



HAL
open science

Mécanisme d'action de l'immunotoxicité induite par les hydrocarbures polycycliques aromatiques

Philippe Saas

► **To cite this version:**

Philippe Saas. Mécanisme d'action de l'immunotoxicité induite par les hydrocarbures polycycliques aromatiques. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1997. Français. NNT : 1997METZ036S . tel-01777219

HAL Id: tel-01777219

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777219v1>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

THESE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT DE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

SOUTENUE LE 2 DECEMBRE 1997

" MECANISME D'ACTION DE L'IMMUNOTOXICITE
INDUITE PAR LES HYDROCARBURES
POLYCYCLIQUES AROMATIQUES"

présentée par Philippe SAAS

JURY

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19970765
Cote	S/M3 97/36
Loc	Maganin

President : - Madame le Professeur P. VASSEUR

Membres :

- Madame le Docteur I. FLORENTIN (rapporteur)
- Madame le Docteur J. WIELS (rapporteur)
- Monsieur le Professeur D. MARZIN
- Monsieur le Professeur M. PALLARDY (directeur de Thèse)
- Monsieur le Docteur J.-F. SAVOURET

A Céline, Matéo, Lison et Louna

Table des matières

Avant propos	page 2
Chapitre 1 : Hydrocarbures polycycliques aromatiques et système immunitaire	page 8
A) Les hydrocarbures polycycliques aromatiques	page 8
1- Structure et exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques	page 8
2- Métabolisme des hydrocarbures polycycliques aromatiques	page 11
3- Récepteurs des hydrocarbures polycycliques aromatiques : la protéine Ah	page 15
4- Effets toxiques autres qu'immunotoxiques liés à l'exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques	page 17
4-1 Propriétés cancérogènes	page 18
4-2 Effets toxiques sur la reproduction	page 23
4-3 Toxicité hématologique	page 24
B) Immunotoxicité liée aux hydrocarbures polycycliques aromatiques	page 25
1- Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire	page 25
1-1 Les organes lymphoïdes	page 25
1-2 L'immunité non spécifique	page 26

1-3 L'immunité spécifique	page 30
2- Déficits de l'immunité spécifique et conséquences pathologiques	page 45
3- Homéostasie calcique et réponse immunitaire	page 48
3-1 Les sites calciques dans le lymphocyte T	page 48
3-2 Mobilisation du calcium intracellulaire	page 49
3-3 Entrée capacitive de calcium	page 51
4- Hydrocarbures polycycliques aromatiques et immunosuppression	page 54
4-1 Effets sur la réponse immunitaire non spécifique	page 58
4-2 Effets sur la réponse immunitaire spécifique	page 59
4-3 Conséquences de l'immunosuppression induite par les hydrocarbures polycycliques aromatiques	page 71
Chapitre 2 : Objectifs de l'étude	page 76
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	page 79
1- Molécules étudiées	page 79
2- Isolement des lymphocytes murins et humains	page 79
3- Etude de la prolifération lymphocytaire	page 82
4- Dosage de l'interleukine-2	page 88
5- Mesure de l'expression des récepteurs de haute affinité	

pour l'IL-2	page 89
6- Mesure de la production d'inositol-1, 4,5-triphosphate	page 90
7- Mesure du calcium intracellulaire par cytométrie	page 91
8- Evaluation de la cytotoxicité spontanée (fonction natural killer (NK))	page 94
9- Evaluation de la cytotoxicité LAK (lymphokine Activated Killer)	page 97
10- Etude de la fonction lymphocytes T cytotoxiques (CTL)	page 98
11- Analyse statistique des résultats	page 100
Chapitre 4 : Résultats	page 101
1ère PARTIE : Effet du diméthyl-7, 12- benz(a)anthracène sur l'activation des lymphocytes T murins et humains : interaction avec l'homéostasie calcique	page 101
1- Effet sur l'activation lymphocytaire des lymphocytes T murins	page 101
2- Effet sur la production d'interleukine-2 des lymphocytes T murins	page 102
3- Effets sur l'homéostasie calcique des lymphocytes T murins	page 103
4- Effet sur l'activation lymphocytaire des lymphocytes T humains	page 115
5- Effet sur la production d'interleukine-2 des lymphocytes T humains	page 116

6- Effets sur l'homéostasie calcique des lymphocytes T humains	page 117
2ème PARTIE : interaction des dérivés méthylés du benz(a)anthracène avec l'activation du lymphocyte T murin : etude de structure-activité	
1- Effets sur la prolifération de splénocytes murins activés par l'anticorps anti-CD3 ou la Concanavaline A	page 125
2- Interaction des dérivés méthylés du benz(a)anthracène avec la voie de l'interleukine-2	page 128
3- Effets des hydrocarbures polycycliques aromatiques sur l'homéostasie calcique des lymphocytes T murins	page 138
3ème PARTIE : Comparaison des effets induits in vitro par le diméthyl-7, 12-benz(a)anthracène sur les lymphocytes T de souris B6C3F1 femelle et sur les lymphocytes périphériques humains	
1- Effet comparé du diméthyl-7, 12-benz(a)anthracène sur la prolifération lymphocytaire	page 148
2- Effet comparé du diméthyl-7, 12-benz(a)anthracène sur la cytotoxicité non restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité	page 155
3- Effet comparé du diméthyl-7, 12-benz(a)anthracène sur la fonction des lymphocytes T cytotoxiques	page 157

Chapitre 5 : Discussion

page 162

Références bibliographiques

page 182

Annexe

page 208

Je tiens à remercier

Monsieur le Professeur Marc PALLARDY. Il m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail. Son enthousiasme et ses compétences scientifiques m'ont guidé tout au long de cette thèse. Je lui exprime mes plus sincères remerciements pour sa disponibilité, son investissement personnel dans mon travail et pour ses excellentes capacités d'enseignant.

Madame le Docteur Joëlle WIELS. Je la remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Madame le Docteur Irène FLORENTIN. Je la remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Madame le Professeur Paule VASSEUR. Je la remercie de présider le jury de cette thèse. Je tiens aussi à la remercier pour la qualité des cours et des séminaires proposés dans le cadre du D.E.A. et du Doctorat de Toxicologie de l'environnement.

Monsieur le Docteur Jean-François SAVOURET. Je le remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.

Zohar MISHAL, Arlette VERVISH et Dominique LAIRD, du laboratoire de Cytométrie de flux du CNRS. Je tiens à les remercier pour leur conseil, leur gentillesse.

Monsieur le Professeur Claude BOHUON, Professeur de Toxicologie à l'Université de PARIS XI. Je tiens à le remercier de m'avoir accueilli dans son service à l'Institut Gustave ROUSSY. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Merci à Christine PAILLER, Armelle BIOLA, Rémi ROGER, Rahmane OUABDESSELAM, Christian BLOT avec qui j'ai passé 3 années à l'Institut G. Roussy. Je tiens à les remercier pour leur gentillesse, leur disponibilité et l'intérêt porté à mon travail.

Merci à Mallory PERRIN, Saadia Kerdine, Marianne StoroGenko et Hervé LeBrec avec qui j'ai débuté dans le tout nouveau laboratoire d'immunotoxicologie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry... Il y a maintenant 6 ans. Merci pour leurs conseils et leur aide.

Merci à tous les membres du Laboratoire d'immunotoxicologie et de l'équipe INSERM U461 de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, ceux du Département de Biologie Clinique de l'Institut G. Roussy pour leur gentillesse, leur disponibilité, leurs conseils et l'intérêt porté à mon travail.

Merci à Marilynne Goergen du Centre des Sciences de l'Environnement pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Liste des abréviations citées dans le texte :

- 2-ME (2-mercapto-éthanol)
- 2,4,5 T (acide 2,4,5 trichlorophénoxyacétique)
- ³H-Thy (thymidine triciée)
- ⁵¹Cr (chrome 51)
- ¹²⁵IIL-2 (IL-2 marquée à l'iode 125)
- aa (acides aminés)
- ADCC pour *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*
- ADN (acide désoxyribonucléique)
- AHH (pour *Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*)
- AhR (pour *Aryl hydrocarbon Receptor*)
- ARNm (acide ribonucléique messenger)
- ARNT (pour *Ah receptor nuclear translocator*)
- ATP (Adénosine Triphosphate)
- BaP (Benzo(a)pyrène)
- BeP (benzo(e)pyrène)
- Ca²⁺ic (calcium intracellulaire ionisé)
- CI50 (concentration inhibitrice 50)
- CIF (pour *Calcium-Influx Factor*)
- CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)
- CMVM (cytomégalovirus murin)
- ConA (Concanavaline A)
- CPA (cellule présentatrice de l'antigène)
- CPM (coups par minutes)
- CTL (lymphocytes T cytotoxiques)
- cyt P450 (cytochrome P450)
- DAG (DiAcylGlycérol)
- DL50 (dose létale 50)
- DMBA (diméthyl-7,12-benz(a)anthacène)
- DMSO (diméthylsulfoxyde)
- DRE (pour *Dioxine response element*)
- EBV (Virus de Epstein-Barr)
- EGF (pour *Epithelial Growth Factor*)
- FasL (Fas Ligand)
- FKBP12 (pour *FK506 Binding Protein 12*)
- GDP (Guanidine DiPhosphate)
- GMPC (pour *Guanidine MonoPhosphate cyclique*)
- GTP (Guanidine TriPhosphate)

GVL (pour *graft versus leukemia*)
H₂O₂ (eau oxygénée)
HLA (pour *human leukocyte antigen*)
HHV (virus herpes humain)
HIV (virus de l'immunodéficience humaine)
HPA (hydrocarbures polycycliques aromatiques)
hr (heure)
hsp (pour *heat shock protein*)
I_{crac} (pour *calcium-release-activated-channel*)
IMF (intensité moyenne de fluorescence)
IFN- γ (interferon- γ)
IgG (immunoglobulines G)
IgM (immunoglobulines M)
IL- (interleukine-)
IP (iodure de propidium)
IP₃ (inositol-1,4,5 triphosphate)
IP₄ (inositol-1,3,4,5-tétrakisphosphate)
JNK (pour *c-Jun N-terminal Kinase*)
K_d (constante d'affinité)
KDa (kilodalton)
LAD (pour *Leucocyte Adhesion Deficiency syndrome*)
LAK (pour *Lymphokine Activated Killer*)
LPS (lipopolysaccharide)
M12BA (méthyl-12-benz(a)anthracène)
M7BA (méthyl-7-benz(a)anthracène)
MAP Kinases (pour *mitogen-activated protein kinase*)
MCA (Méthyl-3-cholanthrène)
MCC (milieu de culture complet)
MFI (pour *Mean Fluorescence Intensity*)
MLR (réaction lymphocytaire mixte)
NF-AT (pour *Nuclear Factor-Activated T cell*)
NF- κ B (pour *Nuclear Factor- κ B cell*)
NK (pour *Natural Killer*)
PBS (tampon phosphate)
PCB (polychloro biphényles)
PCDD (polychloro dibenzo-p-dioxin)
PCDF (polychlorodibenzofurane)
PHA (Phytohémagglutinine)
PI3-Kinase (pour *PhosphoInositol3-Kinase*)

PKC (protéine kinase C)
PLC γ (phospholipase C γ)
PMA (Phorbol-myristate-acétate)
PTB (pour *PhosphoTyrosine Binding domain*)
PTK (pour *protein PhosphoTyrosine Kinase*)
Ras (pour *Rous aviare sarcoma*)
RCT (récepteur de l'antigène des cellules T)
RE (réticulum endoplasmique)
SERCA (pour *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*)
SH2 (pour *src homology domain-2*)
SH3 (pour *src homology domain-3*)
SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise)
SOS (pour *Son of Sevenless*)
STAT (pour *Signal Transducers and Activators of Transduction*)
SupconA, SupAnti-CD3, SupPHA (surnageants)
TCDD (Dioxine ou 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine)
TGF- α (pour *Transforming Growth Factor- α*)
TGF- β (pour *Transforming Growth Factor*)
TPK (pour *tyrosine phosphokinase*)
XRE (pour *xenobiotics response element*)
ZAP70 (pour *Zéta Associated Protein 70 Kd*)

AVANT PROPOS

Depuis la théorie de l'immunosurveillance énoncée par Burnet au début des années 1970 (1) qui proposait que le système immunitaire reconnaissait les cellules ayant subi une transformation maligne comme des cellules étrangères et permettrait donc un contrôle de la croissance tumorale, de nombreuses évidences expérimentales et cliniques sont venues soutenir cette théorie en la modifiant toutefois quelque peu.

Les arguments expérimentaux reposent sur la détection d'expansions clonales de cellules T dans les tumeurs humaines ou dans le sang périphérique de patients porteurs de cancer grâce à l'étude du répertoire du récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (RCT) par des techniques d'amplification en chaîne de l'ARN messager (2) et par la caractérisation d'antigènes de tumeurs dans le mélanome principalement, mais aussi dans d'autres types de cancers (3). Mackensen et col. ont même mis en évidence une expansion clonale de cellules T chez une patiente atteinte d'un mélanome en régression clinique. L'apparition de ce clone cytotoxique T et son expansion étaient concomitantes à la régression du mélanome (4).

Les arguments cliniques en faveur d'une réponse immunitaire contre les cellules tumorales proviennent tout d'abord de la transplantation de moëlle osseuse utilisée dans le traitement de certaines hémopathies malignes. On observe moins de rechutes après les greffes de moëlle osseuse allogéniques qu'après les greffes autologues ou syngéniques. Cette différence due à l'effet de rejet de la leucémie par les cellules du donneurs ou effet GVL (pour *graft versus*

leukemia), reflète la différence du donneur et du receveur au niveau du complexe majeur et /ou mineur d'histocompatibilité. Cet effet est clairement démontré dans les allogreffes de moëlle osseuse lors de traitement des leucémies myéloïdes chroniques (5). Les lymphocytes T sont clairement impliqués dans cet effet GVL puisque la déplétion des cellules T dans les greffes de moëlle osseuse allogéniques conduit à un plus fort taux de rechute que les greffes non T-déplétées (5). De plus, la rechute après greffe de moëlle osseuse allogénique des patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques peut être "guérie" par une seule injection des lymphocytes T du donneur (6).

D'autres arguments cliniques reposent sur l'augmentation de l'incidence des cancers chez les patients immunosupprimés (7, 8). Cette immunosuppression peut être d'origine héréditaire comme dans les syndromes de Wiskott-Aldridge et de Di George ou acquise comme chez les patients ayant reçu une greffe d'organe et prenant quotidiennement des médicaments immunosuppresseurs pour prévenir le rejet de cette greffe ou encore les patients atteints de certaines pathologies infectieuses (virus de l'immunodéficience humaine (VIH), malaria). L'ensemble de ces résultats souligne l'importance du système immunitaire dans l'éradication des processus tumoraux précoces.

La corrélation des données recueillies lors d'études épidémiologiques sur les populations exposées aux cancérogènes chimiques de manière accidentelle ou dans l'environnement professionnel avec l'analyse des mutations présentes dans le sang périphérique ou directement dans la tumeur permettrait

d'attribuer environ 75% des cancers humains dans le monde à des cancérogènes chimiques (9)

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) sont des composés ubiquitaires connus pour leurs propriétés cancérogènes (10, 11). Parmi ces composés chimiques, certains se sont révélés être aussi de puissants immunosuppresseurs (12). L'effet immunosuppresseur chez la souris B6C3F1 de ces HPA persiste 4 à 8 semaines après l'arrêt de l'exposition (13, 14). De nombreux polluants naturels domestiques ou industriels contiennent des HPA. Leur effet cancérogène est surtout bien connu pour le tabac qui contient près de cent HPA différents dont le Benzo(a)pyrène, et qui est responsable de cancers du poumon et des voies respiratoires (10, 15). Certains HPA, comme la dioxine et ses dérivés sont aussi souvent des sous-produits de la fabrication de produits chimiques comme les herbicides. Dans ce cas, les HPA constituent alors à la fois un risque à court terme pour l'organisme lors de l'exposition professionnelle avec ces composés, mais aussi à long terme par l'accumulation dans le sol puis le passage dans la chaîne alimentaire. En Asie du sud-est, l'utilisation intempestive d'herbicides dispersés par avions dans lequel la dioxine a été décelée comme impureté, a conduit à une exposition de la population qui serait responsable de l'augmentation de l'incidence des cancers du foie dans la région de Hanoï (10). La même technique d'épandage par avions d'herbicides aux Etats-Unis dans les années 1960 a permis de démontrer la persistance de la dioxine dans l'environnement. La demi-vie moyenne de la dioxine dans le sol est variable selon les conditions climatiques. En Floride où le climat est chaud et humide, la demi-vie est de 190 jours, en Utah qui présente un temps chaud et

sec la demi-vie est de 350 jours (10). En Floride, la quantité de dioxine répandue pendant deux ans entre 1962 et 1964 a été estimée entre 2 à 50 g/hectare. Dix ans après, la dioxine est retrouvée dans les tissus de nombreux animaux, notamment les souris (1,3 µg/kg de tissu) avec une localisation préférentielle au niveau hépatique (10). L'évaluation du risque de cancer induit chez l'homme par ces HPA repose sur des études épidémiologiques bien menées où sont pris en compte les risques professionnels mais aussi les habitudes de vie (alimentation, alcool, tabac...), sur la détection de mutations ou adduits dans différent prélèvement biologique (urine, sang..), mais aussi sur des données expérimentales sur l'exposition *in vivo* ou *in vitro* aux HPA (9).

Les mécanismes d'évolution d'une cellule vers la tumorigénicité commencent à être mieux compris sur le plan moléculaire par l'activation d'oncogènes, comme *ras* ou *myc* ou par l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs, comme *p53* ou *Rb*. Les oncogènes sont des gènes cellulaires normaux qui lorsqu'ils sont activés de manière inappropriée induisent la dysrégulation de la croissance ou la différenciation cellulaire. A l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes cellulaires normaux qui lorsqu'ils sont inactivés conduisent à une dysrégulation de la croissance ou de la différenciation cellulaire (15). Un grand nombre de tumeurs contiennent souvent des oncogènes mutés ou des protéines p53 mutées. Des mutations du gène *ras* par des HPA, comme le benzo(a)pyrène (B(a)P) ont été démontré *in vivo* et *in vitro* notamment au niveau des codons 12, 13 et 61. En fait, l'agent responsable est son métabolite, le 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde, qui induit principalement des transversions de la guanine vers la thymidine en

interagissant par l'intermédiaire de son carbone en position 10 avec l'amine en position 2 de la guanine (15). Dans les modèles de cancérogénèse cutané murin, la mutation du protooncogène *ras* est un événement précoce dans l'initiation tumorale (15).

Une mutation dans un gène peut conduire au changement d'un acide aminé dans la protéine, qui produit dès lors un peptide capable de se lier à une molécule de classe I pour former ainsi un antigène alors reconnu par un lymphocyte CD8+. L'existence d'une réponse immunitaire T a été clairement démontrée contre des protéines mutées, comme les protéines constituant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. C'est le cas de l'oncogène *ras* pour lequel des réponses *in vitro* ont été démontrées chez l'homme et la souris (16, 17). Des clones de lymphocytes T cytotoxiques ont été générés *in vitro* contre la protéine P53 mutée (18). De plus, dans un modèle murin, l'immunisation *in vivo* avec un peptide correspondant à la forme mutée de P53 conduit à la génération de clones T cytotoxiques qui sont capable de tuer des cellules exprimant la protéine muté (19).

Dans le cas des HPA, les propriétés mutagènes de ces composés sont responsables de l'initiation de la tumeur et l'on peut se demander si l'anergie du système immunitaire n'est pas impliquée dans la phase de progression qui aboutit à la formation de tumeurs. Des travaux sur les tumeurs murines induites par un HPA, le méthyl-3-cholanthrène (MCA) ont montré que ces tumeurs portent des antigènes capables de provoquer une réponse immunitaire de rejet quand celle-ci sont transférées dans un animal syngénique non exposé (20), ce qui plaident en faveur d'une immunosuppression chez les souris

exposées. L'étude des HPA est donc un excellent modèle expérimental pour étudier l'anergie dans les lymphocytes T. Le diméthyl-7,12-benzanthracène (DMBA), choisi comme modèle d'étude des HPA par l'équipe de J. Dean est une molécule synthétique mutagène, cancérigène et immunosuppressive (21). Le DMBA interagit avec le lymphocyte T, qui possède un rôle central dans la réponse immunitaire. Il est le plus puissant immunosuppresseur de cette famille de composé (21). L'importance croissante d'un défaut de transduction du signal dans les lymphocytes T anergiques (22, 23) et le rôle prépondérant du niveau de calcium ionisé intracellulaire dans cette anergie, nous a amené à étudier l'interaction des HPA avec l'homéostasie calcique dans les lymphocytes T humains et murins.

CHAPITRE 1 : HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES ET SYSTEME IMMUNITAIRE:

A- Les hydrocarbures polycycliques aromatiques.

1- Structure et exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) sont parmi les cancérogènes les plus puissants connus à l'heure actuelle. On les rencontre dans de nombreux polluants naturels ou domestiques et rarement à l'état pur. Les HPA se retrouvent dans les produits de combustion incomplète, tels que ceux de la viande grillée ou dans la fumée de tabac, les huiles de moteur usagées, les gaz de combustion et les goudrons (10, 24).

Du point de vue de leur structure chimique, les HPA qui diffèrent par le nombre de cycles benzène, et l'arrangement de ces cycles (Figure n°1). Les dérivés de l'anthracène ont une structure tricyclique. Les composés à quatre cycles correspondent au benzanthracène et à ses dérivés, avec pour principal représentant le dérivé méthylé synthétique : diméthyl-7,12-benz(a)anthracène (DMBA). Le benzo(a)pyrène (B(a)P) est un HPA à cinq cycles benzène. Un des cycles benzènes peut être substitué par un hétérocycle (β naphthoflavone) ou un cyclopentane (méthyl-3-cholanthrène (MCA)).

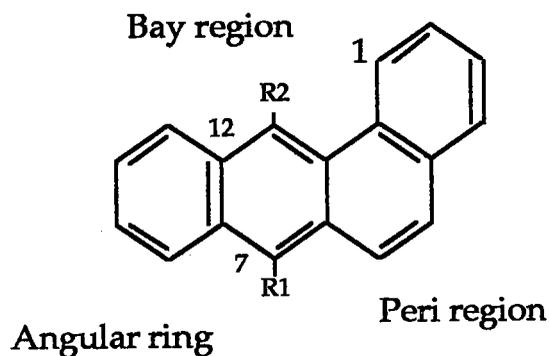
Tous ces composés présentent une structure plane (Figure n°1).

Un autre groupe de toxiques de l'environnement est représenté par des hydrocarbures halogénés et plus particulièrement les dérivés chlorés dont le principal composé est la dioxine ou 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (Figure n°1). La dioxine est un des membres de la famille des dibenzo-p-dioxines polychlorés qui comprend 75 composés dont les structures varient selon le nombre et la position des atomes de chlore sur les noyaux aromatiques. Ces composés comptent parmi les plus étudiés depuis les différents accidents survenue dans les années 1970.

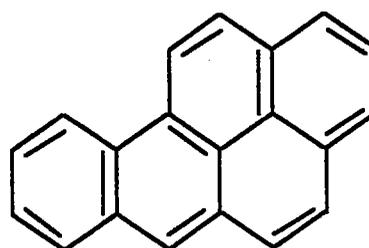
Dans ce chapitre, la dioxine sera utilisée comme molécule de référence car elle présente certaines caractéristiques communes avec les HPA qui déterminent leurs propriétés toxiques. Citons comme propriété commune le métabolisme qui utilisent les mêmes enzymes, mais aussi et surtout la fixation au récepteur Ah (voir plus loin). La fixation au récepteur Ah est responsable de la majeure partie des effets de la dioxine.

Figure n° 1: Structure chimique des principaux hydrocarbures polycycliques aromatiques et de la dioxine.

Dérivés méthylés du Benz(a)anthracène



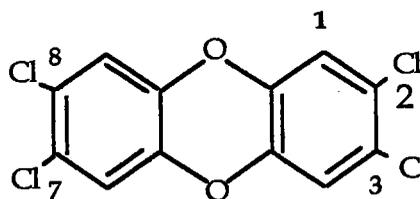
Benzo(a)pyrène



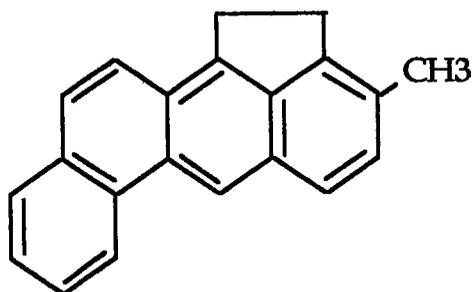
Légende :

- Méthyl-12-Benz(a)anthracène R1=H, R2=CH3
 Méthyl-7-Benz(a)anthracène R1=CH3, R2=H
 Diméthyl-7,12-Benz(a)anthracène R1=CH3, R2=CH3

2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine



Méthyl-3-cholanthrène



L'organisme humain entre en contact avec les hydrocarbures polycycliques aromatiques non halogénés par inhalation des fumées de

tabac, de pots d'échappement des automobiles, ou par contact cutané lors d'exposition professionnelles (suies, goudrons). Les voies cutanées et pulmonaires sont les voies principales d'exposition. On compte plus de 100 HPA dans la fumée de cigarettes (10). En 1775, Sir Percivall Pott a décrit un cancer du scrotum dû à la suie chez de jeunes ramoneurs. Par la suite dans les années 1930, des chimistes révélèrent qu'un groupe de composés de la famille des HPA étaient les agents responsables de ce cancer (10, 24).

Les HPA les plus étudiés sont le B(a)P, le MCA, le dibenz(a,h)anthracène qui sont présents en grande quantité dans la suie, et le dérivé synthétique qui sert de modèle expérimental le DMBA (24, 25).

La dioxine est le toxique de l'environnement le plus étudié depuis le début des années 1970, suite aux différents accidents survenus dans les usines de production de 2,4,5 T (acide 2,4,5 trichlorophénoxyacétique), utilisé comme herbicide et défoliant. En effet, la dioxine a été décelée comme impureté dans des préparations commerciales de pesticides. Elle est produite par chauffage des chlorophénols en milieu alcalin (26).

2- Métabolisme des hydrocarbures polycycliques aromatiques

Tous les HPA sont très liposolubles et sont donc rapidement absorbés par les organismes quelle que soit la voie de contact : cutanée, digestive ou pulmonaire. Les HPA possèdent une forte affinité pour les tissus adipeux où ils peuvent être stockés pendant plusieurs années. Pour les composés chlorés, plus le nombre d'atomes de chlore est grand, moins

les HPA sont métabolisés et donc plus leur temps de rétention dans l'organisme est important.

La dioxine présente une demi-vie dans l'organisme humain de 5,8 années et le 2, 4 ,5 ,2' ,4' ,5'-hexachlorobiphényle possède une demi-vie biologique de 27,5 années (27).

Dans les années 1960, l'observation a été faite que l'exposition à certains HPA comme le B(a)P ou le MCA induisait une augmentation de leur métabolisme. Ces HPA provoquaient l'induction d'enzymes impliqués dans la métabolisme oxydatif de xénobiotiques au niveau des microsomes hépatiques. Cette activité fut alors appelée AHH (pour *Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*), nom commun donné à la somme des activités des cytochromes P450 oxydant les HPA. Les cytochromes P450 représentent une famille d'hémoprotéines qui catalysent le métabolisme de xénobiotiques, mais aussi de composés endogènes, comme les stéroïdes, les acides gras, les prostaglandines et les vitamines. Une nomenclature a été proposée pour classer les quelques 200 gènes des enzymes P450. Le préfixe CYP est suivi par un chiffre en écriture arabe, une lettre majuscule puis un autre chiffre qui définissent respectivement la famille, la sous-famille et le numéro du gène (28).

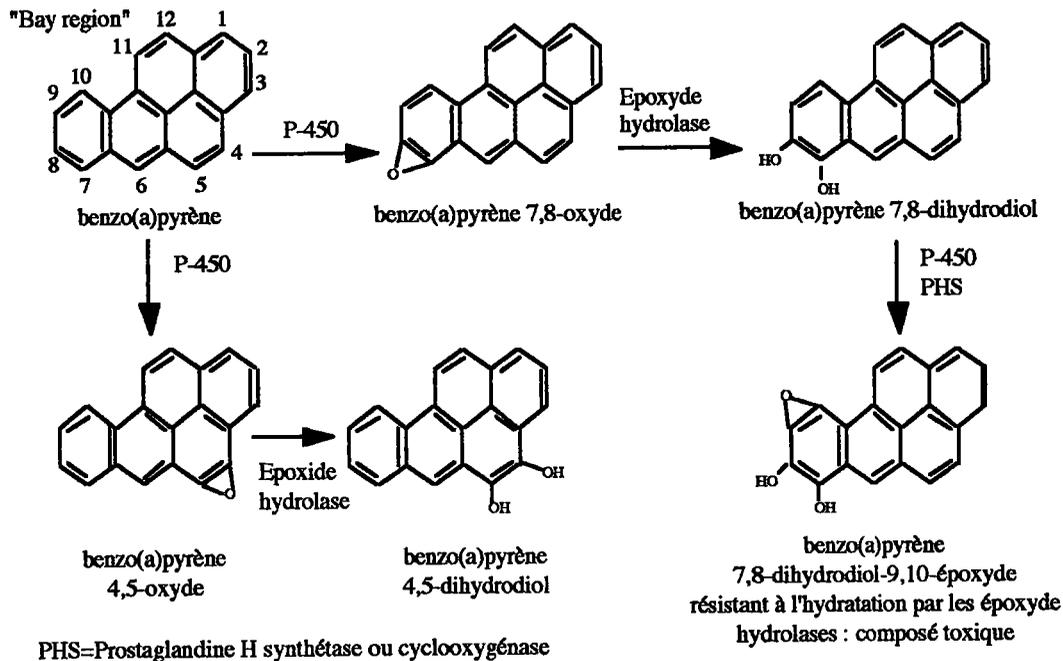
En fait, la métabolisation des HPA non halogénés par les monooxygénases des cytochromes P450 suit la théorie de la "bay region". Selon cette théorie, l'hydroxylation des HPA a lieu au niveau d'une zone particulière appelée la "bay region" pour former un diol-époxyde. Cette théorie est illustrée par l'activation métabolique du B(a)P (Figure n°2). L'époxydation initial du B(a)P par les monooxygénases de la famille

CYP1A1 a lieu en position 7,8. Celle-ci est suivie de l'hydratation de l'époxyde B(a)P par une époxyde hydrolase pour former le 7,8-dihydrodiol B(a)P qui est de nouveau oxydé par les monooxygénases de la famille CYP3A4 ou la prostaglandine H synthétase (appelée aussi cyclooxygénase) en 7,8-dihydrodiol 9,10-oxide B(a)P qui est le composé responsable de la toxicité du B(a)P. D'autres enzymes peuvent intervenir dans la métabolisation des HPA, comme des enzymes de phase II (l'UDP-glucuronosyltransférase ou la sulfotransférase). Les enzymes de phase II seront responsables de la détoxification des métabolites réactifs (15).

La famille des gènes *CYP 1A* comprend deux gènes : *CYP1A-1* et *CYP1A-2*, codant pour une sous-famille de cytochromes P450 inductibles. Une étude menée chez des rats traités avec le MCA à la dose de 40 µg/g, a montré une augmentation de deux membres de la famille des cytochromes P450 : 1A1 et 1A2 (29). De telles observations ont également été faites avec les composés comme la dioxine (30).

L'induction de l'UDP-glucuronosyltransférase par le méthyl-3-cholanthrène et la dioxine a été démontrée chez la souris C57BL/6 mais pas chez la souris DBA/2 (31). La NAD(P)H quinone oxydoréductase, une flavoprotéine qui catalyse la réduction des quinones, est aussi inductible après exposition au MCA ou au TCDD.

Figure n° 2 : Schéma de la métabolisation du Benzo(a)Pyrène.



Une fois métabolisés, les HPA subissent une excrétion hépatobiliaire puis sont éliminés dans les fèces (10).

La métabolisation des HPA par les enzymes des organismes exposés à ces toxiques est responsable en partie de la toxicité observée, notamment de la survenue d'une hépatotoxicité et en particulier d'un phénomène de cancérisation.

Cette métabolisation des HPA par l'une des différentes enzymes de la famille du cytochrome P450 est aussi responsable de la variation de sensibilité individuelle et donc du risque de développer un cancer lors de l'exposition à ces HPA. Ceci a été observé dans les cancers des poumons développés chez les fumeurs, où un variant allélique hautement inductible du gène CYP1A1 a été identifié chez certains patients. Une

activité AHH élevée est généralement corrélée avec un niveau élevé d'adduits à l'ADN détectés dans les lymphocytes périphériques. Enfin au Japon, on a noté une augmentation du cancer du poumon chez des fumeurs associés à un polymorphisme du gène *CYP1A1* (15).

3-Récepteur des hydrocarbures polycycliques aromatiques : la protéine Ah.

En 1969, Nebert D.W. et Gelboin H. V. ont montré que le MCA induisait une activité AHH chez les souris C57Bl/6 et pas chez les souris DBA/2. Cette variation de sensibilité intersouche a permis l'identification de deux phénotypes : les "Ah sensibles" et les "Ah résistants" (32). Le phénotype "Ah sensible" s'est révélé être un caractère dominant suite au croisement de souris sensibles avec des souris résistantes. Mais, ce n'est qu'en 1976, que Poland et coll. démontrèrent que le phénotype "Ah sensible" était lié à l'existence d'une protéine récepteur cytosolique appelée AhR (pour *Aryl hydrocarbon Receptor*) (33). Le caractère dominant est porté par l'allèle *b*, les souris résistantes possèdent l'allèle *d*. (33). Trois différents allèles *b* (*b-1, b-2, b-3*) ont été identifiés codant pour des protéines Ah de 95, 104 et 105-KDa (30)

Le locus Ah code pour le récepteur cytosolique Ah. Ce récepteur Ah détermine l'induction des hydroxylases responsables du métabolisme des HPA. Les souris "Ah sensibles" métabolisent efficacement les HPA à la différence des souris porteuses de l'allèle *d*. Certains HPA comme le B(a)P se fixe sur ce récepteur cytosolique qui possède une stéréospécificité pour

les différents composés de cette famille et la structure des HPA déterminera l'affinité pour ce récepteur (11).

Le récepteur Ah fait partie du groupe des "récepteurs activés par leur ligand", comme le récepteur des glucocorticoïdes ou des différents stéroïdes. Le récepteur Ah non activé par la dioxine est complexé avec la protéine hsp90 (pour *heat shock protein*). La protéine hsp90 semble maintenir le récepteur Ah dans une conformation facilitant la fixation de la dioxine (34). Une fois activé par la fixation du ligand, le complexe récepteur Ah-TCDD migre alors vers le noyau où il se comporte comme facteur régulateur de la transcription en se liant sur des régions de l'ADN, les DRE (pour *Dioxin Responsive Elements*) ou XRE (pour *Xenobiotics Responsive Elements*) (34). Ces régions DRE/XRE sont situées en 5' dans la région promotrice de nombreux gènes. Des régions DRE/XRE ont été identifiées dans les gènes du *CYP1A1*, du *CYP1A2*, de l'*aldéhyde-3-déshydrogénase*, de la *NAD(P)H quinone oxydoréductase...* (30). En fait, Les interactions récepteur-ligand/DRE conduisent à une disruption de la chromatine, une augmentation de l'accessibilité de la région promotrice, et il en résulte alors une augmentation de la transcription des gènes cibles. Cette interaction Ah récepteur/DRE est induite par la fixation de la dioxine, mais dépend aussi d'une seconde protéine ARNT (pour *Ah receptor nuclear translocator*). L'obtention de souris déficientes en ARNT a permis de démontrer le rôle crucial de cette protéine dans la réponse de l'organisme à l'hypoxie et à l'hypoglycémie (35). Les protéines récepteur Ah et ARNT présentent une homologie de séquence avec deux protéines de la drosophile Sim et Per. Elles sont caractérisées par une région

homologue approximativement de 200 acides aminés (aa), le domaine PAS, qui serait impliqué dans la formation d'hétérodimères entre membre de la même famille (AhR-ARNT par exemple). La région N-terminale (basic helix-loop-helix) du récepteur Ah serait impliquée dans la liaison du ligand, la reconnaissance de la région DRE et la dimérisation de ARNT (36). Il existe une forte homologie entre cette région N-terminale du récepteur Ah humain et son homologue murin AhR^b (protéine issus de l'allèle *b-1*, caractérisant les souches murines "Ah sensibles") (36). La région C-terminale du AhR, riche en sérines serait importante pour la formation du complexe hétérodimérique (AhR-ligand-ARNT) et dans la fixation sur l'ADN (30).

4- Effets toxiques autres qu'immunotoxiques liés à l'exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques.

L'exposition aux HPA peut engendrer un certain nombre d'effets toxiques chez l'animal et chez l'homme. Néanmoins, la toxicité de ces composés dépend d'un grand nombre de facteurs comme la dose, la voie d'administration, l'espèce, la souche, l'âge, le sexe de l'animal et la présence ou non du récepteur Ah. C'est ainsi que la DL50 (dose létale 50) du B(a)P varie environ d'un facteur de 2000 entre la souris C57Bl/6 ("Ah sensible") et la souris DBA/2 ("Ah résistante") (10). De même, la DL50 de la dioxine entre le cochon d'Inde "sensible" et le hamster "résistant" varie de 2500 fois (37).

4-1 Propriétés cancérigènes

Les HPA sont donc métabolisés par les monooxygénases du cytochrome P450 en des composés plus hydrosolubles afin d'être éliminés de l'organisme. Toutefois, certains de leurs métabolites intermédiaires comme les diol-époxydes sont très réactifs et peuvent se fixer de façon covalente sur différentes molécules dont l'ADN et former des adduits, engendrant des mutations et donnant lieu à la formation de tumeurs. Ceci est à la base de leur propriété de cancérigènes génotoxiques.

Classiquement, la carcinogénèse comprend 3 étapes. La première appelée "initiation" résulte de mutations. On pense aujourd'hui que plusieurs événements mutationnels indépendants sont nécessaires pour l'initiation de la tumeur. La seconde étape qui fait suite à l'initiation est la "promotion" qui correspond à des défauts de contrôle de la différenciation, de la croissance cellulaire ou encore une résistance à une mort programmée. La troisième étape appelée "progression" correspond à un passage à un état malin et à une instabilité génomique du matériel génétique des cellules concernées (15). Ce concept est assez simpliste, mais permet certainement une bonne compréhension de la carcinogénèse.

4-1-1 Propriétés génotoxiques des hydrocarbures polycycliques aromatiques

L'identification des métabolites est essentielle pour la compréhension des mécanismes de cancérogénèse des HPA et fait donc l'objet de nombreuses recherches actuelles sur les HPA. Jusqu'à présent, les métabolites responsables des adduits étaient déterminés d'après la "théorie de la région bay". Il semble aujourd'hui que cette voie de transformation ne représente que 10% du métabolisme. Des études récentes montrent qu'une autre voie de transformation est possible (38). Cette voie qui passe par la formation d'un bis-diol-époxyde, conduit également à la formation d'adduits potentiellement mutagènes. Ces adduits constituant 80% de l'ensemble des adduits, ne sont pas détectés lors de contrôle de surveillance d'exposition. Les risques de cancers associés à l'exposition des HPA sont donc très probablement sous-estimés (38). Des mutations de gènes critiques ont été identifiées. Ces gènes sont soit les oncogènes, soit les gènes suppresseurs de tumeurs. Les premiers sont des gènes cellulaires normaux qui lorsqu'ils sont activés induisent une dysrégulation de la croissance et de la différenciation cellulaire. Les oncogènes les plus connus sont ceux de la famille Ras (pour *Rous aviare sarcoma*). La mutation de *ras* est un événement précoce dans les modèles expérimentaux de cancérogénèse cutanés et mammaires utilisant des HPA (15). De nombreuses mutations de *ras* ont été observées dans les cancers humains. Dans une revue de la littérature sur la carcinogénèse chimique, Harris C.C. décrit un "spectre de mutations" de *ras* qui est spécifique de

l'exposition à tels ou tels agents toxiques chimiques. Ainsi, la transversion en position 182 de A:T vers T:A induite par le DMBA lors du développement de cancer cutané, pulmonaire ou mammaire chez le rat ou la souris est due majoritairement à un adduit N⁶-7,12-Diméthylbenzanthracène diol-époxyde-déoxyadénosine (9). Dans des cancers cutanés et pulmonaires chez la souris avec mutations de l'oncogène *H-ras* et *K-ras* respectivement, le B(a)P induit une mutation en position 35 de cet oncogène. Il s'agit d'une transversion de G:C vers T:A (9).

Les gènes suppresseurs de tumeurs contrôlent la différenciation et la croissance cellulaire. Le gène suppresseur de tumeur le plus étudié est le gène *p53*. Le gène *p53* est retrouvé muté dans de nombreux cancers humains, comme les cancers du colon, du poumon, les carcinomes hépatocellulaires, les glioblastomes... (39). L'inactivation par mutation des deux allèles du gène est nécessaire à la perte de fonction de ces gènes suppresseurs de tumeurs. La protéine P53 est un excellent candidat pour explorer la nature des facteurs oncogéniques dans l'environnement car il existe une très forte conservation du gène et de la protéine P53 au cours de l'évolution (90% d'homologie entre la séquence humaine et celle des rongeurs) (40). Récemment, Denissenko et al. ont observé qu'une carcinogénèse expérimentale de cellules humaines en culture par le B(a)P diol époxyde intéresse particulièrement les guanines 157, 248 et 273 du gène *p53*. Or, ce sont là trois points chauds des mutations observés dans les cancers bronchiques retrouvés chez les fumeurs. De plus, la majorité des mutations observées chez ces malades sont des transversions de G vers T,

ce qui est attendu pour une mutagenèse provoquée par l'addition de chaînes hydrocarbonées aromatiques polycycliques (41). Ce résultat semble clairement impliquer les HPA présents dans le tabac dans la survenue de cancers pulmonaires.

Le B(a)P a souvent été employé comme carcinogène expérimental. Selon l'espèce et la voie d'exposition du toxique, différentes localisations des tumeurs ont été décrites : des tumeurs hépatiques après absorption dans la nourriture et les eaux de boissons, des tumeurs cutanées après badigeonnage, mais aussi une augmentation des tumeurs pulmonaires chez des souris CD-1 ou C57Bl/6 après inhalation du toxique (10).

L'application de DMBA sur la peau de différentes souches murines conduit rapidement à la formation d'un carcinome cutané. Le DMBA est aussi responsable du développement de tumeurs mammaires chez ces mêmes souris (10).

4-1-2 Propriétés épigénétiques des hydrocarbures polycycliques aromatiques

Les propriétés carcinogènes des HPA ont aussi été démontrées avec la dioxine chez l'animal, en particulier dans l'étude de l'hépatocarcérogénèse (42). Ces expériences menées chez le rat exposé au TCDD, ont montré une augmentation de la concentration de TGF- α (pour *Transforming Growth Factor- α*) dans le foie. Le TGF- α est un ligand du récepteur à l'EGF (pour *Epithelial Growth Factor*). La fixation du TGF- α

sur ce récepteur provoque son internalisation qui se traduit par la transduction d'un signal mitogénique, conduisant à une prolifération cellulaire (42). Le TCDD provoquerait donc une activation de ce processus et favoriserait ainsi le développement de tumeurs hépatiques chez le rat. Dans ce cas-là, la dioxine induit une tumeur par un mécanisme épigénétique et non génotoxique.

4-1-3 Etudes épidémiologiques chez l'homme

Chez l'homme, les propriétés tumorigènes de ces produits ont également été démontrées pour un composé comme la dioxine par des études épidémiologiques. Bertazzi et col. ont effectué une étude rétrospective sur une période allant de 1976 à 1986 appliquée à la population résidant à proximité de Seveso, en Italie. La population prise en compte était âgée de 1 à 19 ans. Les maladies répertoriées sont en majorité des cancers, notamment des leucémies (43). Manz et col. ont réalisé une étude portant sur la mortalité des employés travaillant dans une usine produisant des herbicides en Allemagne pendant la période de 1952 à 1985. La production de ces herbicides a générée de la dioxine. Les causes de décès recensées pour les personnes ayant travaillé plus de 20 ans dans cette usine, sont principalement des cancers. Les cancers les plus fréquents dans cette population concernent les tissus hématopoïétiques (44). Au Vietnam, où la dioxine a été largement répandue avec les défoliants et herbicides on a noté une augmentation de l'incidence des

cancers du foie, sans pour autant pouvoir attribuer ces nouveaux cas de cancers à la dioxine (10).

Chez l'homme, la réponse adverse la plus courante à l'exposition professionnelle à la dioxine et ses dérivés est la chloracné. Il s'agit là encore d'une affection pré-cancéreuse, car elle est associée à un dysfonctionnement de la prolifération cellulaire. En effet, cette intoxication est caractérisée par une altération de la prolifération et de la différenciation des cellules de l'épiderme, des cellules cutanées et des cellules des glandes sébacées. Il en résulte une hyperkératose interfolliculaire suivi par une atrophie des follicules pileux (10).

4-2 Propriétés toxiques sur la reproduction

Le B(a)P est tenu pour responsable de la réduction de la fertilité et de la reproduction chez des souris CD-1 ou C57BL exposées *in utero* (10).

Le passage de DMBA et du B(a)P à travers la barrière placentaire et la présence d'enzymes nécessaire au métabolisme des HPA chez l'embryon sont à l'origine des propriétés embryotoxiques du B(a)P et du DMBA. En effet, chez certaines souches murines, on note une activité AHH placentaire qui peut être induite par l'exposition aux HPA.

L'acide ribonucléique messager (ARNm) et la protéine du récepteur Ah sont fortement exprimés dans le placenta humain (36), ceci peut sans doute expliquer l'extrême sensibilité du fœtus à la toxicité des HPA et les conséquences d'une exposition *in utero*.

Chez l'homme, la contamination *in utero* par les PCB des enfants nées de mères intoxiquées lors des épisodes de Yusho et Yu-Cheng a été bien décrite. Ces enfants présentent un syndrome dysplasique cutané, qui peut s'apparenter à la chloracné observée après exposition au TCDD (45).

4-3 Toxicité hématologique

Chez les souches murines "Ah résistantes", le B(a)P induit une toxicité hématopoïétique, indépendante du récepteur Ah. Ainsi, les souris AKR/N développent une anémie réfractaire après 4 semaines d'exposition au toxique (10). Il s'agit d'une insuffisance médullaire qui affecte la lignée érythrocytaire et précède un état tumoral.

B) Immunotoxicité liée aux Hydrocarbures

Polycycliques Aromatiques :

1- Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire

1-1 Les organes lymphoïdes

Le système immunitaire est un organe diffus. Il est constitué d'organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les organes lymphoïdes primaires comme le thymus et la moëlle osseuse sont les sites majeurs de la lymphopoïèse. Les différentes étapes de la maturation thymique des lymphocytes T sont : l'acquisition par les thymocytes très immatures du récepteur pour l'antigène des cellules T (RCT) et des molécules CD4 et CD8, ainsi que la délétion clonale de lymphocytes T autoréactifs, c'est à dire présentant une spécificité pour les antigènes du soi. Dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques périphériques, rate, plaques de Peyer, amygdale), les lymphocytes peuvent interagir entre eux et/ou avec l'antigène.

