

Université de Montréal

Désordres immunitaires induits par des concentrations subtoxiques de
méthyl-mercure sur les lymphocytes T murins

Par
Say-Ry Pheng

Département de Médecine du Travail et d'Hygiène du Milieu
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade
Maître ès Science (M.Sc.) en hygiène du travail et de l'environnement
Orientation : Toxicologie de l'environnement

Avril 1998

© Say-Ry Pheng, 1998



WA
5
U58
1998
V.014

4 28 10 11 1998

Université de Montréal

Exemples d'activités réduites par des concentrations sérologiques de
anticorps dirigés aux IgG sériques T murins

200-10-1000

Département de Médecine du Travail et d'Hygiène du Milieu
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade
de Maître en Sciences (M.Sc.) en Hygiène du Travail et de l'Environnement
Université Laval - Québec

1998



200-10-1000

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Désordres immunitaires induits par des concentrations subtoxiques de
méthyl-mercure sur les lymphocytes T murins

présenté par :

Say-Ry Pheng

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Robert TARDIF	Président-rapporteur
Docteur Saroj CHAKRABARTI	Directeur de recherche
Docteur Lucie LAMONTAGNE	Co-directrice de recherche
Docteur Denise BÉLANGER	Membre du jury

Mémoire accepté le : 17 septembre 1998

SOMMAIRE

Le mercure est un contaminant omniprésent dans l'environnement et qui peut provoquer plusieurs effets indésirables sur l'organisme vivant. La forme organique, tel le chlorure de méthyl-mercure (MeHgCl), est la plus toxique chez les animaux et l'humain à cause de sa haute liposolubilité. A de fortes doses, le MeHgCl est neurotoxique et peut entraîner la mort chez un l'animal ou l'humain, comme il a été constaté lors de la maladie de Minamata. À des doses plus faibles, par contre, il entraîne des réactions contradictoires chez les animaux de laboratoire. Ainsi, selon la lignée de souris et de rats, le mercure perturbe le système immunitaire de telle sorte qu'une immunosuppression ou une maladie auto-immunitaire se développe. Notre étude consiste à identifier le(s) mécanisme(s) qui pourrait(ent) expliquer cette différence de réponse au mercure chez deux lignées murines, c'est-à-dire que la lignée C57BL/6 (H-2^b), résistante à l'auto-immunité mais qui développe une immunosuppression, et la lignée SJL (H-2^s) sensible à la maladie auto-immune induite par le mercure.

Afin d'expliquer cette différence, nous avons vérifié si de faibles concentrations de MeHgCl induisaient une immunosuppression chez la souris C57BL/6 suite à une augmentation du processus de mort cellulaire programmée (apoptose) chez les lymphocytes T spléniques et thymiques, ou, au contraire, une immunostimulation chez la souris SJL via une résistance au processus apoptotique. Pour vérifier ces hypothèses, des lymphocytes spléniques et thymiques de la souris C57BL/6 et SJL ont été mis en contact, *in vitro*, avec différentes concentrations subtoxiques de MeHgCl (0.001 à 1 μ M) pendant 48 h. Les lymphocytes apoptotiques ont été détectés par des modifications morphologiques et par la fragmentation de leur ADN en cytofluorométrie. Ces cellules apoptotiques ont alors été identifiées par marquage avec des anticorps monoclonaux anti-récepteurs spécifiques aux lymphocytes T. De plus, les fonctions métaboliques de ces lymphocytes ont été analysées par une méthode colorimétrique.

Nous avons montré que les lymphocytes spléniques totaux et, en particulier, la sous-population de lymphocytes CD4⁺ de la souris C57BL/6 étaient plus sensibles à

l'apoptose induite par le MeHgCl que ceux de la souris SJL. Ces splénocytes totaux et les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ de souris C57BL/6 étaient davantage sensibles à cet effet du MeHgCl lorsque stimulés par la concanavalin A (Con A), tandis que ceux de SJL demeuraient résistants à l'apoptose. De plus, certains lymphocytes morphologiquement apoptotiques se sont avérés être hyperploïdes, suggérant une apoptose post-stimulation induite par le MeHgCl. Quant aux thymocytes des deux lignées de souris, le MeHgCl n'a produit que peu d'effet sur ces populations, mais, en présence de Con A, les thymocytes de la souris C57BL/6 ont été plus fortement stimulés. Ces différences de réponses entre les lymphocytes matures spléniques et immatures thymiques à l'induction d'une apoptose post-stimulation indique que le MeHgCl interagit différemment, chez les deux lignées de souris, avec les facteurs responsables du processus apoptotique.

Par ailleurs, nous avons montré que le MeHgCl était capable de perturber l'activité métabolique mitochondriale des lymphocytes spléniques et thymiques de la souris C57BL/6 tandis que le métabolisme des lymphocytes de la souris SJL était peu altéré. En présence de Con A, par contre, le MeHgCl affectait beaucoup moins l'activité métabolique des lymphocytes de la souris C57BL/6. Des expériences d'induction d'apoptose via le système Fas/Fas L ont montré que les lymphocytes spléniques ou thymiques qui exprimaient la molécule Fas étaient sensibles à l'apoptose induite par des concentrations faibles de MeHgCl. De plus, les lymphocytes exprimant la chaîne V β 8 du TCR, chez la souris C57BL/6 seulement, étaient plus sensibles à l'induction d'une apoptose par le MeHgCl.

Nos études montrent, pour la première fois, que le MeHgCl peut induire un processus apoptotique de façon sélective chez des lymphocytes T stimulés, Fas⁺ et surtout de la famille des V β 8 chez une lignée de souris sensible à l'immunodéficiences. Par contre, les lymphocytes T de la souris SJL résistaient à l'induction d'apoptose malgré une stimulation par le MeHgCl. Ces résultats suggèrent que la sensibilité d'un individu à une exposition à des concentrations subtoxiques de MeHgCl pourrait s'exprimer soit par une déficience ou une stimulation des cellules immunitaires, en fonction de facteurs génétiques, consécutifs aux processus d'apoptose post-stimulation.

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xx
Dédicace.....	xxii
CHAPITRE PREMIER : ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Sources de mercure dans l'environnement.....	2
1.1.1 <i>Sources naturelles</i>	2
1.1.2 <i>Sources reliées aux activités humaines</i>	2
1.1.3 <i>Transformation du mercure dans l'environnement</i>	3
1.1.4 <i>Utilisation du mercure</i>	3
1.2 Métabolisme du MeHg.....	4
1.2.1 <i>Absorption</i>	4
1.2.1.1 <i>Voie orale</i>	4
1.2.1.2 <i>Voies pulmonaire et cutanée</i>	4
1.2.2 <i>Distribution corporelle du MeHg</i>	5
1.2.3 <i>Biotransformation</i>	5
1.2.4 <i>Élimination</i>	6

1.3	Manifestations cliniques de la toxicité du MeHg.....	7
1.3.1	<i>Effets sur le système nerveux.....</i>	7
1.3.2	<i>Autres atteintes tissulaires.....</i>	9
1.4	Toxicité du MeHg au niveau cellulaire.....	9
1.4.1	<i>Effets sur la membrane cellulaire.....</i>	9
1.4.2	<i>Effets sur les microtubules.....</i>	10
1.4.3	<i>Perturbation de la fonction cellulaire par le mercure.....</i>	11
1.4.3.1	<i>Effets sur la transmission nerveuse.....</i>	11
1.4.3.2	<i>Effets sur la biosynthèse.....</i>	12
1.4.3.3	<i>Effets anti-mitotiques.....</i>	12
1.5	Effets du mercure sur le système immunitaire.....	13
1.5.1	<i>L'immunodéficience induite par le MeHg.....</i>	14
1.5.1.1	<i>Altération de l'immunité cellulaire ou humorale.....</i>	15
1.5.1.2	<i>Réponses lymphocytaires aux mitogènes.....</i>	15
1.5.1.3	<i>Effets toxiques du MeHg sur les cellules immunitaires.....</i>	16
1.5.1.3.1	<i>Microtubules, synthèse des protéines, canaux ioniques et membrane cellulaire.....</i>	16
1.5.1.3.2	<i>Métabolisme du glucose.....</i>	17
1.5.1.3.3	<i>Effet du mercure sur la biodisponibilité du glutathion.....</i>	17
1.5.2	<i>L'auto-immunité induite par le MeHg.....</i>	18
1.5.2.1	<i>La maladie auto-immune.....</i>	18
1.5.2.2	<i>La sensibilité génétique.....</i>	19
1.5.2.3	<i>Les effets sur les lymphocytes T.....</i>	20

1.5.2.4	<i>Les effets sur les lymphocytes B</i>	22
1.5.2.5	<i>Les mécanismes d'induction de l'auto-immunité</i>	23
1.6	Processus de différenciation et de maturation des lymphocytes T.....	23
1.6.1	<i>La différenciation et la maturation des lymphocytes T, et le microenvironnement thymique</i>	24
1.6.1.1	<i>Les sélections positive et négative</i>	26
1.6.1.2	<i>Les activateurs et inhibiteurs de la différenciation et de la maturation des lymphocytes T</i>	27
1.6.1.3	<i>Les marqueurs de surface des lymphocytes T</i>	27
1.6.1.3.1	<i>Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)</i>	28
1.6.1.3.2	<i>Les récepteurs de cellules T (TCR)</i>	28
1.6.1.3.3	<i>L'antigène Thy-1</i>	29
1.6.1.3.4	<i>Les antigènes CD4 et CD8</i>	29
1.6.1.4	<i>La migration vers la périphérie</i>	30
1.6.1.5	<i>La rate comme organe effecteur de la réponse immune</i>	30
1.7	L'apoptose.....	31
1.7.1	<i>Les rôles physiologiques de l'apoptose</i>	32
1.7.2	<i>Les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose</i>	33
1.7.2.1	<i>Morphologie des cellules apoptotiques</i>	33
1.7.2.2	<i>Altérations biochimiques des cellules apoptotiques</i>	34
1.7.2.2.1	<i>Modifications nucléaires</i>	34
1.7.2.2.2	<i>Modifications cytoplasmiques</i>	35
1.7.2.3	<i>Les mécanismes de l'apoptose</i>	35
1.7.2.4	<i>L'apoptose versus la nécrose</i>	36

1.7.2.5	<i>L'importance de l'apoptose en immunologie</i>	37
1.7.2.5.1	<i>Les facteurs inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose</i>	37
1.7.2.5.1.1	<i>L'irradiation</i>	38
1.7.2.5.1.2	<i>Le gène c-myc</i>	38
1.7.2.5.1.3	<i>Le gène p53</i>	38
1.7.2.5.1.4	<i>Le gène Fas APO-1</i>	39
1.7.2.5.1.5	<i>Les glucocorticoides</i>	40
1.7.2.5.1.6	<i>Les métaux lourds</i>	41
1.7.2.5.1.7	<i>Le gène B-cell lymphoma/leukemia-2 (bcl-2)</i>	42
1.8	Objectifs de ce travail.....	43
CHAPITRE DEUXIÈME : MATÉRIEL ET MÉTHODES		44
2.1	Les animaux de laboratoire.....	45
2.2	Les préparations cellulaires.....	45
2.3	Les traitements <i>in vitro</i> avec le MeHgCl.....	46
2.4	Les immunomarquages et la cytofluorométrie.....	46
2.4.1	<i>Marquage avec l'anticorps anti-Thy1.2 et l'iodure de propidium</i>	46
2.4.2	<i>Double marquage avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8</i>	47
2.4.3	<i>Double marquage avec les anticorps anti-CD4 et anti-Vβ6, Vβ8 ou Vβ14</i>	47
2.4.4	<i>Marquage des fragments d'ADN : méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling)</i>	48

2.5 La stimulation blastique.....	49
2.6 La cytofluorométrie en flux.....	49
2.7 Analyses statistiques.....	50
CHAPITRE TROISIÈME : RESULTATS.....	52
3.1 Détermination des populations cellulaires morphologiquement normales et apoptotiques chez les thymocytes et les splénocytes de souris C57BL/6 et SJL.....	53
3.1.1 <i>Détermination des lymphocytes morphologiquement normaux et apoptotiques par les différences de taille et de réfringence.....</i>	<i>53</i>
3.1.2 <i>Détermination des lymphocytes morphologiquement normaux et apoptotiques par la présence de cassures d'ADN détectées par le test TUNEL.....</i>	<i>55</i>
3.2 Évaluation des populations cellulaires morphologiquement normales et apoptotiques chez les splénocytes et les thymocytes de souris C57BL/6 et SJL traités avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou de dexaméthasone.....	58
3.2.1 <i>Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl.....</i>	<i>58</i>
3.2.2 <i>Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence de concanavalin A.....</i>	<i>60</i>
3.2.3 <i>Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence de dexaméthasone.....</i>	<i>62</i>
3.2.4 <i>Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl, tel que déterminés par le test TUNEL.....</i>	<i>66</i>

3.3	Évaluation des populations cellulaires morphologiquement normales et apoptotiques, chez les lymphocytes T spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL, en présence de différentes concentrations de MeHgCl.....	71
3.3.1	<i>Analyse des cellules spléniques Thy1+ normales et hypoploïdes de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl.....</i>	71
3.3.2	<i>Analyse des cellules thymiques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl.....</i>	73
3.3.3	<i>Analyse des cellules spléniques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la Con A.....</i>	77
3.3.4	<i>Analyse des cellules thymiques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la Con A.....</i>	80
3.3.5	<i>Analyse des cellules spléniques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....</i>	83
3.3.6	<i>Analyse des cellules thymiques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....</i>	83
3.3.7	<i>Analyse des cellules spléniques Thy1+ hyperploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou de dexaméthasone.....</i>	87
3.3.8	<i>Analyse des cellules thymiques Thy1+ hyperploïdes, de souris C57BL/6 et SJL traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou de dexaméthasone.....</i>	90
3.4	Analyse des sous-populations de lymphocytes spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, lorsque traitées in vitro avec des concentrations subtoxiques de MeHgCl.....	94
3.4.1	<i>Sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl.....</i>	94

3.4.2	<i>Sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la concanavalin A.....</i>	97
3.4.3	<i>Sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....</i>	100
3.4.4	<i>Sous-populations lymphocytaires de cellules thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl.....</i>	100
3.4.5	<i>Sous-populations lymphocytaires de cellules thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la Con A.....</i>	105
3.4.6	<i>Sous-populations lymphocytaires de cellules thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....</i>	105
3.5	Activité métabolique de cellules spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL.....	108
3.5.1	<i>Étude de l'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL, en contact avec différentes concentrations de MeHgCl.....</i>	111
3.5.2	<i>Étude de l'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL, en contact avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence de Con A.....</i>	111
3.6	Étude de l'activité métabolique et de l'identification des sous-populations de cellules spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, en présence d'anticorps anti-Fas.....	114
3.6.1	<i>L'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, en contact avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence d'anticorps anti-Fas.....</i>	117
3.6.2	<i>Les sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....</i>	120

3.7 Les sous-populations V β 6, V β 8 et V β 14 des lymphocytes CD4+, de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	120
CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION.....	127
4.1 Induction de lymphocytes T morphologiquement apoptotiques par le MeHgCl.....	128
4.2 Effets de la stimulation blastique sur l'apoptose induite par le MeHgCl chez les lymphocytes T de souris C57BL/6 et SJL.....	130
4.3 Sensibilité des différentes sous-populations de lymphocytes T spléniques et thymiques à l'apoptose induite par le MeHgCl.....	132
4.4 Modulation de l'activité métabolique de lymphocytes spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL en présence de MeHgCl.....	134
4.5 Le rôle de la molécule Fas dans l'apoptose induite par le MeHgCl chez les lymphocytes spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL.....	137
4.6 Effets du MeHgCl sur les différentes familles de CD4+V β + chez les splénocytes de souris C57BL/6 et SJL.....	139
4.7 Importance de l'apoptose dans la sensibilité génétique aux effets du MeHgCl.....	140
4.8 Conclusions.....	142
BIBLIOGRAPHIE.....	144
ANNEXE.....	xxiii
REMERCIEMENTS.....	xxv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Pourcentages de cellules dans les régions R1 et R2 de l'analyse cytofluorométrique, tels que déterminés par le test TUNEL chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL après différents temps de culture57
Tableau II	Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....59
Tableau III	Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes du thymus de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....61
Tableau IV	Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques, (R2) chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....63
Tableau V	Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes du thymus de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....64
Tableau VI	Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....65
Tableau VII	Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes du thymus de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....67
Tableau VIII	Pourcentages de cellules apoptotiques déterminés par le test TUNEL chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....68

Tableau IX	Pourcentages de cellules apoptotiques déterminés par le test TUNEL chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de la concanavalin A.....	70
Tableau X	Pourcentages de lymphocytes CD4+V β 6+, CD4+V β 8+ et CD4+V β 14+ en provenance de la rate de souris C57BL/6 et SJL, traités <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Analyse cytofluorométrique des populations cellulaires du thymus et de la rate des souris C57BL/6 et SJL selon les paramètres FSC et SSC.....	54
Figure 2	Analyse cytofluorométrique des populations cellulaires du thymus et de la rate des souris C57BL/6 et SJL , traitées avec la dexaméthasone, selon les paramètres FSC et SSC.....	56
Figure 3	Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	72
Figure 4	Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	74
Figure 5	Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	75
Figure 6	Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	76
Figure 7	Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....	78
Figure 8	Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....	79

- Figure 9** Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....81
- Figure 10** Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....82
- Figure 11** Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....84
- Figure 12** Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....85
- Figure 13** Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....86
- Figure 14** Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes et normales de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....88
- Figure 15** Cellules spléniques hyperploïdes de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A et de dexaméthasone.....89
- Figure 16** Cellules spléniques hyperploïdes de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A et de dexaméthasone.....91

- Figure 17** Cellules thymiques hyperploïdes de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A et de dexaméthasone.....92
- Figure 18** Cellules thymiques hyperploïdes de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A et de dexaméthasone.....93
- Figure 19** Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ et CD8+ de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.....95
- Figure 20** Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ et CD8+ de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.....96
- Figure 21** Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ et CD8+ de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....98
- Figure 22** Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ et CD8+ de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....99
- Figure 23** Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ et CD8+ de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....101

Figure 24	Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4 et CD8 de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....	102
Figure 25	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	103
Figure 26	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	104
Figure 27	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....	106
Figure 28	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....	107
Figure 29	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....	109
Figure 30	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.....	110
Figure 31	Activité métabolique des cellules spléniques de souris C57BL/6 et SJL traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	112

Figure 32	Activité métabolique des cellules thymiques de souris C57BL/6 et SJL, traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl.....	113
Figure 33	Activité métabolique des cellules spléniques de souris C57BL/6 et SJL, traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....	115
Figure 34	Activité métabolique des cellules thymiques de souris C57BL/6 et SJL, traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.....	116
Figure 35	Activité métabolique des cellules spléniques de souris C57BL/6 et SJL, traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....	118
Figure 36	Activité métabolique des cellules thymiques de souris C57BL/6 et SJL, traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....	119
Figure 37	Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4 et CD8 de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/ SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....	121
Figure 38	Sous-populations de lymphocytes T spléniques de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....	122
Figure 39	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/ SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....	123
Figure 40	Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4 et CD8 de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut), traitées <i>in vitro</i> avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.....	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABS :	Albumine bovine sérique
Ach :	Acétylcholine
Ac :	Anticorps
APO-1 :	Apolipoprotéine-1
bcl-2 :	Gène de la leucémie des lymphocytes B (B cell leukemia)
CD :	Groupe de différenciation (cluster differentiation)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
Con A :	Concanavalin A
CPA :	Cellules présentatrices d'antigène
Cs A :	Cyclosporine A
FITC :	Fluorescéine isothiocyanate
FSC :	Indice de réflexion à angle de 90° (Forward Scatter)
GSH :	Glutathion
IFN- γ :	Interféron- γ
IL :	Interleukine
IP :	Iodure de propidium
L-Cys :	L-cystéine
LPS :	Lipopolysaccharide
MeHgCl :	Chlorure de méthyl-mercure (methyl-mercury chloride)
MSP :	Méthosulfate de phénazine
MTS :	Sel de tétrazolium
NK :	Cellules tueuses naturelles (natural killer)
PBS :	Tampon salin phosphate (phosphate buffer solution)
PE :	Phycoérythrine
SSC :	Indice de réflexion à angle de 0° (Side Scatter)
SVF :	Serum de veau foetal
Th :	Lymphocytes T « helper »

- TCR : Récepteur de cellule T (T cell receptor)
V β : Région variable de la chaîne β
WHO : World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

*À mes parents,
pour leur bienveillance et
leur support tout au long
de mes études.*

*À mon fiancé,
qui est entré dans ma vie.*

CHAPITRE PREMIER

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Sources de mercure dans l'environnement

Le mercure est un contaminant omniprésent dans l'environnement sous formes élémentaire, inorganique ou organique (Friberg et Vostol, 1971). La forme de mercure connue pour être la plus toxique est le mercure complexé avec un ou deux atomes de carbone, c'est-à-dire le mercure organique (Hill et Soares, 1987), tel que le MeHgCl. Ce type de mercure peut provenir de sources naturelles ou être généré par l'activité humaine.

1.1.1 Sources naturelles

Le MeHg présent dans l'environnement est généré par le dégazement de la croûte terrestre, par les émissions volcaniques et par l'évaporation de l'eau des grands lac ou des océans (National Academic of Sciences, 1978). Le mercure libéré dans l'environnement représente environ 2,700 à 6,000 tonnes par année (Lindberg *et al.*, 1987). Le MeHg peut aussi être produit par la méthylation du mercure inorganique (Hg^{++}) effectuée par les micro-organismes présents dans l'eau et les sédiments. Chez les mammifères, cette réaction de transformation est aussi réalisée par les macrophages et les micro-organismes intestinaux.

1.1.2 Sources reliées aux activités humaines

Outre les sources naturelles, le mercure peut être libéré dans l'environnement par diverses activités humaines telles que : les activités minières, la combustion fossile, la production de ciment, etc. Ces activités génèrent de 2,000 à 3,000 tonnes par année de mercure (Seco, 1987).

1.1.3 Transformation du mercure dans l'environnement

Le mercure inorganique présent dans le sol et dans l'eau peut être transformé en mercure métallique (Hg^0) et retourné dans l'atmosphère. Cependant, le mercure retrouvé dans les sédiments peut être transformé en mercure organique par les réactions de méthylation assumées par les microorganismes aérobiques ou anaérobiques. Le mercure méthylé libéré dans l'eau s'accumule principalement dans les poissons ou dans les fruits de mer. Ils représentent une source importante d'intoxication pour l'humain et les animaux (Takizawa, 1979).

1.1.4 Utilisation du mercure

Le mercure a été largement utilisé dans les industries électriques pour la fabrication de lampes, d'instruments industriels de contrôle, des tube fluorescents et d'amalgames dentaires (Frykholm, 1970). De plus, le mercure est utilisé dans la séparation de l'or et de l'argent et dans la fabrication d'appareils scientifiques de précision, comme les thermomètres, les manomètres ou l'appareil de Van Skyke (Harrington, 1974). Les différents dérivés de mercure peuvent être utilisés dans la fabrication de peintures et de crèmes cutanées pour blanchir. Les composés de mercure organique ont été surtout utilisés dans l'agriculture comme insecticides, fongicides et bactéricides, et dans les industries de papier (Lauwerys, 1992).

De nos jours, le MeHg est encore utilisé dans certains laboratoires de recherche, dans les amalgames dentaires qui représentent la source importante d'exposition au mercure dans la population en général et, dans certains pays, pour l'extraction de l'or. La possibilité d'exposition de l'homme au mercure demeure donc présente (Junghans, 1983).

1.2 Métabolisme du MeHg

1.2.1 Absorption

1.2.1.1 Voie orale

La méthylation biologique du mercure et son accumulation subséquente dans la chaîne alimentaire aquatique favorise l'absorption du mercure chez les mammifères sous forme de MeHg. L'absorption par voie orale est la voie d'exposition la plus importante pour la population humaine via la consommation d'aliments contaminés au mercure (poissons, fruits de mer, etc.) (Bakir *et al.*, 1973). Quatre-vingt-quinze pourcent du MeHg de la diète est absorbé surtout au niveau du tube gastro-intestinal chez l'humain (WHO, 1976). Le pH acide et la grande concentration de chlore dans l'estomac favorisent la formation de MeHgCl non-chargé et liposoluble, lequel traverse facilement la barrière gastrique (Rabenstein et Evans, 1978). Chez les rats de laboratoire, l'absorption est effectuée surtout dans le duodénum, suivi de l'iléum et du jéjunum (Sasser *et al.*, 1978).

1.2.1.2 Voies pulmonaire et cutanée

L'absorption du mercure par les voies pulmonaire et cutanée sont importantes seulement en milieu occupationnel (Clarkson *et al.*, 1976). Par voie pulmonaire, le MeHg peut être inhalé sous forme de particules ou de vapeur (Task Group, 1973). Les travaux de Friberg *et al.* (1961) ont montré que l'absorption cutanée est maximale à une dose de 16 mg/ml mais diminue à des doses plus élevées. Cette observation a été expliquée par le fait qu'à une concentration plus faible, la saturation de la liaison au groupement sulfhydryl est augmentée, tandis que des concentrations trop fortes ont pour conséquence une dénaturation des protéines entraînant une inhibition de l'absorption.

1.2.2 Distribution corporelle du MeHg

Une fois absorbé, le MeHg est ensuite distribué dans tout l'organisme. Le mercure sous forme organique, de par sa grande liposolubilité, se distribue facilement dans les différents organes quoique la concentration de mercure varie d'un organe ou d'un tissu à un autre. Un faible pourcentage du mercure total dans les tissus est sous forme inorganique, sauf dans le rein, où s'accumule la majeure partie de cette forme (Magos, 1987). La distribution du MeHg dans les tissus se fait surtout par la circulation sanguine par sa liaison avec les protéines plasmatiques, telles l'albumine et l'hémoglobine (Ballatori, 1991).

L'accumulation du MeHg dans les différents organes peut dépendre de plusieurs facteurs. Chez les rats, le MeHg s'accumule dans le cerveau en fonction du sexe de l'animal. Chez les rats femelles, la concentration de MeHg dans le cerveau augmente plus rapidement que chez les mâles car le ratio cerveau et poids corporel chez les rats femelles est plus élevé que chez les rats mâles (Magos *et al.*, 1981). Chez l'humain, les données sur le ratio du cerveau et du MeHg sanguin ne sont pas connues. De plus, la distribution du MeHg dans le cerveau n'est pas homogène quoique, chez les rats, il a été démontré que la concentration de mercure dans le cortex cérébral était semblable à celle retrouvée dans le cervelet (Somjen *et al.*, 1973). Chez les femmes enceintes exposées au mercure, le MeHg est facilement transporté du sang maternel au fœtus à travers la barrière placentaire et s'accumule surtout dans le cerveau de ce dernier. Des observations similaires ont également été faites chez les rats (Amin-Zaki *et al.*, 1974).

1.2.3 Biotransformation

Le MeHg, contrairement à d'autres composés organomercuriels, est plus résistant à la biodégradation (Magos, 1987). Une faible quantité de MeHg absorbé

peut être biotransformé en mercure inorganique par le mécanisme de déméthylation de l'organisme. La biotransformation du MeHg en mercure inorganique se fait dans le rein (Mottet *et al.*, 1987), dans la rate, par les macrophages et par les bactéries qui composent la flore intestinale (Suda et Takahashi, 1986). Ce processus de conversion en mercure inorganique est l'étape clé du processus de l'élimination du mercure (WHO, 1976).

1.2.4 Elimination

Une fois le MeHg biotransformé en mercure inorganique, ce dernier se concentre ensuite dans le rein, le foie, les fécès, la bile et l'urine (Friberg *et al.*, 1979). Par contre, la majeure partie du MeHg absorbé chez l'humain est éliminé par le foie dans la bile, sous une forme complexée au glutathion, et ensuite dans les fécès (WHO, 1976; Refsvik et Norseth, 1975). Son excrétion par la voie biliaire dépend donc, de la disponibilité du GSH et des protéines de transport (Magos *et al.*, 1978). Le mercure excrété par la bile peut être réabsorbé dans la circulation entérohépatique, ce qui favorise sa rétention dans l'organisme (Friberg *et al.*, 1979). Le MeHg peut également être excrété à l'extérieur de l'organisme par les phanères (ongles, cheveux, etc.) et la transpiration. Durant la période de lactation, le lait maternel est aussi une voie d'élimination du mercure, ce qui a pour conséquence de diminuer la demi-vie biologique du MeHg dans l'organisme jusqu'à environ 45 jours (Greenwood *et al.*, 1978). La demi-vie biologique du MeHg chez l'humain est d'environ 70 jours, mais il peut y avoir des variations individuelles (35 à 189 jours) (Al-Shakristani et Shihab, 1974). Dans un modèle animal, la demi-vie biologique du MeHg est d'environ 7 jours chez les souris de la lignée CBA/J et de 3 jours pour celles de la lignée CFW (Magos, 1987).

1.3 Manifestations cliniques de la toxicité du MeHg

Les études sur le MeHg ont été accentuées suite aux premières intoxications sévères dans la baie de Minamata en 1953-1960 et à Niigata (1965) au Japon. La maladie de Minamata est le premier et le plus important cas de maladies causées par un contaminant de l'environnement présent dans les déchets industriels relargués dans l'eau. Le mercure relargué dans la Baie de Minamata a contaminé la vie aquatique (Harada, 1995). Plus tard, en Irak (1971), la présence de MeHg dans un fongicide utilisé pour la préservation du blé, fut responsable d'une seconde intoxication majeure (Bakir *et al.*, 1973). Depuis ces incidents au Japon et en Irak, les études subséquentes ont démontré que les effets d'une intoxication au MeHg variaient en fonction, principalement, de la dose et du temps d'exposition. Ainsi, la concentration de MeHg permise dans le poisson qui permet d'éviter des effets toxiques est de 0.5 ppm, et ce, pour une consommation de 0.5 livre de poisson (Clarkson et Stockinger, 1972). Chez un adulte, l'ingestion quotidienne de MeHg maximale est de 0.48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel (WHO, 1989). Le MeHg peut avoir des effets indésirables sur plusieurs organes ou tissus comme le rein, le tractus gastro-intestinal, le colon, le foie, le coeur, le cerveau et même l'embryon (Mottet *et al.*, 1987).

1.3.1 Effets sur le système nerveux

Parmi tous les organes et tissus sensibles aux effets toxiques du MeHg, le cerveau est considéré comme le principal organe-cible, que ce soit chez l'humain ou les animaux (Mottet *et al.*, 1987). Des désordres neurologiques sévères ont été observés lors de l'intoxication au MeHg suite à la consommation d'aliments (pain, poissons ou fruits de mer) contaminés. Les premiers symptômes lors de l'intoxication au MeHg sont la paresthésie et des picotements autour de la bouche, des lèvres, des doigts et des orteils. Les symptômes subséquents lors d'une intoxication prolongée

sont l'ataxie, la dysarthrie, la neurasthénie, la fatigue et les maux de tête (Takizawa, 1979).

Le foetus, durant la période prénatale, et les jeunes enfants sont les plus vulnérables aux effets toxiques de MeHg car leur système nerveux est en développement. Ainsi, chez des enfants exposés *in utero* au MeHg, Matsumoto *et al.* (1965) ont observé des neuropathies majeures consistant en une dégénérescence diffuse des neurones et une perte cellulaire dans le cortex cérébral et le cervelet. Choi *et al.* (1978) ont rapporté que le MeHg induisait une migration incomplète et anormale des neurones et perturbait l'organisation dans le cerveau. De plus, il inhibait l'absorption des métabolites essentiels chez le foetus et l'incorporation des acides aminés dans le système nerveux des embryons de rats intoxiqués, en plus de réduire l'ossification des os pariétaux et occipitaux (Fuyuta *et al.*, 1978; Mottet *et al.*, 1987).

Les animaux, tels que les chats, qui avaient consommé des poissons contaminés, ou des animaux de laboratoire traités au mercure, présentaient les mêmes symptômes que ceux observés chez l'humain lors d'une intoxication au MeHg (Inskip et Piotrowski, 1985). Les travaux de Tacheuchi (1968) ont mis en évidence une présence importante de MeHg dans les régions du cortex cérébral et de la couche granulaire du cervelet où des neurones nécrotiques étaient présents. Afin de déterminer le mécanisme par lequel le MeHg pénètre dans le cerveau, Hirayama (1975) a injecté de la L-cystéine (L-Cys) par voie intraveineuse à des animaux de laboratoire et a montré que la présence de L-Cys augmentait la concentration de MeHg dans le cerveau suite à une exposition chronique au MeHgCl. Ces résultats ont permis de postuler que la captation du MeHg par le tissu cérébral était liée au système de transport de la L-Cys au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Oldendorf (1971) avait déjà observé que la L-Cys possédait une affinité pour les acides aminés neutres du système de transport vers le cerveau. Cette découverte a permis à Hirayama (1980) de conclure que le MeHg peut pénétrer dans le cerveau après passage qu'à travers la membrane hémato-encéphalique en se fixant au groupe

SH de la L-Cys. Cependant, il a ajouté que la captation du MeHg dans le cerveau peut être inhibée par la présence des autres acides aminés neutres.

1.3.2 Autres atteintes tissulaires

Bien que le système nerveux soit un des premiers tissus-cibles, il a été démontré que le MeHg pouvait causer plusieurs effets néfastes sur l'organisme en plus des symptômes neurologiques. Des expériences sur les animaux de laboratoire ont montré que le MeHg pouvait être néphrotoxique et avoir des effets néfastes sur la reproduction, en diminuant la spermatogenèse et la mobilité des spermatozoïdes (Popescu, 1978). De plus, des effets embryotoxiques et tératogènes, mutagènes et cancérogènes ont également été rapportés dans la littérature (WHO, 1976).

1.4 Toxicité du MeHg au niveau cellulaire

Toutes les formes de mercure sont réactives, peuvent dénaturer les protéines, inactiver les enzymes et détruire la membrane cellulaire, amenant ainsi la mort cellulaire et la destruction des tissus lorsque la concentration est suffisamment forte (Clarkson, 1972). Le mercure peut aussi détruire efficacement la fonction et la structure cellulaire.

1.4.1 Effets sur la membrane cellulaire

Le MeHg et le mercure inorganique peuvent altérer la perméabilité de la bicouche lipidique (Nakada et *al.*, 1978). Les études sur le système nerveux par Steinwall et Olsson (1969) ainsi que par Chang et Hartman (1972) ont montré que le mercure a le potentiel d'induire rapidement un dysfonctionnement de la barrière hémato-céphalique après son administration. Ce dysfonctionnement pourrait être

expliqué grâce aux résultats de Passow *et al.* (1961) qui ont mis en évidence des dommages dans la structure membranaire suite à la formation de liaisons entre le mercure et les protéines de la membrane cellulaire, détériorant ainsi la fonction de la membrane cellulaire et augmentant sa perméabilité. Ces mécanismes expliquent les dommages observés aux membranes des cellules endothéliales et gliales suite à l'intoxication au mercure.

14.2 Effets sur les microtubules

La différence de toxicité entre le MeHg et le mercure inorganique se situe au niveau de leurs effets spécifiques sur les microtubules (Miura et Imura, 1987). Le MeHg inhibe la division cellulaire en désassemblant les microtubules (Durham *et al.*, 1996) qui forment les fuseaux mitotiques, lesquels agissent comme des structures du cytosquelette (Miura et al., 1978; Lennon *et al.*, 1980). Abe et son équipe (1975) ont observé, pour la première fois, que le MeHg inhibait la polymérisation des microtubules des cellules en culture. Sager (1988), quant à lui, avait découvert sur les cellules HeLa, une diminution du nombre et un désassemblage de microtubules avec des doses variant de 0.5 à 1.0 ou 2.0 μM de MeHg. Les études de Sager *et al.* (1983) ont montré que la perturbation des microtubules cytoplasmiques par le MeHg était fonction du temps d'incubation et de la concentration de MeHg. A une exposition de courte durée (2 h ou moins), les microtubules étaient perturbés par une concentration de 1.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines cellulaires. Cependant, après 6 h d'incubation, les microtubules disparaissaient en présence de concentrations plus faibles de mercure (0.4 à 0.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines). Vogel *et al.* (1985) ont montré que l'inhibition de la polymérisation des tubulines par le MeHg résultait du blocage de seulement deux groupes SH par dimère de tubuline, lesquelles contenant chacune 14 groupes SH libres. La perturbation de l'activité cellulaire associée au système tubuline/microtubule par le MeHg a été démontrée suite à une altération de la tyrosination des tubulines chez les rats traités au MeHg (Ishida *et al.*, 1997). De plus, la présence de composés riches

en groupe SH (glutathion, cystéine et l'acide dimercaptosuccinique) pouvaient prévenir la perturbation des microtubules et contrecarrer les effets du MeHg (Sager *et al.*, 1983). En tenant compte des différentes phases de la formation des microtubules et de la division cellulaire, Sager (1988) conclut que le MeHg arrêta la division cellulaire à la prométaphase.

1.4.3 Perturbation de la fonction cellulaire par le mercure

1.4.3.1 Effets sur la transmission nerveuse

Au niveau du système nerveux central, la dépolymérisation des microtubules des axones de neurones peut aboutir à une diminution du transport axonal (Abe *et al.*, 1975). De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes par lesquels le MeHg affectait la transmission synaptique. Il a été rapporté que le MeHg inhibait la capacité de l'Ach à se lier à ses récepteurs, ce qui suggère que le site de liaison de l'Ach est un endroit-cible pour le MeHg (Shamoo *et al.*, 1976). Dans le cerveau, les fonctions dopaminergiques sont plus sensibles aux effets des métaux lourds lorsque comparées à d'autres systèmes dépendant des neurotransmetteurs. Le MeHg a le potentiel d'inhiber la recapture de la dopamine (IC₅₀, 2.5 µM) et de stimuler le relargage de celle-ci, qui s'accumule, proportionnellement à la concentration du MeHg (Komulainen et Tuomisto, 1981). McKay et son équipe (1986) ont observé que ce relargage de la dopamine se produisait aussi *in vitro* chez les cellules du muscle strié de souris. Ils ont montré que cette libération de la dopamine pouvait être expliquée par le fait que le MeHg augmentait le niveau du L-glutamate. Il a été prouvé, par les travaux de Prasad *et al.* (1980), que le glutamate et le MeHg agissaient synergiquement sur l'inhibition de la croissance cellulaire en culture.

1.4.3.2 Effets sur la biosynthèse

Gruenwedel et Diaham (1982) ont rapporté que le MeHg pouvait causer des changements conformationnels dans la structure des histones des chromatines. Ils ont ensuite suggéré que le MeHg affectait l'expression des gènes sur l'ADN chromosomal par son interaction avec les histones. Plusieurs travaux ont montré que la synthèse des macromolécules était diminuée en présence de 0.1 à 1 μM de MeHg (Gruenwedel et Cruikshank, 1979). Le MeHg, tout comme le mercure inorganique, peuvent inhiber la synthèse d'ADN chez les cellules stimulées par un mitogène mais le mercure organique nécessite une dose 10 fois moins élevée pour induire les mêmes effets que ceux observés avec le mercure inorganique. A une concentration de 10^{-6} M, Nakatsuru *et al.* (1985) ont observé, *in vitro*, une forte inhibition de la synthèse de l'ADN chez des cellules stimulées par un mitogène. Cette altération de la synthèse de l'ADN a été observée non seulement dans le noyau cellulaire, mais aussi dans les mitochondries de cellules nerveuses de chats *in vivo* (Miller *et al.*, 1985). De plus, Nakatsuru *et al.* (1985) ont montré que le mercure réduisait le niveau d'ATP cellulaire et le métabolisme du phosphate inositol, qui sont indépendants l'un de l'autre.

Les études sur les cellules HeLa S3 ont confirmé les résultats à l'effet que le MeHg agissait aussi aux niveaux de la synthèse d'ARN et des protéines, mais la production des protéines était affectée de façon plus importante par le mercure que celles de l'ADN et de l'ARN (Gruenwedel et Cruikshank, 1979).

1.4.3.3 Effets anti-mitotiques

Il a été découvert dans les années 30, que les organo-mercuriels avaient des activités anti-mitotiques (Sass, 1937). Cet effet inhibiteur de la mitose a été observé non seulement dans les cellules animales et humaines, mais aussi dans les cellules végétales (Kostoff, 1940). Une stimulation mitogénique implique une activation des

cellules à l'état de repos (G0) à entrer dans le cycle cellulaire, qui se termine par la mitose. La mitose entraîne une synthèse active des protéines, de l'ARN et de l'ADN, et une augmentation de la taille cellulaire (Ling et Kay, 1975). Vogel et son équipe (1985) ont montré que le mercure augmentait la durée de la phase G1 et diminuait la probabilité de transition cellulaire à la phase suivante lors d'une courte exposition. Lors de traitements à long terme, ils ont montré que le mercure causait l'accumulation de cellules en G2 chez des fibroblastes traités. Plusieurs études ont démontré que la diminution de la division cellulaire observée, en présence du mercure était la conséquence d'une perturbation au niveau du noyau cellulaire c'est-à-dire au niveau des histones (Dieter *et al.*, 1982) ou des microtubules (Vogel *et al.*, 1985).

1.5 Effets du mercure sur le système immunitaire

Les mécanismes de toxicité cellulaire suite à une exposition au mercure ont été étudiés dans une variété de cellules (Ilback, 1991), mais ses effets toxiques sur les cellules du système immunitaire ne sont pas encore très bien connus. Les formes organiques et inorganiques de mercure peuvent perturber les fonctions lymphocytaires chez les cellules de mammifères (Charpentier *et al.*, 1981 ; Nakatsuru *et al.*, 1985). Par contre, des résultats sur les effets immunotoxiques du mercure demeurent contradictoires. Plusieurs groupes de chercheurs ont découvert que le mercure pouvait induire une déficience immunitaire chez les souris et les rats (Koller, 1980). Par contre, d'autres équipes de recherche ont montré que le mercure induisait des réactions auto-immunitaires seulement chez certaines lignées de souris et de rats (Hultman et Johansson, 1991).

1.5.1 L'immunodéficience induite par le MeHg

L'immunodéficience se caractérise par l'absence ou la détérioration de la fonction normale d'un ou de plusieurs éléments du système immunitaire. Les immunodéficiences pathologiques peuvent s'exprimer à deux niveaux : soit dans des lymphocytes B et/ou dans les lymphocytes T (Roitt *et al.*, 1996^d).

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de l'immunité humorale. Ils sont identifiables par la présence d'immunoglobulines à la surface de leur membrane cellulaire (Burrell *et al.*, 1992). Suite à leur rencontre avec leur antigène spécifique, ils se multiplient et se différencient en plasmocytes, lesquels produisent une grande quantité d'Ac qui seront subséquentement excrétés. Les anticorps sont des glycoprotéines retrouvées dans le sang et les fluides tissulaires. Ces Ac se lient aux antigènes qui ont stimulé leur production pour les neutraliser ou les détruire (Roitt, 1996^a).

Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire laquelle nécessite le contact entre plusieurs types de cellules ayant chacune des fonctions bien définies. Les lymphocytes T jouent un rôle important dans l'initiation, l'amplification, la régulation et l'expression de la réponse immune (Burrell *et al.*, 1992). La déficience en lymphocytes T peut amener non seulement à une déficience dans l'immunité cellulaire mais aussi, dans l'immunité humorale via ses interactions avec les lymphocytes B (Roitt *et al.*, 1996^d).

La réponse des cellules immunitaires aux effets toxiques du mercure est complexe et dépend en grande partie du niveau d'exposition. Shenker *et al.* (1992) ont montré qu'à une exposition élevée, le MeHg induisait la mort cellulaire, tandis qu'une exposition faible et chronique déclenchait des effets insidieux associés à la dépression des fonctions immunes.

1.5.1.1 Altérations de l'immunité cellulaire ou humorale

Le mercure est connu, depuis longtemps, comme un agent immunosuppresseur. Il induit une immunodéficience en altérant les fonctions lymphocytaires impliquées dans l'immunité humorale ou cellulaire. L'immunité humorale est perturbée par le mercure suite à une diminution de la synthèse des anticorps, tels que les IgG, par les lymphocytes B de souris (Koller *et al.*, 1977). Cette réduction de la concentration d'anticorps sériques pourrait être due à une diminution de l'activation polyclonale des lymphocytes B par le mercure (Nakatsuru *et al.*, 1985). La déficience dans l'immunité cellulaire se traduit aussi par une réduction de la prolifération des lymphocytes T en présence d'un mitogène (Gaworski et Sharma, 1978; Shenker *et al.*, 1992). Charpentier *et al.* (1981) et Lawrence *et al.* (1987) ont rapporté une diminution de la réactivité des cellules T et B sanguines chez les personnes exposées au MeHg. L'immunosuppression peut être induite *in vivo* chez les souris avec des doses de 1 à 10 ppm de MeHgCl (Koller *et al.*, 1977). Les animaux traités avec le mercure se sont montrés aussi plus susceptibles aux agents infectieux (Koller, 1975; Gainer, 1977).

1.5.1.2 Réponses lymphocytaires aux mitogènes

L'inhibition de la réponse des lymphocytes traités par le mercure à la stimulation par un mitogène a été observée chez les lymphocytes sanguins humains circulants (Rozyrkowa et Raczkewicz, 1977), chez les lymphocytes murins du thymus (Hirokawa et Hayashi, 1980) et de la rate (Nakatsuru *et al.*, 1985) et ce, autant après un court temps d'exposition (heures) (Rozyrkowa et Raczkewicz, 1977) qu'une longue période de contact (jours) (Koerker, 1980). Nakatsuru et son équipe (1985) ont observé une inhibition de la stimulation blastique des lymphocytes T et B par la concanavalin A (Con A) et le lipopolysaccharide (LPS) lorsqu'ils sont incubés, *in vitro*, avec du MeHg. Ils ont aussi rapporté une diminution de la synthèse d'ADN de 70 % à 10 % avec des doses de MeHgCl de 10^{-7} et 10^{-6} M, respectivement, chez des

lymphocytes stimulés par un mitogène. De plus, leurs résultats ont aussi montré une inhibition du métabolisme du phosphate inositol par les lymphocytes traités avec du MeHg. Ortega *et al.* (1997), quant à eux, ont également observé une diminution dans la capacité des lymphocytes à métaboliser et donc, à proliférer, en présence d'un agent mitogène, obtenus à partir de rats traités avec 500 µg/L de MeHgCl.

1.5.1.3 Effets toxiques du MeHg sur les cellules immunitaires

Ces immunodéficiences induites par le MeHgCl pourraient résulter de plusieurs mécanismes. Le MeHg a été montré plus toxique que le mercure inorganique dû à sa grande capacité à traverser la membrane plasmique et donc, à se lier aux groupements actifs dans le noyau, dans le réticulum endoplasmique et dans d'autres organelles (Shenker *et al.*, 1992).

1.5.1.3.1 Microtubules, synthèse des protéines, canaux ioniques et membrane cellulaire

Tel que déjà observé chez les autres types de cellules, le MeHgCl peut perturber la fonction lymphoïde par une altération des microtubules (Miura et Imura, 1987; Healthier *et al.*, 1996), des histones (Dieter *et al.*, 1982), ou par des modulations dans les processus de tyrosination des tubulines (Ishida *et al.*, 1997), amenant alors une réduction de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN et protéines) (Gruenwedel et Cruikshank, 1979). La modulation des échanges ioniques à travers la membrane plasmique peut altérer l'homéostasie cellulaire. Ainsi, chez les lymphocytes T (Tan *et al.*, 1993) et B (Shenker *et al.*, 1993) humains, il a été démontré que l'accumulation de Ca^{+2} intracellulaire se faisait très rapidement avec des concentrations de MeHgCl de l'ordre du micromolaire. Cette accumulation de Ca^{+2}

dans la cellule est associée à un signal de transduction et d'activation de cellules vers des phénomènes amenant une disparition cellulaire (Pollard et Hultman, 1997).

1.5.1.3.2 Métabolisme du glucose

Aussi, le MeHg peut affecter les voies métaboliques de glucose, ce qui aurait pour conséquence, d'inhiber directement la réponse immune (Vallée et Ulmer, 1972). Il a été démontré que la voie métabolique du glucose Embden-Meyerhof produit la plus grande partie de l'énergie nécessaire aux lymphocytes dans le thymus (Jemelin et Frei, 1970 ; Lengle *et al.*, 1978). Le MeHgCl peut interférer directement dans cette voie par une diminution de l'oxydation du glucose ayant pour effet de réduire la concentration de NADPH cellulaire (Horecker et Hiatt, 1958). Les cellules en prolifération ou en différenciation, comme les cellules souches dans la moelle osseuse, sont plus vulnérables à des dommages de ce genre par le MeHgCl que les lymphocytes matures et stables de la rate. La détérioration de cette voie métabolique peut aussi résulter en une inhibition des activités enzymatiques comme, par exemple, celle de l'enzyme kinase pyruvate, une enzyme impliquée directement dans la production de pyruvate à partir du glucose (Dieter *et al.*, 1983). En 1969, Dieter avait déjà observé une inhibition de l'activité de la lactate déshydrogénase dans le thymus et de la monophosphate hexose dans le thymus et dans la rate.

1.5.1.3.3 Effet du mercure sur la biodisponibilité du glutathion

Le GSH est un tripeptide essentiel protégeant les cellules contre des agents oxydants et des radicaux libres qui peuvent endommager la cellule. Le GSH est essentiel aux mitochondries pour maintenir l'homéostasie du Ca^{+2} (Beatrice *et al.*, 1984) et il fournit le groupement thiol nécessaire à la régulation de la perméabilité de la membrane interne des cellules (Kosower et Kosower, 1983). Etant donné que les

mitochondries ne possèdent pas de γ -glutamyl-cystéinyl synthétase, le GSH mitochondriale provient du cytosol. Comme les mitochondries sont exemptes de catalase pour la détoxification des hydroperoxides, elles dépendent entièrement de la GSH peroxidase (Chance *et al.*, 1979). L'intoxication au MeHg chez les souris a réduit de façon marquée le GSH dans le foie et le cerveau. De plus, tel qu'observé *in vivo*, le MeHg induit une diminution de GSH chez les cellules en culture, ce qui pourrait expliquer la vulnérabilité des cellules neuronales (Andersen et Andersen, 1993 ; Cantoni *et al.*, 1982).

1.5.2 L'auto-immunité induite par le MeHg

Les réponses auto-immunes sont des réponses immunes dirigées contre les composants normaux du soi. Il consiste en la production d'auto-Ac par les cellules B contre des auto-antigènes, après stimulation par les lymphocytes T CD4+ via les cytokines produites. Les réponses auto-immunes cellulaires peuvent être médiées par les lymphocytes T CD4+ et/ou les lymphocytes CD8+ cytotoxiques (Bigazzi, 1997).

Les lymphocytes T et B auto-réactifs sont générés occasionnellement chez un individu normal mais ils sont éliminés rapidement. Dans un organisme normal, ces lymphocytes sont complètement ou fortement inactivés, mais sous certaines conditions, ils peuvent être stimulés et induire une maladie auto-immune. Par contre, en absence de cellules T fonctionnellement auto-réactives, les lymphocytes B auto-réactifs sont incapables de produire des auto-Ac (Dighiero *et al.*, 1983).