Le système immunitaire est constitué de l'immunité non spécifique et de l'immunité spécifique de l'antigène. L'immunité non spécifique ou innée constitue la première barrière de défense de l'organisme. Elle est identique chez tous les individus sains. L'immunité spécifique évolue au cours de la vie, et est propre à chaque individu. Elle possède aussi une caractéristique qui la différencie de l'immunité non spécifique qui est la

"mémoire" de l'antigène. En effet après une réponse immunitaire contre un antigène donné, toutes les cellules T ou B ayant participées à cette réponse ne seront pas détruites, certaines resteront avec la capacité de mémoire. En cas de réintroduction de l'antigène, ces cellules reconnaîtront l'antigène et se diviseront de manière clonale de façon à détruire l'antigène.

1-2 L'immunité non spécifique

L'immunité non spécifique comprend des facteurs solubles tels le lysozyme, les différentes fractions du complément, et des cellules comme les phagocytes (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques..) et les cellules NK (pour *Natural Killer*).

1-2-1-Les cellules NK

Les cellules NK sont des cellules douées d'une cytotoxicité spontanée non restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Elles éliminent les cellules infectées par des virus (46) ou les cellules transformées, comme les cellules ayant perdues l'expression des antigènes de classe I du CMH (47, 48). La reconnaissance de la cellule cible par la cellule NK fait intervenir des interactions entre différents couples ligands-récepteurs qui ne sont pas tous encore identifiés (49). Il est connu depuis le début des années 1980, que l'expression de molécules de classe I du CMH de l'hôte par des cellules cibles rend celles-ci résistantes à la lyse

NK. Les cellules NK lysent les cellules ayant perdues (48) ou exprimant faiblement les molécules CMH de classe I de l'hôte et ceci expliquerait la discrimination du soi et du non-soi observée avec les cellules NK (50).

Différents récepteurs des molécules du CMH de classe I ont été identifiés sur les cellules NK (47, 51, 52). Ces récepteurs modulent l'activité NK. Ils possèdent soit une fonction inhibitrice comme Ly49 (52), p58 (53) ou NKB1 (54), soit une fonction activatrice (hNKR-P1A, NKR-P1 ou NK-TR1 (52)).

On distingue deux mécanismes généraux de cytotoxicité dans les lymphocytes. Ceux-ci sont clairement démontrés chez le lymphocyte T et semblent aussi présents chez la cellule NK (55, 56). Le premier est fondé sur l'exocytose des granules cytotoxiques et implique des molécules telles que la perforine et les granzymes, le second fait suite à une interaction membranaire et implique la molécule Fas sur la cellule cible et son ligand (FasL/CD95L) présent sur la cellule effectrice (57-59). Arase et coll. ont démontré la présence de l'ARN messager de FasL dans les cellules NK humaines par des techniques d'amplification en chaîne (59). La présence de la protéine à la surface membranaire des cellules NK n'a pas encore été clairement démontrée. Mais que cette molécule soit présente de manière constitutive à la surface des cellules NK ou de façon inductible, FasL est impliqué dans la cytotoxicité des cellules NK vis à vis de cellules exprimant Fas. La lyse médiée par l'interaction de Fas (CD95) avec son ligand est indépendante du calcium extracellulaire (60).

L'exocytose granulaire est un phénomène calcium-dépendant, au cours duquel la cellule NK libère de façon dirigée à l'interface entre elle et

sa cible le contenu de ces granules après reconnaissance et fixation de cette cellule cible. La perforine après polymérisation permet la formation de canaux dans la membrane plasmique de la cellule cible assurant ainsi le passage des granzymes dans cette cellule. L'utilisation isolée de perforine purifiée sur des cellules cibles permet dans certaines conditions d'obtenir une cytolysse de ces cellules par nécrose (61). Les granzymes sont des sérines estérases contenues dans les granules cytotoxiques. Le granzyme B, est un des responsables de la mort par apoptose des cellules cibles observée lors de la lyse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (62), et donc par analogie, par les cellules NK. Il est très vraisemblable que le granzyme B n'est pas le seul granzyme impliqué, puisque le granzyme A purifié agit en synergie avec le granzyme B pour induire la mort par apoptose de cellules perméabilisées (63). L'exocytose granulaire peut donc induire la mort de la cellule cible à la fois par apoptose et par nécrose. La mort par apoptose est observée dans les conditions physiologiques (rapport effecteurs/cibles faible), lorsque le rapport effecteurs/cibles est élevé la cellule cible meurt par nécrose.

Une étude clinique a rapportée un déficit sélectif en cellules NK chez une patiente qui souffrait d'infections virales récidivantes à virus herpétique (46). Les cellules NK possèderaient donc un rôle dans le contrôle des infections virales.

1-2-2 Les cellules phagocytaires

On compte parmi les phagocytes, les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles (ou granulocytes). La principale fonction de ces cellules phagocytaires est de détruire les organismes pathogènes. Cette fonction nécessite 4 étapes principales : 1) l'adhérence à l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire des nombreuses molécules d'adhésion présentes à leur surface, comme les intégrines, 2) la migration des cellules vers les sites de l'inflammation, 3) la phagocytose des particules "opsonisées", c'est à dire recouverte par des anticorps, et enfin 4) La destruction des organismes pathogènes. Celle-ci a lieu après endocytose et fait intervenir la production d'eau oxygénée (H_2O_2) et de radicaux libres. La reconnaissance des organismes pathogènes fait intervenir des anticorps qui lient l'antigène puis se fixent aux cellules phagocytaires par l'intermédiaire des récepteurs au fragment Fc des anticorps présentes à la surface de ces cellules (64).

Le macrophage est issu des monocytes après passage de la circulation sanguine vers les différents tissus. Il joue un rôle à la fois dans l'immunité non spécifique par la production de cytokines, comme l'interleukine-1 (IL-1) et IL-6 et par ces propriétés cytotoxiques et dans la réponse immunitaire spécifique comme cellule présentatrice de l'antigène (*voir plus loin*).

Les polynucléaires neutrophiles sont issus de la moëlle osseuse. Ils représentent la plus importante fraction cellulaire des globules blancs (ou leucocytes) du sang circulant. Ils possèdent des récepteurs pour les

fragments Fc des immunoglobulines IgG, comme les récepteurs Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16) et des récepteurs pour des fractions du complément, notamment la fraction C3 activée. Ils sont donc doués de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (64).

Les déficits innés en cellules phagocytaires ont pour conséquence le développement très tôt dans la vie du nouveau-né d'infections récurrentes à bactéries extracellulaires, comme les staphylococcies ou les infections à bacilles gram négatif (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*...). Parmi ces déficits immunitaires, citons le déficit des molécules d'adhésion des leucocytes LAD (pour *Leucocyte Adhesion Deficiency syndrome*) qui est caractérisé par l'absence de CD18, la chaîne β commune des intégrines, ou encore la granulomatose chronique ou le syndrome de Chediak-Higashi (64). Un déficit acquis des neutrophiles (ou aplasie granulocytaire) après chimiothérapie anticancéreuse entraîne une augmentation des infections bactériennes.

1-3 L'immunité spécifique

L'immunité spécifique présente une spécificité pour l'antigène. Les effecteurs de cette réponse sont d'une part les anticorps sécrétés par les plasmocytes issus des lymphocytes B, et d'autre part les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Après la reconnaissance de l'antigène, le lymphocyte

auxiliaire coopère par la production de cytokines avec les CTL et les lymphocytes B.

1-3-1 Activation lymphocytaire T

La réponse immunitaire spécifique requiert la présence de cellules effectrices T et de cellules capable de présenter l'antigène (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, lymphocyte B). Les lymphocytes T cytotoxiques expriment majoritairement le marqueur membranaire CD8, il existe quelques rares lymphocytes T cytotoxiques exprimant la molécule de surface CD4. Plus généralement, les lymphocytes T CD4 sont les lymphocytes auxiliaires qui participent à l'initiation de la réponse immunitaire.

La réponse immunitaire faisant intervenir les lymphocytes est restreinte par les molécules du CMH. Pour les lymphocytes CD4+, le complexe CD4/CD3/récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (RCT) reconnaît le complexe antigène peptidique/molécule CMH classe II situé sur la cellule présentatrice de l'antigène (CPAg). Les peptides endogènes d'origine virale sont eux présentés aux lymphocytes T CD8+ par les cellules nucléées aux cotés des molécules de classe I (65).

L'activation des cellules T obéit à un schéma en trois étapes (Figure n°3) : 1) adhésion entre la cellule T et la cellule présentant l'antigène via l'interaction de molécules d'adhésions comme les intégrines; 2) reconnaissance spécifique de l'antigène associé aux molécules HLA de classe II par le complexe CD4/RCT des cellules T; 3) co-stimulation grâce à

l'interaction entre certaines molécules de surface exprimées par les cellules T et les cellules présentant l'antigène et par des cytokines (IL-1, IL-6) sécrétées par la cellule présentatrice de l'antigène. Les molécules de co-stimulation dont le couple CD28/B7 est le système le mieux décrit sont à l'origine d'un deuxième signal. Le CD28 est une molécule accessoire majeure. Le signal d'activation transmis après interaction du CD28 avec un de ces ligands (B7-1, B7-2) est indispensable à l'activation efficace du lymphocyte T et constitue le second signal nécessaire à la production d'IL-2. Le premier signal étant délivré par la reconnaissance spécifique de l'antigène. La production d'IL-2 est rendue possible grâce à la stabilisation des ARN messagers correspondant à cette cytokine, mais aussi à une augmentation de la transcription du gène de l'IL-2 avec l'intervention du facteur de transcription CD28RE (66, 67). En l'absence de ce second signal, il y a induction de l'anergie (*in vitro*) ou de tolérance (*in vivo*). Cet état est spécifique de l'antigène et la cellule anergique ne peut plus synthétiser de l'IL2 (64).

La reconnaissance de l'antigène par le complexe RCT/CD3/CD4 ou CD8 est suivie de nombreux événements biochimiques membranaires, cytoplasmiques puis nucléaires (68). A l'heure actuelle trois voies distinctes de signalisation sont identifiées dans le lymphocyte T (voir Figure n°3) : une première voie active la phospholipase C γ (PLC γ) qui induit une augmentation du taux de calcium intracellulaire et parallèlement une activation des protéines kinases C (PKC) conventionnelles qui retiendra plus particulièrement notre attention, la

seconde fait intervenir la PI3-Kinase (pour *PhosphoInositol3-Kinase*) et la dernière les MAP Kinases (pour *mitogen-activated protein kinase*) directement (69).

Suite à l'activation du complexe récepteur par la reconnaissance de l'antigène restreint par les molécules du CMH, les Tyrosines Kinases (PTK, pour *protein phosphotyrosine kinase*) de la famille Src dont la p56^{lck} et la p59^{fyn} s'associent à différents composants du complexe CD3/RCT/CD4 comme la sous-unité zéta du CD3. Ces Tyrosines Kinases phosphorylent les résidus tyrosines de nombreuses protéines ce qui permet l'ancrage de protéines contenant un domaine SH2 (pour *Src homology domain-2*) qui interviennent dans la transduction du signal, comme la protéine ZAP70 (pour *Zéta Associated Protein 70 Kd*). La PLC1 γ phosphorylée par les Tyrosines Kinases de la famille Src clive le Phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate en Inositol-1,4,5 Triphosphate (IP3) et en DiAcylGlycérol (DAG). L'IP3 qui est une molécule polaire se fixe sur son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et induit la libération de calcium. Le DAG, qui est un lipide neutre reste dans la membrane et active la PKC qui a subi une translocation du cytosol vers la membrane. Six isoenzymes de la PKC ont été caractérisées : les isoenzymes α , β , γ qui dépendent pour leur fonction du taux de calcium intracellulaire et les isoenzymes δ , ϵ , ζ indépendantes du calcium. Une étude récente du groupe de D. Cantrell utilisant la transfection d'isoenzymes mutées actives de la PKC dans des cellules T a montré que la PKC- ϵ majoritairement et

dans une moindre mesure la PKC- α étaient impliquées dans l'activation du lymphocyte T (70).

La voie du calcium permet l'activation du complexe Calmoduline/Calcineurine. La Calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase qui permet l'activation des facteurs de transcription nucléaires tel le NF-AT (pour *Nuclear Factor-Activated T cell*). La calcineurine est stimulée par la Calmoduline en présence de calcium. C'est un hétérodimère composé de deux sous-unités : la sous-unité A possède un site catalytique et des sites de fixation pour la calmoduline, la sous-unité B lie le calcium et régule l'activité de l'autre sous-unité (71). Un des substrat de la Calcineurine est le précurseur cytosolique du facteur de transcription, NF-AT_p (72). Lors de l'activation lymphocytaire, l'augmentation du taux de calcium intracellulaire et la déphosphorylation de NF-AT_p par la Calcineurine permettent la translocation de cette sous-unité cytosolique dans le noyau où elle s'associe avec la sous-unité nucléaire nouvellement synthétisée (73). La sous-unité nucléaire est composée des protéines c-Fos et c-Jun (68).

Dans les cellules non stimulées, le facteur de transcription NF- κ B (pour *Nuclear Factor- κ B cell*) est lié sous une forme inactive à son inhibiteur I- κ B. Lors de l'activation de la cellule T, I- κ B est phosphorylé et libère en conséquence, le NF- κ B cytosolique qui subit alors une translocation dans le noyau (74).

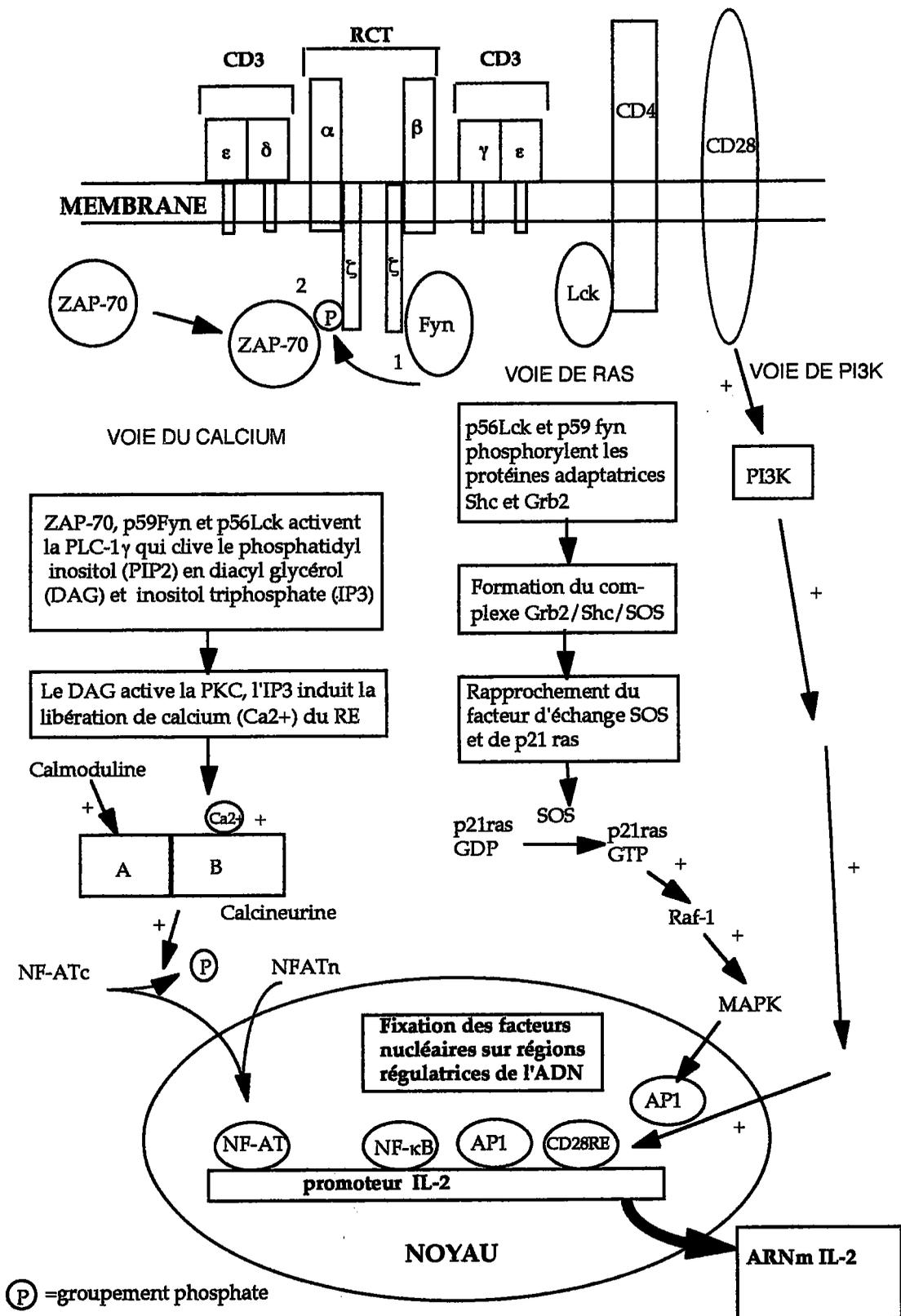
L'intensité de la réponse calcique semble moduler l'activation de certains facteurs de transcription. En effet, dans les lymphocytes une forte

augmentation transitoire de calcium intracellulaire serait nécessaire pour activer sélectivement NF- κ B, alors qu'une élévation plus faible mais prolongée (en plateau) du niveau de calcium activerait préférentiellement NF-AT (75).

Les facteurs de transcription NF-AT, NF- κ B, AP-1 interagissant avec leurs sites spécifiques de reconnaissance sur la région promotrice située en amont du gène de l'IL-2 (76).

La voie d'activation de Ras/MAPK aboutit à l'activation du facteur de transcription AP-1, un homo ou hétérodimère formé par les différents membres des familles Fos et/ou Jun. Cette voie de signalisation fait intervenir au départ, les PTK p56^{Lck} et p59^{Fyn} qui vont phosphoryler différentes protéines sur leurs résidus tyrosines et permettent l'intervention de protéines "adaptatrices", comme Shc et Grb2. Ces 2 protéines possèdent des domaines SH2 et SH3 (pour *Src homology domain-3*). La protéine Grb2 va permettre le rapprochement de facteurs d'échanges cytosoliques tel SOS (pour *Son Of Sevenless*) avec la protéine membranaire p21^{Ras}. Les facteurs d'échanges ont pour rôle de remplacer une molécule de GDP par du GTP, entraînant ainsi l'activation de Ras. La protéine Ras appartient à la famille des petites protéines G, qui lient les nucléotides guanidiques (GDP et GTP). L'activation de p21^{Ras} conduit à l'activation en cascade de différentes kinases dont Raf-1, et les MAPK comme les ERK et les JNK (pour *c-Jun N-terminal Kinase*) (69).

Figure n°3 : Représentation schématique de l'activation lymphocytaire T.



La troisième voie de transduction du signal dans le lymphocyte T est la voie faisant intervenir la PI3-K (voir Figure n°3). Cette voie reste toute fois encore hypothétique. Cette protéine majoritaire cytosolique, est une lipide kinase responsable de la phosphorylation des phospholipides en position 3'-OH du cycle inositol. Cette PI3-K est couplée essentiellement avec l'activation de la molécule de costimulation CD28 (77). Après ligation du CD8 avec ses ligands B7-1 ou B7-2, la PI3-K migre vers la membrane pour se rapprocher de ces substrats potentiels, le phosphatidylinositol, le phosphatidylinositol 4-monophosphate et le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. Cette voie aboutit à l'activation du facteur de transcription CD28RE (RE pour *response element*).

L'interleukine-2 et son récepteur de haute affinité.

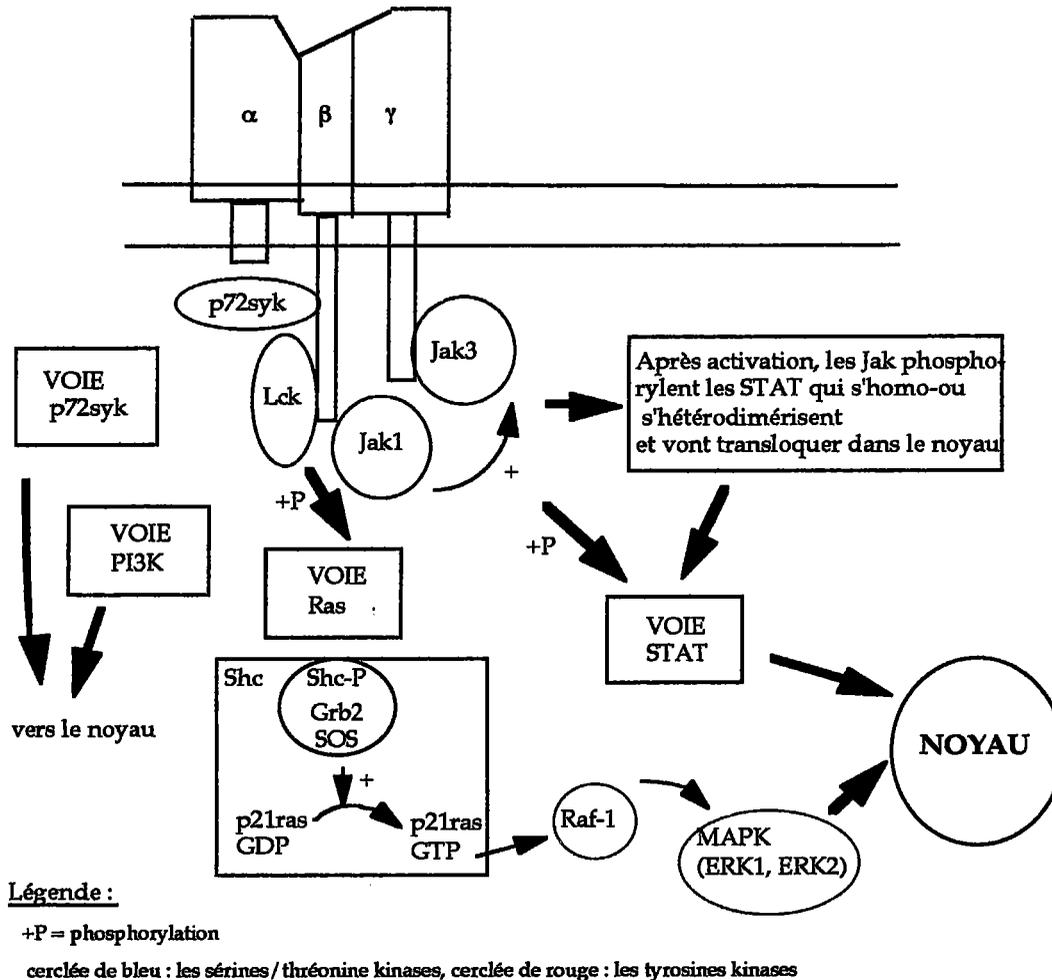
Un des buts de l'activation lymphocytaire est d'induire une prolifération et donc une expansion clonale importante des lymphocytes spécifiques de l'antigène. La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T permet son passage de la phase G0 du cycle cellulaire en G1. Le passage en phase S nécessite la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de haute affinité. L'IL-2 est produite suite à l'activation lymphocytaire, puis sécrétée. Elle agit de façon autocrine et paracrine. Le récepteur de haute affinité pour l'IL-2 ($K_d=10^{-11}M$) est constitué de l'association non covalente de trois sous-unités : p55, p64, p70 (78, 79) (voir aussi Figure n°4).

La sous-unité α p55 (CD25) qui est inductible, est le récepteur de faible affinité ($K_d=1,4 \cdot 10^{-8}M$). Elle possède un court domaine

intracytoplasmique de 13 acides aminés (aa) et ne peut ainsi participer seule à la transduction du signal médié par l'IL-2 (80). La chaîne α est exprimée en excès par rapport aux deux autres chaînes du récepteur pour l'IL-2 sur les lymphocytes T activés (81).

La chaîne β p70 serait exprimée constitutivement sur la membrane plasmique du lymphocyte T humain (82) et murin (83) et est présente sur les lymphocytes NK (84). La chaîne IL-2R β est commune avec le récepteur de l'IL-15 (85). Elle possède une région intracytoplasmique de 286 aa constituée de trois domaines : un domaine riche en sérines, un domaine riche en aa acides (nommé domaine acide) et un domaine riche en prolines. Ces différents domaines sont impliqués dans la transduction du signal sous le récepteur de l'IL-2. La région riche en sérines et le domaine acide sont requis dans l'activation de la p56^{lck} mais aussi dans la voie de la p21^{Ras} conduisant à l'induction de l'expression de c-fos et de c-jun (86). Le domaine riche en sérines est aussi impliqué dans l'activation de Jak1 et de la phosphotyrosine kinase p72^{Syk}, ceci a été démontré à partir de mutations ponctuelles ou de délétions réalisées au niveau de ce domaine. La chaîne β forme avec la chaîne γ le récepteur d'affinité intermédiaire ($K_d=10^{-9}M$).

Figure n°4 : Représentation schématique de la structure du récepteur de l'interleukine-2.



La chaîne γ est commune à différentes cytokines comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-15 (79, 87, 88). L'expression des chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2 est augmentée après reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T (82, 89). La phosphotyrosine kinase (PTK) Jak3 est associée à la région C-terminale de la chaîne γ .

L'interaction de l'IL-2 avec son récepteur a pour conséquence la phosphorylation sur des résidus tyrosines de nombreuses protéines. Le

récepteur pour l'IL-2 ne possédant pas d'activité tyrosine phospho-kinase (TPK) intrinsèque, on a cherché à identifier des TPK associées à ce récepteur. Les premiers candidates sont les TPK de la famille Src. La famille Src est composée de 9 membres, dont 3 sont exprimées dans le lymphocyte T : Lck, Fyn, Yes (86). Les Src kinases possèdent un domaine SH3 qui s'associe avec le domaine acide de la chaîne β du récepteur pour l'IL-2 et un domaine SH2 permettant la liaison avec un résidu tyrosine phosphorylé.

La région riche en sérine de la chaîne β du récepteur pour l'IL-2 s'associe avec Jak1 une TPK de la famille Jak (pour *Janus kinase*). Cette famille compte 4 membres : Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Contrairement aux TPK de la famille Src, elles ne présentent pas de domaines SH2 ou SH3. La fixation de l'IL-2 sur son récepteur produirait la formation d'un hétérodimère IL-2R β / γ c qui serait responsable de l'activation des kinases Jak. Ces kinases phosphoryleraient la chaîne β et γ du récepteur, ce qui aurait pour conséquence l'apparition de sites tyrosines phosphorylées qui permettraient l'assemblage d'autres molécules participant à la transduction du signal comme Shc (86). Les kinases Jak sont responsables de la phosphorylation des facteurs de transcription STAT (pour *Signal Transducers and Activators of Transduction*) (voir plus loin).

Ras est une protéine liant le GTP qui est active lorsqu'elle lie le GTP et inactive quand associée au GDP (voir plus haut). Un participant clé dans la voie Ras/MAP kinases est la protéine Shc. Deux domaines pouvant lier des résidus phosphorylés sur des tyrosines sont présents sur Shc : une

domaine SH2 et un domaine PTB (pour *PhosphoTyrosine Binding domain*). Entre ces 2 domaines se trouve une région riche en glycines et prolines, qui contient une tyrosine en position 317. Cette tyrosine 317 sera phosphorylée en réponse à l'IL-2, ce qui créera un site de liaison pour le domaine SH2 d'une autre protéine adaptatrice Grb2. Les 2 domaines SH3 de Grb2 médient une interaction constitutive mais aussi peut être inductible avec un facteur d'échange guanine nucléotide SOS (pour *Son of Sevenless*). En fait par un mécanisme encore inconnu l'association Shc-Grb2-SOS conduit à l'échange de GDP contre un GTP au niveau de Ras et permet l'activation de celui-ci. Ras active alors une sérine/thréonine Kinase Raf, qui elle-même active MEK, une autre sérine/thréonine kinase. MEK active à son tour une MAP kinase conventionnelle (ERK-1, ERK-2, ERK pour *extracellular regulated kinase*) qui transloque dans le noyau (86). La participation de Jak kinase(s) et des TPK de la famille Src semblent nécessaire pour l'activation de la voie Ras/MAP kinases.

La PI3-K est une enzyme hétérodimérique composée d'une sous unité régulatrice de 85-KDa et d'une sous unité catalytique de 110-KDa. Cette enzyme possède deux fonctions. D'une part, elle phosphoryle le phospho-inositol-4,5-biphosphate en position D3 du cycle inositol (voir plus haut) et d'autre part, elle est douée d'une activité sérine/thréonine kinase. La sous unité régulatrice est une protéine adaptatrice possédant un domaine SH3 et une région analogue aux protéines activant les GTPases de la famille Rho/Rac. Les petites protéines G et en particulier celle de la famille Rho semblent impliquer dans la transduction du signal sous le récepteur pour l'IL-2 (90). La participation de la PI3-K sous le

récepteur pour l'IL-2 reste encore peu clair, il semble que PI3-K soit couplé avec le récepteur pour l'IL-2 par l'intermédiaire de Fyn (86). Les événements biochimiques qui suivent l'activation de PI3-K ne sont pas encore très bien caractérisés. Mais, il semble que PI3-K active la p70S6 kinase, une sérine/thréonine nécessaire pour la mitogénèse (86). Le phospho-inositol-3,4,5-triphosphate est un activateur des PKC calcium indépendantes δ , ϵ (86). Le rôle de PI3-K dans la cascade biochimique faisant suite à l'activation du récepteur pour l'IL-2 reste à définir.

L'activation de Jak3 passe par la fixation de Jak1, impliquant ainsi la région riche en sérines de la chaîne β et donc une coopération entre les domaines intracytoplasmiques de ces deux chaînes du récepteur pour l'IL-2 (91). Ces PTK phosphorylent soit le récepteur, soit des protéines cytoplasmiques appartenant à la famille des facteurs de transcription, les STAT (pour *Signal Transducers and Activators of Transduction*). Après phosphorylation par les Jak, ces protéines s'homo ou s'hétérodimérisent par l'intermédiaire de leur région SH2 phosphorylée et transloquent dans le noyau (92). Dans le noyau, elles reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN situées dans la région promotrices de certains gènes, comme c-fos (92).

Une autre kinase qui jouerait un rôle dans la transduction du signal sous le récepteur pour l'IL-2 serait la PTK Syk, qui possède un domaine SH2. La région riche en sérines de la chaîne β est nécessaire pour l'association avec Syk. Donc Syk comme Jak1 participe à l'induction de c-myc (86).

1-3-2 Effecteurs de l'immunité spécifique

Le but ultime de l'activation et de la différenciation lymphocytaire est l'obtention de différents effecteurs (CTL, anticorps) qui permettront une réponse efficace du système immunitaire. Le lymphocyte CD4+ occupe une position centrale dans la réponse immunitaire par la production des cytokines nécessaires à la différenciation des précurseurs des CTL et des lymphocytes B, mais aussi par l'interaction directe avec le lymphocyte B ou CD8+. Les CTL possèdent une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules infectées par un agent pathogène ou les cellules tumorales. Les anticorps spécifiques de l'antigène produits par les plasmocytes participent à l'élimination de l'antigène par opsonisation en présence du complément ou en coopération avec les cellules de l'immunité non spécifique (NK, phagocytes) responsables de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Cytotoxicité médiée par le lymphocyte T cytotoxique CD8+

Elle s'effectue en deux phases : la reconnaissance puis la lyse de la cellule cible.

Dans le cas des lymphocytes CD8+ le complexe CD8/CD3/RCT situé sur le lymphocyte T reconnaît le complexe antigène peptidique/ CMH de classe I. Les peptides dérivés d'une protéine synthétisée dans le cytosol de la cellule sont présentés par les molécules de classe I. Ils sont constitués de 8 à 10 acides aminés (65).

Comme pour les cellules NK (voir ci-dessus), deux principaux mécanismes de cytotoxicité ont été décrits pour les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ (93). Après reconnaissance de l'antigène, le CTL libère, de façon polarisée vers la cellule cible, la perforine et les granzymes contenus dans les granules cytotoxiques. L'activation des CTL conduit aussi à l'expression de Fas Ligand (FasL) à la surface. L'interaction de FasL avec son récepteur présent sur la cellule cible conduit à la mort de celle-ci par apoptose (93). Des études récentes rapportent que l'activation de ces deux mécanismes de cytotoxicité (exocytose granulaire et expression de FasL) n'utilisent pas les mêmes voies de signalisation biochimique (94-96).

Le lymphocyte B

La production d'anticorps dirigés contre un antigène résulte à la fois de la reconnaissance par le lymphocyte T et le lymphocyte B. Dans ce cas, le lymphocyte B et le lymphocyte T doivent reconnaître des épitopes du même "complexe moléculaire" pour pouvoir interagir. C'est-à-dire que le lymphocyte B reconnaît un antigène par l'intermédiaire de ces immunoglobulines de surface d'isotype IgM ou IgD, puis le complexe antigène-immunoglobuline est internalisé et dégradé. Des peptides dérivés du complexe antigénique sont exprimés à la surface du lymphocyte B liés aux molécules de classe II du CMH, puis reconnus par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺. Le lymphocyte B est alors activé par le lymphocyte T auxiliaire. En effet, l'interaction spécifique entre le lymphocyte B présentant l'antigène et le lymphocyte T conduit à

l'expression du ligand du CD40 (CD40L) à la surface de ce dernier qui interagit avec le CD40 présent à la surface des cellules B et à la production de cytokines comme l'interleukine-4 (IL-4), l'interleukine-5, l'interferon- γ (IFN- γ) et l'interleukine-6. Ces cytokines produites par les lymphocytes T auxiliaires permettent dans un premier temps la prolifération des cellules B, puis la différenciation en plasmocytes (64). La production d'anticorps par les plasmocytes issus des lymphocytes B s'effectue en deux temps : l'apparition des immunoglobulines G (IgG) est précédée par celle précoce des immunoglobulines M (IgM) (97). Ce processus est appelé commutation isotypique. Cette commutation ne se produit pas chez les patients présentant un déficit héréditaire en ligand du CD40 (CD40L), caractérisé par un taux élevé d'IgM. Ceci démontre le rôle de l'interaction CD40/CD40L dans ce processus (64). Des cytokines produites par le lymphocyte T interviennent aussi dans cette commutation isotypique. L'IL-4 induit préférentiellement la commutation d'IgM vers IgG1 (chez la souris) ou IgG4 (chez l'homme) et IgE, alors que le TGF- β (pour *Transforming Growth Factor*) conduit plutôt à la production d'IgG2b et IgA. Enfin, l'IFN- γ produit par le lymphocyte T induit la commutation vers les IgG2a et IgG3 (64).

2-Déficits de l'immunité spécifique et conséquences pathologiques.

Beaucoup de connaissances sur le développement du système immunitaire et l'importance de chaque composant de ce système en

réponse à une agression nous sont venues de l'étude des déficits immunitaires héréditaires ou acquis (comme le syndrome d'immunodéficience acquis ou SIDA), ou encore iatrogène.

Les déficits qui affecte la production d'anticorps comme l'agammagobulinémie liée au sexe (ou maladie de Burton) ont pour conséquences une plus grande susceptibilité aux infections bactériennes (à bactéries extracellulaires, comme les streptococcies), ainsi qu'aux infections virales (virus *Vaccinia*, entérovirus, possibilité de poliomyélites postvaccinales graves) à localisation ORL, bronchiques et digestives. Ceci s'explique par l'absence de production d'anticorps neutralisants. On retrouve une sensibilité aux mêmes infections à bactéries extracellulaires dans le syndrome lié à l'X avec hyperproduction d'IgM, qui est caractérisé par une déficience en CD40L présent sur le lymphocyte T qui permet la commutation isotypique IgM vers IgG (64, 98).

Le SIDA et les déficits héréditaires affectant de façon prédominante les cellules T (déficit en purine nucléoside phosphorylase, déficit de la chaîne γ du récepteur pour l'IL-2....) sont associés à une augmentation des infections bactériennes à bactéries intracellulaires (comme le *Listeria* ou les mycobactéries), aux infections virales (Cytomégalovirus, Varicelle, zona..), parasitaires (Toxoplasme) et mycoses (*Pneumocystis carinii*, *cryptococcus*..) (98).

La persistance d'une immunosuppression peut être à l'origine du développement de tumeurs. En 1988, Penn rapporte les résultats d'une étude réalisée par le Cincinnati Transplant Tumor Registry (CTTR) sur 3040 transplantations d'organes, et les différentes tumeurs qui y sont

associées (7). Les tumeurs surviennent en moyenne vingt-trois mois après la transplantation chez des patients traités quotidiennement par des immunosuppresseurs en association (Azathioprine/Prednisone ou Azathioprine/Prednisone/Cyclosporine A). Il s'agit d'un type particulier de tumeurs, comme des cancers cutanés (sarcome de Kaposi 39%), des carcinomes *in situ* du col de l'utérus 8% et des hémopathies malignes touchant le système lymphoïde (lymphomes malins non hodgkiniens 27%) (7). L'immunosuppression prolongée induit un état de dérégulation du système immunitaire qui permet l'activation de certains virus oncogéniques. Il s'agit du virus de Epstein-Barr (EBV) incriminé dans la survenue de lymphomes malins non Hodgkiniens, ou des *Papilloma virus* mis en cause dans le développement des carcinomes de la vulve, du périnée, de l'anus, ou encore la souche d'*Herpes virus* H8 responsable du développement des sarcomes de Kaposi (99).

L'augmentation de l'incidence des cancers a aussi été décrite dans des pathologies infectieuses associées avec une forte immunodépression comme l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) responsable du SIDA ou la malaria. Chez les patients atteints de SIDA, on note une incidence accrue de lymphomes non hodgkiniens, de sarcomes de Kaposi et des cancers de l'anus ou du col de l'utérus (8). Ces cancers font parties des affections qui définissent le SIDA depuis 1993. Dans les zones d'endémie de la malaria, on décrit une augmentation importante de l'incidence de lymphomes de Burkitt et de sarcome de Kaposi. On pense à l'heure actuelle que l'immunosuppression induite par la malaria est responsable d'une diminution de la réponse immunitaire contre les

cellules B transformés par les virus EBV permettant ainsi le développement de ce type de lymphome. Le même mécanisme serait proposé pour le sarcome de Kaposi.

3- Homéostasie calcique et réponse immunitaire

Le niveau de calcium intracellulaire ionisé (Ca^{2+i}) détermine l'activité des cellules T (voir Figure n°5). Des modifications du niveau intracellulaire de calcium (Ca^{2+i}) interviennent au cours de la transmission intracellulaire du signal après reconnaissance de l'antigène.

3-1- Les sites calciques dans le lymphocyte T

Le réticulum endoplasmique (RE) constitue la source principale de calcium mobilisable dans le lymphocyte T. Pour séquestrer le calcium en excès dans le RE, les pompes calciques de la membrane de cet organite utilise l'Adénosine Triphosphate (ATP). Ces pompes sont appelées SERCA (pour *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*) (100).

La mitochondrie est aussi un réservoir de calcium intracellulaire, mais elle n'intervient pas dans la transmission des signaux cellulaires. Les ions Ca^{2+} de la mitochondrie jouerait un rôle dans le couplage entre le transport des protons au niveau de la membrane interne de cet organite et la synthèse d'ATP (101).

3-2- Mobilisation du calcium intracellulaire (Figure n°5)

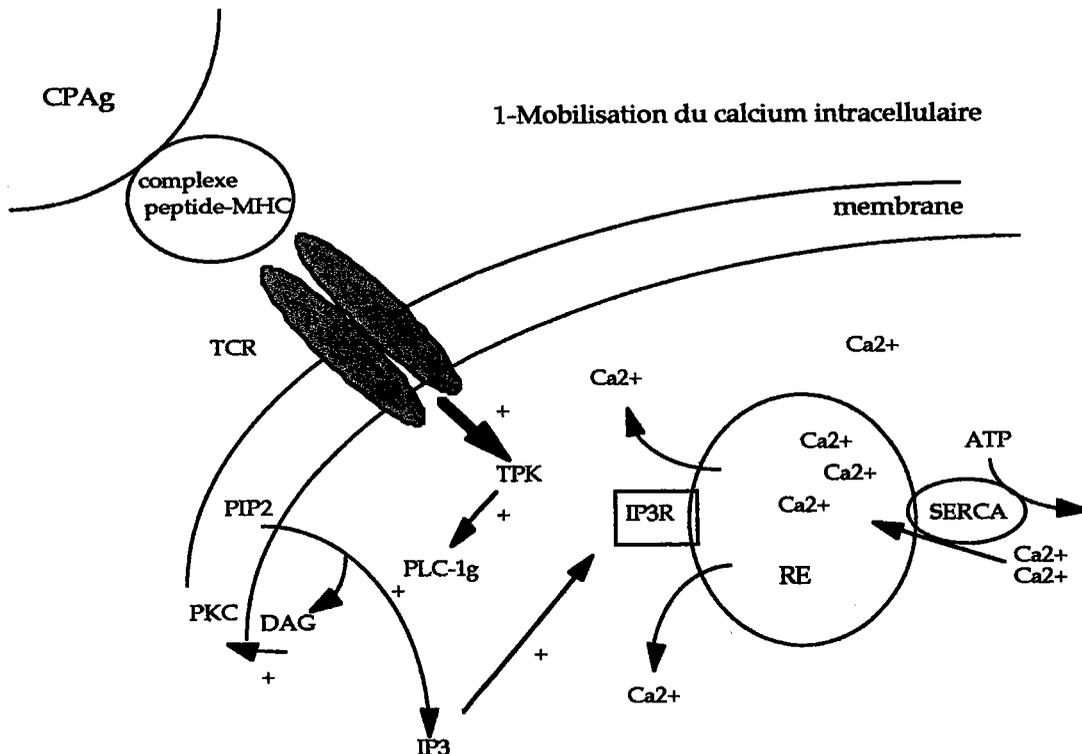
La mobilisation du calcium séquestré s'effectue par l'ouverture de canaux calciques après fixation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) sur son récepteur localisé au niveau du RE. L'IP3 est produit après clivage du phosphatidyl inositol-4,5-biphosphate par la PLC-1 γ . L'IP3 peut alors diffuser jusqu'à son récepteur sur le RE.

Le récepteur de l'IP3 est un tétramère qui possède une activité de canal ionique. Le récepteur pour l'IP3 possède plus de 40% d'homologie avec certaines régions du récepteur pour la ryanodine qui est présent sur le RE des cellules musculaires.

Récemment, il a été démontré que l'immunophiline FKBP12 (pour *FK506 Binding Protein 12*) était physiquement associée avec les canaux calciques du récepteur pour l'IP3 (102) et la Calcineurine (103). L'association de ces 3 protéines, récepteur de l'IP3, FKBP12 et Calcineurine au niveau du RE expliquerait selon les auteurs les fluctuations du taux de calcium intracellulaire observées après l'activation du complexe RCT/CD3. En effet, la fixation de l'IP3 sur son récepteur induit la libération de calcium du RE, via le canal du récepteur à l'IP3. L'augmentation du taux de calcium intracytoplasmique active la PKC, qui phosphoryle alors le récepteur pour l'IP3 et donc permet une sortie encore accrue de calcium du RE. L'augmentation de calcium intracellulaire active aussi la Calmoduline et la Calcineurine (voir ci-dessus). La Calcineurine, une fois activée s'associe alors avec le complexe FKBP12-récepteur pour l'IP3 via la FKBP12. Grâce à son activité phosphatasique, la Calcineurine

déphosphoryle alors le récepteur de l'IP3 ce qui conduit à une réduction du flux de calcium du RE vers le cytosol (103). Ces résultats permettent de comprendre pourquoi lorsque les valeurs de calcium intracellulaire sont proches des concentrations de repos (environ 300 nM), le calcium est alors co-activateur des récepteurs de l'IP3. Par contre, lorsque le taux de calcium intracellulaire augmente trop (supérieur à 500 nM), celui-ci diminue sa propre libération. La persistante oscillation du taux de calcium intracellulaire après activation du lymphocyte T est nécessaire pour l'induction de la transcription de l'IL-2 (104).

Figure n°5 : La réponse calcique après activation du lymphocyte T. Représentation schématique de la mobilisation du calcium intracellulaire.



Abréviations utilisées dans la figure :

DAG = diacylglycérol, IP3 = Inositol-1,4,5-triphosphate, IP3R = récepteur pour l'IP3, PIP2 = phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate, PLC-1g = Phospholipase C-1 γ , PKC = protéine kinase C, RE = réticulum endoplasmique SERCA = Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases TPK = tyrosines kinases (p56Lck, p59Fyn)

3-3- Entrée capacitive de calcium (Figure n°6)

L'entrée de calcium extracellulaire (voir Figure n°6) est couplée à la déplétion du calcium intracellulaire du RE. Ce processus a été baptisé "entrée capacitive de calcium" par Putney et collaborateurs (105).

L'activation de l'entrée capacitive de calcium nécessite le couplage entre le RE appauvri en calcium et la membrane plasmique. Différents médiateurs ont été impliqués dans ce processus.

Selon certains travaux, ce couplage pourrait être assuré par l'IP3 lui-même (106, 107) et/ou son congénère l'inositol-1,3,4,5-tétrakisphosphate (IP4) (108), tous deux produits de l'activité de la voie de la PLC. Des récepteurs à l'IP3 ont été décrits au niveau de la membrane plasmique d'une lignée lymphocytaire (106). Ces observations attendent encore confirmations, car l'activation de l'entrée capacitive de calcium peut aussi se manifester sans participation de la voie de l'IP3. En effet, les inhibiteurs des pompes SERCA, comme la Thapsigargin induisent l'entrée de calcium extracellulaire (109, 110).

Il apparaît donc que la déplétion du RE en calcium produit un (ou plusieurs) messenger(s) qui provoquent l'activation de l'entrée de calcium capacitive en atteignant la membrane plasmique. Le candidat le plus sérieux est un peptide le CIF (pour *Calcium-Influx Factor*) isolé dans plusieurs types cellulaires dont la lignée T humaine Jurkat (111). L'identification moléculaire du CIF reste à achever, il faut retenir que ce composé de faible poids moléculaire est dégradé par les phosphatases (111, 112).

Il n'est pas encore strictement établi que tous les messagers potentiels recensés précédemment activent l'entrée de calcium extracellulaire via le même canal. Le principal canal a été défini par des techniques de patch-clamp et ainsi nommé I_{crac} (pour *calcium-release-activated-channel*). Plusieurs autres canaux membranaires perméables au calcium sont susceptibles de contribuer à l'influx de calcium extracellulaire comme l'échangeur sodium/calcium (116) et les canaux potassium/calcium (117).

La terminaison du signal calcique (voir Figure n°6) est assurée pour une part par la réintégration des ions calciums dans le RE, grâce aux pompes SERCA, mais également par l'extrusion d'une partie des ions Ca^{2+} vers l'extérieur de la cellule, grâce à des pompes et des échangeurs calciques de la membrane plasmique comme l'échangeur sodium/calcium (116).

Un cas de déficit héréditaire des cellules T associé à un défaut d'influx calcique transmembranaire a été rapporté chez un jeune garçon de 3 mois. La mobilisation du calcium intracellulaire après activation était normale, mais l'entrée de calcium extracellulaire était abolie, ce qui avait pour conséquence une augmentation très fugace de Ca^{2+} ic. Le nourrisson souffrait de diarrhées liées à une infection à CMV. La prolifération de ces lymphocytes en réponse à la PHA, un anticorps anti-CD3, ou un couple d'anticorps anti-CD2 était diminuée par rapport à celle d'enfants du même

âge. L'addition d'IL-2 permettait la restauration de cette prolifération. L'expression du CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) était normale après activation. La seule autre anomalie notée concernait une diminution de l'activité liante *in vitro* de NF-AT sur un oligonucléotide spécifique. Il est intéressant de noter qu'alors que le déficit affectait toutes les cellules sanguines mononuclées, les fonctions des plaquettes, des neutrophiles et des lymphocytes B étaient conservées (118).

4-Hydrocarbures polycycliques aromatiques et immunosuppression

La dioxine ou 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-p-Dioxine (TCDD) et les molécules de sa famille sont de loin les toxiques de l'environnement les plus étudiées du fait de leur persistance et de leur accumulation dans l'environnement, ainsi que de la survenue d'accidents (Seveso, Missouri, Asie du sud-est) (119). La dioxine est le plus puissant immunosuppresseur connu chez l'animal, la dose active la plus faible étant de l'ordre du ng/ml (120). Les données rapportées chez l'homme diffèrent : aucune perturbation n'a été observée lors de l'accident de Seveso (121), par contre lors de l'intoxication dans le Missouri les résultats font part d'une diminution de la réaction d'hypersensibilité retardée (122).

Le mécanisme d'action immunosuppresseur de la dioxine passe par la fixation sur un récepteur intracellulaire Ah (Aryl hydrocarbon). Après passage dans le noyau et fixation sur l'ADN, le complexe dioxine/récepteur Ah induit ou inhibe l'expression de certains gènes. Citons l'induction du Cytochrome P4501 A1 (123), et l'activation du gène

de l'IL-1 β et de l'Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène-2 (123). Ces derniers participent tous deux à l'homéostasie cellulaire et à la dégradation de la matrice extracellulaire (123). Il est à noter que comme de nombreux agents promoteurs de tumeurs la dioxine possède la capacité d'induire une réponse inflammatoire et une différenciation cellulaire dont l'IL-1 β et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène entre autres pourraient être responsables.

En ce qui concerne les HPA non halogénés, l'immunosuppression induite par certains d'entre eux n'est pas toujours médiée par le récepteur Ah comme le montre les résultats de Thurmond et collaborateurs sur le DMBA (124). En effet, le DMBA à 40 μ M *in vitro* inhibe la prolifération en réponse à des mitogènes des cellules T (Concanavaline A, phytohémaglutinine) et B (lipopolysaccharide), la réaction lymphocytaire mixte (MLR) et la génération des CTL allogéniques. Ces résultats sont équivalents que l'on utilise des splénocytes de souris B6C3F1 (souche Ah "sensible") ou DBA/2 (souche Ah "résistante") (124). Ceci démontre bien que le mécanisme immunosuppresseur du DMBA est indépendant du récepteur Ah. Par contre, des différences de sensibilité des souches murines ont été notées pour le méthyl-3-cholanthrène (MCA), notamment pour la prolifération *ex vivo* des splénocytes en réponse à la phytohémaglutinine (PHA). En effet, le MCA diminue la prolifération des splénocytes de souris C57Bl/6 ou B6C3F1 en réponse à ce mitogène, lorsque le MCA est administré par injection intrapéritonéale unique à la dose de 5 μ g/g. Alors que cette réponse n'est réduite que pour la plus forte

dose de 50 µg/g lors de l'utilisation de la souche "Ah résistante" DBA/2 (25).

Les paramètres immunopathologiques sont des paramètres statiques évalués dans les études *ex vivo*, couramment utilisés en Toxicologie réglementaire (125). Il s'agit de paramètres hématologiques (formule sanguine) et de l'analyse anatomo-pathologique d'organes lymphoïdes primaires ou secondaires. L'absorption orale de 0,5, 5 ou 10 µg/g/jour de DMBA par des souris B6C3F1 femelles pendant 10 jours modifie les paramètres immunopathologiques analysés 3 à 5 jours après l'arrêt du traitement. Le poids de la rate et la cellularité de la moëlle osseuse et de la rate des souris exposées à la plus forte dose (10 µg/g/jour) sont significativement réduits par rapport au lot de souris contrôle de 28%, 58% et 26% respectivement (126). Le poids du thymus est modifié significativement 4 semaines après exposition de souris femelle B6C3F1 à une dose totale de 50 µg/g de DMBA répartie sur 2 semaines (13). Les paramètres immunopathologiques ne sont pas affectés chez les souris traitées par injection s.c. de 40 µg/g de B(a)P pendant 14 jours (12).

La biodistribution du DMBA marqué au tritium et de ses métabolites dans les différents organes varient en fonction du temps après administration orale (127). Juste après l'ingestion, de fortes concentrations de DMBA sont trouvées dans les organes lymphoïdes associés au tractus digestif comme les plaques de Peyer. Six heures après l'ingestion, le DMBA et ses métabolites sont retrouvés en plus grande quantité dans les

organes lymphoïdes comme la rate et le thymus que dans des organes comme le foie où a pourtant lieu le métabolisme de ce xénotique. Le thymus au niveau duquel se déroule la maturation des cellules T précurseurs CD3- CD4- CD8- fixe le DMBA et ses métabolites. Ceci démontre l'affinité du DMBA pour les organes lymphoïdes. Une exposition périnatale répétée de souris B6C3F1, à 2 µg/kg de dioxine pendant 15 jours, entraîne une atrophie thymique à la naissance (120). Le système immunitaire est donc un organe cible potentiel des HPA.

Dans une autre étude, le pourcentage des lymphocytes T dans la rate est déterminé *ex vivo* par cytométrie en flux après marquage à l'aide des anticorps Thy-1.2, Lyt-1 et Lyt-2. Aucune diminution de ces trois marqueurs des lymphocytes T n'est observée immédiatement après l'exposition des animaux (14). Aux doses intermédiaires de 50 µg/g (doses cumulatives), le DMBA diminue sélectivement le pourcentage de lymphocytes T auxiliaires caractérisés par l'expression de Lyt-1 de 48% de cellules positives pour le contrôle contre 38% pour le lot de souris traitées (14). A la dose de 100 µg/g, le nombre des lymphocytes T cytotoxiques déterminés par l'expression de Lyt-2 est aussi réduit par l'exposition au DMBA, mais pas les macrophages (14). Le lymphocyte T semble donc la cible privilégiée du DMBA *in vivo*.

4-1 Effets sur la réponse immunitaire non spécifique

4-1-1 Activité cytotoxiques des macrophages

Le DMBA n'a pas d'effet significatif sur les macrophages murins après exposition *in vivo*. Ainsi, le DMBA administré à raison de 10 µg/g/jour pendant 10 jours ne modifie pas significativement les capacités fonctionnelles des macrophages péritonéaux (lyse des cellules tumorales MBL-2, production d'H₂O₂), bien que leur nombre, déterminé par l'anticorps monoclonal anti-MAC1 soit réduit après exposition à ce toxique (128).

Par contre, l'exposition à une injection sous-cutanée de 600 µg/souris de méthyl-3-cholanthrène (MCA) produit une diminution significative des capacités phagocytaires des macrophages spléniques et de façon moindre des macrophages hépatiques. Cet effet persiste sur une période de 13 semaines après cette seule injection (25).

In vitro, le DMBA n'affecte pas la production de l'interleukine-1 (IL-1) (129), ni la production d'IL-6 par les macrophages spléniques en réponse au LPS d'*E. coli*. Ces études confirment l'absence d'effet du DMBA sur les macrophages *in vivo* et *in vitro* .

4-1-2 Activité cytotoxique non restreinte au CMH

Le MCA a un effet important sur la lyse NK. Une seule injection sous-cutanée de 100 µg/animal diminue la cytotoxicité contre la lignée YAC-1 des splénocytes murins, 5 jours après cette injection. Cet effet n'est plus observé 15 jours après l'injection. Néanmoins, la préincubation *in vitro* pendant une heure des splénocytes avec l'Interféron-γ permet d'abolir l'effet du MCA (25).

La lyse NK médiée par les splénocytes de souris B6C3F1 exposées pendant 10 jours à une dose totale de 50 µg/g de DMBA est inhibée de 24% par rapport à un lot de souris témoin (128). Cette immunosuppression persiste pendant 4 et 8 semaines après l'arrêt de l'exposition (13). Par contre, le B(a)P et son congénère le B(e)P après une exposition de 10 jours soit une dose totale de 400 µg/g, n'ont aucun effet significatif sur la lyse NK (12).

4-2- Effets sur la réponse immunitaire spécifique

4-2-1 Prolifération des lymphocytes T

L'étude de la prolifération des lymphocytes T utilise des mitogènes pour stimuler les effecteurs cellulaires. La concanavaleine A (ConA), la phytohémagglutinine (PHA), ou certains anticorps (anti-CD3...) induisent spécifiquement la prolifération des lymphocytes T. La concanavaleine A

(ConA) possède une spécificité pour les groupements riches en α -glucose et α -mannose des cellules T. Il semble que la ConA se fixe sur le complexe CD3 du RCT (130). La phytohémagglutinine (PHA), une autre lectine végétale se fixe plus spécifiquement sur les lymphocytes T au niveau des groupements N-acétyl-glucosamine. La PHA agit après fixation sur la molécule CD2 mais aussi sur le complexe CD3/RCT (68). La lymphoprolifération des cellules T en réponse à un anticorps monoclonal anti-CD3 permet d'évaluer l'effet des HPA sur une voie d'activation de la cellule T connue, et dont le point d'impact de l'agent mitogène est parfaitement identifié. L'AT3 ou 145-2C11 est un anticorps monoclonal de type IgG issu de l'immunisation de hamsters par un clone T-cytotoxique murin (131). Cet anticorps est spécifique de la sous unité ϵ du complexe CD3 murin. L'OKT3 est un anticorps monoclonal de type IgG2a dirigé contre le CD3 humain.

Les tests de prolifération *ex vivo* des splénocytes de souris B6C3F1 femelles exposées à 0,5, 5, 10 $\mu\text{g/g}$ de DMBA pendant 10 jours en réponse à la Concanavaleine A (ConA) et à la phytohémagglutinine (PHA) sont affectés dès la dose de 10 $\mu\text{g/g/jour}$. La réaction lymphocytaire mixte (MLR) exploite la capacité des lymphocytes T CD4+ à proliférer en présence de lymphocytes allogéniques, c'est-à-dire possédant des différences au niveau des antigènes de classe II du CMH (132). En réponse à un signal allogénique, le DMBA administré à la dose de 10 $\mu\text{g/g}$ inhibe la prolifération des splénocytes de souris B6C3F1 femelles *ex vivo* (128). Le

B(a)P ou le B(e)P administré à la dose 40 µg/g/jour pendant 14 jours n'affectent pas la MLR (12).

Une autre étude confirme que la prolifération *ex vivo* de lymphocytes issus des plaques de Peyer en réponse à la PHA est réduite après exposition orale au même dose de DMBA de souris femelles B6C3F1 (133).

L'effet immunosuppresseur du DMBA sur le lymphocyte T persiste après exposition comme cela avait été décrit pour la fonction NK, puisque dans les mêmes conditions expérimentales, la diminution de prolifération des splénocytes en réponse à la ConA et la PHA est encore observée 4 et 8 semaines après l'arrêt de l'exposition au DMBA (13).

L'exposition de splénocytes murins à 40 µM de DMBA *in vitro* diminue leur prolifération après activation par la ConA, la PHA (124) ou par l'anticorps anti-CD3 145-2C11 (134). A cette même concentration, le DMBA inhibe aussi la réaction lymphocytaire mixte (MLR) et la génération des CTL (124). Le DMBA n'a pas d'effet sur l'induction polyclonale des CTL par la PHA, par contre l'induction polyclonale des CTL par l'anti-CD3 145-2C11 est inhibée de 58% dès 20 µM de DMBA (135). Comme avec les splénocytes murins, le DMBA à 40 µM inhibe la prolifération de lymphocytes périphériques humains en réponse à la PHA et à l'OKT3 de 75% et 65% respectivement (136). Ceci démontre que le

DMBA entraîne un dysfonctionnement de la reconnaissance de l'antigène

par le complexe CD3/RCT des splénocytes murins et des lymphocytes périphériques humains.

La prolifération des lymphocytes T étant inhibée par le DMBA, la question du mécanisme responsable de cette inhibition s'est donc posée. L'IL-2 étant le principal facteur de croissance des lymphocytes T, l'interaction du DMBA avec la production d'IL-2 a donc été étudiée. La production d'IL-2 par des splénocytes de souris B6C3F1 exposés *in vitro* au DMBA et stimulés par la Concanavaline A est diminuée de façon dose-dépendante (136). Après activation par la ConA, le DMBA diminue l'expression du récepteur de haute affinité de l'IL-2 déterminée par la technique de "binding" avec de l'IL-2 marquée à l'iode 125, mais l'affinité du récepteur n'est pas modifiée (136). En revanche, le DMBA ne modifie pas l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (ou CD25) mesurée par cytométrie en flux avec l'anticorps anti-CD25, 7D4 (136). L'addition d'une population naïve de lymphocytes T ou d'IL-2 exogène permet de restaurer l'activité CTL *in vitro* de splénocytes murins exposés au DMBA. L'IL-2 doit être additionnée le même jour que le DMBA pour pouvoir rétablir l'activité CTL (137). Les effets du DMBA sur la voie de l'IL-2 sont responsables de l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T, ainsi que la suppression de la fonction auxiliaire des lymphocytes CD4+ lors de la génération de CTL. La production d'IL-2 est une des cibles privilégiées du DMBA.

4-2-2 Homéostasie calcique

L'augmentation du calcium est un phénomène précoce après l'activation lymphocytaire (68, 138). Elle précède dans le temps la production d'IL-2, qui semble un évènement calcium-dépendant (139). L'augmentation du taux de calcium intracellulaire déterminée par cytométrie en flux (140, 141) peut être observée pendant plusieurs heures après stimulation du complexe RCT/CD3, ce qui reflète en fait la somme des oscillations du taux de calcium intracytoplasmique non synchronisées qui se produisent au niveau de chaque cellule de cette population (100).

Le DMBA diminue l'amplitude du pic de calcium intracellulaire après activation par la PHA de splénocytes murins (133). La PHA induit une augmentation de calcium intracellulaire, dont une partie est attribuable au CD3 et l'autre partie, dûe au CD2 est indépendante du complexe CD3/RCT (68).

Le DMBA diminue l'augmentation de calcium intracellulaire qui fait suite à l'activation par la PHA de la lignée leucémique T CD4+ humaine Jurkat (142) ou de lymphocytes périphériques humains (143, 144). Le pic de l'augmentation de Ca^{2+}_{ic} est retardé de façon dose-dépendante lors de la stimulation des lymphocytes périphériques humains par la PHA (143). De même, le DMBA diminue de façon dose dépendante l'augmentation de Ca^{2+}_{ic} après activation de la lignée T humaine HBP-ALL par un anticorps anti-CD3 (145).

Le DMBA interfère avec l'élévation calcique qui suit l'activation lymphocytaire, mais il perturbe aussi l'homéostasie calcique du lymphocyte T (133, 142-146). Ainsi, il augmente le niveau de base du calcium intracellulaire indépendamment de toute activation cellulaire (142-144, 146).

Sur une lignée T humaine (HPB-ALL), le DMBA entraîne la phosphorylation de la PLC1 γ en activant les tyrosines kinases p56^{lck} et p59^{fyn} (145). Si le temps de contact dépasse 30 minutes, la PLC1 γ est alors déphosphorylée ce qui correspondrait à une désactivation par phosphorylation des sérines. La conséquence de l'activation de la PLC 1 γ est la production d'IP3 qui se fixe sur son récepteur au niveau du RE et libère le calcium intracellulaire (145).

Des différences apparaissent entre les résultats rapportés sur l'interaction du DMBA avec l'homéostasie calcique des lymphocytes T quiescents, selon que ces lymphocytes soient d'origine humaine ou murine. En effet, Burchiel et coll. décrivent une augmentation de calcium basal dans les splénocytes murins seulement après 4 heures d'exposition et uniquement pour la plus forte concentration 30 μ M (133).

La terminaison du signal calcique est assurée pour une part par la réintégration des ions calciums dans le réticulum, grâce aux pompes SERCA, mais également par l'extrusion d'une partie des ions calcium vers l'extérieur de la cellule, grâce à des pompes et des échangeurs calciques de la membrane plasmique. Récemment, Krieger et collaborateurs ont

démontré que le DMBA à 10 μM et le B(a)P dans une moindre mesure étaient responsables d'une augmentation persistante du $\text{Ca}^{2+}_{\text{ic}}$ dans la lignée HBP-ALL T par inhibition des pompes SERCA (147). D'après cette étude, il serait possible de distinguer parmi les HPA : ceux comme le benzo(e)pyrène et l'anthracène responsables uniquement d'une augmentation précoce de $\text{Ca}^{2+}_{\text{ic}}$ faisant intervenir les tyrosines kinases, de ceux comme le DMBA, le B(a)P et le dibenz(a,h)anthracène induisant aussi une augmentation tardive en interférant avec les pompes SERCA. On compterait parmi ces seconds composés, les HPA aux propriétés immunotoxiques (148). L'inhibition des pompes SERCA par certains HPA n'est pas restreinte au système immunitaire, mais s'étend aussi à d'autres organes comme le système cardiaque (147).

La perturbation de l'homéostasie calcique est responsable des effets délétères du DMBA, mais aussi d'autres HPA comme la dioxine sur le système immunitaire. *In vitro*, la dioxine altère l'homéostasie calcique de thymocytes murins. Elle induit une augmentation du calcium basal dans ces thymocytes de souris B6C3F1 (149). La perturbation de l'homéostasie calcique est aussi impliquée dans l'apoptose de thymocytes de jeunes rats mâles Sprague-Dawley exposés à 10 nM de dioxine (149, 150). Pourtant, il semble que l'atrophie thymique résulterait de l'interaction de la dioxine avec l'épithélium thymique riche en récepteur Ah, et non de l'interaction directe avec les thymocytes (30). De même, l'apoptose ou mort cellulaire programmée observée dans les thymocytes et les lymphocytes des plaques de Peyer après exposition *in vivo* de souris B6C3F1 femelle à une dose

totale de 140 µg/kg ou *in vitro* des cellules lymphoïdes des mêmes souris à 30 µM de DMBA a été attribuée à la propriété que possède le toxique d'interférer avec l'homéostasie calcique (133, 146). Mais, l'augmentation de calcium intracellulaire est un événement biochimique inconstamment associé à l'apoptose.

L'utilisation conjointe d'un ester du phorbol (phorbol myristate acétate, PMA) et d'un ionophore calcique permet l'activation du lymphocyte directement sans solliciter les événements membranaires (activation des tyrosines kinases, de la PLC) (151). Le PMA active certains isoenzymes de la PKC (α , β , ϵ) (152). L'ionophore calcique agit en synergie avec la PMA et induit la prolifération lymphocytaire. En présence de PMA et d'ionophore calcique A23187, le DMBA ne modifie plus la prolifération de lymphocytes périphériques humains (143). L'association ionophore calcique et PMA active à la fois le lymphocyte T (151) et le lymphocyte B (153), mais la proportion de cellules B est très faible dans la circulation périphérique (64). L'action du DMBA dans les lymphocytes périphériques humains serait donc localisée au niveau des événements membranaires.

4-2-3 Lymphocytes T cytotoxiques

Les effets de la dioxine sur la fonction lymphocytaire dépendent de l'âge de l'animal au moment de l'exposition. Une exposition périnatale répétée à 2 µg/kg des souris B6C3F1 femelle pendant 15 jours, entraîne une

atrophie thymique qui se traduit à l'âge adulte par une perte de la fonction CTL (154). De même, l'exposition *in vivo* de souris C57Bl/6 à 15 µg/kg de dioxine induit une inhibition dose-dépendante de la génération de CTL allogéniques contre le mastocytome murin P815 (155, 156). Le rôle du récepteur Ah dans la suppression de la génération de CTL allogéniques a été démontré en utilisant des souris "Ah insensibles" et des analogues de la dioxine présentant une plus faible affinité pour le récepteur Ah (155, 156).

La génération et la fonction cytotoxique des CTL de souris B6C3F1 exposées à 5 ou 10 µg/g/jour pendant 10 jours de DMBA est sévèrement perturbée. L'activité cytotoxique des splénocytes est déterminée *ex vivo* contre la lignée de mastocytome murin P815, après 5 jours de sensibilisation de ces splénocytes vis-à-vis des cellules P815. Cette activité CTL est réduite de 88% et 93% par rapport au lot de souris témoin pour les souris exposées respectivement à la dose totale de 50 µg/g et de 100 µg/g (128). L'immunosuppression induite sur la fonction CTL *ex vivo* par le DMBA persiste de 4 à 8 semaines après l'arrêt de l'exposition à la même dose pendant le même intervalle de temps. Pour la dose totale la plus forte de 100 µg/g, l'inhibition de la fonction CTL est réduite de 80% 4 semaines après et de 45% 8 semaines après l'arrêt de l'exposition (13). L'activité CTL est donc réduite de la même manière par le DMBA immédiatement ou 4 semaines après exposition au toxique.

L'activité CTL de splénocytes de souris B6C3F1 exposés à 5, 20, 40 μM de DMBA est rétablie *in vitro* par ajout de 5 unités/ml d'IL-2 exogène ou d'une population "naïve" de lymphocytes T CD4 (137). L'IL-2 permet de rétablir l'activité CTL uniquement si elle est additionnée le même jour que le DMBA. L'IL-1 (137) l'IFN- β ou l'IFN- γ (129) n'ont aucun effet sur l'inhibition de la fonction CTL engendrée par le DMBA. Le DMBA n'a pas d'effet sur l'induction polyclonale des CTL par une lectine, par contre l'induction polyclonale des CTL par l'anti-CD3 145-2-C11 est inhibé de 58% dès 20 μM (135). Ceci confirme l'interaction du DMBA avec l'IL-2 et le dysfonctionnement de la reconnaissance de l'antigène par le complexe CD3/RCT par le DMBA (135).

Une étude relation structure-activité sur la génération des CTL montre l'inhibition importante induite par le DMBA à 40 μM (60%), alors que ces deux dérivés monométhylés le méthyl-12-benzanthracène (M12BA) et le méthyl-7-benzanthracène (M7BA) diminuent respectivement de 49% et 18% cette même activité à 40 μM (157). La position du méthyl en 12 semble donc importante pour l'inhibition de la génération des CTL. En effet, l'inhibition de la fonction CTL des splénocytes traités *in vitro* par le M7BA bien que significativement différente des splénocytes témoins dès la concentration de 4 μM au rapport effecteurs/cibles 25/1 n'est pas inférieure à 80% de cytotoxicité. Par contre, les splénocytes traités *in vitro* par le M12BA ou le DMBA présentent une cytotoxicité inférieure à 60% dès la concentration de 20 μM (157).

4-2-4 Production d'anticorps

Les cellules B seraient une cible commune à beaucoup d'HPA, puisque le DMBA, le MCA, le B(a)P et la dioxine interagissent avec la production d'anticorps. Administrés à une dose de 20 $\mu\text{mol/kg/jour}$ en sous cutanée chez des souris B6C3F1 pendant 14 jours, le DMBA et le MCA diminuent la production d'anticorps d'isotype IgM en réponse au globule rouge de mouton : de 76% pour le DMBA et de 23% pour le MCA (25).

Dans une autre étude de 10 jours, le DMBA administré à la dose de 0,5, 5 ou 10 $\mu\text{g/g/jour}$ chez la souris B6C3F1 femelle diminue la production d'anticorps primaire (IgM) et secondaire (IgG) après immunisation par le globule rouge de mouton dès la dose de 0,5 $\mu\text{g/g/jour}$. A 1 $\mu\text{g/g/jour}$, la production d'anticorps en réponse à un antigène T-indépendant est diminuée, aussi bien à partir de lymphocyte B matures (TNP-Ficoll), que de lymphocytes B immatures (TNP-LPS) (126).

Dans une autre étude, Burchiel et coll. confirment l'effet persistant du DMBA sur la production d'anticorps, puisque la population lymphoïde B dans la rate déterminée par l'expression de la chaîne légère κ des immunoglobulines est encore diminuée 4 et 8 semaines après l'arrêt d'une exposition cumulative de 100 $\mu\text{g/g}$ de DMBA (14).

Une étude de 14 jours menée chez la souris B6C3F1 femelle exposée à 5, 20, ou 40 $\mu\text{g/g}$ de B(a)P ou à son isomère le B(e)P met en évidence l'effet du B(a)P sur la production d'anticorps primaire (IgM) et secondaire (IgG) par des splénocytes en réponse au globule rouge de mouton. Le B(a)P

inhibe aussi la production d'anticorps en réponse à un antigène T-indépendant à partir de lymphocytes B matures (TNP-Ficoll) mais pas de lymphocytes B immatures (TNP-LPS) (12). Le B(e)P, son congénère non cancérigène n'est pas immunotoxique, alors que le B(a)P interagit avec le lymphocyte B mature.

Hardin et col. ont démontré que le B(a)P *in vitro* supprimait la lymphopoïèse des cellules B de souris (158). Leur expérience a été conduite sur des cultures de moëlle osseuse de souris C57BL/6 ("Ah sensible") et de souris DBA/2 ("Ah résistante"). En ce qui concerne la souris C57BL/6, une diminution significative des cellules B précurseurs (préB) est observée après 7 jours d'exposition au B(a)P, à des concentrations de 10^{-8} M. Pour la souris DBA/2 (souche murine "Ah insensible"), cette diminution est observée, mais à des doses supérieures à 10^{-8} M et est moins significative que pour la souris C57BL/6. L'altération de la lymphopoïèse serait provoquée en partie, par une induction de l'apoptose des cellules pré-B. Le phénomène apoptotique apparaît après 1 jour d'exposition à 10^{-5} ou 10^{-4} M de B(a)P (158). L'effet du B(a)P se situerait sur un précurseur du plasmocyte.

La dioxine affecte la production d'anticorps *in vivo* chez la souris dès $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ et *in vitro* dès 10^{-9} M, que l'antigène soit T-dépendant comme le globule rouge de mouton ou T-indépendant comme le TNP-LPS. Les plasmocytes seraient la cible préférentielle de la dioxine comme l'atteste la diminution de l'expression de l'antigène membranaire PC.2 spécifique de

ces cellules après exposition *in vitro* à 10^{-9} M (120). L'altération d'évènements biochimiques précoces de l'activation des lymphocytes B pourrait permettre d'expliquer la diminution d'expression de cet antigène membranaire. En effet, la dioxine entraîne l'activation de tyrosines kinases comme la p60^{Src} dans des cellules B spléniques (159).

Une diminution de la réponse anticorps, suite à l'injection de globules rouges de mouton chez deux espèces de souris B6C3F1 et DBA/2, a été noté par Morris et col. après leur exposition à des doses de dioxine comprises entre 4,2 et 42 μ g/kg de poids corporel respectivement (160). Ceci met en évidence la différence de sensibilité intersouche liée à l'expression du récepteur Ah.

L'activation du lymphocyte B fait intervenir des seconds messagers communs avec l'activation du lymphocyte T comme, l'activation des tyrosines kinases, de la PLC et l'augmentation de calcium ionisé intracellulaire. Le DMBA interagit aussi avec l'homéostasie du lymphocyte B (133, 161). Le DMBA *in vitro* inhibe la prolifération calcium-dépendante du lymphocyte B en réponse à une IgD, mais pas la prolifération calcium-indépendante en réponse à l'IL-4 (161).

4-3 Conséquences de l'immunosuppression induite par les hydrocarbures polycycliques aromatiques

4-3-1 Les modèles de résistance de l'hôte à l'implantation de tumeurs ou d'infections expérimentales :

Les modèles de résistance de l'hôte à l'implantation de tumeurs ou d'infections expérimentales permettent une étude dynamique du système immunitaire et des différents paramètres qui le composent.

Le modèle d'infection par le *Listeria monocytogenes* permet l'étude de l'impact des HPA sur l'immunité spécifique et non spécifique. En effet, l'élimination de cet agent pathogène intracellulaire se déroule en deux étapes. La phase précoce de défense de l'organisme fait intervenir les cellules phagocytaires productrices d'Interféron- α nécessaires à l'activation des cellules T CD4+ productrices d'IFN- γ qui interviennent dans la phase plus tardive de l'infection (162, 163). L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ intervient aussi dans le contrôle de l'infection, puisque les souris génétiquement déficientes en perforine ne peuvent faire face à une infection par *Listeria* (164). La mortalité de ces souris exposées au DMBA pendant 10 jours à 0,5 $\mu\text{g/g/jour}$ est plus élevée que celle d'un lot de souris témoin lors de l'infection expérimentale par la bactérie *Listeria monocytogenes* (126). Par contre, le B(a)P et le B(e)P administré à 40 $\mu\text{g/g/jour}$ pendant 14 jours n'augmentent pas de façon significative la mortalité par rapport au groupe témoin de souris B6C3F1 infectées expérimentalement par le *Listeria monocytogenes* (12). Ce modèle d'infection expérimental par le *Listeria monocytogenes* confirme l'absence d'effet du B(a)P et du B(e)P sur le lymphocyte T.

L'élimination de l'organisme du sarcome PYB6 dépend essentiellement des effecteurs cytotoxiques. Une diminution de la fonction CTL est à relier soit à une atteinte de la cellule effectrice CD8 par

interaction avec ces fonctions cytotoxiques ou soit à un mécanisme indirect par inhibition de cytokines nécessaires à la génération de la réponse CTL produite par le lymphocyte T auxiliaire CD4 (128). La mortalité des souris exposées au DMBA pendant 10 jours à 0,5 µg/g/jour est plus élevée par rapport à un lot de souris témoin lors de l'implantation sous cutanée du sarcome PYB6 (128). Mais, le B(a)P ou le B(e)P administrés à 40 µg/g/jour pendant 14 jours n'augmentent pas de façon significative la mortalité de souris B6C3F1 chez lesquelles le sarcome PYB6 a été implanté expérimentalement (12). Ces études confirment l'interaction du DMBA avec les cellules T CD4+ et/ou CD8+ et l'absence d'action du B(a)P sur ces composantes du système immunitaire.

L'élimination *in vivo* des métastases pulmonaires du mélanome B16F10 requiert à la fois les macrophages et les cellules NK. Le DMBA n'augmente pas de façon significative la mortalité de souris B6C3F1 chez lesquelles le mélanome B16F10 a été implanté expérimentalement par injection intraveineuse (128). L'activité des macrophages compenserait l'inhibition de la fonction NK par le DMBA démontrée précédemment (128).

Trois paramètres immunitaires interviennent dans l'éradication de l'infection par le Cytomégalovirus murin (CMVM) : la production d'IFN-γ par le lymphocyte T, l'augmentation de l'activité NK suite à cette production d'IFN-γ, et la génération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (165). L'administration de 100 µg/g de DMBA réparti sur 10 jours induit une augmentation très importante de la susceptibilité de souris B6C3F1 et

CD-1 à l'infection expérimentale par le CMVM injecté par voie IP. Par contre, le B(a)P même à une dose totale de 400 µg/g n'a pas d'effet sur la mortalité de ces souris (165). Le DMBA affecte les trois paramètres étudiés par l'infection expérimentale par le CMVM. L'action du DMBA est comparable à celle de la Cyclosporine A dont on connaît les effets de l'administration à long terme chez les patients ayant reçu une greffe d'organe (7).

4-3-2 Etudes épidémiologiques

Chez l'homme, l'éventuelle immunotoxicité des HPA a été évaluée à l'aide d'études épidémiologiques.

Chez des personnes intoxiquées par de l'huile de riz contaminée avec des PCB (Polychloro Biphényles) au Japon (à Yusho en 1968) ou à Taiwan (Yu-Cheng entre 1977 et 1979), les symptômes de cette intoxication alors appelée maladie de Yusho ou de Yu-Cheng, laissaient présager une immunodépression : infection rénale, symptômes bronchitiques et diminution des immunoglobulines (IgA et IgM) pour des concentrations sanguines en PCB allant de 35 à 60 ppb. On note aussi une diminution de l'hypersensibilité retardée corrélée avec la symptomatologie clinique (166). Aucun mécanisme n'a pu être proposé quant à la diminution des immunoglobulines et à l'immunotoxicité des HPA, les populations lymphoïdes n'ayant pas été analysées. Par contre, il a été rapporté que les enfants nés de mère intoxiquée par les PCB et nourris au sein présentent plus d'infections bactériennes que les enfants non nourris au lait maternel

ou de mères non exposées (167). Le temps de demi-vie des PCB calculé chez les gens intoxiqués après les épisodes de Yusho ou Yu-Cheng varie entre 2 ans et 21 ans et demi (168).

Une étude analysant les sous-populations lymphocytaires, a été menée afin de montrer l'éventuelle influence de dérivés de la dioxine, notamment le PCDD (polychloro dibenzo-p-dioxin) et le PCDF (polychlorodibenzofurane) sur le système immunitaire (169). Chez 89 ouvriers travaillant dans une usine de production de pesticides en Allemagne, des dosages sanguins de dioxine ont été réalisés. En fonction de ces dosages, deux sous-groupes ont été formés : le groupe de référence (2 à 24 ppt de TCDD) et le groupe exposés (25 à 140 ppt de TCDD). Dans le groupe des ouvriers exposés, aucune variation des lymphocytes T CD4+ n'a été observée, excepté chez les personnes fortement exposées où une légère augmentation de cette population a été constatée. En ce qui concerne les lymphocytes B et T cytotoxiques aucune variation n'a été décelée.

Une autre étude allemande portant sur 11 ouvriers exposés pendant 20 ans (à des doses estimées entre 43 et 874 pg/g) ne montre pas de modification des sous populations lymphocytaires par rapport à un groupe témoin mais une diminution de certaines fonctions, comme la prolifération en réponse au "Pokeweed mitogen", la réponse lymphocytaire mixte et la prolifération en réponse à l'IL-2. Les auteurs en déduisent une altération des fonctions du lymphocytes T auxiliaire (170).

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DE L'ETUDE.

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) présents dans de nombreux polluants naturels et industriels sont des composés connus pour leurs propriétés cancérogènes. Certains HPA sont de puissants immunosuppresseurs. Du fait de leur lipophilie, les HPA sont stockés dans le tissu adipeux des organismes vivants, ce qui est à la base de leur toxicité cumulative.

Les déficits héréditaires ou acquis de l'immunité affectant de façon prédominante les lymphocytes T sont associés à une augmentation de certains types d'infections et de tumeurs. L'utilisation de médicaments immunosuppresseurs dans la prévention du rejet des greffes d'organe est aussi responsable de la survenue de cancers. Les personnes intoxiquées par des HPA peuvent présenter une diminution de l'hypersensibilité retardée (test permettant d'évaluer la fonction des lymphocytes T CD4+) corrélée à une symptomatologie clinique évocatrice d'une immunosuppression (infections...). Le diméthyl-7,12-benzanthracène (DMBA), un dérivé méthylé synthétisé à des fins expérimentales inhibe principalement chez la souris les fonctions du lymphocyte T.

L'augmentation du taux de calcium intracellulaire représente un élément clé dans l'activation lymphocytaire. La perturbation de l'homéostasie calcique dans le lymphocyte T par un ionophore calcique (augmentation du calcium intracytoplasmique) ou par un inhibiteur des pompes SERCA (déplétion du RE, lieu de stockage du calcium intracellulaire) est responsable d'un état d'anergie.

Le niveau de calcium ionisé intracellulaire dans le lymphocyte T détermine donc sa réponse aux différents signaux délivrés par le récepteur pour l'antigène des cellules T (RcT). Nous avons donc voulu savoir si le DMBA pouvait interagir avec l'homéostasie calcique du lymphocyte T murin. Nous avons donc suivi le taux de calcium intracellulaire dans le lymphocyte T après exposition au DMBA. Puis, nous avons essayé de définir le mécanisme par lequel le DMBA modifiait l'homéostasie calcique. Ainsi, nous avons plus particulièrement étudié l'implication des tyrosines kinases et de la production d'inositol-1, 4, 5-triphosphate dans l'augmentation du taux de calcium intracellulaire induit par le DMBA.

Parmi les dérivés méthylés du benzanthracène, le DMBA est le plus puissant inducteur de tumeurs cutanées chez les souris CD-1. Il est aussi le plus efficace pour inhiber la génération *in vitro* de lymphocytes T cytotoxiques allogéniques.

Pour tenter de définir l'importance respective des deux méthyles 7 et 12 de la structure benz(a)anthracénique sur l'activation lymphocytaire T, et par la suite sur l'homéostasie calcique dans le lymphocyte T, nous avons déterminé l'activité immunosuppressive du DMBA et de ces 2 dérivés monométhylés (le méthyl-7-benz(a)anthracène (M7BA) et le méthyl-12-benz(a)anthracène (M12BA)) et comparé les résultats ainsi obtenus. Tout d'abord, nous avons mesuré la lymphoprolifération des splénocytes activés par la Concanavaleine A ou par l'anticorps anti-CD3 après exposition aux 3 HPA. Afin de mieux comprendre l'interaction de ces trois HPA avec ces deux modèles d'activation, la production d'IL-2, l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 et la

réponse dépendante de l'IL-2 ont été ensuite étudiées après exposition aux HPA et activation des lymphocytes par les mitogènes cités précédemment.

Nous nous sommes ensuite demandés quels étaient le rôle respectif des méthyles 7 et 12 dans la perturbation de l'homéostasie calcique observée après exposition au DMBA.

Enfin, nous avons étudié l'impact du DMBA sur la fonction de lymphocytes périphériques humains *in vitro*.. Nous avons comparé ces résultats obtenus sur les lymphocytes humains avec ceux obtenus avec les splénocytes murins. Cette comparaison s'avère nécessaire afin de permettre d'extrapoler plus facilement à l'homme les résultats des études toxicologiques obtenus *in vivo* chez la souris.

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES :

1-Molécules étudiées.

Nous avons étudié l'hydrocarbure polycyclique aromatique (HPA) synthétique, diméthyl-7,12-benz(a)anthracène (DMBA) (Sigma, St Louis, USA) comme molécule de référence et ces deux dérivés monométhylés : le méthyl-7-benz(a)anthracène (M7BA) et le méthyl-12-benz(a)anthracène (M12BA) (Interchim, France). Les trois molécules sont dissoutes à 4.10^{-2} M dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma) et les solutions mères sont conservées à l'abri de la lumière.

2-Isolement des lymphocytes murins et humains.

2-1-Sources de cellules et préparation de la suspension cellulaire.

Les splénocytes proviennent de souris B6C3F1 femelles, consanguines, âgées de 8 à 10 semaines (Janvier, France). Cette espèce murine est un hybride entre C3H/HeJ (H-2^k) et C57Bl/6 (H-2^b). Les souris sont sacrifiées par élongation cervicale. La rate est prélevée aseptiquement, puis broyée dans le milieu de culture complet (MCC). Après sédimentation des débris spléniques, les cellules sont lavées deux fois dans le MCC et centrifugées. Le milieu de culture complet (MCC) est composé de RPMI 1640 (Gibco, France), L-glutamine à 2 mM (Eurobio, France), de streptomycine à 0,1 mg/ml (Eurobio), 100 UI/ml de pénicilline (Eurobio,

France), de 2-mercapto-éthanol (2-ME) à $5 \cdot 10^{-5}$ M (Sigma) et de 5% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et filtré (ATGC, France). Le culot est resuspendu dans le MCC à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les splénocytes totaux sont utilisés dans les tests de prolifération lymphocytaire (ConA, Anti-CD3 et PHA), pour la mesure de la production d'interleukine-2 et pour l'évaluation de l'expression du récepteur de haute affinité pour l'interleukine-2.

Le sang de volontaires sains est prélevé sur tubes EDTA par ponction veineuse, puis dilué au demi dans du tampon phosphate (PBS) (Eurobio). Les cellules mononuclées sont isolées par gradient de densité (Ficoll-hypaque, Techgen, France) et sont ensuite lavées deux fois dans du MCC. Les cellules mononuclées sont resuspendues dans le MCC à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules mononuclées périphériques totales sont utilisés dans les tests de prolifération lymphocytaire (PHA), pour la mesure de la production d'interleukine-2, la génération de lymphocytes T cytotoxiques, et la détermination de la cytotoxicité spontanée (fonction NK).

2-2-Enrichissement en lymphocytes T.

Les cellules spléniques mononuclées murines sont isolées par gradient de densité (Lympholyte M, Tebu, France), puis resuspendues après deux lavages successifs dans du MCC à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules mononuclées sont incubées à 37°C pendant une heure, afin d'éliminer par adhérence les macrophages restants. Le surnageant cellulaire est ensuite

déposé sur une colonne de nylon (Baxter, France). Les lymphocytes T sont élués de la colonne puis lavés deux fois dans du MCC. La pureté des lymphocytes T est déterminée par cytométrie en flux (EPICS ELITE, Coulter, Margency, France) après marquage par l'anticorps anti-CD3 (145-2C11, IgG de hamster) couplé à la phycoérythrine (PharMingen, France). Le pourcentage des lymphocytes T utilisés par la suite pour la mesure du calcium intracellulaire, la production d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et la prolifération en réponse à la combinaison ester de phorbol et ionophore calcique, est toujours supérieur ou égal à 80%. Pour la mesure du taux de calcium intracellulaire, les lymphocytes sont incubés pendant 16 heures dans du MCC avant l'exposition aux différents toxiques. Nous avons vérifié que le protocole d'enrichissement en lymphocytes T ne modifie pas leur contenu en calcium intracellulaire.

L'enrichissement en cellules T humaines utilise un protocole identique à celui utilisé pour isoler les lymphocytes T murins. Les cellules mononuclées d'origine humaine sont incubées à 37°C dans un flacon de culture deux heures afin d'éliminer les monocytes, qui ont la propriété d'adhérer sur le plastique. Le surnageant est ensuite déposé sur la colonne de nylon (Baxter, France). Les lymphocytes B et les monocytes restant sont retenus sur la colonne, les lymphocytes T sont élués. Le pourcentage de lymphocytes T est déterminé par cytométrie en flux et marquage à l'aide d'un anticorps anti-CD3 couplé à la phycoérythrine (UCHL1, IgG1 de souris, Immunotech, France). Les cellules éluées sont utilisées uniquement lorsque le pourcentage des lymphocytes T est supérieur à 80%.

3-Etude de la prolifération lymphocytaire.

3-1-Traitement des splénocytes.

Les splénocytes sont pré-traités pendant une heure avant l'addition du signal prolifératif étudié. Les différentes dilutions sont réalisées dans le MCC de façon à ce que la concentration finale de DMSO n'excède pas 0,1%. Les concentrations utilisées pour les trois dérivés méthylés du Benz(a)anthracène sont 5, 20, et 40 μM . Les splénocytes murins traités avec 0,1% de DMSO représentent le témoin. Lors de la cinétique d'action, les trois HPA (à 40 μM seulement) sont additionnés à différents temps après le signal d'activation (1 heure, 2 heures, 4 heures, 8 heures puis 24 heures).

3-2-Traitement des lymphocytes périphériques humains.

Les lymphocytes périphériques humains sont pré-traités pendant une heure avant l'addition du signal mitogénique. Les différentes dilutions sont réalisées dans le MCC de façon à ce que la concentration finale de DMSO n'excède pas 0,1%. Les concentrations utilisées de DMBA sont 1, 5, 20, et 40 μM . Lors de la cinétique d'action, le DMBA est additionné à la concentration de 40 μM à différents temps après addition de la PHA (1 heure, 2 heures, 4 heures, 8 heures puis 24 heures).

3-3-Mesure de la viabilité cellulaire.

La mesure de la viabilité cellulaire est réalisée par observation microscopique des cellules après coloration au bleu de trypan (Sigma, France). Cette mesure est effectuée après 24 heures et 48 heures de culture des splénocytes murins ou des lymphocytes périphériques humains en présence des différents toxiques et/ou réactifs pharmacologiques, et ce en présence et en l'absence du signal d'activation (ConA, Anti-CD3, PHA, PMA+ionomycine). La viabilité est obtenue par le calcul suivant :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{nombre de cellules vivantes} \times 100}{\text{nombre de cellules totales}}$$

Lors de l'utilisation des techniques cytométriques, la viabilité est déterminé en cinétique à l'aide de 50 µg/ml d'iodure de propidium (IP) (Sigma, France) pour s'assurer que l'augmentation du calcium intracellulaire n'est pas un reflet de la mort cellulaire. L'iodure de propidium est exclu des cellules vivantes. L'incorporation d'IP est mesurée toutes les minutes pendant 30 minutes. Le pourcentage de cellules mortes est constant pendant la durée de l'expérience quelque soit le composé. Ce pourcentage toujours inférieur à 5% ne varie pas au cours du temps.

3-4-Activation lymphocytaire par les mitogènes.

Les splénocytes de souris B6C3F1 traités sont cultivés en plaque de 96 puits (Costar, France) à 2.10^6 cellules/ml de MCC pendant 48 heures avec une concentration optimale de mitogène (Concanavoline A, ConA (Sigma) ; Phytohémaglutinine A, PHA (Sigma) ou Anti-CD3 (145-2C11, surnageant de culture obtenu à partir de l'hybridome gracieusement fourni par le Docteur R. House)). Cette concentration, ainsi que le temps d'exposition ont été préalablement déterminés pour chaque lot de mitogène. La prolifération cellulaire est évaluée par mesure de l'incorporation de thymidine triciée (^3H -Thy) (activité spécifique : 5 Ci/mmol, Amersham, France), à raison de $0,5 \mu\text{Ci}$ /puits ajouté six heures avant la fin de l'expérience. L'ADN des cellules est récupéré à l'aide d'un appareil semi-automatique ou collecteur de cellules (Cell Harvester, Skatron, Norvège). Les échantillons sont ensuite introduits dans un compteur β (Beckman, France) après addition d'une quantité déterminée de liquide scintillant (Ready Protein, Beckman).

Les lymphocytes périphériques humains traités sont cultivés en plaque de 96 puits (Costar, France) à 2.10^6 cellules/ml de MCC pendant 48 heures avec une concentration optimale de PHA ($1 \mu\text{g/ml}$). Comme précédemment, cette concentration et le temps d'exposition ont été préalablement déterminés pour chaque lot de PHA. La prolifération cellulaire est évaluée comme avec les splénocytes murins par incorporation de thymidine triciée.

3-5-Addition de cytokines exogènes.

L'addition d'interleukine-2 recombinante humaine (IL-2) (Eurocetus, France) seule ou associée avec l'interleukine-6 recombinante humaine (IL-6) (NIBSC, Royaume Uni) ou l'interleukine-1 β murine (IL-1) (NIBSC) est faite au même moment que le traitement des splénocytes par les HPA. L'IL-2 est additionnée à la concentration finale de 200, 500, ou 1000 pg/ml, l'IL-6 de 200 et 500 pg/ml et l'IL-1 β de 1000 UI/ml. Ensuite, le signal d'activation est additionné une heure après.

3-6-Activation par un ester de phorbol et un ionophore calcique.