1.5.2.1 La maladie auto-immune

Des études sur les animaux de laboratoire ont montré le développement d'une glomérulonéphrite suite à une exposition à des doses faibles de mercure, alors qu'à des doses fortes, le mercure produisait des lésions tubulaires (Bariety *et al.*, 1971). Chez

l'humain, le mercure semble aussi induire une auto-immunité rénale tout comme chez les animaux de laboratoire (Soleo *et al.*, 1997). Les observations faites par Kazantzis *et al.* (1962) ont montré le développement d'un syndrome néphrotique chez les travailleurs exposés au mercure, ce qui pourrait être dû à une accumulation croissante de complexes immuns circulants (Stonard *et al.*, 1983) et d'une glomérulonéphrite à complexes immuns (Kibukamusoke *et al.*, 1974), suggérant un rôle stimulateur du mercure sur le système immunitaire (Hultman et Enestrom, 1992). Lors d'études sur les rongeurs, le mercure a également induit la formation des complexes immuns contre la membrane basale des glomérules chez certaines lignées de rats (Michaelson *et al.*, 1985). La dépendance génétique du développement des complexes immuns a aussi été observée chez différentes lignées de souris (Hultman et Eneström, 1989).

Lors du développement de la maladie auto-immune induite par le mercure, la présence d'Ac auto-réactifs comme, par exemple, les anticorps anti-laminines (Soleo *et al.*, 1997) et anti-fibrillarines (Mirtcheva *et al.*, 1989) ont été observés dans la circulation sanguine. De plus, il a été montré que, chez certaines lignées de souris, le mercure pourrait induire la production d'auto-anticorps anti-chromatines qui agissait directement sur les histones (Hultman *et al.*, 1989). L'auto-immunité rénale se développait surtout suite à une production d'anticorps contre les cellules du néphron et contre la membrane basale causant ainsi la glomérulonéphrite (Druet *et al.*, 1978).

1.5.2.2 La différence génétique

Le mercure inorganique (HgCl_2) a été le premier composé mercuriel associé au développement d'une auto-immunité. Plusieurs travaux ont montré une relation entre le développement de l'auto-immunité et la génétique des animaux étudiés (Sapin *et al.*, 1981). Chez la souris, il a été montré que les lignées portant l'haplotype H-2^s était plus sensibles au développement de réactions auto-immunitaires induites par le mercure (Hultman et Eneström, 1987), telles que les lignées SJL, ASW ou B10.S

(Hultman *et al.*, 1989 ; Reuter *et al.*, 1989). Par contre, les souris appartenant aux lignées H-2^b comme les souris C57BL/6 ou BALB/c et H-2^d comme les souris DBA (Hultman et Eneström., 1992) étaient plus résistantes à l'auto-immunité. Chez les rats, ceux de type Brown-Norway (NB) répondaient au HgCl₂ par une maladie auto-immune, alors que les rats Lewis (LEW) n'étaient pas susceptibles au développement de cette auto-immunité (Hirsch *et al.*, 1982). Des études *in vivo*, chez les animaux de laboratoire, ont montré que les souris qui répondaient fortement à un traitement au HgCl₂ accumulaient plus de mercure dans les organes tels que la rate, le rein et le foie (Griem *et al.*, 1997). Chez l'humain, le niveau de risque relié au développement des cellules réactives contre le soi induit par le mercure n'a pas encore été évalué jusqu'à présent. Cependant, étant donné que l'auto-immunité induite par des composés chimiques est très souvent contrôlée génétiquement (Gleichmann *et al.*, 1989), il est possible que de telles réactions immunes causées par le mercure soient régulées génétiquement, tel observé chez les rongeurs (Sapin *et al.*, 1984).

1.5.2.3 Les effets sur les lymphocytes T

L'auto-immunité induite par le mercure est dépendante des lymphocytes T, particulièrement des lymphocytes Th (Hultman *et al.*, 1995). Les lymphocytes T localisés dans les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate et les ganglions lymphatiques, sont les plus susceptibles d'être stimulés par le mercure, tandis que la distribution des populations lymphocytaires dans le thymus ne semble pas affectée par le HgCl₂ (Pelletier *et al.*, 1987). Chez les souris BALB/c, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ répondent à l'effet inductif du HgCl₂ par la prolifération et la transformation blastique (Jiang et Moller, 1995). De plus, les études de Pelletier et son équipe (1987) ont montré l'absence de réponse des lymphocytes T CD8⁺ supresseurs/cytotoxiques chez des rats traités au HgCl₂. Ainsi, une perte de fonction de ces lymphocytes causée par le mercure a été observée par Weening *et al.* (1981). Des observations similaires ont aussi été faites par Jiang et Möller (1995), mais ils ont montré que les cellules

CD4⁺ jouaient un rôle crucial dans l'activation par le HgCl₂ et que les cellules T CD8⁺ ne pouvaient être activées en l'absence de ces lymphocytes CD4⁺. Parmi tous les CD4⁺ stimulés par le HgCl₂, des lymphocytes auto-réactifs avaient été générés et avaient induit la prolifération des lymphocytes B auto-réactifs (Castedo *et al.*, 1993).

Les lymphocytes CD4⁺, une fois stimulés, se différencient en cellules CD4⁺ de type Th-1 et Th -2 (Pelletier *et al.*, 1987). Il est connu que les lymphocytes CD4⁺ Th-1 produisent de l'IL-2, de l'INF- γ et des TNF- β qui activent les macrophages et atténuent l'effet de l'hypersensibilité. Les cellules T CD4⁺ Th -2 produisent plutôt les IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 qui sont nécessaires à l'activation de la production d'anticorps et à l'inhibition des activités macrophagiques (Romagnani, 1997 ; Abbas *et al.*, 1996). Un déséquilibre entre ces deux formes de lymphocytes T conduit à un désordre fonctionnel du système immunitaire favorisant une réponse humorale (Goldman *et al.*, 1991). Une stimulation préférentielle de lymphocytes T CD4⁺ Th-2 par le HgCl₂ a été observée chez les lignées d'animaux susceptibles de développer de l'auto-immunité. Par contre, les lymphocytes T CD4⁺ Th-1 étaient plutôt stimulés chez les souris résistantes à l'auto-immunité en présence de mercure.

Chez les animaux sensibles à l'auto-immunité, Jiang et Moller (1995) ont observé une activation des lymphocytes T CD4⁺ dépendantes des CPA. Dans leurs études subséquentes (1996), ils ont démontré que le HgCl₂ se comportait comme un super-antigène en agissant de façon spécifique sur les cellules T. Ils ont montré que le HgCl₂ pouvait activer sélectivement les lymphocytes T présentant le récepteur TCR possédant les chaînes V β 6, V β 8, V β 10 ou V β 14, mais que les cellules ayant le récepteur TCR V β 8 étaient préférentiellement détruites chez des souris BALB/c résistantes à l'auto-immunité. Chez les souris SJL où le récepteur TCR V β 8 est absent, l'auto-immunité induite par le mercure se développerait par l'activation des autres types de lymphocytes T tels que les TCR V β 6, V β 7 ou V β 14 (Jiang et Möller, 1996).

1.5.2.4 Les effets sur les lymphocytes B

L'activation préférentielle de lymphocytes T CD4⁺ Th-1 ou CD4⁺ Th-2 dépend de la force de liaison d'un peptide, sous forme complexée avec les molécules du CMH de classe II (CMH-II), avec le TCR des cellules T. Les lymphocytes T CD4⁺ Th-1 sont activés lorsque le peptide interagit fortement avec le TCR, tandis qu'une liaison faible favorise la différenciation des lymphocytes CD4⁺ Th-2 (Pfeiffet *et al.*, 1995). Lors de réponses immunes, les lymphocytes CD4⁺ Th-1 stimulés vont induire la prolifération des lymphocytes CD8⁺ à exercer leur fonction cytolytique, et les CD4⁺Th-2, quant à eux, stimulent les cellules B à produire des anticorps pour neutraliser l'antigène (Romagnani, 1997). Un plus grand nombre de lymphocytes B ont été retrouvés chez les rats BN traités au HgCl₂ (Pelletier *et al.*, 1987). Cette activation polyclonale de lymphocytes B s'est avérée être dépendante des lymphocytes T-CD4⁺ de type Th-2 (Hirsh *et al.*, 1982), à cause de la présence de d'IL-4 à la surface de lymphocytes B dès deux jours post-traitement avec le HgCl₂ (Biancone *et al.*, 1996). En réponse aux lymphocytes T auto-réactifs stimulés par le HgCl₂, les lymphocytes B polyclonaux synthétisaient des anticorps tels que les IgM, IgG et IgA réactifs contre les constituants nucléaires chez les souris et les rats sensibles à l'auto-immunité (Robinson *et al.*, 1984 ; Hirsh *et al.*, 1982). Des données épidémiologiques chez les travailleurs exposés au mercure ont également montré une augmentation importante de la concentration d'IgM et d'IgA, mais plus faible chez les IgG (Bencko *et al.*, 1990). Une forte augmentation d'immunoglobulines sériques chez les souris SJL et BALB/c sensibles à l'auto-immunité et traitées au HgCl₂ a été observée mais était demeurée faible chez la souris C57BL/6. Chez les souris sensibles, une production de complexes immuns avait été générée avec ces anticorps et déposés dans le rein, la rate et dans les vaisseaux hépatiques (Hultman et Enestrom, 1987).

1.5.2.5 Les mécanismes d'induction de l'auto-immunité

Les mécanismes par lesquels le HgCl_2 induit l'auto-immunité ne sont pas encore bien élucidés. Il a été proposé par Tan (1989) que le HgCl_2 induirait l'auto-immunité par l'activation nucléaire responsable d'une augmentation de la biogenèse des ribosomes amenant ainsi une synthèse des anticorps anti-fibrillarines.

Le HgCl_2 a été montré, chez les souris, comme pouvant être un agent inducteur de la prolifération des lymphocytes par un mécanisme macrophago-dépendant chez les souris (Reardon et Lucas, 1987). Déjà les études de Hultman et Johansson (1991) avaient mis en évidence la présence de CPA dans la suspension cellulaire lymphocytaires de souris SJL obtenue par centrifugation sur gradient, et ces cellules étaient stimulées, par le HgCl_2 , à relarguer de l'IL-1. L'IL-1 est normalement impliquée dans l'activation des lymphocytes T (Genetet, 1993^d).

Jiang et Möller (1996) ont proposé, d'après leurs résultats, que le HgCl_2 pourrait transformer les molécules présentes à la surface des CPA en des super-antigènes pouvant stimuler les lymphocytes T en se liant aux molécules du CMH-II situé dans la région variable de la chaîne β ($V\beta$) des TCR.

1.6 Processus de différenciation et de maturation des lymphocytes T

Les lymphocytes T, les lymphocytes B et la plupart des autres cellules du système immunitaire sont tous dérivés de cellules souches pluripotentes communes originant de la moelle osseuse (Rose et Margolick, 1992). Le système lymphoïde comprend les organes lymphoïdes primaires ou centraux dans lesquels se produit la maturation cellulaire, et d'organes lymphoïdes secondaires qui drainent les circulations lymphatiques et sanguines et président à la réponse immune effectrice. Chez les mammifères, les organes lymphoïdes primaires sont la moelle osseuse, au sein de

laquelle se déroule la maturation des lymphocytes B, et le thymus, siège de la maturation des lymphocytes T. Les organes lymphoïdes secondaires comprennent la rate, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, et les ganglions associés au réseau lymphatique (Pallardy *et al.*, 1995).

Le système immunitaire comprend l'immunité non-spécifique, laquelle est assurée par des macrophages et des cellules tueuses naturelles (NK), et l'immunité spécifique, qui peut se subdiviser en immunité humorale et cellulaire. La réponse humorale est assumée par les lymphocytes B lesquels secrètent des immunoglobulines responsables d'éliminer les antigènes. La régulation de l'immunité humorale et le déclenchement des réponses cellulaires sont assurés par les lymphocytes T (Davies et Metzger, 1983).

Le thymus est le site majeur de la différenciation et de la maturation des cellules T à partir de précurseurs CD4-CD8-CD3- et dont les différentes étapes sont caractérisées par l'acquisition du récepteur pour l'antigène et des molécules CD4 et CD8, responsables des fonctions effectrices. La délétion clonale des lymphocytes reconnaissant les antigènes du soi se fait durant le processus de différenciation (Pallardy *et al.*, 1995).

1.6.1 La différenciation et la maturation des lymphocytes T, et le microenvironnement thymique

Les précurseurs des lymphocytes T quittent la moelle osseuse vers le thymus où ils vont maturer sous l'influence du microenvironnement thymique. Ces précurseurs de cellules T sont acheminés jusqu'au cortex thymique par le sang. A ce stade, ces cellules n'expriment par encore de molécules de surface spécifiques telles que les TCR, CD3, CD4 ou CD8 et sont incapables de reconnaître ou de répondre à un antigène et d'exprimer leur fonction effectrice. Le thymus se compose de lobules

divisés en une zone médullaire et une zone corticale. Ces lobules forment deux lobes possédant un hile contenant les artères. Le cortex, la partie externe, représente de 85 à 90 % du thymus et la partie la plus interne est la médulla (Le Douarin *et al.*, 1984). Au cours de leur développement, les thymocytes entrent en contact physiquement avec une variété de cellules non lymphoïdes dans le thymus. Ces cellules comprennent les cellules épithéliales thymiques et des cellules dérivées de la moelle osseuse, incluant les macrophages et les cellules dendritiques. Les interactions entre les lymphocytes et les autres cellules thymiques sont nécessaires pour la maturation des lymphocytes T qui est gouvernée par deux types de molécules produites par les cellules non-lymphoïdes. Les premières molécules sont les molécules du CMH dont, celles de classes I et II qui sont exprimées par les macrophages corticaux, les cellules épithéliales et les cellules dendritiques. Les interactions des thymocytes en maturation avec les molécules du CMH sont importantes pour la sélection du répertoire de cellules T matures. Les molécules du deuxième type en contact avec les thymocytes sont des cytokines et des hormones thymiques secrétées par les cellules stromales thymiques, dont les cellules épithéliales.

Ainsi, sous l'influence des hormones thymiques (thymosine et thymopoïétine), les pré-lymphocytes T CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ - se différencient et mûrissent en lymphocytes T CD4+CD8+TCR $\alpha\beta^{\text{faible}}$. Ces derniers subissent des processus de sélections positive et négative de telle sorte que les cellules sélectionnées positivement poursuivent leur différenciation en lymphocytes T matures en exprimant à leur surface membranaire les marqueurs CD4+CD8-TCR $\alpha\beta^{\text{fort}}$ ou CD4-CD8+TCR $\alpha\beta^{\text{fort}}$. Ces lymphocytes matures migrent, par la suite, vers des organes périphériques comme la rate et les ganglions lymphatiques, dans lesquels ils vont assumer leur fonction immunitaire (Genetet, 1993^b).

1.6.1.1 Les sélections positive et négative

Les processus de sélection positive et négative permettent d'éliminer les clones de lymphocytes qui sont réactifs contre les molécules du soi et de garder ceux qui reconnaissent le non-soi (Boyd, 1991). Durant le développement cellulaire, les thymocytes immatures CD4+CD8+, qui ont une affinité intermédiaire pour les molécules du CMH, sont sélectionnés à poursuivre leur processus de maturation (Von Boehmer, 1994). Par contre, les cellules qui ne reconnaissent pas les molécules du CMH sont négligées et meurent par apoptose. Également, les thymocytes immatures qui se lient avidement aux molécules du soi présentées par les cellules stromales thymiques sont sélectionnés négativement et l'élimination de ces cellules, potentiellement auto-réactives, se fait par un processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée (Nossal, 1994). Cependant, certains de ces lymphocytes résistent aux processus de l'apoptose car ils sont dans un état « silencieux » (Vuitton, 1990). Le processus de développement cellulaire permet une production de 10 % seulement de thymocytes matures qui sont exportés vers la périphérie, alors que 90 % de cellules meurent *in situ* (Genetet, 1993^a).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le déclenchement du processus de la mort cellulaire programmée lors de la sélection négative chez les thymocytes en maturation. Il a été prouvé que l'apoptose peut être induite via la formation d'un lien entre la molécule Fas et un Fas ligand de la cellule stromale thymique. Le Fas est exprimé abondamment chez les thymocytes immatures CD4+CD8+ les rendant très sensibles à l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas, agissant comme un ligand. Toutefois, l'apoptose induite par le système Fas chez les lymphocytes peut être bloquée par l'expression du gène bcl-2. Le bcl-2 est exprimé chez les thymocytes double-négatifs (CD4-CD8-), simples positifs (CD4+CD8- et CD4-CD8+) et les cellules en périphérie, mais non chez les thymocytes double-positifs (CD4+CD8+), ce qui explique le fort taux d'apoptose chez ce dernier type de lymphocytes (Menom *et al.*, 1995).

1.6.1.2 Les activateurs et inhibiteurs de la différenciation et de la maturation des lymphocytes T

Plusieurs études ont rapporté que la cyclosporine A (CsA) inhibe, *in vivo*, la maturation des thymocytes CD4⁺CD8⁺ en des lymphocytes matures CD4⁺ et CD8⁺ (Gao *et al.*, 1988). Cette altération de la sélection positive des thymocytes est due à la perturbation de la fonction des cellules stromales par la CsA (Anderson *et al.*, 1995). La staurosporine a également été montrée comme inhibitrice de la maturation des lymphocytes CD4⁺ en culture (Nakyama et Nakauchi, 1993) en réduisant l'activité de la tyrosine kinase aussi bien que celle de la protéine kinase C impliquées dans le processus de sélection positive (Bit *et al.*, 1993). Le processus de maturation des lymphocytes T est aussi sensible aux glucocorticoïdes comme, par exemple, la dexaméthasone qui agit en induisant les lymphocytes à mourir par apoptose (Zucker *et al.*, 1994).

1.6.1.3 Les marqueurs de surface des lymphocytes T

Les complexes TCR sont exprimés tôt durant la maturation intrathymique des cellules T, après la formation des gènes TCR fonctionnels suite à un réarrangement somatique des différents segments de gènes. En plus, des molécules accessoires sont exprimées durant la maturation thymique. Les CD4 et CD8, qui sont un exemple de molécules accessoires jouent un rôle important dans la reconnaissance d'un antigène et dans l'activation des cellules T. La maturation fonctionnelle correspondant à l'acquisition de la capacité à agir en cellules T « helper » (CD4⁺) ou cytolytiques (CD8⁺) a lieu simultanément et dépendamment de l'expression des molécules de surface des cellules T (Abbas *et al.*, 1994).

1.6.1.3.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les gènes codant pour les molécules impliquées dans le rejet de tissu étranger ou du non-soi forment la région des gènes du CMH. Les molécules qui en découlent sont propres à chaque individu et différentes entre les individus d'une même espèce (Genetet, 1993°). Le CMH contient trois classes de gènes : les classes I, II et III. Les gènes de classe I du CMH codent pour les sous-unités glycoprotéiques du CMH de type H-2 K, D et L chez la souris et HLA-A, -B, et -C chez l'humain. Les molécules de classe I sont présentes chez toutes les cellules de l'organisme (Roitt *et al.*, 1996°). Ces protéines sont essentielles à l'expression de la cytotoxicité induite par les lymphocytes T CD8+ qui jouent un rôle clé dans le rejet des cellules étrangères ou infectées par des virus. La reconnaissance, par les cellules CD8+, des molécules de classe I en association avec les antigènes membranaires de cellules anormales ou infectées entraîne une destruction de ces cellules par les CD8+. Contrairement aux molécules de classe I, les molécules de classe II sont exprimées seulement chez les cellules lymphoïdes et les macrophages. Ces molécules de classe II présentent des épitopes qui sont reconnus par les cellules Th et sont responsables des interactions spécifiques entre les CPA (macrophages) et les lymphocytes CD4 et CD8 ou les lymphocytes B (Eisen, 1990).

1.6.1.3.2 Les récepteurs de cellules T (TCR)

Les gènes du TCR codent pour plusieurs récepteurs qui peuvent reconnaître spécifiquement un récepteur de peptides en association avec des molécules du CMH. Le processus de sélection responsable du répertoire de cellules T matures commence seulement après le développement de ce récepteur T. L'expression de TCR est donc nécessaire pour les processus de sélections négative et positive étant donné que ces deux processus sont dépendants de la reconnaissance spécifique des antigènes du soi en relation avec le CMH présent à la surface de cellules épithéliales thymiques, des

cellules dendritiques et des macrophages (Abbas *et al.*, 1994). Le TCR est un complexe composé d'un hétérodimère constitué, en général d'une chaîne alfa (α) de 48-54 kD et d'une chaîne beta (β) de 45-50 kD, et plus rarement, de 3 molécules (CD3) monophormiques γ , δ et ϵ (Roitt *et al.*, 1996^e). Les gènes α et β fonctionnels du TCR sont normalement présents seulement chez les lymphocytes T. La chaîne α est composée de régions variables (V) qui assurent le contact entre le peptide et la molécule du CMH, et d'une région J (segment variable additionnel), tandis que la chaîne β comprend les segments V, D (diversité) et J du gène du TCR (Toyonaga *et al.*, 1984). Les régions variables de la chaîne β ($V\beta$) se subdivisent en plusieurs familles numérotées de 2 à 14 ($V\beta 2$ à $V\beta 14$). Les cellules exprimant la chaîne $V\beta 8$ sont plus importantes en terme de nombre, chez les souris. Par contre, cette famille est génétiquement absente chez la souris de type SJL (Jouvin-Marche *et al.*, 1989).

1.6.1.3.3 L'antigène Thy-1

L'antigène Theta ou Thy-1 est une glycoprotéine de 25 kD qui se présente sous forme de deux allotypes, Thy-1.1 et Thy-1.2 (Reif et Allen, 1964). Chez les souris, le marqueur Thy-1 est exprimé en grande quantité sur les thymocytes et aussi sur les lymphocytes T du sang, de la rate, des ganglions, du péritoine et des plaques de Peyer (Holmes et Morse, 1988). Il a été le premier antigène utilisé pour séparer les cellules T des cellules B dans les études fonctionnelles (Kroczek *et al.*, 1986).

1.6.1.3.4 Les antigènes CD4 et CD8

Les molécules CD4 et CD8 chez la souris sont constituées de glycoprotéines de 55 kD et 30-35 kD, respectivement (Dialynas *et al.*, 1983) qui sont codées par deux gènes localisés sur le chromosome 6 (Ledbetter et Herzenberg, 1979). Ces molécules CD4 et CD8 sont communément utilisées comme marqueurs pour classer les sous-

populations de thymocytes. Des études récentes ont indiqué que l'expression de ces molécules joue un rôle dans les processus de sélection qui forment le répertoire de cellules T. Les thymocytes peuvent être divisés en 4 groupes sur la base de l'expression des marqueurs CD4 et CD8. Ces populations comprennent les cellules les plus immatures, les doubles négatifs (CD4⁻CD8⁻), les cellules à l'étape des processus de sélection soit, les doubles positifs (CD4⁺CD8⁺), et les cellules matures, les simples positifs (CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺) (Abbas *et al.*, 1994).

1.6.1.4 La migration vers la périphérie

Les précurseurs des lymphocytes T, ayant subi la double sélection (positive et négative), se différencient en lymphocytes T matures exprimant à leur surface cellulaire soit la molécule CD4, soit la molécule CD8. Ces cellules matures, capables de reconnaître les antigènes du non-soi et de fournir une réponse spécifique à ces antigènes lorsqu'ils sont présentés en association avec les molécules du CMH de classe I ou II, vont migrer du thymus vers les organes périphériques. Les lymphocytes CD4⁺CD8⁻, aussi appelés cellules Th, ont comme fonction la coordination centrale de la réponse immunitaire, donnant lieu soit à une activation des lymphocytes B, soit à celle des lymphocytes cytotoxiques (Letonturier, 1996). Les lymphocytes cytotoxiques (CD8⁺CD4⁻) sont des cellules T possédant une activité cytolytique envers des cellules infectées ou étrangères. Leur activité cytolytique est déclenchée par la sécrétion des IL-2, -4 et -6 et l'IFN- γ par des lymphocytes CD4⁺CD8⁻ spécifiquement stimulés (Fradelizi, 1993).

1.6.1.5 La rate comme organe effecteur de la réponse immune

La rate est un organe multifonctionnel qui filtre le sang des particules étrangères, enlève les cellules usées du sang, convertit l'hémoglobine en bilirubine et

agit dans la métabolisation du fer. Elle est entourée d'une capsule conjonctive et des cellules de muscles lisses, et est formée d'une zone de pulpe rouge dans laquelle se fait l'élimination des érythrocytes sénescents ou altérés et d'une zone, appelée pulpe blanche, qui forme le tissu lymphoïde organisé en manchons autour des ramifications des artères spléniques où se développent les réponses immunes humorales (Ac) et cytotoxiques (Genetet, 1993^b). La rate, contrairement au thymus, contient uniquement des lymphocytes matures soit des CD4+ ou des CD8+. Les lymphocytes B et T représentent respectivement 25-35 % et 30-50 % de la population cellulaire dans la rate. Elle a un rôle de captation des antigènes présents dans le sang qui pénètrent dans la pulpe rouge (Pallardy *et al.*, 1995).

Les autres organes lymphoïdes secondaires drainent chacun un compartiment vasculaire particulier et sont aptes à fournir une réponse primaire appropriée au type d'antigène étranger rencontré (Pallardy *et al.*, 1995).

La réaction vis-à-vis un antigène spécifique chez des lymphocytes T immatures est différente de celle des lymphocytes T matures. Chez les thymocytes CD4+CD8+, un signal transmis à la cellule via le TCR déclenche soit une sélection positive amenant à la différenciation cellulaire, soit une sélection négative aboutissant à la mort cellulaire (Von Boehmer, 1991). Au contraire, chez les lymphocytes T matures, la liaison d'un antigène au récepteur TCR d'un lymphocytes T produit une réponse immune par activation et prolifération de ces cellules (Schwartz, 1992). L'étape finale de la réponse immune est l'induction d'un processus apoptotique chez les lymphocytes activés, via le système Fas-Fas L (Russell *et al.*, 1993).

1.7 L'apoptose

Le terme « apoptose » a été utilisé pour la première fois par Kerr *et al.* (1972). L'apoptose représente une forme de mort cellulaire programmée qui suppose la présence de gènes spéciaux (des thanatogènes) qui contrôlent l'expression de

protéines responsables de l'apoptose (Tenniswood *et al.*, 1994). Elle se différencie de la nécrose sur le plan structural et fonctionnel et elle est indépendante de l'environnement (Feldmann, 1995). L'apoptose est un phénomène rapide d'une durée d'environ de 6 heures avec une fourchette de 4 à 9 h (Wyllie *et al.*, 1980).

1.7.1 Les rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose survient dès les premiers stades du développement chez une partie des cellules du blastocyste (Wyllie *et al.*, 1980). Les cellules germinales mâles ou femelles (Coucovanis *et al.*, 1993) et de nombreux neurones meurent aussi par apoptose durant la période embryonnaire, mais la mort neuronale continue pendant les périodes foetale et post-natale (Wyllie *et al.*, 1980). L'apoptose s'observe lors de la morphogénèse du coeur (James, 1994), du duodénum, de la résorption des membranes interdigitales, de la disparition des canaux de Müller et de la fusion des processus palatins (Wyllie *et al.*, 1980).

L'apoptose est continuellement présente tout au long de la vie, chez les cellules en prolifération lente comme les cellules hépatiques (Kerr, 1972) et celles de l'épithélium du cortex surrénalien (Wyllie *et al.*, 1973), et en prolifération rapide telles que les cellules de l'épithélium des cryptes de l'intestin (Potten, 1977) et des spermatogonies en différenciation (Alian *et al.*, 1987).

1.7.2 Les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose

1.7.2.1 Morphologie des cellules apoptotiques

Le processus apoptotique se présente en trois étapes: *la première étape* se caractérise par une distribution irrégulière de la chromatine, qui se rapproche de la membrane interne du noyau, et de sa condensation en une forme de croissant homogène plus ou moins volumineux. Les fibres et les granules nucléaires sont alors dispersés dans le nucléoplasme. Dans le cytoplasme, les organites se rapprochent et s'agglomèrent, particulièrement les mitochondries, ainsi que les filaments du cytosquelette et les ribosomes libres. Les desmosomes sont détruits et les espaces intercellulaires s'élargissent, permettant à la cellule de prendre un aspect plus arrondi (Wyllie *et al.*, 1980). A ce stade, les mitochondries et le réticulum endoplasmique restent intacts, les lysosomes ne sont pas altérés et la membrane cytoplasmique reste imperméable aux colorants vitaux (Feldmann, 1995).

La deuxième étape, qui peut chevaucher la première, est caractérisée par la présence d'un crénelage de la membrane nucléaire annonçant une fragmentation nucléaire et cytoplasmique (Wyllie *et al.*, 1980) suivie de la formation de fragments cellulaires plus ou moins volumineux encore reliés entre eux par la membrane cytoplasmique. Ces fragments contiennent des reliquats nucléaires, des organites apparemment encore intacts ou un mélange de débris nucléaires et cytoplasmiques. La cellule devient plus petite et condensée par rapport à la normale. Chez les thymocytes, une réduction de 30 % du volume cellulaire a été observée par Ohyama *et al.* (1981). Les fragments cellulaires ou corps apoptotiques se détachent de la cellule pour être phagocytés par des macrophages ou des cellules avoisinantes (Kerr *et al.*, 1972).

Cependant, certains auteurs soulignent que l'altération d'ADN peut être détectée dans toutes les cellules en apoptose, mais la fragmentation en

oligonucléosomes n'est pas toujours observée, car elle dépend de la nature de la cellule-cible. Par exemple, les lymphoblastes B ne produisent pas de bris d'ADN double-brin lors de l'apoptose induite par les cellules cytolytiques. Par contre, les cellules non hématopoïétiques murines ont montré des fragments d'ADN simple-brin détectés par le test nick (Sellins et Cohen, 1991). L'absence de fragmentation d'ADN pourrait être expliquée par une déficience dans l'activité des enzymes responsables du clivage de l'ADN (Cohen *et al.*, 1992). Chez les thymocytes, Alnemri et Litwaef (1989) ont rapporté l'absence de l'enzyme endonucléase dans le noyau de ces cellules. Ils ont proposé que l'endonucléase était probablement sous forme non activable par le Ca^{+2} et Mg^{+2} ou était synthétisée de *novo* lors de l'apoptose.

La troisième étape consiste en la dégradation des corps apoptotiques. Ce phénomène de dégradation entraîne des lésions de la membrane cytoplasmique qui ont pour conséquence de rendre la cellule perméable aux colorants vitaux suivi d'une destruction des reliquats cytoplasmiques et nucléaires par les macrophages (Wyllie *et al.*, 1980)

1.7.2.2 Altérations biochimiques des cellules apoptotiques

1.7.2.2.1 Modifications nucléaires

La condensation de la chromatine se traduit par un profond remaniement de l'ADN. Wyllie (1980) avait observé, par électrophorèse de l'ADN, que le poids moléculaire des fragments d'ADN retrouvés, correspondait à un nucléotide, c'est-à-dire à 180 paires de bases nucléiques ou des multiples (oligonucléosomes) de cette unité de base du filament d'ADN. Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que la coupure de filament d'ADN en des endroits précis était due à l'activation d'une nucléase.

1.7.2.2 Modifications cytoplasmiques

Les transglutaminases Ca^{2+} -dépendantes, localisées dans le cytoplasme sont activées, *in vivo* et *in vitro*, au cours de l'apoptose (Fesus *et al.*, 1987). Elles catalysent la polymérisation des protéines en formant des ponts entre les résidus glutamine et lysine, ce qui peut modifier l'ultrastructure du cytoplasme (agglomération des organites et densification) (Wyllie, 1992) responsable de la formation des corps apoptotiques, dont la membrane remaniée et modifiée résiste à l'action des détergents (Fesus *et al.*, 1989). De plus, dans le cytoplasme, il y a une transduction du signal susceptible de déclencher l'apoptose qui pourrait se faire par l'intermédiaire de l'activation de la protéine kinase C (Arends et Wyllie, 1991). Les modifications au niveau de la membrane sont surtout reliées à un remaniement de la membrane cytoplasmique au cours de l'apoptose. Ces modifications membranaires ont été expliquées par une perte de la symétrie des phospholipides membranaires exposant les phospholipides insaturés, comme la phosphatidylsérine, à la surface externe de la membrane cellulaire. La phosphatidylsérine est un site de reconnaissance des macrophages par lequel ils se lient à cette dernière et engouffrent les cellules apoptotiques (Allen *et al.*, 1988).

1.7.2.3 Les mécanismes de l'apoptose

Le mécanisme le plus connu du déclenchement de l'apoptose est l'activation d'une endonucléase. Cette enzyme est localisée dans le noyau et son activité est augmentée par une variété de stimuli. Les trois formes d'endonucléase (A, B et C) associées à l'apoptose sont $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ -dépendantes. Cette enzyme clive, à des endroits spécifiques, l'ADN double-brin en plusieurs petits fragments de 180 paires de bases d'ADN (Wyllie, 1980). Elle peut être activée par plusieurs voies dépendamment de la nature du stimulus. Les voies d'activation peuvent impliquer l'influx du Ca^{+2} , l'activation ou l'inhibition des protéines kinases, l'altération de la synthèse

d'ARN/protéines et/ou l'altération de l'expression de gènes (Schwartzman et Cidlowski, 1993). Les études faites chez les lymphocytes T matures ont montré que l'hydrolyse de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Crabtree et Clipstone, 1994) pourrait augmenter la concentration du Ca^{+2} intracellulaire (Weiss *et al.*, 1984), amenant une activation de la calcineurine qui est une sérine-thréonine phosphatase responsable du déclenchement de l'apoptose (Clipstone et Crabtree, 1992).

Le déclenchement de l'apoptose peut être dépendant de deux systèmes cytoplasmiques : les mitochondries et les protéases. L'apoptose induite par la perturbation des mitochondries peut se faire à plusieurs niveaux: 1) l'inhibition de la synthèse protéique ou enzymatique mitochondriale (Baixeras, *et al.*, 1994); 2) la réduction du potentiel transmembranaire, qui a été démontrée comme un processus ayant lieu avant le changement nucléaire (Deckwerth et Johnson, 1993); et 3) le déséquilibre entre la chaîne de transport des électrons et la synthèse de l'ATP réduisant ainsi la respiration cellulaire (Zamzami *et al.*, 1995). Tous ces mécanismes conduisent soit à une augmentation de la concentration du Ca^{+2} intracellulaire (Trump et Berezsky, 1995) ou à une diminution de l'ATP (Bernardi *et al.*, 1994) et du NADH (Wright *et al.*, 1994), et en conséquence, activent les protéases, désorganisent le cytosquelette cytoplasmique, activent les endonucléases (Trump et Berezsky, 1995), et déclenchent la chromatinolyse et la nucléolyse (Kroemer *et al.*, 1995).

1.7.2.4 L'apoptose versus la nécrose

L'apoptose se différencie de la nécrose par le fait qu'elle est un processus cellulaire actif qui met en action le métabolisme propre de la cellule sans l'induction de la réaction inflammatoire (Feldmann, 1995). Morphologiquement, les cellules en nécrose deviennent gonflées, perdent leur intégrité membranaire et la fragmentation de leur ADN se fait au hasard. Lors de la mort par nécrose, la membrane cellulaire se lyse et libère le contenu cellulaire, ce qui explique la présence de réactions

inflammatoires. Au contraire, les cellules en apoptose diminuent de volume, maintiennent l'intégrité de leur membrane et leur ADN condensé est clivé à des endroits spécifiques par une endonucléase (Arends *et al.*, 1990).

1.7.2.5 L'importance de l'apoptose en immunologie

L'apoptose joue un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire (Sen, 1992). Elle intervient de façon courante dans la différenciation et la maturation des lymphocytes T et B. Les lymphocytes T immatures, à des étapes critiques de leur maturation, sont stimulés à rentrer en apoptose par l'intermédiaire de leur TCR. Ce mécanisme permet d'éliminer les cellules T auto-réactives (Shi *et al.*, 1989). Les lymphocytes T matures peuvent également être éliminés par apoptose sous l'influence de différentes cytokines ou des glycoprotéines virales. Le fait que l'apoptose chez les thymocytes en maturation est déclenchée par des mécanismes différents de ceux des lymphocytes matures pourrait expliquer les résultats de Perandones *et al.* (1993) qui a montré que le processus apoptotique chez les lymphocytes T spléniques était plus rapide que celui chez les thymocytes.

Chez les lymphocytes B immatures et matures, la mort cellulaire se fait aussi par apoptose aussi bien dans la moelle osseuse que dans les ganglions lymphatiques ou la rate (Krammer *et al.*, 1994). Des travaux récents ont montré que les lymphocytes T cytotoxiques induiraient l'apoptose chez les cellules cibles par la sécrétion de protéases (Heusel *et al.*, 1994).

1.7.2.5.1 Les facteurs inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose

Plusieurs facteurs physiques ou moléculaires peuvent induire le processus apoptotique chez les lymphocytes.

1.7.2.5.1.1 L'irradiation

Les lymphocytes au repos meurent, lorsqu'irradiés, par l'intermédiaire d'un processus nommé « mort interphasique » qui n'implique pas la division cellulaire. L'irradiation affecte la synthèse d'ATP, change la perméabilité membranaire et perturbe le noyau. Les changements nucléaires causés par l'irradiation, chez les thymocytes, aboutissent à des cassures d'ADN qui peuvent être détectées après 2 à 2.5 h d'exposition, et la mort cellulaire a lieu dans les quelques heures qui suivent (Sellins et Cohen, 1987). Les radiations ionisantes causent en plus, un dommage direct à l'ADN.

1.7.2.5.1.2 Le gène c-myc

Bien que le gène c-myc soit impliqué dans la prolifération cellulaire (Koskinen *et al.*, 1993), les expériences d'Askew *et al.* (1991) ont montré que la sur-expression de ce gène pourrait accélérer l'apoptose des cellules myéloïdes en culture, en absence de facteurs de croissance (Koskinen *et al.*, 1993) ou de fibroblastes (Evan *et al.*, 1992). Ce phénomène a été également observé chez les lymphocytes T et les hybridomes de cellules T (Shi *et al.*, 1992) ainsi que chez les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Il a été démontrée que la protéine myc réagissait avec la protéine max intra-cytoplasmique pour induire l'apoptose (Amati *et al.*, 1993).

1.7.2.5.1.3 Le gène p53

Le gène p53, aussi connu comme un anti-oncogène ou gène suppresseur de tumeur par induction de l'apoptose cellulaire, code pour un nucléophosphoprotéine qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, comme inhibiteur du cycle cellulaire en phase G1 et comme inducteur de la différenciation cellulaire (Levine *et*

al., 1991). Des résultats de Bates *et al.* (1994) suggèrent que le gène p53 pourrait être en relation avec la perte de protéines d'adhésion et/ou de contacts intercellulaires observée dans la transformation cancéreuse.

1.7.2.5.1.4 Le gène Fas APO-1

Il a été démontré, chez les lymphocytes normaux et cancéreux, que la liaison d'un anticorps monoclonal avec la protéine membranaire, l'apolipoprotéine-1 (APO-1), pouvait induire une apoptose par blocage de la prolifération cellulaire (Trauth *et al.*, 1989). Suite à cette importante découverte, le gène Fas a été identifié. Il code pour un antigène localisé sur la membrane cellulaire. Il s'est avéré que l'antigène Fas était identique à la protéine APO-1 (Itoh *et al.*, 1991). Le ligand de Fas, une glycoprotéine de 40 kda (Suda et Nagata, 1994), est une protéine transmembranaire appartenant à la famille du facteur de nécrose tumorale (FNT) (Suda *et al.*, 1993) mais est différente de ce dernier, car elle ne se lie pas à ses récepteurs (Itoh *et al.*, 1993). Des expériences chez les souris BALB/C ont montré que la présence d'anticorps anti-Fas provoquait une apoptose chez les cellules hépatiques (Ogasawara *et al.*, 1993). Cette induction d'apoptose résulte soit d'une liaison entre l'antigène Fas et son ligand ou via la fixation d'un anticorps monoclonal anti-Fas (Nakajima *et al.*, 1996). Chez les souris mutantes *lpr*, où l'expression de la molécule Fas à la surface membranaire est absente, l'altération des thymocytes est presque nulle (Zhou *et al.*, 1991), ce qui peut expliquer la survie des thymocytes négligés en périphérie, ayant ainsi échappé à l'apoptose dans le thymus (Zhou *et al.*, 1993). La molécule Fas est également fortement exprimée chez les lymphocytes T matures périphériques activés (Trauth *et al.*, 1989).

La molécule Fas est aussi exprimée dans une variété de cellules : les cellules thymiques, hépatiques, cardiaques et de l'ovaire. Dans les cellules du système immunitaire, l'antigène Fas est exprimé abondamment à la surface membranaire des

thymocytes immatures CD4+CD8+ et des lymphocytes T matures activés, principalement les lymphocytes T CD4+V β 8+, demeurant en périphérie, lesquels ont été montrés très sensibles à l'activation du processus d'apoptose par l'anticorps anti-Fas. Par contre, les lymphocytes thymiques doubles négatifs et simples positifs sont insensibles à l'induction d'apoptose via le système Fas (Nishimura *et al.*, 1995; Boshell *et al.*, 1996). L'apoptose induite par la molécule Fas ou le FNT se fait de manière directe, c'est-à-dire ne requiert pas la synthèse d'ARN, de protéines ou de d'autres molécules, telle qu'observée avec les glucocorticoïdes. Le Fas déclenche le processus de l'apoptose en se liant au récepteur des protéases de la famille des enzymes de conversion de l'IL-1 β (ICE) (Anderson, 1997).

1.7.2.5.1.6 Les glucocorticoïdes

Les hormones glucocorticoïdes sont reconnues pour leurs effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires et sont largement utilisés dans le traitement de certaines conditions médicales. Ces composés interfèrent dans l'activation des macrophages (Chensue *et al.*, 1991), inhibent la production de cytokines par les lymphocytes T (Vacca *et al.*, 1992) et induisent la mort cellulaire programmée chez la progéniture des cellules T et B (Cohen *et al.*, 1992) aussi bien que chez les cellules T matures (Zubiaga *et al.*, 1992). La dexaméthasone, un produit de la famille des glucocorticoïdes, à une concentration 1.0 μ M, augmente l'apoptose des lymphocytes T jusqu'à 45 % après 6 heures d'incubation par rapport à une apoptose spontanée qui est de 15 % (Zucker, *et al.*, 1994). La fragmentation d'ADN induite par ce glucocorticoïde a été montrée dépendante de l'élévation de la concentration du Ca⁺² intracellulaire, ce qui signifie qu'une perte de Ca⁺² extracellulaire ou un blocage dans sa mobilisation prévient la fragmentation d'ADN (Lam *et al.*, 1993). Il a été démontré que les glucocorticoïdes induisaient l'apoptose chez les thymocytes de rat par l'élévation du Ca⁺² intracellulaire, de manière indépendante de l'endonucléase

dépendante du $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (Kaiser et Edelman, 1977), ce qui laisse supposer la présence d'autres endonucléases pour cliver l'ADN (Alnemri et Litwack, 1989).

Les cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T, sont très sensibles aux effets des glucocorticoïdes, surtout les lymphocytes T immatures $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ qui répondent beaucoup plus fortement que les lymphocytes matures CD4^+ et CD8^+ (Cohen *et al.*, 1992).

Des études chez les lymphocytes T ont montré que les glucocorticoïdes pouvaient inhiber l'hydrolyse des phospholipides, diminuer l'activité des protéines dépendantes de la phosphorylation par la tyrosine kinase (Boumpas *et al.*, 1991) ou induire la mort des cellules par l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des lymphocytes, ce qui avait pour conséquence de réduire le contact avec les cellules endothéliales (Pitzalis *et al.*, 1997).

1.7.2.5.1.7 Les métaux lourds

L'apoptose joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Jusqu'à maintenant, très peu d'études ont été faites sur l'induction de l'apoptose par le mercure organique. Néanmoins, quelques travaux ont démontré que le MeHg peut agir comme inducteur de l'apoptose selon une relation dépendante de la dose. Shenker *et al.* (1997) ont récemment observé une induction d'apoptose dans les lymphocytes T humains traités avec du MeHg à des doses de 0.6 à 1 μM . De plus, en présence de mitogènes, tel que la concanavalin A, le mercure perdait sa capacité à induire l'apoptose et la nécrose cellulaire. D'autres métaux comme le cadmium, le chrome III ont également été montrés comme ayant un potentiel à induire l'apoptose cellulaire (El Azzoudi *et al.*, 1994; Yui *et al.*, 1997).

Par contre, certains métaux lourds tels que le zinc (Zn^{+2}) et le mercure (Hg^{+2}) sous forme ionique induisent, plutôt, la prolifération cellulaire. Des études, *in vitro*, chez les lymphocytes humains (Berger et Skinner, 1974 ; Caron *et al.*, 1970) et murins ont montré que ces deux métaux activaient la division des cellules (Reardon et Lucas, 1981). Une prolifération cellulaire induite par le mercure inorganique a été aussi observée suite à la liaison du mercure au groupement SH de la p56^{lck}, qui est une protéine kinase ayant une fonction non-réceptrice associée aux récepteurs Thy-1, CD3 et CD4 des lymphocytes T. Cette liaison du mercure amène un transfert des signaux qui prolongent la prolifération des lymphocytes (Nakashima *et al.*, 1994).

1.7.2.5.1.8 Le gène B-cell lymphoma/leukemia-2 (*bcl-2*)

Le gène *bcl-2* code pour une protéine ayant une action anti-apoptotique (Vaux *et al.*, 1994). Cette protéine est localisée dans la membrane externe du noyau, le réticulum endoplasmique et la membrane externe des mitochondries (Lithgow *et al.*, 1994). Durant la maturation des thymocytes, l'expression du *bcl-2* est présente chez les lymphocytes doubles négatifs (CD4-CD8-), simples positifs (CD4+ et CD8+) et chez les lymphocytes en périphérie, mais cette molécule est faiblement exprimée chez les cellules doubles positifs (CD4+CD8+) (Memon *et al.*, 1995). Sa fonction principale est de voir à la survie des cellules. Elle ne bloque pas le processus de sélection négative, mais, plutôt, prolonge la survie des cellules sélectionnées positivement (King et Ashwell, 1995). Il a été révélé que l'apoptose induite par les glucocorticoïdes était bloquée par le *bcl-2*, mais pas par celle déclenchée via le système Fas (Memon *et al.*, 1995).

1.11 Objectifs de ce travail

Le MeHg peut induire, à des concentrations toxiques, des désordres cellulaires autant dans le système nerveux que dans les cellules du système immunitaire. Par contre, à des doses plus faibles, des désordres fonctionnels du système immunitaire ont été observés chez des rats et des souris, de telle sorte que des immunodéficiences ou le développement de maladies auto-immunitaires ont été associés à des composés mercuriels. Quoiqu'étant en apparence contradictoires, ces désordres immunitaires pourraient refléter des sensibilités différentes lors de la différenciation et de la maturation des lymphocytes T, favorisant soit l'apoptose chez les thymocytes immatures de souris sensibles à l'immunodéficiência ou, au contraire, un blocage de cette apoptose, chez les lignées de souris sensibles à l'auto-immunité, permettant la survie de lymphocytes auto-réactifs. Au cours de ce travail, nous allons vérifier si des concentrations subtoxiques de MeHgCl sont capables d'induire un processus apoptotique chez les lymphocytes T spléniques et thymiques de souris génétiquement sensibles à l'immunodéficiência (C57BL/6) ou à la maladie auto-immune (SJL). Nous déterminerons si ce processus apoptotique est directement induit par le MeHgCl ou résulte d'une apoptose post-stimulation de ces cellules. Ainsi, il sera possible de vérifier si le processus d'apoptose est associé à la présence de la protéine Fas et/ou relève d'une activité spécifique du MeHgCl sur la nature des chaînes V β du TCR, sous contrôle génétique. Les expériences réalisées vont nous permettre d'identifier certains mécanismes impliqués dans les déséquilibres immunitaires reliés à l'exposition à de très faibles concentrations de MeHgCl en relation avec la sensibilité génétique des animaux.

CHAPITRE DEUXIÈME

MATERIEL ET METHODES

2.1 Les animaux de laboratoire

Des souris de lignées C57BL/6 et SJL, en provenance de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) et âgées de 6 à 15 semaines, ont été utilisées pour toutes les expériences. Dès leur arrivée, elles ont été divisées en groupe de cinq animaux par cage et gardées sous atmosphère stérile dans des enceintes biologiques (Forma Scientific, Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada) dans des conditions standard de luminosité et d'alimentation.

2.2 Les préparations cellulaires

Les souris C57BL/6 et SJL ont été euthanasiées par inhalation de CO₂. Les lymphocytes de la rate et du thymus ont été prélevés stérilement et les cellules ont été isolées par frottement des organes sur une passoire à cellules en nylon et mis en suspension dans un milieu composé de RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, E.U.) contenant 20 % SVF (Hyclone, Logan, UT) et 50 µM de 2-mercaptoéthanol (Gibco BRL). Les lymphocytes ont été enrichis par passage sur un gradient de Lympholyte[®] (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada). L'interface cellulaire a été prélevée et lavée deux fois avec du milieu RPMI 1640 contenant 20 % de SVF, de la L-glutamine (Gibco BRL) et des antibiotiques : tylosin (Sigma, St-Louis, MI, E.U.), Amphotericin B (Sigma), pénicilline (Gibco BRL) et streptomycin (Gibco BRL). Le culot a été ensuite resuspendu dans un volume de 3 ml de RPMI 1640 contenant 40 % de SVF. Le dénombrement cellulaire a été effectué par comptage électronique (Coulter Counter, Coulter Electronics Hialeah, FL, E.U.) en présence de 20 µL de la zap-O-globine (Coulter Electronics) et de 20 ml d'Hematall (Fisher Scientific). Les lectures ont été faites en duplicata et le nombre de cellules a été calculé sur une base finale de 1 ml.

2.3 Les traitements *in vitro* avec le MeHgCl

Les lymphocytes de thymus et de rate de souris C57BL/6 ou/et SJL ont été mis en culture à une concentration de 5×10^5 cellules / ml dans un milieu RPMI 1640 contenant 20 % de SVF et des antibiotiques en présence de 50 μ M de 2-mercaptoéthanol, et ce, en absence et en présence de différentes doses de MeHgCl (Alfa Products, Danvers, MA, E.U.). Le MeHgCl a préalablement été dissout dans l'acétone (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, E.U.) et dilué dans l'eau distillée à une concentration de 10^{-2} M, et subséquemment dilué dans du RPMI 1640 à des concentrations variant de 0.001 à 1.0 μ M. Les traitements des cellules ont été réalisés en présence ou en absence de dexaméthasone (10^{-8} M) (Sigma), de Con A (5 μ g/ml) (Sigma) ou d'anticorps anti-Fas (50 ng/ml) (Pharmingen, San Diego, CA, E.U.). Les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 37° C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂, et ont ensuite été marquées avec différents anticorps pour les études en cytofluorométrie. Des expériences similaires ont été réalisées avec des cellules incubées jusqu'à 6 jours pour les études de stimulation blastique et de cytotoxicité. Toutes les expériences avec des cultures cellulaires ont été effectuées plus d'une fois en triplicata.