Les cellules spléniques enrichies en cellules T sont resuspendues après deux lavages successifs dans du MCC à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml puis prétraitées par les toxiques, une heure avant l'addition de la combinaison ester de phorbol (Phorbol Myristate Acétate, PMA, Sigma, France) plus ionophore calcique (ionomycine ou A23187). La PMA est utilisée à la concentration de 10 ng/ml. La ionomycine (Sigma) tout comme le ionophore calcique A23187 (Sigma) sont utilisés à la concentration de 1 μ M. Après 24 ou 48 heures, la lymphoprolifération est mesurée par incorporation de ^3H -Thy (0,5 μ Ci/puit 6 heures avant la fin de l'expérience).

De même, les lymphocytes périphériques T humains ($2 \cdot 10^6$ cellules/ml) sont prétraités par le DMBA, une heure avant l'addition de

la combinaison ester de phorbol (Phorbol Myristate Acetate, PMA, Sigma, France) plus ionophore calcique (ionomycine ou A23187). La PMA et les ionophores calciques sont utilisés aux mêmes concentrations que lors de l'utilisation des cellules murines. Après 24 ou 48 heures, la lymphoprolifération est mesurée par incorporation de $^3\text{H-Thy}$ (0,5 μCi /puit 6 heures avant la fin de l'expérience).

3-7-Prolifération dépendante de l'interleukine-2.

Une première étape consiste en l'activation des splénocytes de souris B6C3F1 (2.10^6 cellules/ml) ou des cellules mononuclées humaines pendant 48 heures respectivement par la ConA (3 $\mu\text{g/ml}$) ou la PHA (1 $\mu\text{g/ml}$). Après ces deux jours de culture, les cellules sont comptées, lavées trois fois afin d'éliminer le mitogène résiduel. Les cellules sont resuspendues à 5.10^5 cellules/ml dans le MCC, en présence d'IL-2 recombinante humaine à 500 pg/ml. Pendant 8 jours, les lymphocytes sont ainsi cultivés en présence d'IL-2 exogène additionnée tous les 2 jours (500 pg/ml). La mesure de la réponse à l'IL-2 est réalisée le douzième jour, alors que les cellules ne sont plus en phase S du cycle cellulaire (plus d'incorporation de $^3\text{H-Thy}$). Les lymphocytes sont alors pré-incubés en présence des molécules à étudier pendant une heure, puis répartis en plaque 96 puits (10^6 cellules/ml). L'IL-2 est additionnée aux concentrations de 200, 500 ou 1000 pg/ml. Les cellules sont traitées 1 heure avant l'addition d'IL-2. Après 24 heures de culture, la lymphoprolifération est

évaluée par la mesure de l'incorporation de ^3H -Thy (0,5 μCi /puit 6 heures avant la fin de l'expérience).

3-8-Réaction lymphocytaire mixte.

La réaction lymphocytaire mixte (MLR) exploite la capacité des lymphocytes T CD4+ à proliférer en présence de lymphocytes allogéniques, c'est à dire possédant des différences au niveau des antigènes de classe II et de classe I du CMH (132).

Les cellules murines ou humaines sont traitées comme décrit au paragraphe 3-2 (voir ci-dessus). La seule différence est que les cellules humaines sont incubées avec des concentrations plus faibles de DMBA (0,5, 1, 5 et 10, 20 μM).

Les splénocytes de souris B6C3F1 (H-2^b/H-2^k) sont cultivés avec les splénocytes de souris DBA/2 (H-2^d) irradiés (2000 Rads, pendant 10 minutes) pendant 5 jours. Le rapport cellules stimulatrices (DBA/2)/cellules répondeuses (B6C3F1) est de 4 pour 1. La prolifération des cellules répondeuses est mesurée par incorporation de ^3H -Thy (0,5 μCi /puit) pendant les 6 dernières heures du test. Puis, on procède comme pour les tests de prolifération (voir ci-dessus).

Les lymphocytes périphériques humains (cellules répondeuses) sont cultivées avec pour cellules stimulatrices, des lymphocytes périphériques allogéniques irradiés (CNTS, Versailles) (2000 Rads). Le test dure 5 jours. Le rapport cellules stimulatrices/répondeuses est égale à 4 pour 1. La

prolifération est mesurée par incorporation de thymidine triciée (0,5 μ Ci/puits) lors des 6 dernières heures du test.

Les résultats sont exprimés en coups par minutes (CPM) après correction en tenant compte de l'incorporation de thymidine triciée par des cellules non stimulées. Un contrôle de l'irradiation est effectué en stimulant les cellules stimulatrices par un mitogène des cellules T pendant les 5 jours du test.

4-Dosage de l'Interleukine-2.

4-1-Préparation des surnageants de culture.

les splénocytes de souris B6C3F1 sont cultivés en plaque de 24 puits (Costar, France) (2.10^6 cellules/ml). Ils sont pré-traités une heure avant l'addition de mitogène par les HPA (0 à 40 μ M) puis incubés à 37°C pendant 24 heures avec une dose optimale de ConA, d'anti-CD3 ou de PHA. Les surnageants (SupconA, SupAnti-CD3, SupPHA) sont récupérés et conservés à -80°C en attendant le dosage.

On procède de même pour les lymphocytes périphériques humains. Ceux-ci sont pré-traités une heure avant l'addition de PHA par le DMBA (0 à 40 μ M) puis cultivés en plaque de 24 puits (Costar, France) (2.10^6 cellules/ml) pendant 24 heures avec une dose optimale de PHA définie précédemment (1 μ g/ml). Les surnageants sont récupérés et conservés à -80°C en attendant le dosage.

4-2-Dosage de l'interleukine-2 par la lignée CTLL-2.

Le dosage de l'IL-2 présente dans les surnageants est effectué à l'aide d'un bioessai employant la lignée CTLL-2, qui est un clone de lymphocytes T cytotoxiques murins dépendant pour sa croissance de l'IL-2. Les cellules sont cultivées en plaque de 96 puits (10^4 cellules/ml) en présence de SupConA, de SupAnti-CD3 ou de SupPHA dilués au $1/50^{\text{ème}}$ et $1/100^{\text{ème}}$ pendant 24 heures.

Les résultats sont exprimés à partir de la construction d'une gamme standard d'IL-2 recombinante humaine (pg/ml) qui permet le calcul de la quantité d'IL-2 présente dans les surnageants, mais aussi en pourcentage de prolifération par rapport au témoin (calcul de la CI50 : concentration induisant 50% d'inhibition de la production d'IL-2). Les concentrations des molécules testées et retrouvées après dilution dans les surnageants de culture sont dénuées d'effet sur la prolifération des CTLL-2.

5-Mesure de l'expression des récepteurs de haute affinité pour l'IL-2.

La mesure de l'expression des récepteurs de haute affinité pour l'interleukine-2 (IL-2) est basée sur la technique décrite par Robb et collaborateurs (171). Les splénocytes (2.10^6 /ml) sont mis en contact une heure avec les HPA, puis on additionne le signal d'activation (ConA, ou Anti-CD3). Après 48 heures, les splénocytes sont lavés, concentrés (10^7 /ml) et incubés pendant une heure à 37°C , pour permettre l'endocytose de l'IL-2 initialement fixée sur les récepteurs. Les cellules sont ensuite récupérées,

puis mise en contact avec de l'IL-2 marquée à l'iode 125 ($^{125}\text{IL-2}$) (Amersham, France) à différentes concentrations et de l'IL-2 froide en excès (200 fois). L'IL-2 froide en excès permet de déterminer la fixation non spécifique. Après 20 mn d'incubation à 37°C, les cellules sont centrifugées à +4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans du RPMI 1640 maintenu à +4°C. La suspension cellulaire est ensuite passée sur un mélange d'huiles : 84% d'huile de silicone, et 16% d'huile de parafine (Aldrich, France) ce qui permet de retenir l' $^{125}\text{IL-2}$ non fixée. Le culot cellulaire au bas de la couche d'huile contient l' $^{125}\text{IL-2}$ fixée sur les cellules après centrifugation à 9000 g. Après congélation, le tube est coupé au dessus du culot cellulaire, transféré dans un tube de comptage puis la mesure de la radioactivité émise par les cellules fixant l' $^{125}\text{IL-2}$ est effectuée à l'aide d'un compteur γ (Hewlett Packard, France).

Les résultats sont obtenus à l'aide de la représentation de Scatchard qui permet de calculer l'affinité du récepteur de l'IL-2 et le nombre de récepteurs exprimés sur la cellule.

6-Mesure de la production d'inositol-1,4,5-triphosphate.

La production d'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) est mesurée pour une suspension cellulaire enrichie en lymphocytes T (lymphocyte T > 80%). Les HPA sont ajoutés à la concentration de 40 μM puis les cellules sont lysées par une solution acide (HClO_4 , 0,1 M) qui est ensuite neutralisée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 0,1 M).

La production d'IP3 est mesurée régulièrement pendant 10 minutes après addition de l'HPA. La ConA à fortes doses (10 µg/ml) est utilisée comme témoin positif. La production d'IP3 est mesurée à l'aide d'une trousse de dosage commercialisée par Amersham (D-myoinositol-1,4,5-triphosphate (³H) Assay System, Amersham, France). Cette trousse de dosage (sensibilité : 84 pg/tube soit 840 pg/ml) est basée sur la compétition pour un nombre limité de sites de fixation spécifique sur une protéine entre l'IP3 froid des extraits cellulaires et une quantité fixe d'IP3 marqué au tritium.

Les résultats sont exprimés à partir de la construction d'une gamme standard d'IP3 (en pg) qui permet le calcul de la quantité d'IP3 produite par 10 millions de cellules T traitées par les différents HPA.

7- Mesure du calcium intracellulaire par cytométrie :

Le calcium intracellulaire est mesuré par cytofluorimétrie en utilisant un indicateur fluorescent du calcium libre : le Fluo-3 (Sigma, St Louis, USA).

7-1-Fluo-3

Le Fluo-3 est un dérivé de la fluorescéine ayant une forte affinité pour le calcium. Il possède des radicaux acétoxy-méthyl-esters lui permettant de traverser la membrane. Les estérases cellulaires hydrolysent ces radicaux, une fois l'indicateur à l'intérieur de la cellule. La forme ionisée hydrophile est ainsi piégée dans la cellule. L'acide pluronique

présent dans la solution commerciale de Fluo-3 augmente le marquage des cellules par l'indicateur fluorescent. L'intensité de fluorescence émise par le Fluo-3 augmente de 40 fois après la fixation au calcium. La longueur d'onde d'excitation optimale est 506 nm, la longueur d'onde émission 526 nm. Le spectre optique du Fluo-3 est compatible avec les cytofluorimètres utilisant comme source d'excitation un laser argon 488 nm. L'intérêt du Fluo-3 est sa faible affinité pour le calcium ($K_d = 400$ nM) ce qui permet de mieux mesurer des pics de calcium transitoire que lors de l'utilisation de l'indo-1 ou du Fura-2 ($K_d = 224$ et 250 nM respectivement).

La technique utilisant le Fluo-3 mesure l'intensité moyenne de fluorescence (MFI, pour *Mean Fluorescence Intensity*) ou le logarithme de l'intensité de fluorescence à 525 nm de 5000 cellules au cours du temps. La concentration en calcium intracellulaire est directement proportionnelle à l'intensité moyenne de fluorescence à 525 nm (141) et ceci indépendamment de la concentration de Fluo-3 utilisée.

7-2-Technique de cytofluorométrie utilisant des cellules en suspension : cytométrie en flux.

Le marquage consiste à incuber $40 \cdot 10^6$ cellule/ml en présence de Fluo-3 ($4 \mu\text{M}$) pendant 30 minutes à 37°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées deux fois dans du MCC, et resuspendues à $2 \cdot 10^6$ /ml dans un tube contenant 2 ml pour la mesure du calcium.

Les échantillons sont incubés 10 minutes à 37°C avant chaque mesure. Les HPA sont ajoutés seuls sur des cellules non marquées par le

Fluo-3 pour s'assurer que ces composés possédant de nombreux noyaux benzéniques n'interfèrent pas avec la mesure du calcium intracellulaire.

Interaction des Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques avec le calcium intracellulaire induit après activation lymphocytaire :

Les cellules après marquage par le Fluo-3AM sont incubées pendant une heure avec les différentes concentrations de toxiques ou avec le solvant DMSO à 0,1% dans le MCC. La mesure du calcium intracellulaire par cytométrie en flux est réalisée pendant trente minutes après addition de la ConA et ce toutes les minutes. Le temps T=0 correspond à l'addition du mitogène. Cette technique sera utilisée avec les trois molécules (DMBA, M12BA, M7BA), aussi bien avec les cellules murines ou humaines.

Effet direct des Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques sur le calcium intracellulaire :

Les lymphocytes T marqués au Fluo-3AM sont incubées au bain-marie pendant 10 minutes. Les HPA à 40 μ M sont additionnés et les mesures sont effectuées toutes les minutes jusqu'à retour du calcium à son niveau de base ou pendant 30 minutes. Une nouvelle mesure est faite après une heure d'exposition aux HPA. Pour les études menées en milieu privé de calcium, les cellules sont resuspendues dans une solution saline tampon phosphate sans calcium et magnésium (Phosphate Buffer Saline, Eurobio, France) dans laquelle est ajoutée 1 mM de chlorure de magnésium (Sigma), 5 % de SVF décomplémenté et filtré (ATGC, France),

5.10^{-5} M de 2-ME (Sigma) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) (Eurobio) aux mêmes concentration que dans le MCC. Après que les HPA aient été ajoutés et que le taux de calcium mesuré ait atteint son niveau de base, du chlorure de calcium (1mM) est ajouté pour mesurer l'entrée de calcium extracellulaire.

7-3 Microscopie confocale :

Les lymphocytes marqués par le Fluo3-AM sont mis à adhérer dans des boîtes de Pétri 35 x 10 mm (Costar, USA) recouverte d'une solution de Poly-l-Lysine (Sigma, St Louis, France) diluée au 1/10^{ème} dans du milieu solution saline tampon phosphate/10 mM HEPES (Sigma, St Louis, France) contenant 1 mM de chlorure de calcium. Dix à quinze minutes après la fixation des splénocytes, les cellules sont analysées par microscopie confocale à détection laser (ACAS, MéridianND). Le mitogène (ConA à 10 µg/ml) ou l'HPA (à 40 µM) est additionné dans la boîte de Pétri, puis l'augmentation du calcium est mesurée à 525 nm toutes les 30 secondes jusqu'à stabilisation de l'intensité moyenne de fluorescence.

8- Evaluation de la cytotoxicité spontanée (fonction Natural Killer (NK)).

8-1-Détermination de la cytotoxicité spontanée : fonction NK.

La fonction NK est déterminée par la technique de relargage de chrome 51 (^{51}Cr). Les cellules cibles (YAC-1, un lymphome murin pour les splénocytes murins ou K562, une érythroleucémie humaine pour les lymphocytes périphériques humains) sont incubés à 37°C pendant une heure avec 200 μCi de ^{51}Cr (Amersham, France) pour 10 millions de cellules. Le ^{51}Cr est ainsi incorporé dans les cellules cibles. Il est retenu à l'intérieur de la cellule en se fixant aux protéines sous forme de chromate. Puis, les cellules cibles sont lavées trois fois dans du MCC. Ces cellules cibles sont ensuite placées dans des plaques 96 puits à fond conique (Nunc, France) à la concentration de $5 \cdot 10^3$ cellules/ml. Les cellules effectrices (splénocytes murins ou lymphocytes périphériques humains) sont ajoutées à différentes concentrations cellulaires afin d'obtenir différents rapports effecteurs/cibles (pour les lymphocytes humains 100/1, 50/1, 25/1 et 12,5/1 ; pour les splénocytes murins 100/1, 66/1, 33/1). Les surnageants sont récoltés après 4 heures d'incubation des cibles en présence des effecteurs à 37°C. Ensuite, la radioactivité dans les surnageants est mesurée à l'aide d'un compteur γ .

Comme précédemment, les cellules effectrices sont incubées une heure avant la mise en plaque de culture avec les différentes concentrations d'HPA (5, 20, 40 μM). Les cellules cibles sont aussi traitées avec les HPA afin de déterminer le relargage de Cr^{51} induit uniquement par les toxiques.

Le relargage spontané est obtenu en incubant les cellules cibles avec du MCC. Le relargage maximum est obtenu en ajoutant une solution

contenant de triton X-100 (Aldrich, France) qui permet la lyse des cellules cibles.

Le pourcentage spécifique de lyse est calculé comme suit :

$$\% \text{ spécifique de lyse} = \frac{\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}}{\text{relargage total} - \text{relargage spontané}} \times 100$$

Tous les résultats sont convertis ensuite en Unités Lytiques (UL). Une UL20 est définie comme le nombre de cellules effectrices nécessaire pour induire la lyse de 20% des cellules cibles, le nombre de cellules cibles étant normalisé à 10^7 .

$$\text{UL20 (pour } 10^7 \text{ cellules effectrices)} = \frac{10^7}{(\text{E/T } 20 \times 5.10^3)}$$

8-2-Addition d'Interleukine-2 exogène.

L'addition d'interleukine-2 recombinante humaine (IL-2) (Eurocetus, France) est faite au même moment que le traitement des cellules effectrices par le DMBA. L'IL-2 est additionnée à de faible concentration (10, 40 pg/ml) afin de stimuler uniquement les cellules NK qui expriment pour la plupart le récepteur d'affinité intermédiaire pour l'IL-2 de façon constitutive. Les cellules effectrices sont ensuite ajoutées dans les plaques 96 puits à fond conique contenant déjà les cellules cibles. L'absence de cytotoxicité LAK est vérifiée en parallèle à l'aide des cellules cibles P815 et Daudi (voir ci-dessous).

9-Evaluation de la cytotoxicité LAK (Lymphokine Activated Killer)

Les splénocytes murins ou les lymphocytes périphériques humains sont activés par 500 pg/ml d'IL-2 pendant 24 heures. La fonction LAK, comme la fonction NK est déterminée par la technique de relargage de ^{51}Cr . Les cellules cibles (P815, un mastocytome murin pour les splénocytes murins ou Daudi, un lymphome de Burkitt humain pour les lymphocytes périphériques humains) sont caractérisées par leur résistance à la lyse NK) sont incubés à 37°C pendant une heure avec 200 μCi de ^{51}Cr pour 10 millions de cellules. Les cellules cibles, après trois lavages pour éliminer le ^{51}Cr résiduel sont placées dans des plaques 96 puits à fond conique (Nunc, France) à la concentration de $5 \cdot 10^3$ cellules/ml. Les cellules effectrices (splénocytes murins ou lymphocytes périphériques humains activés pendant 24 heures par l'IL-2) sont ajoutées à différentes concentrations cellulaires afin d'obtenir différents rapports effecteurs/cibles (60/1, 30/1, 10/1 et 3/1). On procède ensuite comme pour la détermination de la fonction NK pour mesurer le relargage de ^{51}Cr et pour le calcul du pourcentage spécifique de lyse et des UL.

10-Etude de la fonction lymphocytes T cytotoxiques (CTL):

10-1- Obtention des lymphocytes T cytotoxiques :

Le test est effectué en deux étapes. La première consiste en la phase d'éducation (=génération d'effecteurs cytotoxiques proprement-dite). Les cellules répondeuses (splénocytes murins ou lymphocytes périphériques humains) sont mis pendant 5 jours au contact de cellules stimulatrices inactivées par irradiation (2000 Rads, pendant 10 minutes). Les rapports cellules répondeuses /cellules stimulatrices sont respectivement de 100/1 et de 25/1 pour la génération de CTL murins et humains. Les cellules stimulatrices utilisées sont la lignée P815 (H-2^d), un mastocytome murin pour la génération d'effecteurs cytotoxiques murins ou la lignée Jurkat, une leucémie lymphoblastique T aigüe pour la génération de cellules cytotoxiques humaines. Les cellules répondeuses sont exposées au DMBA une heure à 37°C avant l'addition des cellules stimulatrices.

La deuxième étape consiste en la phase de cytotoxicité. Cette étape s'effectue sans traitement des cellules effectrices par le DMBA. Après les 5 jours, les cellules activées sont comptées, lavées deux fois dans du MCC, puis placées dans des plaques 96 puits à fond conique en présence de 2500 cellules cibles (qui sont aussi les cellules stimulatrices, P815 ou Jurkat) marquées au chrome 51 (le marquage est réalisé comme pour les cellules cibles YAC-1 et K652 utilisées pour déterminer la fonction NK) à différents rapports effecteurs/cibles (50/1, 25/1, 12,5/1, 6,25/1). Après 4 heures d'incubation à 37°C, les surnageants sont collectés puis le relargage de ⁵¹Cr

est mesuré à l'aide d'un compteur γ . Le relargage spontané de ^{51}Cr est obtenu en incubant les cellules cibles avec du MCC pendant 4 heures et avec les différentes concentrations de DMBA. L'incorporation maximale de ^{51}Cr par les cellules P815 et Jurkat est déterminée par addition d'une solution de triton X-100 afin de lyser toutes les cellules cibles. Le pourcentage spécifique de lyse et les UL sont déterminés comme décrit précédemment (voir ci-dessus, paragraphe 9).

10-2- Fonction cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques :

Pour l'étude du DMBA sur la fonction cytotoxique des CTL, les cellules répondeuses sont générées en l'absence de DMBA comme décrit précédemment. Les cellules effectrices sont traitées par le DMBA (à la concentration de 40, 20 et 5 μM) une heure avant l'addition des cellules cibles (P815, ou Jurkat). Le toxique est présent uniquement pendant la phase de cytotoxicité et non pendant la phase de génération. La cytotoxicité est mesurée par relargage de ^{51}Cr comme décrit précédemment.

10-3- Etude du mécanisme d'action du DMBA sur la fonction cytotoxique de CTL humains:

On distingue deux mécanismes généraux de cytotoxicité dans les lymphocytes T cytotoxiques (57, 58). Le premier, fondé sur l'exocytose des granules cytotoxiques impliquant des molécules telles que la perforine et

les granzymes est dépendant du calcium extracellulaire, le second calcium-indépendant fait suite à une interaction membranaire et implique la molécule Fas et son ligand. Pour évaluer la part de cytotoxicité indépendante du calcium dans la lyse de la lignée Jurkat par les lymphocytes périphériques humains, nous avons placé les cellules effectrices dans du milieu additionné de 1,5 mM d'EGTA (Sigma) et 1 mM de chlorure de magnésium (Sigma). Les cellules effectrices sont incubées 1 heure en présence des réactifs (chlorure de magnésium, EGTA et DMBA) avant d'ajouter les cellules cibles.

La lignée P815 utilisée pour mesurer la fonction cytotoxique des splénocytes murins n'expriment pas la molécule Fas (CD95).

La lignée Jurkat exprime de façon constitutive la molécule Fas et est résistante à la lyse NK.

11- Analyse statistique des résultats :

Les comparaisons statistiques sont celles qui s'appliquent à la comparaison de moyennes de variables continues. Dans un premier temps, nous avons procédé à l'analyse de variance entre le groupe témoin (cellules traitées par 0,1% de DMSO) et les différents groupes traitement (les groupes traitement correspondent aux différentes concentrations d'HPA utilisées), puis nous avons ensuite procédé à l'ensemble des comparaisons traitement/témoins à l'aide du test t de Dunnett. Le rejet de l'hypothèse nulle a été adoptée au seuil de 5 %.

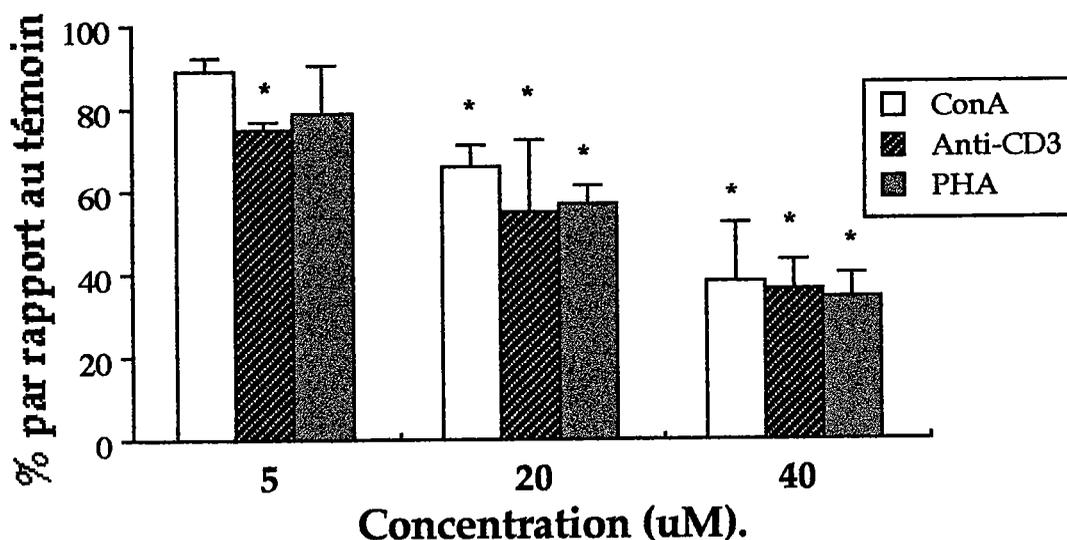
CHAPITRE 4 : RESULTATS :

1^{ère} PARTIE : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur l'activation des lymphocytes T murins et humains : interaction avec l'homéostasie calcique.

1- Effet sur l'activation lymphocytaire des lymphocytes T murins.

Le DMBA inhibe de manière dose-dépendante la prolifération de splénocytes murins en réponse à différents mitogènes polyclonaux des cellules T comme la phytohémagglutinine (PHA), la concanavaline A (ConA) ou un anticorps anti-CD3 (Figure n°7). Les concentrations inhibitrices 50 (CI50) sont respectivement de $2,7 \cdot 10^{-5}M$, $3,0 \cdot 10^{-5}M$ et $2,2 \cdot 10^{-5}M$. Le DMBA inhibe donc de façon identique la prolifération des lymphocytes T murins en réponse à la ConA, la PHA ou l'anticorps anti-CD3.

Figure n°7 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération de splénocytes murins activés par la phytohémagglutinine, la concanavaline A ou l'anticorps anti-CD3.



Résultats de 3 expériences indépendantes (moyenne \pm sem).

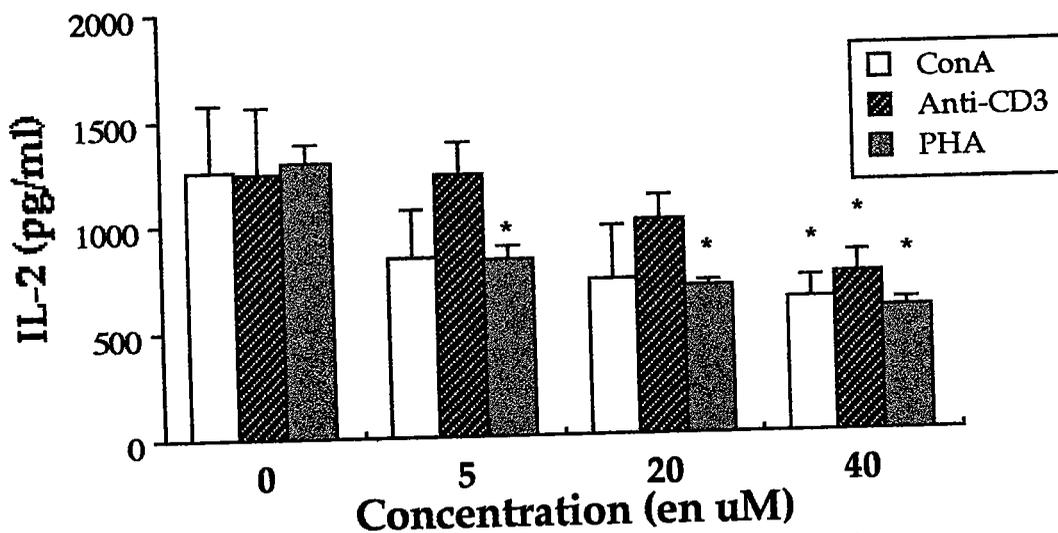
* $p < 0.05$

2- Effet sur la production d'interleukine-2 des lymphocytes T murins.

L'interleukine-2 (IL-2) est le facteur de croissance majeur du lymphocyte T activé, nous avons donc mesuré la quantité d'IL-2 produite par les splénocytes murins activés par la PHA, la ConA ou par l'anticorps anti-CD3 après exposition au DMBA. Le DMBA inhibe de façon dose-dépendante la production d'IL-2 des splénocytes murins quel que soit le mitogène utilisé (Figure n°8). Les CI50 sont les suivantes : $4,6 \cdot 10^{-5}M$ lorsque la ConA est utilisée comme mitogène, $8,3 \cdot 10^{-5}M$ avec l'anticorps anti-CD3 et $2,9 \cdot 10^{-5}M$ avec la PHA. Les quantités d'interleukine-2 produites par les splénocytes en réponse à la PHA, la ConA ou l'anti-CD3 sont

à peu près identiques : $1292 \pm m$ pg/ml, 1251 ± 326 pg/ml et 1241 ± 315 pg/ml (Figure n°8).

Figure n°8 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la production d'IL-2 par les splénocytes murins activés par la phytohémagglutinine, la concanavoline A ou l'anticorps anti-CD3.



Résultats de 3 expériences indépendantes (IL-2 en pg/ml \pm sem).
* $p < 0,05$

3-Effet sur l'homéostasie calcique des lymphocytes T murins.

Effets du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des splénocytes par la Concanavoline A.

La production d'IL-2 après activation du lymphocyte T est dépendante à la fois de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation de la PKC. Une augmentation persistante du taux de calcium intracellulaire dans le lymphocyte T est nécessaire pour la production d'IL-2. Nous avons donc suivi l'évolution du taux de calcium intracellulaire au cours du temps après

exposition au DMBA. Après une heure de traitement par le DMBA, le signal mitogénique est additionné et le taux de calcium intracellulaire est mesuré par cytométrie en flux. La ConA est utilisée pour stimuler les lymphocytes T issus de la rate purifiés et exposés au DMBA (Figure n°9).

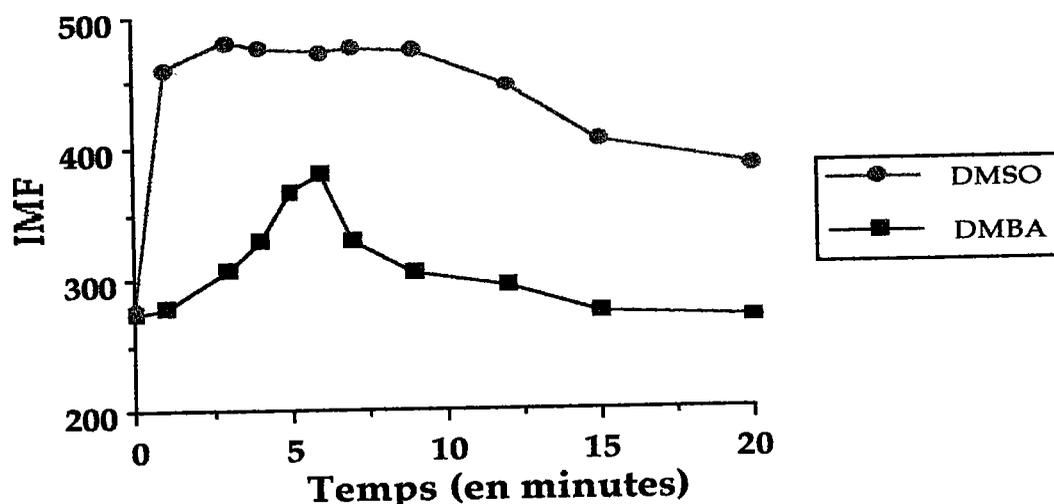
Une heure après exposition au DMBA, le taux de base du calcium intracellulaire n'est pas modifié de façon significative, quelle que soit la concentration d'HPA utilisée (de 5 à 40 μM) (Figure n°9).

Lorsque les lymphocytes T murins sont traités avec le solvant DMSO, le taux de calcium intracellulaire arrive à son niveau maximal 3 minutes après l'addition de ConA. Le signal augmente de 64% par rapport à son niveau de base (Figure n°9).

Après activation par la ConA des lymphocytes traités par le DMBA, l'augmentation du taux de calcium est diminuée de manière dose-dépendante par rapport au DMSO. Selon la concentration de DMBA, le signal n'augmente plus que de 40% pour 10 μM (résultats non montrés), 30% pour 20 μM , 25% pour 40 μM (Figure n°9). Cette augmentation du taux de Ca^{2+} après activation par la ConA est retardée de façon dose-dépendante par le DMBA : 1 minute à 10 μM , 2 minutes à 20 μM (résultats non montrés), et 3 minutes à 40 μM . De plus, le taux de calcium intracellulaire redescend à son niveau initial 15 minutes après activation par la ConA (Figure n°9).

Les lymphocytes T exposés au DMBA et activés par la ConA ne présentent pas la phase de plateau observée dans les splénocytes traités par le solvant DMSO après activation par la ConA (Figure n°9).

Figure n°9 : Effet du Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des lymphocytes T par la concanavaleine A.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF). La ConA est additionnée une heure après l'exposition au DMBA (40 μ M)

Effet du Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire dans le lymphocyte T murin.

Le DMBA est connu pour induire une augmentation de calcium intracellulaire de façon précoce dans des lignées cellulaires T humaines. Les résultats rapportés précédemment (Figure n°9) montrant que le DMBA interagit avec le taux de calcium intracellulaire du lymphocyte T murin après activation par la ConA, nous avons décidé d'étudier la modification du taux de calcium intracellulaire après exposition des lymphocytes T au DMBA seul.

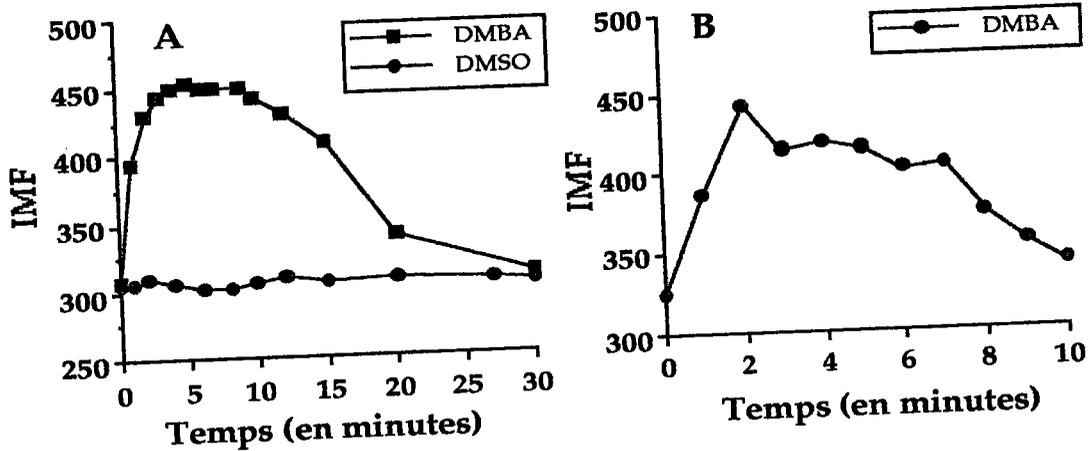
Le taux de calcium intracellulaire augmente après exposition au DMBA. Le taux atteint un maximum après 5 minutes, puis reste stable jusqu'à 10 minutes puis décline pour arriver à son niveau initial 30 minutes après

exposition au DMBA (Figure n°10A). Ces résultats confirment l'absence de modification du taux de calcium intracellulaire après une heure d'exposition au DMBA (Figure n°9).

Origine du calcium libéré par le diméthyl-7,12-benz(a)anthracène dans le lymphocyte T murin.

En l'absence de tout stimulus mitogène, le DMBA induit dans le lymphocyte T une augmentation du taux de calcium intracellulaire. L'utilisation d'un milieu sans calcium extracellulaire permet de déterminer l'origine extracellulaire ou intracellulaire du calcium libéré par le DMBA. Dans ces conditions, le DMBA entraîne une augmentation de calcium intracellulaire de même intensité qu'en présence d'un milieu riche en calcium. Cependant, la cinétique de l'augmentation de calcium est différente puisque le pic est atteint 2 minutes après exposition au DMBA et que le niveau basal est rejoint plus tôt (10 minutes après exposition) (Figure n°10B). Ces résultats montrent que l'augmentation du taux de calcium intracellulaire produite dans le lymphocyte T murin par le DMBA seul est due à une libération de calcium d'origine intracellulaire.

Figure n°10: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire des lymphocytes T murins en présence (A) et en l'absence de calcium extracellulaire (B).



Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF)

Le DMBA est additionné au temps $t=0$ et le taux de calcium intracellulaire dans les lymphocyte T est mesuré toute les minutes

Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la production d'inositol-1,4,5-triphosphate dans le lymphocyte T murin.

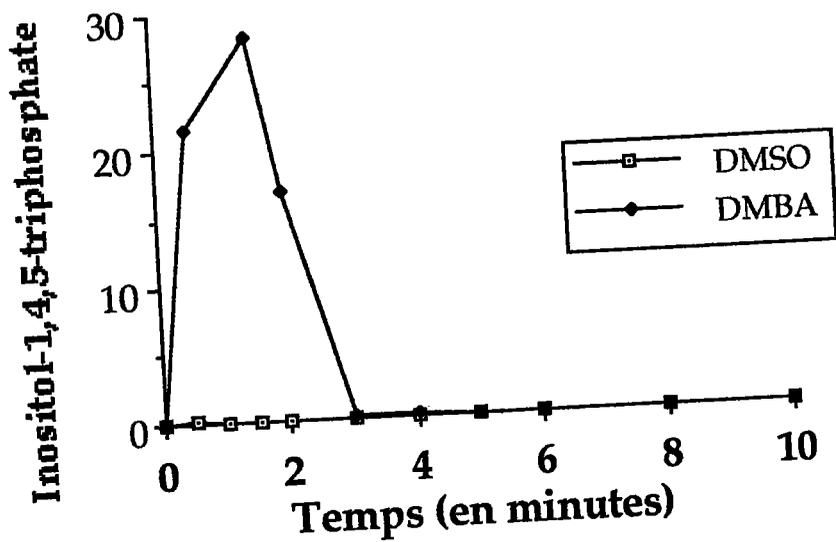
Nous avons mesuré ensuite la production d'IP3 après exposition des lymphocytes T au DMBA, puisque l'IP3 produite par clivage enzymatique des phospholipides membranaires est directement responsable après fixation sur son récepteur situé sur le réticulum endoplasmique (RE) de la libération de calcium intracellulaire stocké dans cet organe intracellulaire.

Le DMBA induit la production d'IP3 dans le lymphocyte T ($28,7 \text{ pmol}/10^7$ cellules T) en absence de tout stimulus mitogénique. Détectée après 30 secondes,

la production d'IP3 par le DMBA est maximale à 2 minutes. Elle retourne à son niveau de base 3 minutes après exposition (Figure n°11). La quantité d'IP3 produite par le DMBA est légèrement inférieure à celle produite par la ConA dans notre modèle cellulaire (41.6 pmol/10⁷ cellules T, production maximale à T= 30 secondes et persiste encore, 36.8 pmol/10⁷ cellules, à 1 minute 30 secondes-Figure n°11).

Ces résultats suggèrent que le DMBA induit une production d'IP3 qui serait par la suite responsable de la libération de calcium du RE.

Figure n°11 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la production d'inositol-1,4,5-triphosphate par les lymphocytes T murins.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en pmol d'IP3/10 millions de cellules.

Le DMBA est additionné au temps t=0.

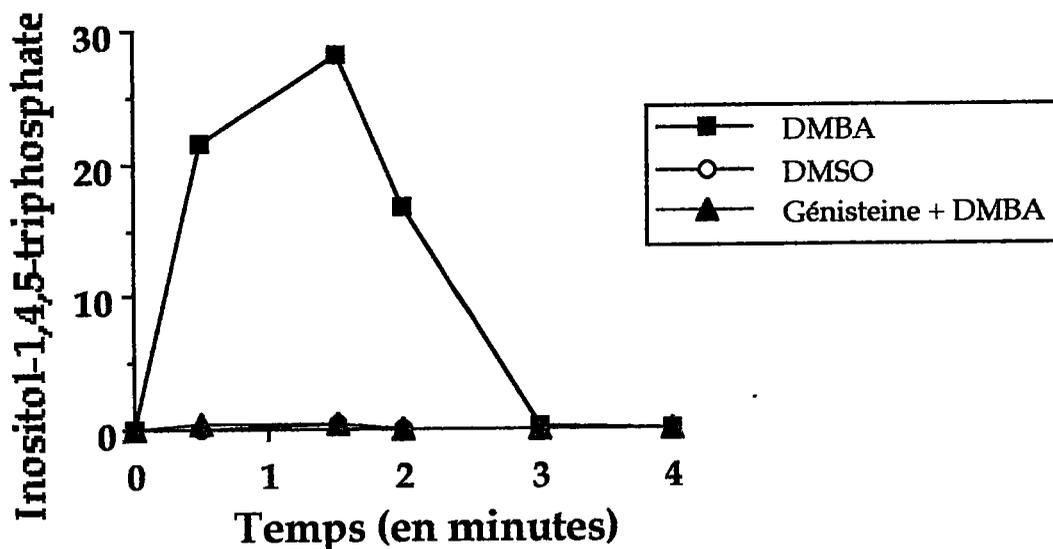
Implication des tyrosines kinases dans l'élévation du calcium intracellulaire et dans la production d'inositol-1,4,5-triphosphate induite par le diméthyl-7,12-benz(a)anthracène.

Des tyrosines kinases comme celle de la famille *src* et ZAP70 sont activées quelques secondes après stimulation du récepteur des cellules T pour l'antigène (RcT). Cette activation des tyrosines kinases permet la phosphorylation de la phospholipase-C-1- γ (PLC) qui clive les phospholipides membranaires et conduit ainsi à la production d'IP3 (voir Figure n°3). Pour démontrer que les tyrosines kinases sont responsables de la production d'IP3 et de l'augmentation calcique dans le lymphocyte T murin après exposition au DMBA, les cellules sont préincubées en présence de génisteine, un inhibiteur de tyrosines kinases, 30 minutes avant addition du DMBA. La génisteine inhibe la production d'IP3 (Figure n°12A) et l'augmentation calcique (Figure n°12B) induite par le DMBA.

L'activation de tyrosines kinases par le DMBA serait donc responsable de la production d'IP3 et de l'augmentation de calcium intracellulaire.

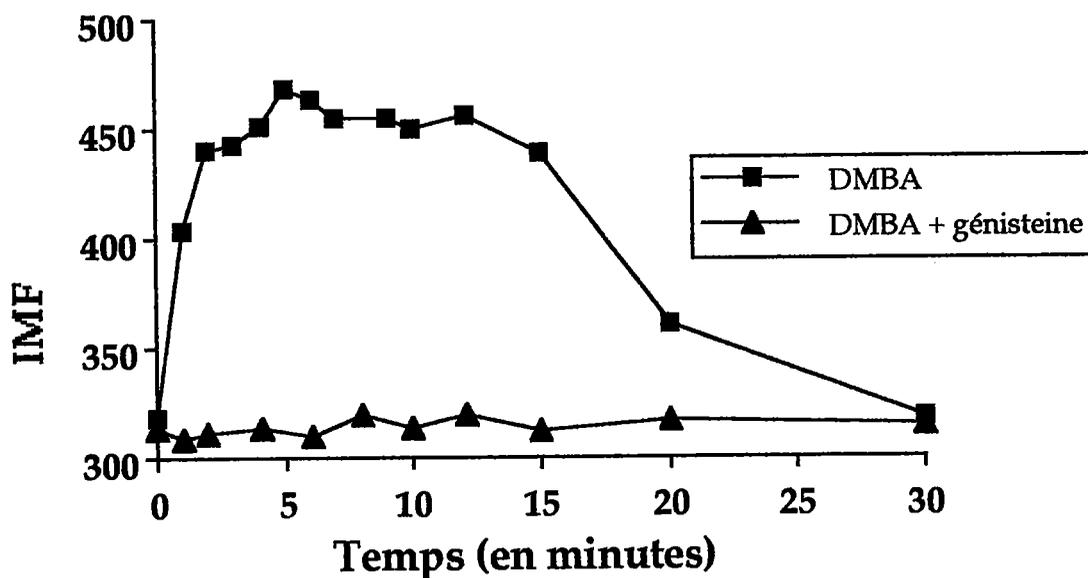
Figure n°12: Effet de la génisteine sur la production d'inositol-1,4,5-triphosphate (A) et sur l'élévation du taux de calcium intracellulaire (B) induit par le Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène dans le lymphocyte T murin.

A



Résultats d'une expérience représentative exprimés en pmol/10 millions de cellules. La génisteine est pr incub e avec les lymphocytes 30 minutes avant l'addition du DMBA.

B



Résultats exprimés en Intensité Moyenne de Fluorescence (IMF) d'une expérience représentative.

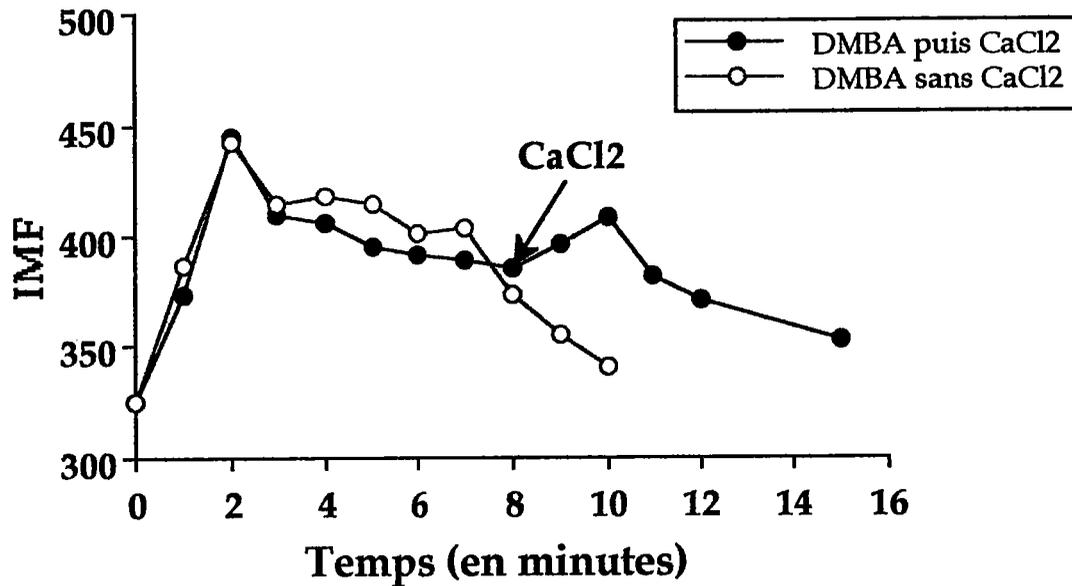
La génisteine est pr incub e avec les lymphocytes 30 minutes avant addition du DMBA.

Dans cette Figure n 12, T=0 correspond à l'addition du DMBA.

Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur l'entrée de calcium extracellulaire : mécanismes impliqués dans cette entrée de calcium extracellulaire.