2.4 Les immunomarquages et la cytofluorométrie

2.4.1 Marquage avec l'anticorps anti-Thy1.2 et l'iodure de propidium

Cette technique de double marquage des cellules a été réalisée tel que décrit par Garvy *et al.* (1993) et Telford *et al.* (1991) avec quelques modifications. Brièvement, les cellules incubées en présence ou en absence de dexaméthasone ou de concanavalin A ont été prélevées et centrifugées, à l'aide d'une microcentrifugeuse (Fisher Scientific, model 59A), pendant 5 min à la vitesse 275g. Les culots ont ensuite été resuspendus dans 1 ml du milieu RPMI 1640 contenant 20 % de SVF et les cellules ont été électroniquement comptées. Ces cellules ont été incubées avec

l'anticorps anti-Thy1 (Pharmingen) couplé à la fluorescéine (Thy1-FITC), à une concentration de 1mg/ml/10⁶ cellules, dans un volume de 500 µl de RPMI avec 20 % de SVF et incubées pendant 40 min sur la glace. Elles ont été ensuite centrifugées et le culot a été resuspendu dans 500 µl d'un milieu de fixation composé d'un tampon phosphate (PBS) (Sigma) contenant 1 % de formaldéhyde (Anachemia, Toronto, Ontario, Canada). Ces cellules ont été fixées toute la nuit à 4° C, ensuite centrifugées et lavées deux fois par centrifugation avec du PBS contenant 0.005 % de saponine (Sigma). Les cellules ont ensuite été resuspendues et conservées, pendant une nuit à 4° C, dans 500 µl d'une solution contenant 50 µg/ml d'IP et 0.1 µg/ml d'ARNase-A (Boehringer Mannheim, Laval, Québec). Les cellules ainsi marquées ont été analysées en cytofluorométrie. Ces marquages ont été réalisés en triplicata.

2.4.2 Double marquage avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8

Pour réaliser ce marquage, les cellules ont été d'abord prélevées, centrifugées et resuspendues dans du RPMI 1640 contenant 20 % de SVF. Elles ont été ensuite incubées avec les anticorps anti-CD4 couplés à la FITC (CD4-FITC) (Pharmingen) et anti-CD8 couplés à la PE (CD8-PE) (Pharmingen) pendant 40 min dans la glace, à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été centrifugées et le culot cellulaire a été resuspendu dans 500 µl de PBS (Sigma) contenant 1 % de formaldéhyde, toute la nuit à 4° C. Les cellules marquées ont été visualisées en cytofluorométrie. Ces marquages ont été réalisés en triplicata.

2.4.3 Double marquage avec les anticorps anti-CD4 et anti-Vβ6, Vβ8 ou Vβ14

Ce marquage a été fait avec le même procédure que celle indiquée à la section 2.4.2, sauf que dans cette expérience, le double marquage cellulaire a été effectué en utilisant les anticorps anti-CD4-PE (Pharmingen) et des anticorps monoclonaux anti-

V β 6, V β 8 ou V β 14-FITC (Pharmingen). Les cellules ont été alors marquées et fixées avant d'être analysées au cytofluoromètre. Lors de la mise au point de ces immunomarquages, des contrôles d'isotype ont été effectués à l'aide d'anticorps de même isotypes mais dirigés contre des marqueurs sans relation avec ceux utilisés dans les expériences pré-citées. Tous les immunomarquages ont été réalisés en triplicata.

2.4.4 Marquage des fragments d'ADN : méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling)

Le marquage de cellules apoptotiques par la méthode TUNEL a été fait, avec quelques modifications, selon la méthodologie commerciale décrite par Boehringer Mannheim (Cat. No. 1684 795, Laval, Québec). Cette méthode permet de détecter les cellules apoptotiques en phase intermédiaire de l'apoptose au moment de la fragmentation d'ADN. Elle consiste en l'incorporation de nucléotides marqués à l'extrémité terminale-5' de l'ADN par une déoxynucléotidyle transférase. Les cellules ont d'abord été prélevées, centrifugées et lavées par centrifugation avec 1 ml de PBS contenant 1 % de ABS (Sigma). Le culot a été resuspendu dans 1 ml de cette solution, puis les cellules ont été dénombrées. Une quantité de 1.5×10^6 cellules a été marquée avec l'anticorps anti-TCR $\alpha\beta$ -PE (Pharmingen) pendant 40 min dans la glace à l'obscurité. Les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 100 μ l d'une solution de paraformaldéhyde 4 % (Anachemia) dans du PBS à pH 7.4 pendant 30 min à la température de la pièce. Les cellules ont été lavées par centrifugation avec 200 μ l de PBS puis resuspendues dans 100 μ l d'une solution de perméabilisation contenant 0.1 % de Triton X-100 (Fisher Scientific) et 0.1 % de citrate de sodium (Fisher Scientific) pour deux min sur la glace. Les cellules ont été ensuite lavées 2 fois par centrifugation avec 200 μ l du PBS 1X et mises en contact avec le réactif TUNEL (Boehringer Mannheim) pendant 60 min à 37° C en atmosphère humide et à l'obscurité. Les cellules ont été subséquentement lavées deux fois, par centrifugation,

avec 200 μ l de PBS et resuspendues dans 500 μ l de PBS. Les préparations ont été analysées en cytofluorométrie. Ces marquages ont été réalisés en triplicata.

2.5 La stimulation blastique

Le test de stimulation blastique permet de mesurer la survie et/ou la prolifération cellulaire avec ou sans mitogène, en présence ou absence de produits toxiques (Mosmann, 1983). La méthodologie utilisée est basée sur la mesure de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale, détectable par colorimétrie à l'aide de MTS et MSP (Promega, New York, NY, lot no. 6781102). Après une incubation de 24 h avec le MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou d'anticorps anti-Fas, 20 μ l du mélange de produits MTS et MSP dans un rapport de 20:1 a été ajouté dans chaque puits. La réaction a été quantifiée sous une longueur d'onde de 490 nm, avec un colorimètre adapté pour les cellules en cultures (Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, E.U.). La première lecture colorimétrique a été effectuée après 4 h suivant l'ajout de MTS et PMS. Les lectures subséquentes ont été faites à différents temps durant 4 jours. Des courbes doses-réponses ont été réalisées pour déterminer la variation de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale des lymphocytes. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

2.6 Cytofluorométrie en flux

L'analyse cytofluorométrique des cellules marquées a été effectuée sur un appareil FACScan équipé d'un laser (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, E.U.). L'analyse a été faite sur 5000 cellules lymphocytaires, telles qu'identifiées selon leur taille et leur réfringence. Les lymphocytes montrant une réfringence se situant entre 50 et 400 en SSC et une taille variant entre 200 et 600 sur l'axe de FSC, ont été sélectionnés. Les événements détectés en dehors de ces paramètres correspondent à

des débris puisque leur taille et leur réfringence sont trop faibles, ou à des cellules macrophagiques ou des polymorphonucléaires, qui possèdent une taille et une réfringence supérieure à celle des lymphocytes. Ces événements ont été exclus de l'analyse. Les lymphocytes ont été ainsi séparés en deux populations: celle qui possédait une réfringence et une taille normales (R1) et celle qui montrait une plus grande densité, donc une plus grande réfringence (SSC), et une plus petite taille (FSC) (R2), qui sont des caractéristiques de cellules apoptotiques.

Lors de l'analyse de la quantité d'ADN intracellulaire, telle que déterminée par le marquage à l'IP, les cellules apparaissant sur l'histogramme du nombre de cellules en fonction de la quantité de l'IP, autour de 10^3 en échelle logarithmique, ont été considérées comme des cellules normales, c'est-à-dire contenant $2n$ chromosomes, tandis que cellules ayant perdu des fragments d'ADN, donc contenant moins d'ADN que les cellules normales et se situant avant 10^3 sur l'axe des x, représentaient des cellules dites en apoptose. Par contre, celles qui présentaient une quantité supérieure d'ADN à celle des cellules normales ont été classées comme des cellules en division ayant $4n$ chromosomes car elles retenaient plus d'IP. Des histogrammes similaires ont été réalisés afin de déterminer le pourcentage de cellules positives au test TUNEL. Tous les doubles marquages ont été analysés en rapport avec une matrice de distribution des intensités des deux marqueurs, permettant de séparer les cellules sélectionnées en quatre quadrants. Les nombres absolus et les pourcentages de cellules dans chacun de ces quadrants ont été notés.

2.7 Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés statistiquement par le test de "t" de Student pour les différents groupes de cellules traitées et analysées en cytofluorométrie, alors que l'analyse de variance (ANOVA) a été effectuée sur les mesures d'activité métabolique des cellules en culture soumises à différents traitements (Scherrer, 1984). Les effets

de différentes doses de MeHgCl ont été comparés à ceux des cellules contrôles n'ayant pas été mis en contact avec le MeHgCl. Le rapport R1/R2 a été calculé pour mettre en évidence le changement dans le pourcentage de cellules normales qui deviennent apoptotiques. Le seuil de signification a été fixé à un $p \leq 0.05$ et les résultats sont exprimés en pourcentage ou nombre de cellules \pm écart type.

CHAPITRE TROISIÈME

RÉSULTATS

3.1 Détermination des populations cellulaires morphologiquement normales et apoptotiques chez les thymocytes et splénocytes de souris C57BL/6 et SJL

Des concentrations faibles de métaux lourds, tel le MeHgCl, peuvent altérer des mécanismes biochimiques de la cellule sans nécessairement entraîner la mort par nécrose. Le processus d'apoptose pourrait être déclenché dans une telle situation. Les cellules en apoptose sont principalement caractérisées par des modifications morphologiques au niveau de leur membrane plasmique et des clivages de leur ADN par des endonucléases. Ces modifications cellulaires reliées à l'apoptose peuvent être détectées par différentes techniques.

3.1.1 Détermination des lymphocytes morphologiquement normaux et apoptotiques par la différence de taille et de réfringence

Les cellules qui sont en apoptose voient leur granulosité intra-cellulaire et leur taille diminuer par la perte du contenu de leurs organites cellulaires sous forme de corps apoptotiques (Feldmann, 1995). Ces caractéristiques morphologiques de l'apoptose peuvent être détectées en cytofluorométrie par l'analyse de la taille (FSC) et du degré de réfringence (SSC) des événements cellulaires.

Afin de différencier, *in vitro*, les lymphocytes qui sont morphologiquement normaux de ceux en processus d'apoptose, des lymphocytes de rate et de thymus de souris C57BL6 et SJL ont été enrichis par passage sur un gradient de Lympholyte[®], incubés pendant deux jours à 37 °C puis analysés en cytofluorométrie. La population dite morphologiquement normale a été différenciée de celle dite apoptotique par la taille (FSC) et la réfringence (SSC) cellulaire (Fig. 1). Les cellules apoptotiques, qui présentent une taille plus petite et une réfringence plus grande que celle d'une cellule normale, se retrouvent dans la région (R2) montrant un SSC plus grand et un FSC plus petit qu'une cellule morphologiquement normale (R1) et ce, autant chez les

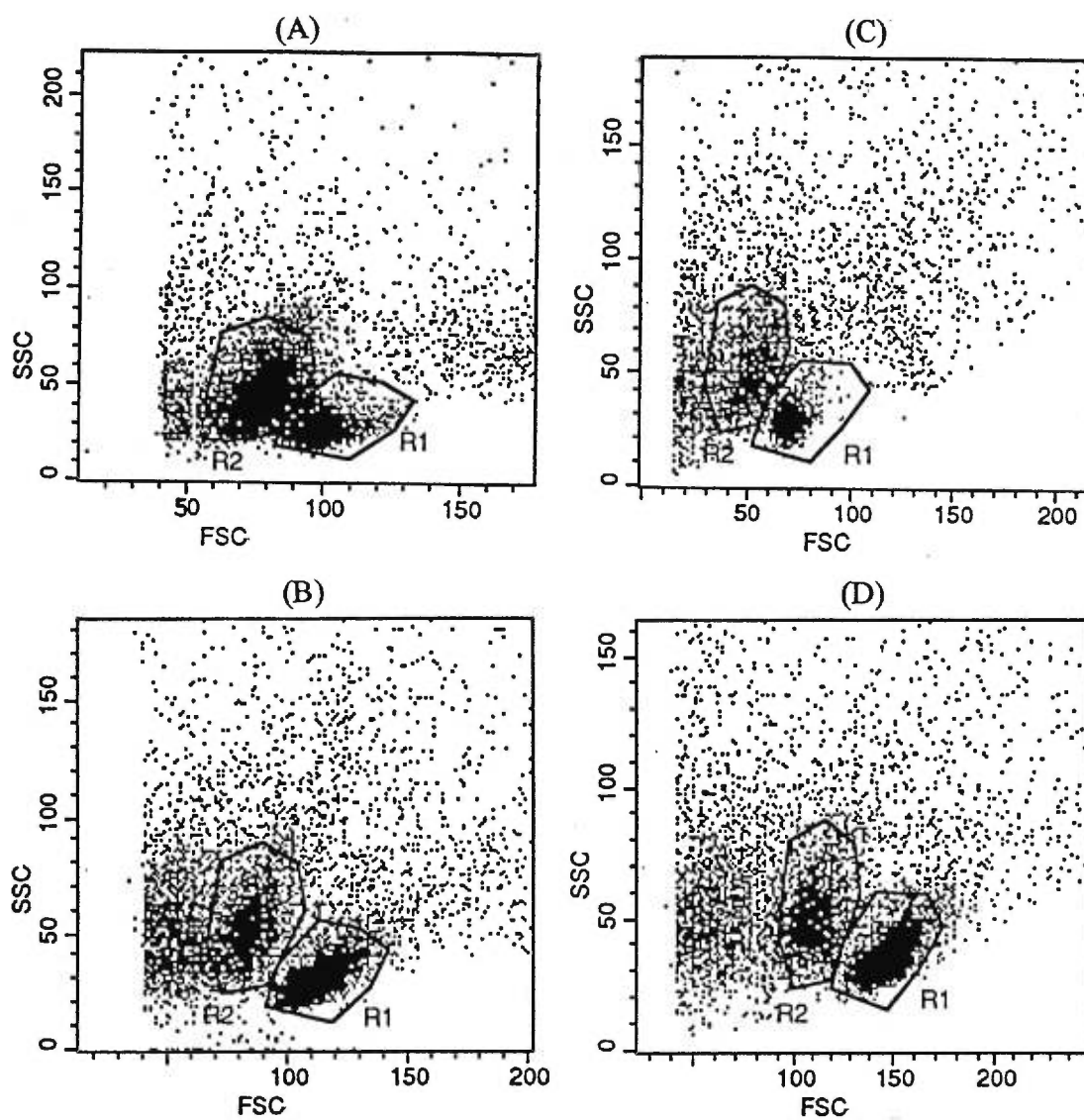


Figure 1 : Analyse cytofluorométrique des populations cellulaires du thymus (A, C) et de la rate (B, D) des souris C57BL/6 (A, B) et SJL (C, D) selon les paramètres FSC et SSC. La région R1 correspond à des cellules lymphoïdes normales et la région R2 à une population cellulaire exprimant un plus faible FSC et un plus fort SSC.

lymphocytes de rate ou de thymus des deux lignées murines. Afin de confirmer que les cellules de la région R2 sont en processus d'apoptose, les cellules ont été traitées avec de la dexaméthasone connue comme étant un excellent inducteur d'apoptose chez les lymphocytes. La figure 2 montre que la présence de dexaméthasone a réduit le niveau de cellules normales dans la région R1 et augmenté le nombre de cellules dans la région R2 correspondant donc à des structures apoptotiques. Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser ces critères morphologiques comme premier indicateur de la présence de cellules apoptotiques dans les expériences subséquentes avec le MeHgCl.

3.1.2 Détermination des lymphocytes morphologiquement normaux et apoptotiques par la présence de cassures d'ADN détectées par le test TUNEL

Afin de confirmer la présence de fragments d'ADN dans les cellules classifiées dans la région R2, un test TUNEL a été effectué. Ce test permet d'identifier les cellules apoptotiques par la présence d'extrémités libres d'ADN, suite à l'action de l'endonucléase. Le tableau I montre que dans la région R1, il n'y a qu'un faible pourcentage de lymphocytes qui sont positifs au test TUNEL et ce, chez les deux lignées de souris. Par contre, les lymphocytes retrouvés dans la région R2 sont pratiquement tous positifs au test TUNEL. Ces résultats montrent que la majorité des lymphocytes de la rate et du thymus ayant une taille plus petite et une densité plus forte montrent des bris d'ADN spécifiques à l'apoptose.

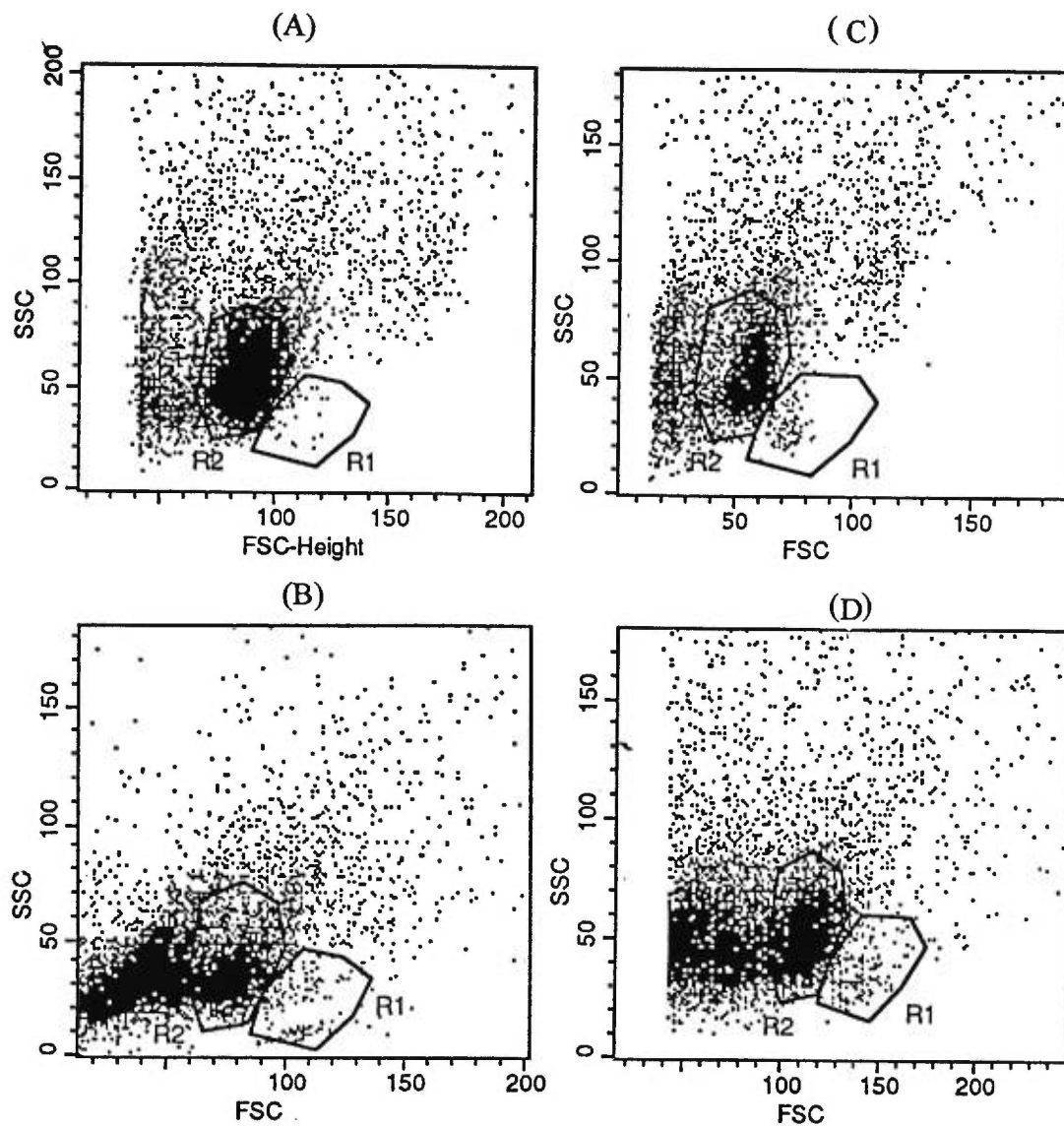


Figure 2 : Analyse cytofluorométrique des populations cellulaires du thymus (A, C) et de la rate (B, D) des souris C57BL/6 (A, B) et SJL (C, D), traitées avec la dexaméthasone, selon les paramètres FSC et SSC. La région R1 correspond à des cellules lymphoïdes normales et la région R2 à une population cellulaire exprimant un plus faible FSC et un plus fort SSC.

Tableau I : Pourcentages de cellules dans les régions R1 et R2 de l'analyse cytofluorométrique, tels que déterminés par le test TUNEL chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL après différents temps de culture.

Lignée murine	Temps post-culture (h)	*R1 (%)	**R2 (%)
C57BL/6	24	10.0 ± 0.8	95.8 ± 1.0
	72	12.0 ± 0.7	74.4 ± 39.1
SJL	24	6.9 ± 0.9	99.3 ± 0.1
	72	7.3 ± 2.1	97.1 ± 1.1

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

3.2 Évaluation des populations cellulaires morphologiquement normales et apoptotiques chez les splénocytes et les thymocytes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou de dexaméthasone

3.2.1 Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl

Afin de déterminer si des doses subtoxiques sont capables d'induire un processus apoptotique, des lymphocytes de rate et du thymus en provenance des deux lignées de souris ont été incubés pendant 48h avec différentes concentrations de MeHgCl. Les nombres relatifs de lymphocytes morphologiquement normaux (région R1) et apoptotiques (région R2) ont été déterminés en cytofluorométrie (Tableau II). Lorsque le nombre de cellules dans chacune des régions est analysé en fonction de la concentration de MeHgCl, aucune différence significative n'est mise en évidence dans les splénocytes en provenance de la souris C57BL/6. Par contre, chez la souris SJL les nombres de cellules apoptotiques (région R2) sont augmentés en fonction de la dose de MeHgCl, à partir d'une concentration de 0.01 μM ($p \leq 0.05$ et 0.01), alors que ceux de la région R1 (cellules normales) diminuent à des concentrations de 0.1 μM et plus ($p \leq 0.05$). L'analyse des rapports R1/R2 montrent, chez la souris C57BL/6, que le nombre de splénocytes morphologiquement normaux augmente par rapport à celui des cellules apoptotiques à la concentration la plus faible de MeHgCl mais diminuent graduellement à des concentrations plus élevées de MeHgCl ($p \leq 0.05$). Ce rapport est abaissé, chez la souris SJL, qu'avec des concentrations de 0.5 et 1 μM de MeHgCl ($p \leq 0.05$).

Chez les thymocytes de souris C57BL/6, seules les concentrations plus fortes de MeHgCl (0.5 et 1.0 μM) peuvent réduire significativement le nombre de

Tableau II : Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

Lignée murine	MeHgCl	Populations cellulaires		Rapport
	(μ M)	*R1	**R2	R1/R2
C57BL/6	Contrôle	3231 \pm 750	2388 \pm 503	1.35 \pm 0.04
	0.001	4002 \pm 95	2339 \pm 87	1.71 \pm 0.10*
	0.01	3586 \pm 11	2723 \pm 96	1.32 \pm 0.05
	0.1	3420 \pm 191	2882 \pm 36	1.20 \pm 0.06*
	0.5	3102 \pm 159	3045 \pm 238	1.00 \pm 0.14*
	1	2906 \pm 272	3128 \pm 192*	0.90 \pm 0.15*
SJL	Contrôle	3563 \pm 208	2424 \pm 55	1.47 \pm 0.12
	0.001	3576 \pm 189	2467 \pm 93	1.45 \pm 0.13
	0.01	3577 \pm 211	2629 \pm 68*	1.36 \pm 0.10
	0.1	3119 \pm 56*	2715 \pm 157*	1.20 \pm 0.18
	0.5	3129 \pm 56*	2865 \pm 89**	1.10 \pm 0.05**
	1	3230 \pm 201	3294 \pm 75**	1.00 \pm 0.04**

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

thymocytes normaux en comparaison avec ceux qui sont apoptotiques ($p \leq 0.05$) (Tableau III). Chez les cellules de souris SJL, les thymocytes sont très peu affectés par le MeHgCl puisque seule la concentration la plus forte de MeHgCl entraîne une diminution du rapport R1/R2 ($p \leq 0.05$).

Ces résultats suggèrent qu'à partir d'une concentration de $0.01 \mu\text{M}$, le MeHgCl entraîne les lymphocytes spléniques à entrer en apoptose. Les splénocytes de souris SJL sont, par contre, plus sensibles aux effets apoptotiques du MeHgCl puisque la concentration minimale d'induction de l'apoptose se situe à $0.01 \mu\text{M}$ alors que les cellules de la souris C57BL/6 sont affectées par des concentrations égales ou supérieures à $0.1 \mu\text{M}$. Par contre, les thymocytes de SJL sont légèrement plus résistants à l'apoptose induite par le MeHgCl que ceux des souris C57BL/6.

3.2.2 Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, des souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence de concanavalin A

Il est proposé que l'apoptose induite par le MeHgCl pourrait alors être contrecarrée par la stimulation antigénique. D'autre part, une atteinte plus généralisée des effets du MeHgCl sur des voies métaboliques ou des structures mitotiques (ex. microtubules) pourrait, au contraire, augmenter le niveau d'apoptose chez les cellules en division. Afin de vérifier ces hypothèses, des splénocytes et des thymocytes en provenance de souris C57BL/6 et SJL ont été mis en contact avec différentes concentrations de MeHgCl concurremment à une stimulation par la Con A durant 48 h. Le tableau IV montre que les splénocytes stimulés de souris C57BL/6 diminuent en nombre dans la région R1 et augmentent dans la région R2 en fonction de la concentration du MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.001). Les rapports R1/R2 diminuent fortement dès une concentration de $0.01 \mu\text{M}$ de MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.001). Cependant, chez les

Tableau III : Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes du thymus de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

Lignée murine	MeHgCl	Populations cellulaires		Rapport
		(μ M)	*R1	**R2
C57BL/6	Contrôle	2220 \pm 194	5052 \pm 156	0.44 \pm 0.03
	0.001	2119 \pm 165	4990 \pm 122	0.42 \pm 0.03
	0.01	2055 \pm 126	5029 \pm 103	0.41 \pm 0.03
	0.1	2201 \pm 304	5047 \pm 104	0.40 \pm 0.07
	0.5	1902 \pm 70	5078 \pm 99	0.40 \pm 0.01*
	1	1731 \pm 104*	5384 \pm 327	0.30 \pm 0.04*
SJL	Contrôle	1126 \pm 132	3319 \pm 443	0.34 \pm 0.01
	0.001	1101 \pm 210	2800 \pm 190	0.39 \pm 0.08
	0.01	987 \pm 228	2702 \pm 727	0.37 \pm 0.08
	0.1	1136 \pm 257	2479 \pm 266*	0.47 \pm 0.16
	0.5	1227 \pm 42	3140 \pm 310	0.39 \pm 0.04
	1	1019 \pm 170	3476 \pm 505	0.29 \pm 0.02*

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$

splénocytes de SJL, les résultats montrent très peu de variations significatives du nombre de splénocytes morphologiquement apoptotiques et normaux (Tableau IV).

Des résultats différents sont observés avec les thymocytes, car en présence de la Con A, les thymocytes de souris C57BL/6 augmentent fortement dans les régions R1 et R2 (Tableau V) ($p \leq 0.05$ à 0.001). Le rapport R1/R2 confirme cette hausse relative du nombre de thymocytes normaux de souris C57BL/6 ($p \leq 0.001$). Par contre, chez les thymocytes de SJL, tout comme chez les splénocytes, il n'y a aucun changement significatif autant dans le nombre de splénocytes apoptotiques que de celui de lymphocytes normaux.

Les résultats observés chez les lymphocytes traités avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulés par la Con A suggèrent une sensibilité plus grande à l'effet apoptotique induit par le MeHgCl chez les splénocytes et les thymocytes de souris C57BL/6 que chez ceux de la souris SJL, malgré une stimulation des thymocytes de la souris C57BL/6.

3.2.3 Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence de dexaméthasone

Dans l'organisme, les glucocorticoïdes sont une famille de substances endogènes qui peuvent induire la mort cellulaire par apoptose (Wyllie, 1980). La dexaméthasone, un composé de la famille des glucocorticoïdes, est connue comme un indicateur d'apoptose chez les lymphocytes (Compton *et al.*, 1988). Afin de vérifier si le MeHgCl induit l'apoptose via une voie semblable à celle utilisée par la dexaméthasone, des splénocytes et des thymocytes de souris C57BL/6 et SJL ont été similairement traités, tel que décrit à la section 3.2.1, mais en présence de 10^{-8} M de dexaméthasone. Les résultats présentés dans le tableau VI indiquent une diminution

Tableau IV : Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

Lignée murine	MeHgCl (μ M)	Populations cellulaires		Rapport
		*R1	**R2	R1/R2
C57BL/6	Contrôle	2964 \pm 117	3118 \pm 261	0.96 \pm 0.11
	0.001	2120 \pm 403*	3206 \pm 609	0.70 \pm 0.20
	0.01	2053 \pm 387*	3991 \pm 111*	0.50 \pm 0.11*
	0.1	1837 \pm 323**	3989 \pm 134*	0.50 \pm 0.10**
	0.5	1672 \pm 272**	4426 \pm 364*	0.40 \pm 0.09**
	1	1014 \pm 30**	5085 \pm 322**	0.20 \pm 0.01**
SJL	Contrôle	1878 \pm 586	610 \pm 148	3.05 \pm 0.34
	0.001	1263 \pm 154	623 \pm 29	2.00 \pm 0.40*
	0.01	1391 \pm 432	615 \pm 52	2.20 \pm 0.61
	0.1	1638 \pm 157	551 \pm 41	3.00 \pm 0.16
	0.5	1888 \pm 564	708 \pm 128	2.60 \pm 0.36
	1	3070 \pm 813	1256 \pm 139*	2.40 \pm 0.43

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

Tableau V : Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes du thymus de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

Lignée murine	MeHgCl	Populations cellulaires		Rapport
		(μ M)	*R1	**R2
C57BL/6	Contrôle	284 \pm 24	2978 \pm 25	0.096 \pm 0.007
	0.001	311 \pm 78	3054 \pm 293	0.101 \pm 0.016
	0.01	1152 \pm 131**	4387 \pm 227**	0.262 \pm 0.020**
	0.1	1205 \pm 71**	4581 \pm 82**	0.263 \pm 0.011**
	0.5	877 \pm 47**	4348 \pm 168**	0.202 \pm 0.013**
	1	896 \pm 60**	4795 \pm 187**	0.187 \pm 0.016**
SJL	Contrôle	338 \pm 87	2103 \pm 160	0.16 \pm 0.05
	0.001	431 \pm 45	2173 \pm 142	0.20 \pm 0.03
	0.01	364 \pm 80	2177 \pm 387	0.17 \pm 0.01
	0.1	443 \pm 70	2528 \pm 212*	0.17 \pm 0.02
	0.5	388 \pm 63	2204 \pm 158	0.18 \pm 0.02
	1	302 \pm 41	2315 \pm 77	0.13 \pm 0.02

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$

Tableau VI : Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

Lignée murine	MeHgCl	Populations cellulaires		Rapport
		(μ M)	*R1	**R2
C57BL/6	Contrôle	82 \pm 19	3303 \pm 97	0.030 \pm 0.010
	0.001	93 \pm 5	3511 \pm 329	0.028 \pm 0.001
	0.01	57 \pm 4	3376 \pm 136	0.017 \pm 0.002
	0.1	46 \pm 2*	3075 \pm 401	0.015 \pm 0.002
	0.5	41 \pm 5*	2871 \pm 462	0.014 \pm 0.001*
	1	31 \pm 8*	3161 \pm 393	0.010 \pm 0.002*
SJL	Contrôle	204 \pm 21	4451 \pm 230	0.050 \pm 0.010
	0.001	191 \pm 25	3909 \pm 107*	0.050 \pm 0.008
	0.01	201 \pm 50	3965 \pm 395	0.050 \pm 0.009
	0.1	164 \pm 8*	3995 \pm 83*	0.041 \pm 0.002
	0.5	122 \pm 18**	4515 \pm 123	0.027 \pm 0.003**
	1	116 \pm 13**	4807 \pm 338	0.024 \pm 0.004**

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

du nombre de splénocytes morphologiquement normaux (R1) chez les deux lignées de souris suite à l'action de la dexaméthasone ($p \leq 0.05$ à 0.01). Par contre, le MeHgCl, à des concentrations égales ou supérieures à $0.05 \mu\text{M}$ entraîne une plus forte diminution des cellules normales, et ce chez les deux lignées de souris, malgré une diminution de cellules apoptotiques (R2) chez la souris SJL avec des concentrations faibles de MeHgCl ($p \leq 0.05$). Le MeHgCl semble donc légèrement augmenter l'apoptose de splénocytes induite par la dexaméthasone.

Au niveau des thymocytes, la présence de dexaméthasone réduit drastiquement le nombre de thymocytes dans R1 et produit une hausse des lymphocytes dans R2, et ce, chez les deux lignées de souris, lorsque comparés aux résultats du Tableau III (Tableau VII). Toutefois, chez les thymocytes traités avec le MeHgCl, aucune variation significative n'est observée chez les deux lignées, malgré une légère tendance à l'augmentation du nombre de thymocytes de la souris SJL dans la région R2 avec l'augmentation de la concentration de MeHgCl ($p \leq 0.05$) (Tableau VII).

3.2.4 Nombres de splénocytes et de thymocytes morphologiquement normaux et apoptotiques, de souris C57BL/6 et SJL, traités avec différentes concentrations de MeHgCl, tels que déterminé par le test TUNEL

Afin de confirmer que l'augmentation des cellules dans la région R2 est bien une conséquence de l'induction d'un processus apoptotique par le MeHgCl, la présence de cassures spécifiques de l'ADN chez ces cellules a été vérifiée par le test TUNEL. Tel que montré dans le Tableau VIII, les splénocytes de souris C57BL/6 incubés pendant 24h avec du MeHgCl montrent une hausse significative ($p \leq 0.01$) de cellules avec des bris d'ADN avec $1 \mu\text{M}$ de MeHgCl, et ce, dans la région R1, alors que la plupart des cellules de la région R2, considérées comme morphologiquement apoptotiques, possèdent effectivement des cassures de l'ADN (Tableau VIII). Chez

Tableau VII : Nombres de cellules morphologiquement normales (R1) et apoptotiques (R2), chez des lymphocytes du thymus de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

Lignée murine	MeHgCl (μ M)	Populations cellulaires		Rapport
		*R1	**R2	R1/R2
C57BL/6	Contrôle	18 \pm 3	6434 \pm 355	0.005 \pm 0.001
	0.001	16 \pm 6	6161 \pm 117	0.003 \pm 0.001
	0.01	16 \pm 6	6200 \pm 210	0.003 \pm 0.001
	0.1	26 \pm 22	6388 \pm 36	0.004 \pm 0.004
	0.5	34 \pm 19	6447 \pm 93	0.005 \pm 0.004
	1	23 \pm 11	6376 \pm 88	0.003 \pm 0.001
SJL	Contrôle	82 \pm 28	3579 \pm 320	0.020 \pm 0.010
	0.001	95 \pm 25	3567 \pm 169	0.026 \pm 0.006
	0.01	114 \pm 39	3646 \pm 90	0.030 \pm 0.010
	0.1	108 \pm 14	3620 \pm 379	0.030 \pm 0.006
	0.5	117 \pm 17	4349 \pm 415	0.027 \pm 0.006
	1	95 \pm 34	4424 \pm 234*	0.021 \pm 0.007

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$

Tableau VIII : Pourcentages de cellules apoptotiques déterminés par le test TUNEL chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

Lignée murine	MeHgCl (μ M)	Populations cellulaires (%)		Rapport R1/R2
		*R1	**R2	
C57BL/6	Contrôle	10.0 \pm 0.8	95.8 \pm 1.0	0.11 \pm 0.08
	0.001	12.0 \pm 1.6	96.3 \pm 0.4	0.13 \pm 10.02
	0.01	12.3 \pm 2.5	95.7 \pm 0.7	0.13 \pm 0.03
	1	13.6 \pm 0.6**	96.4 \pm 1.1	0.14 \pm 0.01**
SJL	Contrôle	6.9 \pm 0.9	99.3 \pm 0.1	0.07 \pm 0.01
	0.001	6.4 \pm 0.8	98.8 \pm 0.1**	0.07 \pm 0.01
	0.01	8.2 \pm 1.2	99.0 \pm 0.1*	0.08 \pm 0.01
	1	6.2 \pm 0.8	98.9 \pm 0.2	0.06 \pm 0.01

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$

les splénocytes de souris SJL, par contre, aucune variation significative n'est observée dans la région R1, et très peu dans la région R2.

Par contre, suite à une stimulation de 72 h avec de la Con A en présence de différentes concentrations de MeHgCl, la majorité des splénocytes de souris C57BL/6 de la région R2 présente des clivages de leur ADN (Tableau IX). Seule la concentration de 1 μ M de MeHgCl entraîne une forte augmentation du pourcentage de cellules positives au test TUNEL dans la région R1 ($P \leq 0.05$), ce qui a aussi pour effet d'augmenter le rapport R1/R2 ($P \leq 0.05$). Chez les lymphocytes de souris SJL, la présence de MeHgCl à des concentration de 0.01 μ M et plus, favorise le clivage de l'ADN chez les splénocytes stimulés par la Con A qui sont morphologiquement apoptotiques (région R2) ($P \leq 0.05$) mais aussi augmente légèrement les cellules apoptotiques dans la région R1 ($P \leq 0.05$). En comparant les pourcentages de cellules positives au test TUNEL chez des lymphocytes stimulés par la Con A par rapport à ceux de cellules non-stimulées (Tableau VIII), la présence de Con A semble avoir pour effet d'augmenter le pourcentage des splénocytes positifs au test TUNEL de la région R1 et de diminuer celui des lymphocytes apoptotiques (R2) chez la souris SJL.

Les expériences réalisées avec le test TUNEL montrent que les pourcentages de cellules apoptotiques dans les régions R1 et R2 ne sont que peu ou pas affectées par des concentrations inférieures à 1 μ M de MeHgCl et confirment que les changements de dimension et de réfringence des cellules de la région R2 reflètent bien un processus apoptotique dans ces cellules.

Tableau IX : Pourcentages de cellules apoptotiques déterminés par le test TUNEL chez des lymphocytes de rate de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de la concanavalin A.

Lignée murine	MeHgCl	Populations cellulaires (%)		Rapport
		*R1	**R2	
	(μ M)			R1/R2
C57BL/6	Contrôle	10.5 \pm 2.9	96.3 \pm 2.7	0.11 \pm 0.03
	0.001	16.3 \pm 2.3	97.7 \pm 0.4	0.17 \pm 0.03
	0.01	14.5 \pm 2.8	96.2 \pm 0.9	0.15 \pm 0.03
	1	36.5 \pm 1.6**	98.6 \pm 0.6	0.37 \pm 0.16*
SJL	Contrôle	4.4 \pm 0.9	85.4 \pm 5.0	0.05 \pm 0.01
	0.001	5.4 \pm 0.7	90.5 \pm 3.0	0.06 \pm 0.01
	0.01	7.3 \pm 2.0*	95.1 \pm 2.6*	0.08 \pm 0.02
	1	12.9 \pm 6.9*	94.0 \pm 3.8	0.14 \pm 0.07

*R1 : FSC/SSC normaux

**R2 : FSC bas / SSC haut

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

3.3 Evaluation des populations cellulaires morphologiquement normales et apoptotiques, chez les lymphocytes T spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, en présence de différentes concentrations de MeHgCl

Les expériences précédentes ont mis en évidence une augmentation de cellules apoptotiques dans la rate et le thymus, sans tenir compte du type de lymphocytes. Il est proposé que les lymphocytes T sont spécifiquement sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl chez la souris C57BL/6 mais non pas chez la souris SJL. Ainsi, les expériences subséquentes sont basées sur l'identification des lymphocytes T, via le marqueur Thy+, qui sont morphologiquement normaux ou apoptotiques en tenant compte de leur contenu en ADN à l'aide d'un marquage à l'IP. Pour réaliser ces expériences, les cellules ont été préalablement mises en contact avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de Con A et de dexaméthasone. Après 48h d'incubation, les lymphocytes ont été doublement marqués par un anticorps anti-Thy1 couplé à la fluorescéine et par l'IP afin de déterminer la quantité d'ADN présente dans les cellules. Les nombres de lymphocytes T hypoploïdes, normaux et hyperploïdes ont été évalués par cytofluorométrie.

3.3.1 Analyse des cellules spléniques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl

La figure 3 concerne les nombres de lymphocytes T hypoploïdes (apoptotiques) et normaux de la rate de souris C57BL/6 obtenus après un traitement avec les différentes concentrations de MeHgCl. Cette figure montre une augmentation du nombre de lymphocytes T hypoploïdes autant dans les régions R1 (cellules normales) que dans R2 (cellules apoptotiques) avec des concentrations de 0.001 à 0.01 μM de MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.01). Les nombres de lymphocytes T normaux en contenu d'ADN sont aussi augmentés en présence de faibles concentrations de

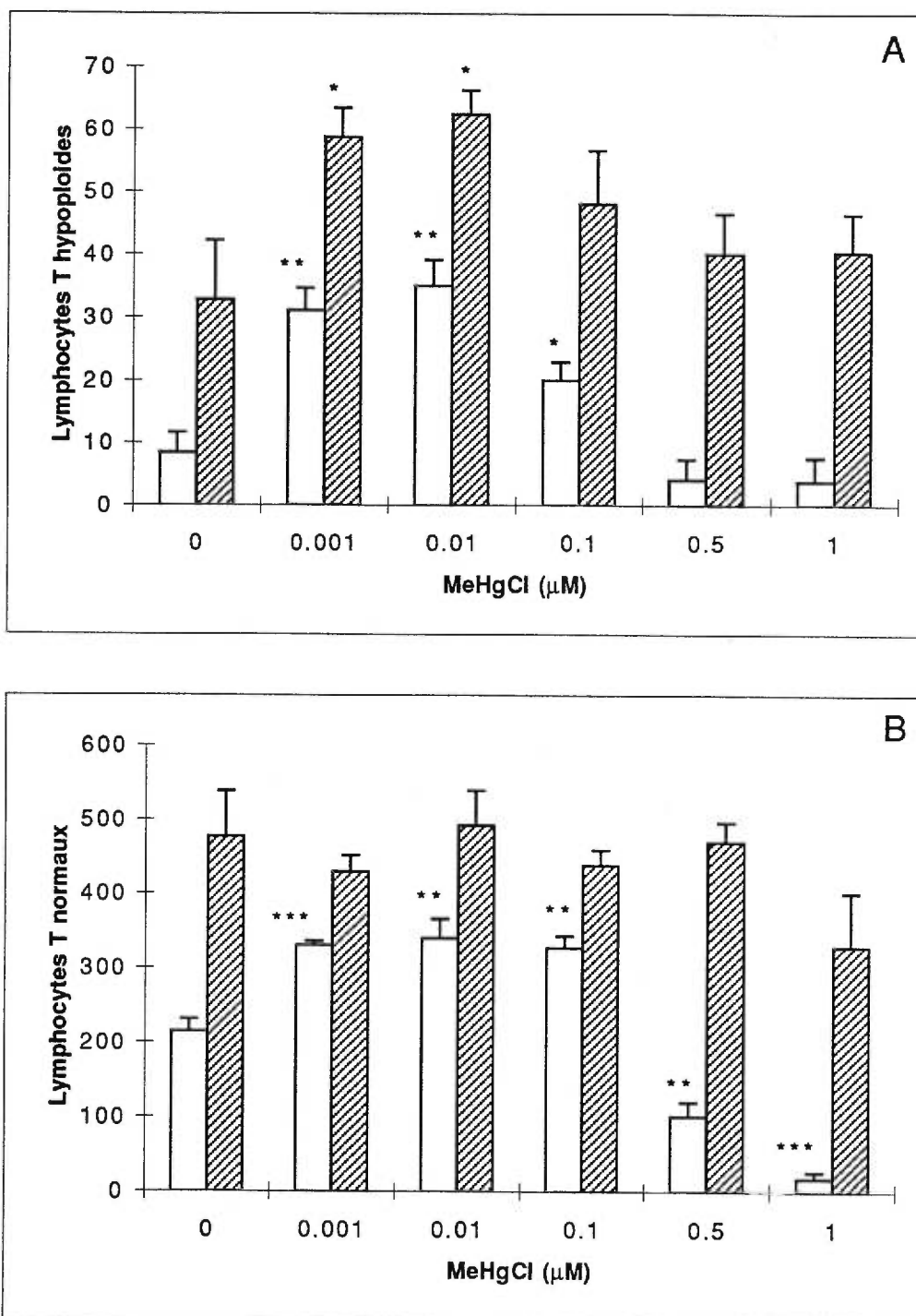


Figure 3 : Cellules spléniques Thy1⁺ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

MeHgCl ($p \leq 0.01$ à 0.001) puis diminués avec des concentrations plus élevées ($p \leq 0.01$) (Fig. 3B). Par contre, une légère diminution du nombre de lymphocytes T hypoploïdes en provenance de la souris SJL est observée avec des concentrations de 0.01 et $0.1 \mu\text{M}$ de MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 4A). Cependant, le MeHgCl à des concentrations de 0.1 et $0.5 \mu\text{M}$ cause une augmentation de lymphocytes normaux dans la région des lymphocytes morphologiquement apoptotiques (R2) ($p \leq 0.05$) (Fig. 4B), ce qui indique que des lymphocytes T qui présentent une quantité normale d'ADN peuvent être déjà morphologiquement apoptotiques. Ces résultats montrent que de faibles concentrations de MeHgCl peuvent induire une apoptose chez les cellules spléniques de souris C57BL/6 suite à une stimulation de ces cellules alors qu'elles bloquent, au contraire, ce processus chez la souris SJL.

3.3.2 Analyse des cellules thymiques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées in vitro avec différentes concentrations de MeHgCl

Les thymocytes représentent la population de lymphocytes T qui sont en processus de maturation, donc plus sensibles à l'apoptose lors du processus de sélection négative mais aussi en forte division cellulaire. Pour vérifier si le MeHgCl affecte le processus de maturation des thymocytes via une augmentation ou une diminution de l'apoptose selon les lignées murines, les thymocytes ont été mis en contact avec différentes concentrations de MeHgCl pendant 48h dans des conditions normales d'incubation et marqués avec un anticorps anti-Thy1 et de l'IP.

L'analyse cytofluorométrique ne montre aucune variation significative dans le nombre de thymocytes normaux et apoptotiques en provenance de la souris C57BL/6, que ce soit dans les régions R1 ou R2 (Fig. 5 A et B). Chez les thymocytes de SJL, seules les concentrations fortes de MeHgCl augmentent le nombre de lymphocyte T apoptotiques (région R2) ($p \leq 0.05$) (Fig. 6 A et B). Donc, le MeHgCl n'affecte pas le

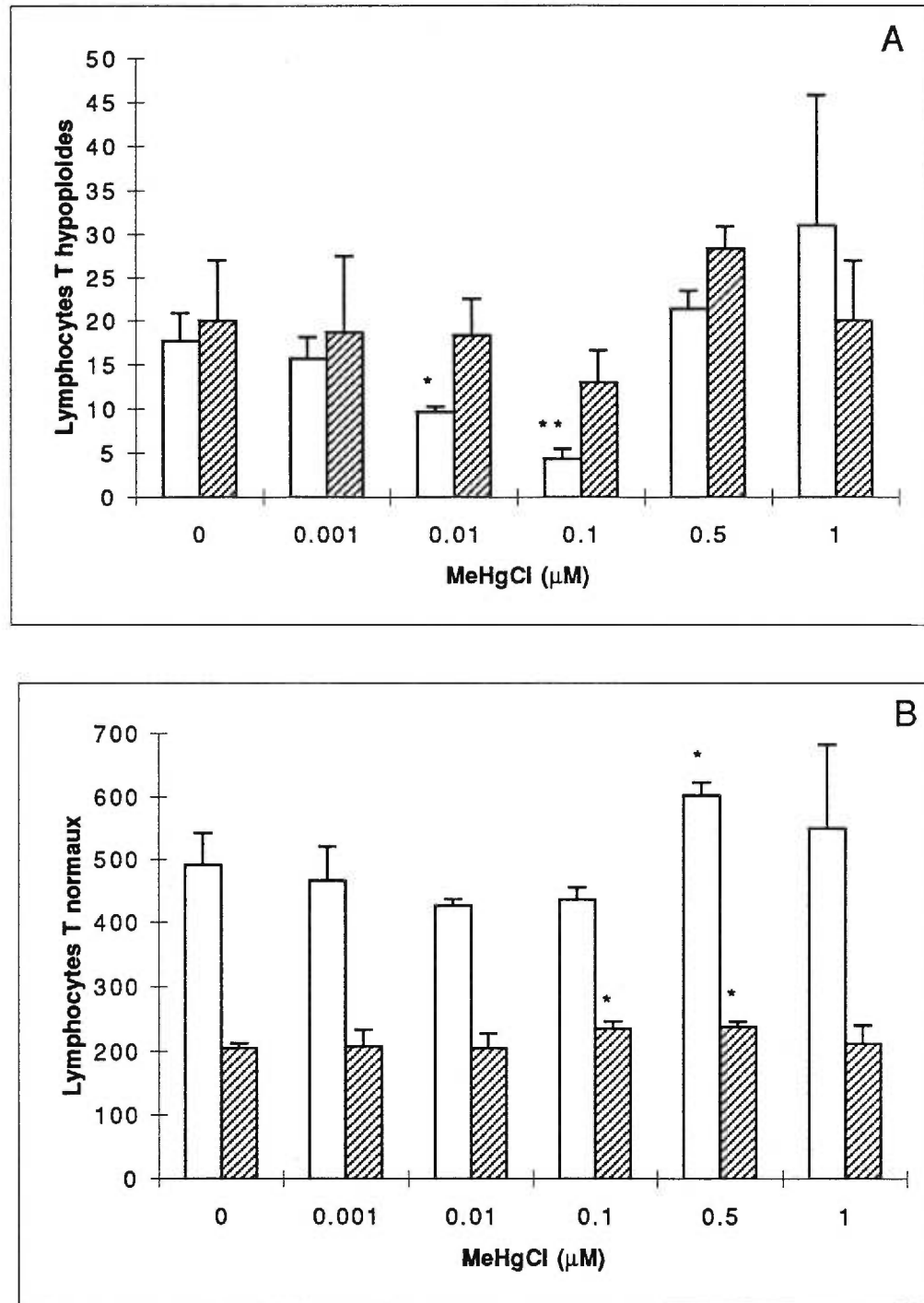


Figure 4 : Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (\square) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

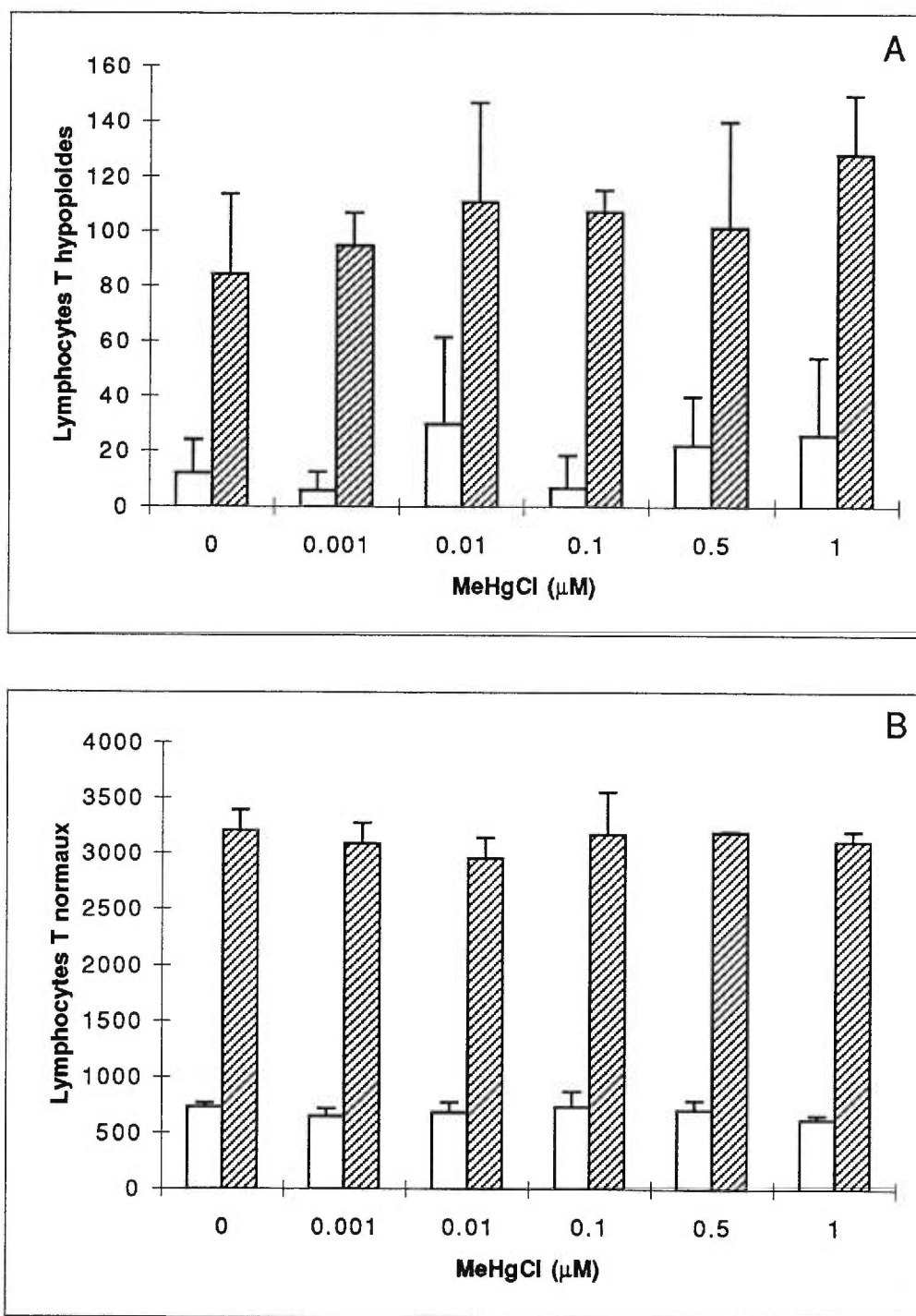


Figure 5 : Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

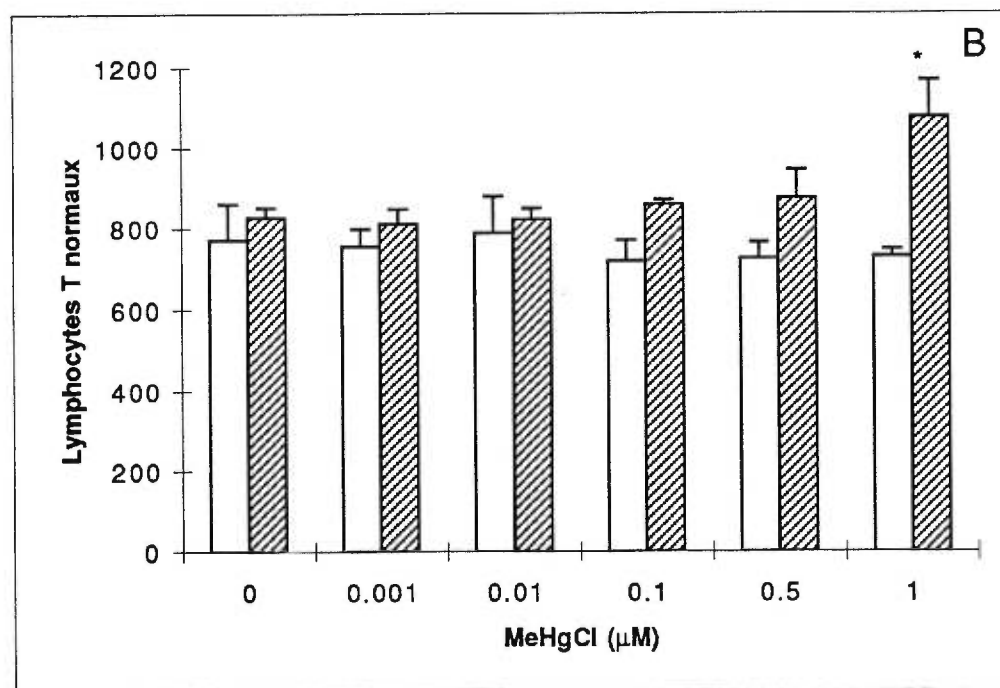
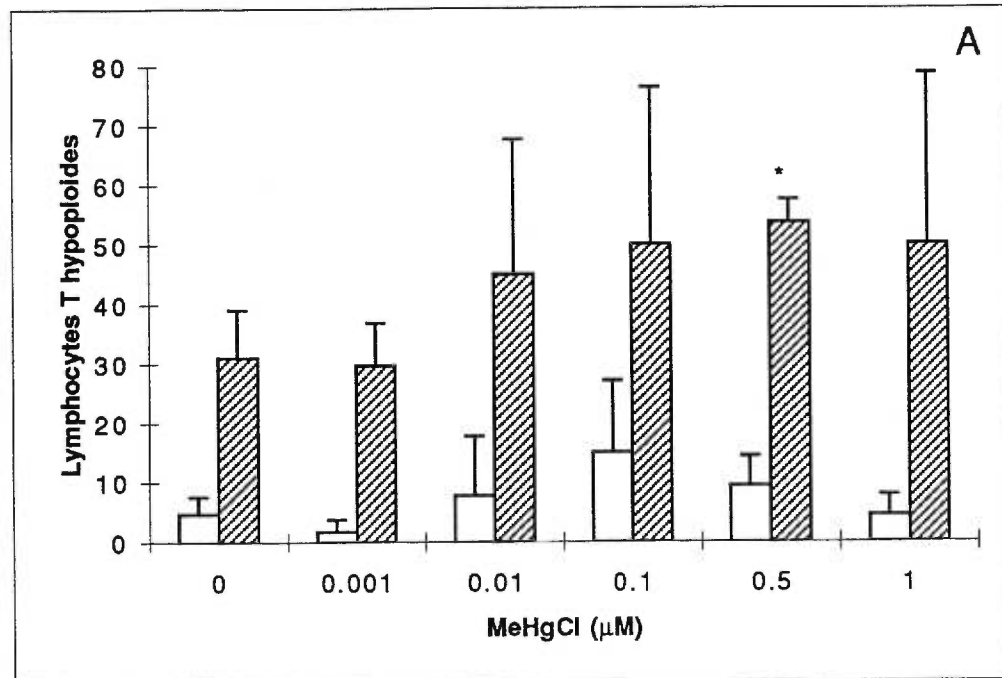


Figure 6 : Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (■), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

* $p < 0.05$

nombre de thymocytes de souris C57BL/6 et n'augmente légèrement l'apoptose chez les thymocytes de souris SJL que seulement aux plus fortes concentrations.

3.3.3 Analyse des cellules spléniques Thy1⁺ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la Con A

Les lymphocytes matures périphériques entrent en apoptose suite à une stimulation par un antigène ou par un mitogène (Russell *et al.*, 1993). Pour vérifier si le MeHgCl, à différentes concentrations, peut induire la mort par apoptose des lymphocytes T ainsi stimulés, les lymphocytes matures présents dans la rate des deux lignées de souris ont été incubés avec le MeHgCl et stimulés par la Con A pendant deux jours. Les cellules ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-Thy1 et de l'IP et analysées par cytofluorométrie.

Tel que montrée dans la figure 7A, une hausse du nombre de lymphocytes T hypoploïdes de souris C57BL/6 est remarquée autant dans les régions des lymphocytes morphologiquement apoptotiques (R2) que normaux (R1) ($p \leq 0.05$ à 0.001), et ce, avec de faibles concentrations de MeHgCl. Par contre, à fortes dose, la plupart des cellules hypoploïdes se retrouvent dans la région R2 ($p \leq 0.05$ à 0.001). Parallèlement, les lymphocytes T normaux en contenu d'ADN et morphologiquement normaux, sont fortement diminués avec des fortes concentrations de MeHgCl ($p \leq 0.001$) alors que les nombres de cellules normales mais morphologiquement apoptotiques augmentent légèrement ($p \leq 0.01$) (Fig. 7B). Chez les lymphocytes T de la souris SJL, les plus fortes concentrations de MeHgCl réduisent les nombres de lymphocytes T hypoploïdes et normaux dans les régions de R1 et R2 ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 8 A et B) alors que les lymphocytes traités avec des concentrations plus faibles se retrouvent en nombres plus élevés dans la région de R1 ($p \leq 0.05$) (Fig. 8 A et B), suggérant une augmentation du nombre de cellules morphologiquement normales mais hypoploïdes suite à l'action

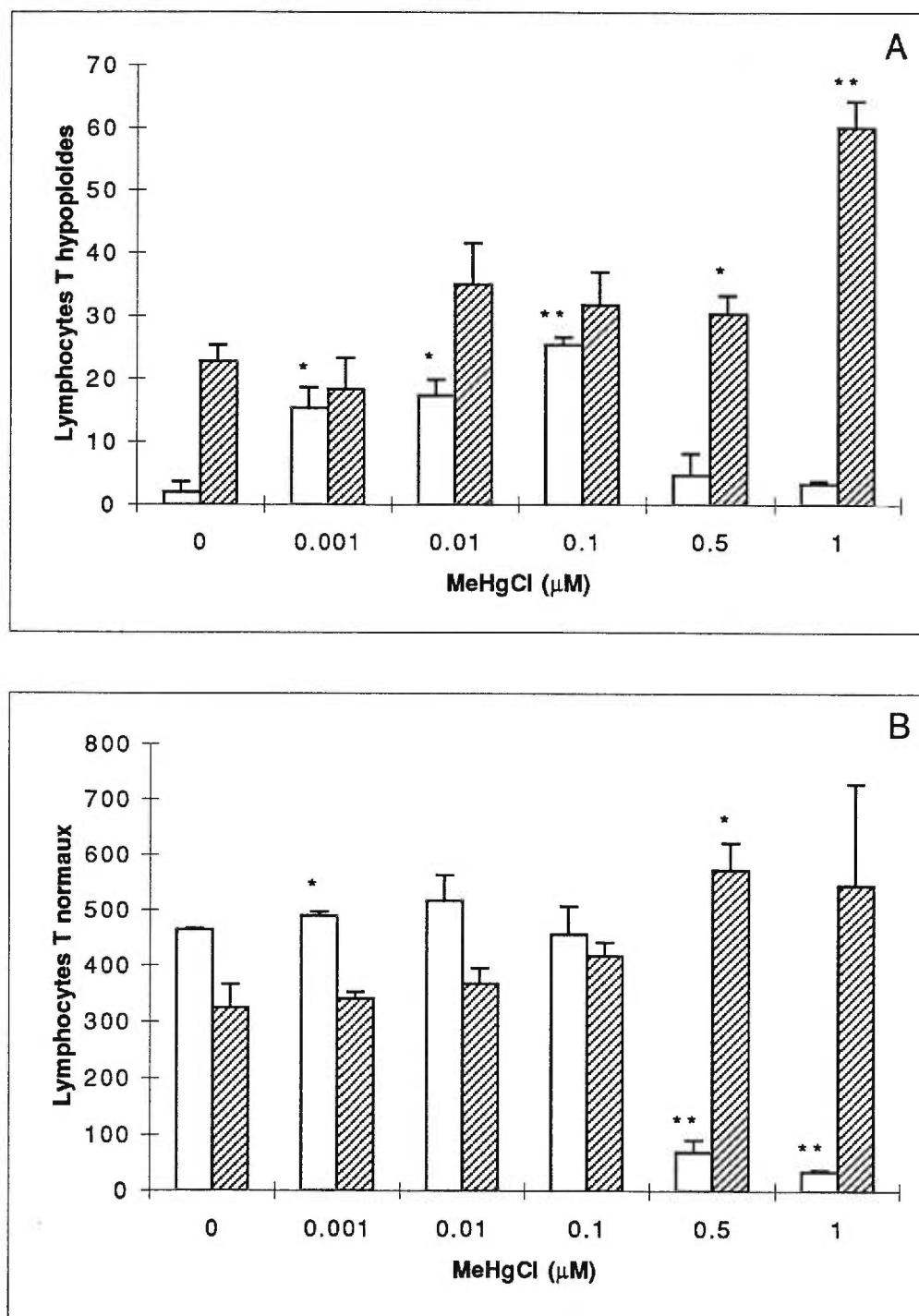


Figure 7 : Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

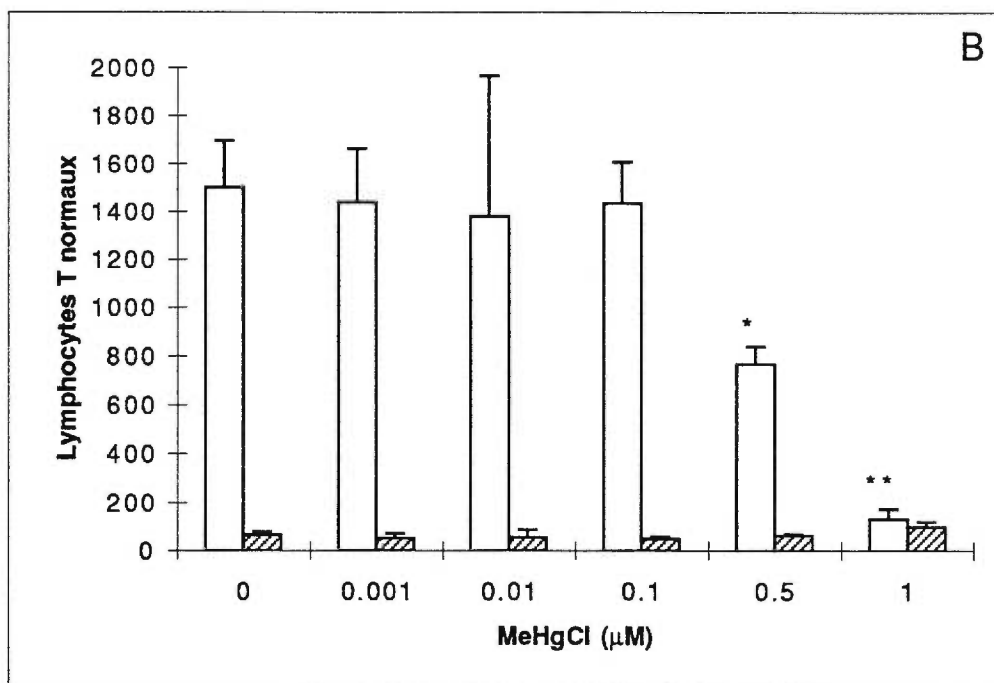
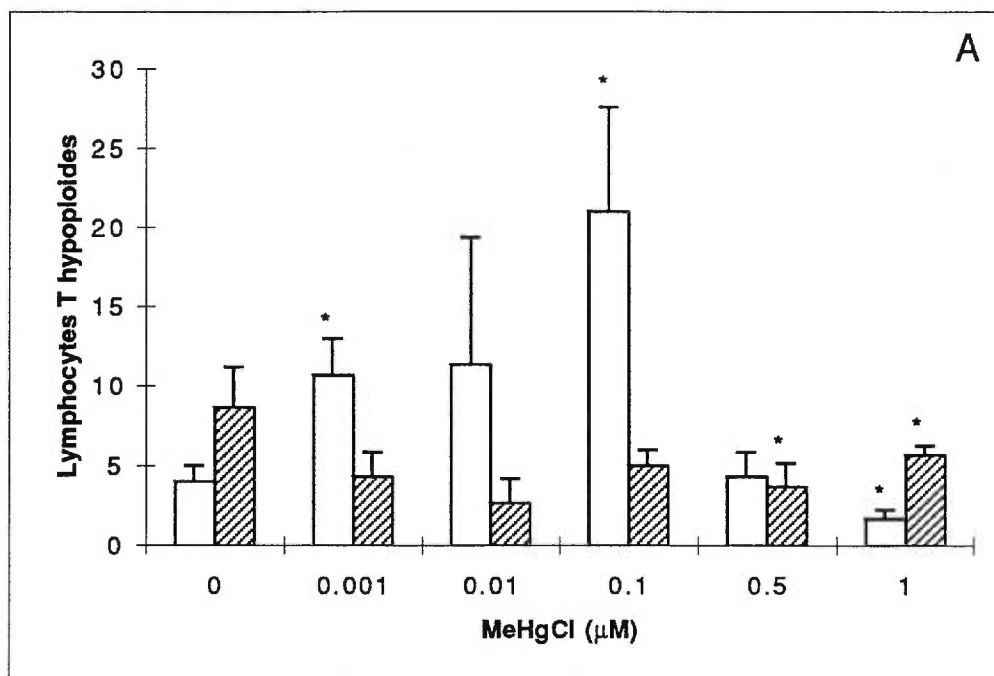


Figure 8 : Cellules spléniques Thy1+ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (\square) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

de faibles concentrations de MeHgCl. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les cellules spléniques normales présentes dans la région R1 résistent aisément à une apoptose induite par des doses plus faibles de MeHgCl (Fig. 8B). Donc, la stimulation des lymphocytes de la souris C57BL/6, par la Con A, les rend plus sensibles à l'apoptose induite par de faibles concentrations de MeHgCl alors, qu'au contraire, les lymphocytes T spléniques de la souris SJL sont plus résistants lorsque stimulés.

3.3.4 Analyse des cellules thymiques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la Con A

Quoique le MeHgCl n'a induit aucun effet significatif dans le nombre de thymocytes apoptotiques de souris C57BL/6, nous avons montré que ces cellules étaient plus sensibles à l'apoptose lorsque stimulées par la Con A (Tableaux III et V). Nous avons vérifié si le MeHgCl agit sur le contenu en ADN chez des thymocytes de souris C57BL/6 et SJL, tel que traités comme dans la section précédente. La figure 9 montre que le MeHgCl réduit légèrement le nombre de thymocytes ayant une quantité normale d'ADN dans les régions R1 et R2 mais n'entraîne pas plus d'apoptose (Fig. 9 A et B). Par contre, les thymocytes normaux de SJL sont sensibles au MeHgCl seulement aux concentrations les plus fortes, tel que montré par une réduction du nombre de cellules normales dans les régions R1 en faveur de la région R2 ($p \leq 0.05$) (Fig. 10). Cependant, le nombre de thymocytes apoptotiques de souris SJL semble moindre que ceux de souris C57BL/6, que ce soit dans R1 ou R2.

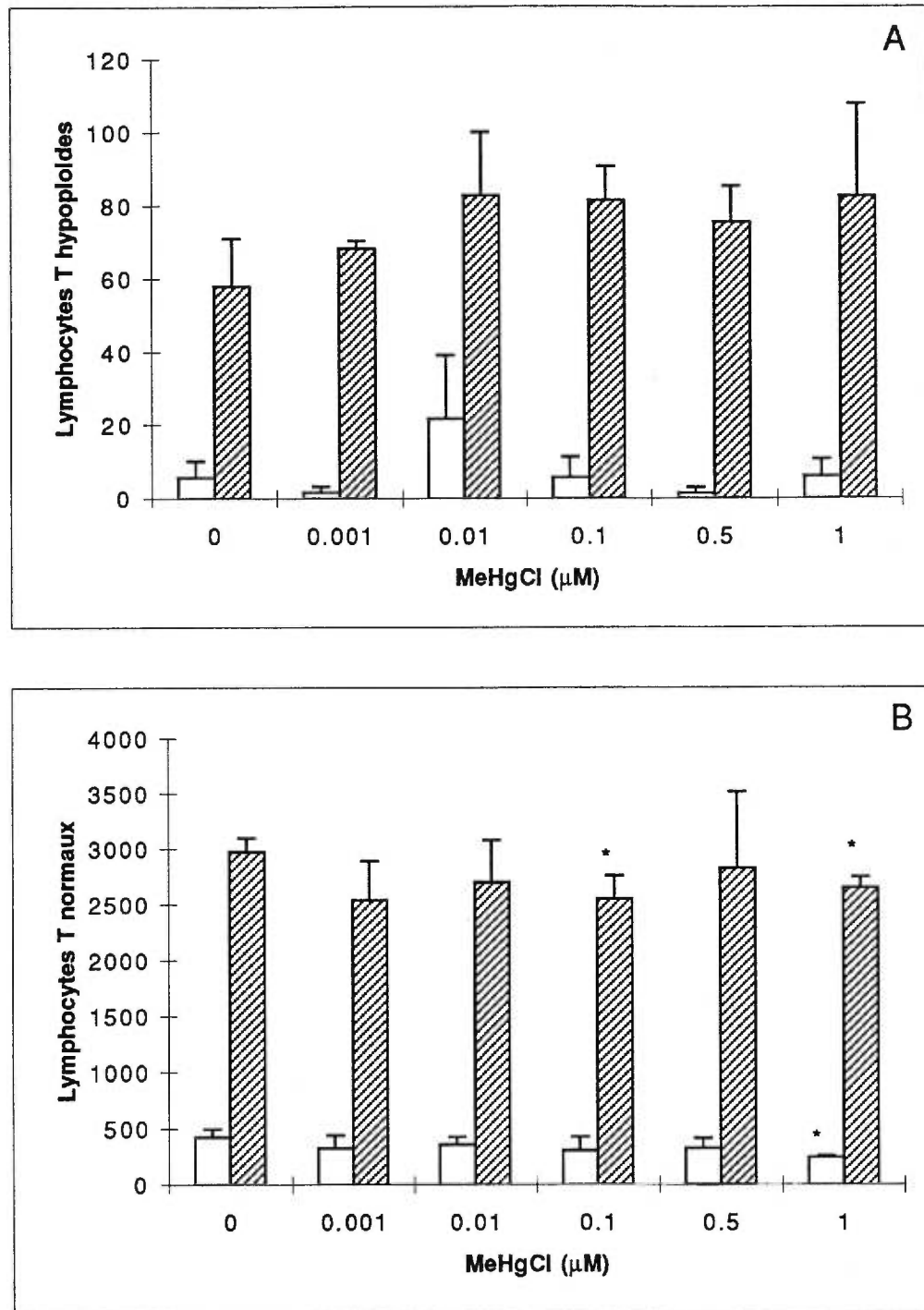


Figure 9 : Cellules thymiques Thy1+ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$

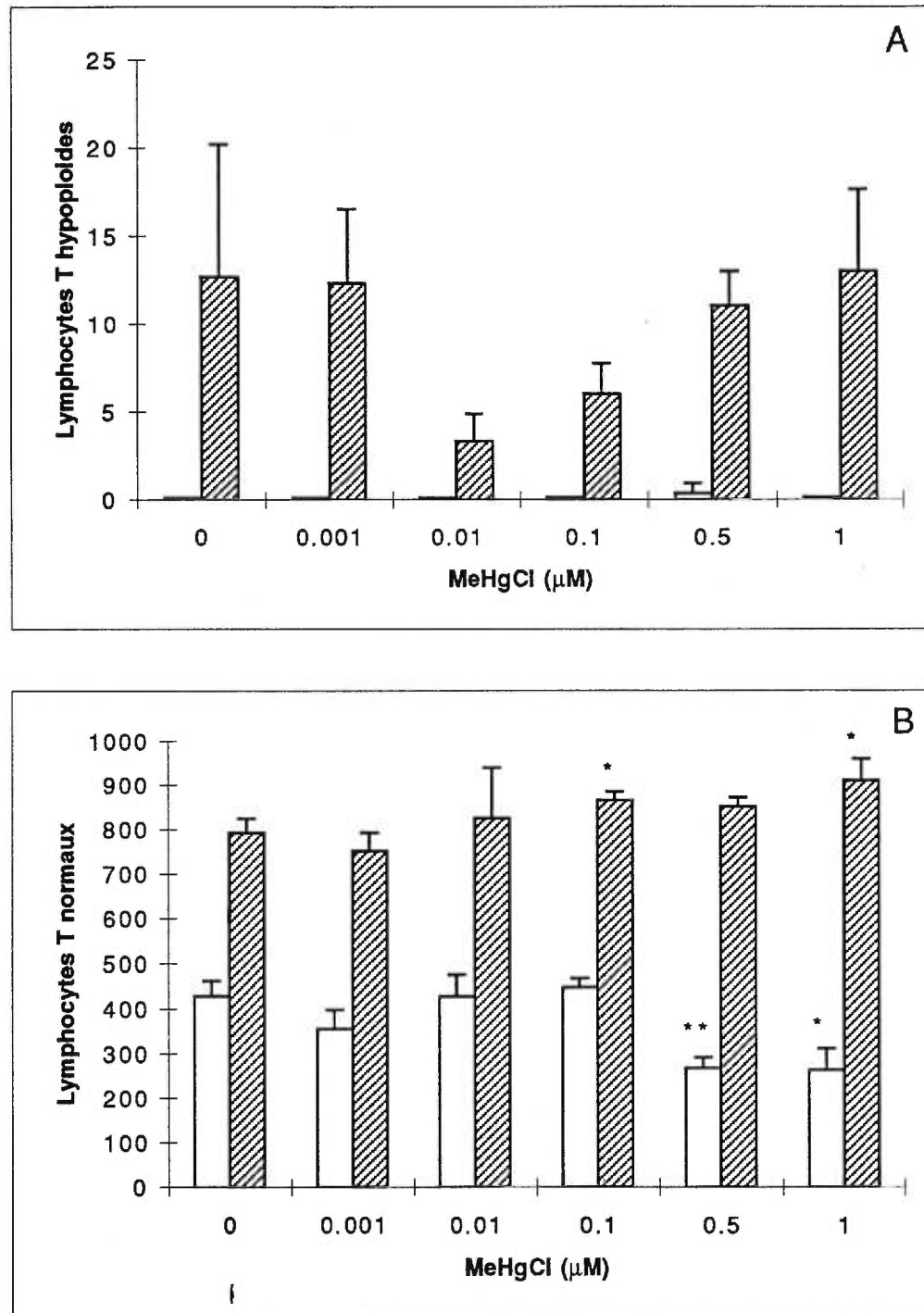


Figure 10 : Cellules thymiques Thy1⁺ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

3.3.5 Analyse des cellules spléniques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone

La dexaméthasone est un inducteur d'apoptose chez les lymphocytes T. Il est possible que le MeHgCl induise ou bloque l'apoptose, selon les lignées murines, en altérant l'action de la dexaméthasone, tel que montré avec le zinc (Berger et Skinner, 1974 ; Caron *et al.*, 1970). Afin de vérifier ces hypothèses, les lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 et SJL ont été similairement traités mais en présence de 10^{-8} M de dexaméthasone. Les résultats montrent, chez la souris C57BL/6, une diminution de lymphocytes T apoptotiques hypoploïdes ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 11A) et une augmentation de thymocytes normaux dans la région R1 avec de faibles concentrations de MeHgCl (Fig. 11B). Également chez la souris SJL, une diminution des nombres de lymphocytes T apoptotiques et normaux est aussi observée dans R1 ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 12A et B). Ces résultats suggèrent que de faibles concentrations de MeHgCl peuvent altérer légèrement le processus apoptotique induit par la dexaméthasone, chez les lymphocytes T spléniques, en diminuant ou en augmentant le nombre de cellules normales, chez les souris SJL et C57BL/6, respectivement.

3.3.6 Analyse des cellules thymiques Thy1+ normales et hypoploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone

Les cellules thymiques sont particulièrement sensibles à l'apoptose induite par la dexaméthasone (Cohen *et al.*, 1992). Nous avons aussi vérifié l'effet du MeHgCl sur ce type d'apoptose. Chez les thymocytes de souris C57BL/6, le MeHgCl n'a pas produit d'effet significatif sur le nombre de thymocytes Thy1+ morphologiquement hypoploïdes en présence de dexaméthasone (Fig. 13 A) mais a fortement augmenté le

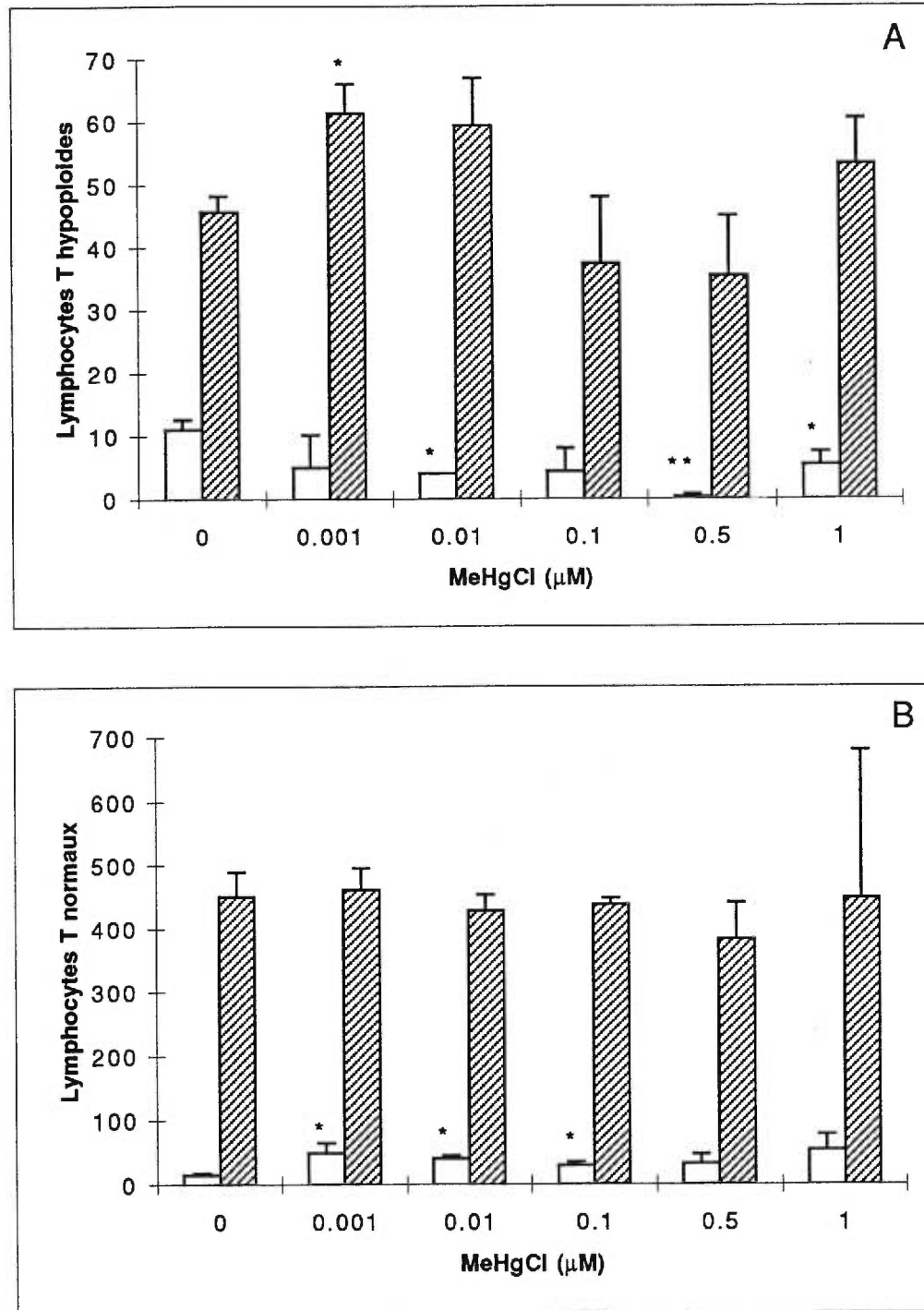


Figure 11 : Cellules spléniques Thy1⁺ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

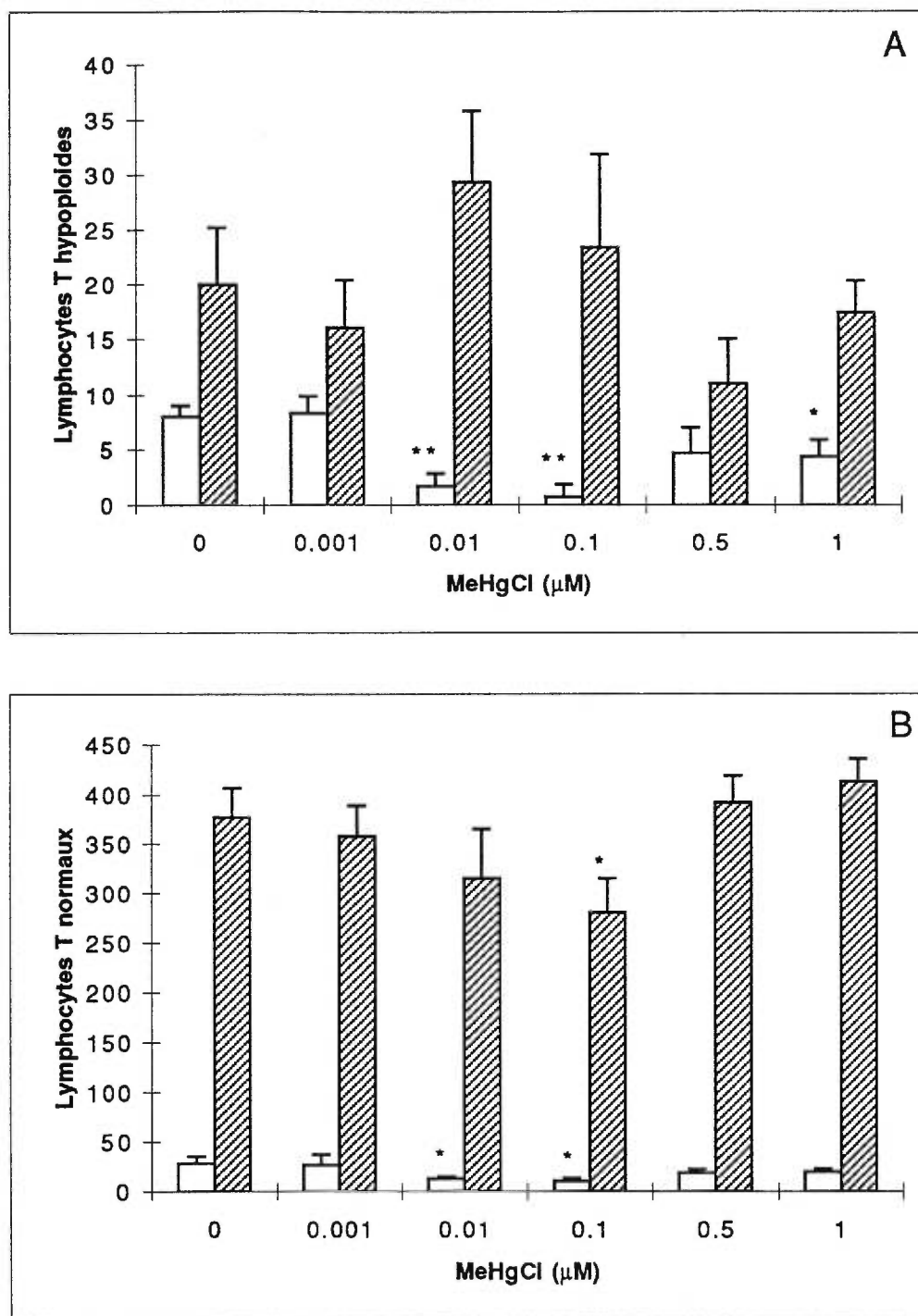


Figure 12 : Cellules spléniques Thy1⁺ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

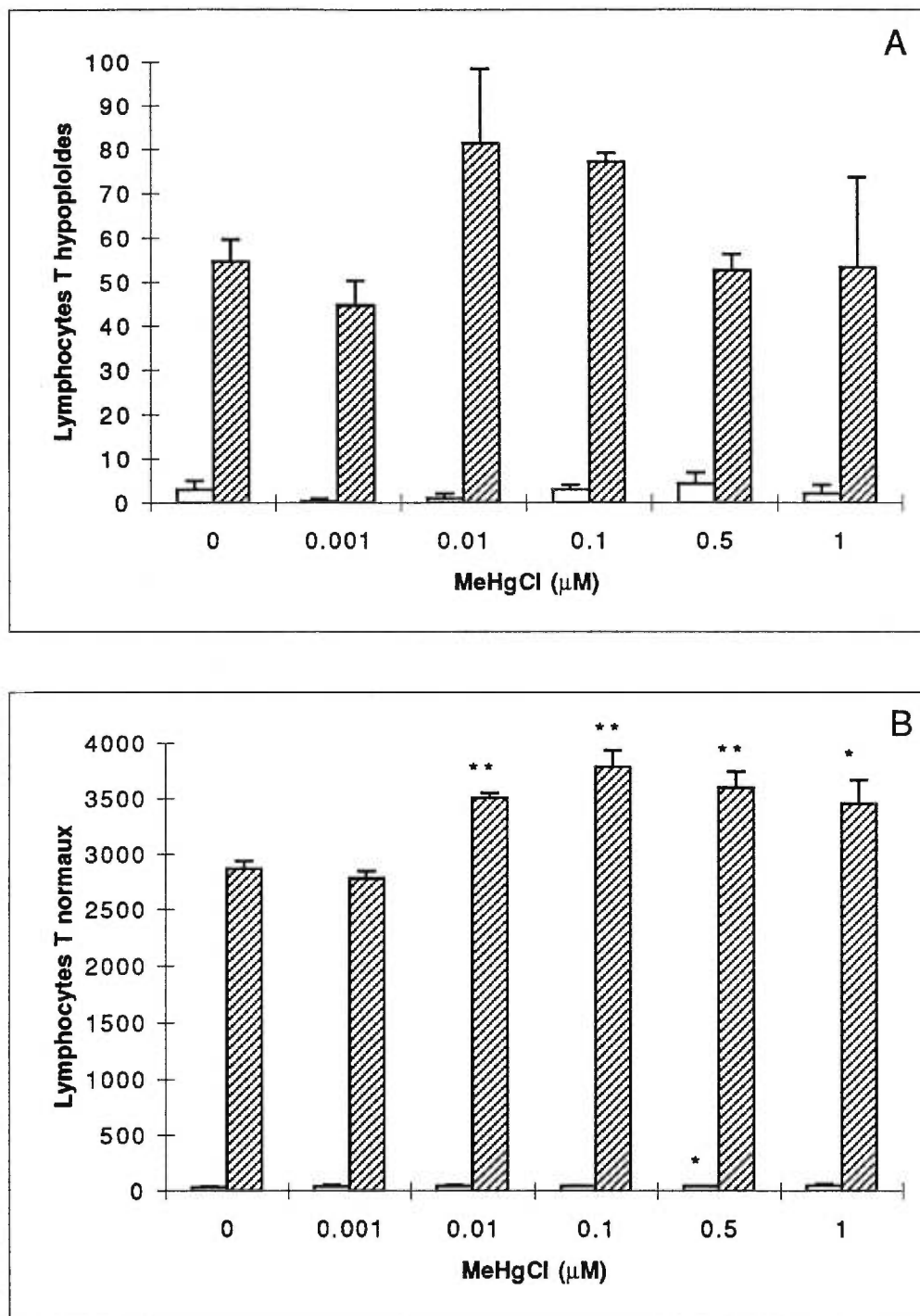


Figure 13 : Cellules thymiques Thy1⁺ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

nombre de cellules morphologiquement apoptotiques mais normales en ADN ($p \leq 0.05$ à 0.001). Ces variations n'ont pas été observées chez les thymocytes de SJL (Fig. 14). La présence de dexaméthasone a donc eu pour effet d'accroître le niveau de lymphocytes dans R2 et de les réduire dans R1 chez la souris C57BL/6 sans qu'il y ait une diminution importante dans le contenu en ADN cellulaire.

3.3.7 Analyse des cellules spléniques Thy1+ hyperploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou de dexaméthasone

La présence de cellules morphologiquement apoptotiques mais ayant un contenu normal en ADN suggère que les cellules en division seraient aussi plus sensibles à l'induction d'apoptose ou à son blocage par des concentrations faibles de MeHgCl, selon les lignées murines. De plus, les cellules en division ont été montrées comme étant plus sensibles à l'effet toxique du MeHgCl ($10 \mu\text{M}$) par une atteinte au niveau des microtubules (Miura *et al.*, 1978). Afin de vérifier si des concentrations subtoxiques de MeHgCl peuvent encore altérer la division mitotique, des lymphocytes spléniques des souris C57BL/6 et SJL ont été traités avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou non de Con A ou de dexaméthasone et marqués avec un anticorps anti-Thy1 et de l'IP. Lors de l'analyse cytofluorométrique de ces cellules, les populations montrant un taux d'ADN plus élevé que des cellules normales (hyperploïdes) ont été comptabilisées. Les résultats obtenus suite au traitement avec les différentes concentrations de MeHgCl montrent que les nombres de lymphocytes hyperploïdes de souris C57BL/6 diminuent dans la région R1 en présence des concentrations les plus fortes de mercure ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 15 A). La présence de Con A, entraîne une hausse du niveau de lymphocytes hyperploïdes de souris C57BL/6 dans la région R2 (Fig. 15B). La figure 15C montre une augmentation des lymphocytes hyperploïdes apoptotiques dans la région R2 en présence de dexaméthasone, chez la souris C57BL/6, surtout avec des concentrations fortes de

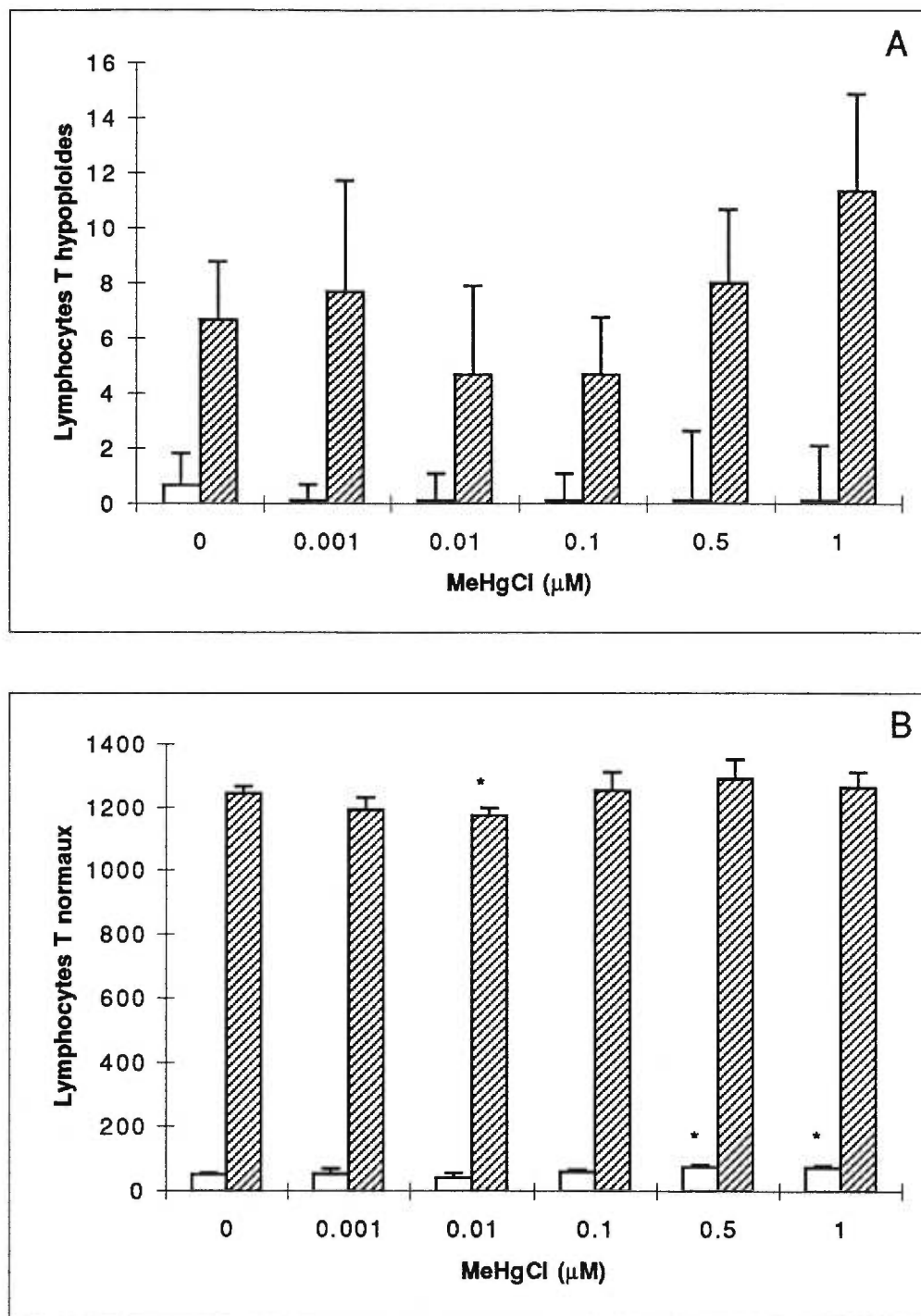


Figure 14 : Cellules thymiques Thy1⁺ hypoploïdes (A) et normales (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$

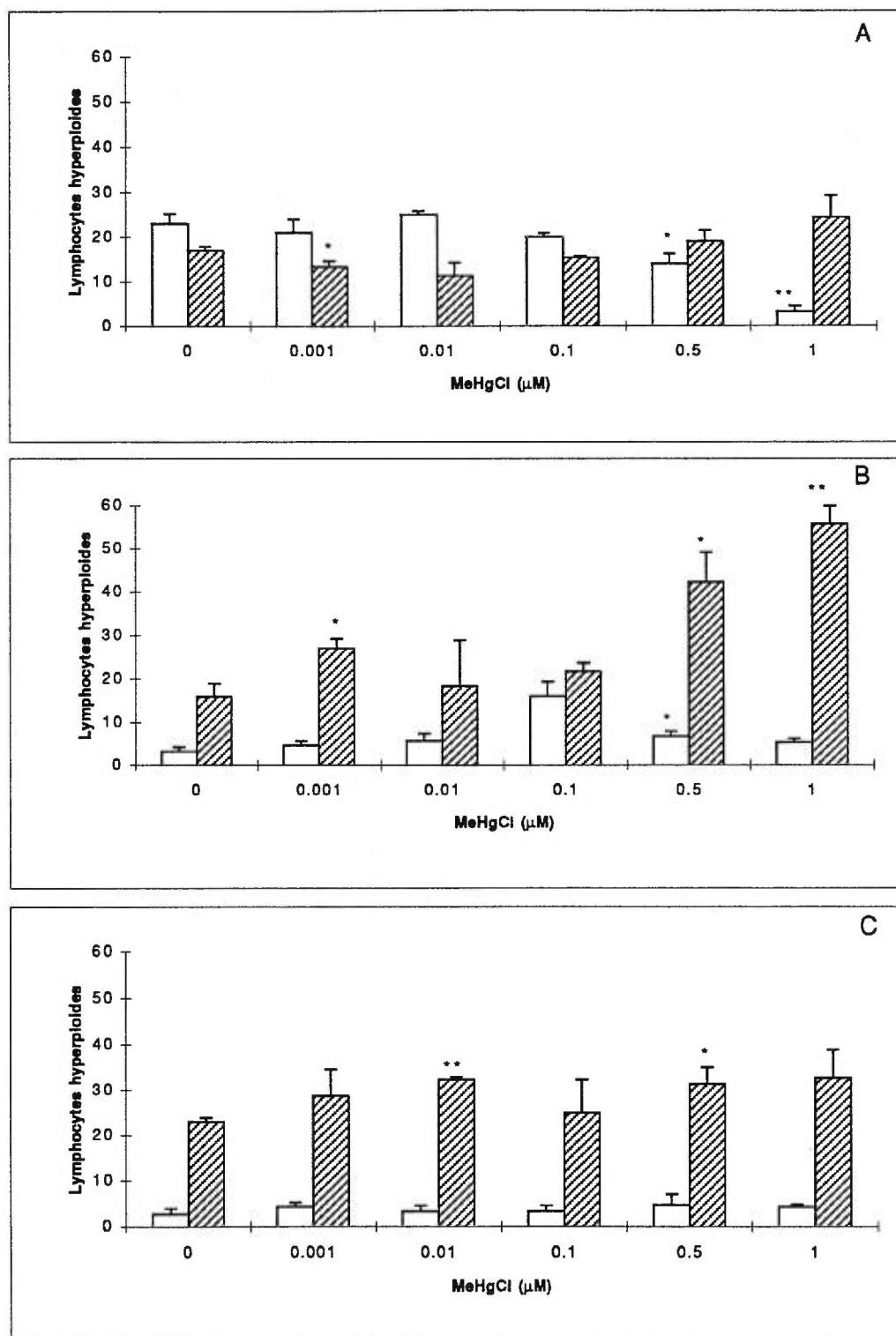


Figure 15 : Cellules spléniques hyperploïdes de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (\square) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (\blacksquare), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl (A) en présence de concanavalin A (B) et de dexaméthasone (C).

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.001). Par contre, chez la souris SJL, le MeHgCl ne cause aucun effet significatif sur le nombre de lymphocytes dans R1 et R2 (Fig. 16 A). Chez SJL cependant, en présence de Con A, une légère augmentation de cellules en division dans la région R1 est remarquée avec de faibles concentrations de MeHgCl suivie d'une diminution de ces cellules à des concentrations plus fortes MeHgCl (Fig. 16B). En même temps, le nombre de lymphocytes hyperploïdes est diminué dans la région R2.

Ces résultats suggèrent une sensibilité plus grande des lymphocytes T en division, en provenance de souris C57BL/6, aux effets apoptotiques du MeHgCl alors que les lymphocytes T en division, de souris SJL, résistent au MeHgCl lorsque stimulés par la Con A.

3.3.8 Analyse des cellules thymiques Thy1+ hyperploïdes, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de concanavalin A ou de dexaméthasone

Comme le thymus est l'organe de maturation des lymphocytes T et que les processus de division cellulaire y sont importants, il est possible que le MeHgCl, à des concentrations subtoxiques, puisse altérer la division cellulaire. Ainsi, l'analyse cytofluorométrique de thymocytes hyperploïdes, de souris C57BL/6, en présence de différentes concentrations de MeHgCl montre que ces cellules ne répondent pas de façon significativement différente de celle des cellules non-traitées (Fig. 17A). D'autre part, la stimulation de la division cellulaire par la Con A n'a pas rendu les thymocytes hyperploïdes plus sensibles à l'apoptose (Fig. 17B). Ceci est également observé chez les lymphocytes de souris SJL (Fig. 18A) sauf chez les thymocytes hyperploïdes mis en contact avec la dexaméthasone et le MeHgCl où une légère augmentation significative ($p \leq 0.05$) est observée dans la région R2 (Fig. 18C). Donc, les thymocytes en division cellulaire semblent plus résistants aux dérèglements pouvant être induits par le MeHgCl.