L'origine du calcium responsable de l'augmentation du taux intracellulaire de ce cation divalent après exposition au DMBA est essentiellement intracellulaire (voir Figure n°10). Néanmoins, si on compare les cinétiques d'augmentation du calcium en milieu avec et sans calcium, il semble probable que le DMBA provoque aussi une entrée de Ca^{2+} extracellulaire. Si on ajoute du CaCl_2 après exposition à $40 \mu\text{M}$ de DMBA à des lymphocytes T murins dans un milieu privé de calcium, on observe une augmentation fugace du taux de calcium intracellulaire (10%) (Figure n°13). De plus, si les lymphocytes "stimulés" par le DMBA sont mis en présence d'EGTA au temps correspondant au pic du taux de Ca^{2+}_{ic} , le niveau de calcium intracellulaire revient au niveau basal à $t=12$ minutes par rapport à $t=20$ minutes pour les cellules témoins (Figure n°14). Ces résultats montrent que le DMBA induit une ouverture de canaux calciques membranaires des lymphocytes T et que ces canaux permettent l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire.

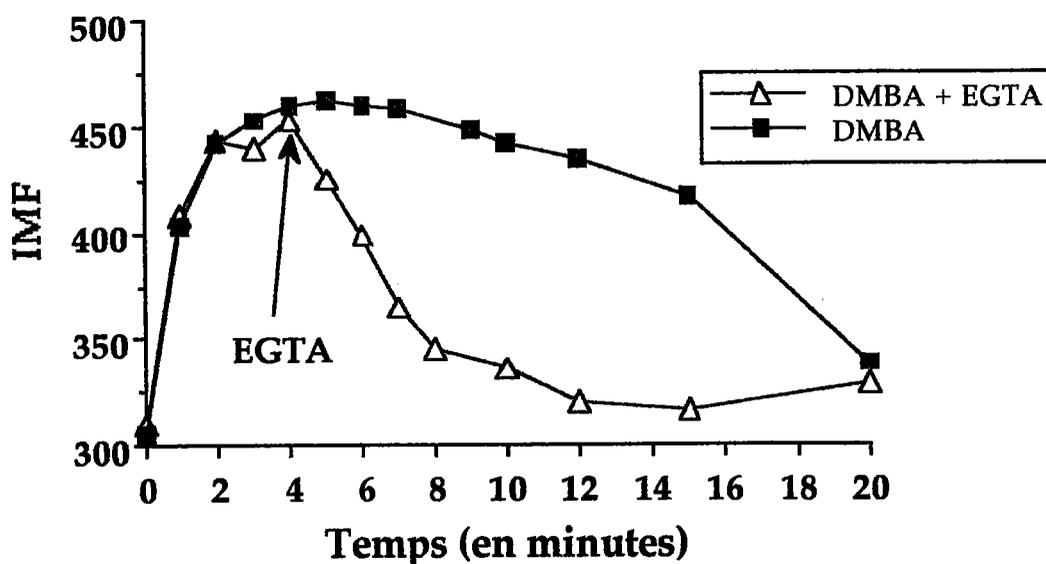
Figure n°13: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur l'entrée de calcium extracellulaire dans le lymphocyte T murin.



Résultats d'une expérience type exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF)

Le DMBA est additionné au temps T=0.

Figure n°14: Effet de l'EGTA sur l'entrée de calcium extracellulaire induit par le diméthyl-7,12-benz(a)anthracène dans le lymphocyte T murin.



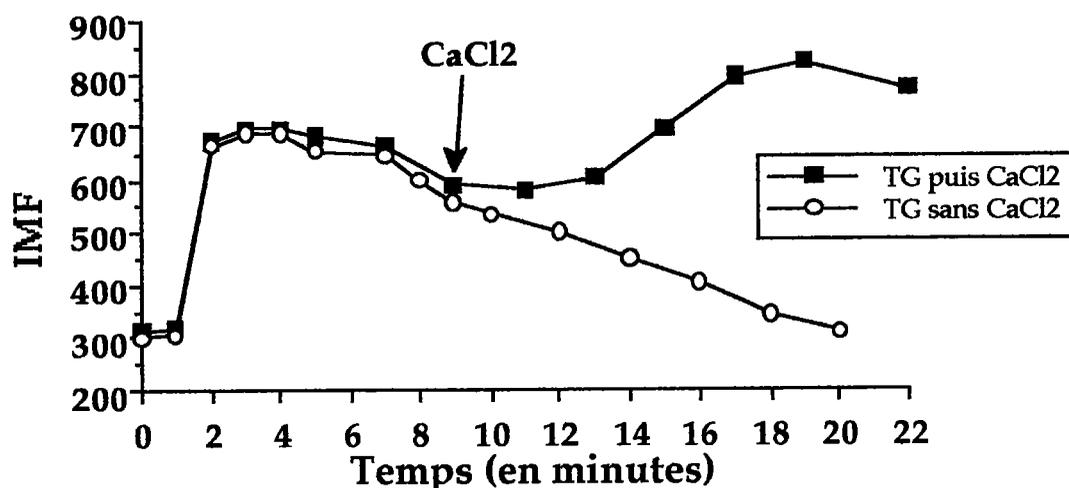
Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

Le DMBA est additionné au temps T=0.

Interaction(s) du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène avec les canaux calciques de la membrane plasmique.

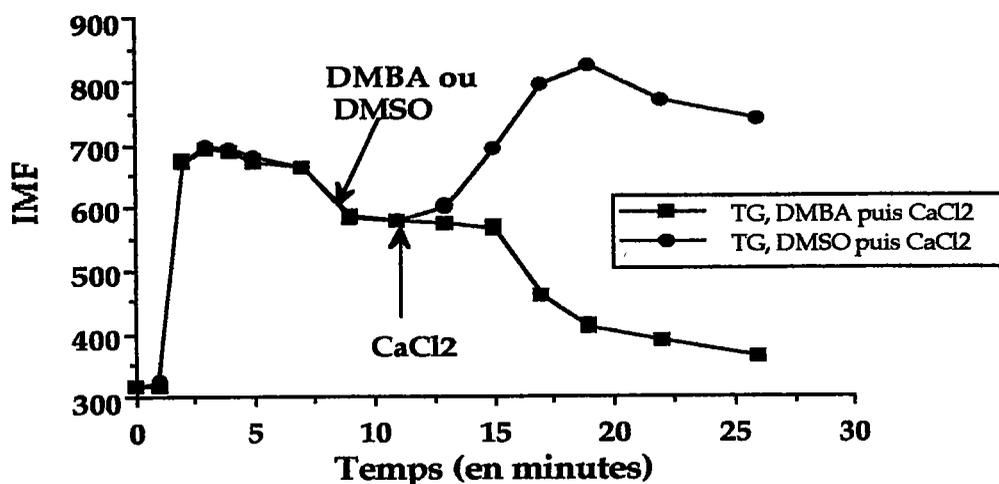
L'entrée de calcium du milieu extracellulaire est beaucoup plus importante et prolongée quand les cellules sont traitées par la Thapsigargin que par le DMBA (Comparer les Figures n°15 et n°17). La Thapsigargin est un puissant inhibiteur des SERCA permettant ainsi une déplétion importante du RE. Ce résultat montrerait que le DMBA pourrait inhiber partiellement l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire par une action sur les canaux calciques membranaires. Pour tester cette hypothèse, le DMBA est additionné aux lymphocytes T placés dans un milieu sans calcium juste avant la réintroduction de chlorure de calcium après activation par la Thapsigargin ou la ConA. Le DMBA inhibe complètement l'entrée de calcium extracellulaire induite par la Thapsigargin (Figure n°16) ou la Concanavaline A (Figure n°17). Le DMBA inhibe donc l'entrée de calcium extracellulaire en interférant avec des canaux calciques de la membrane plasmique.

Figure n°15: Effet de la thapsigargin sur l'entrée de calcium extracellulaire dans le lymphocyte T murin.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).
La thapsigargin est additionnée au temps T=0.

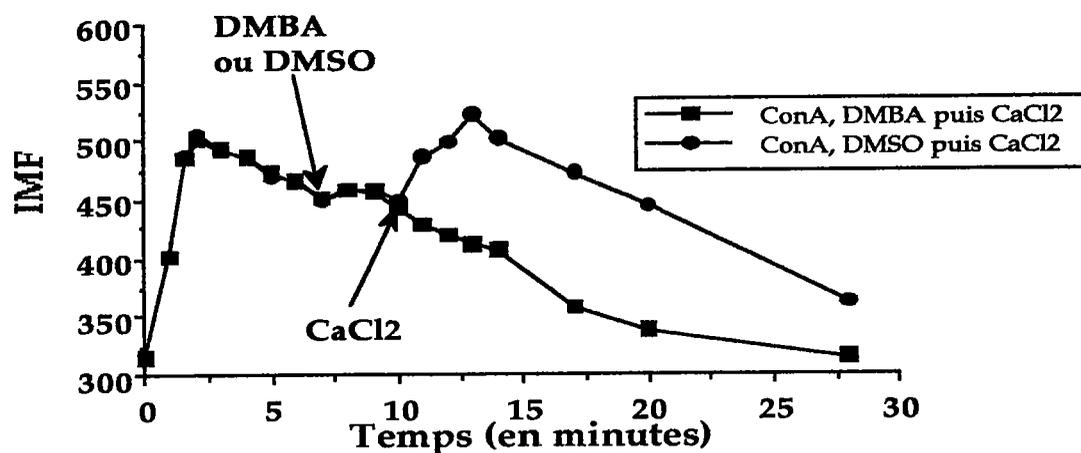
Figure n°16: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur l'entrée de calcium extracellulaire induite par la thapsigargin dans le lymphocyte T murin.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

La thapsigargin est additionnée au temps T=0, puis le DMBA ou le DMSO sont ajoutés.

Figure n°17: Effet du Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur l'entrée de calcium extracellulaire induite par la concanavoline A dans le lymphocyte T murin.



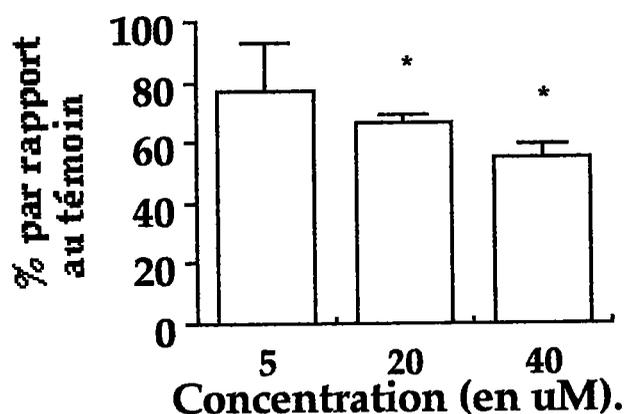
Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF). La Concanavoline A est additionnée au temps T=0, puis le DMBA ou le DMSO sont ajoutés.

De plus, le DMBA additionné après la Thapsigargin ou la ConA ne permet pas une nouvelle augmentation du taux de calcium intracellulaire lorsque les splénocytes sont placés dans un milieu sans calcium (Figures n°16 et n°17), suggérant l'existence d'un pool calcique intracellulaire commun mobilisé par le DMBA et la Thapsigargin d'une part et par le DMBA et la ConA d'autre part.

4- Effet sur l'activation lymphocytaire des lymphocytes T humains.

Le DMBA inhibe de façon dose-dépendante la prolifération de lymphocytes périphériques humains en réponse à la PHA (Figure n°19). La CI50 est égale à $4,8 \cdot 10^{-5} M$.

Figure n°18 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération des lymphocytes T humains en réponse à la phytohémagglutinine.

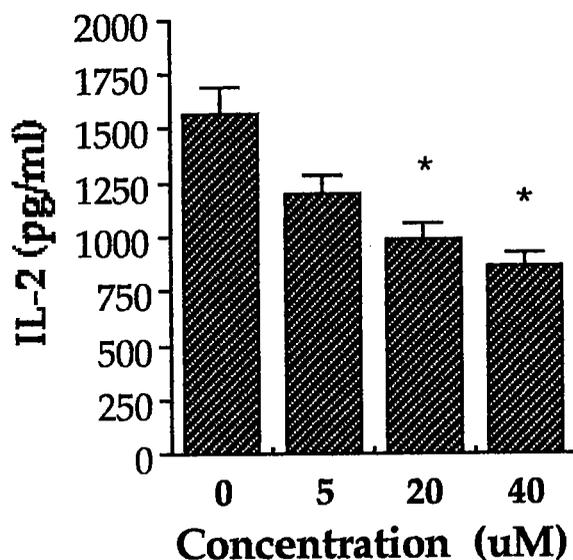


Résultats de 3 expériences indépendantes (moyenne \pm sem).
* $P < 0.05$

5- Effet sur la production d'interleukine-2 par les lymphocytes T humains.

Nous avons ensuite mesuré la quantité d'IL-2 produite par les lymphocytes périphériques humains activés par la PHA après exposition au DMBA. Le DMBA inhibe de façon dose-dépendante la production d'IL-2 en réponse à la PHA des lymphocytes périphériques humains (Figure n°19). La CI50 est égale à $4,6 \cdot 10^{-5}$ M.

Figure n°19: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la production d'interleukine-2 par les lymphocytes périphériques humains en réponse à la phytohémagglutinine.



Résultats de trois expériences indépendantes (moyenne \pm sem)
* $P < 0.05$

Le DMBA affecte à la fois la prolifération des lymphocytes T humains et la production d'IL-2 en réponse à la PHA. Le DMBA agit donc en amont de la production d'IL-2. Il est donc intéressant d'étudier l'interaction du DMBA avec l'homéostasie calcique du lymphocyte T humain.

6- Effet sur l'homéostasie calcique des lymphocytes T humains.

Comme avec le lymphocyte T murin, nous avons déterminé l'interaction du DMBA avec le lymphocyte T humain après activation par un mitogène polyclonal des cellules T (la PHA), mais aussi l'effet direct du DMBA sur le taux de calcium intracellulaire.

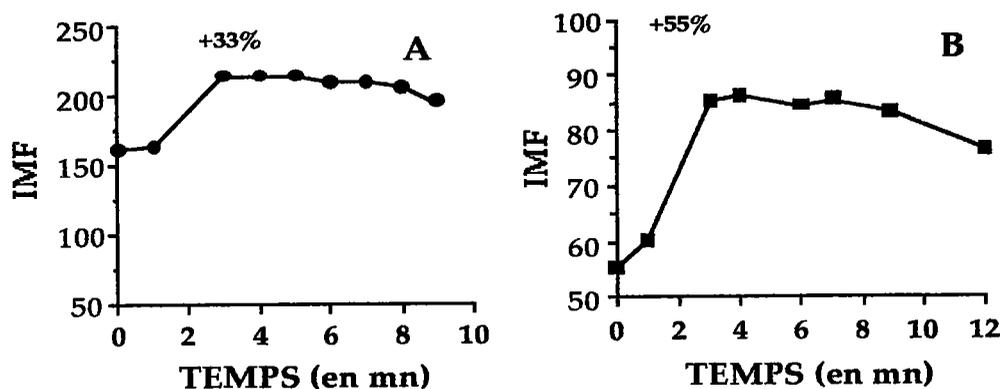
Effets du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des lymphocytes périphériques humains par la phytohémagglutinine

Tout d'abord, nous avons suivi l'évolution du taux de calcium intracellulaire au cours du temps après activation par la PHA et exposition au DMBA.

Deux minutes après l'addition de la PHA, le calcium arrive à sa concentration intracellulaire maximale, lorsque les cellules sont traitées avec le solvant DMSO. Le signal augmente par rapport à son niveau de base (Figure n°20B). Le calcium intracellulaire dans le lymphocyte périphérique humain retrouve son niveau de base, 35 minutes après l'addition du signal d'activation (résultats non montrés).

L'intensité de l'augmentation du calcium intracellulaire suite à l'activation par la PHA et exposition au DMBA est diminuée de manière dose-dépendante (résultats non montrés). Le taux de calcium intracellulaire redescend à son niveau initial 20 minutes après activation par la PHA (Figure n°20A). Les lymphocytes exposés au DMBA et activés par la PHA ne présentent pas la phase de plateau du taux de calcium intracellulaire observée dans les lymphocytes traités par le solvant DMSO après activation par la PHA (Figure n°20B). L'augmentation de calcium est retardée de 1 minute à 40 μM (Figure n°20A). De plus, le taux de base du calcium intracellulaire des lymphocytes humains est augmenté après une heure d'exposition au DMBA (Figure n°20A).

Figure n°20: Effet comparé du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène (A) et du DMSO (B) sur le taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des lymphocytes périphériques humains par la phytohémagglutinine.



Résultats d'une expérience représentative exprimée en Intensité Moyenne de Fluorescence (IMF)
Les pourcentages indiquent l'augmentation maximal du signal

Les lymphocytes sont traités par le DMBA ou le DMSO une heure avant l'addition du signal mitogénique. Le temps T=0 correspond à l'addition du signal mitogénique.

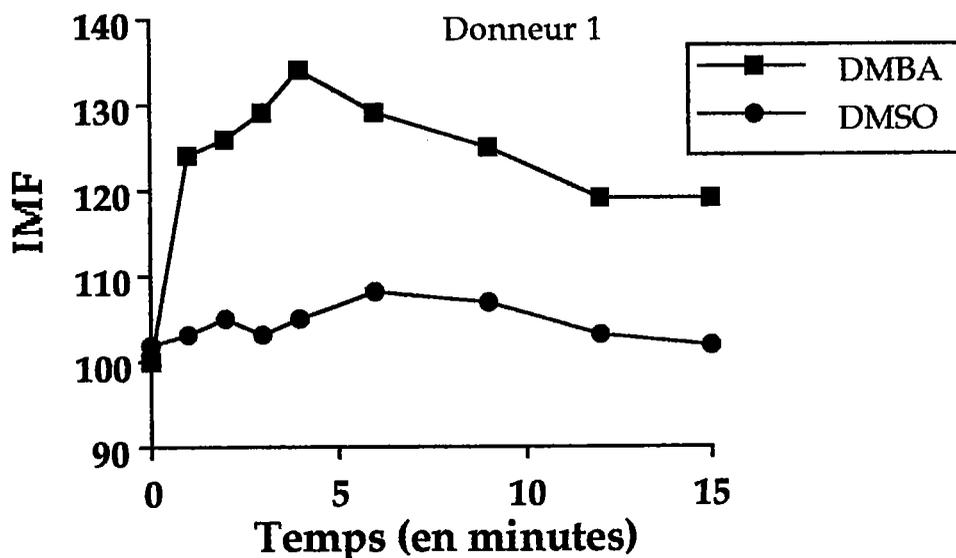
Effets du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire des lymphocytes humains.

Le DMBA est connu pour induire une augmentation de calcium intracellulaire de façon précoce dans des lignées leucémiques T humaines de phénotype CD4+ (Jurkat) et thymocytaire CD4+CD8+ (HBP-ALL) ainsi que dans les lymphocytes T murins (voir plus haut). De plus, le DMBA perturbant le taux de calcium intracellulaire du lymphocyte T humain après activation par la PHA, nous avons décidé d'étudier le taux de calcium intracellulaire des lymphocytes T périphériques après traitement par le DMBA.

Les résultats obtenus ne sont pas identiques selon les individus. Le DMBA induit une augmentation précoce du taux de calcium intracellulaire dans

les lymphocytes T humains purifiés et isolés du sang périphérique de 4 donneurs sains sur les 10 volontaires testés (voir exemple du Donneur 1, Figure n°21A). Cette augmentation atteint son maximum entre 3 à 6 minutes après exposition au DMBA. En revanche, nous n'avons pas pu détecter de modification du taux de calcium intracellulaire de manière précoce (inférieure à 30 minutes) dans les lymphocytes T humains des 6 autres donneurs (voir Figure n°21B, où sont représentés les deux types de donneurs).

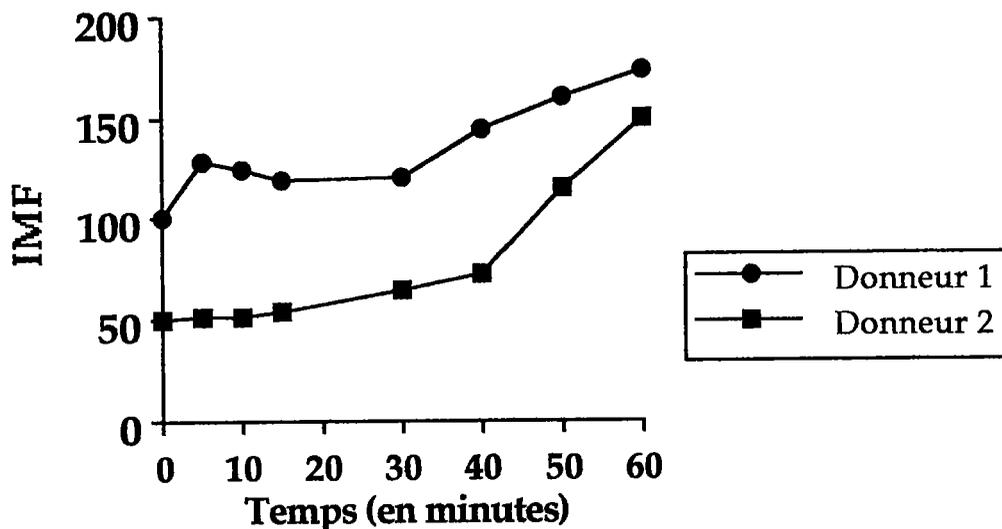
Figure n°21A: Cinétique d'augmentation du taux de calcium intracellulaire après traitement des lymphocytes T humains par le DMBA : Augmentation précoce du taux de calcium intracellulaire.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

Le DMBA (ou le DMSO° est additionné au temps T=0.

Figure n°21B: Cinétique d'augmentation du taux de calcium intracellulaire après traitement des lymphocytes T humains par le DMBA : Augmentation tardive du taux de calcium intracellulaire : comparaison de 2 donneurs.



Ne figure que les résultats du DMBA.

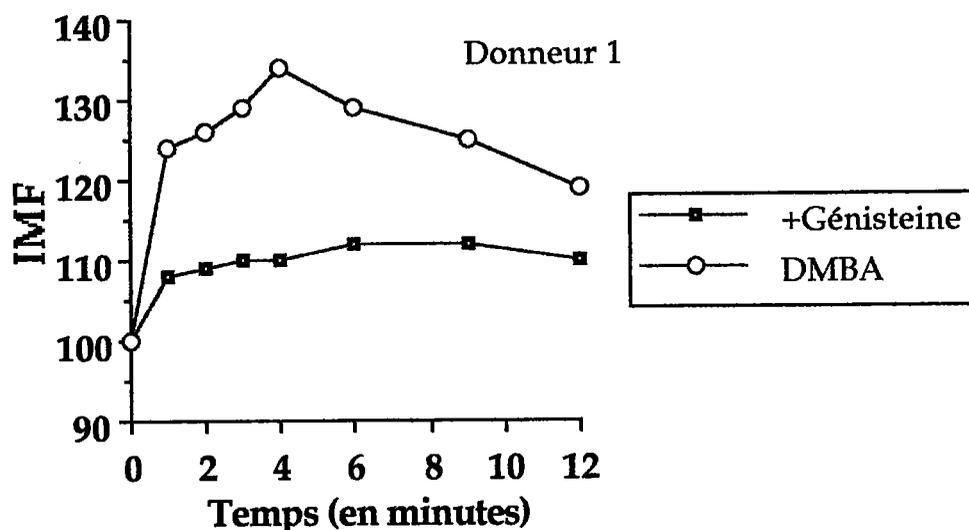
Chez le donneur 1, le DMBA induit une augmentation tardive et une précoce.

Chez le donneur 2, on n'observe que l'augmentation tardive.

Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).
Le DMBA (ou le DMSO) est additionné au temps T=0.

Dans les lymphocytes T périphériques des 4 donneurs pour lesquels on observe une augmentation précoce du taux de calcium intracellulaire, l'utilisation de milieu sans calcium et d'un inhibiteur des tyrosines kinases (la génistéine) a permis de démontrer d'une part que l'augmentation du taux de calcium intracellulaire était majoritairement due à une libération de calcium intracellulaire et d'autre part que l'inhibition des tyrosines kinases permettait de réduire ce taux (Figure n°22), mais de façon incomplète à la différence de ce que nous avons observé précédemment avec les splénocytes murins où l'inhibiteur était complète.

Figure n°22 : Effet de la génisteine sur l'élévation précoce du taux de calcium intracellulaire induit par le Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène dans le lymphocyte T humain.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF)

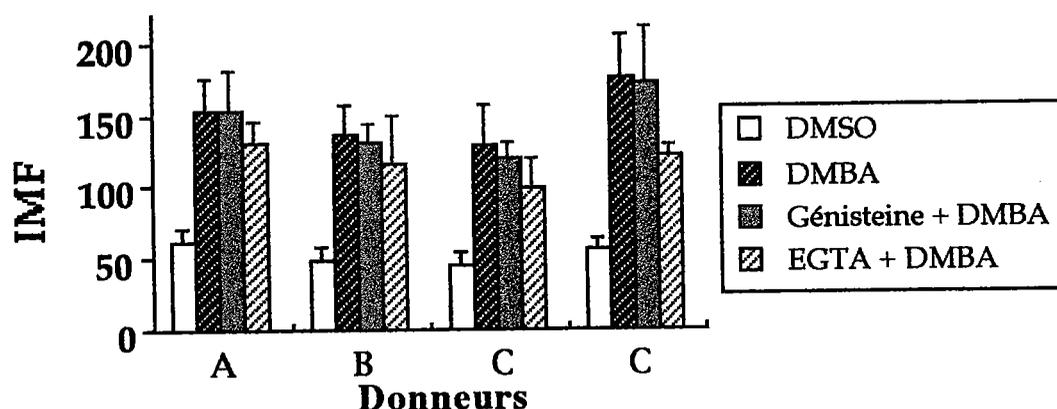
Le DMBA est additionné au temps T=0.

Néanmoins, après une heure d'exposition au DMBA le taux de calcium intracellulaire est élevé de manière significative dans les lymphocytes périphériques T humains de tous les donneurs (voir Figure n°20A et résultats non montrés). Cette augmentation tardive, variable d'un individu à l'autre peut durer jusqu'à 6 heures après traitement par le DMBA. Elle est insensible à un traitement par la génisteine et persiste même en absence de calcium extracellulaire (Figure n°23).

Ces résultats suggèrent que le DMBA induit une augmentation précoce du taux de calcium intracellulaire dans les lymphocytes T humains chez certains individus seulement à la différence de l'élévation tardive qui est constante chez

tous les donneurs. Si on observe une augmentation du Ca^{2+}_{ic} précoce, celle-ci est dépendante des tyrosines kinases, alors que l'augmentation tardive est indépendante des tyrosines kinases et du Ca^{2+} extracellulaire.

Figure n°23: La génisteine et l'EGTA ne modifient pas l'augmentation tardive du taux de calcium intracellulaire de lymphocytes T humains induit par le diméthyl-7,12-benz(a)anthracène.



Résultats exprimés en Intensité Moyenne de Fluorescence (IMF±sem).

Le donneur C a été testé deux fois.

Tous les résultats sont significativement différents du témoin-DMSO.

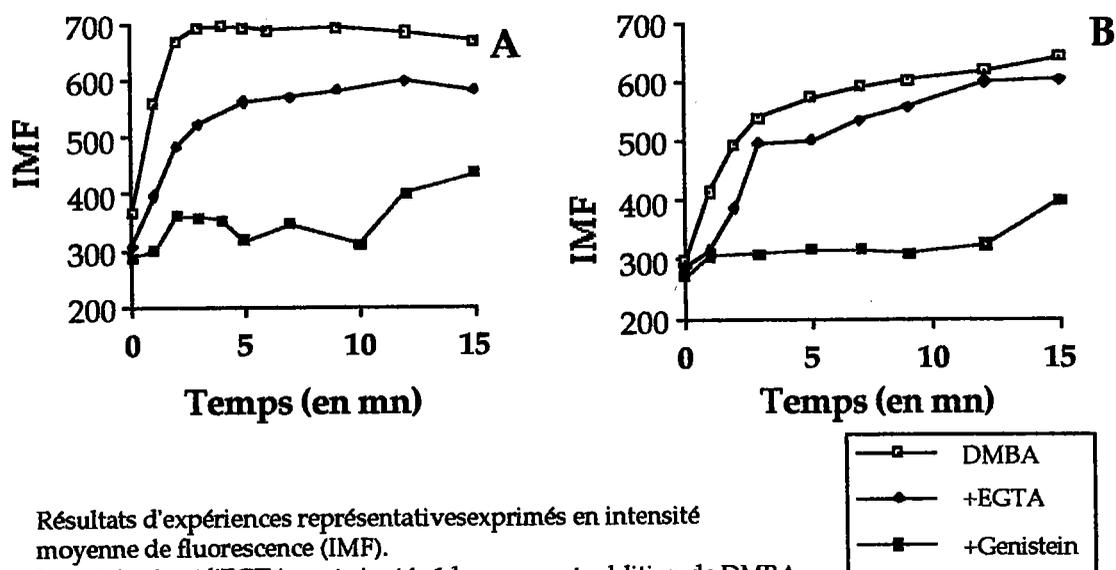
L'IMF est déterminée au temps T=1 heure, soit une heure après l'addition du DMBA.

Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire de lignées leucémiques T de phénotype CD4.

Pour s'assurer que la technique utilisée (cytométrie en flux et fluo-3AM) est suffisamment sensible pour détecter une augmentation précoce de calcium intracellulaire après exposition au DMBA, nous avons utilisé la lignée leucémique T Jurkat. En effet, il a été rapporté que le DMBA induisait une importante augmentation de calcium intracellulaire dans cette lignée.

L'augmentation du taux de calcium intracellulaire dans deux lignées T CD4+ (Jurkat et HUT78) induite par le DMBA est nettement plus importante que dans les lymphocytes T périphériques humains (Figure n°24). L'inhibition par la génistéine de l'augmentation du taux de calcium intracellulaire induite par le DMBA est complète dans les 10 premières minutes après l'addition du DMBA (Figure n°24). L'addition d'EGTA permet de démontrer que l'augmentation du taux de calcium intracellulaire induit par le DMBA dans les 2 lignées Jurkat et HUT78 est essentiellement d'origine intracellulaire (Figure n°24). Ces résultats suggèrent une différence dans le mécanisme de l'augmentation de calcium intracellulaire induite par le DMBA dans les lymphocytes T humains leucémiques et les lymphocytes T humains non tumoraux.

Figure n°24 : Effet du Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire dans la lignée T CD4 Jurkat (A) et la lignée T CD4 HUT78 (B).



Résultats d'expériences représentatives exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).
La génistéine et l'EGTA sont ajoutés 1 heure avant addition de DMBA
Le DMBA est additionné au temps T=0.

2^{ème} PARTIE : Interaction des dérivés méthylés du benz(a)anthracène avec l'activation du lymphocyte T murin : Étude de structure-activité.

1- Effets sur la prolifération de splénocytes murins activés par l'anticorps anti-CD3 ou la Concanavaleine A.

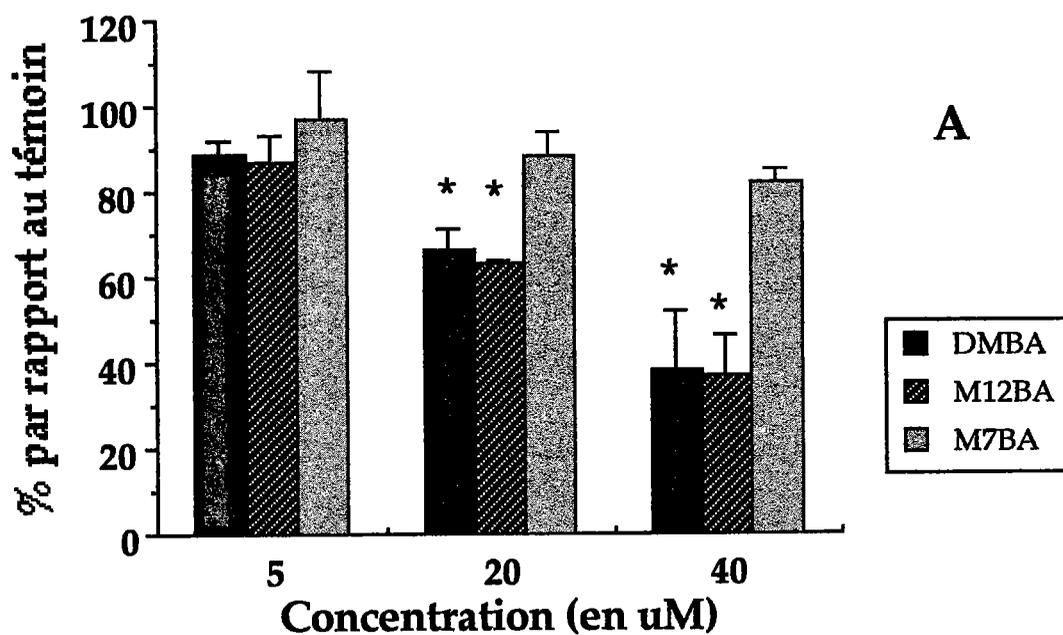
Le DMBA et le M12BA inhibent de manière dose-dépendante la prolifération en réponse à un mitogène polyclonal des cellules T, la concanavaleine A (ConA). Les concentrations inhibitrices 50 % (CI50) sont respectivement égales à $3,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$ et $2,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (Figure n°25A). Par contre, ce test n'est pas affecté par le M7BA (CI50= $4,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$) : quelle que soit la concentration, on observe aucune différence significative par rapport au témoin DMSO.

Le DMBA, le M7BA, le M12BA inhibent la prolifération des splénocytes en réponse à l'anti-CD3 de façon dose-dépendante (Figure n°25B). Les CI50 sont du même ordre de grandeur, bien que le DMBA soit encore le plus actif (CI50= $2,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$), puis le M7BA (CI50= $4,3 \cdot 10^{-5} \text{M}$), et le M12BA (CI50= $5,3 \cdot 10^{-5} \text{M}$).

Les viabilités cellulaires quelques soient les concentrations et les molécules employées ne sont pas significativement différentes du témoin.

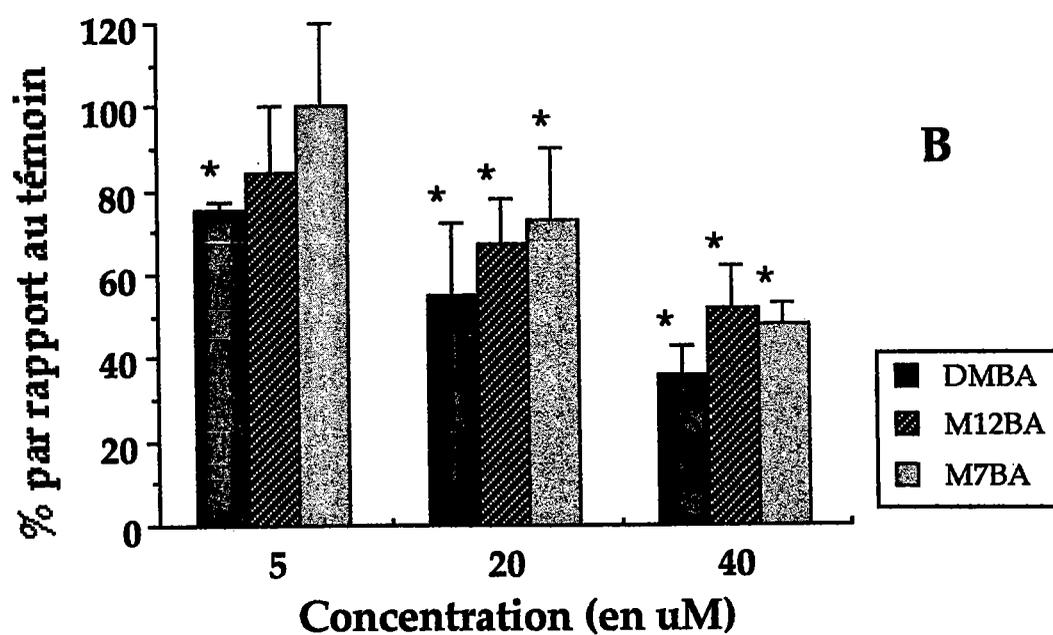
Figure n°25A: Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la prolifération des splénocytes murins activés par la concanavaline

A.



Résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Figure n°25B: Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la prolifération des splénocytes murins activés par l'anticorps anti-CD3.



Résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Pour différencier l'interaction des HPA sur les événements précoces (stimulation du récepteur pour l'antigène des cellules T (RCT)) ou plus tardifs de la prolifération (comme l'interaction de l'IL-2 avec son récepteur de haute affinité) des splénocytes en réponse à la ConA, nous avons ajouté à la concentration de 40 μ M les trois HPA à différents temps après l'activation par la ConA. La ConA est choisie comme signal d'activation car les trois dérivés méthylés du Benz(a)anthracène présentent un profil d'action différent lorsque les splénocytes sont activés par ce mitogène.

L'effet du DMBA persiste même lorsqu'il est additionné 24 heures après le signal d'activation (Tableau n°1). Le DMBA à 40 μ M inhibe de 62% la prolifération des splénocytes traités une heure avant l'addition de la ConA (Figure n°25A et Tableau n°1). La prolifération des splénocytes traités 24 heures après le signal d'activation n'est plus réduite que de 48%.

Le M7BA n'a pas d'effet significatif sur la prolifération en réponse à la ConA (Figure n°25A et Tableau n°1).

Le M12BA possède un effet significatif sur la prolifération de splénocytes en réponse à la ConA uniquement lorsqu'il est additionné jusqu'à 2 heures après le signal d'activation (Tableau n°1).

Tableau n°1: Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la prolifération de splénocytes murins après différents temps d'exposition avant ou après activation par la concanavaline A.

	- 1 hr (a)	0 hr (b)	+1 hr (b)	+2 hr (b)	+4 hr (b)	+8 hr (b)	+24hr (b)
DMBA	38±14*	29±7*	29±2*	43±9*	50±7*	53±5*	52±5*
M7BA	82±3	85±5	83±8	90±12	91±6	97±2	92±5
M12BA	37±9*	32±9*	31±4*	46±8*	71±10	78±6	89±10

a : Les HPA (40 µM) sont additionnés une heure avant le signal d'activation.

b : les HPA sont ajoutés après le signal d'activation.

La prolifération est mesurée à t= 48 heures.

Résultats de trois expériences indépendantes. *p<0,05

Le DMBA interagit avec les événements précoces et tardifs de l'activation lymphocytaire par la ConA. Le M12BA inhibe préférentiellement la phase précoce de l'activation.

2- Interaction des dérivés méthylés du benz(a)anthracène avec la voie de l'interleukine-2.

Effets sur la production d'Interleukine-2 par les splénocytes murins stimulés par l'anticorps anti-CD3 ou la Concanavaline A.

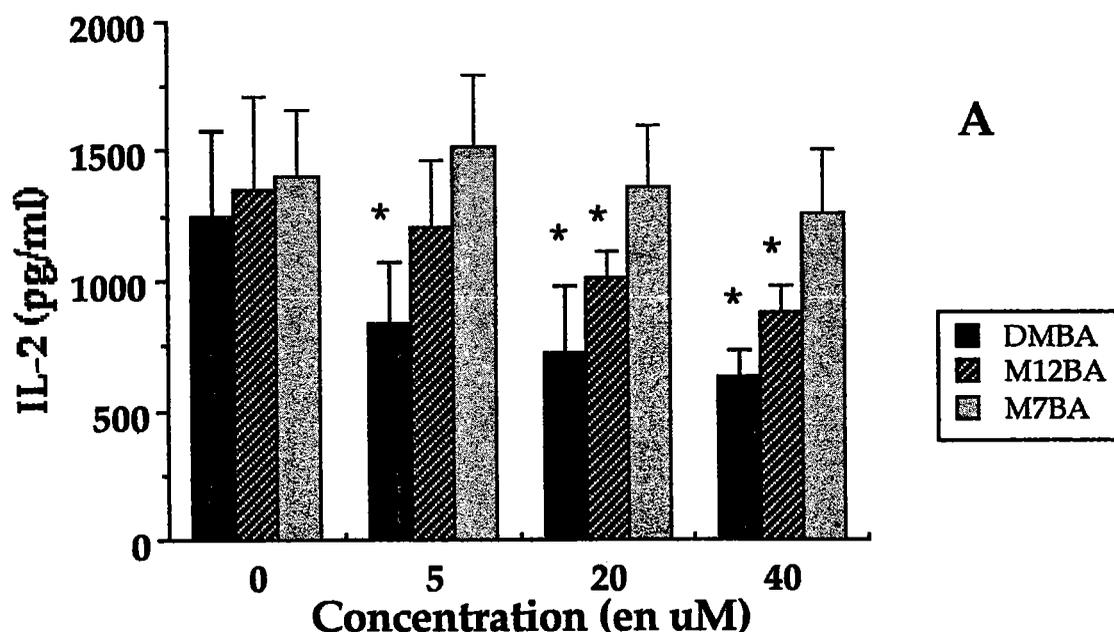
L'interleukine-2 (IL-2) étant le facteur de croissance majeur du lymphocyte T activé, nous avons mesuré la production d'IL-2 par les splénocytes murins activés par la ConA ou l'anticorps anti-CD3 après exposition aux dérivés méthylés du benz(a)anthracène. La production d'IL-2 par les splénocytes en réponse à la ConA

ou à l'anti-CD3 est à peu près identique : 1251 ± 326 pg/ml et 1241 ± 315 pg/ml respectivement (Figures 26A et 26B).

Comme pour le test de prolifération en réponse à la ConA, le M7BA n'affecte pas la production d'IL-2 après activation par ce mitogène : sa CI50 est de 2.10^{-2} M. Le DMBA et le M12BA inhibent de manière dose-dépendante la production d'IL-2 par les splénocytes activés par la ConA, le DMBA est toujours le dérivé plus actif (CI50= $4,6.10^{-5}$ M). La CI50 du M12BA est égale à $1,2.10^{-4}$ M (Figure n°26A).

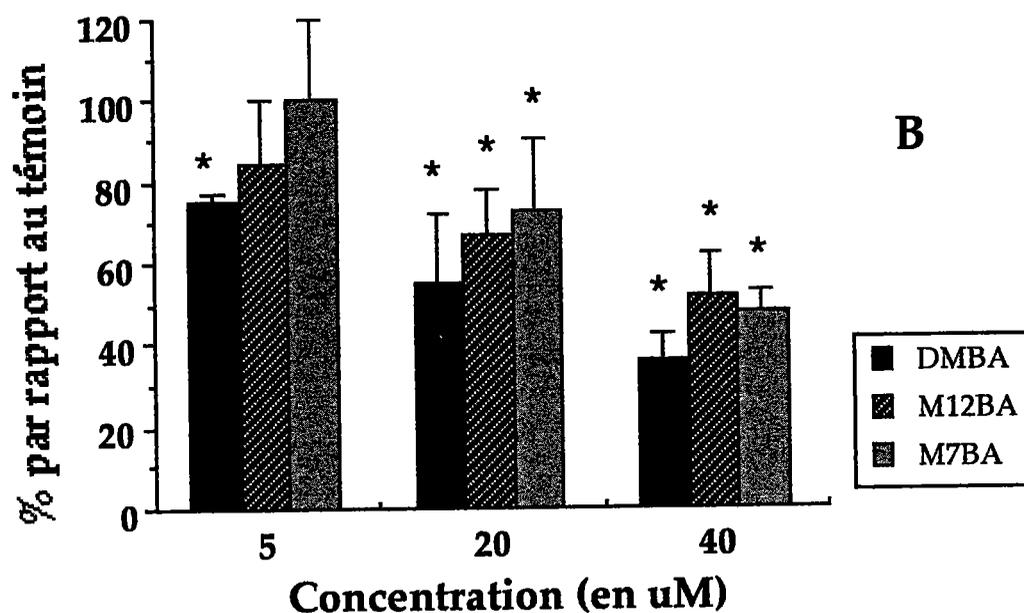
La production d'IL-2 en réponse à l'anticorps anti-CD3 est affectée de façon dose-dépendante par les trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène. La CI50 du DMBA $8,3.10^{-5}$ M est identique à celle du M7BA $8,6.10^{-5}$ M et inférieure à celle du M12BA $1,5.10^{-4}$ M (Figure n°26B).

Figure n°26A : Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la production d'interleukine-2 par les splénocytes murins activés par la concanavaleine A.



Résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Figure n°26B : Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la production d'interleukine-2 par les splénocytes murins activés par l'anticorps anti-CD3.



Résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Afin de transmettre son signal mitogénique aux lymphocytes activés, l'IL-2 doit interagir avec son récepteur de haute affinité constitué de trois chaînes α , β , et γ . L'interaction de l'IL-2 avec son récepteur permet au lymphocyte activé de passer de la phase G1 à S du cycle cellulaire. Nous avons donc déterminé l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 des splénocytes stimulés par la ConA et l'anti-CD3 après exposition *in vitro* à 40 μM des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène (Tableau n°2A et n°2B).

Lorsque les splénocytes sont activés par la ConA et exposés au DMSO, on dénombre grâce à la méthode de Scatchard 1452 sites de fixation pour l'IL-2. Quand les splénocytes activés par le même mitogène sont traités par les trois dérivés méthylés du Benzanthracène, le nombre de sites de fixation par cellule est de 1032 pour le M7BA (soit 71% par rapport au témoin), de 940 pour le M12BA (soit 64%

par rapport au témoin) et de 456 pour le DMBA (soit 31% par rapport au témoin). L'affinité de ces sites de fixation déterminée par la constante de dissociation K_d n'est pas affectée (Tableau n°2A).

Quand les splénocytes sont activés par l'anti-CD3, l'affinité des sites de fixation pour l'IL-2 n'est pas diminuée ($K_d=8,5 \cdot 10^{-11}$ M pour le témoin-DMSO, $6,8 \cdot 10^{-11}$ M, $7,7 \cdot 10^{-11}$ et $6,4 \cdot 10^{-11}$ M pour le DMBA, le M7BA et le M12BA respectivement). La réduction du nombre de sites de fixation pour l'IL-2 est importante avec le DMBA (486 sites de fixation par cellule contre 1583 pour le témoin-DMSO soit 69% d'inhibition, comme pour la ConA). Le M7BA et le M12BA inhibent de façon relativement identique le nombre de sites de fixation pour l'IL-2 (871 et 856 sites de fixation soit 46% et 45% d'inhibition respectivement) (Tableau n°2B).

Tableau n°2A : Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur l'affinité et le nombre de récepteur de haute affinité pour l'IL-2 de splénocytes activés par la concanavaline A.

ConcanavalineA	$K_d^a \times 10^{-11}$ M	Nombre de sites de fixation par cellules
DMSO	9.0	1459 (100%) ^b
DMBA	7.6	456 (31%)
M7BA	9.7	1032 (71%)
M12BA	5.5	940 (64%)

a : K_d signifie constante de dissociation.
 Résultats d'une expérience représentative.

Tableau n°2B : Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur l'affinité et le nombre de récepteur de haute affinité pour l'IL-2 de splénocytes activés par l'anticorps anti-CD3.

Anticorps anti-CD3	Kd ^a x 10 ⁻¹¹ M	Nombre de sites de fixation par cellules
DMSO	8.5	1583 (100%) ^b
DMBA	6.8	486 (31%)
M7BA	7.7	856 (54%)
M12BA	6.4	871 (55%)

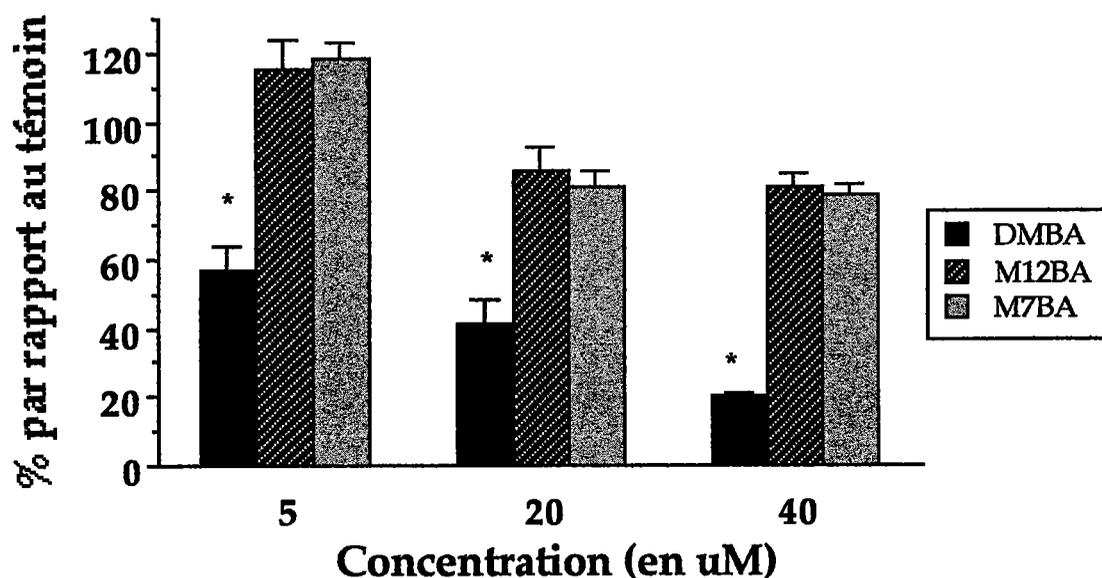
a : Kd signifie constante de dissociation.
 Résultats d'une expérience représentative.

Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la prolifération dépendante de l'interleukine-2.

Pour étudier l'interaction des HPA avec la voie de transduction de l'IL-2, les splénocytes murins sont stimulés pendant deux jours par la ConA, puis les lymphoblastes sont rendus dépendant de l'IL-2 pour leur croissance par addition d'IL-2 exogène. Seul le DMBA diminue significativement la prolifération dépendante de l'IL-2 des lymphoblastes stimulés par 200 pg/ml d'IL-2 (Figure n°27). Le DMBA inhibe toujours la prolifération dépendante de l'IL-2 de lymphoblastes stimulés par 500 pg/ml d'IL-2 (CI50=8,2.10⁻⁶ M à 500 pg/ml d'IL-2). Les deux autres dérivés monométhylés du benz(a)anthracène affectent faiblement la prolifération IL-2 dépendante (CI50 du M7BA=1,4 10⁻⁴ M; pour le M12BA 2,2 10⁻⁴ M) à cette concentration d'IL-2 (résultats non montrés). Lorsque la concentration

d'IL-2 est augmentée à 1000 pg/ml, le DMBA inhibe toujours fortement la prolifération dépendante de l'IL-2 ($CI_{50}=1,1.10^{-5}M$).

Figure n°27 : Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la prolifération dépendante de l'interleukine-2 (IL-2).



Résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$
IL-2= 200 pg/ml

Effet de l'ajout d'interleukine-2 sur l'inhibition de la prolifération en réponse à l'anti-CD3 ou la Concanavaline A induite par les trois dérivés du Benz(a)anthracène.

L'ajout d'IL-2 exogène à la concentration de 500 pg/ml au moment de l'exposition des splénocytes aux toxiques permet d'inhiber l'effet du M12BA sur la prolifération en réponse à la ConA ($CI_{50}=2,9.10^{-5}M$ avec la ConA seule et $9,8.10^{-5}M$

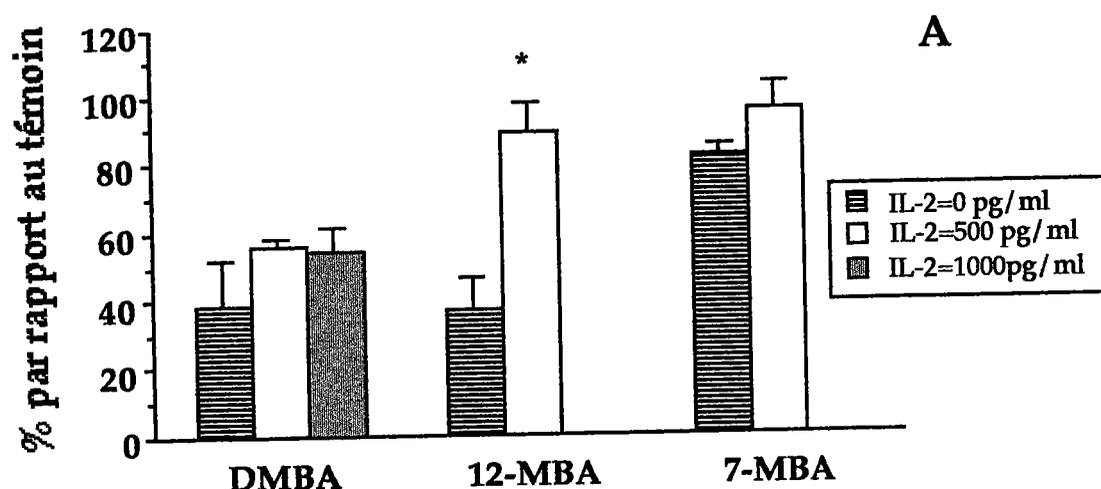
avec 500 pg/ml d'IL-2) (Figure n°28A) ou à l'anti-CD3 ($CI_{50}=5,3.10^{-5}M$ avec l'anti-CD3 seul, et $1,1.10^{-4}M$ avec 500 pg/ml d'IL-2) (Figure n°28B).

Le M7BA inhibe uniquement la prolifération des splénocytes activés par l'anti-CD3 (Figure n°26B). L'effet du M7BA est réduit par addition d'IL-2 exogène ($CI_{50}=4,3.10^{-5}M$ sans cytokines, $1,0.10^{-4}M$ avec 500 pg/ml d'IL-2) (Figure n°28B).

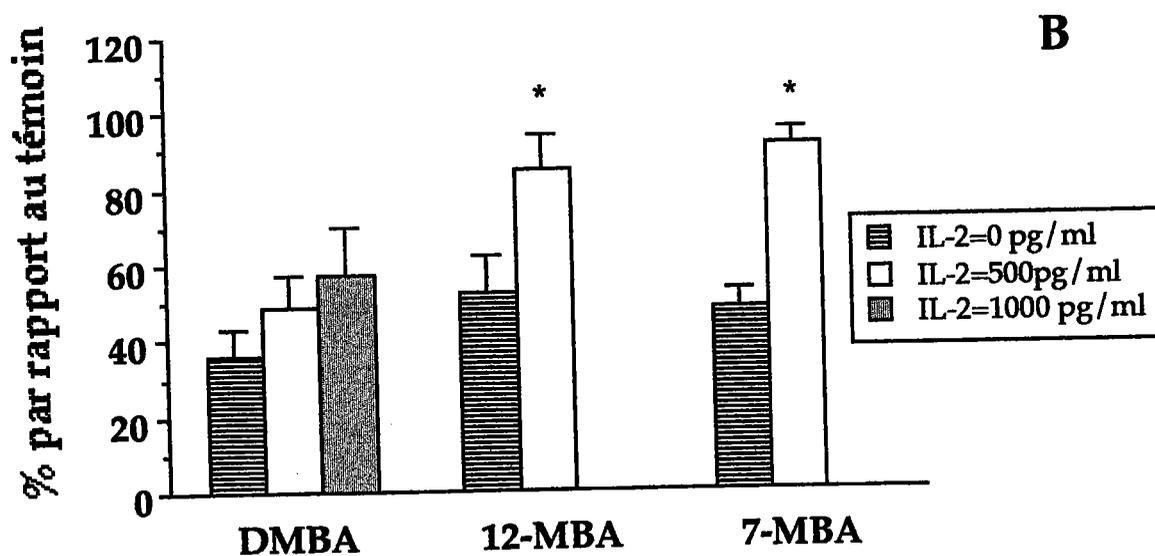
L'inhibition de la prolifération en réponse à l'anti-CD3 ou à la ConA induite par le DMBA n'est pas abolie par l'IL-2. Même à 1000 pg/ml d'IL-2, les CI_{50} restent stables ($CI_{50}=2,2.10^{-5}M$ avec anti-CD3, $4,7.10^{-5}M$ avec 1 ng/ml d'IL-2, $CI_{50}=3.10^{-5}M$ avec la ConA $4,6.10^{-5}M$ avec 1 ng/ml d'IL-2) (Figure n°28A et n°28B).

L'ajout d'IL-2 exogène permet d'inhiber les effets sur la prolifération des splénocytes en réponse aux mitogènes ConA ou anti-CD3 des deux dérivés monométhylés du benzantracène. Par contre, l'addition d'IL-2 ne permet pas d'inhiber les effet du DMBA sur la prolifération des splénocytes en réponse à l'anti-CD3 ou la ConA.

Figure n°28: Effet de l'ajout d'interleukine-2 (IL-2) sur l'inhibition de la prolifération des splénocytes murins en réponse à la concanavaline A (A) ou à l'anticorps anti-CD3 (B) induite par les trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène.



Résultats de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$.
L'interleukine-2 (IL-2) est additionnée en même temps que le dérivé du Benzanthracène.



Résultats de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$.
L'interleukine-2 (IL-2) est ajoutée en même temps que le dérivé du Benzanthracène.

Effet de l'ajout d'Interleukine-2 en combinaison avec d'autres cytokines sur l'inhibition de la prolifération en réponse à l'anti-CD3 ou à la Concanavaline A induite par les trois hydrocarbures polycycliques aromatiques

Des cytokines produites par les cellules présentatrices de l'antigène comme l'IL-1 et l'IL-6 délivrent un signal comitogénique aux lymphocytes T. Ces cytokines agissent sur l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 et/ou la réponse dépendante de l'IL-2.

L'addition d'IL-1 β ou d'IL-6 en combinaison avec l'IL-2 ne modifie pas significativement l'inhibition de l'effet du M12BA et du M7BA observée après ajout d'IL-2 seule (Figure n°29A et 29B). L'IL-2 à 500 pg/ml avait déjà corrigée l'inhibition de la prolifération causée par le M12BA et le M7BA (Figure n°28A et 28B).

Avec l'addition d'IL-2 et d'IL-1 β , l'effet du DMBA sur la prolifération en réponse à la ConA ou à l'anticorps anti-CD3 est réduit (Figure n°29A et 29B). L'IL-2 seule, même à fortes concentrations ne permettait pas un tel effet (Figure n°28A et 28B).

L'addition d'IL-6 en plus de l'IL-2 ne modifie rien (Figure n°29A et n°29B). Le DMBA est toujours aussi actif.

Figure n°29A : Effet de l'ajout d'interleukine-2 exogène en combinaison avec d'autres cytokines sur l'inhibition de la prolifération des splénocytes murins en réponse à la concanavoline A induite par les trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène.

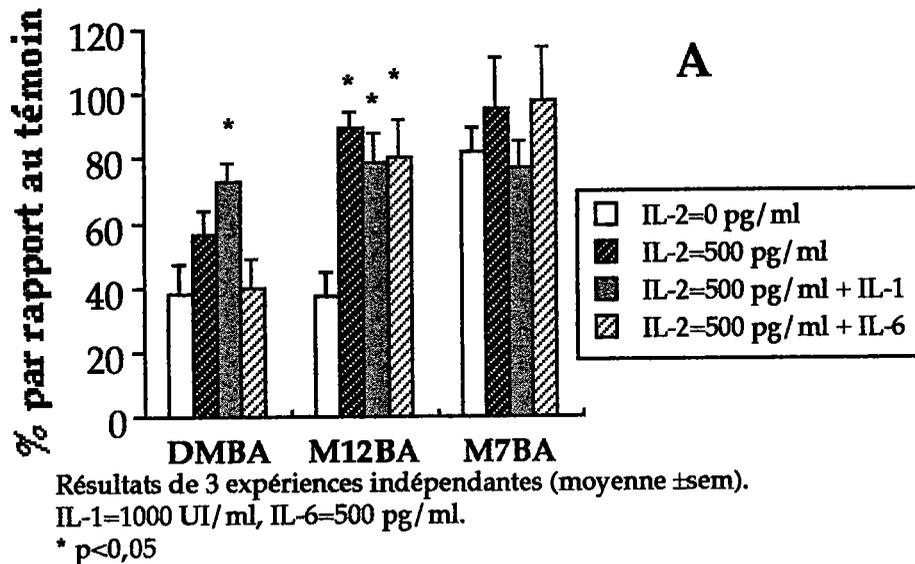
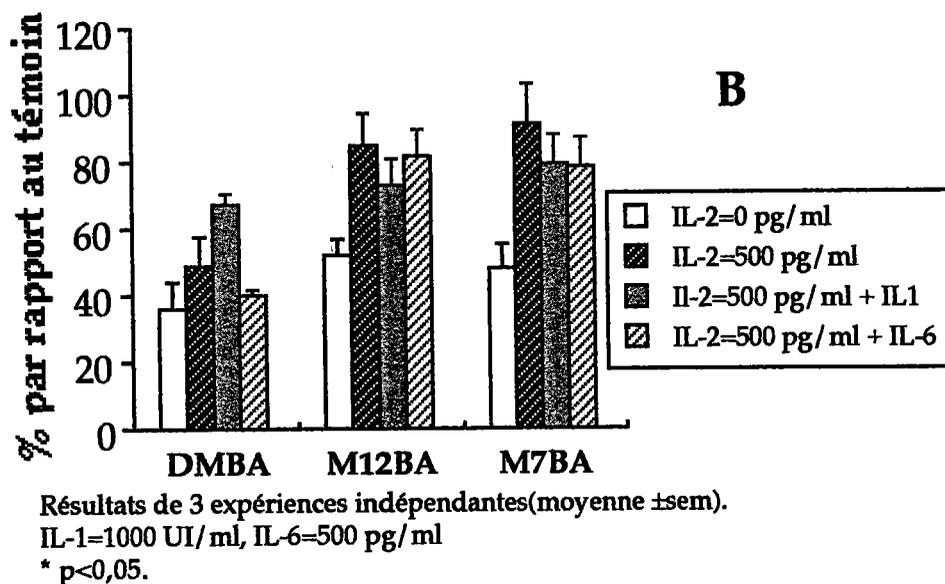


Figure n°29B : Effet de l'ajout d'interleukine-2 exogène en combinaison avec d'autres cytokines sur l'inhibition de la prolifération des splénocytes murins en réponse à l'anticorps anti-CD3 induite par les trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène.



3- Effets des hydrocarbures polycycliques aromatiques sur l'homéostasie calcique des lymphocytes T murins

Les résultats précédemment rapportés montrent que le DMBA inhibe l'augmentation du taux de calcium intracellulaire qui fait suite à l'activation lymphocytaire T. Afin de définir le ou le(s) groupements méthyles responsable(s) de cet effet, nous avons donc suivi la variation du taux de calcium intracellulaire des lymphocytes T murins après activation par la ConA et exposition aux trois différents HPA. La ConA est choisie comme signal d'activation car les trois dérivés Benz(a)anthracène affectent de manière distinctes la prolifération des splénocytes en réponse à ce mitogène.

Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des splénocytes par la Concanavaline A.

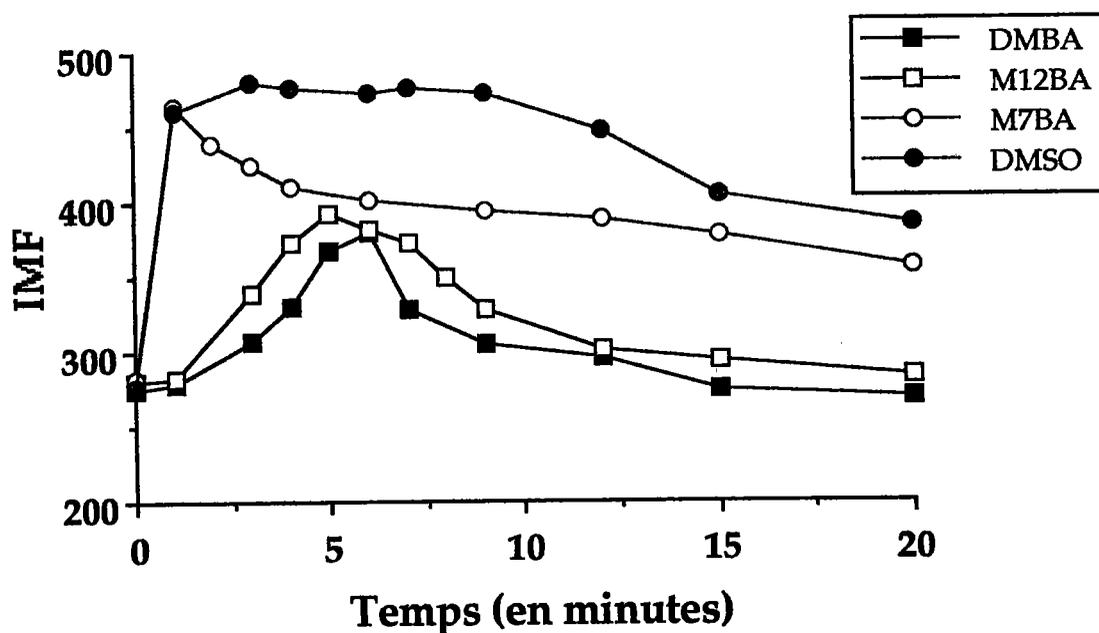
Trois minutes après l'addition de ConA, le taux de calcium arrive à son niveau maximal, lorsque les cellules sont traitées avec le solvant DMSO. Le signal augmente de 64% par rapport à son niveau de base (Figure n°30).

L'augmentation du calcium intracellulaire après activation par la Concanavaline A et exposition à 40 μ M de M7BA est de la même intensité que le témoin-DMSO. Après exposition au M7BA, le taux maximal de calcium intracellulaire est plus précoce que celui obtenu avec le DMSO (1 minute à la place de 3 minutes) : il diminue 1 minute après addition de ConA, puis se stabilise à un niveau légèrement inférieur à celui du témoin-DMSO (Figure n°30).

Le M12BA inhibe par rapport au témoin l'augmentation du taux de calcium après activation par la ConA. Le pic de calcium intracellulaire est retardé dans le temps de 2 minutes par le M12BA. La phase de plateau qui correspond à l'entrée de calcium extracellulaire est pratiquement inexistante (Figure n°30).

L'augmentation de calcium intracellulaire des lymphocytes T murins exposés à 40 μM de DMBA puis activés par la ConA est retardée de 3 minutes. L'augmentation du taux de calcium intracellulaire des lymphocytes T murins exposés au DMBA est diminuée par rapport à celle de lymphocytes traités avec le DMSO. Les splénocytes exposés au DMBA et activés par la ConA ne présente pas la phase de plateau observée dans les lymphocytes T traités par le solvant DMSO après activation par la ConA (Figure n°30).

Figure n°30: Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des splénocytes murins par la concanavaleine A.



Résultats d'une expérience type exprimés en intensité moyenne de fluorescence.

On retrouve le même profil d'action des trois dérivés du benz(a)anthracène sur l'augmentation de calcium intracellulaire après activation par la ConA et sur la prolifération en réponse à ce même mitogène; en effet le DMBA et le M12BA inhibe de manière similaire ces deux paramètres. Le M7BA n'affecte pas la prolifération des splénocytes en réponse à la ConA, ni le taux maximal de calcium intracellulaire suite à ce stimuli. La phase de plateau du calcium intracellulaire des lymphocytes T murins exposés au M7BA est de plus faible intensité que celle des lymphocytes T traités avec le DMSO, mais à la différence des 2 composés cette phase persiste

Le méthyl en position 12 semble donc nécessaire pour l'inhibition du taux de calcium intracellulaire après activation des lymphocytes T murins par la ConA.

Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire dans les lymphocytes T murins.

Il reste maintenant à déterminer si le méthyl en position 12 est aussi responsable de l'augmentation du taux de calcium intracellulaire observé après exposition au DMBA d'une population enrichie en lymphocytes T murins. Nous avons étudié l'interaction des trois dérivés méthylés de benz(a)anthracène après exposition précoce (dès 30 secondes) et tardive (après 1 heure).

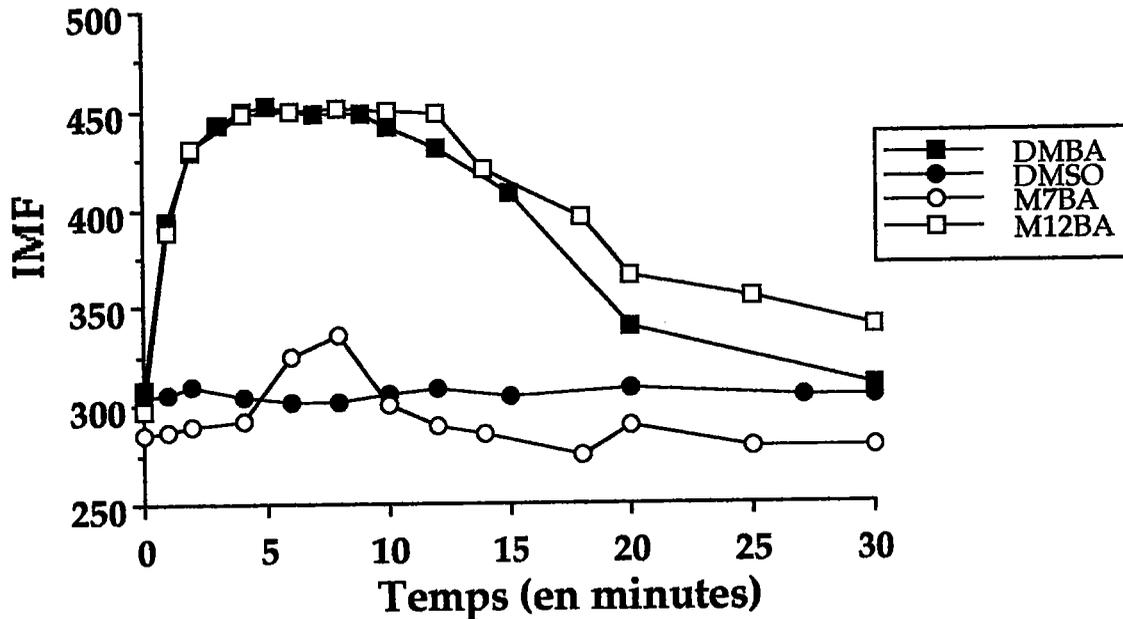
Le M7BA n'entraîne pas d'augmentation significative du taux de calcium intracellulaire dans les lymphocytes T murins. Cette augmentation est très fugace après addition du toxique (Figure n°31). Par contre, le M7BA à 40 μ M augmente le taux de calcium intracellulaire de base dans les splénocytes totaux après 1 heure

d'exposition. Cette augmentation disparaît lorsque le dérivé méthylé du benz(a)anthracène est ajouté aux splénocytes enrichis en cellules T (Tableau n°3).

L'addition de M12BA seul provoque une augmentation du taux de calcium intracellulaire dans les splénocytes enrichis en lymphocytes T. Le niveau maximal est atteint 5 minutes après addition du toxique. On observe alors une phase de plateau qui dure environ 7 minutes, puis une diminution régulière du taux de Ca^{2+}_{ic} . Le taux de Ca^{2+}_{ic} retrouve son niveau basal 30 minutes après addition du toxique (Figure n°31). Le M12BA à la concentration de 40 μ M augmente aussi le taux de calcium intracellulaire de base dans les splénocytes totaux, mais pas dans les lymphocytes issus de la rate et enrichis en cellules T (Tableau n°3).

Le taux de calcium intracellulaire augmente rapidement après exposition au DMBA. Le taux atteint un maximum après 5 minutes, puis reste stable jusqu'à 10 minutes puis décline pour arriver à son niveau initial 30 minutes après exposition au DMBA (Figure n°31). Le DMBA ne modifie pas de façon significative le taux de base du calcium intracellulaire après 1 heure d'exposition, quelle que soit la concentration utilisée et quelle que soit la population cellulaire étudiée (Tableau n°3).

Figure n°31: Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur le taux de calcium intracellulaire des lymphocytes T murins.



Résultats d'une expérience type exprimés en intensité moyenne de fluorescence.

Tableau n°3: Augmentation du taux de calcium intracellulaire induit par les dérivés méthylés du benz(a)anthracène dans les splénocytes totaux ou les lymphocytes T murins isolés de la rate après une heure de traitement.

	Splénocytes totaux	Lymphocytes T murins
DMBA	10%	0%
M7BA	172%*	5%
M12BA	110%*	11%

Résultats de trois expériences indépendantes.

L'augmentation du taux de calcium intracellulaire est mesuré 1 heure après exposition aux HPA.

* significativement différent du témoin $p < 0,05$

Le DMBA et le M12BA agissent de manière similaire sur le taux de calcium intracellulaire du lymphocyte T. Le groupement méthyl en position 12 semble déterminant pour l'augmentation du taux de calcium intracellulaire dans le lymphocyte T murin. Le M7BA n'a pratiquement pas d'effet. Par contre, les deux dérivés monométhylés M7BA et M12BA ont une action identique sur le taux de calcium intracellulaire sur une autre population cellulaire de la rate que les lymphocytes T.

Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la production d'inositol-1,4,5-triphosphate dans les lymphocytes T murins.

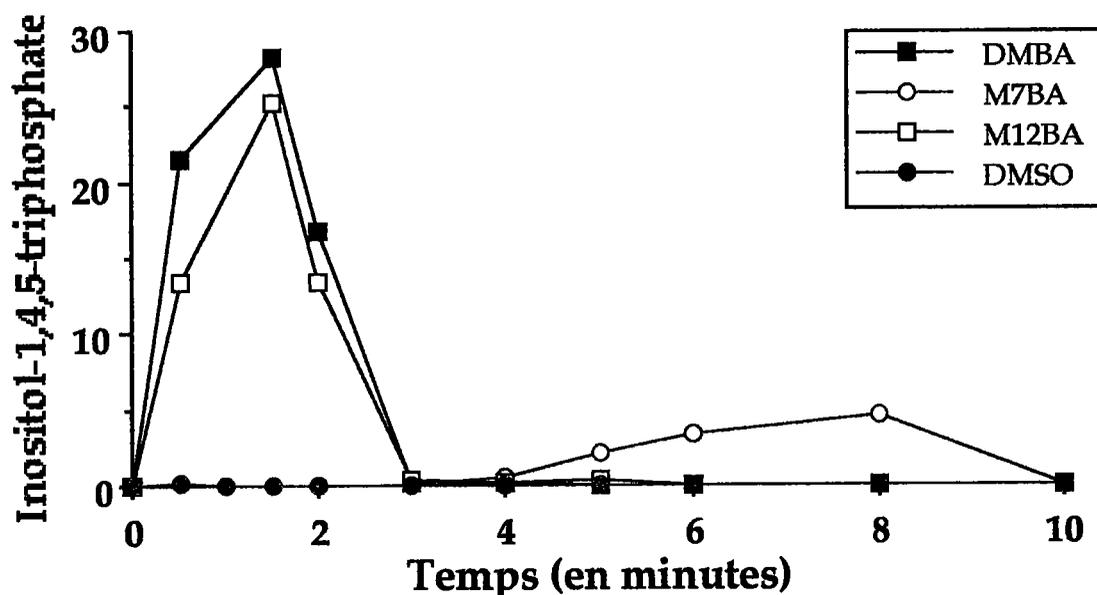
Nous mesurons ensuite la production d'IP3 après exposition des lymphocytes T aux trois HPA, puisque cette molécule produite par clivage enzymatique des phospholipides membranaires est directement responsable après fixation sur son récepteur situé sur le réticulum endoplasmique (RE) de la libération de calcium intracellulaire stocké dans cet organite intracellulaire.

Le M7BA entraîne une légère production d'IP3 (8,6 pmol pour 10 millions de lymphocytes T) qui a lieu 5 minutes après exposition et dure jusqu'à 9 minutes après l'incubation des cellules avec le toxique (Figure n°32).

Le M12BA induit une production plus importante d'IP3 (24,6 pmol/10⁷ cellules T, après 2 minutes d'exposition), plus précoce (détectable dès 30 secondes) et plus fugace (retour à son niveau de base après 3 minutes) que celle décrite avec le M7BA (Figure n°32).

Le DMBA est le plus puissant producteur d'IP3 (28,7 pmol/10⁷ cellules T) avec une cinétique comparable à celle du M12BA (Figure n°32).

Figure n°32: Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la production d'inositol-1,4,5-triphosphate par les lymphocytes T murins purifiés.



Résultats d'une expérience type exprimés en pmol/10 millions de cellules.

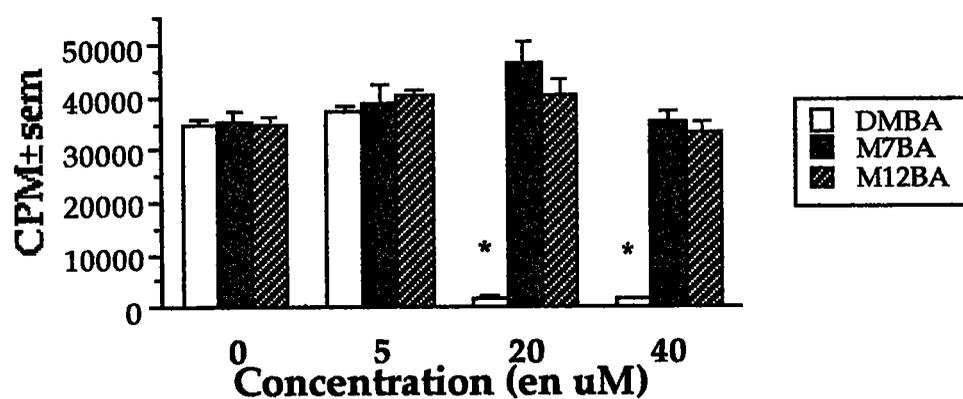
Ces résultats suggèrent que le groupement méthyl en 12 est nécessaire pour la production d'IP3 par les lymphocytes T murins purifiés.

Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur l'activation du lymphocyte T murin par une combinaison ionophore calcique plus ester de phorbol.

La prolifération des lymphocytes T induite par la ionomycine et un ester du phorbol permet d'étudier l'interaction des toxiques avec les événements biochimiques précoces précédant l'augmentation de calcium et l'activation des isoenzymes de la PKC.

Plus aucune inhibition n'est observée sur la prolifération des splénocytes exposés au M7BA ou au M12BA, lors de l'utilisation comme signal mitogénique de la PMA, activateur de la PKC et d'un ionophore calcique la ionomycine. Aucune inhibition n'est observée pour 5 μ M de DMBA, mais dès 20 μ M la prolifération des splénocytes est complètement supprimée (2011 \pm 325 cpm et 1390 \pm 106 cpm respectivement pour 20 et 40 μ M, le témoin étant à 34559 \pm 978 cpm) (Figure n°33).

Figure n°33 : Effet des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène sur la prolifération de splénocytes murins activés par la ionomycine plus un ester du phorbol.



Résultats d'une expérience représentative exprimés en coups par minutes (CPM) \pm l'erreur standard sur la moyenne (sem).
*p<0,05

La diminution de prolifération en réponse à la combinaison PMA/ionomycine des splénocytes après traitement par 20 et 40 μ M de DMBA correspond à une importante mort cellulaire (33 \pm 8% et 26 \pm 5% de viabilité respectivement pour 20 et 40 μ M contre 97 \pm 3% avec 5 μ M de DMBA).

L'utilisation combinée de la ionomycine et de la PMA confirme l'interaction des dérivés monométhylés du benz(a)anthracène (M7BA, M12BA) avec les événements précoces de l'activation lymphocytaire T.

Cette étude de structure-activité permet de déterminer quels sont les groupements chimiques impliqués dans l'immunosuppression induite par les HPA (voir Tableau n°4). Le méthyl en position 12 semble être nécessaire pour inhiber la prolifération et la production d'IL-2 en réponse à la ConA. Le DMBA et le M12BA interfère de manière identique avec l'homéostasie calcique et la production d'IP3, ce qui suggère que le déterminant chimique important pour cette fonction est le méthyl en 12. La prolifération et la production d'IL-2 en réponse à l'anti-CD3 est affectée aussi bien par le groupement méthyl en position 7 ou 12. La présence des 2 groupements méthyl en 7 et 12 confère au DMBA une plus forte inhibition du nombre de récepteurs de haute affinité pour l'IL-2 après activation des lymphocytes T soit par la ConA ou l'anticorps anti-CD3. De plus, la présence de 2 méthyls est nécessaire pour l'inhibition de la prolifération dépendante de l'IL-2. En fait, seul le DMBA interfère à la fois avec la transition de la phase G0 à G1 et G1 à S du cycle cellulaire. Les dérivés monométhylés du Benz(a)anthracène interagissent uniquement avec le passage de la phase G0 à G1. L'autre différence majeure entre les dérivés monométhylés et leur dérivé diméthylé est l'induction de la mort par le DMBA des lymphocytes T stimulés par la combinaison PMA/ionomycine, alors que le fait d'activer les lymphocytes en passant outre les événements membranaires supprime l'effet immunosuppresseur du M7BA et du M12BA.

Tableau n°4 : Récapitulatif des différentes concentrations inhibitrices 50 (CI50) obtenus sur différents paramètres de l'activation lymphocytaire T avec les trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène.

	M7BA	M12BA	DMBA
Position du groupement méthyl	7	12	7, 12
Prolifération en réponse à la ConA	4,0 10 ⁻³ M	2,9 10 ⁻⁵ M	3,0 10 ⁻⁵ M
Production d'IL-2 en réponse à la ConA	2,0 10 ⁻² M	1,2 10 ⁻⁴ M	4,6 10 ⁻⁵ M
Récepteur de haute affinité pour l'IL-2 en réponse à la ConA	29% d'inhibition à 40 µM	46% d'inhibition à 40 µM	69% d'inhibition à 40 µM
Effet de l'addition d'IL-2 sur la prolifération en réponse à la ConA	Pas d'effet	9,8 10 ⁻⁵ M (IL-2=500 pg/ml)	4,6 10 ⁻⁵ M (IL-2=1000 pg/ml)
Prolifération en réponse à l'anticorps anti-CD3	4,3 10 ⁻⁵ M	5,3 10 ⁻⁵ M	2,2 10 ⁻⁵ M
Production d'IL-2 en réponse à l'anti-CD3	8,5 10 ⁻⁵ M	1,5 10 ⁻⁴ M	8,3 10 ⁻⁵ M
Récepteur de haute affinité pour l'IL-2 en réponse à l'anti-CD3	46% d'inhibition à 40 µM	45% d'inhibition à 40 µM	69% d'inhibition à 40 µM
Effet de l'addition d'IL-2 sur la prolifération en réponse à l'anti-CD3	1,0 10 ⁻⁴ M (IL-2=500 pg/ml)	1,1 10 ⁻⁴ M (IL-2=500 pg/ml)	4,7 10 ⁻⁵ M (IL-2=1000 pg/ml)

3^{ème} PARTIE : Comparaison des effets induits *in vitro* par le diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur les lymphocytes T de souris B6C3F1 femelle et sur les lymphocytes périphériques humains.

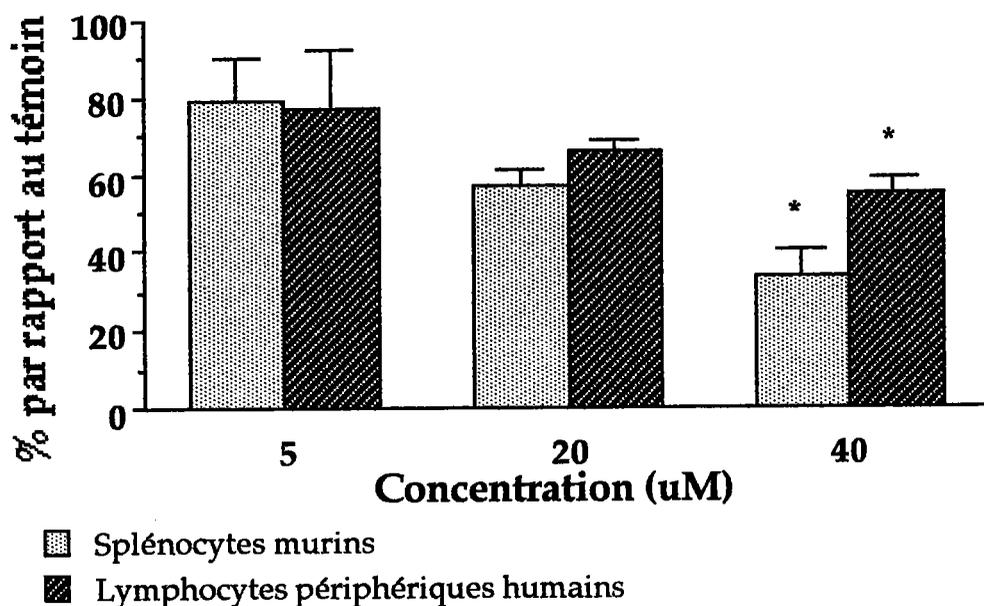
Afin de permettre d'extrapoler plus facilement à l'homme les résultats des études toxicologiques obtenus *in vivo* chez la souris, une comparaison des effets *in vitro* des molécules toxiques sur les lymphocytes T murins et humains a été réalisée (125, 172).

1-Effet comparé du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération lymphocytaire.

Effet comparé du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération de lymphocytes périphériques humains ou de splénocytes murins.

Le DMBA inhibe de façon dose-dépendante la prolifération de splénocytes murins et de lymphocytes périphériques humains en réponse à la PHA (Figure n°34). Cependant, le DMBA est légèrement plus actif sur les splénocytes murins ($CI_{50} = 2,7 \cdot 10^{-5}M$) que sur les lymphocytes périphériques humains ($CI_{50} = 4,8 \cdot 10^{-5}M$) : cette différence est significative à la concentration de 40 μM de DMBA (36 et 58 % d'inhibition respectivement).

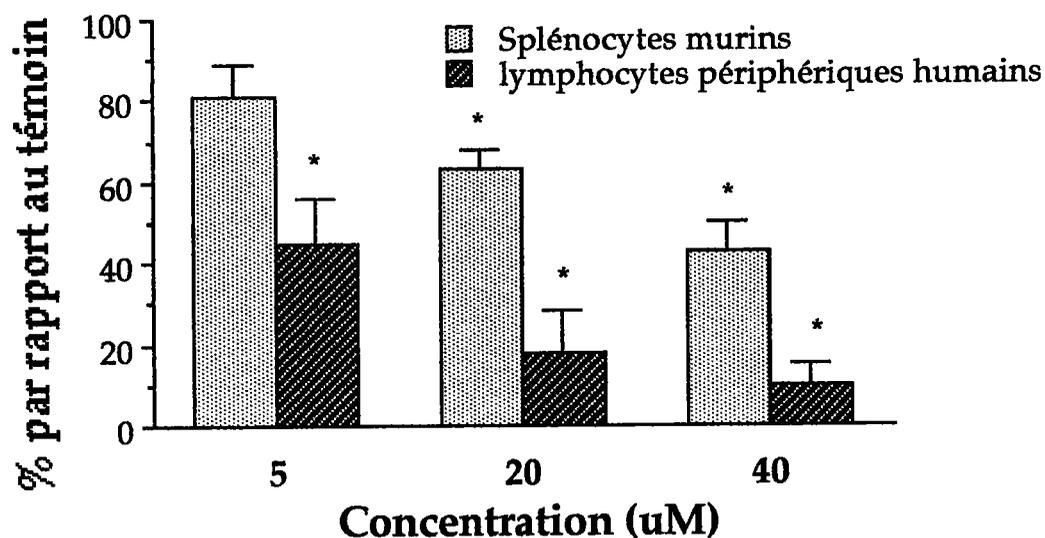
Figure n°34 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains en réponse à la phytohémagglutinine.



Résultats de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

La réaction lymphocytaire mixte (MLR) exploite la capacité des lymphocytes T CD4+ à proliférer en présence de lymphocytes allogéniques, c'est à dire ne possédant pas les mêmes antigènes de classe II du CMH. L'activation des lymphocytes T murins ou humains par un stimulus allogénique lors de la réaction lymphocytaire mixte est inhibée de façon dose-dépendante par le DMBA *in vitro* (Figure n°35). Le DMBA est 30 fois plus actif sur les lymphocytes humains ($CI_{50} = 0,1 \cdot 10^{-5} M$) que sur les splénocytes murins ($CI_{50} = 3,3 \cdot 10^{-5} M$). Lors de l'utilisation de lymphocytes périphériques humains, la réaction lymphocytaire mixte est le test le plus sensible au DMBA.

Figure n°35: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains en réponse à un signal allogénique.



Résultats de 3 expériences indépendantes (moyenne \pm sem).

* $p < 0,05$

Pour préciser l'interaction du DMBA avec les événements précoces ou plus tardifs de l'activation lymphocytaire (passage de la phase G1 à S du cycle cellulaire, qui correspond à l'interaction de l'IL-2 avec son récepteur de haute affinité) des splénocytes murins ou des lymphocytes périphériques humains activés par la PHA, le DMBA à la concentration de 40 μ M est ajouté à différents temps après l'addition de la PHA.

L'effet du DMBA sur les splénocytes murins persiste même lorsqu'il est additionné 24 heures après le signal d'activation (Tableau n°5). Le DMBA à 40 μ M inhibe de 66% la prolifération des splénocytes traités une heure avant l'addition de la PHA. La prolifération des splénocytes traités 24 heures après le signal d'activation n'est plus réduite que de 51%.

L'inhibition de la prolifération des lymphocytes périphériques humains induite par le DMBA persiste lorsqu'il est additionné jusqu'à 6 heures après le signal d'activation (Tableau n°5). Le DMBA à 40 μM inhibe de 45% la prolifération des lymphocytes périphériques traités une heure avant l'addition de la PHA. La prolifération des splénocytes traités 4 heures après le signal d'activation n'est plus réduite que de 23%.

Le DMBA agit sur les événements précoces et tardifs de l'activation du lymphocyte T murin, alors qu'il inhibe plutôt la phase précoce de l'activation du lymphocyte T humain.

Tableau n°5 : Effets comparés du diméthyl-7,12-benzanthracène sur la prolifération de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains en réponse à la PHA après différents temps de traitement.

	- 1 hr (a)	0 hr (b)	+1 hr (b)	+4 hr (b)	+8 hr (b)	+24hr (b)
Splénocytes murins	34 \pm 6*	37 \pm 5*	33 \pm 7*	37 \pm 5*	40 \pm 5*	49 \pm 1*
Lymphocytes périphériques humains	55 \pm 4*	50 \pm 4*	70 \pm 9*	77 \pm 6	80 \pm 4	79 \pm 2

a : Le DMBA (40 μM) est additionné une heure avant le signal d'activation.

b : le DMBA est ajouté après le signal d'activation.

Résultats de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

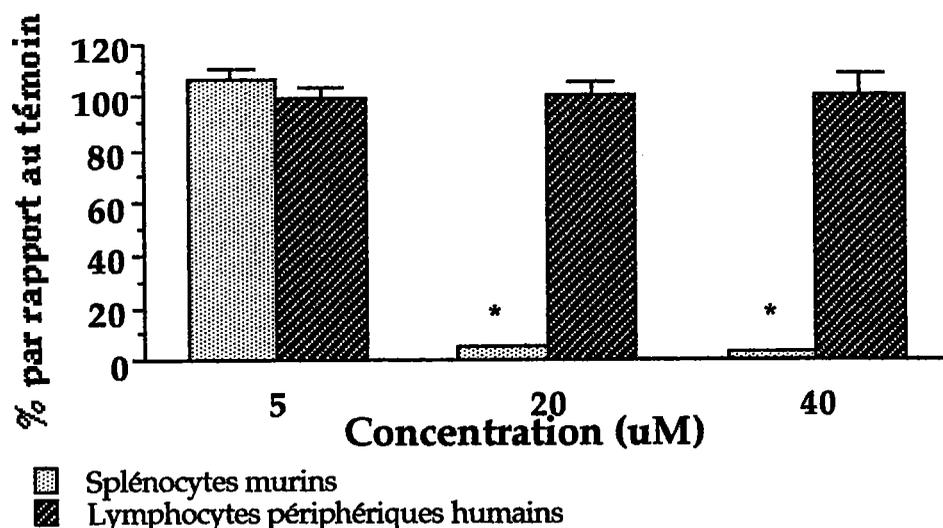
La prolifération des lymphocytes T induite par la ionomycine et un ester du phorbol permet d'étudier l'interaction du DMBA avec les événements

biochimiques précoces précédant l'augmentation de calcium et l'activation des isoenzymes PKC.

Aucune inhibition n'est observée sur la prolifération des lymphocytes périphériques humains enrichis en cellules T exposés au DMBA, lors de l'utilisation comme signal mitogénique de la PMA et de la ionomycine. Par contre, la prolifération des lymphocytes T murins est complètement inhibée dès 20 μM (Figure n°36).

Ceci confirme les résultats précédents qui localisaient les effets du DMBA sur les lymphocytes périphériques humains dans les quatre premières heures après activation (Tableau n°5 et Figure n°36).

Figure n°36: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la prolifération de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains en réponse à la ionomycine et à un ester de phorbol.

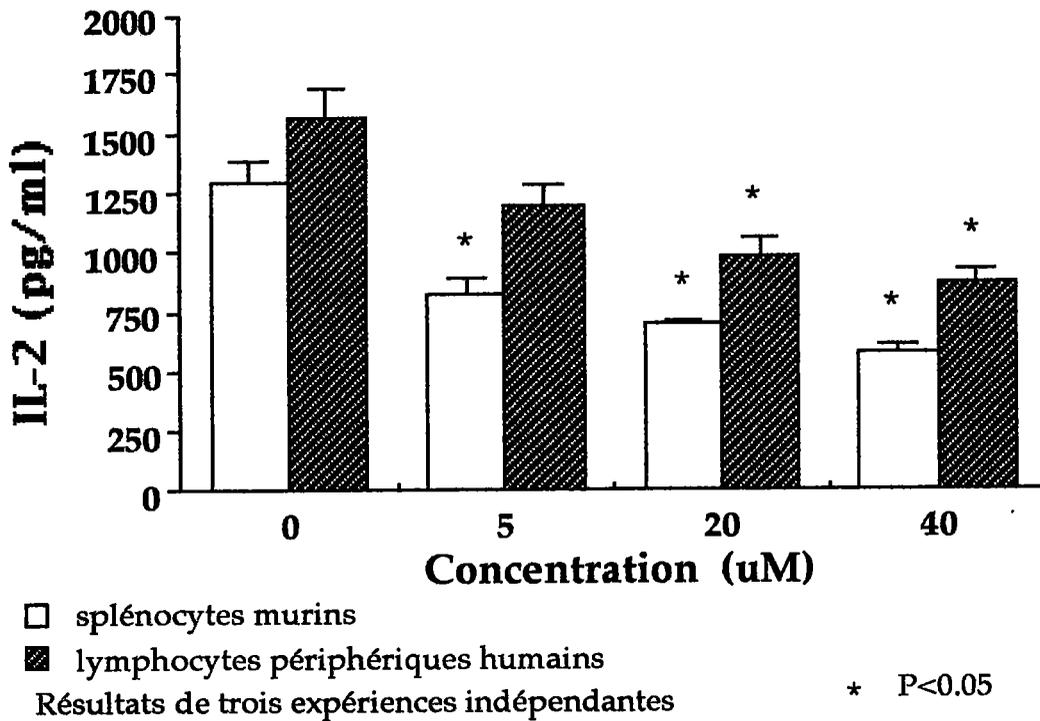


Résultats d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Interaction du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène avec la voie de l'interleukine-2 : comparaison des effets sur les lymphocytes périphériques humains et sur les splénocytes murins.