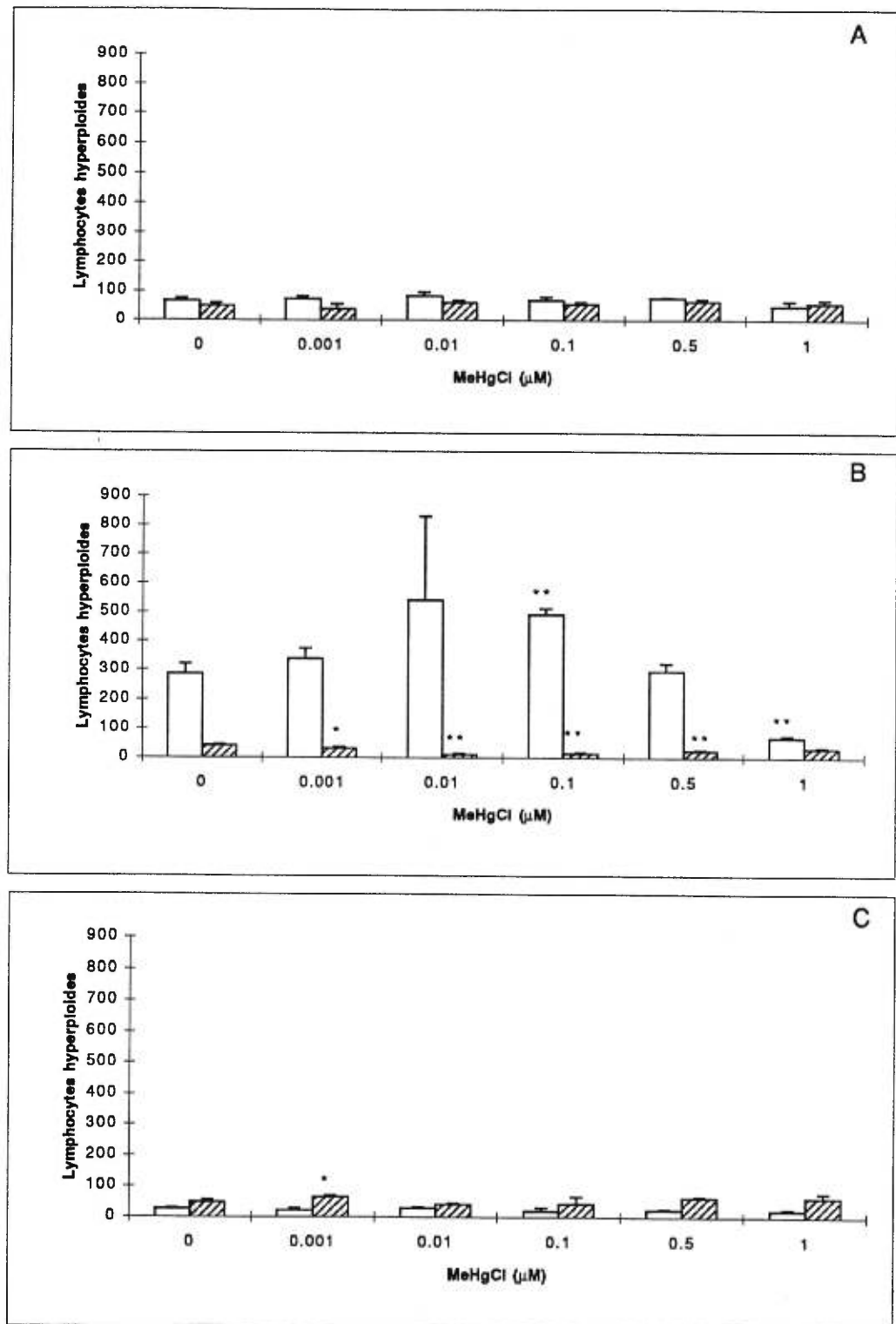


Figure 16 : Cellules spléniques hyperploïdes de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl (A) en présence de concanavalin A (B) et de dexaméthasone (C).

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

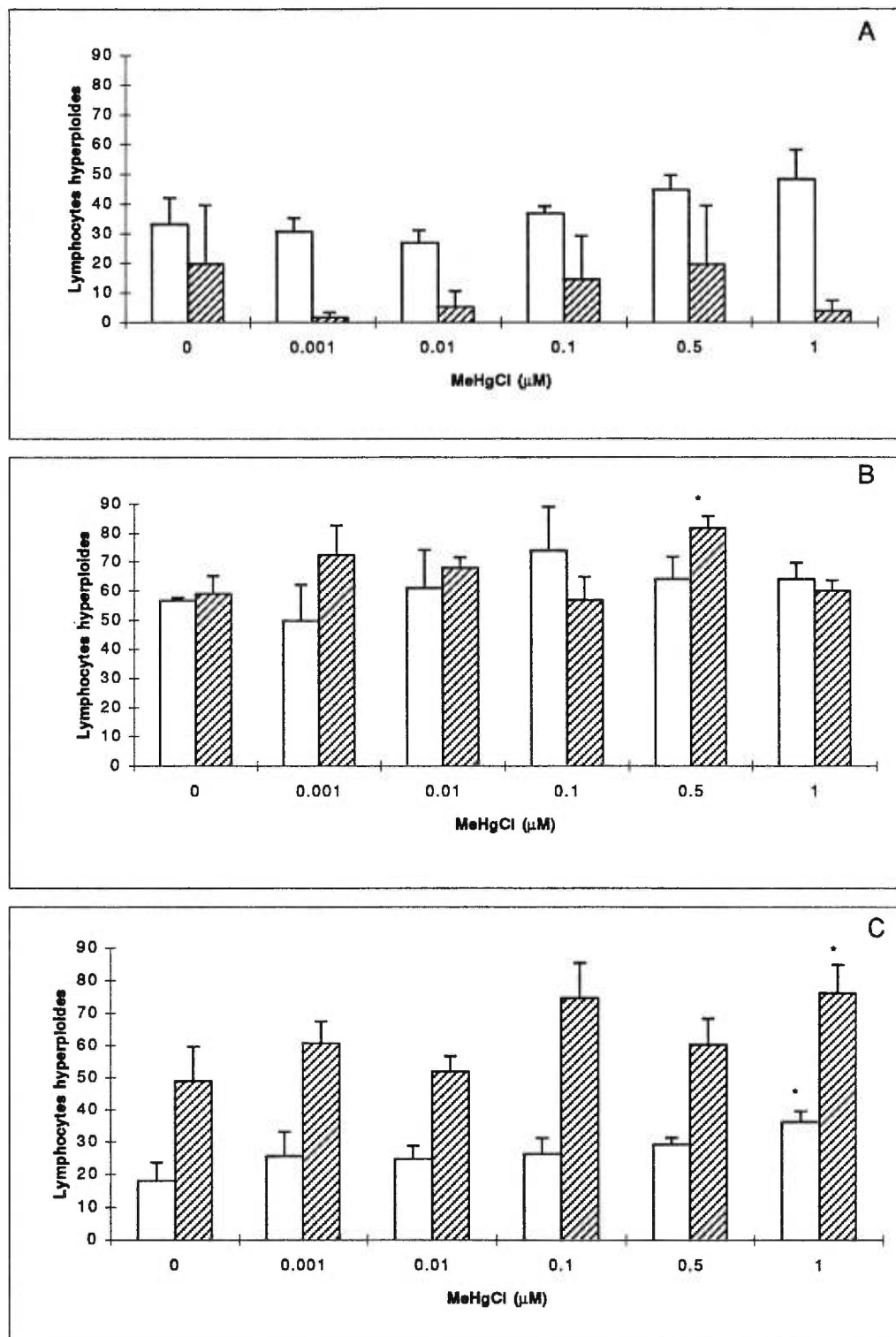


Figure 17 : Cellules thymiques hyperploïdes de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (\square) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl (A) en présence de concanavalin A (B) et de dexa-méthasone (C).

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

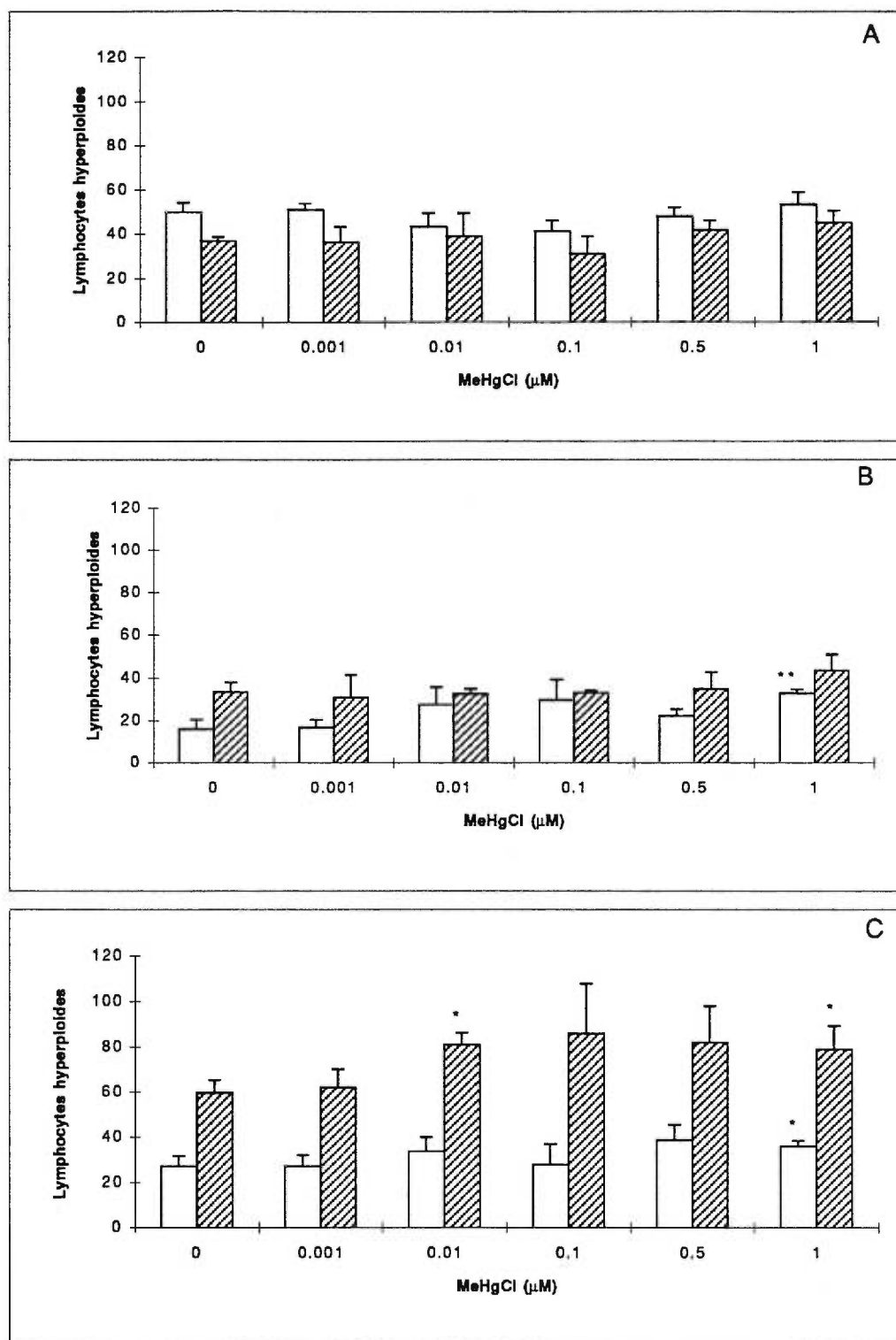


Figure 18 : Cellules thymiques hyperploïdes de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl (A) en présence de concanavalin A (B) et de dexaméthasone (C).

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

3.4 Analyse des sous-populations de lymphocytes spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec des concentrations subtoxiques de MeHgCl

Les lymphocytes T se composent de plusieurs sous-populations qui se différencient les unes des autres par des marqueurs à leur surface membranaire. L'intégrité du fonctionnement du système immunitaire dépend de l'équilibre entre ces sous-populations de lymphocytes. Les problèmes d'immunodéficience ou d'auto-immunité sont souvent reliés à de tels déséquilibres observés chez l'humain (Hickel *et al.*, 1991) et les rongeurs (Jiang et Möller, 1995). Afin de vérifier si le MeHgCl peut provoquer un déséquilibre entre les sous-populations de lymphocytes T, via un processus d'apoptose, ces cellules en provenance de souris C57BL/6 et SJL ont été mises en culture avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de Con A ou de dexaméthasone. Par la suite, les sous-populations de lymphocytes ont été marquées avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes et les nombres relatifs de chacune des sous-populations ont été déterminés par cytofluorométrie.

3.4.1 Sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl

Les figures 19A et 20A montrent les nombres de lymphocytes spléniques matures CD4⁺ et CD8⁺ après un traitement avec les différentes concentrations de MeHgCl. Ainsi, les nombres de lymphocytes CD4⁺ apoptotiques augmentent chez les deux lignées de souris. Par contre, chez les lymphocytes de SJL, cette augmentation devient significative à partir d'une concentration de 0.01 μM ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 20A) tandis que chez la souris C57BL/6, les CD4⁺ sont augmentés à partir d'une concentration de 0.5 μM de MeHgCl ($p \leq 0.05$ à $p \leq 0.001$) (Fig. 19A). Les

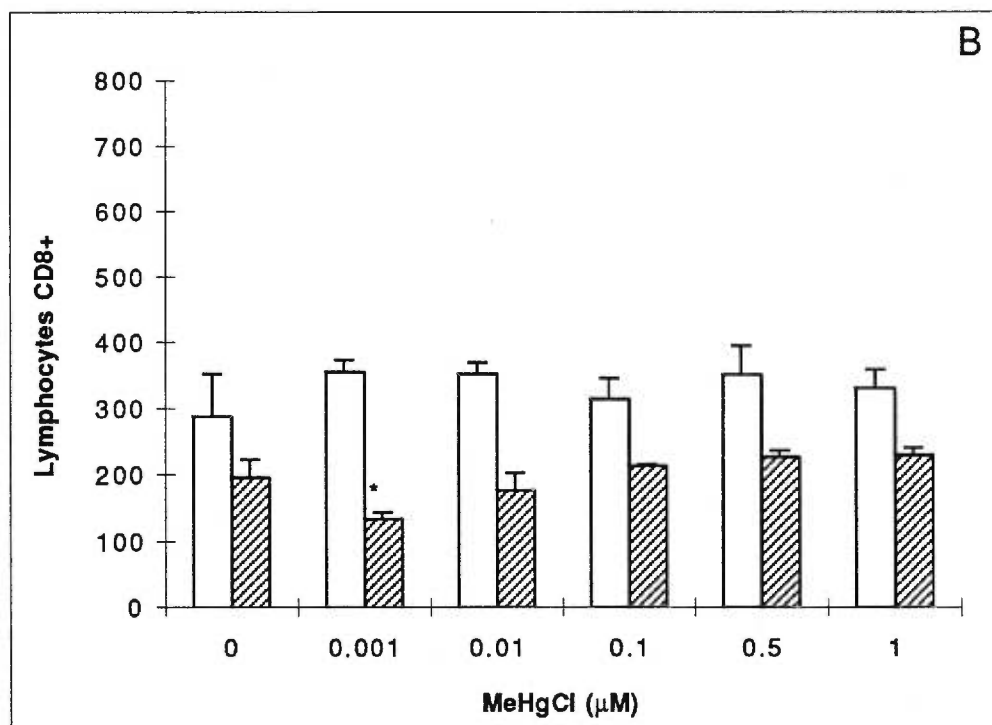
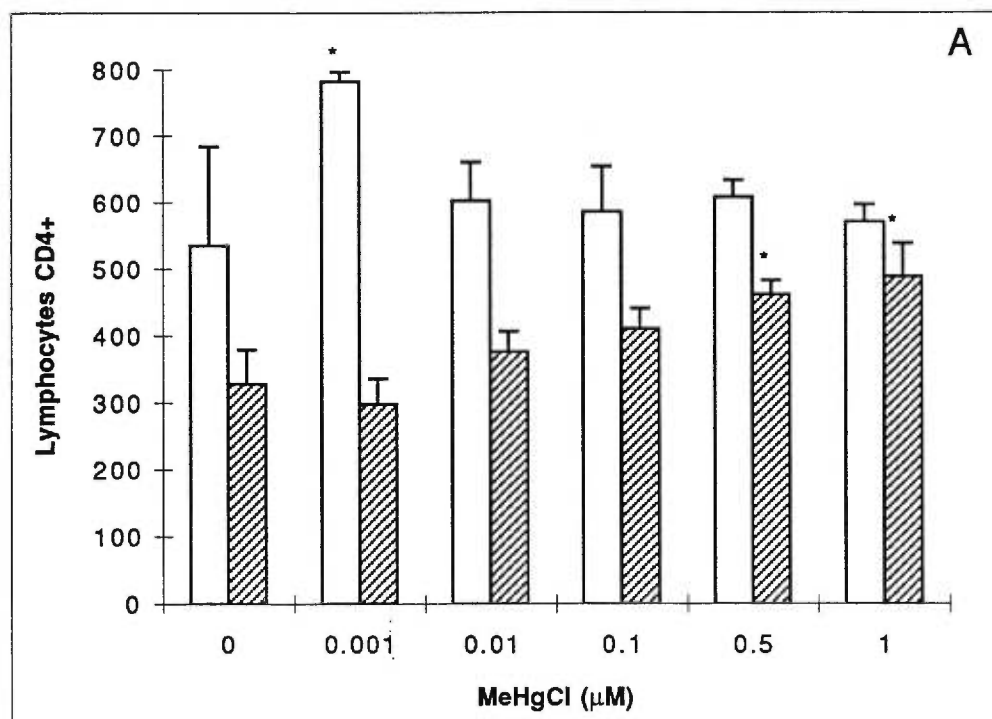


Figure 19 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ (A) et CD8+ (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

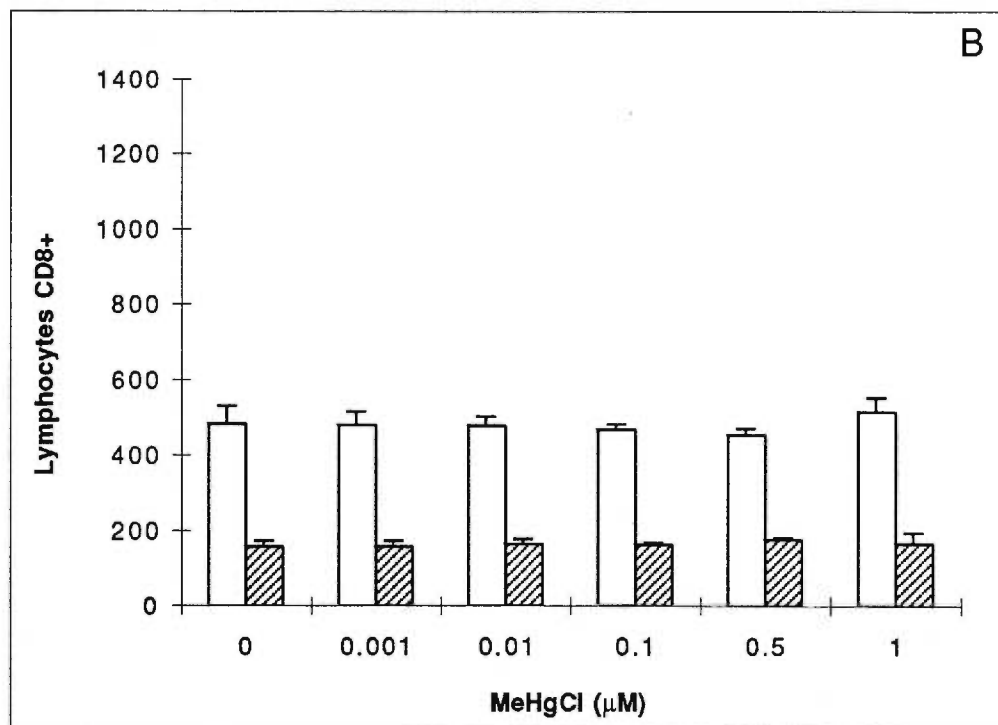
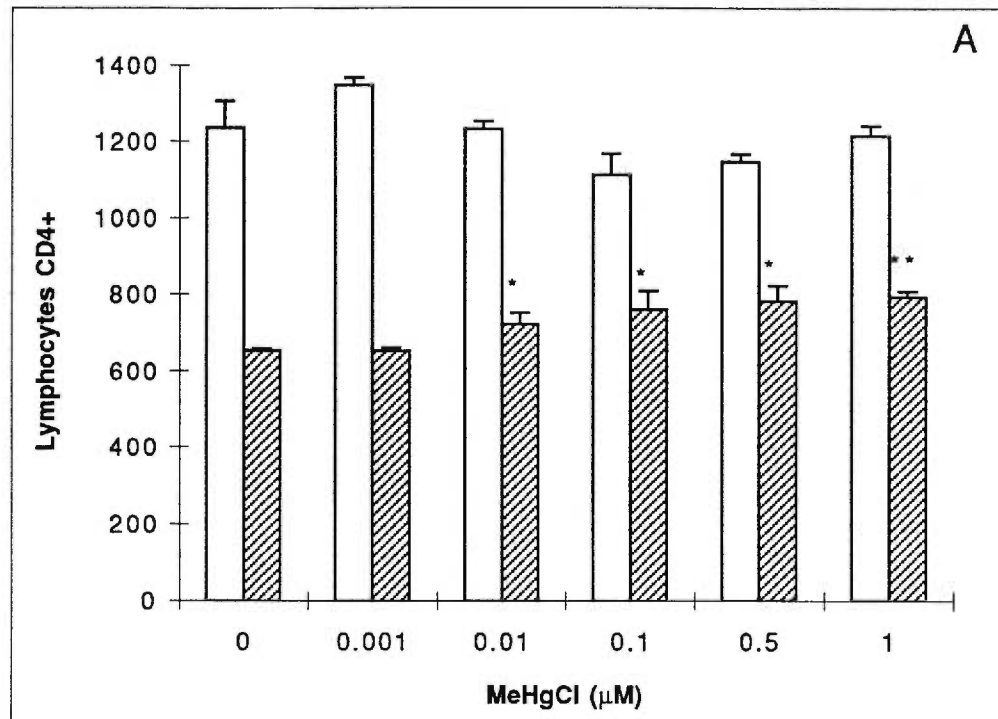


Figure 20 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4⁺ (A) et CD8⁺ (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

lymphocytes CD8⁺, par rapport aux lymphocytes contrôles, ne sont pas fortement affectés par le MeHgCl et ce, chez les deux lignées de souris (Fig. 19B et 20B).

Ces résultats montrent que les lymphocytes spléniques CD4⁺ seraient plus sensibles à une apoptose induite par le MeHgCl que les cellules CD8⁺ et ce, chez les deux lignées murines.

3.4.2 Sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la concanavalin A

Lors d'une réponse antigénique, les lymphocytes T sont appelés à entrer en division cellulaire, les rendant soit plus sensibles ou plus résistants à l'apoptose induite par le MeHgCl. Des expériences similaires à celles décrites dans la section précédente mais après une stimulation avec la Con A ont été effectuées et montrent que les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ de souris C57BL/6 se retrouvent graduellement en plus grand nombre dans la région R2 en fonction de la concentration de MeHgCl (Fig. 21A et B). Outre cela, les concentrations de 0.5 et 1 μ M de MeHgCl induisent une élévation du nombre de lymphocytes CD8⁺ dans R1 (Fig. 21B). Par contre, le MeHgCl ne produit aucun effet significatif sur les sous-populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺ de la souris SJL (Fig. 22).

Encore une fois, les lymphocytes CD4 surtout et secondairement, les CD8⁺ de la souris C57BL/6, lorsque stimulés, sont plus sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl alors que les cellules de la souris SJL résistent à cet effet du MeHgCl.

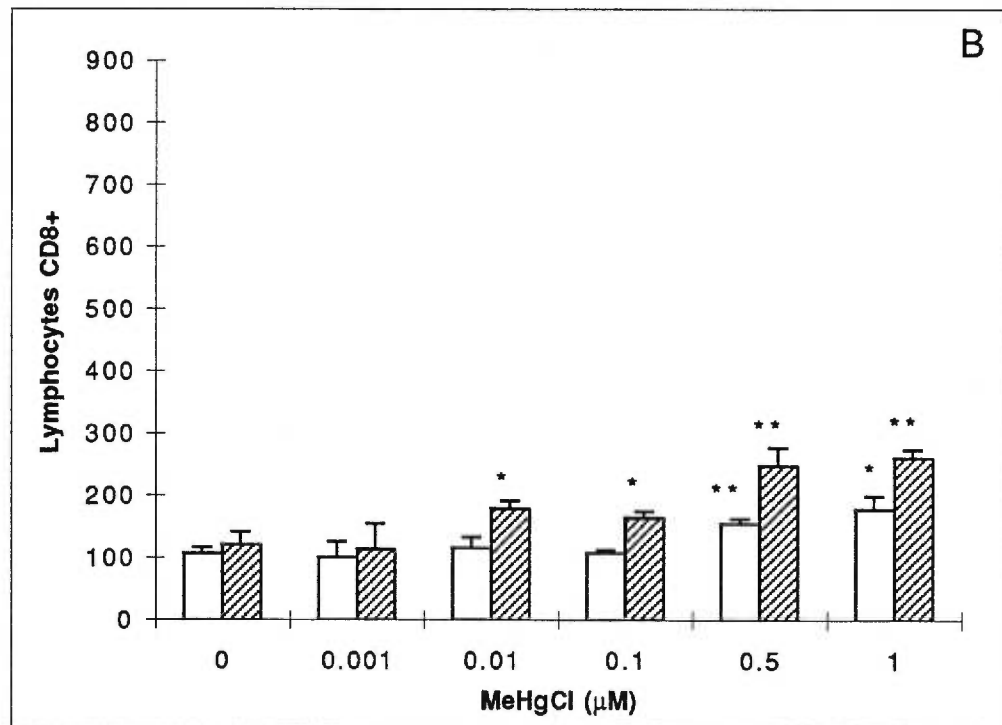
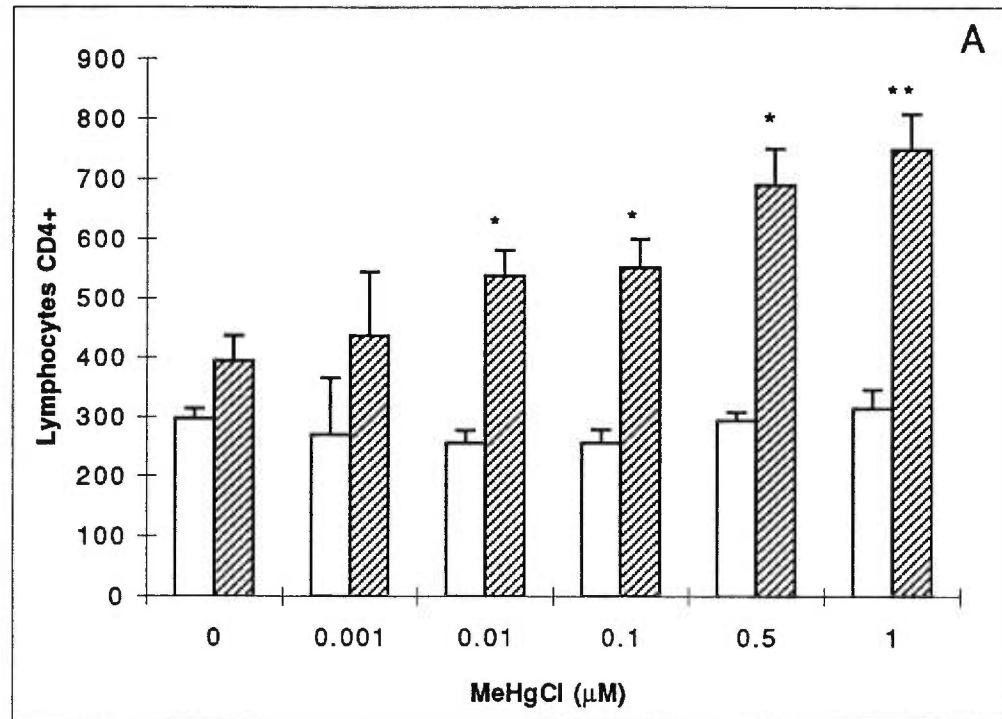


Figure 21 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4⁺ (A) et CD8⁺ (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

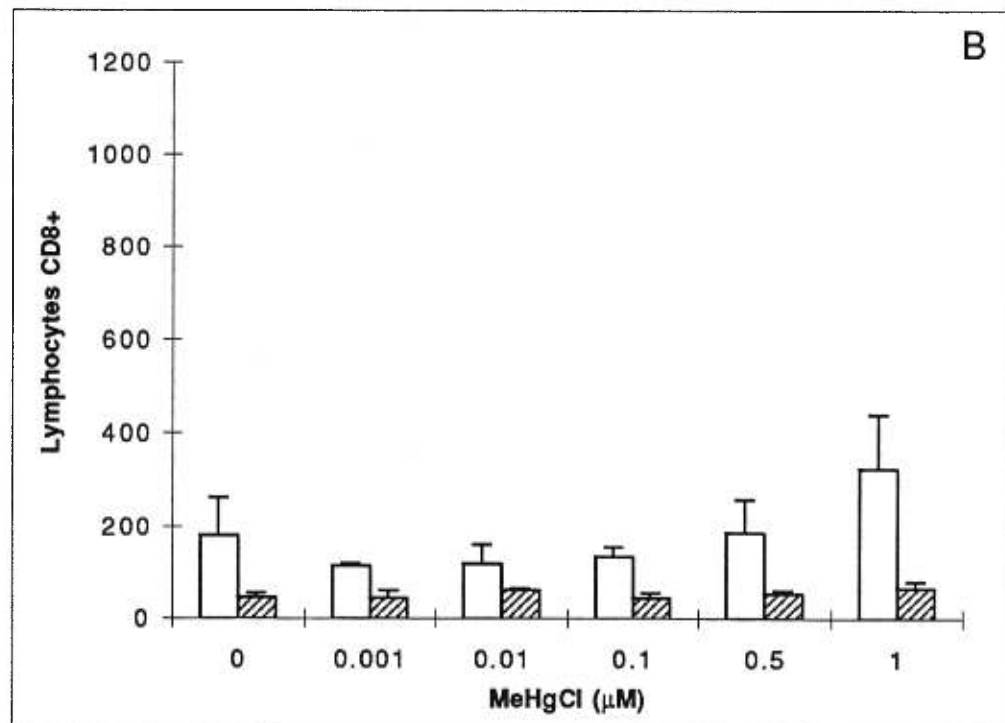
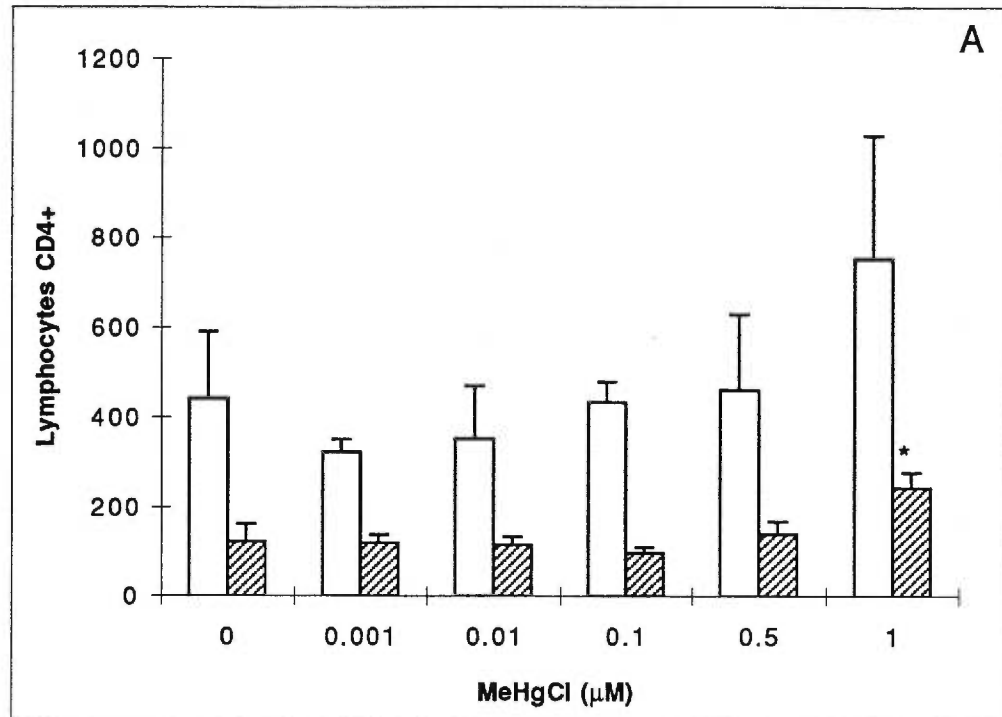


Figure 22 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4⁺ (A) et CD8⁺ (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$

3.4.3 Sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone

Nous avons observé, dans la section 3.3.5, que des faibles concentrations de MeHgCl pouvaient diminuer l'apoptose induite par la dexaméthasone. Afin de vérifier si cette diminution se fait au dépend de l'une ou l'autre des sous-populations lymphocytaires, des expériences similaires ont été effectuées en présence de dexaméthasone. Chez les deux lignées de souris, la dexaméthasone réduit presque totalement le nombre de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ dans la région R1 (Fig. 23 et 24). Seuls, les lymphocytes CD4⁺ dans la région R1 et CD8⁺ dans la région R2, de la souris SJL, sont augmentés en fonction de la concentration du MeHgCl (Fig. 24B) alors que les autres variations demeurent à des niveaux très faibles. Donc, le MeHgCl peut augmenter, à de faibles doses, l'apoptose induite par des glucocorticoïdes chez les lymphocytes CD4⁺ de la souris SJL seulement.

3.4.4 Sous-populations lymphocytaires de cellules thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl

Malgré le fait que le MeHgCl ne semble pas affecter significativement l'apoptose chez les thymocytes en général, des déficits dans le processus de maturation pourraient favoriser un déséquilibre dans les sous-populations de thymocytes. Afin de vérifier cette hypothèse, des thymocytes de souris C57BL/6 et SJL ont été traités avec du MeHgCl et les sous-populations lymphocytaires ont été identifiées en cytofluorométrie par un double marquage avec des anticorps anti-CD4 et CD8 couplés à des fluorochromes. Tel que montré dans les figures 25 et 26, les traitements avec les plus fortes concentrations de MeHgCl (0.5 et 1 μ M) haussent les nombres de thymocytes simples positifs (SP) CD4⁺ apoptotiques (région R2) ($p \leq 0.01$) chez la souris C57BL/6 (Fig. 25A). Par contre, le MeHgCl n'a que très peu

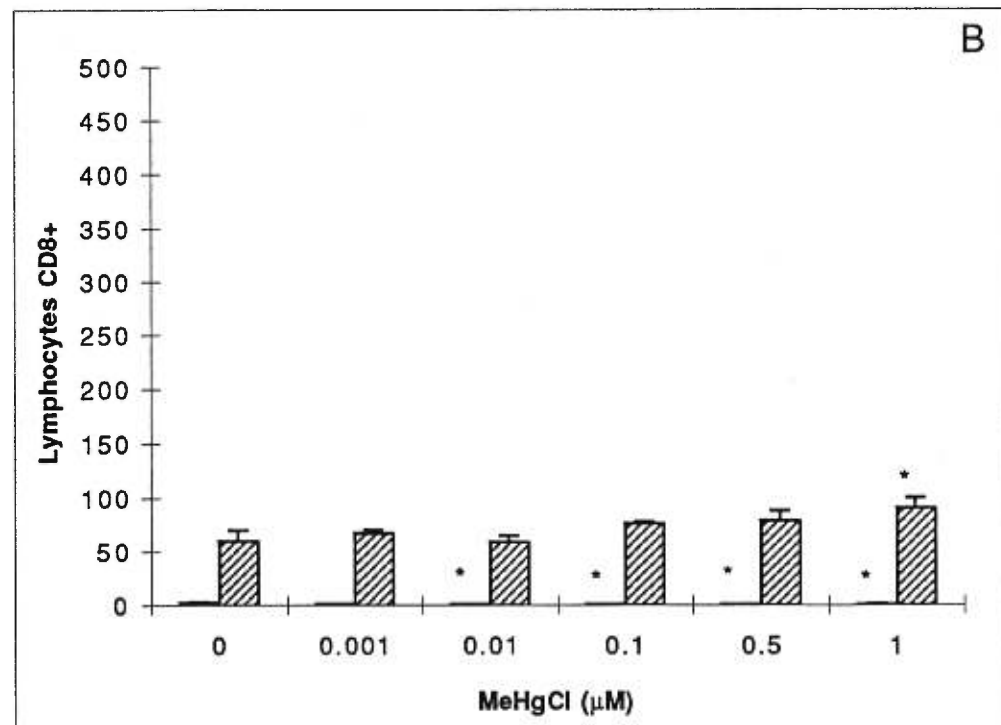
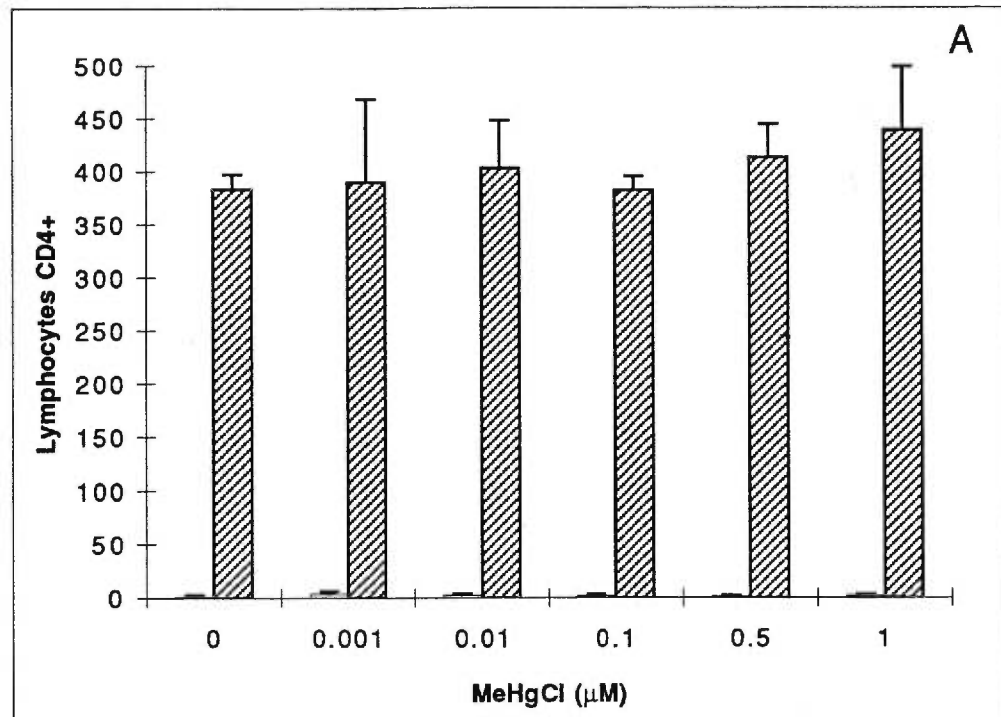


Figure 23 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ (A) et CD8+ (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$

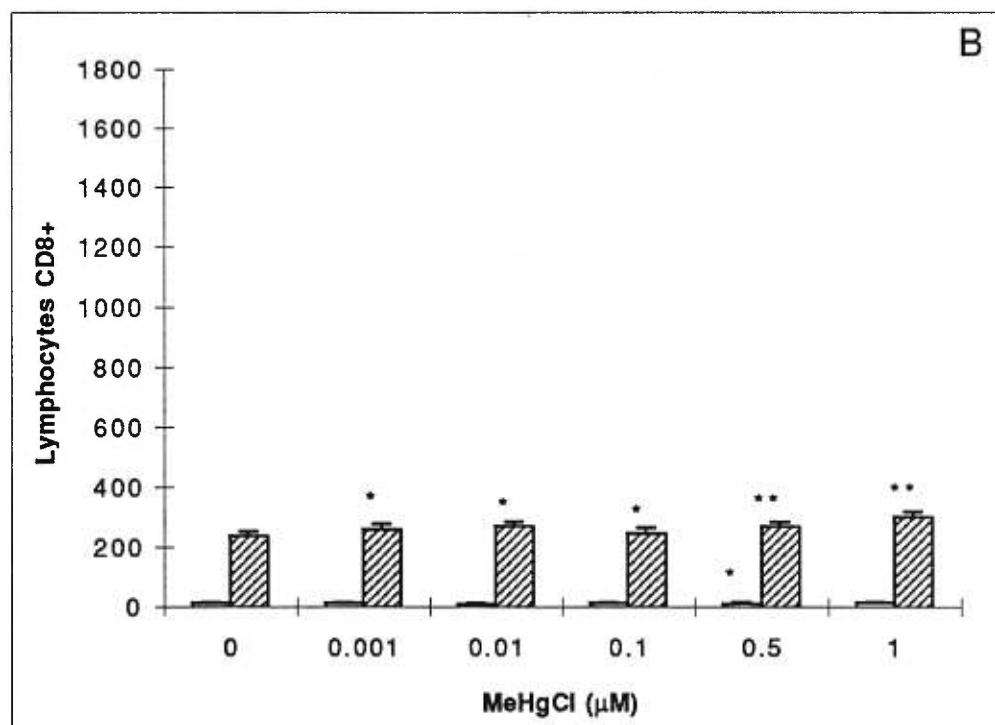
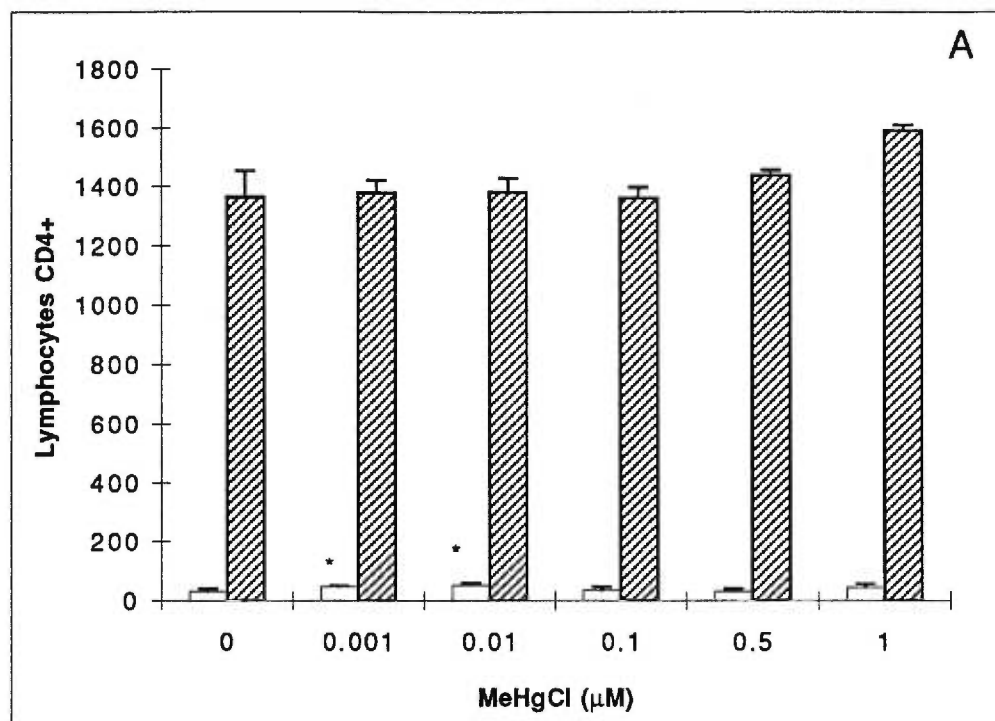


Figure 24 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ (A) et CD8+ (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

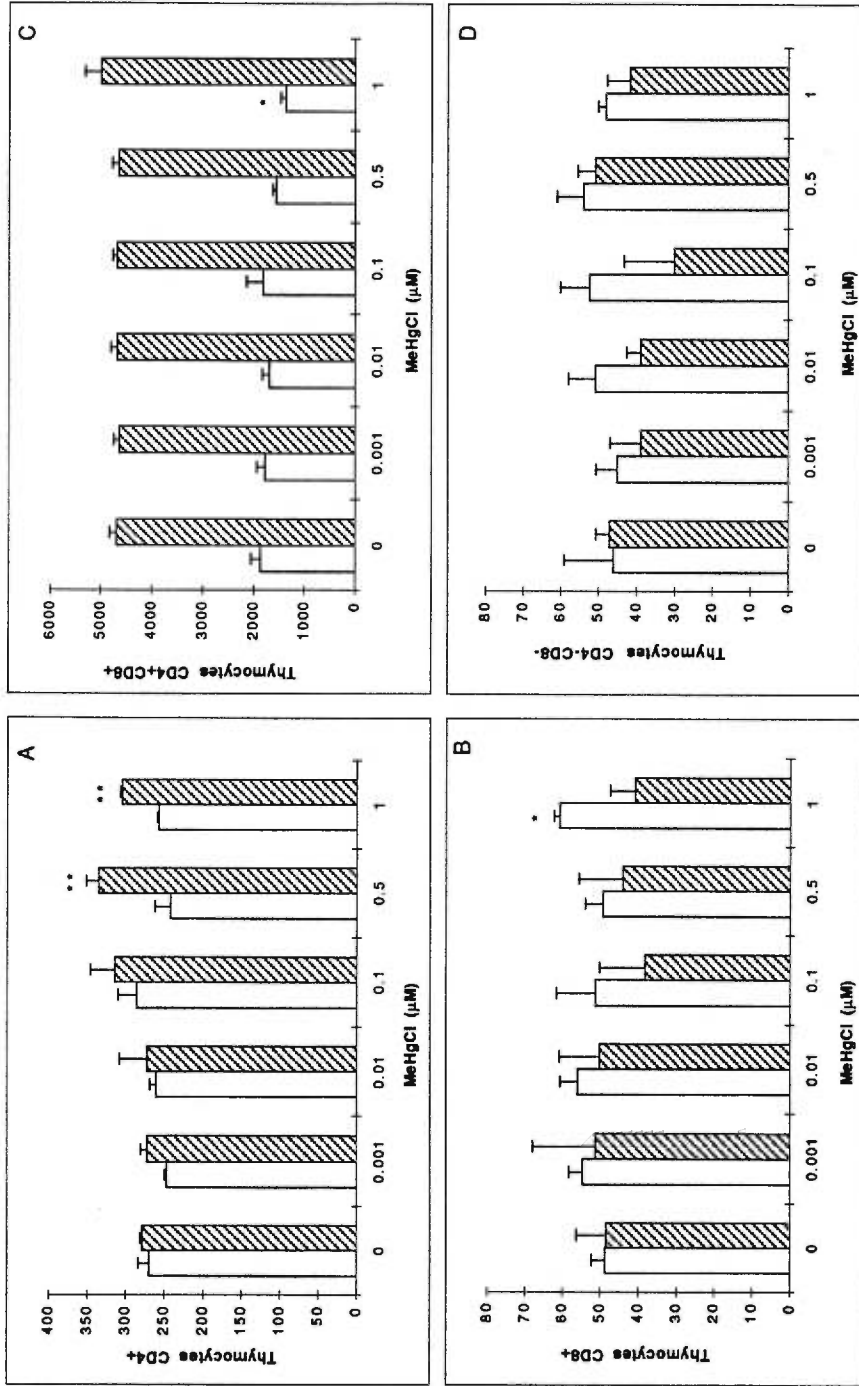


Figure 25 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A) et CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.
 * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

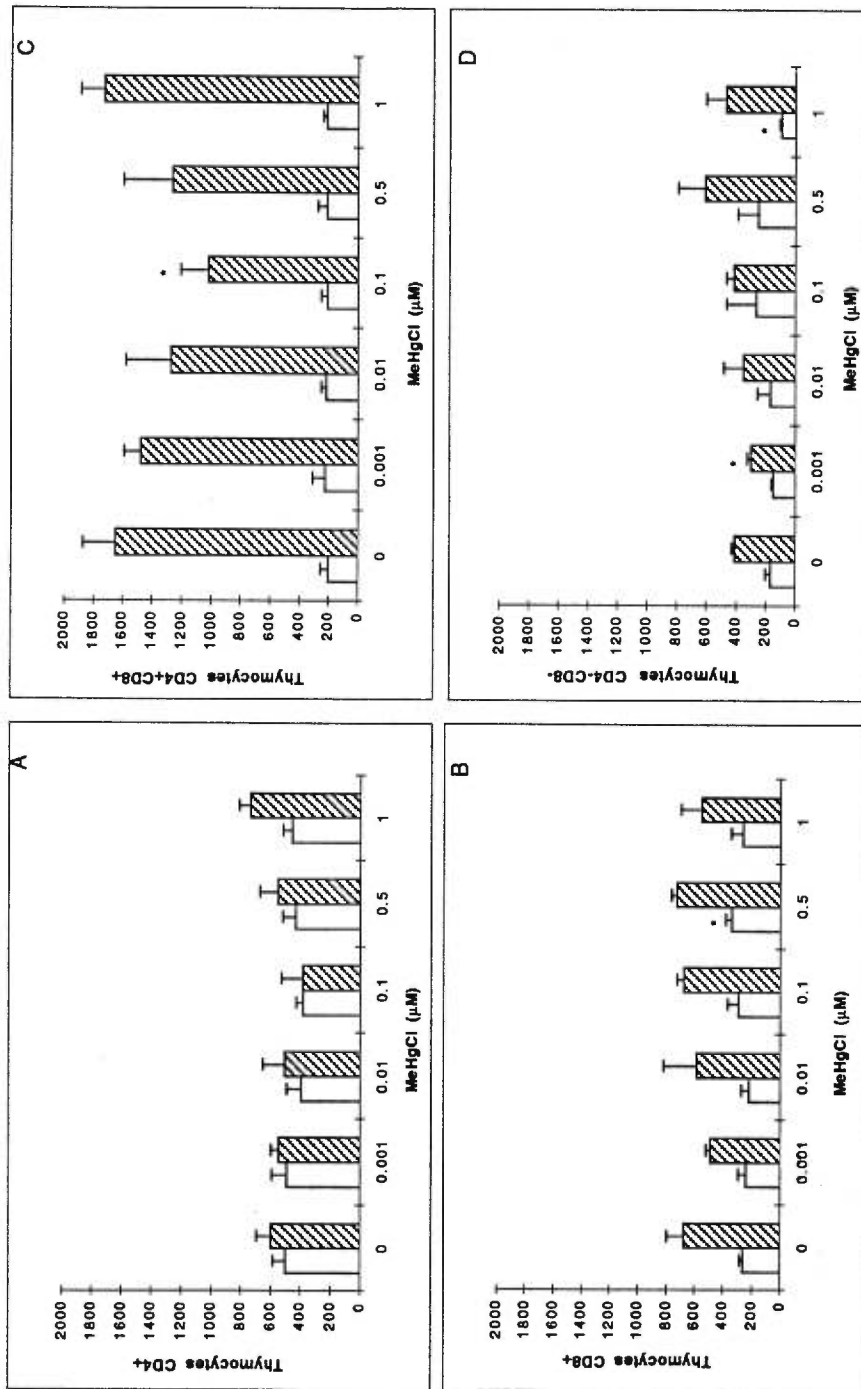


Figure 26 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A) et CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.
 * p < 0.05; ** p < 0.01.

d'effet sur les sous-populations CD4⁺ de SJL ainsi que sur les sous-populations CD8⁺ (SP), doubles positifs (DP) CD4⁺CD8⁺ et doubles négatifs (DN) CD4⁻CD8⁻ chez les deux lignées de souris (Fig. 25B, C et D et 26A et D) à l'exception d'une légère baisse des cellules DP apoptotiques de la souris SJL lorsque traitées avec de faibles concentrations de MeHgCl ($p \leq 0.05$) (Fig. 26C).

3.4.5 Sous-populations lymphocytaires de cellules thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl et stimulées par la Con A

Par contre, suite à une stimulation par la Con A, le MeHgCl induit à la fois une hausse dans les nombres de toutes les sous-populations de thymocytes chez la souris C57BL/6 ($p \leq 0.05$ à $p \leq 0.001$) et ce, autant dans les régions R1 que R2 (Fig. 27). Toutefois, le MeHgCl favorise l'accroissement du nombre de thymocytes CD8⁺ dans la région R1 de façon plus importante que celui des thymocytes CD4⁺ (Fig. 27A et B). Par contre, chez les thymocytes de SJL en présence de Con A, seulement une légère augmentation du nombre de thymocytes CD8⁺ et des cellules CD4⁻CD8⁻ est observée dans la région R2 ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 28B et D). Ainsi, il est donc possible que le MeHgCl agisse en stimulant les différentes sous-populations thymiques à se diviser chez les deux lignées murines mais que seules les cellules thymiques de la souris C57BL/6 entreraient subséquemment en apoptose.

3.4.6 Sous-populations lymphocytaires de cellules thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone

Il a été observé, à la section 3.3.6, que le MeHgCl potentialisait l'induction d'apoptose par la dexaméthasone chez les thymocytes de la souris C57BL/6 mais pas

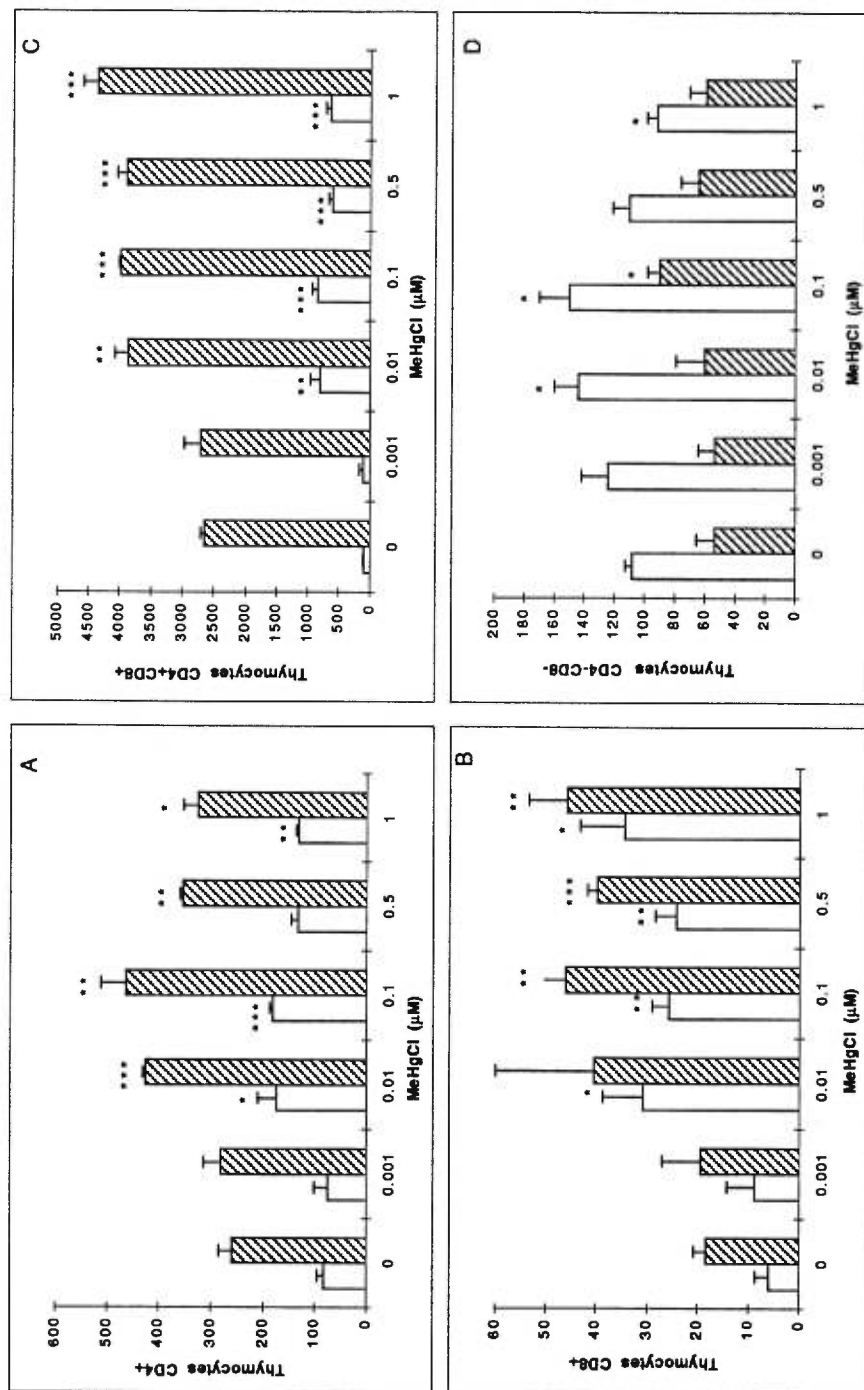


Figure 27 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A) et CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

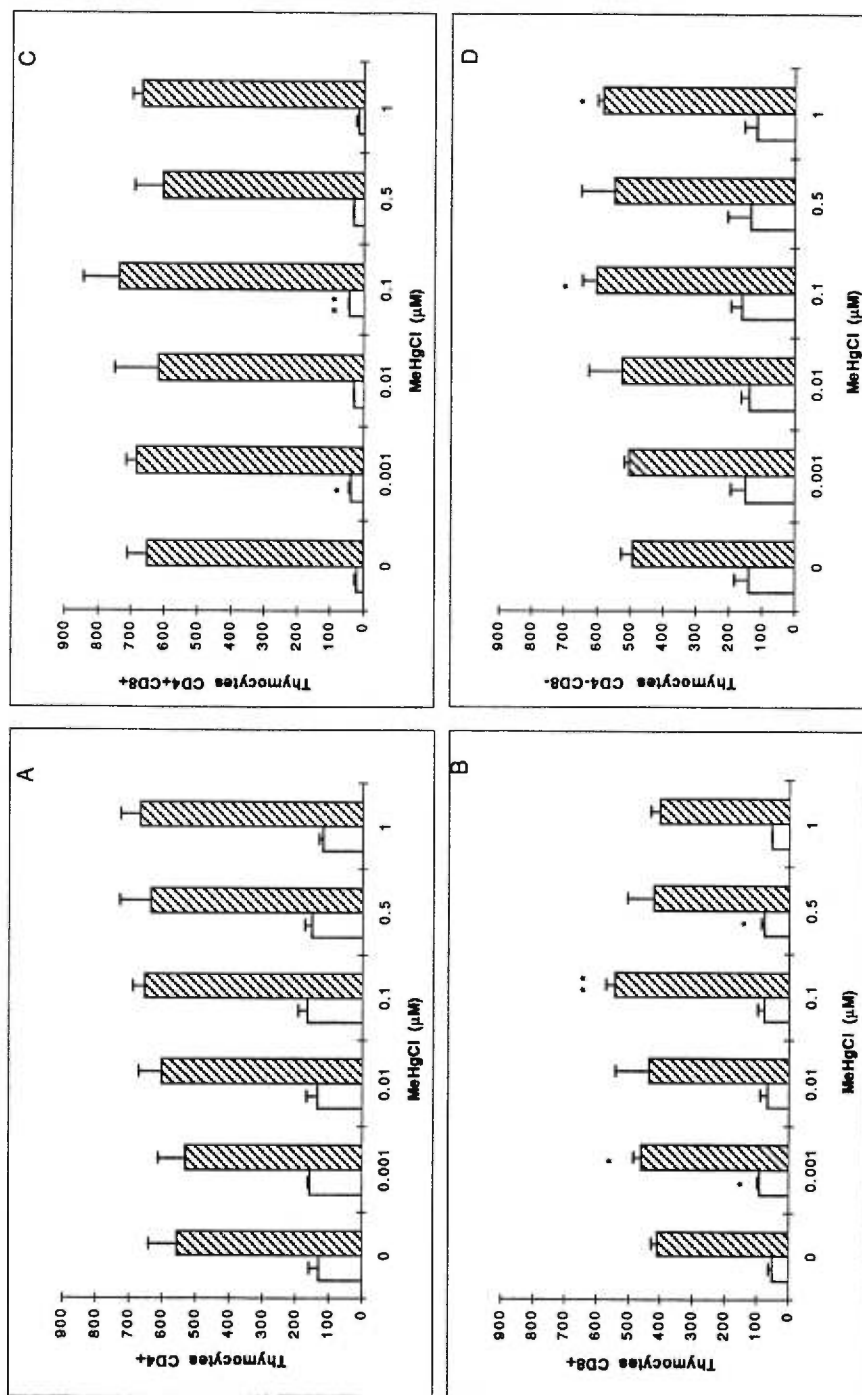


Figure 28 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A) et CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

chez ceux de la lignée SJL. Afin d'identifier laquelle des sous-populations est affectée par cet effet du MeHgCl, des expériences similaires ont été réalisées avec des thymocytes des deux lignées murines en présence de dexaméthasone. Tel que montré dans les figures 29C et 30C, la présence de dexaméthasone, réduit presque complètement le nombre de lymphocytes DP dans la région R1 et augmente, parallèlement, ceux de la région R2 chez les deux lignées de souris. Par contre, une augmentation des lymphocytes SP CD4⁺ et CD8⁺ apoptotiques est observée chez les cellules de la souris C57BL/6 (Fig. 29A et B) avec la plus forte concentration de MeHgCl, tandis que chez la souris SJL, seul le nombre de lymphocytes SP CD4⁺ apoptotiques est augmenté. Par contre, les lymphocytes CD8⁺ de la souris SJL sont très sensibles à une augmentation d'apoptose en présence de dexaméthasone ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 30B). Ainsi, il apparaît que les thymocytes SP de la souris C57BL/6 sont légèrement plus sensibles aux effets apoptotiques du MeHgCl que ceux de la souris SJL mais que les cellules SP CD8⁺ de la souris SJL sont plus sensibles que celles de la souris C57BL/6.

3.5 Étude de l'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL

Les expériences précédentes ont mis en lumière le fait que les lymphocytes spléniques et thymiques de la souris C57BL/6 étaient généralement plus sensibles aux effets apoptotiques du MeHgCl que ceux de la lignée SJL. Il est postulé que des concentrations subtotoxiques de MeHgCl, pouvant induire un processus apoptotique, sont aussi capables de rendre anergiques les lymphocytes de la souris C57BL/6, et à un moindre degré, ceux de la souris plus résistante, SJL. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences sur l'évaluation de la capacité des enzymes mitochondriales des lymphocytes à métaboliser les sels de tétrazolium ont été réalisées. Les cellules ont été d'abord incubées pendant 24h avec différentes concentrations de MeHgCl en présence ou en absence de Con A. Les niveaux d'activité de la deshydrogénase mitochondriale

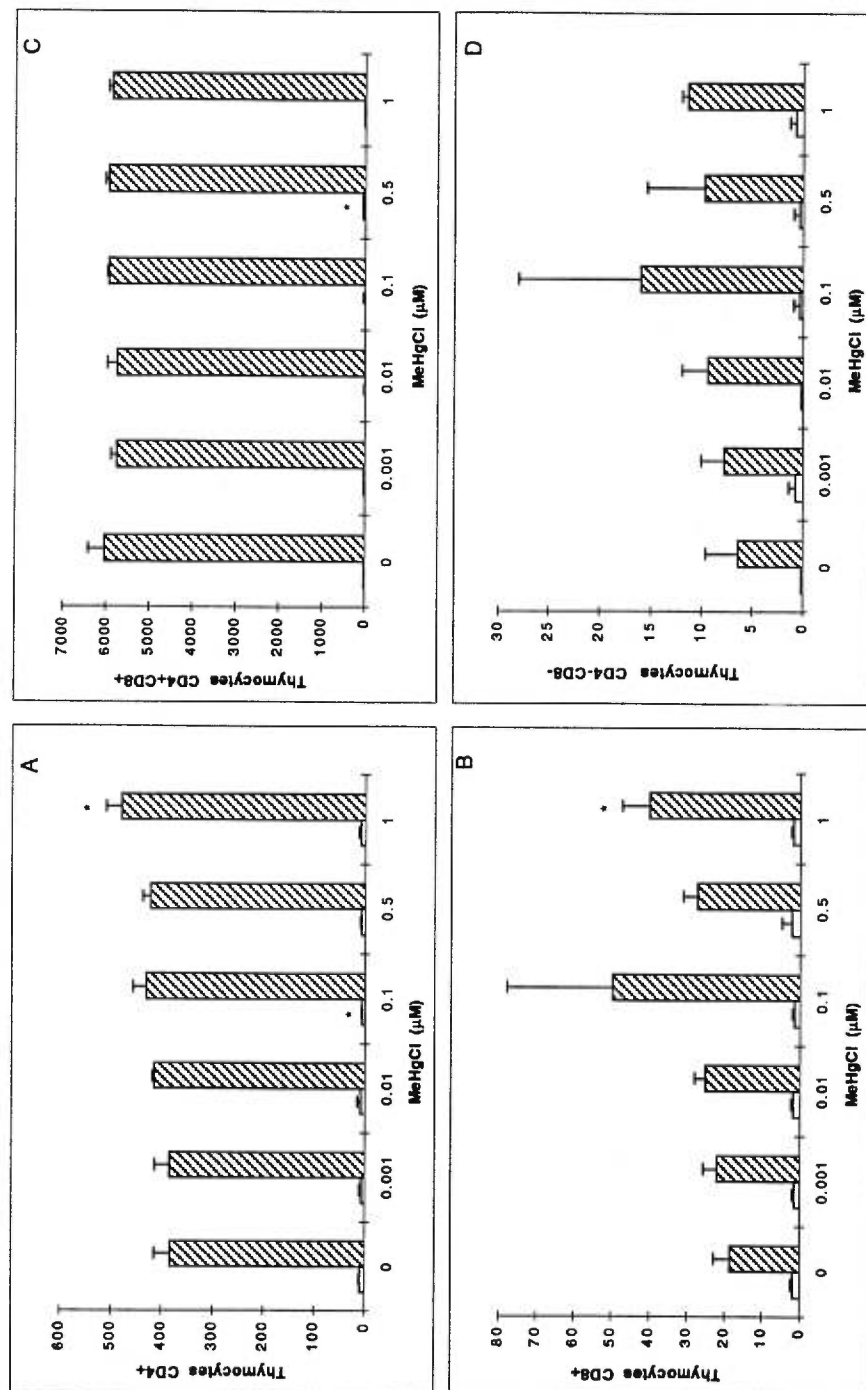


Figure 29 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A) et CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$

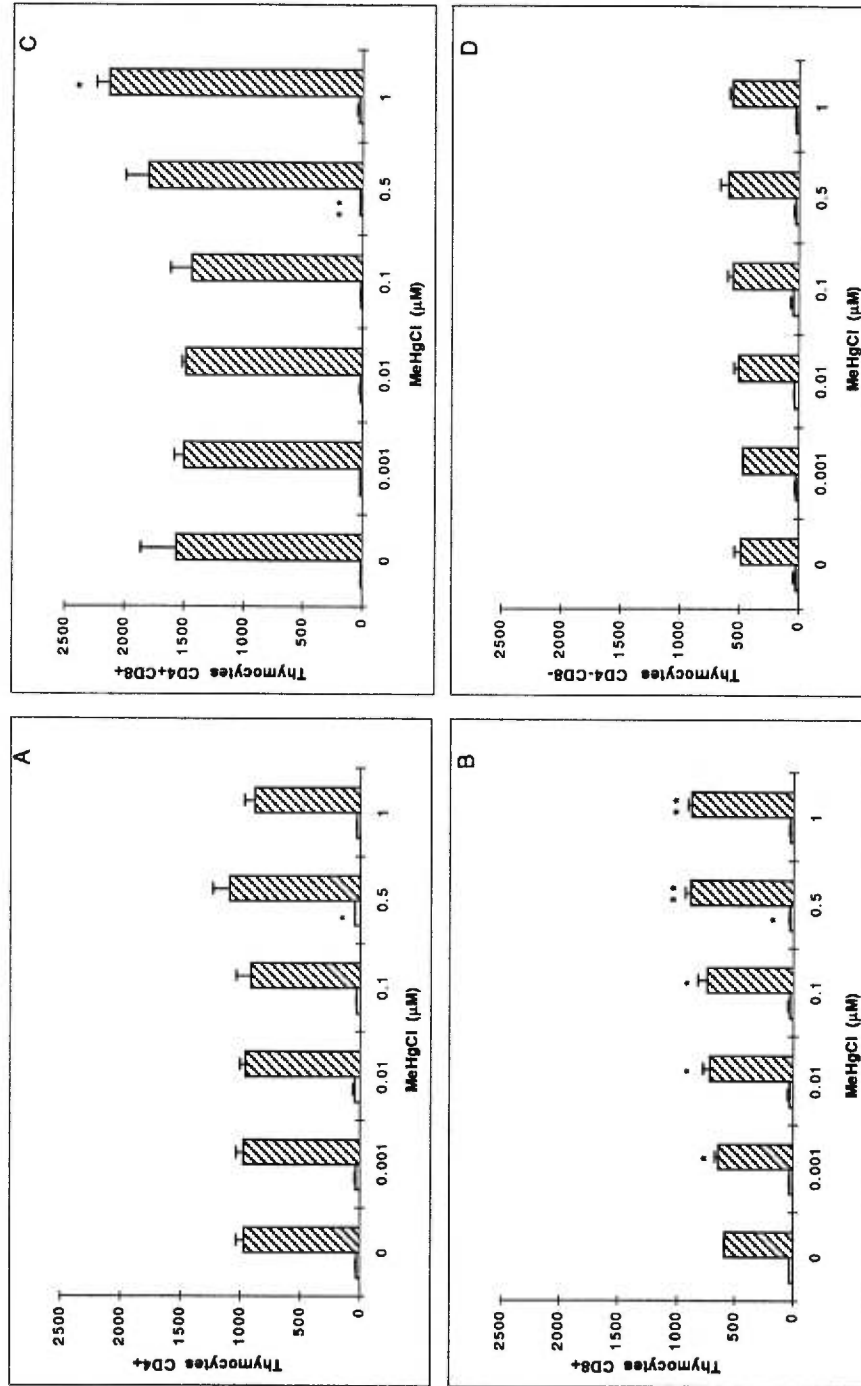


Figure 30 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A) et CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de dexaméthasone.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$.

ont été évalués par l'ajout de MTS et de MSP et des lectures en colorimétrie à 490 nm ont été effectués à différents temps après le traitement.

3.5.1 Étude de l'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL, en contact avec différentes concentrations de MeHgCl

Tel que montré dans la figure 31, le traitement des cellules spléniques de souris C57BL/6 avec des concentrations subtoxiques de MeHgCl a pour effet de réduire l'activité des splénocytes de souris C57BL/6 pour toutes les concentrations utilisées. Par contre, chez les splénocytes de souris SJL, seules les concentrations de 0.5 et 1 μ M de MeHgCl diminuent significativement l'activité métabolique de ces splénocytes ($p \leq 0.01$) (Fig. 31B). Chez les thymocytes de souris C57BL/6, aucun effet significatif n'est observé quel que soit les concentrations du MeHgCl utilisées (Fig. 32A). Par contre, la figure 32B montre que les thymocytes de SJL sont stimulés par le MeHgCl à des concentrations égales ou supérieures à 0.01 μ M ($p \leq 0.05$). Ces résultats mettent en lumière la différence de réactivité des lymphocytes aux concentrations subtoxiques de MeHgCl entre les deux lignées murines mais surtout l'anergie induite par des concentrations subtoxiques de MeHgCl chez la souris C57BL/6.

3.5.2 Étude de l'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL, en contact avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence de Con A

Il a été préalablement observé que la stimulation des lymphocytes T spléniques par la Con A les rendaient plus sensibles aux effets apoptotiques induits par le MeHgCl chez les souris C57BL/6 mais plus résistantes, chez les cellules des souris SJL (sections 3.2.2, 3.3.3, 3.3.4 et 3.3.5). L'analyse de l'activité métabolique de ces cellules lorsque stimulées par la Con A révèle que les splénocytes de souris C57BL/6

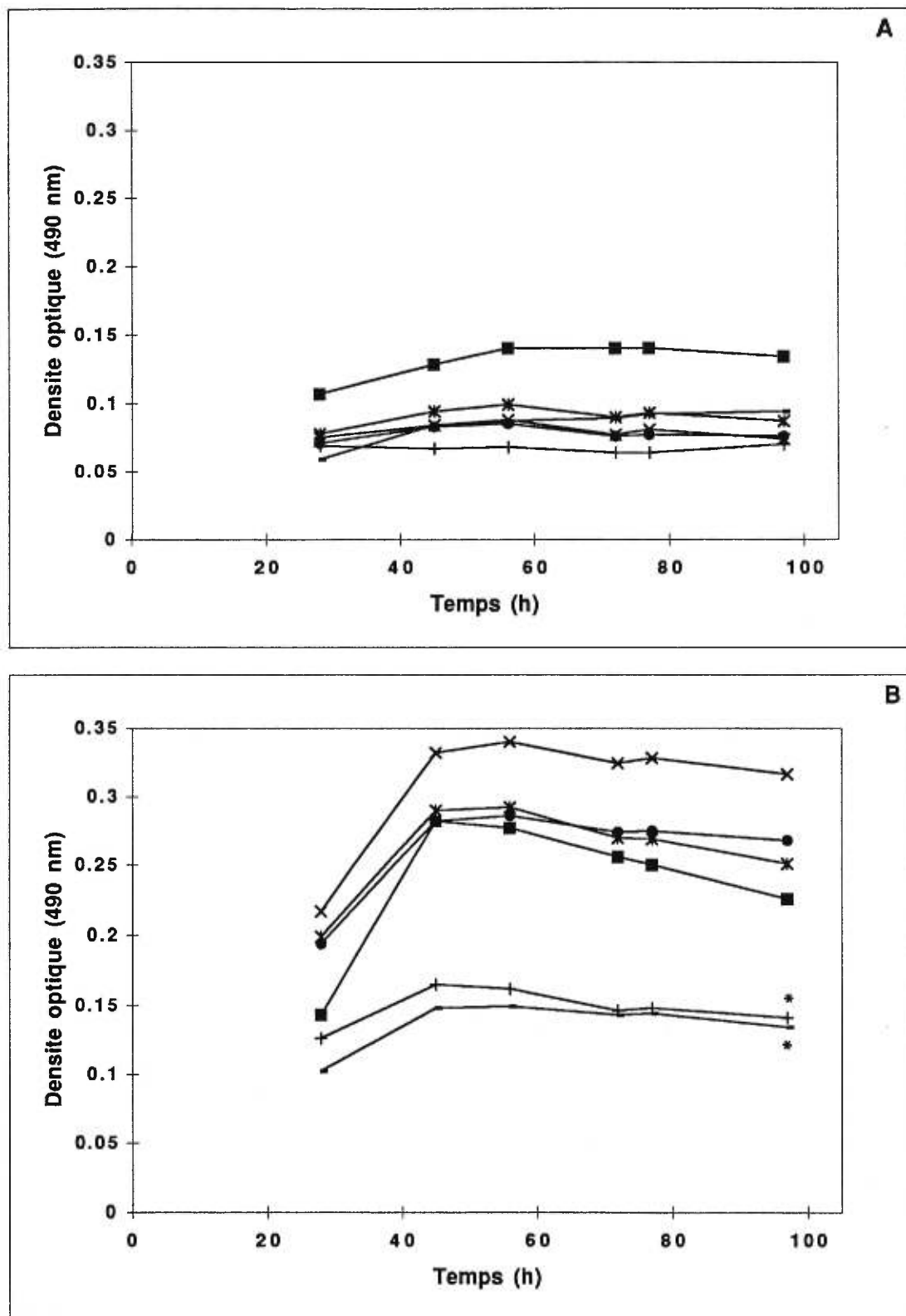


Figure 31 : Activité métabolique des cellules spléniques de souris C57BL/6 (A) et SJL (B), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

(■) contrôle, (×) 0.001, (✱) 0.01, (●) 0.1, (+) 0.5, (-) 1 μM.

* $p \leq 0.01$

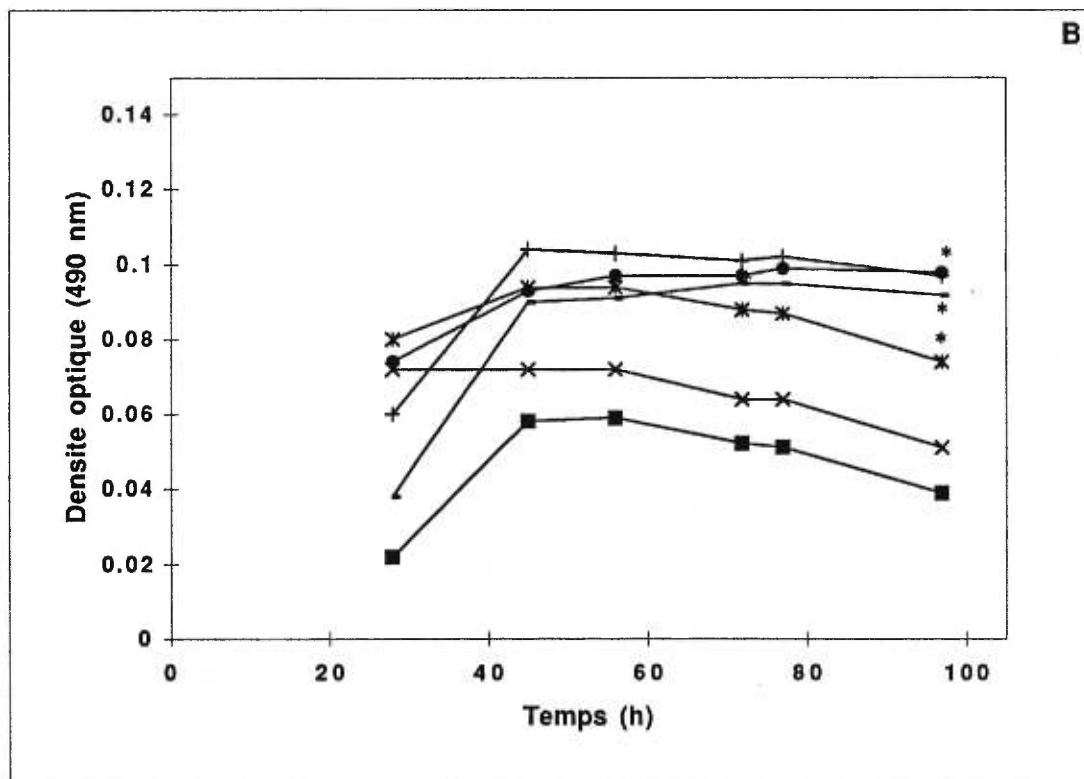
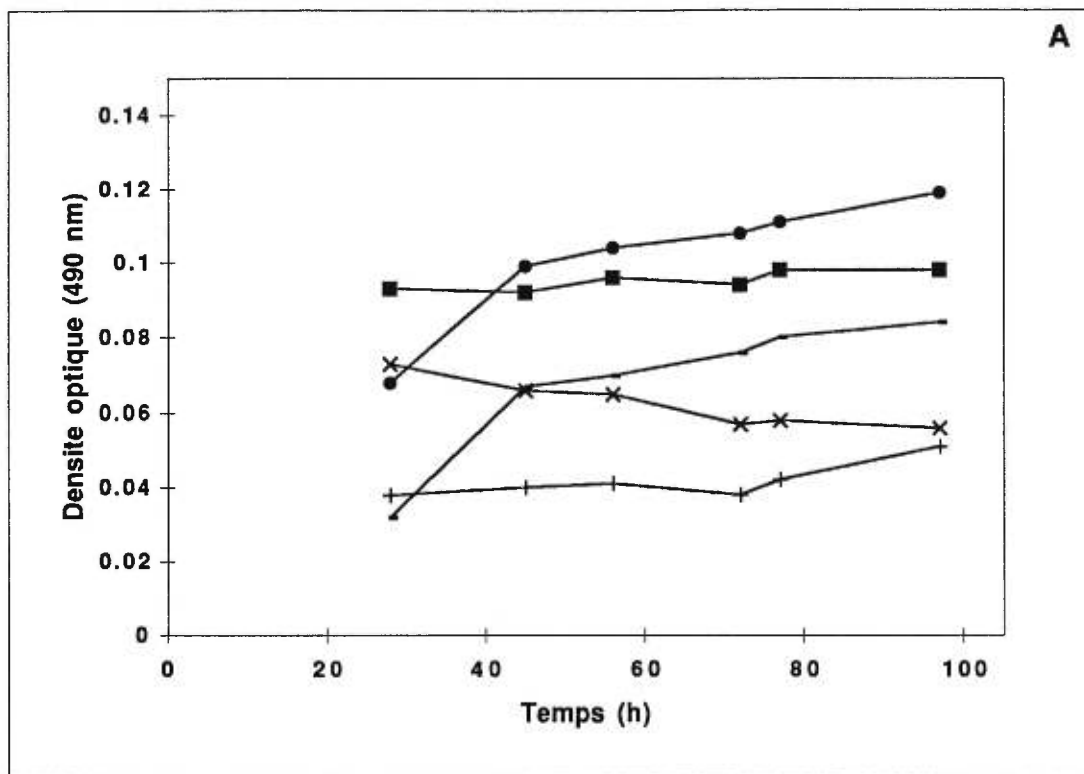


Figure 32 : Activité métabolique des cellules thymiques de souris C57BL/6 (A) et SJL, (B), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

(■) contrôle, (×) 0.001, (⊗) 0.01, (●) 0.1, (+) 0.5, (▣) 1 μ M.

* $p \leq 0.05$

métabolisent plus les sels de tétrazolium en présence des faibles concentrations de MeHgCl alors que cette activité est réduite aux deux concentrations les plus fortes ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 33A). Par contre, la figure 33B montre que seule la plus forte concentration de MeHgCl inhibe significativement l'activité métabolique des splénocytes de SJL ($p \leq 0.01$). Similairement, les thymocytes stimulés à la Con A et traités avec le MeHgCl montrent une activité métabolique plus élevée, surtout avec des concentrations les plus fortes de MeHgCl utilisées, chez les souris C57BL/6 ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 34A). Au contraire, les thymocytes de la souris SJL stimulés par la Con A en présence des concentrations les plus fortes de MeHgCl, perdent une partie de leur capacité à métaboliser les sels de tétrazolium alors que les concentrations plus faibles augmentent cette activité ($p \leq 0.01$) (Fig. 34B).

Ainsi, la stimulation de l'activité métabolique induite par la Con A est maintenue en présence de concentrations subtoxiques de MeHgCl chez les lymphocytes T spléniques de la souris C57BL/6 et SJL mais non pas aux plus fortes concentrations. Au contraire, les thymocytes de la souris SJL en présence de faibles concentrations de MeHgCl montrent une augmentation de l'activité métabolique, alors que cette activité est plus forte chez la souris C57BL/6.

3.6 Étude de l'activité métabolique et de l'identification des sous-populations de cellules spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 SJL, en présence d'anticorps anti-Fas

Le système Fas-FasL joue un rôle important dans l'activation des lymphocytes à entrer en apoptose. Les lymphocytes matures, dans leur état normal, expriment peu le récepteur Fas, mais les thymocytes DP sont connus pour avoir plus de récepteurs Fas à la surface de leur membrane cellulaire (Nishimura *et al.*, 1995). Les lymphocytes T matures entrent en apoptose en passant par ce système après avoir été stimulés par un antigène, tandis que chez les lymphocytes T immatures, le système Fas

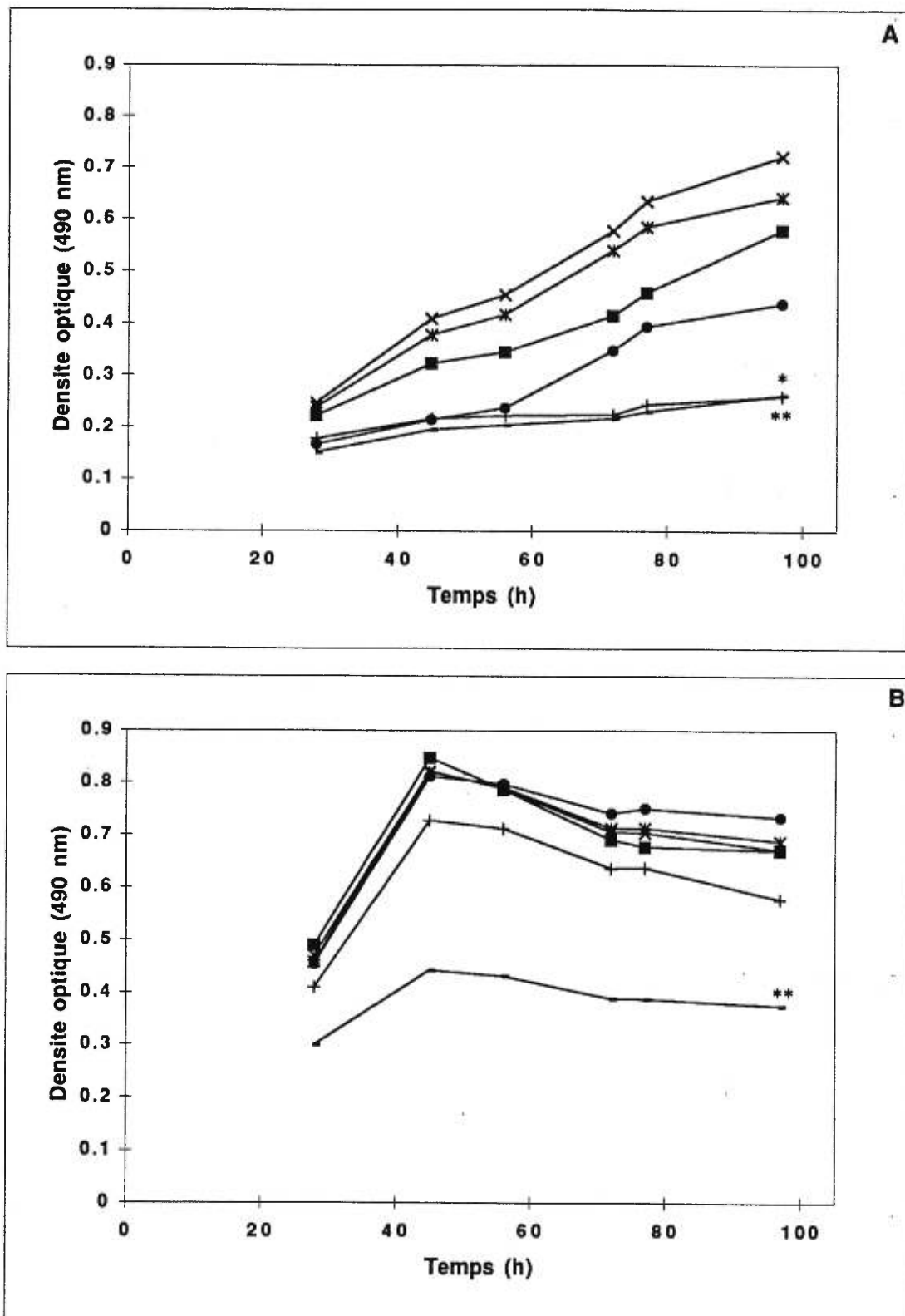


Figure 33 : Activité métabolique des cellules spléniques de souris C57BL/6 (A) et SJL (B), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A. (■) contrôle, (×) 0.001, (*) 0.01, (●) 0.1, (+) 0.5, (◻) 1 μ M.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

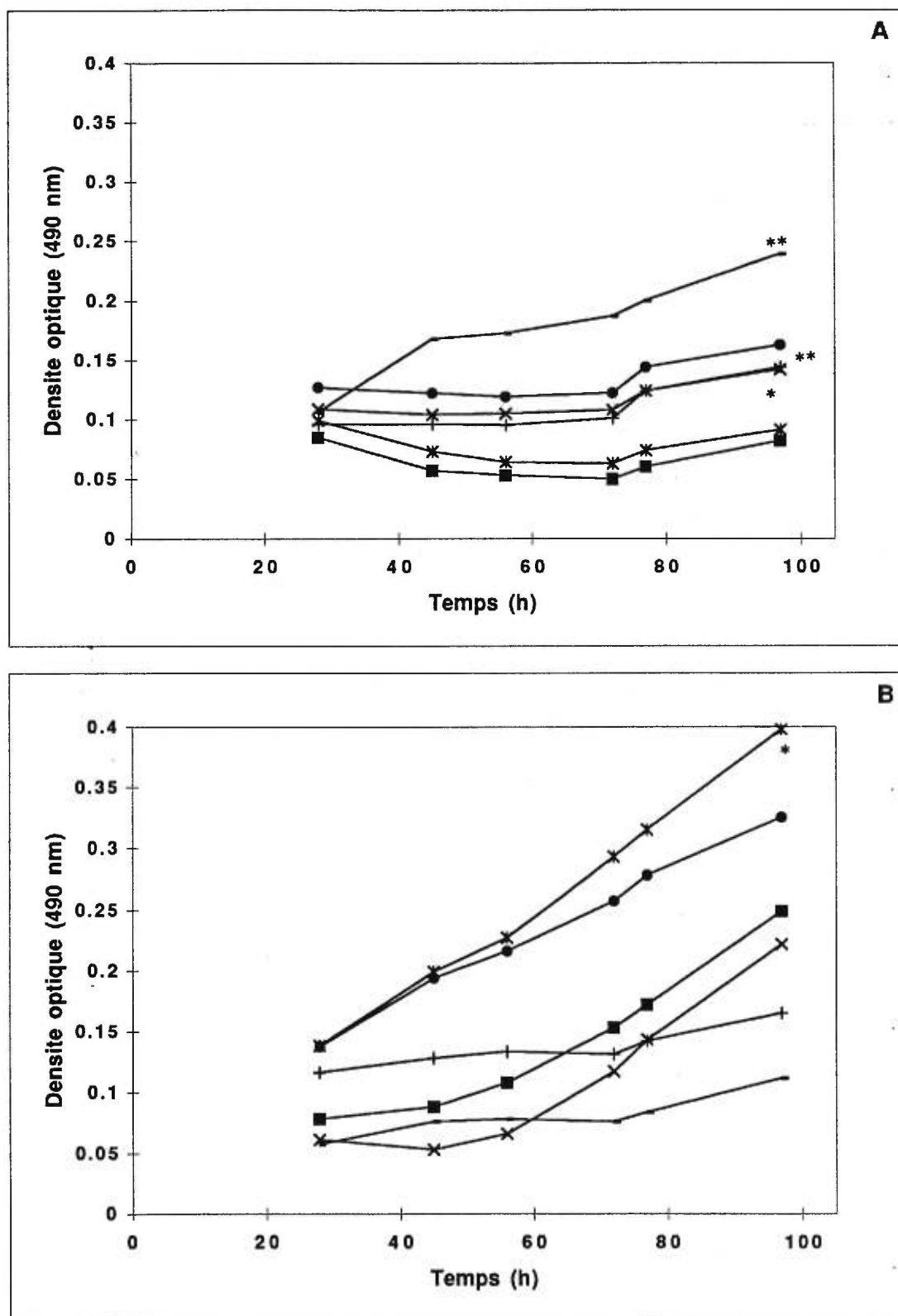


Figure 34 : Activité métabolique des cellules thymiques de souris C57BL/6 (A) et SJL (B), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de concanavalin A. (■) contrôle, (×) 0.001, (*) 0.01, (●) 0.1, (+) 0.5, (◐) 1 μ M.
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

permet de faire la sélection positive et négative durant le processus de maturation intra-thymique. Afin de vérifier si l'apoptose induite par le MeHgCl résulte d'une activation du récepteur Fas chez les sous-populations de lymphocytes T, des splénocytes et des thymocytes provenant de souris C57BL/6 et SJL ont été incubées avec différentes concentrations de MeHgCl en présence de l'anticorps anti-Fas. Les sous-populations ont ensuite été identifiées par un double marquage avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8 avant d'être analysées en cytofluorométrie. Leurs niveaux d'activité métabolique ont été ainsi évalués tel que décrit dans la section précédente.

3.6.1 L'activité métabolique de cellules spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, en contact avec différentes concentrations de MeHgCl et en présence d'anticorps anti-Fas

L'ajout d'un anticorps anti-Fas permet de vérifier si la stimulation induite par le MeHgCl entraîne une augmentation de sensibilité à l'apoptose via le système Fas car un anticorps anti-Fas agit comme un signal d'apoptose pour des cellules exprimant adéquatement la molécule Fas à sa surface (Itoh *et al.*, 1991). Ainsi, la figure 35 montre que l'ajout d'un anticorps anti-Fas n'a pas modifié de façon significative l'activité métabolique mitochondriale induite par les différentes concentrations de MeHgCl chez des lymphocytes de la rate provenant des deux lignées murines, sauf à la plus forte concentration où une inhibition significative de l'activité métabolique est encore observée ($p \leq 0.05$) (Figs. 35A et B). Par contre, le MeHgCl altère de manière évidente celle des thymocytes de souris C57BL/6 ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 36A) pour toutes les concentrations utilisées. Tandis que chez la souris SJL, le MeHgCl altère l'activité mitochondriale à un degré moindre et ce, seulement avec des concentrations fortes ($p \leq 0.001$) (Fig. 36B), lorsque ces résultats sont comparés à l'activité mitochondriale des thymocytes traités avec le MeHgCl seulement (Figs. 32A et B).

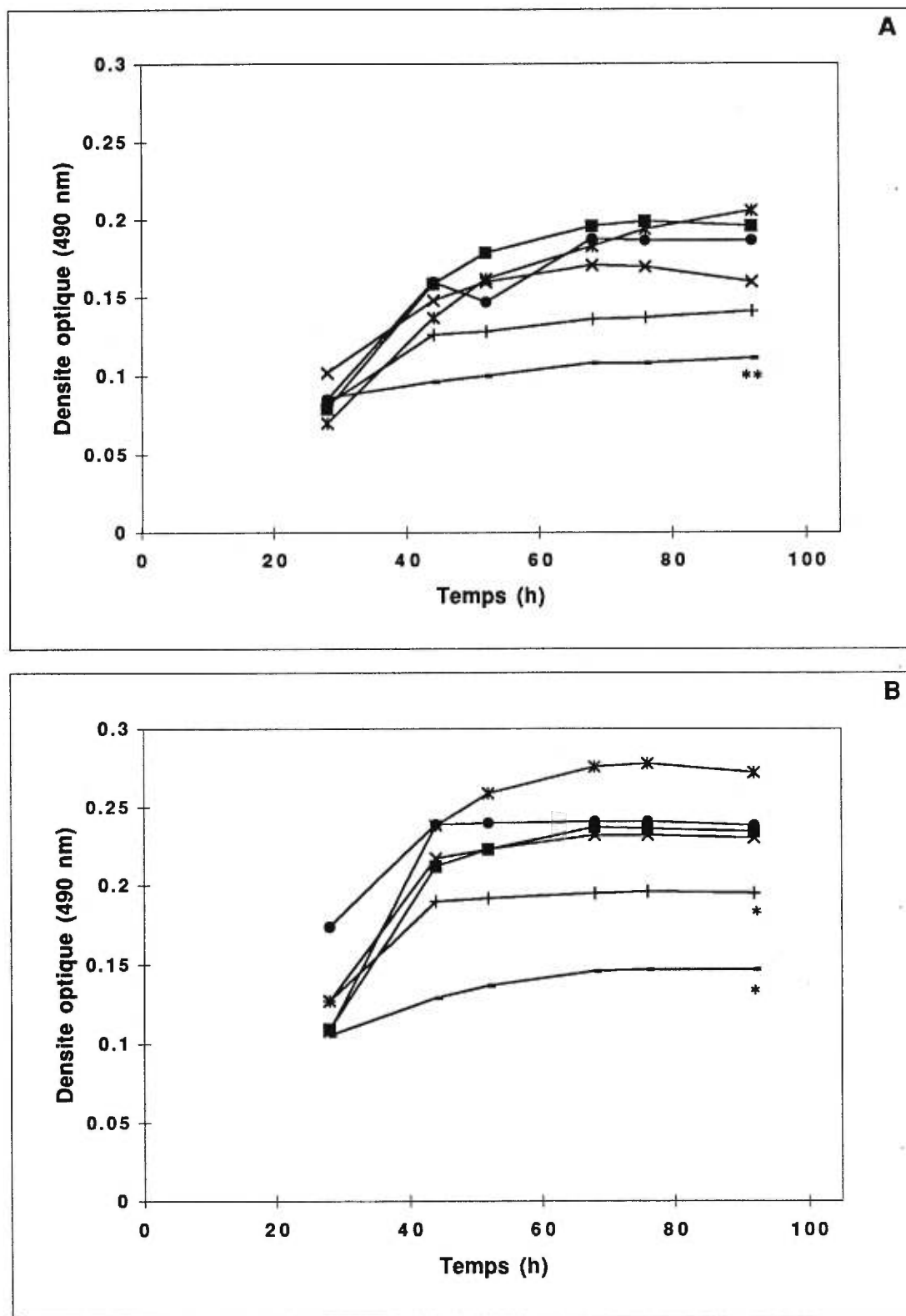


Figure 35 : Activité métabolique des cellules spléniques de souris C57BL/6 (A) et SJL (B), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas. (■) contrôle, (×) 0.001, (*) 0.01, (●) 0.1, (+) 0.5, (◻) 1 μ M.
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

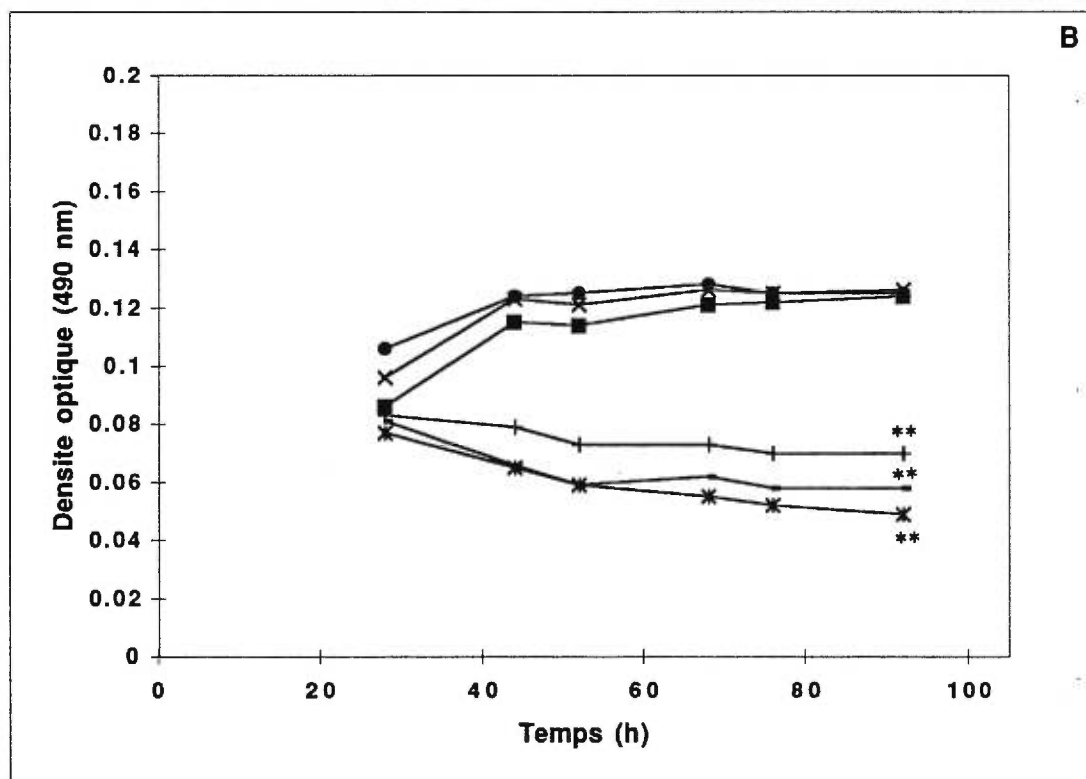
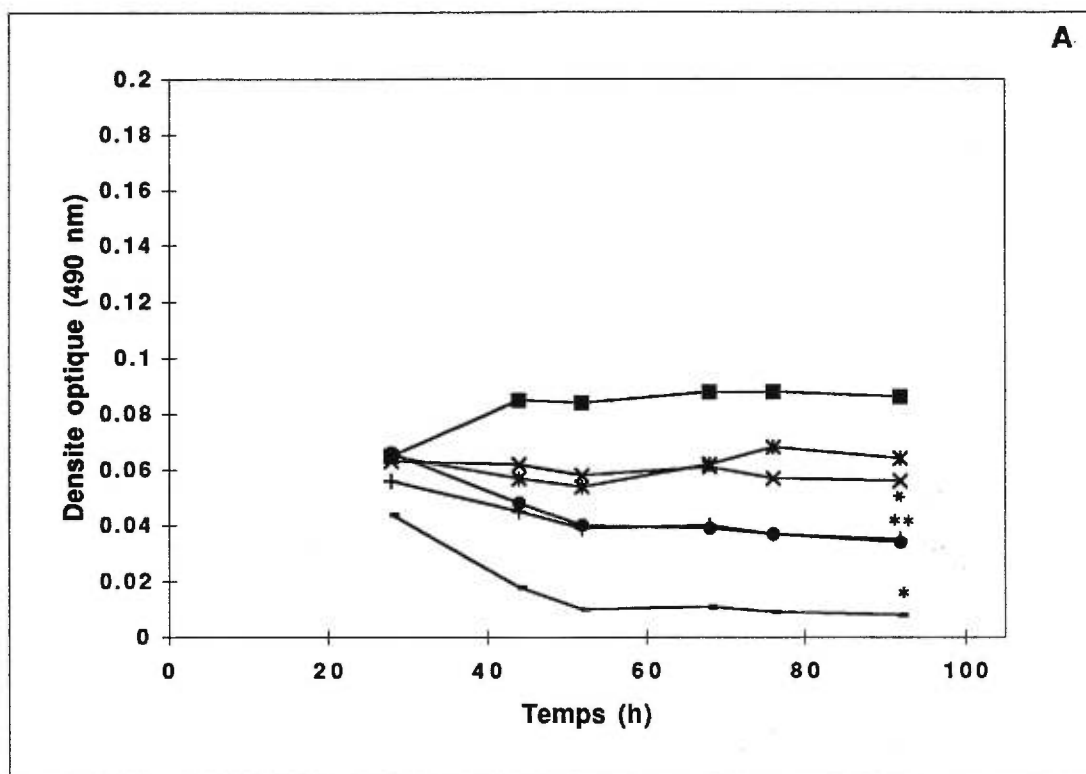


Figure 36 : Activité métabolique des cellules thymiques de souris C57BL/6 (A) et SJL (B), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas. (■) contrôle, (×) 0.001, (●) 0.01, (+) 0.5, (◻) 1 μM. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$

3.6.2 Les sous-populations lymphocytaires de cellules spléniques et thymiques, de souris C57BL/6 et SJL, traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas

L'analyse des sous-populations spléniques lorsque traitées avec le MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas ne montre que de faibles variations peu significatives des nombres relatifs de lymphocytes spléniques CD4⁺ et CD8⁺ de souris C57BL/6 et SJL (Figs. 37 et 38). Par contre, lorsque les thymocytes de souris C57BL/6 sont traités au MeHgCl et mis en contact avec l'anticorps anti-Fas, les lymphocytes DP et CD8⁺ apoptotiques de souris C57BL/6 (région R2) diminuent en nombre même avec de faibles concentrations de MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 39C). Les lymphocytes SP CD4⁺ non apoptotiques et les SP CD8⁺ apoptotiques augmentent avec de faibles concentrations de MeHgCl ($p \leq 0.05$) (Fig. 39A et B). Par contre, les nombres de lymphocytes SP CD4⁺ et CD8⁺ normaux diminuent avec une concentration de $1 \mu\text{M}$ de MeHgCl ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 39A et B). Chez la souris SJL, seule la concentration de $1 \mu\text{M}$ de MeHgCl a réduit le nombre des cellules CD4⁺, CD8⁺ et DP dans la région R1 et augmenté ceux dans la région R2 ($p \leq 0.05$) (Fig. 40). Aussi, des faibles concentrations de MeHgCl de 0.001 et $0.5 \mu\text{M}$ de MeHgCl ($p \leq 0.05$) (fig. 40B) stimulent légèrement les lymphocytes CD8⁺. Donc, les expériences utilisant l'anticorps anti-Fas mettent en lumière le fait que les cellules sensibles aux effets des concentrations faibles de MeHgCl sont éliminées par l'ajout de cet Ac suggérant que le MeHgCl puisse induire l'apoptose seulement chez des cellules exprimant la protéine Fas.