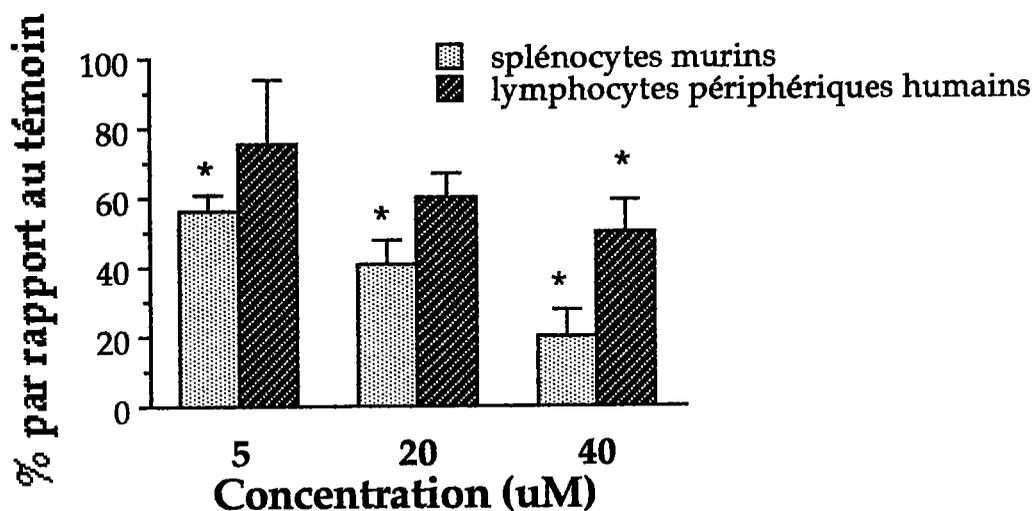
L'interleukine-2 (IL-2) est le facteur de croissance majeur du lymphocyte T activé. Sa production est dépendante à la fois de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation de la PKC événements qui font suite à la stimulation du complexe CD3/RCT. Nous avons donc mesuré la quantité d'IL-2 produite par les splénocytes murins ou les lymphocytes périphériques humains activés par la PHA après exposition au DMBA. Le DMBA inhibe de façon dose-dépendante la production d'IL-2 en réponse à la PHA des splénocytes murins et des lymphocytes périphériques humains (Figure n°37). Le DMBA est légèrement plus actif sur les splénocytes murins, puisque à 40 μM l'inhibition de la production d'IL-2 est de 45% (579 pg/ml contre 1292 pg/ml lorsque les cellules sont traitées avec du DMSO, $\text{CI}_{50}=2,9 \cdot 10^{-5}\text{M}$) pour les cellules murines contre 55% (soit 861 pg/ml contre 1573 pg/ml pour le témoin, $\text{CI}_{50}=4,6 \cdot 10^{-5}\text{M}$) pour celles d'origine humaine.

Figure n°37: Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la production d'IL-2 de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains activés par la phytohémagglutinine.



Le DMBA affecte de manière dose-dépendante la prolifération dépendante de l'IL-2 de lymphoblastes murins stimulés par 500 pg/ml d'IL-2 (CI₅₀=0,8 10⁻⁵M) (Figure n°38). Le DMBA a une activité moindre sur la prolifération dépendante de l'IL-2 de lymphoblastes humains (CI₅₀= 3,8 10⁻⁵ M, différence plus nette à 40 μM) (Figure n°38). Lorsque l'on augmente les concentrations d'IL-2 à 1 ng/ml, ce traitement par le DMBA ne modifie pas la prolifération IL-2-dépendante des lymphoblastes humains activés (Résultats non montrés). Ces résultats confirment un effet moindre du DMBA sur les événements tardifs de la prolifération des lymphocytes périphériques humains. En effet, le DMBA inhibe le prolifération dépendante de l'IL-2 de splénocytes murins stimulés par 1000 pg/ml (Voir Chapitre 4 partie 2).

Figure n°38 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la réponse dépendante de l'interleukine-2 (500 pg/ml) de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains



Résultats de 3 expériences indépendantes.

* $P < 0,05$

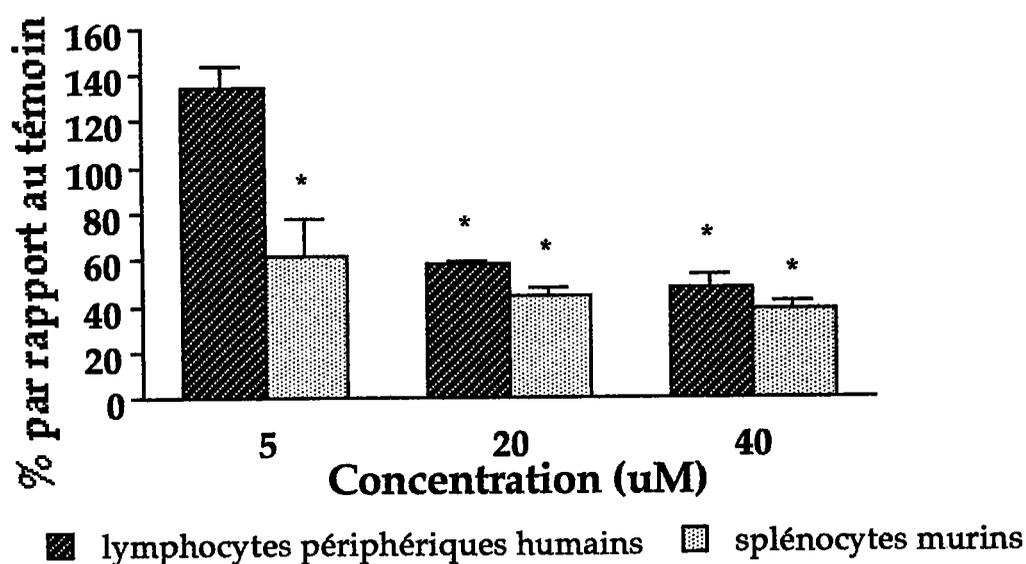
2-Effet comparé du Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la cytotoxicité non restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité .

Cytotoxicité spontanée (cytotoxicité Natural Killer ou NK)

Les cellules NK sont douées d'une cytotoxicité spontanée non restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Elles éliminent les cellules infectées par des virus ou des cellules de l'hôte transformées, comme les cellules tumorales ayant perdues l'expression des antigènes de classe I du CMH. Afin de comparer les effets immunotoxiques *in vitro* du DMBA chez l'homme et la souris, nous avons étudié l'action du DMBA sur la fonction NK des lymphocytes périphériques humains et des splénocytes murins. Le DMBA

inhibe de façon dose-dépendante la cytotoxicité spontanée de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains (Figure n°39). Les CI50 sont du même ordre de grandeur (CI50= 3,5 et 1,9 10⁻⁵ M pour la fonction cytotoxique spontanée humaine et murine respectivement), mais le DMBA à 5 µM est significativement plus actif sur la fonction NK murine.

Figure n°39 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la fonction NK de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains.

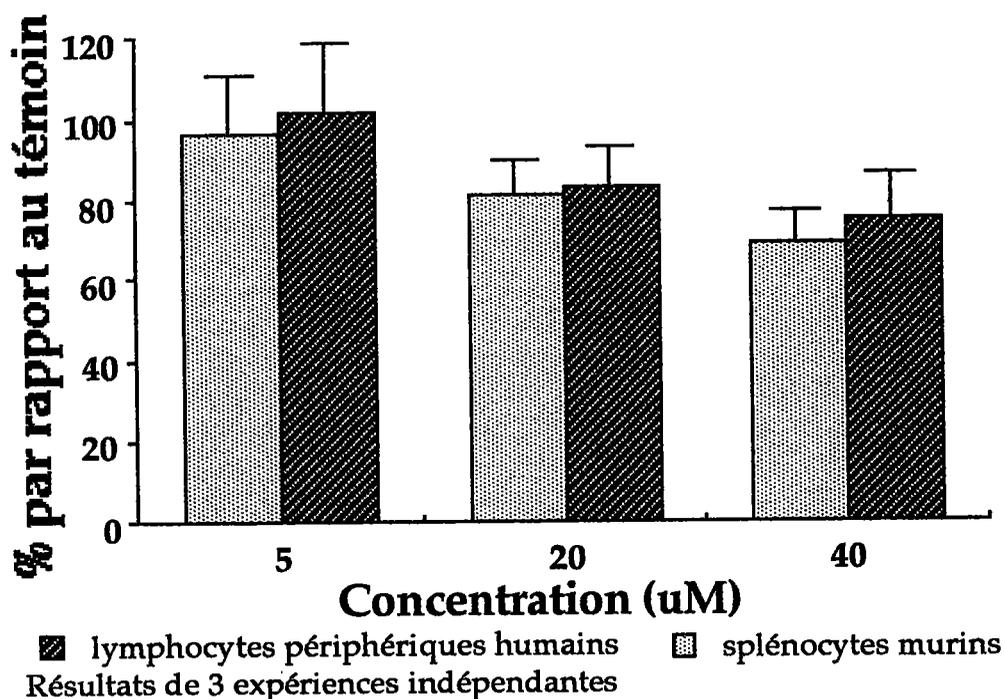


Cytotoxicité LAK (pour lymphokine Activated Killer)

Les cellules LAK (pour *Lymphokine Activated Killer*) sont obtenues par incubation des splénocytes murins ou des lymphocytes périphériques humains avec l'IL-2. L'activité LAK est caractérisée fonctionnellement par la lyse de cellules habituellement résistantes à la cytotoxicité spontanée (les cellules Daudi pour déterminer l'activité LAK humaine et les cellules P815 pour la souris). Le DMBA n'inhibe pas de façon significative la cytotoxicité LAK de

splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains activés pendant 1 jour par l'IL-2 à 500 pg/ml (Figure n°40). Les CI50 sont du même ordre de grandeur (CI50= $6,4 \cdot 10^{-5}M$ et $7 \cdot 10^{-5}M$ pour la fonction LAK humaine et murine respectivement).

Figure n°40 : Effet du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la fonction LAK de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains.

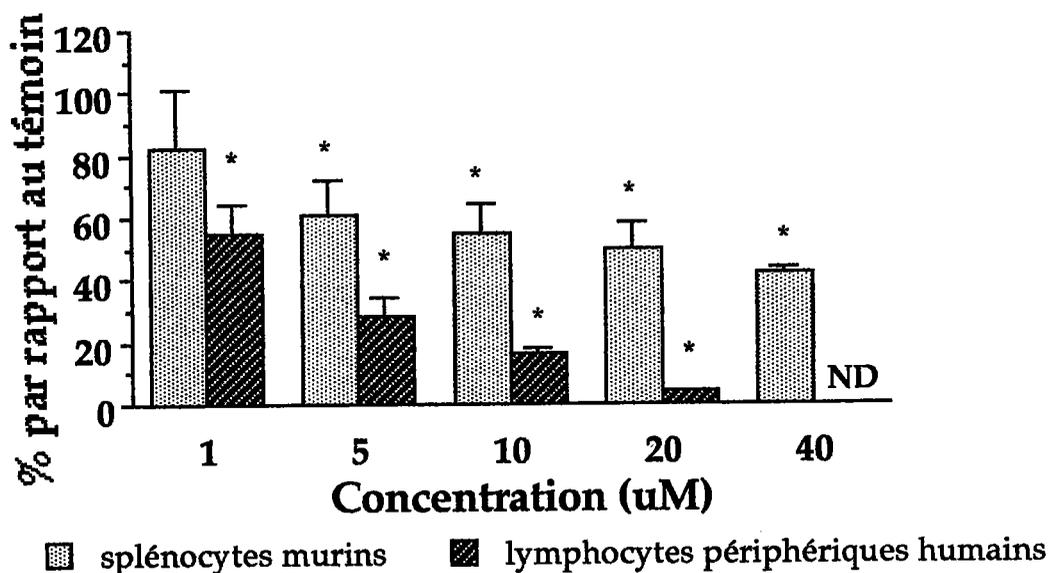


3-Effet comparé du Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur la fonction des lymphocytes T cytotoxiques.

Le DMBA inhibe de façon dose-dépendante la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) à partir de splénocytes murins ou de

lymphocytes périphériques humains (Figure n°41). Les cellules sont exposées au DMBA durant les 5 jours nécessaires à la génération de CTL. Le DMBA est dix fois plus actif sur la génération de CTL à partir des lymphocytes périphériques humains que des splénocytes murins ($CI_{50} = 0,2 \cdot 10^{-5} M$ et $CI_{50} = 2,2 \cdot 10^{-5} M$).

Figure n°41 : Fonction cytotoxique des CTL allogéniques obtenus à partir de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains traités par le DMBA pendant leur phase d'obtention.



Résultats de 3 expériences indépendantes (moyenne \pm sem).

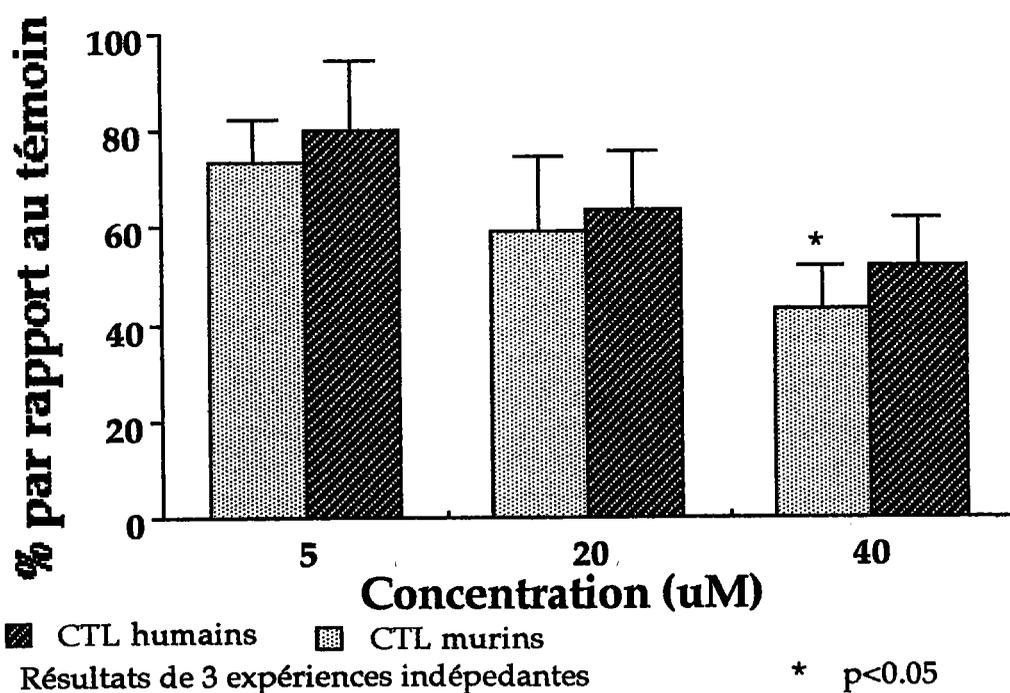
* $p < 0,05$

ND= non déterminé.

Le DMBA inhibe aussi directement la fonction cytotoxique des CTL puisqu'on observe une diminution du relargage spécifique de chrome 51 des

lymphocytes T murins et périphériques humains quand le toxique est ajouté uniquement pendant les 4 heures du test de cytotoxicité et non pendant la phase de génération des effecteurs cytotoxiques (Figure n°42). Le DMBA est légèrement plus actif sur la fonction CTL des splénocytes murins (57% d'inhibition de la fonction CTL murine à 40 μM contre 48% d'inhibition de la fonction humaine, avec des CI_{50} presque identiques : $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ et $4,1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ respectivement).

Figure n°42 : Fonction cytotoxique de CTL allogéniques obtenus à partir de splénocytes murins ou de lymphocytes périphériques humains lorsque le DMBA est additionné lors de la phase effectrice.



Différents paramètres immunologiques ont été étudiés après exposition des splénocytes de souris B6C3F1 femelles ou des lymphocytes périphériques humains au DMBA *in vitro*. Les splénocytes de souris B6C3F1 servent de

référence car il existe des données dans la littérature sur les mêmes paramètres immunologiques *in vivo* (voir Chapitre 1). Les résultats ainsi obtenus *in vitro* sur les lymphocytes périphériques humains montrent qu'il existe peu de différence avec ceux obtenus pour les splénocytes murins (voir Tableau n°6). Cependant, il faut noter que le DMBA semble agir au niveau des événements membranaires qui suivent l'activation du RCT des lymphocytes T humains, puisque la prolifération des lymphocytes humains par la combinaison ester de phorbol/ionophore calcique n'est pas inhibée par le DMBA. Nous avons vu précédemment que le DMBA induisait la mort des cellules T lorsqu'il était en présence de PMA/ionomycine. Autre différence, la prolifération lymphocytaire (réaction lymphocytaire mixte) et la génération de lymphocytes cytotoxiques en réponse à un signal allogénique seraient plus fortement affectées par le DMBA avec les cellules humaines.

Tableau n°6 : Comparaison des effets induits *in vitro* par le Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène sur les lymphocytes T murins et sur les lymphocytes T périphériques : Comparaison des différentes concentrations inhibitrices 50 (CI50) .

	Lymphocytes périphériques humains	Splénocytes murins
Prolifération en réponse à la PHA	4,8 10 ⁻⁵ M	2,7 10 ⁻⁵ M
Réaction lymphocytaire mixte	0,1 10 ⁻⁵ M	3,3 10 ⁻⁵ M
Prolifération en réponse à la PMA et ionomycine	Pas d'effet à 40 µM	Inhibition complète dès 20 µM
Production d'IL-2 en réponse à la PHA	4,6 10 ⁻⁵ M	2,9 10 ⁻⁵ M
Prolifération dépendante de l'IL-2	3,8 10 ⁻⁵ M	0,8 10⁻⁵M
Cytotoxicité spontanée (Fonction NK)	3,5 10 ⁻⁵ M	1,9 10 ⁻⁵ M
Fonction LAK	6,4 10 ⁻⁵ M	7 10 ⁻⁵ M
Génération de CTL allogéniques	0,2 10⁻⁵M	2,2 10 ⁻⁵ M
Fonction cytotoxique de CTL allogéniques	4,1 10 ⁻⁵ M	3 10 ⁻⁵ M

Sont notés en gras les résultats significativement différents.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Les HPA sont des composés ubiquitaires, contaminants de l'environnement et connus pour leurs propriétés cancérigènes (10). Certains de ces composés, comme le DMBA se sont révélés être aussi de puissants immunosuppresseurs (12, 21, 25). Le lymphocyte T constitue la cible cellulaire principale du DMBA, aussi bien *in vivo* (128) que *in vitro* (124, 129, 135-137, 157). L'implication des lymphocytes T CD4 et CD8 dans la réponse immunitaire antitumorale a été directement démontrée *in vivo* dans certains modèles tumoraux murins. En effet, la déplétion d'une des deux populations lymphocytaires à l'aide d'un anticorps conduit à une croissance de la tumeur jusque là contrôlée. Le lymphocyte T CD4 prolifère et produit des cytokines dont l'interleukine-2 en réponse aux antigènes tumoraux, le lymphocyte T CD8 détruit spécifiquement les cellules tumorales qui présentent de façon adéquate l'antigène tumoral (17, 18). Pour cela, le lymphocyte T CD8 possède deux principaux mécanismes de cytotoxicité : l'exocytose granulaire et l'expression membranaire de FasL (93). Le DMBA inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4 (124, 128, 137), la production d'IL-2 par les lymphocytes T (124, 136-137) et perturbe la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T CD8 (135).

Les cibles moléculaires du DMBA responsables de l'inhibition de la fonction des lymphocytes T par le DMBA restent à définir. De premières études menées par le groupe de Burchiel (142, 145) et dans notre laboratoire (143-144), avaient démontré que le DMBA interférait avec l'augmentation du taux calcium intracellulaire (Ca^{2+ic}) qui fait suite à l'activation du lymphocyte T. D'autre part, il a été rapporté que le niveau de Ca^{2+ic} au moment de l'activation du

lymphocyte T était un événement critique dans l'induction de l'anergie (22-23). On peut ainsi induire l'anergie dans les lymphocytes T en ajoutant un ionophore calcique juste avant l'activation par l'antigène (22). Nous avons suivi par cytométrie en flux à l'aide d'une sonde spécifique du calcium le Fluo-3, l'augmentation du taux de Ca^{2+}_{ic} dans le lymphocyte T murin après exposition au DMBA. Le DMBA induit une élévation du taux de Ca^{2+}_{ic} dans les lymphocytes T, 30 secondes après addition. Le taux Ca^{2+}_{ic} est maximal 5 minutes après addition du DMBA, puis retourne à son niveau basal après 30 minutes. Le calcium mobilisé par le DMBA est essentiellement d'origine intracellulaire, comme le démontre les résultats utilisant les lymphocytes T placés dans un milieu sans calcium. Comme dans les lymphocytes T stimulés par un mitogène (ConA ou anti-CD3), cette augmentation de Ca^{2+}_{ic} résulte de la production d'IP3 par le DMBA. Comme le suggère les résultats obtenus avec la génistéine (un inhibiteur de TPK), la production d'IP3 dépendrait de l'activation des tyrosines kinases (TPK) qui par la suite phosphoryleraient la PLC-1 γ . Dans les cellules de la lignée T humaine HBP-ALL, l'augmentation précoce du taux de calcium de base par le DMBA est la conséquence de la libération du calcium intracellulaire du RE par l'IP3. En effet, Archuleta et coll. ont montré que le DMBA en activant les tyrosines kinases p56^{lck} et p59^{fyn} phosphorylait la PLC1 γ ce qui entraînait la formation d'IP3 (145). Récemment, il a été démontré que le récepteur de l'IP3 situé au niveau du RE était directement régulé par la TPK p59^{fyn} (173). On peut donc supposer que le DMBA induit la libération du calcium du RE, en activant la p59^{fyn} et par la production d'IP3. Des résultats récents rapportés par Krieger et coll. ont démontré que le DMBA

empêchait la rétention et la réintégration du calcium dans le RE en inhibant les pompes SERCA (pour *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*) dans une lignée T humaine immature de phénotype thymique CD4+/CD8+. Cette inhibition serait responsable d'une augmentation plus tardive du taux de calcium (147). Nous n'avons pas pu démontrer une augmentation de Ca^{2+ic} tardive (après 30 minutes) dans les lymphocytes T murins isolés de la rate de souris B6C3F1. De plus, la génistéine inhibe complètement l'élévation de Ca^{2+} après exposition au DMBA dans nos cellules. Ceci suggère que l'augmentation du calcium intracellulaire dans le lymphocyte T murin après exposition au DMBA est plutôt consécutive à la production d'IP3 et à l'activation des TPK et de la PLC-1 γ (Voir Figure n°43). Il faut signaler que l'acide arachidonique stimule l'extrusion de Ca^{2+ic} dans le macrophage (174). L'acide arachidonique, comme le DMBA a une structure aromatique. Nous n'avons pas testé l'hypothèse de l'extrusion de calcium hors du lymphocyte T murin. Si le DMBA stimule l'extrusion du calcium de la cellule, ceci peut expliquer l'absence de modification tardive du taux de Ca^{2+ic} , même si le DMBA inhibe les pompes SERCA comme cela a été suggéré dans une lignée lymphocytaire T (147) (voir Figures n°43).

Les mécanismes responsables de l'entrée de calcium extracellulaire ne sont pas encore clairement définis. Plusieurs hypothèses (voir Figure n°5) ont été avancées comme la présence sur la membrane plasmique de récepteurs à l'IP3 (106), ou à l'IP4 un métabolite de l'IP3 (108), ou encore la production suite à la déplétion du RE du peptide CIF qui conduit à une entrée de calcium extracellulaire (111). Après exposition du lymphocyte T murin au DMBA, une

entrée fugace de calcium extracellulaire se produit. Cette entrée fait suite à la déplétion du RE, car si on prévient la libération de calcium du RE par la génistéine, cet influx de calcium n'a pas lieu. Mais cet influx est très faible si on le compare à celui provoqué par la ConA ou la Thapsigargin. Cette faible entrée de calcium extracellulaire pourrait s'expliquer par le fait que le DMBA inhibe l'entrée de calcium extracellulaire. En effet, le DMBA s'oppose à l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire induit par la Thapsigargin ou la ConA en agissant au niveau des canaux calciques de la membrane plasmique.

Comment réconcilier les perturbations de l'homéostasie calcique provoquées par le DMBA (voir Figures n°43) avec l'inhibition de l'augmentation calcique et plus généralement l'inhibition de la prolifération induite par le DMBA après activation par la ConA ? Le DMBA en induisant la libération de Ca^{2+} du RE et en inhibant la recapture du Ca^{2+} par cet organe contribue à diminuer le pool de Ca^{2+} ic du RE qui ne pourra être convenablement mobilisé par la ConA ou par un antigène, les cellules étant alors anergiques. En effet, le DMBA libère majoritairement du Ca^{2+} provenant du pool intracellulaire (143, nos résultats). Deuxièmement, le DMBA inhibe l'entrée de calcium extracellulaire induite par la ConA. Pour certains, le maintien d'un niveau de calcium intracellulaire suffisant après l'activation lymphocytaire est un événement critique pour la production d'IL-2 et une prolifération optimale (175). De plus, l'amplitude et la durée de l'augmentation du calcium intracellulaire dans les lymphocytes régulent finement l'activation

des facteurs de transcription tel que NF-AT ou NF- κ B (75) qui eux-mêmes contrôlent la synthèse d'IL-2.

En ce qui concerne l'interaction du DMBA avec l'homéostasie calcique des lymphocytes périphériques humains, les résultats obtenus sont variables selon les donneurs. Les perturbations précoces de l'homéostasie calcique (moins de 1 heure) provoquées par le DMBA sont beaucoup moins nettes sur les lymphocytes périphériques humains que sur des lignées tumorales humaines comme les lignées Jurkat et HUT78 ou sur les lymphocytes T murins. En fait, le DMBA semble surtout induire une augmentation progressive et tardive du taux de Ca^{2+} ic dans les lymphocytes périphériques humains. Cette augmentation fait plutôt penser à une inhibition des pompes SERCA, comme cela a été décrit dans la lignée HBP-ALL (147). Le RE est alors incapable de stocker le calcium et le taux de Ca^{2+} ic augmente donc progressivement. Ces résultats expliqueraient pourquoi le DMBA doit être additionné dans les 6 premières heures après activation pour inhiber la prolifération en réponse à la PHA. Passer les 6 premières heures après stimulation, le calcium paraît moins nécessaire. Certains facteurs de transcription se sont déjà fixés sur leur site spécifique de régulation en amont du gène de l'IL-2 (76) et la voie de signalisation biochimique sous le récepteur de l'IL-2 est indépendante du calcium (86).

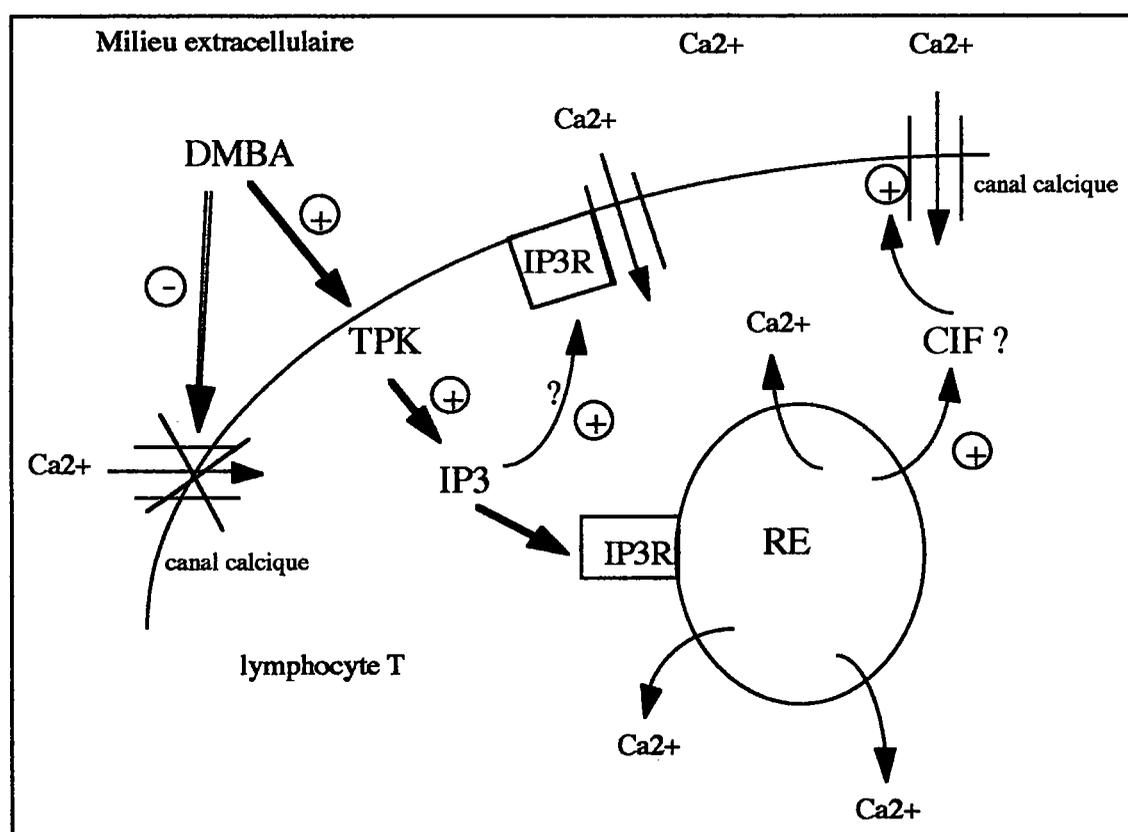
Il est intéressant de noter l'hétérogénéité des donneurs pour l'augmentation précoce du taux de Ca^{2+} ic suite au traitement par le DMBA. Les tests fonctionnels (prolifération en réponse à la PHA, production d'IL-2 en réponse à la PHA et la cytotoxicité spontanée) ne permettent pas de différencier les donneurs pour lesquels les lymphocytes présentent une augmentation

précoce du taux de calcium intracellulaire après DMBA de ceux n'en présentant pas.

L'homéostasie du calcium est une des cible moléculaire du DMBA. Il en résulte une diminution de la prolifération des lymphocytes en réponse aux mitogènes, mais aussi une diminution de la synthèse de protéines comme l'IL-2 qui fait suite à l'activation du lymphocyte T.

Figure n°43A : Schéma illustrant le mécanisme d'interaction du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène avec l'homéostasie calcique dans le lymphocyte T murin.

Augmentation du taux de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire après activation des tyrosines kinases (TPK) et production d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3).



Les abréviations sont les mêmes que celles utilisées dans le texte.

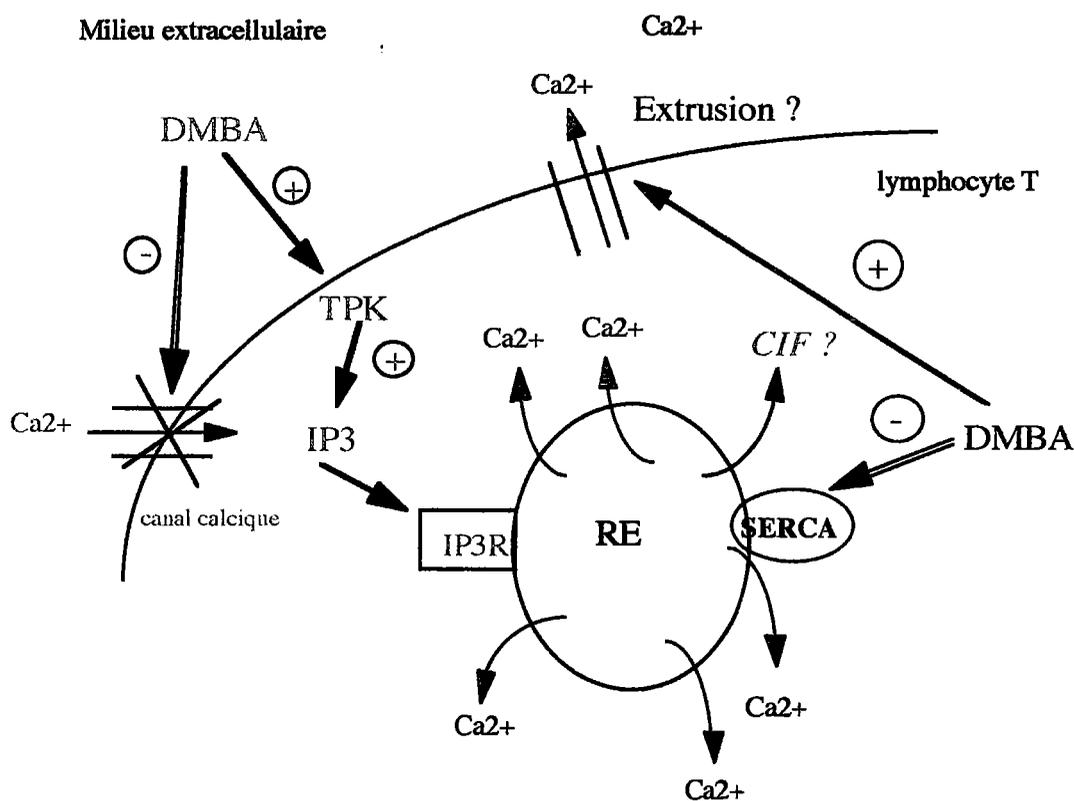
Les flèches en gras indiquent les résultats obtenus.

Les points d'interrogation indiquent les effets possibles observés dans le lymphocyte T murin après exposition au DMBA.

Figure n°43B : Schéma illustrant le mécanisme d'interaction du diméthyl-7,12-benz(a)anthracène avec l'homéostasie calcique dans le lymphocyte T murin.

Blocage de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire.

Ce schéma prend en compte les résultats de Krieger et coll. qui suggère que le DMBA inhibe les pompes SERCA (147) et le fait que l'on observe pas d'augmentation tardive du taux de calcium intracellulaire dans les lymphocytes T murins (traits en rouge). L'inhibition des pompes SERCA empêche le remplissage du réticulum endoplasmique (RE). Ce schéma représente le statut de la cellule en Ca^{2+} au moment de l'addition du mitogène.



En gris sont rappelés les effets du DMBA selon la figure précédente..

Pour les abréviations se rapporter au texte.

Le but de la deuxième partie de cette étude était de montrer le rôle respectif des méthyles en position 7 et 12 du cycle benzanthracène sur l'activation lymphocytaire. Pour cela, nous avons utilisé comme système cellulaire les splénocytes murins *in vitro* traités par trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène : le DMBA, le M12BA, le M7BA. Des trois HPA, le DMBA est le plus puissant inducteur de tumeurs cutanées chez la souris CD-1 (11). Une étude de relation structure-activité menée avec les mêmes molécules sur la génération de CTL allogéniques montrait que le DMBA est la molécule la plus active (60% d'inhibition à 40 μM), puis le M12BA (49% d'inhibition à 40 μM) et le M7BA (17% d'inhibition à 40 μM) (157).

Les trois dérivés méthylés du benzanthracène DMBA, M7BA, M12BA affectent de manière similaire la prolifération de splénocytes en réponse à l'anticorps anti-CD3 (145-2-C11). Cependant, le test de lymphoprolifération en réponse à la Concanavaline A n'est pas affecté de façon significative par le M7BA à la différence du DMBA ($\text{CI}_{50}=3.10^{-5}\text{M}$) et du M12BA ($2,9.10^{-5}\text{M}$). L'hypothèse d'une cytotoxicité différente sur les splénocytes en culture entre les trois dérivés méthylés du benzanthracène est écartée : la viabilité cellulaire des splénocytes évaluée par la technique d'exclusion du bleu trypan n'est pas significativement différente du témoin quelle que soit la molécule et les concentrations employées. L'effet du M7BA dépend donc du signal d'activation utilisé. Les résultats obtenus avec le DMBA sur la prolifération en réponse à la ConA sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (124, 136). La ConA est un activateur polyclonal des cellules T qui se lie à de nombreuses glycoprotéines de surface avec une spécificité plus particulière pour les résidus

α -glucose et D-mannose (68). Ce mitogène permet aussi la production de cytokines comme l'IL-1 et l'IL-6 par les cellules accessoires (176). Par contre, l'activation des splénocytes par l'anticorps anti-CD3 est indépendante des cellules accessoires, celles-ci n'interviennent uniquement que pour permettre la fixation du fragment Fc de l'anticorps anti-CD3 et sa présentation aux cellules T (68).

L'IL-2 étant le facteur de croissance majeur des lymphocytes T, il nous a paru intéressant de savoir si les 3 HPA interagissait avec cette cytokine comme cela est décrit pour le DMBA (124, 136). Les trois molécules ont une activité similaire sur la production d'IL-2 par les splénocytes stimulés par l'anti-CD3. La production d'IL-2 en réponse à la ConA n'est pas affectée par le M7BA. Les résultats obtenus pour la prolifération et la production d'IL-2 en réponse à l'anti-CD3 ou la ConA sont donc corrélés.

Les trois HPA utilisés à 40 μ M diminuent de façon distincte le nombre de récepteurs de haute affinité pour l'IL-2 après activation des splénocytes par la ConA ou l'anti-CD3. La molécule la plus active est le DMBA, puis le M12BA et le M7BA. La présence des deux méthyles est nécessaire pour obtenir un effet conséquent sur l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Les dérivés monométhylés du benz(a)anthracène sont plus actifs lorsque les splénocytes sont activés par l'anti-CD3. L'affinité de ces récepteurs n'est pas significativement modifiée. Les résultats obtenus avec le DMBA sont conformes à ceux rapportés dans la littérature : le DMBA inhibe l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 (136) qui est constitué de trois chaînes α , β , γ (78-

79), mais il n'affecte pas l'expression du récepteur de faible affinité qui correspond à la chaîne α (136).

La prolifération dépendante de l'IL-2 est significativement inhibée après exposition au DMBA, même aux fortes concentrations d'IL-2, ce qui est en accord avec les résultats rapportés dans la littérature (136). Le M7BA comme le M12BA sont actifs aux faibles concentrations d'IL-2 mais peu aux fortes concentrations d'IL-2. La forte concentration d'IL-2 utilisée (500 pg/ml) est inférieure à celle produite par les splénocytes exposés à 40 μ M de M7BA ou de M12BA en réponse à la ConA ou l'anti-CD3. On peut donc penser que ces deux substances n'auront pas un effet majeur sur la prolifération dépendante de l'IL-2 lors de l'activation des splénocytes par les mitogènes ConA ou anti-CD3. La présence des deux méthyles en position 7 et 12 est donc nécessaire pour avoir une action sur la prolifération dépendante de l'IL-2 lors de l'activation des splénocytes par la ConA ou l'anti-CD3.

Le DMBA agit sur la transition de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire (production d'IL-2, expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2), mais aussi lors du passage de la phase G1 à S (prolifération dépendante de l'IL-2), alors que les deux autres dérivés monométhylés du benz(a)anthracène semblent affecter essentiellement la transition de la phase G0 à G1. Ces résultats sont confirmés par l'addition du toxique à différents temps après le signal d'activation. En effet, le DMBA inhibe encore la prolifération des splénocytes lorsqu'il est ajouté 24 heures après la ConA. Le M12BA ne diminue plus la prolifération des splénocytes quand il est additionné 4 heures après le stimulus. Des résultats similaires sont observés avec les deux immunosuppresseurs de la famille des macrolides, FK-506 et rapamycine (177).

L'addition exogène d'IL-2 après activation par l'anti-CD3 ou la ConA permet d'inhiber partiellement l'effet antiprolifératif des trois molécules, les concentrations nécessaires varient selon la molécule et le mitogène considéré. Il a été montré que l'addition d'IL-2 exogène permet de supprimer les effets du DMBA sur la génération de CTL allogéniques générés à partir des splénocytes de souris B6C3F1 : l'IL-2 doit être ajoutée dans les premières heures après exposition des splénocytes par le DMBA (137).

L'action des dérivés monométhylés, M12BA et M7BA sur la prolifération en réponse à l'anti-CD3, et l'action du M12BA sur la prolifération en réponse à ConA dépendent donc essentiellement de l'effet sur la production d'IL-2. Si la concentration d'IL-2 exogène apportée est suffisante, la prolifération des splénocytes exposés au M7BA ou M12BA est restaurée. Par contre, le DMBA inhibe la production d'IL-2, mais aussi l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 et la prolifération dépendante de l'IL-2, les concentrations d'IL-2 exogènes à ajouter pour inhiber son effet sont donc plus importantes.

La réduction de nombre de récepteur de haute affinité pour l'IL-2 par le DMBA et l'interaction de celui-ci avec la transduction du signal sous ce récepteur sont des facteurs limitants pour l'utilisation de l'IL-2 dans le but de reverser les effets de ce toxique. Nous avons donc combiné l'IL-2 avec d'autres cytokines produites par les cellules accessoires (IL-1 et IL-6), qui permettent d'augmenter l'expression du récepteur à l'IL-2 (176, 178). Seul l'ajout combiné d'IL-2 et d'IL-1 β permet d'inhiber les effets des trois HPA et en particulier du DMBA sur la prolifération en réponse à la ConA ou à l'anti-CD3.

L'effet des dérivés méthylés de benz(a)anthracène sur les événements précoces de l'activation des splénocytes par l'anti-CD3 ne dépend pas de la position du méthyl, ni du nombre. L'association PMA et ionomycine qui permet d'activer le lymphocyte directement et sans solliciter les événements membranaires (activation des tyrosines kinases, de la PLC) (151) a été choisi comme signal d'activation. La PMA active certaines isoenzymes de la PKC (α , β , ϵ) (152, 179). La ionomycine est un ionophore calcique qui agit en synergie avec la PMA. Le M7BA et le M12BA n'inhibent pas la prolifération des splénocytes en réponse à la combinaison PMA/ionomycine. L'action des deux dérivés est donc localisée au niveau des événements membranaires précédant l'augmentation calcique et l'activation des isoenzymes de la PKC. Par contre, le DMBA inhibe dès 20 μ M la prolifération de splénocytes en réponse à cette combinaison. La diminution de la prolifération des splénocytes exposés à 20 ou 40 μ M de DMBA est à relier à une augmentation importante de la mortalité cellulaire. Le DMBA induit une apoptose des cellules lymphoïdes *in vivo* et *in vitro* (146). Dans notre système, nous n'avons pas pu détecter la fragmentation de l'ADN, un des signes de l'apoptose après exposition des lymphocytes T murins au DMBA (Perrin-Wolf M., résultats non publiés). Il reste cependant possible qu'en association avec la PMA et le ionophore calcique, le DMBA active une des voies biochimiques responsable de l'apoptose. En effet, il se peut que l'augmentation de Ca^{2+} provoquée non seulement par le DMBA et mais aussi la ionomycine soit si importante que la cellule ne puisse y faire face et meurt. D'autre part, il est aussi possible que comme cela a été décrit pour certains médicaments anticancéreux

(Doxorubicine, méthotrexate) (180), le DMBA induit l'expression de Fas et de son ligand sur les lymphocytes T et conduisent ainsi à leur mort par apoptose.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de notre étude, le DMBA inhibe l'augmentation du taux de calcium intracellulaire qui suit l'activation du lymphocyte T murin. Nous avons donc décidé d'étudier l'interaction des trois HPA avec l'augmentation de calcium intracellulaire (Ca^{2+ic}) qui fait suite à l'activation des splénocytes afin de déterminer quelle structure chimique est nécessaire pour la modification de cette fonction. Nous avons choisi la ConA comme mitogène car le M7BA n'a pas d'effet significatif sur la prolifération en réponse à ce mitogène.

Le M7BA n'inhibe pas l'augmentation de Ca^{2+ic} qui suit l'activation lymphocytaire, mais la phase de plateau qui correspond à l'influx de calcium extracellulaire est d'intensité moindre par rapport à des lymphocytes T traités avec le solvant DMSO. L'entrée de calcium extracellulaire et le niveau de Ca^{2+ic} qu'il en résulte semblent toutefois suffisants pour que le M7BA n'inhibe pas significativement la prolifération des splénocytes murins et la production d'IL-2 en réponse à la ConA. La légère réduction de la phase de plateau observée avec le M7BA est peut être à relier avec une inhibition par le M7BA des canaux calciques membranaires, mais de façon moindre que le DMBA.

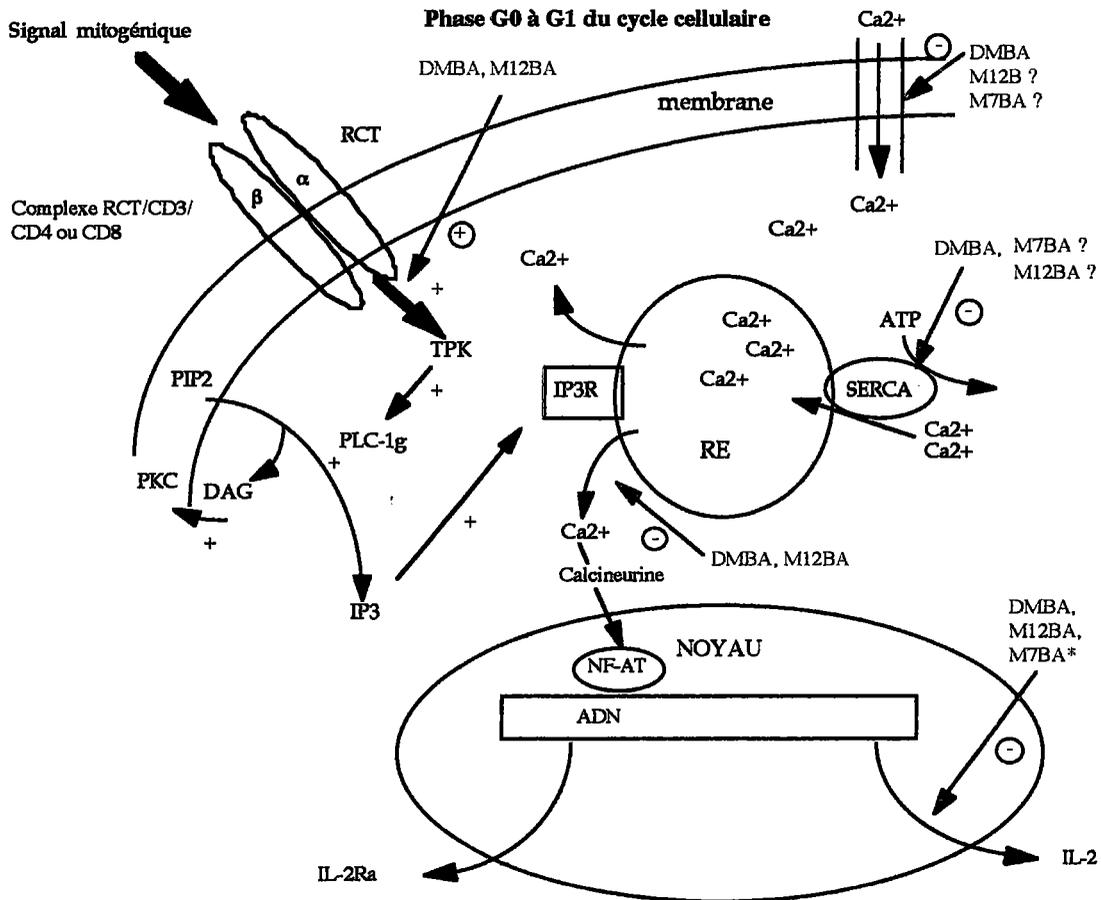
Le M12BA et le DMBA inhibent de manière identique l'augmentation de calcium intracellulaire (37% et 35% respectivement par rapport au témoin), mais le M12BA ne retarde pas le pic d'augmentation de Ca^{2+} par rapport au témoin à la différence du DMBA. Les résultats obtenus pour la prolifération et l'augmentation du taux de calcium intracellulaire dans les lymphocytes T en

réponse à la ConA sont donc corrélés. La position du méthyl en 12 est donc nécessaire pour observer un effet sur l'augmentation de calcium faisant suite à l'activation lymphocytaire.