3.7 Les sous-populations V β 6, V β 8 et V β 14 des lymphocytes CD4⁺, de souris C57BL/6 et SJL, traités, *in vitro*, avec différentes concentrations de MeHgCl

Les lymphocytes peuvent aussi être stimulés à entrer en anergie et en apoptose suite à un signal via la chaîne β du TCR. Ce phénomène est surtout connu comme le

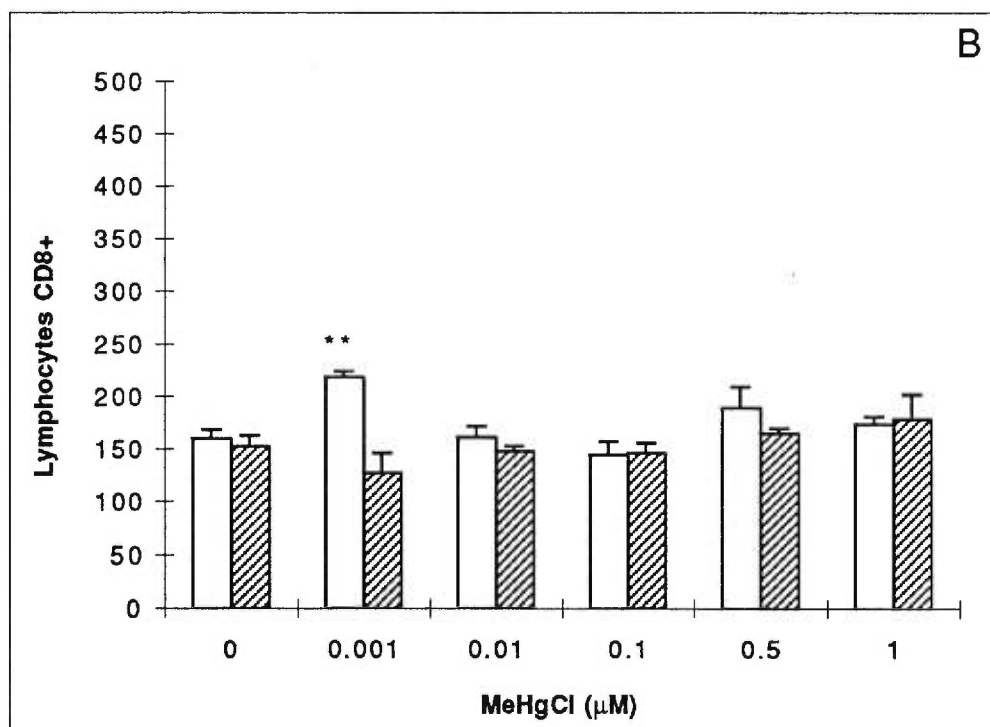
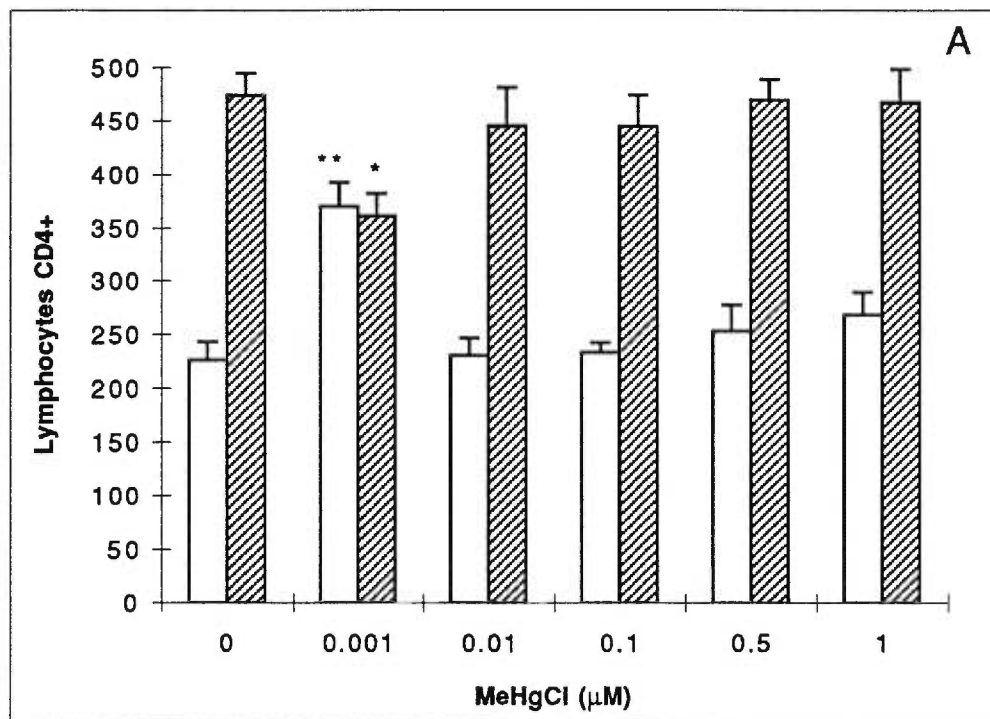


Figure 37 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4+ (A) et CD8+ (B) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

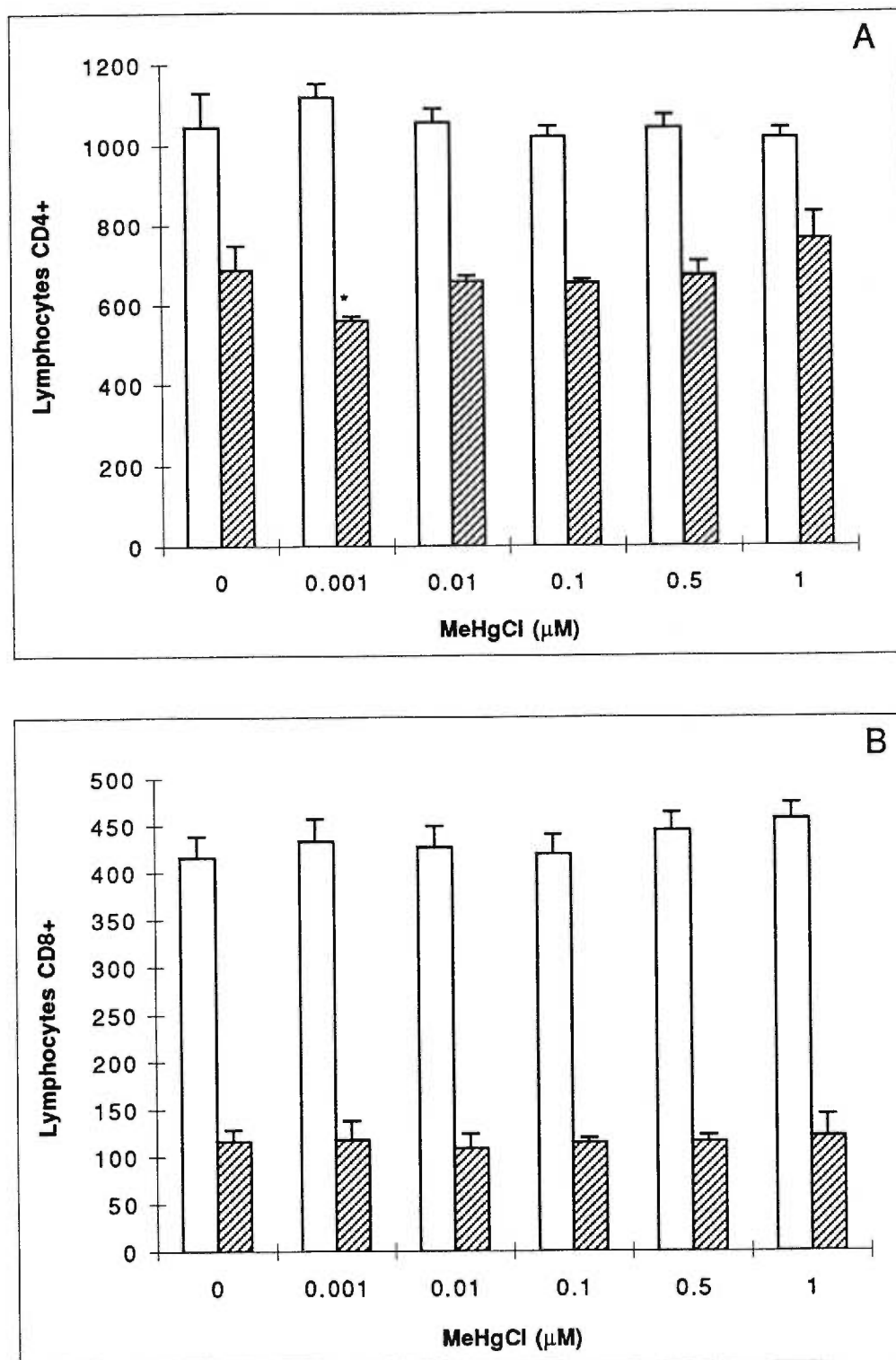


Figure 38 : Sous-populations de lymphocytes T spléniques CD4⁺ (A) et CD8⁺ (B) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.

* $p \leq 0.05$

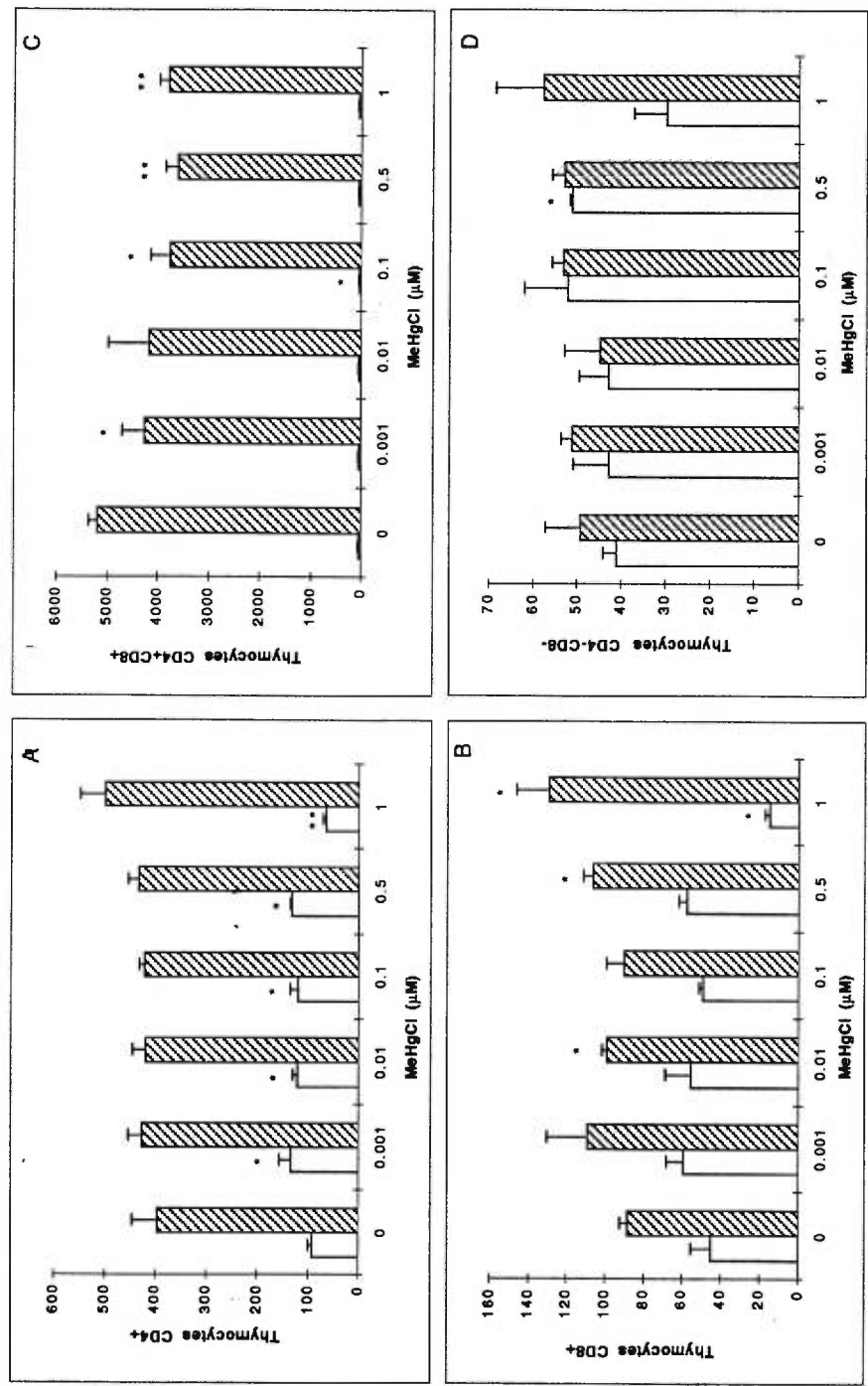


Figure 39 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A), CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris C57BL/6, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.
 * p<0.05; ** p<0.01

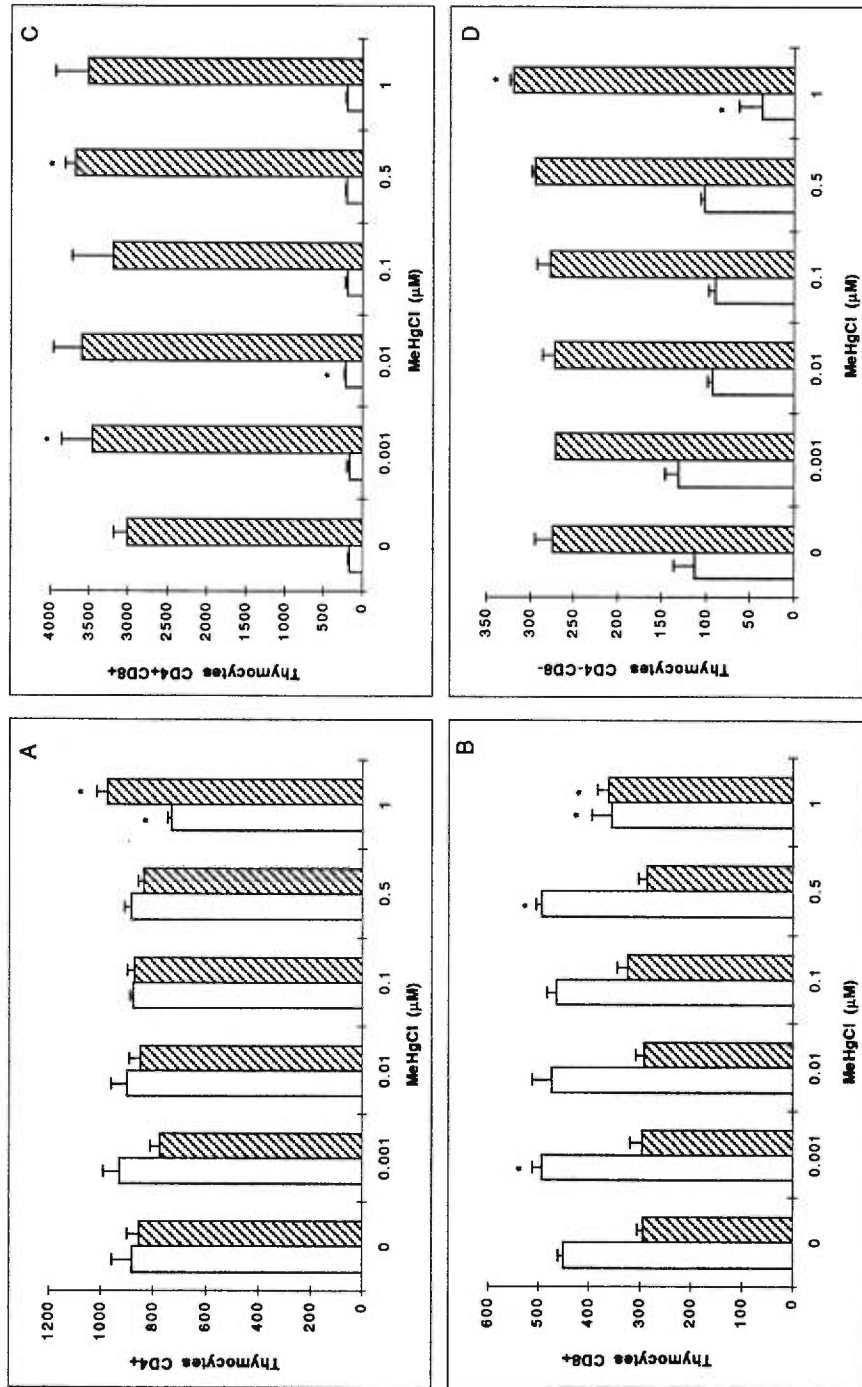


Figure 40 : Sous-populations de lymphocytes T thymiques CD4+ (A), CD8+ (B), CD4+CD8+ (C) et CD4-CD8- (D) de souris SJL, présentes dans la région R1 (FSC/SSC normaux) (□) et dans la région R2 (FSC bas/SSC haut) (▨), traitées *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas.

mécanisme d'action des superantigènes (Herman *et al.*, 1991). Il est proposé que l'induction d'apoptose par le MeHgCl pourrait résulter d'une altération de la chaîne V β du TCR chez certaines familles de lymphocytes T entraînant leur disparition. Pour vérifier cette hypothèse, des lymphocytes spléniques de souris C57BL/6 et SJL ont été traités avec différentes concentrations de MeHgCl et les pourcentages de trois familles de V β (V β 6, V β 8, V β 14) chez les lymphocytes CD4⁺ ont été analysés par cytofluorométrie suite à un double marquage avec des anticorps anti-CD4 et des anticorps contre chacune des chaînes V β . Les lymphocytes CD4⁺V β 8 représentent la sous-population la plus importante chez des lymphocytes CD4⁺. Il a déjà été démontré que chez les souris de type H-2^b, le HgCl₂ activait les lymphocytes CD4⁺V β 6, V β 8, V β 10 et V β 14 alors que chez la souris SJL, qui ne possède pas de lymphocytes CD4⁺V β 8 (Jouvin-Marche *et al.*, 1989), le HgCl₂ agissait sur les autres types de lymphocytes CD4⁺ tels que les V β 6, V β 7 et V β 14 (Jiang et Möller, 1996).

Le tableau X montre que le MeHgCl réduit préférentiellement le pourcentage des lymphocytes CD4⁺V β 8 de souris C57BL/6 mais non pas ceux des lymphocytes CD4⁺V β 6 et V β 14. Par contre, chez la souris SJL, les lymphocytes CD4⁺ V β 6 et V β 14 ne sont pas modifiés significativement par le MeHgCl quelle que soit la concentration utilisée.

Ces résultats suggèrent que les lymphocytes CD4⁺ de la famille de V β 8 de la souris C57BL/6 sont plus spécifiquement induits à entrer en apoptose par des concentrations faibles de MeHgCl, ce qui suggère que la résistance aux effets apoptotiques du MeHgCl chez la souris SJL pourrait être reliée à l'absence de V β 8 chez les lymphocytes de lignée de souris.

Tableau X: Pourcentages de lymphocytes CD4+V β 6+, CD4+V β 8+ et CD4+V β 14+ en provenance de la rate de souris C57BL/6 et SJL, traités *in vitro* avec différentes concentrations de MeHgCl.

Lignée murine	MeHgCl (μ M)	Famille de V β (%)		
		CD4+V β 6+	CD4+V β 8+	CD4+V β 14+
C57BL/6	Contrôle	4.9 \pm 1.1	15.3 \pm 2.5	8.4 \pm 1.1*
	0.001	6.1 \pm 0.4	7.6 \pm 1.1*	5.3 \pm 0.3
	0.01	8.3 \pm 1.5	13.0 \pm 0.6	8.3 \pm 1.0
	0.1	7.0 \pm 0.3	7.1 \pm 0.2*	6.4 \pm 0.1
	0.5	7.4 \pm 1.7	7.2 \pm 1.2*	7.3 \pm 0.3
	1	9.2 \pm 1.2*	8.4 \pm 1.1*	P.F.
SJL	Contrôle	8.5 \pm 0.3	<1	8.3 \pm 0.2
	0.001	8.9 \pm 0.7	<1	8.8 \pm 0.2
	0.01	8.5 \pm 0.9	<1	8.0 \pm 0.5
	0.1	8.5 \pm 1.1	<1	9.0 \pm 0.3
	0.5	9.0 \pm 0.7	<1	8.0 \pm 1.0
	1	8.5 \pm 1.1	<1	9.0 \pm 0.4

P.F. = Pas fait

* $p \leq 0.05$

CHAPITRE QUATRIÈME

DISCUSSION

Nous avons montré, au cours de ce travail, que le MeHgCl pouvait induire un processus d'apoptose chez les lymphocytes T de la rate et du thymus de souris C57BL/6 reconnue comme, particulièrement sensible à l'immunodéficience induite par des concentrations toxiques de MeHgCl. Par contre, les lymphocytes T de la souris SJL, capable de développer une auto-immunité suite à des concentrations subtoxiques de MeHgCl, se sont avérés plus résistants à l'apoptose. Un des aspects les plus importants de ce travail a été de démontrer que des concentrations faibles de MeHgCl, considérées comme non-toxiques, pouvaient entraîner une stimulation suivie de l'induction d'un processus apoptotique chez les lymphocytes exprimant l'antigène Fas, et plus particulièrement ceux appartenant à la famille des V β 8.

4.1 Induction de lymphocytes T morphologiquement apoptotiques par le MeHgCl

L'analyse cytofluorométrique des lymphocytes incubés, soit dans des conditions normales ou en présence de MeHgCl, a montré la présence de lymphocytes dans une région ayant un SSC plus élevé et un FSC plus faible que ceux de la population de lymphocytes normaux. Le traitement à la dexaméthasone, un inducteur d'apoptose, a entraîné l'accumulation de cellules dans la région R2 définie comme étant la région apoptotique et en parallèle, réduit celle dans R1 définie comme étant celle des cellules morphologiquement normales. Par ailleurs, la majorité des lymphocytes dans la région R2 avaient leur ADN clivé, tel que détecté à l'aide de la méthode TUNEL. Il est donc possible d'affirmer que des cellules présentes dans la région R2 représentent les cellules morphologiquement apoptotiques, alors que les cellules retrouvées dans la région R1 sont plutôt normales ou en début d'apoptose, selon les pourcentages de positivité au test TUNEL.

L'apoptose est définie comme une forme de mort cellulaire programmée mettant en action la synthèse de nouveaux gènes (Tenniswood *et al.*, 1994) suivie d'une

augmentation de la granulosité (Feldmann, 1995) et d'une perte graduelle d'organelles cellulaires sous forme de corps apoptotiques (Kerr *et al.*, 1972). De plus, une cellule en apoptose se différencie morphologiquement d'une cellule normale par le fait qu'elle possède une plus forte réfringence (ou densité intracellulaire) et une plus petite taille, tel qu'observé au microscope électronique (Willye *et al.*, 1980). L'ADN des cellules apoptotiques se caractérise principalement, par électrophorèse sur gel d'agarose, par la présence de plusieurs fragments internucléosomiaux, absents chez une cellule normale (Wyllie, 1980). Ces deux caractéristiques fondamentales de l'apoptose peuvent être détectées par l'analyse en cytofluorométrie, comme le montrent les travaux de Chrest *et al.* (1995). Toutefois, ces auteurs ont remarqué que la région de cellules apoptotiques se situait à peu près au même niveau, en SSC, que celle de cellules normales, contrairement à nos observations. Cette différence au niveau de l'intensité de la réfringence cellulaire entre nos résultats et ceux de Chrest *et al.* (1995) pourrait être expliquée par la durée du temps d'incubation qui est de 20 h au lieu de 48 h et la méthode d'induction de l'apoptose utilisée, à l'aide d'anticorps anti-CD3 à la place de la dexaméthasone ou du MeHgCl.

Nous avons montré que les lymphocytes totaux de la rate des souris C57BL/6 et SJL traités avec différentes concentrations de MeHgCl étaient sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl. Cependant, les lymphocytes T spléniques de la souris C57BL/6 se sont avérés être plus sensibles aux effets de MeHgCl que ceux de la souris SJL. Les diminutions observées dans les rapports R1/R2 reflètent l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques (R2) par rapport au nombre de cellules normales (R1) lorsque traités avec des concentrations faibles de MeHgCl. Ainsi, des concentrations de 0.1 μM ont été suffisantes pour favoriser le processus d'apoptose autant chez les lymphocytes T de la rate de souris C57BL/6 que SJL. Par contre, les lymphocytes thymiques, dont la plupart sont des cellules immatures mais en prolifération, ont montré une plus grande résistance à l'effet apoptotique induit par le MeHgCl chez les deux lignées de souris, quoiqu'une légère stimulation des thymocytes de SJL a été observée.

Nos travaux ont montré que le MeHgCl, chez les lymphocytes des lignées murines utilisées, a induit l'apoptose non seulement via la modification morphologique des lymphocytes mais aussi par le clivage de leur ADN. De plus, les niveaux d'apoptose variaient selon la concentration du MeHgCl. Très récemment, Shenker *et al.* (1997) ont montré, chez des lymphocytes T humains, que le MeHgCl, à des concentrations de 0.6 à 5 μ M, induisait des bris d'ADN détectés par des tests TUNEL. Miura *et al.* (1978) et Miura et Imura (1987) avaient montré dans leurs études que la synthèse de l'ADN était plus résistante au MeHg que la prolifération cellulaire, ce qui indique que la synthèse de l'ADN n'apparaît pas être la cible primaire à la toxicité du MeHg, mais ce qui n'exclut pas la possibilité de bris d'ADN. De très rares études rapportent la présence d'apoptose induite par le MeHgCl. A part de l'étude de Shenker *et al.* (1997) sur les lymphocytes humains, il avait déjà été suggéré que le MeHgCl pouvait induire un processus apoptotique dans les cellules du système nerveux (Choi et Kim, 1984).

4.2 Effets de la stimulation blastique sur l'apoptose induite par le MeHg Cl sur les lymphocytes T de souris C57BL/6 ET SJL

Nous avons montré que la stimulation blastique avec de la Con A rendait les splénocytes de la souris C57BL/6 plus sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl que ceux de la souris SJL. Ces observations sur les lymphocytes de souris C57BL/6, par contre, vont à l'encontre des résultats de Shenker *et al.* (1997) sur l'effet du MeHg (0.6 à 5 μ M) sur les lymphocytes T humains. Ils ont montré que la présence du mitogène PHA (1 μ g/ml) empêchait les lymphocytes T à entrer en apoptose. Cependant Nakatsuru *et al.* (1985) avaient déjà montré une diminution de la synthèse de l'ADN chez les lymphocytes T de souris C57BL/6, lorsque traités *in vivo* avec 10^{-7} M de MeHg, et subséquemment stimulés par la Con A, ce qui nous laisse supposer une atteinte à la viabilité des lymphocytes plutôt qu'une stimulation. Ainsi, Daum *et al.* (1993), avaient montré une inhibition de la réponse à un mitogène chez les

lymphocytes murins et humains prétraités avec des concentrations faibles de mercure. De plus, nos résultats sur les splénocytes en division ont montré que les lymphocytes matures de la souris C57BL/6 étaient plus sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl que ne l'étaient ceux de la souris SJL. Nakatsuru *et al.* (1985) avaient aussi remarqué qu'une fois la synthèse de l'ADN induite par un mitogène, elle était difficilement inhibée par le MeHgCl même à des concentrations aussi fortes que 10^{-6} M. Nous avons observé qu'un certain certain nombre de cellules hyperploïdes pouvaient morphologiquement se retrouver dans la région R2, donc être déjà en processus apoptotique chez la souris C57BL/6, ce qui pourrait suggérer une apoptose post-stimulation, alors qu'au contraire, la stimulation par la Con A diminuait le nombre de cellules en division et apoptotiques dans la rate de la souris SJL.

D'autre part, les thymocytes de la souris C57BL/6 mais non pas ceux de la lignée SJL ont plutôt été stimulés par des concentrations subtoxiques de MeHgCl en présence de Con A puisque les nombres de cellules dans la région R1 ont été augmenté. Le mercure est connu pour induire, *in vitro*, chez des lymphocytes humains (Berger et Skinner, 1974 ; Caron *et al.*, 1970) et murins (Reardon et Lucas, 1981), une prolifération cellulaire suite à sa liaison avec le groupement SH de la p56^{lck}, une protéine kinase agissant sur le récepteur Thy1, CD3 ou CD4 (Nakashima *et al.*, 1994). Par contre, le nombre de cellules morphologiquement apoptotiques de la région R2 a aussi été fortement augmenté, ce qui suggère encore une fois l'induction d'une apoptose post-stimulation. L'induction de l'apoptose chez des cellules spléniques et thymiques à l'aide de la dexaméthasone a été, par contre, légèrement diminuée par l'ajout de MeHgCl suggérant un effet légèrement inhibiteur du MeHgCl sur le processus apoptotique.

Les différences de comportements entre les lymphocytes T matures de la rate et ceux immatures du thymus indiquent que le MeHgCl agit par des mécanismes différents chez les deux types de populations de lymphocytes. L'analyse plus détaillée des splénocytes à l'aide de l'anticorps anti-Thy1 a montré que, quoique les splénocytes

totaux ne semblent pas être stimulés par des concentrations faibles de MeHgCl, tel qu'observé chez les thymocytes, les lymphocytes T spléniques normaux étaient effectivement stimulés (région R1) et devenaient subséquemment apoptotiques, chez la souris C57BL/6 (Fig. 3 A et B). Par contre, les lymphocytes spléniques de la souris SJL n'ont pas été stimulés et le niveau de cellules apoptotiques était même légèrement en baisse (Fig. 4A). Il est possible que d'autres cellules spléniques, telles les lymphocytes B, les cellules NK ou certains macrophages aient été plus sensibles que les lymphocytes T à l'apoptose induite par le MeHgCl, masquant ainsi la stimulation des lymphocytes T. Ces résultats sont donc encore en accord avec un mécanisme d'apoptose post-stimulation des lymphocytes T immatures ou matures de la souris C57BL/6 mais non chez la souris SJL.

Le mécanisme par lequel le MeHgCl induit l'apoptose après une stimulation blastique n'est pas connu mais plusieurs actions du MeHgCl sur le métabolisme cellulaire ont été décrites. Les études sur les mécanismes d'action du MeHgCl sur des cellules en culture ont mis en évidence une inhibition de la synthèse des macromolécules (Nakazawa *et al.*, 1975). Gruenwedel et Cruikshank (1979) ont aussi montré, que l'exposition des cellules HeLa S₃, à différentes concentrations de MeHgCl entraînait une diminution des synthèses de l'ADN, de l'ARN et de protéines. De plus, la viabilité cellulaire était également réduite. De plus, le MeHg pouvait perturber la structure des microtubules (Durham *et al.*, 1995), altérer le transport des acides aminés et donc, la synthèse des macromolécules (Gruenwedel et Cruikshank, 1979).

4.3 Sensibilité des différentes sous-populations de lymphocytes T spléniques et thymiques à l'apoptose induite par le MeHgCl

Nous avons montré que le MeHgCl entraînait surtout les lymphocytes spléniques CD4⁺ à entrer en apoptose chez les deux lignées de souris. Cette sensibilité des CD4⁺ a été exacerbée suite à une stimulation par la Con A chez la

souris C57BL/6 seulement, alors que les lymphocytes CD8 normaux étaient plus fortement stimulés et entraient relativement moins en apoptose. Cependant, les résultats sur les thymocytes ont montré que les CD4⁺ de souris C57BL/6 entraient en apoptose à des concentrations plus fortes de MeHgCl que celles agissant sur les cellules spléniques. Quant aux thymocytes de la souris SJL, le MeHgCl n'a eu aucun effet sur les lymphocytes CD4⁺ malgré une légère hausse de CD8⁺ avec la concentration de 0.5 µM. Ces résultats montrent donc que le MeHgCl peut induire une immunosuppression chez la souris C57BL/6 par une déplétion des lymphocytes CD4⁺ via l'induction d'un processus apoptotique et d'une hausse relative de CD8⁺ pouvant inclure des cellules suppressives. Chez la souris SJL, il ne s'est produit aucune variation dans les nombres des différentes sous-populations lymphocytaires suggérant une résistance à l'effet du MeHgCl.

De plus, les observations faites avec les lymphocytes stimulés par la Con A, confirment que la souris C57BL/6 a tendance à développer une immunosuppression lorsqu'elle doit répondre à une stimulation antigénique, via la perte de lymphocytes CD4⁺ et la production de lymphocytes CD8⁺. Les études de Blakley *et al.* (1979) et de Koller *et al.* (1977) ont montré une réduction de la synthèse des anticorps chez les souris traitées au MeHg. Comme les lymphocytes B nécessitent la stimulation des lymphocytes T matures pour être entraînés à synthétiser des anticorps, une diminution de la production d'anticorps pourrait être la conséquence d'une atteinte primaire au niveau des lymphocytes T et/ou secondairement à un défaut des lymphocytes B. Saoudi *et al.* (1993) ont expliqué que l'immunosuppression était surtout reliée à une atteinte au niveau des lymphocytes T et des interleukines qu'ils produisent. Ces différents mécanismes d'action pourraient expliquer la plus grande sensibilité des lymphocytes à l'action toxique du MeHgCl lorsqu'ils sont en division ou stimulés par des mitogènes mais ils n'expliquent pas l'induction d'une apoptose post-stimulation comme nous l'avons observé chez la souris C57BL/6.

faibles de MeHgCl. L'inhibition dans l'activité métabolique des thymocytes de la souris SJL n'est apparue qu'avec les deux concentrations les plus fortes de MeHgCl. Les lymphocytes de SJL semblent être non pas seulement plus résistants à l'effet toxique du MeHgCl que ceux de souris C57BL/6 mais ont été stimulés. Ainsi, la baisse de l'activité mitochondriale des splénocytes de souris C57BL/6 suite à l'action du MeHgCl est en accord avec l'induction d'un processus apoptotique tel que montré dans la section 3.4.

Il a été démontré que la masse mitochondriale diminuait durant la mort cellulaire programmée chez les splénocytes de souris BALB/c. La perte d'énergie potentielle mitochondriale a été observée chez les lymphocytes T CD4+, CD8+ et chez les thymocytes (Zamzami *et al.*, 1995). Cette perturbation fonctionnelle des mitochondries pourrait être due à l'augmentation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Bouillaud *et al.*, 1994). La chaîne respiratoire mitochondriale peut être inhibée par des inhibiteurs tels que la rotenne et l'antimycine A tout comme les inhibiteurs de la synthèse d'ATP mitochondriale (Wolvetang *et al.*, 1994). Le MeHg a été montré comme ayant le potentiel d'altérer cette respiration mitochondriale observée chez les cellules hépatiques (Fowler et Woods, 1977) ce qui suggère que les mitochondries pourraient être un site possible d'action des faibles concentrations de MeHgCl. Des études cinétiques ont montré que les cellules perdaient d'abord le potentiel de la membrane mitochondriale avant que les processus d'endonucléolyses, de peroxydation et de cytolyse se déclenchent (Zamzami *et al.*, 1995).

D'autre part, le MeHgCl pourrait induire directement une inhibition du niveau de production d'ATP cellulaire dans les mitochondries (Nakatsuru *et al.*, 1985) tout en agissant sur les synthèses d'ARN et de protéines (Gruenwedel et Cruikshank, 1979). Ainsi, l'altération de la synthèse protéique ou de l'expression des gènes pourrait alors agir comme déclencheur du processus apoptotique (Schwartzman et Cidlowski, 1993). La perturbation des mitochondries via l'inhibition de la synthèse

Chez la souris SJL, la sous-population de lymphocytes CD8⁺ a été légèrement stimulée à entrer en apoptose par le MeHgCl alors que les cellules CD4⁺ n'ont pas été affectées. La survie des lymphocytes CD4⁺ peut alors entraîner une augmentation de réponse immune, associée à une diminution des lymphocytes CD8⁺ suppresseurs favorisant ainsi un processus auto-immunitaire. Certaines lignées de souris et de rats sont sensibles tandis que d'autres sont résistantes au développement de l'auto-immunité causée par le mercure (Stiller-Winkler *et al.*, 1988 ; Pelletier *et al.*, 1987). Le mercure inorganique a été surtout montré comme étant un très bon inducteur de l'auto-immunité (Hultman et Eneström, 1991), mais quelques études ont également montré que le mercure inorganique avait le potentiel de produire cet effet (Bernaudin *et al.*, 1981) quoique le MeHgCl possède une toxicité de 10 fois supérieure à celle du mercure inorganique, à cause de sa forte liposolubilité et sa capacité à altérer la synthèse des macromolécules (Shenker *et al.*, 1992). Lors du développement de cette maladie, des complexes immuns et la prolifération des lymphocytes CD4⁺, principalement de type Th-2, associés à une suppression des lymphocytes CD8⁺ ont été observés chez les animaux susceptibles (Pelletier *et al.*, 1987). De plus, Bigazzi (1997) avait mentionné que la réponse auto-immune pouvait être médiée soit par les sous-populations de lymphocytes CD4⁺ et/ou par les lymphocytes CD8⁺.

4.4 Modulation de l'activité métabolique de lymphocytes spléniques et thymiques de souris C57BL/6 et SJL en présence de MeHgCl

Nos résultats montrent que l'activité mitochondriale des splénocytes de la souris C57BL/6 diminuait plus rapidement que celle de la souris SJL, car cette activité métabolique était plus fortement réduite avec toutes les concentrations de MeHgCl utilisées chez la souris C57BL/6, mais seulement avec, les concentrations plus fortes de MeHgCl, chez la souris SJL. Chez les thymocytes de la souris C57BL/6, l'activité mitochondriale a été plus basse avec toutes les concentrations de MeHgCl alors que ces cellules ont été stimulées chez la souris SJL même avec les concentrations les plus

protéique est connue pour entraîner une augmentation de la concentration du Ca^{++} intracellulaire (Trump et Berezsky, 1995), et une diminution de la production d'ATP et de NADH (Bernardi *et al.*, 1994), ce qui activent les protéases, désorganisent le cytosquelette et, ultimement, activent les endonucléases, dont celles responsables de l'apoptose (Kroemer *et al.*, 1995).

Par contre, la stimulation de l'activité mitochondriale observée avec les faibles concentrations de MeHgCl chez la souris SJL ne peut s'expliquer par des mécanismes d'activation directe du MeHgCl. Il est possible que la stimulation via la protéine de surface Thy1 entraîne les cellules à se diviser légèrement mais qu'elles n'aient pas encore acquis la capacité d'entrer en apoptose. Il est connu que les lymphocytes T matures doivent être activés et faire plusieurs cycles de division cellulaire avant de devenir sensibles à des signaux inducteurs d'apoptose (Wesselborg *et al.*, 1993). Ainsi, la stimulation par la Con A a entraîné une augmentation de l'activité mitochondriale chez les deux lignées de souris, sauf avec les deux concentrations les plus fortes de MeHgCl. Par contre, chez les thymocytes stimulés de souris C57BL/6, le MeHgCl n'a eu aucun effet inhibiteur sur l'activité métabolique des cellules pour toutes les concentrations de MeHgCl utilisées. Cependant, chez la souris SJL, les deux concentrations les plus fortes ont inhibé cette activité métabolique, tandis que les autres concentrations de MeHgCl induisaient plutôt une stimulation du métabolisme mitochondrial. Ainsi, la stimulation blastique avec la Con A a permis de contrecarrer le processus apoptotique, particulièrement celui induit par de faibles concentrations de MeHgCl (Shenker *et al.*, 1997).

4.5 L'activité métabolique et l'effet de l'anticorps anti-Fas sur les sous-populations de lymphocytes spléniques et thymiques C57BL/6 et SJL

La molécule Fas est une molécule de surface de la famille des FNT qui transmet des signaux impliqués dans le déclenchement de l'apoptose. Il a été démontré

que les thymocytes immatures DN (CD4-CD8-) et matures CD4+CD8- et CD4-CD8+ exprimaient la molécule Fas à leur surface cellulaire, mais qu'elles étaient moins réactives à l'anticorps anti-Fas. Les thymocytes DP (CD4+CD8+), par contre, sont plus sensibles à l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas (Nishimura *et al.*, 1995). D'autre part, les lymphocytes spléniques peuvent être sensibles à l'apoptose induite via le système Fas lorsque la cellule a été préalablement activée, il s'agit alors d'une apoptose post-activation (Klas *et al.*, 1993). Nos résultats montrent que les cellules sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl sont aussi sensibles à l'effet de l'anticorps anti-Fas puisque les thymocytes DP ont été fortement diminués chez la souris C57BL/6, tandis qu'une faible atteinte n'a été observée chez les thymocytes matures. Aussi, la diminution de l'activité métabolique des splénocytes en présence d'Ac anti-Fas reflète une perte d'un certain nombre de cellules activées. Nos résultats suggèrent donc que les lymphocytes de la souris SJL possèderaient moins de récepteurs Fas à leur surface par rapport aux lymphocytes de souris C57BL/6, pouvant alors leur conférer une plus grande résistance à l'induction de l'apoptose par l'anticorps anti-Fas. Il a été démontré que le récepteur Fas n'est pas présent chez certaines personnes ou chez certaines lignées murines, mais il semble que l'absence du récepteur pour la molécule Fas ne modifie pas le processus normal de sélection positive ou négative des thymocytes (Rieux-Laurat *et al.*, 1995 ; Watanabe-Fukunuga *et al.*, 1992) car ces processus sont sous la responsabilité du TCR et du CD3 (Odaka *et al.*, 1990). L'apoptose induite par le système Fas diffère de celle induite par les glucocorticoïdes car elle ne nécessite pas de synthèse d'ARN ou de protéines enzymatiques (Anderson, 1997). Ce processus se produit chez des lymphocytes T matures préalablement activés par un antigène ou chez les lymphocytes T mémoires, de façon à provoquer l'élimination d'une quantité excessive de cellules immunes (Miyawaki *et al.*, 1992). Il a été récemment montré que les interactions Fas/FasL et CD40/CD40 ligand entraînaient non seulement l'auto-destruction des lymphocytes T mais aussi la destruction subséquente des lymphocytes B activés par ces lymphocytes T (Scott *et al.*, 1996), expliquant alors l'immunodéficience. Par contre, la diminution de l'apoptose induite via le système Fas/FasL pourrait favoriser la survie de

lymphocytes T activés ou auto-réactifs entraînant alors la stimulation de lymphocytes B auto-réactifs.

Les expériences utilisant l'anticorps anti-Fas permettent donc de montrer que les cellules qui sont sensibles à l'apoptose induite par le MeHgCl sont les mêmes que celles qui sont induites à entrer en apoptose via la molécule Fas. Moins de 10 % de splénocytes normaux totaux de souris BALB/c possèdent le récepteur Fas en surface (Drappa *et al.*, 1993) et expriment l'ARNm et des protéines Fas intracellulaires (Andjelic *et al.*, 1994). Nos résultats montrent qu'en présence de l'anticorps anti-Fas, le MeHgCl pouvait inhiber l'activité métabolique des splénocytes de souris SJL et C57BL/6 mais seulement aux deux concentrations les plus fortes, suggérant que les cellules sensibles à l'apoptose avec les concentrations plus faibles aient été éliminées par le traitement avec l'anticorps anti-Fas. Par contre, le MeHgCl n'a pas induit d'augmentation de cellules apoptotiques, en présence d'anticorps anti-Fas, tel que montré par l'analyse cytofluorométrique des populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺ de la rate de souris C57BL/6 et SJL, suggérant encore une fois que les cellules sensibles à l'effet apoptotique du MeHgCl ont disparu par l'action de l'anticorps anti-Fas. Par contre, les niveaux métaboliques des lymphocytes de SJL ont été plus élevés que ceux de la souris C57BL/6 indiquant un plus grand nombre de cellules résiduelles fonctionnelles en provenance de la souris SJL après l'action de l'anticorps anti-Fas.

D'autre part, l'activité métabolique des lymphocytes thymiques de souris C57BL/6 a été fortement inhibée par toutes les concentrations du MeHgCl en présence d'anticorps anti-Fas alors que celle des thymocytes de la souris SJL n'a été affectée que par les plus fortes concentrations de MeHgCl. Ces résultats suggèrent que le MeHgCl peut agir en synergie avec l'anticorps anti-Fas pour provoquer une plus forte apoptose chez les thymocytes de la souris C57BL/6. Cette hypothèse est aussi supportée par le fait que les cellules DP du thymus ont diminué alors que les lymphocytes matures SP CD4⁺CD8⁻ ont augmenté et ce, chez les cellules en provenance de la souris C57BL/6. Par contre, les thymocytes de la souris

SJL, tout en montrant une anergie lorsque mis en contact avec les concentrations les plus élevées de MeHgCl, sont demeurés moins sensibles à l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas. Au contraire, les lymphocytes DP n'ont pas été affectés par ces traitements, sauf avec la plus forte concentration de MeHgCl où les cellules normales SP et DN sont devenues plus apoptotiques. Ainsi, une différence importante dans la sensibilité à l'apoptose induite via le système Fas/FasL pourrait expliquer les comportements différents des deux lignées murines vis-à-vis des concentrations subtoxiques de MeHgCl.

4.6 Effets du MeHgCl sur les différentes familles de CD4+V β + chez les splénocytes de souris C57BL/6 et SJL

Nous avons finalement observé que le MeHgCl induisait une diminution préférentielle des lymphocytes de la famille des CD4+V β 8+ tandis que les lymphocytes CD4+V β 6+ n'augmentaient que très légèrement chez la souris C57BL/6 et ce, en fonction de la concentration du MeHgCl. Chez la souris SJL, cependant, le MeHgCl n'affectait ni les lymphocytes CD4+V β 6+ ni les CD4+V β 14+ alors que la famille des CD4+V β 8+ est normalement absente chez cette lignée murine (Shortman *et al.*, 1988). Ce phénomène de disparition ou de stimulation spécifique à une famille de V β est une caractéristique fonctionnelle des superantigènes. L'hypothèse du mode d'action du mercure similaire à celui d'un superantigène a été récemment proposée par Jiang et Möller (1996) qui supposaient que le HgCl₂, en se liant aux molécules présentes à la surface des cellules APC, les transformaient en superantigènes pouvant activer les lymphocytes T ayant des récepteurs V β spécifiques. Il est aussi possible que le MeHgCl puisse se lier directement au récepteur TCR des lymphocytes V β 8 et donc, de déclencher l'apoptose chez ces cellules via un signal calcique, et ce, chez la souris C57BL/6. Ainsi, le MeHgCl aurait une plus grande affinité avec le récepteur TCR de lymphocytes CD4+ de la famille des V β 8 chez la souris C57BL/6. Par contre, cette affinité serait moindre avec le récepteur TCR des thymocytes immatures

à cause du faible niveau d'expression de ce récepteur. De plus, la différence de l'affinité entre la chaîne V β 8 et les autres chaînes V β du TCR pourrait être due à la disponibilité et à la quantité de groupements sulfhydriles des acides aminés ou à la conformation du récepteur qui permettrait un accès facile à des molécules ligands.

Les superantigènes sont connus comme inducteurs d'apoptose via le TRC par la région variable de la chaîne β ou en se liant aux molécules du CMH de classe II (White *et al.*, 1989). Il est connu que l'interaction directe du superantigène SEB avec le récepteur TCR produit un signal calcique qui amène à l'apoptose cellulaire (Kawabe et Ochi, 1991). Il a été démontré, *in vivo*, que le HgCl₂ inhibait profondément les lymphocytes V β 8 chez les souris BALB/c (Jiang et Möller, 1996). Donc, la susceptibilité particulière des lymphocytes CD4+V β 8 aux effets apoptotiques induits par des concentrations subtoxiques de MeHgCl est un autre mécanisme par lequel cette forme de mercure peut entraîner une immunodéficience chez la souris C57BL/6.

4.7 Importance de l'apoptose dans la sensibilité génétique aux effets du MeHgCl

En somme, nos résultats sur les faibles concentrations de MeHgCl montrent que les lymphocytes T spléniques sont plus sensibles aux concentrations subtoxiques de MeHgCl qui les entraînent à entrer en apoptose suite à une stimulation, chez la souris C57BL/6. Cette apoptose est davantage induite par le MeHgCl lorsque ces lymphocytes sont stimulés par la Con A, principalement les lymphocytes CD4+. Ce mécanisme pourrait expliquer le fait que le MeHgCl affecte la capacité des cellules de la souris C57BL/6 à répondre à un mitogène (Nakatsuru *et al.*, 1985). Par contre, cet effet n'est que faiblement observé chez les lymphocytes de la souris SJL, ce qui le rendrait résistante à une immunodéficience. De plus, la diminution des lymphocytes CD4+V β 8+ de la souris C57BL/6 étant les plus touchés par le MeHgCl, aggraverait ainsi l'immunodéficience.

D'une part, les études chez les animaux de laboratoire ont montré que la présence du mercure produit une réduction, due à la toxicité, des cellules du système immunitaire comme les cellules NK et les lymphocytes après un traitement de 12 semaines avec du MeHg (Ilbäck, 1991), et affecte aussi la division cellulaire (Vogel *et al.*, 1986). Chez l'humain, le MeHgCl est également un toxique sur les cellules du système immunitaire comme, par exemple, chez les monocytes et les lymphocytes (Shenker *et al.*, 1992). D'autre part, le mercure peut agir en stimulant le système immunitaire, tel qu'observé chez les animaux de laboratoire (Pietsch *et al.*, 1989) et chez l'humain (Soleo *et al.*, 1997).

Il a été montré, par Nakatsuru *et al.* (1985), que chez les souris de lignées H-2^b, susceptibles au développement de l'immunosuppression, les fonctions lymphocytaires étaient altérées par le MeHgCl via l'inhibition de la réponse des lymphocytes T et B aux mitogènes. Une suppression de la population de lymphocytes CD4⁺ pourrait avoir comme conséquence de réduire la stimulation des lymphocytes T responsables de la prolifération des lymphocytes B à produire des anticorps (Castedo *et al.*, 1993), ce qui rendrait les animaux susceptibles aux agents infectieux ou résistants à la production d'auto-anticorps. (Koller, 1975 ; Gainer, 1977). Cette altération fonctionnelle induite par le MeHgCl a été reliée à une atteinte au niveau des microtubules (Miura et Imura, 1987) et à de la synthèse des macromolécules avec des concentrations de 5 à 1 µM. De plus, le MeHg peut perturber les canaux calciques (Marty et Atchison, 1997) et les voies métaboliques du glucose (Vallée et Ulmer, 1972) amenant ainsi, un déséquilibre dans le fonctionnement cellulaire. Mais, ces altérations fonctionnelles n'ont pas été démontrées à des concentrations plus faibles. De plus, chez cette même lignée de souris, le MeHgCl affecte préférentiellement les lymphocytes CD4⁺Vβ8⁺ qui représentent la population la plus importante des lymphocytes T « helper » (Möller et Jiang, 1996).

Contrairement aux lymphocytes de souris C57BL/6, nos résultats sur les lymphocytes de la souris SJL indiquent que ces lymphocytes matures et immatures

sont plus résistants à l'effet apoptotique du MeHgCl, qu'ils soient stimulés ou non par la Con A. Il a été démontré que l'auto-immunité observé chez les souris de lignées H-2^s était due à la présence d'auto-anticorps réactifs contre les molécules du soi (Bigazzi, 1997). Les études sur le mercure inorganique avaient montré une prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ chez les souris traitées au mercure (Jiang et Möller, 1995). Bien que nos résultats ne démontrent pas de façon évidente une stimulation des lymphocytes en provenance de la souris SJL, lorsque traités avec du MeHgCl, ces lymphocytes résistent à l'induction d'une apoptose post-stimulation, ce qui pourrait expliquer l'absence d'une immunosuppression et le développement d'une auto-immunité chez ces souris.

4.8 Conclusions

Nous avons démontré que le MeHgCl, à des faibles concentrations, induit l'apoptose chez les cellules spléniques et thymiques de la souris C57BL/6 connue pour développer de l'immunosuppression en présence de mercure. Tandis que chez les lymphocytes de la souris SJL, les résultats ont montré une plus grande résistance à l'apoptose induite par le MeHgCl, ce qui pourrait expliquer la sensibilité de ces souris au développement de l'auto-immunité.

L'apoptose induite par le MeHgCl se produirait donc, une étape surtout post-activation, c'est-à-dire que les lymphocytes seraient d'abord stimulés puis entreraient en apoptose, à condition d'exprimer la molécule Fas dans un état fonctionnel à leur surface membranaire. Afin de démontrer le rôle essentiel de la molécule Fas et du mécanisme d'activation par le MeHgCl chez les lymphocytes de la souris C57BL/6 et SJL, il faudrait quantifier le récepteur Fas fonctionnel à la surface des lymphocytes T et analyser l'action du MeHgCl sur le processus de signalisation intracellulaire de l'apoptose. Il est possible que les lymphocytes de la souris C57BL/6 possèdent plus

de récepteur Fas fonctionnel que ceux de la souris SJL ou que le MeHgCl stimule différemment les messagers intracellulaires.

De plus, la détermination *in vitro* de la sensibilité génétiquement déterminée des lymphocytes humains à la stimulation et à l'apoptose subséquente lorsque mis en contact avec des concentrations subtoxiques de MeHgCl pourrait permettre d'identifier les individus présentant des risques accrus à une exposition chronique à de faibles doses. Ainsi, il serait possible de mieux expliquer la relation qui existe entre l'incidence d'exposition au mercure chez l'humain et les sensibilités individuelles étant donné que l'exposition quotidienne à de faibles concentrations de mercure se fait continuellement comme, par exemple, via les amalgames dentaires ou en provenance de l'environnement. Il est fort possible que les états chez l'humain montrent aussi une différence génétique au développement de l'auto-immunité ou l'immunodéficience comme observé chez les animaux de laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

Abbas A. K., A. H. Lichtman et J. S. Pober. (1994). Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders Company, Philadelphia. p. 166-186.

Abbas A. K., K. M. Murphy et A. Sher. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383** : 787-792.

Abe, T., T. Haga et M. Kurokawa, (1975). Blockage of axoplasmic transport and depolymerisation of assembled microtubules by methylmercury. *Brain Res.*, **86**: 504-508.

Adkins B., C. Mueller, C. Y. Okada, R.A. Reichert, I. L. Weissman et G. J. Spangrude. (1987). Early events in T-cell maturation. *Ann. Rev. Immunol.*, **5**: 325-365.

Alian D. J., B. V. Harmon et J. F. R. Kerr. (1987). Cell death in spermatogenesis. Dans: Perspectives on mammalian cell death. éd. par C.S. Potten. Oxford University Press, England. p. 229.

Allen T. M., P. Williamson et R. A. Schlegel. (1988). Phosphatidylserine as a determinant of reticuloendothelial cell recognition of liposome models of the erythrocyte surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85 (21)** : 8067-8071.

Alnemri E. S. et G. Litwaek. (1989). Glucocorticoid-induced lymphocytolysis is not mediated by an induced endonuclease. *J. Biol. Chem.*, **264** : 4104-4111.

Al-Shahristani H. et K. M. Shihab. (1974). Variation of biological half-life of methylmercury in man. *Arch. Environ. Health*, **28**: 342-344.

Amati B., T. D. Littlewood, G. I. Evan et H. Land. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with max. *EMBO J.*, **12**: 5083-5087.

Amin-Zaki L., S. Elhassani, M. A. Majeed, T. W. Clarkson, R. A. Doherty et M. Greenwood. (1974). Intra-uterine methylmercury poisoning in Irak. *Pediatrics*, **54**: 587-595.

Andersen H.R. et O. Andersen. (1993). Effect of dietary α -tocopherol and β -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol. Toxicol.*, **73** : 192-201.

Anderson G., K. L. Anderson, L. A. Conroy, T. J. Hallam, N. C. Moore, J. J. T. Owen et E. J. Jenkinson. (1995). Intracellular signaling events during positive and negative selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J. Immunol.*, **154** : 3636-3643.

Anderson P. (1997). Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **61** (1) : 33-46.

Andjelic S., J. Drappa, E. Lacy, K. B. Elkon et J. Nikolic-Zugic. (1994). The onset of Fas expression parallels the acquisition of CD8 and CD4 in fetal and adult $\alpha\beta$ thymocytes. *Int. Immunol.*, **6** : 73-79.

Arends M.J., R. G. Morris et A. H. Wyllie. (1990). Apoptosis: The role of the endonuclease. *Amer. J. Pathol.*, **136** : 593-608.

Arends M. J. et A. H. Wyllie. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **32** : 223-54.

Askew D. S., R. A. Ashmun, B. C. Simmons et J. L. Cleveland. (1991). Constitutive *c-myc* expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*, **6** : 1915-1922.

Baixeras E., L. Bosca, C. Stauber, A. Gonzaler, A. C. Carrera, J. A. Gonzalo et A. Martiner. (1994). From apoptosis to autoimmunity : insights from the signaling pathways leading to proliferation or to programmed cell death. *Immunol. Rev.*, **142** : 53-91.

Bakir F., S.F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N. Y. al-Rawi, S. Tikriti, H. I. Dahahir, T. W. Clarkson, J. C. Smith, R. A. Doherty. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, **181** : 230-241.

Ballatori N. (1991). Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes. *Drug Metab. Rev.*, **23** : 83-132.

Bariety J. P., Druet, F. Laliberté et C. Sapin. (1971). Glomerulonephritis with-and 1C-globulin deposits induced in rats by mercuric chloride. *Am. J. Pathol.*, **65** : 293-302

Bates R.C., A. Buret, D. F. Van-helden, M. A. Horton et G. F. Burns. (1994). Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J. Cell Biol.*, **125** : 403-415.

Beatrice M. D., D. L. Stiers et D. R. Pfeiffer. (1984). The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **259** : 1279-1287.

Bencko V., V. Wagner, M. Wagnerova, U. Ondrejack. (1990). Immunological profiles in workers occupationnally exposed to inorganic mercury. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol.*, **34** : 9-15.

Berger N. A. et A. M. Skinner. (1974). Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions. *J. Cell. Biol.*, **61** : 45-55.

Bernardi P., D. M. Broekemeier et D. R. Pfeiffer. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore : a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenergetics Biomembranes*, **26** : 509-517.

Bernaudin J.F., E. Druet, P. Druet et R. Masse. (1981). Inhalation or ingestion of organic or inorganic mercurials produces auto-immune disease in rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **20** : 129-135.

Biancone L., G. Andres, H. Ahn, A. Lim, C. Dai, R. Noelle, H. Yagita, C. De Martino, I. Stamenkovic. (1996). Distinct regulatory roles of lymphocyte costimulatory pathways on T helper type-2 mediated autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, **183(4)** :1473-1481.

Bigazzi P.E. (1997). Autoimmunity caused by xenobiotics. *Toxicology*, **119** : 1-21.

Bit R. A., P. D. Davis, L.H. Elliot, W. Harris, C. H. Hill, E. Keech, H. Kumar, G. Lawton, A. Maw, J. S. Nixon, D. R. Vesey, J. Wadsworth et S. E. Wilkinson. (1993). Inhibitors of protein kinase C. III. Potent and selective bisindolymaleimides by conformational restriction. *J. Med. Chem.*, **36** : 21-29.

Blakley B. R., C. S. Sisodia et T. K. Mukkur. (1980). The effect of methylmercury, tetraethyl lead, and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **52** : 245-254.

- Bosshell M. J. McLeod, L. Walker, N. Hall, Y. Patel et D. Sansom. (1996). Effets of antigen presentation on superantigen-induced apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions in human T cells. *Immunology*, **87** : 586-592.
- Bouillaud F., I. Arechaga, P. S. Petit, S. Raimbault, C. Levi-Meyrueis, L. Casteilla, M. Laurent, E. Rial et D. Ricquier. (1994). A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *EMBO J.*, **13** : 1990-1997.
- Boumpas D. T., F. Paliogianni, E. D. Anastassiou et J. E. Balow. (1991). Glucocorticosteroid action on the immune system : molecular and cellular aspects. *Clin. Exp. Rheum.*, **9** : 413-423.
- Boyd R.-L. (1991). Towards an integrated views of thymopoiesis. *Immunol. Today*, **12** :239-245.
- Burrell R., D. K. Flaherty et L. J. Sauers. (1992). Toxicology of the immune system- A human approach. Van Nostrand Reinhold, New York. p.9-32.
- Cantoni O., R. M. Evans et M. Costa. (1982). Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and x-rays : DNA damage and glutathione depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108** : 614-619.
- Caron G. A., S. Poutala et T. T. Provost. (1970). Lymphocyte transformation induced by inorganic and organic mercury. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **37** : 76-87.

Castedo B.M., L. Pelletier, J. Rossert, R. Pasquier, H. Villarrooy et P. Druet. (1993). Mercury-induced autoreactive anti-class II T cell line protects from experimental autoimmune encephalomyelitis by the bias of CD8+ antiertgotypic cells in Lewis rats. *J. Exp. Med.*, **177** : 881-889.

Chance B., H. Sies et A. Boveris. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59** : 527-605.

Chang L.W. et H. Hartmann. (1992). Blood-brain barrier dysfunction in experimental mercury poisoning. *Acta Neuropathol.*, **19** : 122-128.

Charpentier B., P. Moullot, N. Faux, G. Manigand et D. Fries. (1981). Fonctions lymphocytaires T au cours d'une glomérulonéphrite extra-membraneuse induite par une intoxication chronique au mercure. *Néphrologie.*, **2** : 153-157.

Chensue S.W., P. D. Terebuth, D. E. Remick, W. E. Scales et S. L. Kunkel. (1991). In vivo biologic and immunohistochemical analysis of Interleukin-1 alpha, beta, and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia: kinetics, kupffer cell expression, and glucocorticoid effets. *Am. J. Pathl.*, **138** : 395-402.

Choi B. H. et R. C. Kim. (1984). The comparative effects of methylmercuric chloride and mercuric chloride upon DNA synthesis in mouse fetal astrocytes *in vitro*. *Exp. Mol. Pathol.*, **41** : 371-376.

Choi B. H., L. W. Lapham, L. Amin-Zaki et T. Saleem. (1978). Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning *in utero*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **37** : 719-733.

Chrest F. J., M. A. Buchholz., Y. O. Kim, T. K. Kwon et A. A. Nordin. (1995). Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice. *Cytometry*, **20** : 33-42.

Clarkson T.W. (1972). Recent advances in the toxicology of mercury with emphasis on the alkylmercurials. *CRC Critical Reviews in Toxicology.*, **1** : 203-234.

Clarkson T.W., L. Amin-Zaki et S. Al-Tikriti. (1976). An outbreak of methyl mercury poisoning due to consumption of contaminated grain. *Fed. Proc.*, **35** : 2395-2399.

Clipstone N. A. et G. R. Crabtree. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, **357** : 695-697.

Cohen I., C. Duker, V. A. Fadok et W. E. Sellins. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **10** : 267-293.

Cohen J. J. (1992). Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Seminars Immunol.*, **4 (6)** : 363-369.

Compton M.M., J. S. Haskill et J. A. Cidlowski. (1988). Analysis of glucocorticoid actions on rat thymocyte deoxyribonucleic acid by fluorescence-activated flow cytometry. *Endocrinology*. **122** : 2158-2164.

Coucouvani E.C., S. W. Sherwood, C. Carswell-Crumpton, E. G. Spack et P. P. Jones. (1993). Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp. Cell. Res.*, **209** : 238-247.

Crabtree G. R. et N. A. Clipstone. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T-lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.*, **63** : 1045-1083.

Daum J. R., D. M. Shepherd et R. J. Noelle. (1993). Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes-I. Effects on lymphocyte function. *Int. J. Immunopharmacol.*, **15 (3)** : 383-394.

Davies D.R. et H. Metzger. (1983). Structural basis of antibody function. *Annu. Rev. Immunol.* **1** : 63-86.

Deckwerth T.L. et E. M. Johnson. (1993). Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J. Cell Biol.*, **123** : 1207-1222.

Dialynas D.P., D. B. Wilde, P. Marrack, A. Pierres, K. A. Wall, W. Havran, G. Otten, M. R. Loken, M. Pierres, J. Kappler et F. W. Fitch. (1983). Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK-1.5: Expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen reactivity. *Immunol. Rev.*, **74** : 29-56.

Dieter M. P. (1969). Glucose metabolism in rat lymphatic tissues : Effect of acute and chronic exercise. *Life Sci.*, **8** : 459-468.

Dieter M. P. (1982). Methylmercury(II)-induced histone perturbations in nuclei isolated from calf thymus. *Mol. Pharmacol.*, **22** : 121-126.

Dieter M. P., M. I. Luster, G. A. Boorman, C. W. Jameson, J. H. Dean, J. W. Cox. (1983). Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **68 (2)** : 218-28

Dighiero G., J. Lymberi, J. C. Marie, S. Rouyes, G. S. Butler-Browne, R. G. Whalen et S. Avrameas. (1983). Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J. Immunol.*, **135** : 2267-2271.

Druet P., E. Druet, F. Potdevin et C. Sapin. (1978). Immune type glomerulonephritis induced by HgCl₂ in the Brown Norway rat. *Ann. Immunol.*, **129 C(6)** :777-92.

Durham H. D., S. Minotti et E. Caporicci, S. Chakrabarti et J.-C. Paniset. (1996). Sensitivity of platelet microtubules to disassembly by methylmercury. *J. Toxicol. Env. Health*, **48** : 57-69

Eisen H.N. (1990). *General immunology*. J.B. Lippicott Company, Philadelphia. p. 92.

El Azzouzi B., G. T. Tsangasis, O. Pellegrini, Y. Manuel, J. Benveniste et Y. Thomas. (1994). Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology*, **88 (1-3)** : 127-139.

Evan G.I., A. H. Willie, C. S. Gilbert, T. D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, X. M. Waters, L. Z. Penn et D. C. Hancock. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, **69** : 119-128.

Feldmann G. (1995). L'apoptose ou la mort cellulaire programmée. *Ann. Pathol.*, **15 (1)** : 92-109.

Fesus L., V. Thomazy, F. Autuori., M. P. Ceru, E. Tarcsa et M. Placentini. (1989). Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett.*, **245** : 150-154.

Fesus L., V. Thomazy et A. Falus. (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.*, **224** : 104-108.

Fowler B.A. et J. S. Woods. (1977). The transplacental toxicity of methyl mercury to fetal rat liver mitochondria. Morphometric and biochemical studies. *Lab. Invest.*, **36** : 122-130.

Fradelizi D. (1993). Le système immunitaire: Les lymphocytes. Dans: La réponse immunitaire cellulaire. éd. par N. Genetet. Editions Médicales Internationales, Paris. p. 258-261.

Friberg L., G. F. Nordberg et V. B. Vouk. (1979). Handbook on the toxicology of metals. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 503-530.

Friberg L., E. Skog et J. E. Wahlberg. (1961). Resorption of mercuric chloride and methylmercury dicyandiamide in guinea-pigs through normal skin and through skin pre-treated with acetone, alkylaryl-sulphonate and soap. *Acta Dermatovener.*, **41** : 40-52.

Friberg L. et J. Vostol. (1971). Mercury in the environment. Cleveland, Ohio, CRC Press.

Frykholm K.O. (1970). Exposure of dental personnel to mercury during work. A comparative study using advanced analytical methods. *Svenok Tandladk. T.*, **63** : 763-772.

Fuyuta M., T. Fujimoto et S. Hirata. (1978). Embryotoxic effects of methylmercuric chloride administered to mice and rats during organogenesis. *Teratology*, **18** : 353-366.

Gainer J. H. (1977). Effects of heavy metals and of deficiency of zinc on mortality rates in mice infected with encephalomyocarditis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **38** : 869-872.

Gao E. K., D. Lo, R. Cheney, O. Kanagawa et J. Sprent. (1988). Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporin A. *Nature*, **336** : 176-179.

Garvy B. A., W. G. Telford, L. E. King et P. J. Fraker. (1993). Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. *Immunology*, **79** : 270-277.

Gaworski C. L. et R. P. Sharma. (1978). The effect of heavy metals on [³H] thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46** : 305-313.

Genetet N. (1993). Le système immunitaire: Les lymphocytes. Dans: *Immunologie*. éd. par N. Genetet. Editions Médicales Internationales, Paris. p. 46-47^a, 69-82^b, 94-109^c, 148^d.

Gleichmann E., I. Kimber et I. F. H. Purchase. (1989). Immunotoxicology : suppressive and stimulatory effects to drugs and environmental chemicals on the immune system. *Arch. Toxicol.*, **63** : 257-273.

Goldman M., P. Druet et E. Gleichmann. (1991). T_H2 cells in systemic autoimmunity : insights from allogeneic diseases and chemically induced autoimmunity. *Immunol. Today*, **12** : 223-227.

Greenwood M. R., T. W. Clarkson, R. A. Doherty, A. H. Gates, L. Amin-Zaki, S. Elhassani et M. A. Majeed. (1978). Blood clearance half times in lactating and non-lactating members of a population exposed to methyl mercury. *Environ. Res.*, **16** : 48-54.

Griem P., E. Scholz, M. Turfeld, D. Zander, U. Wiesner, L. Dunemann et E. Gleichmann. (1997). Strain differences in tissue concentrations of mercury in inbred mice treated with mercuric chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144** : 163-170.

Gruenwedel D.W. et M. K. Cruikshank. (1979). Effect of methylmercury (II) on the synthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in HeLa S3 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **28** : 651-655.

Gruenwedel D.W. et B. Diaham. (1982). Methylmercury (II)-induced histone perturbations in nuclei isolated from calf thymus. *Mol. Pharmacol.*, **22** : 121-126.

Harada M. (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, **25** (1) : 1-24.

Harrington J. M.. (1974). Risk of mercurial poisoning in laboratories using volumetric gas analysis. *Lancet*, **1** : 86-87.

Herman A., J. W. Kappler, P. Marrak et A. M. Pullen. (1991). Superantigens : mechanisms of T-cell stimulation and role in immune response. *Ann. Rev. Immunol.*, **9** : 745-772.

Heusel J. W., R. L. Wesselschmidt, S. Shresta, J. H. Russell et J. Ley. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, **76** : 977-987.

Hill E. F. et J. H. Soares. (1987). Oral and intramuscular toxicity of inorganic and organic mercury chloride to growing quail. *J. Toxicol. Environ. Health*, **20** : 105-116.

Hirayama K. (1975). Transport mechanism of methylmercury-intestinal absorption, biliary excretion and distribution of methylmercury. *Kumamoto Med. J.*, **28** : 151-163.

- Hirayama K. (1980). Effect of amino acids on brain uptake of methyl mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55** : 318-323.
- Hirokawa K. et Y. Hayashi. (1980). Acute methyl mercury intoxication in mice-effect on the immune system. *Acta Pathol. Japon.*, **30** (1) :23-32.
- Hirsh F., J. Couderc, C. Sapin, G. Fournie et P. Druet. (1982). Polyclonal effect of HgCl₂ in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.*, **12** : 620-625.
- Holmes K. L. et H. C. Morse. (1988). Murine hematopoietic cell surface expression. *Immunol. Today*, **9** (11) : 344-350.
- Horecker B. L. et H. H. Hiatt. (1958). Pathways of carbohydrate metabolism in normal and neoplastic cells. *New Engl. J. Med.*, **258** : 177-184.
- Hultman P. et S. Eneström. (1987). The induction of immune complex deposits in mice by peroral and parenteral administration of mercuric chloride : strain dependent susceptibility. *Clin. Exp. Immunol.*, **67** : 283-292.
- Hultman P. et S. Eneström. (1989). Mercury induced B cell activation and antinuclear antibodies in mice. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **28** : 143-150.
- Hultman P., S. Eneström, K. M. Pollard et E.M. Tan. (1989). Anti-fibrillar autoantibodies in mercury-treated mice. *Exp. Immunol.*, **78** : 470-477.
- Hultman P. et S. Eneström. (1992). Dose-response studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113** : 199-208.

Hultman P. et U. Johansson. (1991). Strain differences in the effect of mercury on murine cell-mediated immune reactions. *Food Chem. Toxicol.*, **29 (9)** : 633-638.

Hultman P., U. Johansson et F. Dagnaes-Hansen. (1995). Murine mercury-induced autoimmunity : the role of T-helper cells. *J. Auto-immunity*, **8 (6)** : 809-823.

Ilbäck N.G. (1991). Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer (NK) cell activity in the mouse. *Toxicology*, **67** : 117-124.

Incskip M.J. et J. K. Piotrowski. (1985). Review of the health effects of methylmercury. *J. Appl. Toxicol.*, **5** : 113-133.

Ishida Y., T Ichimura, H. Sumi, T. Horigome et S. Omata. (1997). Methylmercury alters the tyrosination status of tubulin in the brains of acutely intoxicated rats. *Toxicology*, **122** : 171-181.

Itoh N., S. Yonehara, A. Ishi, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto et S. Nataga (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66** : 233-243.

Itoh N., et S. Nataga. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human fas antigen. *J. Biol. Chem.*, **268** : 10932-10937.

James T. N. (1994). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation*, **90** : 556-571.

Jemelin M. et J. Frei. (1970). Leukocyte energy metabolism. III. Anaerobic and aerobic ATP production and related enzymes. *Enzym. Biol. Clin.*, **11** : 289-323.

- Jiang Y. et G. Möller. (1995). In vitro effects of HgCl₂ on murine lymphocytes. I. Preferable activation of CD4⁺ T cells in a responder strain. *J. Immunol.*, **154** : 3138-3146.
- Jiang Y. et G. Möller. (1996). In vitro effects of HgCl₂ on murine lymphocytes. II. Selective activation of T cells expressing certain V_β TCR. *International Immunol.* **8 (11)** : 1729-1736.
- Jouvin-Marche E., S. Trede, A. Bandeira, A. Tomas, E. Y. Loh et P. A.Cazenave. (1989). Different large deletions of T cell receptor V beta genes in natural populations of mice. *European J. Immunol.*, **19 (10)** : 1921-1926.
- Junghans RP. (1983). A review of the toxicity of methylmercury compounds with application to occupational exposures associated with laboratory uses. *Environmental Res.*, **31 (1)** :1-31.
- Kaiser N. et I. S. E. Delman. (1977). Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74 (2)** : 638-642.
- Kawabe Y. Ochi A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of V beta 8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature*, **49 (6306)** :245-248.
- Kerr J. F. R., A. H. Wyllie et A. R. Currie. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, **26** : 239-57.
- Kibukamusoke J.W., D. R. Davies et M. S. R. Hutt. (1974). Membranous nephropathy due to skinlightening cream. *Br. Med. J.*, **2** : 646-647.

King LB. et J. D. Ashwell. (1995). Thymocyte and cell apoptosis : is all death created equal ? *Thymus*, **23** : 231-257.

Klas C. K. M. Debatin, R. R. Jonker et P. H. Krammer. (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int. Immunol.*, **5 (6)** : 625-630.

Koerker R.L. (1980). The cytotoxicity of methylmercuric hydroxide and colchicine in cultured mouse neuroblastoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53** : 458-469

Koller L. D. (1975). Methylmercury: Effect on oncogenic and nononcogenic viruses in mice. *Am. J. Vet. Res.*, **36** : 1501-1504.

Koller L. D. (1980). Immunotoxicology of heavy metals. *Int. J. Immunopharmacol.*, **2 (4)** : 269-279.

Koller L. D., J. H. Exon et J. A. Brauner. (1977). Methylmercury: Decreased antibody formation in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155** : 602-604.

Komulainen H. et J. Tuomisto. (1981). Effects of heavy metals on monoamine uptake and release in brain synaptosomes and blood platelets. *Neurobehavior. Toxicol. Teratol.*, **4 (6)** : 647-649.

Koskinen P. J. et K. Alitalo. (1993). Role of *myc* amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. *Cancer Biol.*, **4** : 3-12.

Kosower M.S. et E. M. Kosower. (1983). Glutathione and cell membrane thiol status. Dans : *Functions of glutathione : Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects*. Édité par : A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren et B. Mannervik. Raven Press, New York. p. 307-315.

Kostoff D. (1940). Atypical growth, abnormal mitosis and polyploidy induced by ethyl-mercury-chloride. *Phytopathol. Z.*, **23** : 91-96.

Krammer P. H., I. Behrmann., P. Daniel, J. Dhein et K. M. Debatin. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, **6** : 279-289.

Kroczek R. A. K. C. Gunter, R. N. Germain et E. M. Shevach. (1986). Thy-1 functions as a signal transduction molecule in T lymphocytes and transfected B lymphocytes. *Nature*. **322 (6075)** :181-184.

Kroemer G., P. Petit, N. Zamzami, J. L. Vayssiere et B. Mignotte. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, **9** : 1277-1287.

Lam M., G. Dubyak et C. W. Distelhorst. (1993). Effect of glucocorticosteroid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma. *Molecular Endocrinol.*, **7 (5)** : 686-693.

Lauwerys R. (1992). Le mercure. Dans: *Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle*. 3^e édition. Masson, Montréal. p. 170-180.

Lawrence F., D. Mufxindki, U. Tufogdky et T. Estnrt. (1987). Mechanisms of metal-induced autoimmunity. Dans: *Immunotoxicology*. éd. par A. Berlin, J. Dean, M.H. Draper, E.M.B. Smith et F. Sprefacio, Marinus Nijhoff, Dordrecht, p. 293-307.

Ledbetter J. A. et L. A. Herzenberg. (1979). Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.*, **47** : 63-90.

Ledouarin N. M., R. Dieterlen-Lievre et P. D. Oliver. (1984). Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am. J. Anatomy*, **170** : 261-269.

Lengle E. E., N. C. Gustin, F. Gonzalez, L. A. Menahan et R. G. Kemp. (1978). Energy metabolism in thymic lymphocytes of normal and leukemic AKR mice. *Cancer Res.*, **38** : 1113-1119.

Lennon A. M., J. Francon., A. Felluus et J. Nunez. (1980). Rat, mouse and guinea pig brain development and microtubule assembly. *J. Neurochem.*, **35** : 804-813.

Letonturier Ph. (1996). *Immunologie générale*. 5^e éd., Masson, Paris. p. 36.

Levine A. J., J. Momand et C. A. Finlay. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351** : 453-457.

Lindberg S., P. Stokes, E. Goldberg et C. Wren. (1987). Group report: Mercury. Dans: *Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment*. éd. par T.W. Hutchinson et K.M. Meema. John Wiley and Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, p. 17-34.

Ling N. R. et J. E. Kay. (1975). *Lymphocyte stimulation*. North-Holland, Amsterdam.

Lithgow T., R. Van Driel, J. F. Bertram et A. Strasser. (1994). The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Diff.*, **5** :411-417.

Lomgren H. et B. Andersson. (1971). Characteristics of the immunocompetent cells in the mouse thymus : cell population changes during cortisone-induced atrophy and subsequent regeneration. *Cell. Immunol.*, **1** : 545-560.

Magos L. (1987). The absorption, distribution, and excretion of methyl mercury. Dans: The toxicity of methyl mercury. éd. par C.U. Eccles et Z. Annau. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. p. 24-44.

Magos L., T. W. Clarkson et J. Allen (1978). The interrelationship between non-protein bound thiols and the biliary excretion of methylmercury. *Biochem. Pharmacol.*, **27** : 2203-2208.

Magos L., G. C. Peristianis, T. W. Clarkson, A. Brown, S. Preston et R. Snowden. (1981). Comparative study of the sensitivity of male and female rats to methylmercury. *Arch. Toxicol.*, **48** : 11-20.

Marty M. S. et W. D. Atchison. (1997). Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147 (2)** : 319-330.

Matsumoto H., G. Koya et T. Takeuchi. (1965). Fetal Minamata disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **24** : 563-574.

McKay S. J., J. N. Reynolds et W. J. Racz. (1986). Differential effects of methylmercuric chloride and mercury chloride on the L-glutamate and potassium evoked release of [³H]dopamine from mouse striatal slices. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **64** : 656-660.

Memon S. A., M. B. Moreno, D. Petrak et C. M. Zacharchuk. (1995). Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J. Immunol.*, **155** : 4644-4652.

Michaelson J.H., J. P. McCoy, P. Hirszel et E. Bigazzi. (1985). Mercury-induced autoimmune glomerulonephritis in inbred rats. *Surv. Synth. Pathol. Res.*, **4** : 401-411.

- Miller C. T., D. Krewski et L. Tryphonas (1985). Methylmercury-induced mitochondrial DNA synthesis in neural tissue of cats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5** : 251-264.
- Mirtcheva J., C. Pfeiffer, J. A. De Bruijn, F. Jacquesmart et E. Gleichmann. (1989). Immunological alterations inducible by mercury compounds. III. H-2A acts as an immune response and H-2^E as an immune suppression locus for HgCl₂-induced antinucleolar antibodies. *Eur. J. Immunol.*, **12** : 2257-2261.
- Miura K. et N. Imura. (1987). Mechanism of methylmercury cytotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, **18 (3)** : 161-188.
- Miura K., K. Suzuki et N. Imura. (1978). Effects of methylmercury on mitotic mouse glioma cells. *Environ. Res.*, **17** : 453-471.
- Miyawaki T., T. Vehera, R. Nibu, T. Tsuji, A Yachie, S. Yonehara et N. Taniguchi. (1993). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J. Immunol.*, **149(11)** :3753-3758.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65 (1-2)** : 55-63.
- Mottet K., C. M. Shaw et T. M. Burbacher. (1987). The pathological lesions of methyl mercury intoxication in monkeys. Dans: *The toxicity of methyl mercury*. éd. par C.U. Eccles et Z. Annau. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. p.78.
- Nagata S. (1994). Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: fas ligand and fas. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **345** : 281-287.

Nakada S. K. Inoue, S. Nojima et N. Imura. (1978). Change in permeability of liposomes caused by methylmercury and inorganic mercury. *Chemico-Biological Interactions*, **22 (1)** :15-23

Nakajima T., S. Ichii, J. I. Furuyama et T. Tamaoki. (1996). A new alternative splice variant of the mouse Fas antigen with a deletion in the N-terminal portion of the extracellular domain. *Life Sciences*, **58 (9)** : 761-768.

Nakashima I., M.-Y. Pu, A. Nishizaki, I. Rosila, L. Ma, Y. Katano, K. Ohkusu, S. M. J. Rahman, K.-I. Isobe, M. Hamaguchi et K. Saga. (1994). Redox mechanism as alternative to ligand binding for receptor activation delivering disregulated cellular signals. *J. Immunol.*, **152** : 1064-1071.

Nakatsuru S., J. Oohashi, H. Nozaki, S. Nakada et N. Imura. (1985). Effect of mercurials on lymphocyte functions in vitro. *Toxicology*, **36** : 297-305.

Nakayama K. et H. Nakauchi. (1993). Cyclosporin A inhibits the decrease of CD4 and CD8 expression induced by PKC activation. *Int. Immunol.*, **5** : 419,-426.

Nakazawa N., F. Makino et S. Okada. (1975). Acute effects of mercury compounds on cultured mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.*, **24** : 489-493

National Academy of Sciences. (1978). An assessment of mercury in the environment. Washington, DC, National Academy of Sciences, National Research Council.

Nishimura Y., A. Ishii, Y. Kobayashi, Y. Yamasaki et S. Yonehara.. (1995). Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J. Immunol.*, **154** :4395-4403.

Nossal G. J. V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*, **76** : 229-239.

Odaka C., H. Kizaki et T. Tadakuma, (1990). T cell receptor-mediated DNA fragmentation and cell death in T cell hybridomas. *J. Immunol.*, **144** (6) : 2096-2101.

Ogaswara J., R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda et S. Nagata. (1993). Lethal effect of the anti-fas antibody in mice. *Nature*, **364** : 806-809.

Ohyama H., T. Yamada et I. Watanabe (1981). Cell volume reduction associated with interphase death in rat thymocytes. *Radiat. Res.*, **85** : 333-339.

Oldendorf W. H. (1971). Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines and hexoses after arterial injection. *Amer. J. Physiol.*, **221** : 1629-1639.

Ortega H. G., M Lopez, J. E. Salvaggio, R. Reimers, C. Hsiao-Lin C., J. E. Bollinger et W. George. (1997). Lymphocyte proliferative response and tissue distribution of methylmercury sulfide and chloride in exposed rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **50** : 605-616.

Pallardy M., H. Lebrech, R. Roger, C. Blot et C. Bohuon. (1995). Immunotoxicité in vitro. Dans : *Toxicologie cellulaire in vitro-méthodes et applications*. Éd. par : M. Adolphe, A. Guillouzo et F. Marano. Édition Inserm, p. 285-304.

Passow W. H., A. Rothstein et J. W. Clarkson. (1961). The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Rev.*, **13** : 185-224.

Pelletier L., M. Castedo, B. Bellon et P. Druet. (1994). Mercury and autoimmunity. Dans : *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Éd. par J.H. Dean, M.I. Luster, A.E. Munson et I. Kimber. Raven Press, New York, p. 539-552.

Pelletier L., R. Pasquier., J. Rossert et P. Druet. (1987). HgCl₂ induces nonspecific immunosuppression in Lewis rats. *Eur. J. Immunol.*, **17** : 49-54.

Perandones C. E., V. A. Illera, D. Peckham, L. L. Stunz et R. F. Ashman. (1993). Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen T cells. *J. Immunol.*, **151** : 3521-3529.

Pfeiffer C., J. Stein, S. Southwood, H. Ketelaar, A. Sette et K. Bottomly. (1995). Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J. Exp. Med.*, **181** : 1569-1574.

Pietsch P., H. W. Vohr, K. Degitz et E. Gleinmann. (1989) Immunological alterations inducible by mercury compounds. II. HgCl₂ and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **90** : 47-53.

Pitzalis C., N. Pipitone, G. Bajocchi, M. Hall, N. Goulding, A. Lee, G. Kingsley, J. Lanchbury et G. Panayi. (1997). Corticosteroids inhibits lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion : an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J. Immunol.*, **158** : 5007-5016.

Pollard K. M. et P. Hultman. (1997). Effects of mercury on the immune system. *Metal Ions Biol. Syst.*, **34** : 421-440.

Popescu H.I. (1978). Poisoning with alkylmercury compounds (Letter to the editor). *Br. Med. J.*, **1** : 1347.

Potten C. S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and γ irradiation. *Nature*, **269** : 518-521.

- Prasad K. N., M. Nayak., J. Edward-Prasad, S. Cummings et K. Pattisapu (1980). Modification of glutamate effects on neuroblastoma cells in culture by heavy metals. *Life Sci.*, **27** : 2251-2259.
- Rabenstein D. L. et C. A. Evans. (1978). The mobility of methyl mercury in biological systems. *Bioinorg. Chem.*, **8** : 107-114.
- Reardon C. L. et D. O. Lucas. (1987). Heavy-metal mitogenesis: Zn^{++} and Hg^{++} induce cellular cytotoxicity and interferon production in murine T lymphocytes. *Immunobiol.*, **175** ; 455-469.
- Refsvik T. et T. Norseth. (1975). Methyl mercuric compounds in rat bile. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **36** : 67-68.
- Reichlin M. (1995). Cell injury mediated by autoantibodies to intracellular antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **76** : 215-219.
- Reif A. E. et J. M. V. Allen. (1964). The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J. Exp. Med.*, **120** : 413-433.
- Reuter R., G. Tessars, H.-W. Vohr, E. Gleichman et R. Lührmann. (1989). Mercuric chloride induces autoantibodies against U3 small nuclear ribonucleoprotein in susceptible mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (1) : 237-245.
- Rieux-Laucat R., F. Le Deist, C. Hivroz, L. A. G. Roberts, K. M. Debatin, A. Fisher et J. P. De Villartay. (1995). Mutations in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. **268** : 1347-1349.
- Robinson C. J., A. A. Abraham et T. Balazs. (1984). Induction of anti-nuclear antibodies by mercuric chloride in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **58** : 300-306.

Roitt I., J. Brostoff et D. Male. (1996). The lymphoid system. Dans: Immunology, 4e éd., Mosby, London. p. 1.4^a, 3.1-3.9^b, 5.2-5.3^c, 21.1^d

Romagnani S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. Immunology Today, **18 (6)** : 263-266.

Rose N. R. et J. B. Margolick. (1992). The immunological assessment of immunotoxic effects in man. éd. par D.S. Newcombe, N.R. Rose et C. Bloom, Raven Press, Ltd., New York.

Rozyrkowa D. et B. Raczkewicz. (1977). Destructive effect of methylmercury chloride on human mitoses in living cells *in vitro*. Mutat. Res., **56** : 185-191.

Russell J. H., B. Rush, C. Weaver et R. Wang. (1993). Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90** : 4409-4413.

Sager P. R. (1988). Selectivity of methyl mercury effects on cytoskeleton and mitotic progression in cultured cells. Toxicol. Appl. Pharmacol., **94** : 473-486.

Sager P. R., R. A. Doherty et J. B. Olmsted. (1983). Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and *in vitro*. Exp. Cell Res., **146** : 127-137.

Saoudi A., J. Kuhn, K. Huygen, Y. De Kozak, T. Velu, M. Goldman et P. Druet. (1993). Role of the TH1-TH2 balance in the development of autoimmunity in rats. Transpl. Proceed., **25 (5)** : 2824-2825.

Sapin C., C. Mandet, E. Druet, G. Günther et P. Druet. (1981). Immune complex type disease induced by HgCl₂ : genetic control of susceptibility. Transplant. Proc., **13** : 1404-1406.

Sass J. E. (1937). Histological and cytological studies of ethyl mercury phosphate poisoning in corn seedlings. *Phytopathology*, **27** : 95-99.

Sasser L. B., G. E. Jarboe, B. K. Walter et B. J. Kelman. (1978). Absorption of mercury from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **157** : 57-60.

Scherrer B. (1984). *Biostatistique*. Éd. par G. Morin. Chicoutimi, Québec, Canada. p. 85 et 408.

Schwartz R. H. (1992). Costimulation of T-lymphocytes : the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in IL-2 production and immunotherapy. *Cell*, **71** : 1065-1068.

Schwartzman R. A. et J. A. Cidlowski. (1993). Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*, **14** : 133-149.

Scott D. W., T. Grdina et Y. Shi. (1996). T cells commit suicide, B cells are murdered. *J. Immunol.*, **156** : 2352-2356.

Seco J. M. (1987). Big mercury deposit found in Spain. *Financial Times*, 30 October 1987.

Sellins K. S. et J. J. Cohen. (1987). Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.*, **139** : 3199-3206.

Sellins K. S. et J. J. Cohen. (1991). Cytotoxic T lymphocytes induce different types of DNA damage in target cells of different origins. *J. Immunol.*, **147** : 795-803.

Sen S. (1992). Programmed cell death: Concept, mechanism and control. *Biol. Rev.*, **67** : 287-319.

Shamoo A. E., D. H. MacLennan et M. E. Eldefrawi. (1976). Differential effects of mercurial compounds on excitable tissues. *Chem. Biol. Interact.*, **12**: :41-52.

Shenker B. J., P. Berthold, S. Decker, J. Mayro, C. Rooney, L. Bitale et I. M. Shapiro. (1992). Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **14** : 555-577.

Shenker, B. J., P. Berthold, C. Rooney, L. Vitale, K. DeBolt et I.M. Shapiro. (1993). Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. *Immunopharm. Immunotoxicol.*, **15 (1)** : 87-112.

Shenker B. J., S. Datar, K. Mansfiels et I. M. Shapiro. (1997). Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143** : 397-406.

Shi Y. F., B. M. Sahai et D. R. Green. (1989). Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature*, **339 (6226)**: 625-626.

Shi Y., J. M. Glynn, L. J. Guilbert, T. G. Cotter, R. P. Bissonnette et D. R. Green. (1992). Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, **257** : 212-214.

Shortman K., A Wilson, M. Pearse, P. Gallagher et R. Scollay. (1988). Mouse strain differences in subset distribution and T cell antigen receptor expression among CD4-CD8- thymocytes. *Immunol. Cell Biol.*, **66 (5-6)** :423-33.

Soleo L., A. Vacca, L. Vimercati, S. Bruno, M. Di Loreto, C. Zocchetti, R. Di Stefano, G. Candilio, G. Lasorsa, G. Franco et V. Foa. (1997). Minimal immunological effects on workers with prolonged low exposure to inorganic mercury. *Occ. Env. Med.*, **54** : 437-442.

Somjen G. G., S. P. Herman, R. Klein, W. H. Brubaker, J. K. Brinder., J. K. Goodrich, M. R. Krigman et J. K. Haseman. (1973). The uptake of methylmercury (^{203}Hg) in different tissues related to its neurotoxic effects. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **187** : 602-611.

Steinwall O. et Y. Olsson. (1969). Brain uptake of C14-cycloleusine after damage to blood-brain barrier by mercuric ions. *Acta Neurol. Scand.*, **45** : 369-375.

Stiller-Winkler R., T. Radaszkewich et E. Gleichmann. (1988). Immunopathological signs in mice treated with mercury compounds—I. Identification by the popliteal lymph node assay of responder and nonresponder strains. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10** : 475-484.

Stonard M. D., B. V. Chater, D. P. Duffield, J. J. O'Sullivan et C. M. Lockwood. (1983). Circulating immune complexes in individuals occupationally exposed to mercury vapour. Dans : *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals*. éd. par S.S. Brown et J. Savory. Academic Press, New York. p. 135-148.

Suda T. et S. Nagata. (1994). Purification and characterization of the fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, **179** : 873-879.

Suda T., T. Takahashi, P. Golstein et S. Nagata. (1993). Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75** : 1169-1178.

Suda I. et H. Takahashi. (1986). Enhanced and inhibited biotransformation of methyl mercury in the rat spleen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82** : 45-52.

Takeuchi T. (1968). Pathogenesis of Minamata disease. Dans: *Minamata disease*. éd. par M. Kutsuma. Kumamoto Univ. Press, Kumamoto, Japan. p. 141-228.

Takizawa Y. (1979). Epidemiology of mercury poisoning. Dans: *The biogeochemistry of mercury in the environmental*. éd. par J. Nriagu. Elsevier/North-Holland and Biomedical Press, Amsterdam. p. 325-365.

Tan M. (1989). Antinuclear antibodies : Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.*, **44** : 93-151.

Tan X.-X., C. Tang, A. F. Castoldi, L. Manzo et L.G. Costa. (1993). Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, **38 (2)** : 159-170.

Task Group on Metal Accumulation. (1973). Accumulation of toxic metals with special reference to their absorption, excretion, and biological half-times. *Env. Phys. Biochem.*, **3** : 65-107.

Telford W. G., L. E. King et P. J. Fraker. (1991). Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif.*, **24** : 447-459

Tenniswood M., D. Taillefer, J. Lakins, R. Guenette, M. Mooibroek, L. Daehlin et J. Welsh. (1994). Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. Dans: *Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease*. éd. par L.D. Tomei et F.O. Cope. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p. 283-311.

Toyonaga B., Y. Yanagi, N. Suciú-Roca, M. Minden et T. W. Mak (1984). Rearrangements of T cell receptor gene YT35 in human DNA from thymic leukemia T cell lines and functional T cell clones. *Nature*, **311** : 385-387.

Trauth B. C., D. Klas, A. M. J. Peters, S. Matzuku, P. Möller, W. Falk, K.-M. Debatin et P. H. Krammer. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245** : 301-305.

Trauth B. C., C. Klas, A. M. Peters et S. Matzku, P. Möller, W. Falk, K. M. Debatin et P. H. Krammer. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245** : 301-305.

Trump B. F. et I. K. Berezesky. (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.*, **9** : 219-228.

Vacca A., M. P. Felli, A. R. Farina, S. Martinotti, M. Maroder, I. Screpanti, D. Meco, E. Petrangeli, L. Freti et A. Gulino. (1992). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin-2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J. Ex. Med.*, **175** : 637-646.

Vallee B. L. et D. D. Ulmer. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.*, **41 (10)** : 91-128.

Vaux D. L., G. Haecker et A. Strasser. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, **76** : 777-779.

Vogel D. G., R. L. Margolis et N. K. Mottet. (1985). The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80** : 473-486.

Vogel D. G., P. S. Rabinovitch et N. K. Mottet. (1986). Methylmercury effects on cell cycle kinetics. *Cell Tissue Kinet*, **19** : 227-242.

Von Boehmer H. (1991). Positive and negative selection of the $\alpha\beta$ T-cell repertoire in vivo. *Curr. Opin. Immunol.*, **3** (2) : 210-215.

Vuitton D. A. (1990). *Immunologie*. Medsi/McGraw-Hill, Paris. p.16-23.

Watanabe-Fukunaga R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins et S. Nagata. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. **356** : 314-317.

Weening J. J., P. J. Hoedemaeker et W. W. Bakker. (1981). Immunoregulation and anti-nuclear antibodies in mercury-induced glomerulopathy in the rat. *Clin. Exp. Immunol.*, **45** (1) : 64-71.

Weiss A., J. Imboden, D. Shoback et J. Stobo. (1984). Rôle of T3 surface molecules in human T-cell activation : T3 dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81** (13) : 4169-4173.

Wesselborg S. O. Janssen et D. Kabelitz. (1993). Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J. Immunol.*, **150** (10) : 4338-4345.

White J., A. Herman, A. M. Pullen, R. Kubo, J. W. Kappler et P. Marrack. (1989). The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B : stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*, **56** : 27-35.

World Health Organization. (1976). Mercury. Environment programme and the world health organization. *Environmental Health Criteria 1*, Geneva. p. 5-131.

World Health Organization. (1989). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, World Health Organization.

Wright S. C., Q. S. Wie, J. Zhong, H. Zheng, D. H. Kinder et J. W. Larrick. (1994). Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J. Exp. Med.*, **180** : 2113-2123.

Wyllie A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284** : 555-556.

Wyllie A. H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast. Rev.*, **11** : 95-103.

Wyllie A. H., J. F. R. Kerr et A. R. Currie. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68** : 251-306.

Wyllie A. H., J. F. R. Kerr, I. A. M. Macaskill et A. R. Currie. (1973). Adrenocortical cell deletion: The role of ACTH. *J. Pathol.*, **111** : 85-94.

Yui S., M. Mikami, K. Tsurumaki et M. Yamazaki. (1997). Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. *J. Leukocyte Biol.*, **61 (1)** : 50-57.

Zamzami N., P. Marchetti, M. Castedo, D. Decaudin, A. Macho, T. Hirsch, S. A. Susin, P. X. Petit, B. Mignotte et C. Kroemer. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.*, **182** : 367-377.

Zhou T., H. Bluethmann, J. Eldridge, M. Brockhaus, K. Berry et J. D. Mountz. (1991). Abnormal thymocyte development and production of autoreactive T cells in T cell receptor transgenic autoimmune mice. *J. Immunol.*, **147** : 466-474.

Zhou T., H. Bluethmann, J. Eldridge, M. Brockhaus, K. Berry et J. D. Mountz. (1993). Origin of CD4-CD8-B220⁺ T cells in MRL-*lpr/lpr* mice. *J. Immunol.*, **150** : 3651-3667.

Zubiaga A.M., M. E. Munoz et B. T. Huber. (1992). IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Immunol.*, **149** : 107-112.

Zucker R.M., H. Elstein, D. J. Thomas et J. M. Rogers. (1994). Tributyltin and dexamethasone induce apoptosis in rat thymocytes by mutually antagonistic mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127** : 163-170.

ANNEXE

Liste des communications qui découlent de travail :

1. Lamontagne L., S. Chakrabarti et **S. R. Pheng**. (1998). Autoimmunity induced by methylmercury may be related to a blockage of apoptosis in the T cell maturation process. **Toxicological Sciences**, supplement **42 (1-5)** : 7.
2. **Pheng S. R.**, S. Chakrabarti et L. Lamontagne. (1998) Immunodeficiency induced by methylmercury in C57BL/6 mice is related to increase of Fas-mediated apoptosis in splenic and thymic CD4+ T cells. **Toxicological Sciences**, supplement **42 (1-5)** : 272.
3. **Pheng S. R.**, S. Chakrabarti et L. Lamontagne. (1997). Methylmercury increases apoptosis in splenic and thymic T cells sub-populations in mice. **Congrès Annuel de Toxicologie du Canada**, Montréal, décembre.
4. **Pheng S. R.**, S. Chakrabarti et L. Lamontagne. (1997). Effets du chlorure de méthylmercure à des concentrations très faibles sur les lymphocytes T murins en culture. Congrès Annuel de l'**ACFAS**. Université du Québec à Trois-Rivières, Canada. Mai

REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur, Dr. Saroj Chakrabarti, pour les connaissances en toxicologie et les conseils qu'il m'a apportés tout au long de mes études en maîtrise, et à ma codirectrice, Dr. Lucie Lamontagne pour les connaissances en immunologie appliquées à la toxicologie et l'encadrement qu'elle m'a fourni dans son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier M. Christian Pagé et Mme Zahra Nacer pour leur aide et leurs connaissances techniques tout au long de la réalisation de mon projet de recherche.