Ensuite, nous avons étudié l'augmentation du taux de Ca^{2+ic} directement après exposition des lymphocytes T murins aux trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène. Le M7BA n'augmente pas significativement le taux de calcium intracellulaire et ceci est lié à une faible production d'IP3. Par contre, le M12BA comme nous l'avons vu précédemment pour le DMBA induit une augmentation du taux de Ca^{2+ic} à $40 \mu\text{M}$ qui est corrélée à une production d'IP3. Le méthyl en position 12 des dérivés du benz(a)anthracène est donc impliqué dans la production d'IP3 et dans l'augmentation du taux de calcium intracellulaire qui en découle.

Figure n°44A : Schéma résumant les cibles moléculaires des trois dérivés méthylés du Benz(a)anthracène dans le lymphocyte T murin.

Transition de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire.

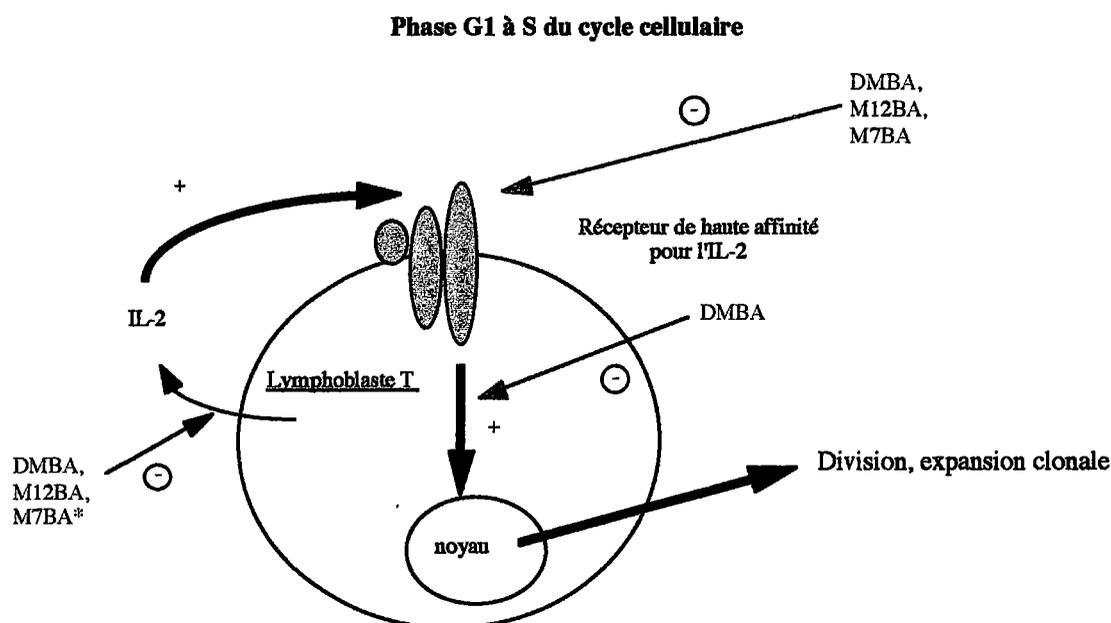


En rouge, sont signalés les cibles moléculaires des différents HPA.

M7BA* signifie : dépend du signal mitogénique utilisé (Concanavaleine A ou anticorps anti-CD3)

Figure n°44B : Schéma résumant les cibles moléculaires des trois dérivés méthylés du Benz(a)anthracène dans le lymphocyte T murin.

Transition de la phase G1 à S.



En rouge, sont signalés les cibles moléculaires des différents HPA.

M7BA* signifie : dépend du signal mitogénique utilisé (Concanavaline A ou anticorps anti-CD3).

Seul le DMBA affecte significativement la réponse dépendante de l'IL-2.

Dans la troisième partie, nous avons donc comparé les effets du DMBA *in vitro* sur le lymphocyte T murin et sur le lymphocyte T humain. Cette comparaison s'avère nécessaire afin de pouvoir extrapoler les résultats obtenus chez la souris *in vivo* à l'homme et définir ainsi le risque couru par l'homme. Les tests de prolifération, de cytotoxicité spontanée (fonction NK), de

génération de CTL sont affectés aussi bien lorsque les splénocytes ou les lymphocytes périphériques humains sont exposés au DMBA. La génération de CTL allogéniques et la prolifération en réponse à un signal allogénique (MLR) sont plus sensibles au DMBA lors de l'utilisation de lymphocytes périphériques humains.

Des différences apparaissent sur la perturbation de l'homéostasie calcique du lymphocyte T par le DMBA entre les résultats rapportés chez l'homme et ceux rapportés chez la souris. Le DMBA augmente le taux de calcium basal dès 20 μM dans les lymphocytes périphériques humains (143), et dans les lignées T humaines HBP-ALL (dès 3 μM) (145), et Jurkat (142) après une heure d'exposition. Nous n'observons pas de modification du calcium basal des splénocytes ou des lymphocytes T murins après une heure d'exposition à 40 μM de DMBA, mais au contraire une augmentation précoce dans les premières minutes après exposition qui disparaît 30 minutes après addition du DMBA. Burchiel et coll. décrivent une augmentation du calcium basal dans les lymphocytes T murins après quatre heures d'exposition uniquement à 30 μM (133). Cette différence peut reposer sur le fait que le DMBA stimule l'extrusion de Ca^{2+} dans les lymphocytes T murins, mais pas dans les lymphocytes T humains. Il est aussi possible que le DMBA soit un inhibiteur médiocre des pompes SERCA dans le lymphocyte T murin, contrairement à ce qui est rapporté pour les lymphocytes humains (147). L'élévation précoce du taux de Ca^{2+} induite par le DMBA dans les lymphocytes T murins n'est pas toujours constamment observé dans les lymphocytes T humains. Ainsi, il existe une hétérogénéité de réponse des lymphocytes périphériques humains au DMBA.

Bien que chez certains donneurs, on observe en plus de l'élévation tardif du taux de Ca^{2+}_{ic} , une modification précoce de ce taux, il n'existe pas de différence significative au niveau des tests fonctionnels quels que soient les individus testés.

En conclusion, le DMBA prototype chimique des hydrocarbures polycycliques aromatiques est un puissant immunosuppresseur *in vivo* (126, 128). Notre étude *in vitro* permet de préciser que le DMBA interfère avec l'activation du lymphocyte T murin et plus particulièrement l'augmentation calcique qui fait suite à la stimulation du RCT. Les méthyles 7 et 12 du DMBA sont nécessaires pour réduire le nombre de récepteurs de haute affinité pour l'IL-2 et surtout pour inhiber la prolifération dépendante de l'IL-2 qui correspond au passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. En revanche, le méthyl en position 12 suffit pour perturber l'homéostasie calcique : libération de Ca^{2+} du RE après activation des TPK, formation d'IP3 et inhibition de l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire. Comme le suggère les résultats obtenus sur la prolifération des splénocytes en réponse à l'anticorps anti-CD3 avec le dérivé du benz(a)anthracène méthylé en position 7, la perturbation de l'homéostasie calcique ne peut totalement expliquer l'inhibition de l'activation lymphocytaire induite par le DMBA. Mais l'interaction avec l'influx de calcium extracellulaire peut rendre compte des effets du DMBA sur la cytotoxicité des cellules NK et des CTL.

Dans les lymphocytes périphériques humains, l'interaction avec l'homéostasie calcique semble plus complexe que dans les lymphocytes T murins : l'augmentation tardive du taux de Ca^{2+} prédominerait ce qui serait en

faveur d'une inhibition des pompes SERCA par le DMBA (147). Néanmoins, ces différences d'action du DMBA sur la voie calcique de l'activation lymphocytaire selon que l'on utilise des cellules d'origine humaine ou murine conduisent aux mêmes résultats, à savoir une inhibition de tous les tests pharmacotoxicologiques qui rentrent dans le cadre de l'évaluation du potentiel immunosuppresseur d'une molécule chimique (125, 172).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13** : 1.
- 2- Ferradini L., Mackensen A., Genevee C., Bosq J., Duvillard P., Avril M.F., and Hercend T. (1993). Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *J. Clin. Invest.* **91** : 1183.
- 3- Boon, T., and Van der Bruggen P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183** : 725.
- 4- Mackensen, A., Carcelain G., Viel S., Raynal M.C., Michalaki H., Triebel F., Bosq J., and Hercend T. (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J. Clin. Invest.* **93** : 1397.
- 5- Horowitz, M.M., Gale R.P., Sondel P.M. Goldmann J.M., Kersey J., Kolb H.J., Rimm A.A., Ringden O., Rozman C. Speck B., Truitt R.L., Zwaan F.E., and Bortin M.M. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75** : 555.
- 6- Helg, C., Roux E., Beris P., Cabrol C., Wacker P., Darbellay R., Wyss M., Jeannet M., Chapuis B., and Roosnek E. (1993). Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplant.* **12** : 125.
- 7- Penn, I. (1988). Tumors of the immunocompromised patient, *Ann.Rev.Med.* **39** : 63.

- 8- Ambinder, R.F. (1995). Cancer in AIDS. *Curr. Opin. Oncology*, 7 : 427.
- 9- Harris, C.C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis : Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 51 (suppl.) : 5023s.
- 10- International Agency for Research on Cancer, (1983). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatics compounds. Part I. Chemical, Environmental and experimental data, In *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, vol. 32, 33.
- 11- Hecht, S.S., Assieh A.M., and Shantu A. (1986). Effects of methyl on the tumorigenicity and metabolic activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, In *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Carcinogenesis Structure Activity Relationships*. (Yang S.K. & B.D. Silverman Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 95.
- 12- Dean, J.H., Luster M.I., Boorman G. A., Lauer L. D., Luebke R.W. and Lawson L. (1983). Selective immunosuppression resulting from exposure to the carcinogenic congener of Benzopyrene in B6C3F1 mice. *Clin. Exp. Immunol.* 52 : 199.
- 13- Ward, E.C., Murray M.J., Lauer L.D., House R.V. and Dean J.H. (1986). Persistent suppression of humoral and cell-mediated immunity in mice following exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene, *Int.J.Immunopharmacol.*, 8 : 13.

- 14- Burchiel, S.W., Hadley W.M., Barton S.L., Fincher R.H., Lauer L.D., and Dean J.H. (1988). Persistent immunosuppression of humoral immunity produced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in B6C3F1 mice : correlation with changes in cell surface markers detected by flow cytometry. *Int. J. Immunopharmacol.* **10** : 369.
- 15- Shields, P.G., and Harris C.C. (1993). principles of carcinogenesis : Chemical in *Principles & practice of Oncology edited by De Vita Jr V. T., Hellman S., Rosenberg S.A.*, pp. 200-211, J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
- 16- Jung, S., and Schluesner H.J. (1991). Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated oncogenic ras proteins. *J.Exp. Med.* **173** : 273.
- 17- Gedde-Dahl, T.I., Fossum B., Eriksen J.A., Thorsby E., and Gaudernack G. (1993). T cell clones specific for p21ras-derived peptides : characterisation of their fine specificity and HLA restriction. *Eur. J. Immunol.* **23** : 754.
- 18- Houbiers, J.G., Nijman H.W., Van Der Brug S.H., Drijfhout J.W., Kenemans P., Van De Velde C.J., Brand A., Momburg F., Kast W.M., and Melief C.J. (1993). In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild type p53. *Eur. J. Immunol.* **23** : 2072.
- 19- Noguchi, Y., Chen Y.T., and Old L.J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91** : 3171.
- 20- Prehn R.T., and Main J.M. (1957). Immunity to methyl-cholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **18** : 769.

- 21- Dean, J.H., Ward E.C., Murray M.J., Lauer L.D. and House R.V. (1985). Mechanism of Dimethylbenzanthracene-induced immunotoxicity. *Clin. Physio. Biochem.* **3** : 98.
- 22- Gajewski, T.F., Qian, D., Fields, P., and Fitch F. W. (1994). Anergic T-lymphocytes clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 38.
- 23- Gajewski,T.F., Fields P., and Fitch F.W. (1995). Induction of the increased fyn kinase activity in anergic T helper type 1 clones requires calcium and protein synthesis and is sensitive to cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* **25** : 1836.
- 24- Saboori, A.M., and Newcombe D.S. (1992). Environmental chemicals with immunotoxic properties, *In Clinical immunotoxicology, Ed. by Newcombe D.S., Rose N.R. & Bloom J.C., pp. 379-383, Raven Press, New York.*
- 25- White, Jr., K.L. (1986). An overview of immunotoxicology and carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *J. Env. Sci. Hlth.,* **2** : 163.
- 26- Robberts, L., (1991). EPA moves to reassess the risk of Dioxin. *News and Comment.* p 911.
- 27- Landers, J.P., and Bunce N.J. (1991). The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.* **276** : 273.
- 28- Nebert, D.W., Nelson D.R., Coon M.J. et al. (1991). The P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.* **10** : 1.

- 29- Prafulla, R., Iversen P.L., and Bresnick E. (1991). Induction of cytochrom P450 1A1 and 1A2 as determined by solution hybridization. *Biochem. Pharmacol.* **41** : 1719.
- 30- Safe, S., and Krishnan V. (1995). Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch. Toxicol. Suppl.* **17** : 99.
- 31- Owens, I.S. (1977). Genetic regulation of UDP-glucuronosyltransferase induction by polycyclic aromatic compounds in mice. *J. Biol. Chem.* **252** : 2827.
- 32- Nebert, D.W., and Gelboin H.V. (1969). The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains and development and hormonal states. *Arch. Biochem. Biophys.* **134** : 76.
- 33- Poland, A., and Glover E. (1976). Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo p-dioxin by hepatic cytosol. *J. Biol. Chem.* **251** : 4936.
- 34- Pratt, W.B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **268** : 21455.
- 35- Maltepe E., Schmidt J.V., Baunoch D., Bradfield C.A., and Celeste Simon M. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* **386** : 403.

- 36- Dolwick, K.M., Schmidt J.V., Carver L.A., Swanson H.I., and Bradfield C.A. (1993) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* **44** : 911.
- 37- Swanson, H.I., and Bradfield C.A. (1993). The Ah receptor : genetics, structure and function. *Pharmacogenetics*, **3** : 213.
- 38- Segerback, D., and Vodicka P. (1993). Recoveries of DNA adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ³²P-postlabelling assay. *Carcinogenesis* **14**, 2463.
- 39- Hollstein, M., Sidransky D., Vogelstein B., and Harris C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253** : 49.
- 40- Soussi, T., Caron de Fromental C., and May P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5** : 945.
- 41- Denissenko, M.F., Pao A., Tang M.-S., and Pfeifer G.P. (1996). Preferential formation of Benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* **274** : 430.
- 42- Kohn, M.C., Lucier G.W., Clark G.C., Sewall C., Trischer A.M., and Portier C.J. (1993). A mechanistic model of effects of dioxin on gene expression in the rat liver. *Tox. Applied Pharmacol.* **120** : 138.
- 43- Bertazzi, P.A., Zocchetti C., Pesatori A.C., Guercilena S., Consummi D., Tironi A., and Landi M.T. (1992). Mortality of young population after accidental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin. *Int. J. Epidemiol.* **21** : 118.

- 44- Manz, A., Berger J., Duyer J.H., Flesch J.D., Nagel S., and Waltsgott H. (1991). Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet*, **338** : 959.
- 45- Peterson, R.E., Theobald H.M., and Kimmel G.L. (1993). Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-species comparisons. *Crit. Rev. Toxicol.* **23** : 283.
- 46- Biron, C.A., Byron K.S., and Sullivan J.L. (1989). Severe herpes virus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* **320** : 1731.
- 47- Kärre, K. (1995). Express yourself or die : Peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science* **267** : 978.
- 48- Ferrone, S., and Marincola F.M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells : molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol. Today* **16** : 487.
- 49- D'Andrea, A., Chang C., Franz-Bacon K., Mc Clanahan T., Phillips J.H., and Lanier L.L. (1995). Molecular cloning of NKB1 a natural killer cells receptor for HLA-B allotypes. *J. Immunol.* **155** : 2306.
- 50- Kaufman, D.S., Schoon R.A., Robertson M.J., and Leibson P.J. (1995). Inhibition of selective signaling events in natural killer cells recognizing major histocompatibility complex class I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6484.

- 51- Malnati, M.S., Peruzzi M., Parker K.C., Biddison W.E., Ciccone E., Moretta A., and Long E.O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 267 : 1016.
- 52- Yokoyama, W.M. (1995). Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 7 : 110.
- 53- Moretta, A, Vitale M., Bottino C., Orengo A.M., Moretti L., Augugliaro R., Barbaresi M., Ciccone E., and Moretta L. (1993). p58 molecules as putative receptor for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class-I protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* 178 : 597.
- 54- Litwin, V., Gumperez J., Parham P., Phillips J.H., and Lanier L.L. (1994). NKB1 : a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J. Exp. Med.* 180 : 537.
- 55- Doherty, P.C. (1993). Cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 75 : 607.
- 56- Shresta, S., MacIvor D.M., Heusel J.W., Russell J.H., and Ley T.J. (1993). Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 5679.
- 57- Kägi, D., Vignaux F., Ledermann B., Bürki K., Depraetere V., Nagata S., Hentgartner H., and Golstein P. (1994a). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265 : 528.

- 58- Lowin, B., Hahne M., Mattmann C., and Tschopp J. (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and fas lytic pathways. *Nature* 370 : 650.
- 59- Arase, H., Arase N., and Saito T. (1995). Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J. Exp. Med.* 181 : 1235.
- 60- Rouvier, E., Luciani M.F., and Golstein P. (1993). Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177 : 195.
- 61- Duke, R.C., Persechini P.M., Chang S., Liu C.C., Cohen J.J. and Young J.D.E. (1989). Purified perforin induces target cells lysis but not DNA fragmentation, *J. Exp. Med.* 170 : 1451.
- 62- Heusel, J.W., Wesselschmidt R.L., Shresta S., Russell J.H., and Ley T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76 : 977.
- 63- Shi, L., Krautt R.P., Aebersold R., and Greenberg A.H. (1992). A natural killer granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* 175 : 553.
- 64- Janeway, C.A.Jr, and Travers P. (1995). Immunobiology : The immune system in health and disease, *Current Biology Ltd.*, London.
- 65- Germain, R.N. (1994). MHC-dependant antigen processing and peptide presentation : providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76 : 287.

- 66- Guinan, E.C., Gribben J.G., Boussiotis V.A., Freeman G.J., and Nadler L.M. (1994). Pivotal role of B7: CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* **84** : 3621.
- 67- June, C.H., Ledbetter J.A., Linsley P.S., and Thompson C.B. (1990). Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* **11** : 211.
- 68- Altman, A., Coggeshall M., and Mustelin T. (1990). Molecular events mediating T cell activation. *Adv. Immun.* **48**, 227.
- 69- Cantrell, D. A., Izquierdo M., Reif K., and Woodrow M. (1993). Regulation of PtdIns-3-Kinase and the guanidine nucleotide binding proteins p21ras during signal transduction by the T cell antigen receptor and the interleukin-2 receptor. *Semin. Immunol.* **5** : 319.
- 70- Genot, E.M., Parker P.J., and Cantrell D.A. (1995). Analysis of the role of protein kinase C -alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation, *J. Biol. Chem.*, **270** : 9833.
- 71- Cohen, P. (1998). Structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58** : 453.
- 72- Jain, J., Mc Caffrey P.G., Miner Z., Kerppola T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran T., and Rao A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*, **365** : 352.

- 73- Flanagan, W.M., Corthesy B., Bram R.J., and Crabtree G.R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352 : 803.
- 74- Ghosh, S., and Baltimore D. (1990). Activation *in vitro* of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* 344 : 678.
- 75- Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C., and Healy J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386 : 855.
- 76- Crabtree G.R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243 : 355.
- 77- Pages, F., Ragueneau M., Rottapel R., Truneh A., Nunes J., Imbert J., and Olive D. (1994). Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 369 : 327.
- 78- Takeshita, T., Asao H., Ohtani K., Ishi N., Kumaki S., Tanaka N., Munakata H., Nakamura M., and Sugamura K. (1992). Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257: 379.
- 79- Leonard, W.J., Noguchi N., Russell S.M., and Mc Bride O.W. (1994). The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency : the role of the interleukine-2 receptor gamma chain as a common gamma chain *Immunol. Rev.* 138 : 61.
- 80- Taniguchi, T., and Minami Y. (1993) The IL-2/IL-2 receptor system : a current overview. *Cell* 73 : 5.

- 81- Grant, A.J., Roessler E., Ju G., Tsudo M., Sugamura K., and Waldmann T.A. (1992). The interleukin-2 receptor (IL-2R) : the IL-2 alpha subunit alters the function of the IL-2R beta subunit to enhance IL-2 binding and signaling by mechanisms that do not require binding of IL-2 to IL-2R alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 2165.
- 82- Cerdan, C., Martin Y., Courcoul M., Mawas C., Birg F., and Olive D. (1995). CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R β expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J. Immunol.* **154** : 1008.
- 83- Kondo, M., Ohashi Y., Tada K., Nakamura M., and Sugamura K. (1994) Expression of the mouse interleukin-2 receptor gamma chain in various cell populations of thymus and spleen. *Eur. J. Immunol.* **24** : 2026.
- 84- Siegel, J.P., Sharon M., Smith P.L., and Leonard W.J. (1987). The IL-2 receptor β chain (p70) role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* **238** : 75.
- 85- Grabstein, K.H., Eiseman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., Beers C., Richarson J., Schoenborn M.A., Ahdieh M., Johnson L., Alderson M.R., Watson J.D., Anderson D.M., and Giri J.G. (1994). Cloning of T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264** : 965.
- 86- Karnitz, L.M., and Abraham R.T. (1996). Interleukin-2 receptor signaling mechanisms. *Adv. Immunol.* **61** : 147.

- 87- Kimura, Y., Takeshita T., Kondo M., Isshii N., Nakamura M, Van Snick J., and Sugamura K. (1995). Sharing of the IL-2 receptor γ chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int. Immunol.* **7** : 115.
- 88- Giri, J.G., Ahdieh M., Eiseman J., Shanebeck K., Grabstein K., Kumaki S., Namen A., Park L.S., Cosman D., and Anderson D (1994). Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13** : 28822.
- 89- Page, T.H., and Dallman M.J. (1991). Molecular cloning of cDNAs for the rat interleukin-2 receptor α and β chain genes : differentially regulated gene activity in response to mitogenic stimulation. *Eur. J. Immunol.* **21** : 2133.
- 90- Lang, P., Guizani L., Vitte-Mony I., Stancou R., Dorseuil O., Gacon G., and Bertoglio J. (1992). ADP-ribosylation of the ras-related, GTP-binding protein RhoA inhibits lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **267** : 11677.
- 91- Minami, Y., and Taniguchi T. (1995). IL-2 signaling : recruitment and activation of multiple protein kinases by the components of the IL-2 receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7** : 156.
- 92- Taga, T., and Kishimoto T. (1995). Signalling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components. *Curr. Opin. Immunol.* **7** : 17.
- 93- Henkart, P. (1994). Lymphocyte-mediated cytotoxicity : two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* **1** : 343.

- 94- Cao, W., Tykodi S.S., Esser M.T., Braciale V.L., and Braciale T.J. (1995). Partial activation of CD8+ T cells by a self derived peptide. *Nature* 378 : 295.
- 95- Esser, M.T., Krishnamurthy B., and Braciale V.L. (1996). Distinct T cell receptor signaling requirements for perforin- or FasL-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 183 : 1697.
- 96- Brossart, P., and Bevan M.J. (1996). Selective activation of Fas/FasL ligand-mediated cytotoxicity by a self peptide. *J. Exp. Med.* 183 : 2449.
- 97- Roit I., Brostoff J., and Male D. (1989). *Immunologie fondamentale et appliquée*, 2nd Ed., MEDSI, Paris.
- 98- Griscelli, C. (1989). Déficits héréditaires de l'immunité spécifique. *Médecines/Science*, numéro spécial, 34.
- 99- Tursz, T. (1989). Cancer et immunodépression. *Médecines/Science*. numéro spécial : 42.
- 100- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell.* 80, 259.
- 101- Loew, L.M., Carrington W., Tuft R.A., and Fay F.S. (1994). Physiological cytosolic Ca²⁺ transients evoke concurrent mitochondria depolarizations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 12579.
- 102- Cameron A.M., Steiner J.P., Sabatini D.M., Kaplin A.I., Walensky L.D., and Snyder S.H. (1995). Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92 : 1784.

- 103- Cameron, A.M., Steiner J.P., Roskams A.J., Ali S.M., Ronnett G.V., and Snyder S.H. (1995). Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca^{2+} flux. *Cell* **83** : 463.
- 104- Goldsmith, M.A., and Weiss A. (1988). Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation. *Science* **240** : 1029.
- 105- Putney, J.W. Jr. and Bird G. S. J. (1993). The signal for capacitive calcium entry. *Cell* . **75**, 199.
- 106- Khan, A.A., Steiner J.P., Klein M.G., Schneider M.F., and Snyder S.H. (1992). IP3 Receptor: Localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor. *Science* **257**, 815.
- 107- Kuno, M., and Gardner P. (1987). Ion channels activated by inositol-1,4,5-triphosphate in plasma membrane of human T lymphocytes. *Nature*. **326**, 301.
- 108- Luckhöff, A., and Clapham D.E. (1992). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} channel. *Nature*. **355** : 356.
- 109- Gouy, H., Cefai D., Brogger Christensen S. , Debre P., and Bismuth G. (1990). Ca^{2+} influx in human T lymphocytes is induced independently of inositol phosphate production by mobilization of intracellular Ca^{2+} stores. A study with the Ca^{2+} endoplasmic reticulum-ATPase inhibitor thapsigargin. *Eur.J.Immunol.* **20**, 2269.

- 110- Thastrup, O., Cullen P.J., Droback B.K., Hanley M.R., and Dawson A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** : 2466.
- 111- Randriamampita, C. and Tsien R.Y. (1993). Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* **364** : 809.
- 112- Parekh, A.B., Terlau H., and Stühmer W. (1993). Depletion of InsP_3 stores activates a Ca^{2+} and K^+ current means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* . **364**, 814.
- 113- Galione, A., White A., Willmot N., Turner M., Potter B.V.L., and Watson S.P. (1993). cGMP mobilizes intracellular Ca^{2+} in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* **365** : 456.
- 114- Alvarez, G., Montero M., Garcia-Sancho G. (1992). Cytochrome P450 may regulate plasma membrane Ca^{2+} permeability according to the filling state of the intracellular stores. *FASEB J.* **6** : 786.
- 115- Fasolato, C., Innocenti B., and Pozzan T. (1994). Receptor-activated Ca^{2+} influx : how many mechanism for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **15** : 271.
- 116- Wacholtz, M.C., Cragoe Jr. E.J., and Lipsky P.E. (1992). A Na^+ -dependent Ca^{2+} exchanger generates the sustained increase in intracellular Ca^{2+} required for T cel activation. *J. Immunol.* **149** : 1912.

- 117- Lin, C.S., Boltz R.C., Blake J.T., Nguyen M., Talento A., Fischer P.A., Springer M.S., Sigal N.H., Slaughter R.S., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., and Koo G.C. (1993). Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **177**, 637.
- 118- Le Deist, F., Hivroz C., Partiseti M., Thomas C., Buc H. A., Oleastro M., Belohradsky B., Choquet D., and Fischer A. (1995). A primary T-cell immunodeficiency with defective transmembrane calcium influx. *Blood*, **85** : 1053.
- 119- Exon, J.H., Kerkvliet N.I., and Talcott P.A. (1987). Immunotoxicity of carcinogenic pesticides and related chemicals. *J. Env. Sci. Hlth.*, **1** : 73.
- 120- Luster, M.I., Germolec D.R., Clark G., Wiegand G., and Rosenthal G.R. (1998). Selective effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and corticosteroid on in vitro lymphocyte maturation. *J. Immunol.* **140** : 928.
- 121- Reggiani, G. (1978) Medical problems raised by the TCDD contamination in Seveso. *Arch. Toxicol.* **40** : 161.
- 122- Hoffman, R.E., Stehr-Green P.A., Webb K.B., Evans G., Knutsen A.P., Schramm W.F., Staake J.L., Gibson B.B., and Steinberg K.K. (1986). Health effects of long term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *JAMA* **255** : 2031.
- 123- Sutter, T.R., Guzman K., Dold K.M., and Greenlee W.F. (1991). Targets for Dioxin : genes for Plasminogen Activator Inhibitor-2 and Interleukin-1 β . *Science* **245** : 415.

- 124- Thurmond, L.M., House R.V., Lauer L.D. and Dean J.H. (1988). Suppression of splenic lymphocyte function by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **93** : 363.
- 125- Luster, M.I., Munson A.E., Thomas P.T., Holsapple M.P., Fenters J.D., White Jr K.L., Lauer L.D., Germolec D.R., Rosenthal G.R., and Dean J.H. (1988). Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity : National Toxicology Programm's Guidelines for immunotoxicity evaluation in mice, *Fund. Appl.Toxicol.*, **10**, 2.
- 126- Ward, E.C, Murray M.J., Lauer L.D., House R.V., Irons R., and Dean J.H. (1984). Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene exposure in B₆C₃F₁ mice. I - Effects on humoral immunity and host resistance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74** : 299.
- 127- Archuleta, M.M., Born J.L., Montano R.M., and Burchiel S.W. (1992). Covalent binding of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene to lymphoid and non lymphoid tissues following oral administration to B₆C₃F₁ mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **113** : 133.
- 128- Dean, J.H., Ward E.C., Murray M.J., Lauer L.D., House R.V., Stillman W.S., Hamilton T.A., and Adams D.O. (1986). Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene exposure in B₆C₃F₁ mice. II - Altered cell-mediated immunity and tumoral resistance. *Int. J. Immunopharmacol.* **8** : 189.
- 129- House, R.V., Pallardy M.J., Burlison G.R. and Dean J.H. (1989). 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced modulation of cytokines involved in cytotoxic T lymphocyte induction. *In Vitro Toxicol.* **2**: 267.

- 130- Weiss, A., Schields R., Newton M., Mauger B., and Imboden J. (1987). Ligand -receptor interaction required for commitment to the activation of the interleukin-2 gene. *J. Immunol.*, **138** : 2169.
- 131- Leo, O., Foo M., Sachs D.H., Samelson L.E., and Bluestone J.A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84** : 1374.
- 132- Bradley, L.M., (1980). Mixed lymphocyte response. In *Selected methods in Immunology* (Freedman and Comp Ed.), p162.
- 133- Burchiel, S.W., Davis D.A.P, Gomez M.P., Montano R.M., Barton S.L., and Seamer L.C. (1990). Inhibition of lymphocyte activation in splenic and gut-associated lymphoid tissues following oral exposure of mice to 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **105** : 434.
- 134- Saas, P., Bohuon C., and Pallardy M. (1996). Effects of methyl substitutions on Benz(a)anthracene derivatives-induced immunosuppression. *J. Toxicol. Environ. Health* **49** : 371.
- 135- House, R.V., Pallardy M.J., and Dean J.H. (1988). Suppression of murine Cytotoxic T-Lymphocyte induction following exposure to 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene : Dysfunction of antigen recognition. *Int. J. Immunopharmacol.* **11** : 207.
- 136- Pallardy, M.J., House R.V. and Dean J.H. (1989). Molecular mechanism of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced immunosuppression : Evidence for action via the Interleukin-2 pathway. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 128.

- 137- House, R.V., Lauer L.D., Murray M.J. and Dean J.H. (1987). Suppression of T-helper cell function in mice following exposure to carcinogen 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene and its restoration by Interleukin-2. *Int. J. Immunopharmacol.* **9** : 89.
- 138- Tsien R. Y., Pozzan T., and Rink T. J. (1982). T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocyte. *Nature* . **295** : 68.
- 139- Mills, G.B., Cheung R.K., Grinstein, S., and Gelfand, E.W. (1985). Increase in cytosolic free calcium concentration is an intracellular messenger for the production of interleukin-2 but not for expression of the interleukin-2 receptor. *J. Immunol.* **134**: 1640.
- 140- Rabinovitch, P.S., June C.H., Grossmann A., and Ledbetter J.A. (1986). Heterogeneity among T cells in intracellular free calcium response after mitogen stimulation with PHA or anti-CD3 simultaneous use of indo-1 and immunofluorescence with flow cytometry. *J. Immunol.* **137** : 952.
- 141- Vandenberghe, P.A., and Ceuppens J.L. (1990). Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3, a new fluorescent calcium indicator. *J. Immunol. Methods.* **127** : 197.
- 142- Burchiel, S.W., Thompson T.A., and Davis D.P. (1991). Alterations in mitogen-induced calcium mobilization and intracellular free calcium produced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in the Jurkat human T cell line. *Int. J. Immunopharmacol.* **13** : 109.

- 143- Pallardy M., Mishal Z., Lebrec H., and Bohuon C. (1992). Immune modification due to chemical interference with transmembrane signalling : Application to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 377.
- 144- Pallardy, M., Mishal Z., Lebrec H., Saas Ph., and Bohuon, C. (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons alter calcium flux following activation of human lymphocyte. *Cancer Mol. Biol.*, **1**, 71.
- 145- Archuleta, M.M., Schieven G.L., Ledbetter J.A., Deanin G.G., and Burchiel S.W. (1993). 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene activates protein-tyrosine kinases Fyn and LCK in the HPB-ALL human T-cell line and increases tyrosine phosphorylation of phospholipase $C_{\gamma 1}$, formation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate, and mobilization of intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90** : 6105.
- 146- Burchiel, S.W., Davis D.P., Ray S.D., Archuleta M.M., Thilsted J.P., and Corcoran G.B. (1992). DMBA-induced cytotoxicity in lymphoid and nonlymphoid organs of B6C3F1 mice : relation of cell death to target cell intracellular calcium and DNA damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **113** : 126.
- 147- Krieger, J.A., Davila D.R., Lytton J., Born J.L., and Burchiel S.W. (1995). Inhibition of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases (SERCA) by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in HPB-ALL human T cells and others tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133** : 102.
- 148- Krieger, J.A., Born J.L., and Burchiel S.W. (1994). Persistence of calcium elevation in the HBP-ALL human T cell line correlates with

immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127** : 268.

- 149- Mc Conkey, D.J., and Orrenius S. (1989). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) kills glucocorticoid-sensitive thymocytes in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160** : 1003.
- 150- Mc Conkey D.J., Hartzell P., Duddy S.K., Hakansson H., and Orrenius S. (1988). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺-mediated endonuclease activation. *Science* **242** : 256.
- 151- Truneh, A., Albert F., Golstein P., and Schmitt-Verhulst A-M. (1985). Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester, *Nature*, **313**, 318.
- 152- Terajima, J., Tsutsumi A., Freire-Moar J., Cherwinski H.M., and Ransom J.T. (1992). Evidence for clonal heterogeneity of expression of six protein kinase C isoforms in murine B and T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **142** : 197.
- 153- Roifman C.M., Benedict S.H., Cheung R.K., and Gelfand E.W. (1987). Induciton of human B cell proliferation and differentiation by the combinaison of phorbol ester and ionomycin. *Eur. J. Immunol.* **17** : 701.
- 154- Kerkvliet N.I., and Burleson G.R. (1994). Immunotoxicity of TCDD and related halogenated aromatic hydrocarbons. In *Immunotoxicology and Immunopharmacology, 2nd Ed, Ed. by J.H. Dean, M.I. Luster, A.E. Munson, and I. Kimber*, p. 94, Raven Press, New York.

- 155- Kerkvliet N.I., Baecher-Steppan L., Smith B.B., Youngberg J.A., Henderson M.C., and Buhler D.R. (1990). Role of the Ah locus in suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by halogenated aromatic hydrocarbons (PCBs and TCDD): structure-activity relationships and effects in C57Bl/6 mice congenic at the Ah locus. *Fundam. Appl. Toxicol.* **14** : 532.
- 156- DeKrey, G.K., and Kerkvliet N.I. (1995). Suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin occurs in vivo, but not in vitro, and is independent of corticosterone elevation. *Toxicology* **97** : 105.
- 157- House, R.V and Dean J.H. (1987). Studies on structural requirements for suppression of cytotoxic T lymphocyte induction by polycyclic compounds. *In Vitro Toxicol.* **1**: 149.
- 158- Hardin, J.A., Hinoshita F., and Shur D.H. (1992). Mechanisms by which Benzo(a)pyrene, an environmental carcinogen, suppress B cell lymphopoiesis. *Tox. Applied Pharmacol.* **117** : 155.
- 159- Clark, G.C., Blank J.A., Germolec D.R., and Luster M.I. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin stimulation of tyrosine phosphorylation in B lymphocytes: potential role in immunosuppression. *Mol. Pharmacol.* **39** : 495.
- 160- Morris, D.L., Snyder N.K., Gokani V., Blair R.E., and Holsapple M.P. (1992). Enhanced suppression of humoral immunity in DBA/2 mice following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Tox. Applied Pharmacol.* **112** : 128.

- 161- Davis, D. P., and Burchiel, S.W. (1992). Inhibition of calcium-dependent pathways of B-Cell activation by DMBA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116** : 202.
- 162- Bradley, S.G. (1985). Immunologic mechanisms of host-resistance to bacteria and parasites. In *Immunotoxicology and Immunopharmacology* (J. Dean et al., Eds), Raven press, New-York, p45.
- 163- Liu, C.-C., Young L.H.Y., and Young J.D.-E (1996). Lymphocyte-mediated cytotoxicity and disease. *N. Engl. J. Med.* **335** : 1651.
- 164- Kägi, D., Ledermann B., Burki K., Hentgartner H., and Zinkernagel R.M. (1994b). CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular microbial infection by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **24** : 3068.
- 165- Selgrade, M.K., Daniels M.J., Burleson G.R., Lauer L.D., and Dean J.H. (1988). Effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(a)pyrene and cyclosporin A on murine cytomegalovirus infection: studies of resistance mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.* **10** : 811
- 166- Lu, Y.C., and Wu Y.C. (1985). Clinical findings and immunological abnormalities in Yu-Cheng patients *Environ. Health Perspect.* **59** : 17.
- 167- Tryphonas, H. (1995). Immunotoxicity of PCBs (Aroclor) in relation to Great Lakes. *Environ. Health Perspect.* **103** (suppl. 9) : 35.
- 168- Ryan, J.J., Levesque D., Panopio L.G., Sun W.F., Masuda Y., and Kuroki H. (1993). Elimination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from human blood in the Yusho and Yu-Cheng rice oil poisonings. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **24** : 504.

- 169- Neubert, R., Maskow L., Webb J., Jacob-Müller U., Nogueira A., Delgado I., Helge H., and Neubert D. (1993). Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the immune system. *Life Sciences* 53 : 1995.
- 170- Tonn, T, Esser, C., Schneider E.M., Steinmann-Steiner-Haldenstatt W., and Gleichmann E. (1996). Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ. Health Perspect.* 104 : 422.
- 171- Robb, R.J., Mayer P.C., and Garlick R. (1985). Retention of biological activity following radioiodination of human interleukin-2 : comparison with biosynthetically labeled growth factor in receptor binding assays. *J. Immunol. Methods* 81: 15.
- 172- Luster, M.I., Portier C., Pait D.G., White K.L Jr, Gennings C., Munson A.E. and Rosenthal G.R. (1992). Risk assessment in immunotoxicology : Sensitivity and predictability of immune test, *Fundam.Appl.Tox.* 18, 200.
- 173- Jayaraman, T., Ondrias K., Ondriasova E., and Marks A.R. (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* 272 : 1492.
- 174- Randriamampita, C., and Trautmann A. (1990). Arachidonic acid activates Ca^{2+} extrusion in macrophages. *J. Bio. Chem.* 265, 18059.
- 175- Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B., and Grinstein, S. (1988). Uptake of extracellular Ca^{2+} and not recruitment from internal stores is essential for T lymphocyte proliferation. *Eur.J. Immunol.* 18 : 917.

- 176- Vink, A., Uyttenhove C., Wauters P., and Van Snick J. (1990). Accessory factors involved in murine T cell activation. Distinct roles of interleukin 6, interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Eur. J. Immunol.*, 20: 1-6.
- 177- Dumont, F.J., Staruch M.J., Koprak S.L., Melino M.R., and Sigal N.H. (1990). Distinct mechanism of suppression of murine T cell activation by related macrolides FK-506 and Rapamycin. *J. Immunol.* 144 : 251.
- 178- Houssiau, F., and Van Snick J. 1992. IL-6 and the T-cell response. *Res.Immunol.*, 143:740-743.
- 179- Tsutsumi A., Kubo M., Fujii H., Freire-Moar J., Turck C.W., and Ransom J.T. (1993). Regulation of protein kinase C isoform proteins in phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells. *J. Immunol.* 150 : 1746.
- 180- Friesen, C., Herr I., Krammer P.H., and Debatin K.M. (1996). Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* 2 : 574.

ANNEXE

Les résultats présentés dans cette thèse ont fait l'objet de publications et de communications orales ou sous forme de posters lors de congrès internationaux :

Publications :

-Saas P., Z. Mishal, and M. Pallardy (?), 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene induces intracellular calcium mobilization and inhibits extracellular calcium influx in naive murine T lymphocyte, *Toxicology*, soumis.

-Saas P., C. Bohuon and M. Pallardy (1996), Effects of methyl substitution on 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene induced T-helper lymphocyte immunosuppression, *J. Toxicol. Environ. Health.*, 49 : 101-117.

-Pallardy M., Z. Mishal, H. Lebec, P. Saas and C. Bohuon (1994), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons alter calcium flux following activation of human lymphocyte, *Cancer Molecular Biology*, 1: 71-75.

Posters ou communications orales :

- 34th Annual Meeting of American Society of Toxicology, Baltimore, March 1995 :

-Saas P., Z. Mishal, C. Bohuon, and M. Pallardy (1995), Implication of IP3 and tyrosines kinases in DMBA-induced calcium release in T-lymphocytes, *The Toxicologist*, 15 : 104 (Abstract).

-Saas P., C. Bohuon, and M. Pallardy (1995) In vitro evaluation of DMBA-induced immunotoxicity using murine and human lymphocytes, *The Toxicologist*, 15 : 227.(Abstract)

- 3rd Conference of the European Society for Analytical Cellular Pathology, Grenoble, 16-20 May 1994 :

Saas P., Z. Mishal, C. Bohuon and M. Pallardy, DMBA releases intracellular pool of calcium in murine T lymphocytes.

- Joint meeting Société Française de Toxicologie & Società Italiana Di Tossicologia, Marseille, 18-19 Avril 1994 :

Saas P., Z. Mishal and M. Pallardy, Structure-activity relationships in immunosuppression : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

- 33rd Annual Meeting of American Society of Toxicology, Dallas, March 1994 :

-Saas P., Z. Mishal, C. Bohuon and M. Pallardy (1994), Benzanthracene derivatives induced immunosuppression : structure-activity relationships, *The Toxicologist*, 14 : 203 (Abstract).

RESUME : Le Diméthyl-7,12-benz(a)anthracène (DMBA) est un hydrocarbure polycyclique aromatique cancérigène dont les effets immunosuppresseurs chez la souris sont bien connus. Dans cette étude, nous avons étudié les effets *in vitro* du DMBA sur l'activation lymphocytaire T, en s'intéressant plus particulièrement à l'interaction avec l'homéostasie calcique. Dans une seconde partie, l'utilisation des 2 dérivés monométhylés du DMBA, le méthyl-7-benz(a)anthracène (M7BA) et le méthyl-12-benz(a)anthracène, nous a permis de définir le rôle respectif des 2 groupements méthyles en position 7 et 12 dans l'interaction du DMBA avec l'activation lymphocytaire T. Enfin, dans une troisième partie, nous avons comparé les effets induits par le DMBA sur la fonction de lymphocytes T murins et sur celle de lymphocytes T humains afin de pouvoir extrapoler les résultats obtenus *in vivo* chez la souris à l'homme. Ainsi, nous avons pu démontrer que le DMBA induit une augmentation du taux de calcium intracellulaire (Ca^{2+ic}) dans les lymphocytes T murins et humains. Cette augmentation détectée précocement dans les lymphocytes T murins et plus tardivement dans les lymphocytes T humains est essentiellement d'origine intracellulaire. Elle fait suite à la production d'inositol-1,4,5-triphosphate par le DMBA. En plus de la déplétion du pool calcique intracellulaire du lymphocyte T murin, le DMBA s'oppose à l'entrée de calcium extracellulaire induite par la concanavaleine A. Ceci a pour conséquence une mobilisation insuffisante du calcium lors de l'activation par un mitogène et donc inhibe la prolifération lymphocytaire. Des trois dérivés méthylés du benz(a)anthracène, le DMBA est le plus puissant immunosuppresseur. Le DMBA agit à la fois sur la transition de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire (production d'IL-2, expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2) et sur la transition de la phase G1 à S (prolifération dépendante de l'IL-2), alors que le M12BA et le M7BA interfèrent essentiellement avec la transition de la phase G0 à G1. Le M7BA n'inhibe pas la prolifération en réponse à la concanavaleine A et n'induit pas d'augmentation significative du taux de Ca^{2+ic} . En revanche comme le DMBA, le M12BA provoque une augmentation de Ca^{2+ic} , démontrant ainsi l'importance du méthyl en position 12 pour l'interaction du DMBA avec l'homéostasie calcique. Le DMBA inhibe la prolifération lymphocytaire T, la génération et la fonction de lymphocytes T cytotoxiques ainsi que la fonction NK de lymphocytes murins ou humains. Des différences entre ces 2 systèmes cellulaires existent en ce qui concernent l'interaction du DMBA avec l'homéostasie calcique.

MOTS CLES

Hydrocarbures polycycliques aromatiques, Lymphocyte T, Calcium, Immunosuppression, Interleukine-2, Structure-activité

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Laboratoire d'Immunotoxicologie, INSERM U461, Faculté de Pharmacie Paris XI, Rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry