

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DE L'ÉQUILIBRE RÉDOX DANS LA VOIE D'ACTIVATION  
DE *EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE* (ERK1/2) PAR LE  
CADMIUM ET COMPARAISON AVEC LE ZINC UN MÉTAL ESSENTIEL

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

JOANNIE LEMAIRE

MARS 2019



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»





## REMERCIEMENTS

Cette merveilleuse aventure n'aurait pas été possible sans le support et l'opportunité offerte par ma directrice de recherche Dr Catherine Jumarie. Elle restera à jamais pour moi un modèle de persévérance, de bonté et de dévouement. L'expérience que j'ai acquise auprès d'elle sera à jamais gravée en moi et je n'aurais pas pu passer au travers de ce travail colossal sans sa patience et sa confiance en mes capacités.

Un immense merci à Denis Flipo pour ses conseils et pour tout le savoir précieux qu'il m'a transmis à travers de nombreuses techniques de laboratoire, surtout en microscopie et analyse d'images. À mon « voisin » de bureau, merci pour ta présence accompagnatrice et les petits chocolats pour me remonter le moral quand le FACS ne coopérait pas! Merci aussi à mes collègues de laboratoire, Myriam Mireault et Daphnée Gariépy, pour les beaux moments et les fous rires qu'on a partagés! Je tiens à remercier aussi les membres étudiants du groupe TOXEN pour la chaleureuse ambiance et les encouragements tout au long de mon parcours.

Merci au support que m'ont fourni mes ami(e)s et membres de ma famille, je vous adore!

À mes parents, mes piliers, j'aimerais qu'il y ait des mots assez forts pour décrire toute la reconnaissance que j'éprouve envers les sacrifices et le soutien que vous m'avez donné sans compter, mais s'ils existent ils m'échappent. Mille fois merci.

Finalement, à mon amour, mon roc, je t'aime et te remercie de ton acharnement à me motiver pour travailler fort et m'aider à réaliser le plus gros projet de mon parcours à date et certainement pas le dernier!



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	xiii
RÉSUMÉ .....	xvii
CHAPITRE I : INTRODUCTION .....	1
1.1    Mise en contexte.....	1
1.2    Le Cadmium .....	4
1.2.1    Propriétés physico-chimiques .....	4
1.2.2    Sources de Cd dans l'environnement.....	4
1.2.3    Voies d'exposition .....	5
1.3    Effets et mécanismes généraux de toxicité du Cd .....	7
1.3.2    Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydatif.....	9
1.4    L'épithélium intestinal .....	12
1.4.1    Structures .....	12
1.4.2    Contrôle du renouvellement de l'épithélium intestinal.....	14
1.4.3    Transport intestinal du Cd.....	15
1.4.4    Modèle cellulaire.....	16
1.5    La voie de signalisation des MAP kinases .....	18
1.5.1    Rôle de la voie des MAP kinases.....	18
1.5.2    Activation de ERK1/2 par le Cd .....	19
1.5.3    Lien entre ERK1/2 et eiF4E.....	21

1.6	Le Zinc .....	22
1.6.1	Propriétés physico-chimiques .....	22
1.6.2	Importance biologique du Zn .....	22
1.6.3	Le Zn et le stress oxydatif .....	23
1.6.4	Le Zn et ERK1/2 .....	24
1.7	Objectifs et Hypothèses de recherche .....	25
1.7.1	Résumé de la problématique et objectifs .....	25
1.7.2	Hypothèses .....	25
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....		27
2.1	Culture cellulaire .....	27
2.2	Activité MTT .....	27
2.3	Dosage des protéines selon la méthode de Bradford .....	28
2.4	Dosage des thiols totaux .....	29
2.5	Mesure des ERO par la sonde DCFH-DA en microscopie confocale .....	29
2.6	Dosage des métaux internalisés par spectrophotométrie d'émission de flamme .....	30
2.7	Immunobuvardage .....	30
2.8	Analyse du cycle cellulaire par marque au PI .....	32
2.9	Analyses statistiques .....	32
CHAPITRE III : RÉSULTATS .....		33
CHAPITRE IV : DISCUSSION .....		45
CHAPITRE V : CONCLUSION .....		57
BIBLIOGRAPHIE .....		61

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 : Variation de l'activité MTT en fonction de concentrations de Cd dans des cellules Caco-2 au jour 7, 14 ou 21 à la suite d'une exposition de 24 heures (figure tirée de Mantha et Jumarie 2010).....	2
Figure 1.2 : Incorporation du [ <sup>3</sup> H]-thymidine dans des cellules Caco-2 au jour 21 à la suite d'une exposition de 24 heures à des concentrations croissantes (0 à 50 µM) de Cd (figure tirée de Mantha et Jumarie 2010).....	3
Figure 1.3 : Contribution relative des différentes sources alimentaires à la dose journalière de Cd. (Source : données compilées à partir de EFSA 2009).....	7
Figure 1.4 : Schématisation des structures fondamentales du tube digestif (figure tirée de Marieb, 2005) .....	13
Figure 1.5 : Schématisation des structures modifiées de l'intestin afin d'accroître sa surface d'absorption (figure tirée de Marieb, 2005) .....	13
Figure 1.6 : Schématisation de la crypte de Lieberkühn et de l'activité de ERK en fonction de l'état de différenciation cellulaire (figure tirée de Groulx <i>et al</i> , 2012)....	14
Figure 1.7 : Schématisation d'une monocouche de cellules entérocytaires et localisation des pôles apical et basolatéral.....	17
Figure 1.8 : Voie de signalisation simplifiée des MAPK chez les mammifères (figure inspirée des figures 2, 7 et 8 de Cargnello et Roux, 2011) .....	19
Figure 1.9 : Schématisation simplifiées des différentes voies de signalisation de l'activation de eiF4E par ERK1/2 (figure inspirée de la figure 2 de Fruman et Rommel, 2014) .....	21
Figure 3.1 : Effet d'hormèse sur l'activité MTT induit par le Cd et le Zn et stimulation de la phosphorylation de ERK1/2. (A) Variation de l'activité MTT dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours et exposées 24 heures à des concentrations croissantes (0 à 500 µM) de Cd ou de Zn. (n = 4-7) (B) Agrandissement des courbes en (A) entre 0 et 75 µM (C) Exemple d'immunobuvardage de l'expression des	

protéines ERK1/2 et p-ERK1/2 dans les cellules traitées 24 heures au Cd (10 $\mu$ M) ou au Zn (100 $\mu$ M) en présence ou en absence de U0126 (20 $\mu$ M) (D) Analyses densitométriques normalisées sur les niveaux d'actine et exprimées relativement au niveau contrôle (n = 4). * statistiquement différent comparativement à la condition Cd (test t non-apparié avec une correction de Welch, $p < 0,05$ ). .....	34
Figure 3.2 : Variation de la répartition des cellules dans les différentes phases G1, S et G2 du cycle cellulaire mesurée en cytométrie en flux dans des cellules Caco-2 au jour 3, 5, 7, 14 et 21 de culture (n = 4-5). * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ : statistiquement différents comparativement à la valeur mesurée au jour 3 (test t non-apparié avec une correction de Welch).....	35
Figure 3.3 : Variation de la répartition des cellules dans les différentes phases G1, S et G2 du cycle cellulaire mesurée en cytométrie en flux dans des cellules Caco-2 au jour 21 de culture exposées au Cd (10 $\mu$ M) ou au Zn (150 $\mu$ M) (n = 4). .....	36
Figure 3.4: Variation de l'activité MTT en fonction de concentrations de Cd ou de Zn en présence ou en absence de CHX (5 $\mu$ M) dans des cellules Caco-2 au jour 21 à la suite d'une exposition de 24 heures (n = 6-9) * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ , **** $p < 0,0001$ : statistiquement différent comparativement à la valeur mesurée en absence de CHX (test t non-apparié avec une correction de Welch). .....	37
Figure 3.5: Effets d'un déséquilibre rédox sur l'activité MTT induite par le Cd et le Zn. (A) Variation de l'activité MTT de cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours puis exposées 24 heures à des concentrations de Cd variant entre 0 et 75 $\mu$ M seul ou en présence de BSO (3 mM) ou de BCNU (30 $\mu$ M) (n = 4). (B) Variation de l'activité MTT de cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours puis exposées 24 heures à des concentrations de Cd variant entre 0 et 75 $\mu$ M de Cd, seul ou en présence de NAC (1 mM). L'effet du Cd a aussi été testé sur des cellules prétraitées à du NAC (1 mM) pendant 24 heures avant l'exposition de 24 heures au Cd seul (n = 6) (C) Accumulation cellulaire de Cd dans des cellules Caco-2 de 21 jours exposées 24 heures au métal seul ou en présence de NAC (1 mM). L'accumulation de Cd a aussi été mesurée dans des cellules prétraitées à 1mM de NAC pendant 24 heures. (n = 3) (D) Variation de l'activité	

MTT dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours exposées 24 heures à des concentrations de Zn variant entre 0 et 200 $\mu\text{M}$ , seul ou en présence de BSO (3 mM), de BCNU (30 $\mu\text{M}$ ) ou de NAC (1 mM) (n = 4). * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ significativement différent comparativement à la valeur obtenue avec le métal seul (test non paramétrique ANOVA avec un test post-hoc de Dunn).....	39
Figure 3.6: Contenus en ERO détectés par fluorescence avec la sonde DCF-DA en microscopie confocale dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours et exposées 24 heures à du Cd (10 $\mu\text{M}$ ) en présence ou en absence de BSO (3 mM), de NAC (1 mM), suite à un prétraitement de NAC (1 mM) ou exposées à du Zn (150 $\mu\text{M}$ ) pendant 24 heures ou à du $\text{H}_2\text{O}_2$ (100 $\mu\text{M}$ ) pendant 1 heure (n = 4).....	41
Figure 3.7: Contenus en thiols dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours et exposées au Cd (10 $\mu\text{M}$ ) en présence ou en absence de BSO (3 mM) ou au Zn (150 $\mu\text{M}$ ) pendant 24 heures (n = 4). .....	42
Figure 3.8: Effet du Cd sur l'activation de ERK1/2 et de eiF4E. (A) Variation de l'activité MTT dans des cellules Caco-2 au jour 21 exposées à du Cd seul ou en présence de LJI308 (10 $\mu\text{M}$ ) ou de ETP-46464 (20 $\mu\text{M}$ ) pendant 24 heures (n = 4). (B) Exemple d'immunobuvardage de l'expression des protéines p-eiF4E et p-ERK1/2 dans des cellules Caco-2 exposées pendant 24 heures au Cd (10 $\mu\text{M}$ ) en présence ou en absence de U0126 (20 $\mu\text{M}$ ), de LJI308 (10 $\mu\text{M}$ ) ou de ETP-46464 (20 $\mu\text{M}$ ) (C) Analyses densitométriques normalisées sur les niveaux d'actine et exprimées relativement aux niveaux contrôles dans les cellules Caco-2 exposées pendant 24 heures au Cd (10 $\mu\text{M}$ ) en présence ou en absence de U0126 (20 $\mu\text{M}$ ), de LJI308 (10 $\mu\text{M}$ ) ou de ETP-46464 (20 $\mu\text{M}$ ) (n = 3-4). * $p < 0,05$ : significativement différent de la valeur obtenue avec le Cd seul (test t non-apparié avec une correction de Welch).....	43





## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Sources de nourriture avec les 10 plus grandes concentrations moyennes de cadmium retrouvées dans l'étude menée par la FDA pour la période de janvier 2006 jusqu'à avril 2008. Source : Données compilées à partir de FDA (2010).....	6



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4EBP	<i>4E binding protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASMC	Cellules de muscle lisse des voies respiratoires
BCNU	Carmustine
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSO	Buthionine sulfoximine
Caco-2	<i>Carcinoma colon cell line</i>
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
Cd <sup>2+</sup>	Ion cadmium
CDX1-2	<i>Caudal type homeobox 1</i>
CHX	Cycloheximide
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
COX	Cytochrome-c-oxydase
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescine diacétate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DTNB	5,5'-Dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

EGTA	Éthylène-bis(oxyéthylènenitrilo)tétraacétique
eiF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eiF4G	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4G</i>
ERK1/2	<i>Extracellular regulated kinase 1/2</i>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESCC	<i>Esophageal squamous cell carcinoma</i>
ETP-46464	<i>2-Methyl-2-[4-(2-oxo-9-quinolin-3-yl-4H-[1,3]oxazino[5,4-c]quinolin-1-yl)phenyl]propanenitrile, 4-[4-(1-Isocyano-1-methyl-ethyl)-phenyl]-6-quinolin-3-yl-1,4-dihydro-2-oxa-4,9-diaza-phenanthren-3-one</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe <sup>2+</sup>	Ion fer
GLUT-5	<i>Glucose-transporter 5</i>
GSH	Glutathion
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HNO <sub>3</sub>	Acide nitrique
HO·	Radical hydroxyle
HO <sup>-</sup>	Hydroxyde
IEG	<i>Immediate early response genes</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
IP	Iodure de propidium
JNK	c-JUN N-terminal kinase
LADH	Lipoamide déshydrogénase

LJI308	<i>2,6-Difluoro-4-(4-(4-morpholinophenyl)pyridin-3-yl)phenol, 2,6-Difluoro-4-[4-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-3-pyridinyl]phenol</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Chlorure de magnésium hexa hydrate
MEK	<i>MAPK/ERK Kinase</i>
MKKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
Mnk1/2	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Interacting Kinases 1 and 2</i>
MT	Métallothionéine
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogénophosphate de sodium
NAC	N-acétyle cystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaF	Fluorure de sodium
NaVanadate	Sodium Vanadate
Ni-Cd	Nickel-Cadmium
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Anion superoxyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p38	<i>Mitogen-activated protein kinases 38</i>
Pb	Plomb
PBS	Tampon phosphate salin
PD98059	<i>2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one</i>
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PVDF	Membrane de polyfluorure de vinylidène
RSK90	Ribosomal S6 kinase 90 kDa

RT-PCR	Transcription en chaîne par polymérase inverse
SGLT1	<i>Sodium-glucose linked transporter 1</i>
SH	Thiol
SOD	Superoxyde dismutase
TBS	Tampon <i>Tris-buffered saline</i>
TEF-1 $\delta$	<i>Translation elongation factor 1<math>\delta</math></i>
TIF3	<i>Translation initiation factor 3</i>
TNB	Anion 2-nitro-5-thiobenzoate
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
U0126	<i>1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene</i>
Zn	Zinc
Zn <sup>2+</sup>	Ion zin

## RÉSUMÉ

Le cadmium (Cd) est un métal reconnu pour son potentiel carcinogène. Le but de cette étude était de comprendre les circonstances et les composantes nécessaires à l'activation de ERK1/2 par le Cd. Nous avons émis l'hypothèse de l'implication d'un déséquilibre rédox dans cette activation par le Cd mais pas par le zinc (Zn), un métal essentiel. La lignée cellulaire intestinale Caco-2 différenciée (J21) a été choisie comme modèle *in vitro* car l'intestin est un organe cible du Cd ingéré. L'induction de l'activité déshydrogénase mitochondriale (MTT) et le contenu en thiols totaux ont été mesurés par spectrophotométrie, les niveaux de phosphorylation des protéines par immunobuvardage, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par la fluorescence de la sonde DCFH-DA et l'accumulation cellulaire de Cd par spectrophotométrie d'émission de flamme. Le Cd (10  $\mu$ M) et le Zn (150  $\mu$ M) peuvent induire une augmentation de l'activité MTT, mais seul le Cd peut activer ERK1/2. L'analyse du cycle cellulaire a permis d'écarter la possibilité que cette activité MTT soit reliée à de la prolifération cellulaire stimulée par le Cd ou le Zn. L'annulation du pic d'activité MTT par l'ajout de cycloheximide (CHX) (5  $\mu$ M) au Cd (0-75  $\mu$ M) et au Zn (0-200  $\mu$ M) permet de corrélérer cette activité à de la stimulation de synthèse protéique. La buthionine sulfoximine (BSO) (3 mM), la carmustine (BCNU) (30  $\mu$ M) et la N-acétylcystéine (NAC) (1 mM) ont modulé l'activité MTT induite par les métaux, mais le prétraitement au NAC n'a apporté aucun changement. Le NAC en co-traitement avec le Cd (mais pas en prétraitement) a diminué les ERO induits par le Cd (10  $\mu$ M), L'inhibiteur de la kinase MNK II (ETP-46464, 20  $\mu$ M) et celui de la kinase S6 (LJI308, 10  $\mu$ M) toutes deux impliquées dans l'activation du facteur de traduction eIF4E n'ont pas modifié l'induction de l'activité MTT par le Cd, mais ETP-46464 a significativement diminué la phosphorylation de eIF4E par le Cd. Par contre, les niveaux d'expression de eIF4E variaient d'une condition à l'autre et aucune activation de ERK1/2 par le Cd n'a été obtenue dans cette dernière étude, nous empêchant de conclure sur l'effet ultime du Cd sur l'activation de eIF4E via ERK1/2. Les résultats indiquent toutefois qu'un déséquilibre rédox module l'activité MTT induite par le Cd et le Zn, même si le Zn n'active pas ERK1/2.

Mots clés : stress oxydatif, caco-2, voies de signalisation, cadmium, zinc





## CHAPITRE I : INTRODUCTION

### 1.1 Mise en contexte

La problématique abordée dans ce document découle d'un résultat préalablement obtenu par Mantha et Jumarie (2010). Ils ont observé un effet d'hormèse sur l'activité de la déshydrogénase mitochondriale ou «activité MTT» des cellules Caco-2 différenciées exposées pendant 24 heures à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  de Cd, mais ce qui était particulièrement intéressant était que l'effet d'hormèse ne variait pas seulement selon la concentration, mais aussi en fonction des niveaux de différenciation cellulaire. À chaque tranche de sept jours, les cellules atteignaient un stade de maturité supérieur et l'induction de l'activité MTT par le Cd augmentait, le plus haut niveau de stimulation a été observé au 21<sup>e</sup> jour de culture (Figure 1.1). Un effet d'hormèse semblable induit par le Cd avait déjà été observé dans d'autres lignées cellulaires (Hao *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009), mais aucune étude n'avait rapporté un effet d'hormèse variant avec l'état de différenciation cellulaire. L'activité MTT est habituellement utilisée pour mesurer la viabilité et la prolifération cellulaire (Vega-Avila et Pugsley, 2001), mais l'étude de Mantha et Jumarie (2010) a montré que l'augmentation de cette activité n'est pas corrélée à de la synthèse d'ADN, mesurée par l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine qui diminuait lorsque les concentrations de Cd augmentaient (figure 1.2). Des divergences similaires entre l'activité MTT et la prolifération avaient été observées par Hamel *et al.*, (2008) en étudiant les effets de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité dans des ostéoblastes. Donc, une augmentation de l'activité MTT ne représente pas nécessairement de la prolifération cellulaire et doit être interprétée avec prudence. De l'étude de Mantha et Jumarie (2010) découlait de nombreux résultats, dont celui très intéressant de l'activation de la *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) par le Cd dans les cellules différenciées, car cette kinase n'est normalement pas active à ce niveau de différenciation cellulaire (Aliaga *et al.*, 1999). Cela rehausse l'intérêt d'étudier cette

activation de ERK1/2 par le Cd. Ce sont, entre autres, les conséquences de cette activation qui seront étudiées dans le cadre de ce mémoire.

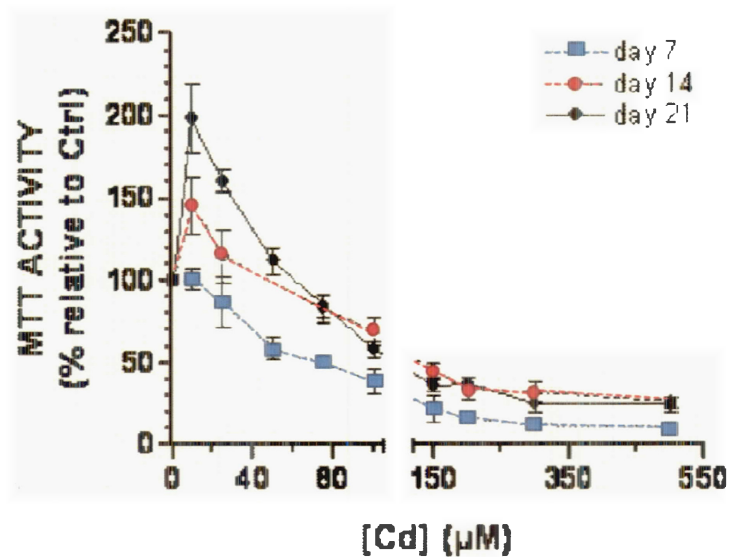


Figure 1.1 : Variation de l'activité MTT en fonction de concentrations de Cd dans des cellules Caco-2 au jour 7, 14 ou 21 à la suite d'une exposition de 24 heures (figure tirée de Mantha et Jumarie 2010)

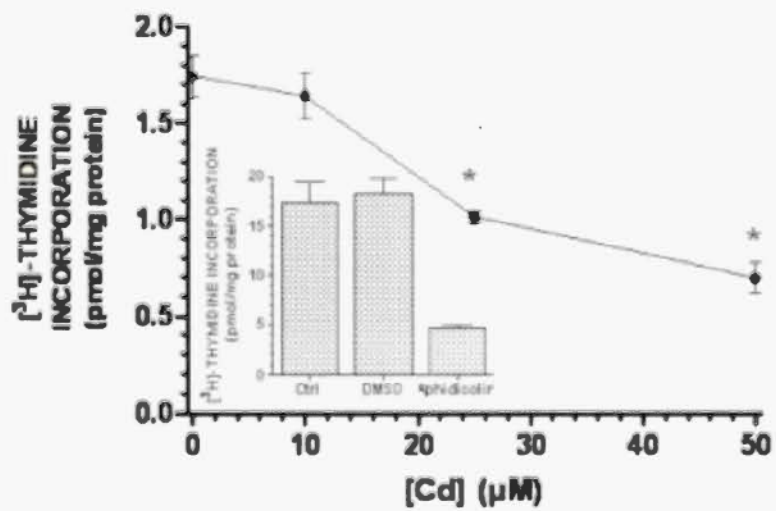


Figure 1.2 : Incorporation du  $[^3\text{H}]$ -thymidine dans des cellules Caco-2 au jour 21 à la suite d'une exposition de 24 heures à des concentrations croissantes (0 à 50  $\mu\text{M}$ ) de Cd (figure tirée de Mantha et Jumarie 2010)

## 1.2 Le Cadmium

### 1.2.1 Propriétés physico-chimiques

Le Cd occupe le numéro 48 dans le tableau périodique et possède une masse atomique de 112,4u. Avec une densité de  $8,6 \text{ g/cm}^3$ , il possède une forme cristalline hexagonale d'apparence blanc-argenté et malléable (Weast, 1986). La spéciation du Cd dans son milieu affecte sa biodisponibilité, car selon le type d'espèce chimique le métal va emprunter différentes voies de transport cellulaire (Fortin et Campbell, 2000). La spéciation des métaux dépend de nombreux facteurs présents dans leur environnement, par exemple le pH, la présence de matière organique et elle dépend aussi de leur l'affinité pour les ligands se trouvant à proximité. La forme cationique du Cd ( $\text{Cd}^{2+}$ ) existe rarement librement, car elle peut se combiner à beaucoup de ligands endogènes. Une fois lié à ces ligands, le phénomène de mimétisme moléculaire peut se présenter, ce qui signifie que ce complexe peut imiter de façon incomplète un substrat endogène et tromper les mécanismes métaboliques (Clarkson, 1993). Par exemple, une étude a proposé que le  $\text{Cd}^{2+}$  pouvait former un complexe avec le chlorure ou le bicarbonate et cela lui permet d'emprunter l'échangeur d'anions des érythrocytes humains sous la forme des complexes  $[\text{Cd}(\text{OH})(\text{HCO}_3)_2]^-$  ou  $[\text{Cd}(\text{OH})(\text{HCO}_3)\text{Cl}]^-$ . La liaison du Cd au chlorure imiterait les anions monovalents normalement transportés sur l'échangeur d'anions (Lou *et al.*, 1991). C'est un exemple de comment la spéciation du Cd peut moduler son mode de toxicité.

### 1.2.2 Sources de Cd dans l'environnement

#### 1.2.2.1 Naturelles

Le Cd se retrouve dans la croûte terrestre, souvent en présence de zinc (Zn) ou de plomb (Pb), à l'intérieur de gisements de minéraux sulfureux (Nordberg *et al.* 2015). Il peut se retrouver naturellement dans l'environnement, entre autres par l'intermédiaire

d'activités volcaniques, par des feux de forêt et il peut se retrouver dans les rivières suite à l'érosion du sol (Hassanien et El Shahawy, 2011).

#### 1.2.2.2 Anthropiques

Il existe de nombreux usages industriels du Cd, entre autres pour sa capacité à protéger les produits ferreux contre l'oxydation. Il est très utilisé dans les fonderies comme enduit pour produire de l'acier galvanisé et dans certains pays il est encore ajouté à certains pigments de couleur pour la production de peintures (Nordberg *et al*, 2015). Le Cd est fortement utilisé dans le domaine de l'énergie, il entre dans la fabrication de batteries Ni-Cd et son utilisation va en augmentant dans la fabrication des panneaux solaires (Hodes, 2013). Toute cette activité industrielle fait qu'il y a un relâchement de Cd sous forme de particules fines dans l'atmosphère qui se déposent par la suite dans les cours d'eau et les sols. Le Cd est également utilisé en industrie agroalimentaire puisqu'on le retrouve dans la composition de certains pesticides et fertilisants (Jarup *et al*, 1998). Il y a également du Cd dans les boues résultant du traitement des eaux usées qui servent dans plusieurs régions du monde, dont le Québec, à fertiliser les champs de culture.

#### 1.2.3 Voies d'exposition

Nous nous retrouvons exposés au Cd le plus fréquemment par deux voies: pulmonaire et orale. L'exposition pulmonaire concerne majoritairement deux groupes de la population. Les travailleurs et travailleuses des industries utilisant ce métal peuvent inhaler une grande quantité de particules de Cd et cela peut mener à de graves problèmes de santé tels que des dommages sévères aux tubules rénaux parfois irréversibles (Jarup *et al*, 1993; Roels *et al*, 1997). Le deuxième groupe est constitué

des personnes qui fument des cigarettes car, comme beaucoup de plantes, les plants de tabac accumulent du Cd dans leurs feuilles. De plus, la quantité de Cd biodisponible suite à l'inhalation (10 à 50%) est supérieure à la biodisponibilité orale (4 à 10%), cela explique, entre autres, la gravité des symptômes chez les personnes exposées sur leur lieu de travail (Nordberg *et al*, 2015). Pour le reste de la population, l'exposition au Cd se fait principalement par l'alimentation puisque les plantes et les produits maraîchers peuvent absorber des quantités non négligeables de Cd (voir tableau 1) par la contamination des sols cultivés suite au dépôt de particules contenues dans l'atmosphère ou encore par l'utilisation de fertilisants (WHO, 1992). Notre alimentation contribue donc à notre apport quotidien de Cd, mais la contribution des groupes d'aliments varie comme on peut le constater selon des données recueillies en 2009 par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) (figure 1.3). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a d'ailleurs fixé en 2003 la dose journalière tolérable à  $1\mu\text{g/kg}$  de poids corporel. Une étude menée par Cui *et al.* (2004) a rapporté des taux élevés, entre 0,15 et 0,24 mg/kg de Cd dans les légumes cultivés dans la province de Guangxi, en Chine, une région à ce point contaminée par la présence d'une fonderie que les cultures de riz sont devenues impropres à la consommation.

Tableau 1.1 : Sources de nourriture avec les 10 plus grandes concentrations moyennes de cadmium retrouvées dans l'étude menée par la FDA pour la période de janvier 2006 jusqu'à avril 2008. Source : Données compilées à partir de FDA (2010).

Type de nourriture	Quantité moyenne de Cd (mg/kg)
Graines de tournesol	0,412
Épinards (fraîche/congelé, bouillis)	0,124
Feuilles de laitues crues	0,064
Croustilles de pommes de terre	0,057
Arachides, séché et salé	0,054
Laitue iceberg crue	0,051
Céréales de blé	0,050
Céleri cru	0,040

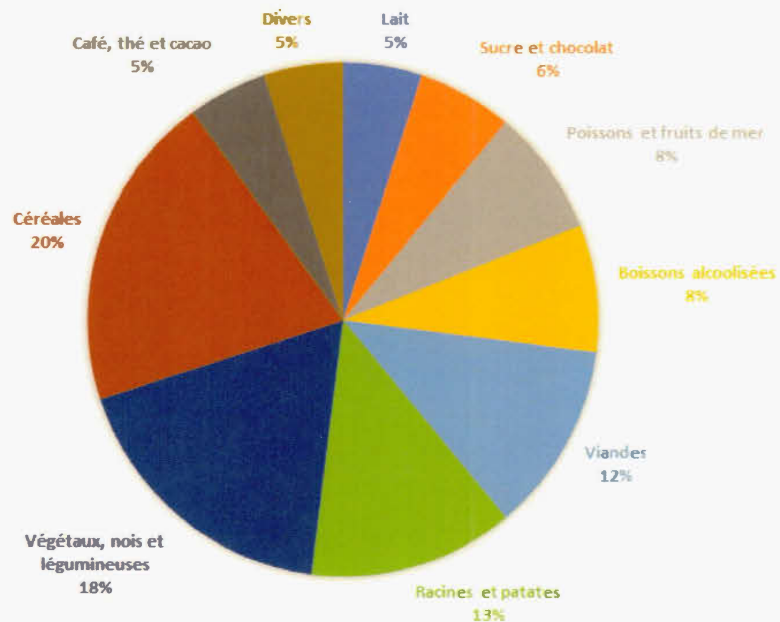


Figure 1.3 : Contribution relative des différentes sources alimentaires à la dose journalière de Cd. (Source : données compilées à partir de EFSA 2009)

### 1.3 Effets et mécanismes généraux de toxicité du Cd

#### 1.3.1.1 Effets sur la santé humaine

Il est plutôt rare de souffrir d'un empoisonnement aigu au Cd, l'ingestion d'une forte quantité menant à des symptômes d'éjection (ex : vomissements, diarrhées, etc...) assez violents et soudains, additionnés au taux d'absorption lent du Cd, ce qui résulte en une guérison rapide et de faibles taux de mortalité (Nordberg *et al*, 2015). L'empoisonnement sous forme chronique est davantage répandu, le plus célèbre de l'Histoire étant assurément celui arrivé au Japon dans les années 1950, causé par la



consommation de riz contaminé au Cd provenant des déchets d'une mine de Zn en bordure de la rivière Jinzu dans la préfecture de Toyama. L'empoisonnement aigu au Cd, ou la maladie Itai-Itai, cause, entre autres, un dysfonctionnement rénal causé par des dommages tubulaires et glomérulaires, des dommages osseux provenant d'ostéoporose et d'ostéomalacie et d'intenses douleurs (Ogawa *et al*, 2004).

### 1.3.1.2 Effets carcinogènes du Cd

Le Cd est reconnu par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme un agent carcinogène du groupe 1 chez l'humain, car il induit indirectement des effets génotoxiques par la production de stress oxydatif (Skipper *et al*, 2016). Certains composés du Cd peuvent être considérés co-mutagènes dans les cellules de mammifères lorsqu'ils sont combinés à des agents génotoxiques en ce sens qu'ils inhibent les mécanismes de réparation de l'ADN. Les travaux de Dally et Hartwig (1997) ont démontré que de petites concentrations de Cd (0,5-10  $\mu\text{M}$ ) peuvent inhiber le mécanisme de réparation par excision de bases qui intervient normalement pour remédier aux dommages oxydatifs au génome dans des cellules HeLa.

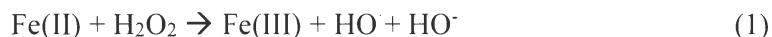
La perturbation de l'expression génétique induite par le Cd est aussi considérée comme un facteur majeur de sa carcinogénicité. Les *immediate early response genes* (IEGs) sont des proto-oncogènes dont la surexpression peut contribuer au développement de cancers (Buechner *et al*, 2011). Les IEGs participent à la prolifération et à la différenciation cellulaires et sont souvent surexprimés dans les tumeurs. Une surexpression de ces gènes, surtout *c-fos* et *c-jun*, en présence de Cd a été observée dans beaucoup de modèles *in vitro* différents, incluant la lignée de cellules épithéliales de prostate humaine RWPE-1 (Achanzar *et al*, 2000) et les cellules fibroblastes embryonnaires murines BALB/c-3T3 (Joseph *et al*, 2001). Malgré les légères



différences relatives aux lignées cellulaires, cette surexpression de IEGs induite par le Cd est généralement observée à de faibles concentrations, de l'ordre du micromolaire, et très rapidement, aussitôt que 15 à 30 minutes suite à l'exposition (Ding et Templeton, 2000). Une autre forme de perturbation de l'expression génétique par le Cd consiste à modifier les niveaux de nombreux facteurs régulant les différentes étapes de la synthèse protéique. Les travaux de Joseph *et al* (2002a,b) ont démontré la surexpression de deux de ces facteurs, le facteur d'initiation 3 (TIF3) et le facteur d'élongation-1 $\delta$  (TEF-1 $\delta$ ) dans les cellules BALB/c-3T3 exposées au CdCl<sub>2</sub>. Lorsqu'ils surexpriment ces gènes par transfection dans des cellules de mammifère de la lignée NIH3T3 injectées chez des souris, cela a abouti à leur transformation et une tumorigenèse, illustrant bien le potentiel oncogénique de TIF3 et TEF-1 $\delta$ . Ces résultats démontrent le pouvoir carcinogène du Cd et comment il peut être, en partie, médié par la surexpression de facteurs de traduction.

### 1.3.2 Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydatif

Le stress oxydatif est le résultat d'une perturbation de l'équilibre rédox cellulaire qui a été largement étudié dans une variété d'organismes du règne vivant. L'équilibre rédox peut être déstabilisé dès que la balance entre la génération d'espèces réactives et d'ions, ceux contenant de l'oxygène étant regroupés sous l'appellation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et la disponibilité en antioxydants servant à les neutraliser est perturbée (Dziubla et Butterfield, 2016). Lorsque la défense antioxydante est dépassée, on peut observer du stress oxydatif. La génération de ERO peut, entre autres, provenir de la réaction de Fenton qui consiste en l'oxydation du fer <sup>2+</sup> (Fe(II)) par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour donner du fer <sup>3+</sup> (Fe(III)) et le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) selon l'équation suivante :



S'ils possèdent 2 états d'oxydation, d'autres métaux peuvent remplacer le fer dans cette équation, comme le cuivre et faire des réactions de «type de Fenton» (Sigel et Sigel, 1999). La production de ERO se produit à plusieurs endroits de l'environnement cellulaire, mais une des organelles générant beaucoup de ERO est la mitochondrie. Elle est le centre de production de la source d'énergie cellulaire, l'adénosine triphosphate (ATP), qui est produite par l'action réductrice du cytochrome-c-oxydase (COX) sur l'oxygène (Nohl, 1990). Mais cette réduction mène à la formation d'anions superoxyde ( $O_2^-$ ), un ERO pouvant provoquer un stress s'il n'est pas rapidement pris en charge. C'est le rôle de la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la réaction suivante :



La SOD permet ainsi de diminuer l'effet de l'anion superoxyde et de protéger la cellule contre ce type de ERO. Une autre enzyme bien connue dans la protection cellulaire contre le déséquilibre rédox est la catalase (CAT). Elle est principalement localisée dans le peroxysome et possède une action complémentaire à la SOD puisqu'elle dismute le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène selon l'équation suivante (Grune, 2005):



Le Cd est connu pour causer du dommage au matériel génétique par la production de stress oxydatif. Cependant, le Cd ne génère pas d'ERO directement, entre autres parce qu'il ne peut pas catalyser de réactions de Fenton car le  $Cd^{2+}$  ne peut accepter ou donner d'électron dans des conditions physiologiques (Waisberg *et al*, 2003). Par contre, le Cd peut favoriser ce type de réaction car il peut augmenter la concentration de  $Fe^{2+}$  libre, possiblement en le remplaçant dans certaines protéines comme les protéines de la chaîne respiratoire des mitochondries (Dorta *et al*, 2003). Il peut aussi prendre la place du Fe dans la ferritine, la protéine présente dans la muqueuse intestinale et responsable de l'absorption et de la distribution du  $Fe^{2+}$  (Peraza *et al*, 1998). Cependant, le Cd agit plutôt de manière indirecte, par exemple en perturbant l'équilibre intracellulaire entre

pro- et antioxydants. Il possède une grande affinité pour les groupements thiols, dont celui d'un des antioxydants les plus importants de la cellule et présent en abondance: le glutathion (GSH). Lorsqu'il y a épuisement de la réserve de GSH causé par sa mobilisation par le Cd et le déséquilibre rédox, le métal peut se lier aux thiols de protéines fonctionnelles (Lopez *et al.*, 2006). Par exemple, Dorta *et al.* (2003) ont proposé que le Cd pourrait se lier aux thiols contenus dans la membrane mitochondriale, affectant sa perméabilité et inhibant la chaîne de transport des électrons, ce qui entraîne la production d'ERO. L'effet du Cd sur le transfert d'électrons mitochondriaux est la source majeure de ERO générées par le Cd et non seulement dans les cellules mammaliennes, mais aussi chez les plantes (Heyno *et al.*, 2008).

## 1.4 L'épithélium intestinal

### 1.4.1 Structures

L'intestin grêle est un organe très complexe et il est parfaitement efficace pour effectuer sa fonction vitale: l'absorption des nutriments à partir de notre alimentation. Sa paroi est divisée en trois types structuraux: la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculuse et le tout est recouvert de la séreuse constituée par le péritoine viscéral (figure 1.4). Les couches de la muqueuse et de la sous-muqueuse sont elles-mêmes subdivisées en trois modifications structurales: les plis circulaires, les villosités intestinales et les microvillosités (figure 1.5). La première structure permet de ralentir le mouvement du bol alimentaire afin d'obtenir une absorption optimale des nutriments. Les villosités intestinales tapissent les plis circulaires et les cellules épithéliales qui recouvrent les villosités ont pour principale fonction de transporter les nutriments vers le réseau dense de capillaires sanguins et lymphatiques nichés au cœur de chaque villosité. Les microvillosités, de minuscules protubérances formées par la membrane plasmique des cellules épithéliales, constituent une structure que l'on nomme aussi bordure en brosse qui possède des transporteurs et des hydrolases qui effectuent la digestion finale des glucides et des protéines (Marieb, 2005). L'épithélium intestinal est celui qui possède le taux de renouvellement le plus rapide: il est renouvelé en totalité tous les 4-5 jours. Ce renouvellement commence dans le fond des cryptes intestinales où se trouvent les cellules souches prolifératives qui se différencieront en remontant le long de la crypte vers le sommet en trois catégories de cellules: les cellules absorbantes (entérocytes), les cellules sécrétrices du mucus (caliciformes) et les cellules produisant les hormones gastro-intestinales (entéro-endocrine). Un quatrième phénotype, celui des cellules sécrétrices de peptides antimicrobiens (cellules de Paneth) font exception au mouvement des autres types de cellules et se différencient dans la crypte (Traber, 1994).

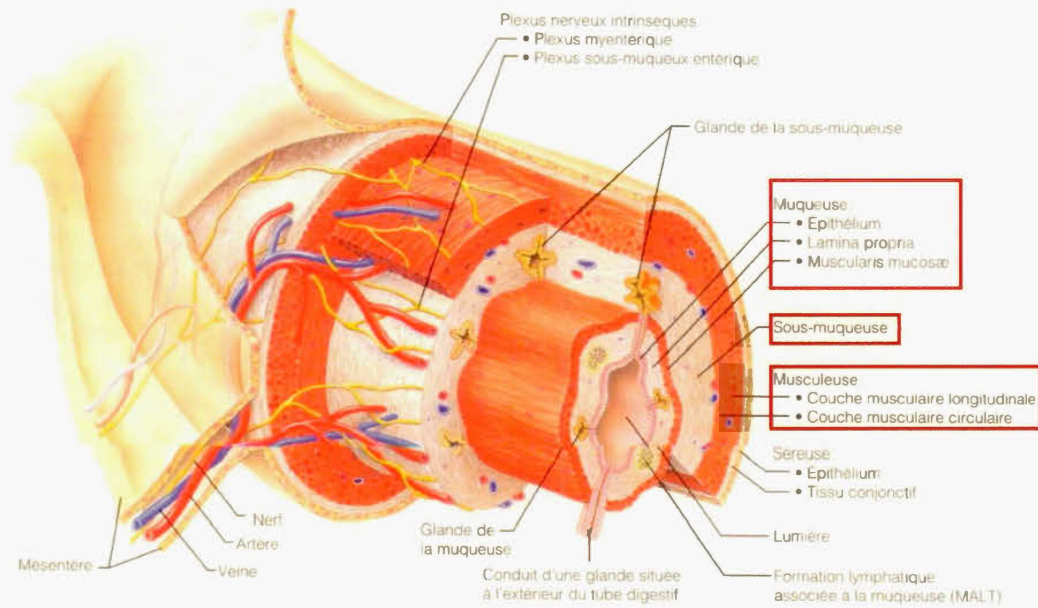
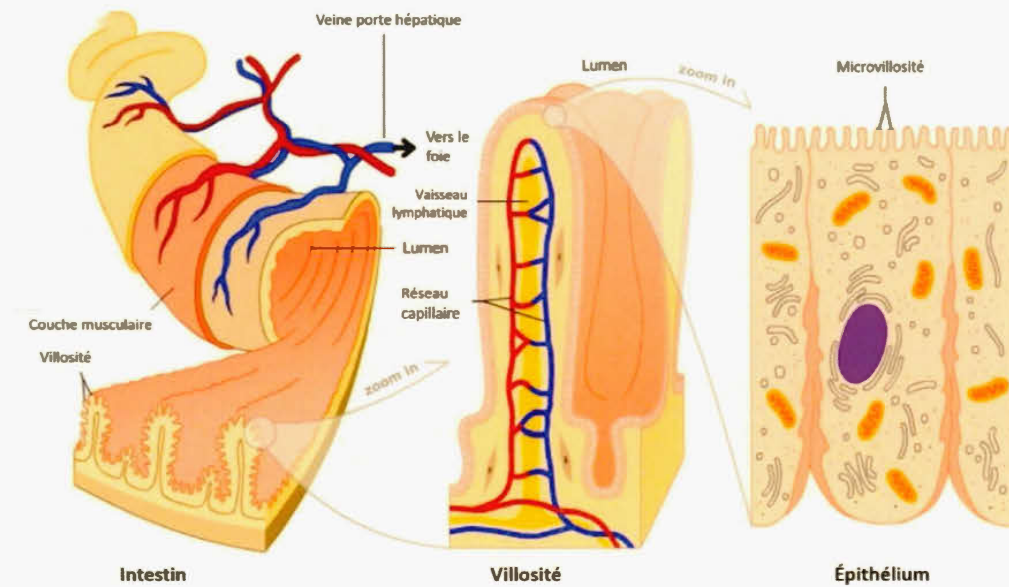


Figure 1.4 : Schématisation des structures fondamentales du tube digestif (figure tirée de Marieb, 2005)



© 2007-2011 The University of Waikato | <https://anatomydiagramclass.com/>

Figure 1.5 : Schématisation des structures modifiées de l'intestin afin d'accroître sa surface d'absorption (figure tirée de Marieb, 2005)



#### 1.4.2 Contrôle du renouvellement de l'épithélium intestinal

Dans l'épithélium intestinal, il y a une succession constante et rapide de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales. Le processus de différenciation entérocytaire a longuement été étudié, incluant les caractéristiques fonctionnelles de la muqueuse et le temps de maturation des cellules entérocytaires (Gordon et Hermiston, 1994; Pageot *et al*, 2000; Cheng et Bjerknes, 1985). Le cycle prolifération-différenciation est régulé, entre autres, par certains membres de la famille des MAP kinases dont ERK1/2 et p38. Il a été démontré que lorsque l'activité de ERK1/2 dans les cellules intestinales humaines était élevée, cela promeut la progression du cycle cellulaire et qu'inversement une diminution de son activité est corrélée avec un arrêt du cycle en phase G1 ce qui favorise le processus de différenciation (Aliaga *et al*, 1999). La protéine ERK1/2 est donc active dans la région inférieure de la crypte intestinale, là où se retrouvent les cellules prolifératives indifférenciées (figure 1.6)

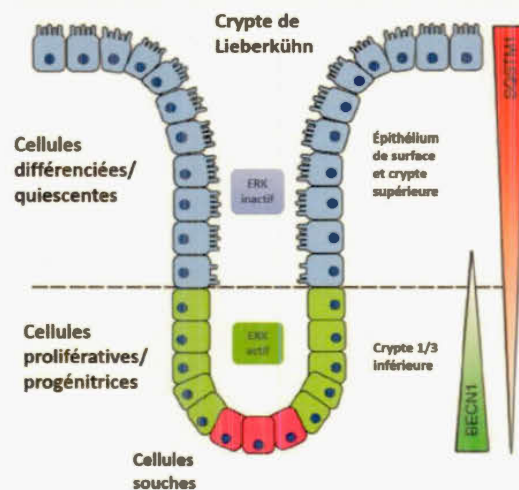


Figure 1.6 : Schématisation de la crypte de Lieberkühn et de l'activité de ERK en fonction de l'état de différenciation cellulaire (figure tirée de Groulx *et al*, 2012)

La protéine p38 régule plutôt négativement la prolifération cellulaire et est plus active dans les cellules différenciées. La kinase p38 influence différents mécanismes de

régulation du cycle cellulaire. Par exemple, elle peut inhiber la progression dans le cycle en stimulant l'activité d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes et la kinase p38 module l'activité du gène suppresseur de tumeur p53 en le phosphorylant, ce qui active un point de contrôle en phase G2/M dépendant de p53 (Ambrosino et Nebreda, 2001; Thornton et Rincon, 2009). La kinase p38 peut également déclencher des voies géniques notamment en activant les gènes de type «boîte homéotique» CDX1-2 qui sont nécessaires au développement de l'intestin et codent aussi pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation entérocytaires (Suh et Traber, 1996).

#### 1.4.3 Transport intestinal du Cd

Pour que le Cd puisse exercer ses effets toxiques sur l'organisme, il doit être absorbé et atteindre la circulation sanguine. Il y a deux voies de transport possible pour traverser l'épithélium: la voie transcellulaire et paracellulaire. Selon le substrat, c'est l'une ou l'autre, mais il est également possible que les deux voies soient utilisées simultanément. Le transport paracellulaire consiste en la simple diffusion des substances dans l'espace entre les jonctions serrées, donc entre deux cellules et non au travers de l'espace intracellulaire, comme le transport transcellulaire (Pade et Stavchansky, 1997). La voie transcellulaire rassemble les transports médié actif et passif, dépendamment de la nature de la substance et du transporteur impliqué. Cette voie n'exclut pas la diffusion passive dépendamment de la perméabilité membrane face à un composé donné et une autre caractéristique de cette voie est que les transporteurs peuvent être saturés. Dans le cas du Cd, une étude menée au laboratoire a révélé que l'implication de la voie paracellulaire au transport transépithélial de Cd mesuré sur monocouches de cellules intestinales Caco-2 est négligeable, ce qui suggère que le Cd ne passerait pas par des jonctions serrées saines. C'est donc la voie transcellulaire qui

primerait pour le transport intestinal de Cd (Jumarie *et al*, 1999). L'absorption du Cd par l'épithélium intestinal est effectuée en deux phases de vitesses différentes: la liaison du Cd aux transporteurs de la membrane plasmique est rapide, alors que le transport intracellulaire est plutôt lent (Jumarie *et al*, 1997). Ce transport membranaire peut mener à l'accumulation intracellulaire de Cd, entre autres par la liaison à la métallothionéine (MT), puisque les travaux de Blais *et al*. (1999) ont démontré que la quantité de MT synthétisée et mobilisée dans la cellule était corrélée avec le niveau d'accumulation de Cd. Le laboratoire du Dr Jumarie a également montré que le Cd est beaucoup transporté par le côté apical de la monocouche cellulaire de l'épithélium intestinal, mais qu'il ressort très peu par le côté basolatéral (figure 1.7). Donc ces travaux ont montré une grande capacité d'accumulation du Cd dans les entérocytes, possiblement suite à la liaison aux protéines et organelles intracellulaires (Jumarie *et al*, 1997; Jumarie *et al*, 1999). Cela explique la faible biodisponibilité orale du Cd variant entre 4% et 10% (Aziz *et al*, 2015; Reeves et Chaney, 2004; WHO, 1992). Du fait de cette tendance à accumuler le Cd sans le relarguer dans la circulation sanguine, l'épithélium intestinal offre une protection considérable à l'organisme contre les effets toxiques de ce métal, mais devient ainsi un tissu cible de cette même toxicité.

#### 1.4.4 Modèle cellulaire

Lorsque le Cd est absorbé oralement, l'épithélium intestinal est la première barrière à lui faire obstacle. Pour étudier les conséquences de l'accumulation de Cd dans l'entérocyte, il est important d'utiliser un modèle qui reproduit le plus fidèlement possible ce qui se produirait dans l'organe ciblé. La lignée cellulaire Caco-2, constituée de cellules intestinales immortelles provenant d'un adénocarcinome colorectal, est un modèle *in vitro* fréquemment utilisé pour étudier les mécanismes de transports intestinaux ou encore les effets et interactions de nombreux xénobiotiques. Une fois la



confluence atteinte, normalement autour de sept jours suite à une densité d'ensemencement de l'ordre de  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ , la différenciation débute et les cellules forment une monocouche polarisée avec des jonctions serrées et expriment les nombreuses caractéristiques morphologiques et biochimiques d'entérocytes matures: bordure en brosse, hydrolases et transporteurs d'hexoses, comportant GLUT-5 et le cotransporteur  $\text{Na}^+$ -glucose SGLT1 (Pinto *et al*, 1983; Rousset *et al*, 1985; Mahraoui *et al*, 1992; Bissonnette *et al*, 1996). Comme pour beaucoup de processus biologiques, une grande variété d'hormones prend part à la différenciation entérocytaire. L'hydrocortisone et la thyroxine sont d'importantes hormones dans les étapes précoces du développement de l'épithélium intestinal et leur mode d'action est bien documenté dans la littérature (Deren, 1968; Henning et Kretchmer, 1973; Moog, 1981). L'influence de l'insuline a également été démontrée (Moog et Goellner, 1982), mais ces hormones peuvent également interagir entre elles, comme dans le cas de l'action synergique observée entre l'insuline et la thyroxine rapportée par Malo et Ménard (1983). Après deux semaines post confluence, donc 21 jours de culture, la différenciation des cellules Caco-2 est considérable (Jumarie et Malo, 1991). Bien qu'au-delà de 3 semaines, la différenciation devienne plus homogène entre les cellules d'une même culture (Vachon et Beaulieu, 1992) le niveau de différenciation atteint au 21<sup>e</sup> jour est suffisant pour nos travaux.

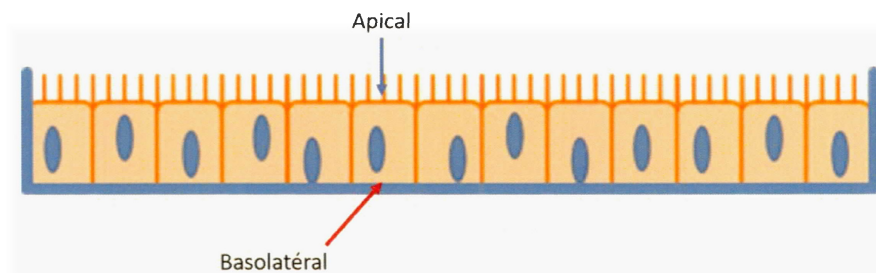


Figure 1.7 : Schématisation d'une monocouche de cellules entérocytaires et localisation des pôles apical et basolatéral.

## 1.5 La voie de signalisation des MAP kinases

### 1.5.1 Rôle de la voie des MAP kinases

La famille des MAPK comprend de nombreux membres, dont c-JUN N-terminal kinase (JNK), p38 et ERK1/2. Cette voie a été conservée au fil de l'évolution dans toutes les cellules eucaryotes et permet à ces dernières de répondre aux changements des propriétés physiques ou chimiques de leur environnement, comme des stimuli mitogéniques en réponse à certains stress (Cuenda *et al*, 2017). La réponse adéquate au stimulus, et au dénouement de la cascade de kinases, est exprimée par l'altération de diverses fonctions cellulaires, par exemple la différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose ou encore l'interaction avec d'autres cellules. Chaque cascade possède des modules de signalisation comprenant toujours un membre des trois familles de kinases suivantes: une MAPK kinase kinase (MKKK), une MAPK kinase et une MAPK. D'abord, la MKKK est activée en réponse à un stimulus, ce qui entraîne la phosphorylation d'une MKK par celle-ci. Ensuite, selon la spécificité de l'interaction entre une région N-terminale de la MKK et un site de liaison situé sur la MAPK, cette dernière est activée par phosphorylation par la MKK active (Cuenda et Rousseau, 2007) (figure 1.8). Une fois activées, les MAP kinases peuvent réguler l'expression génique par la phosphorylation de facteurs de transcription en aval. Par exemple, JNK phosphoryle et active le domaine de transactivation c-JUN N-terminal du complexe AP-1, un activateur de la transcription de nombreuses cibles, comme p53 (Hibi *et al*, 1993; Angel *et al*, 2001).

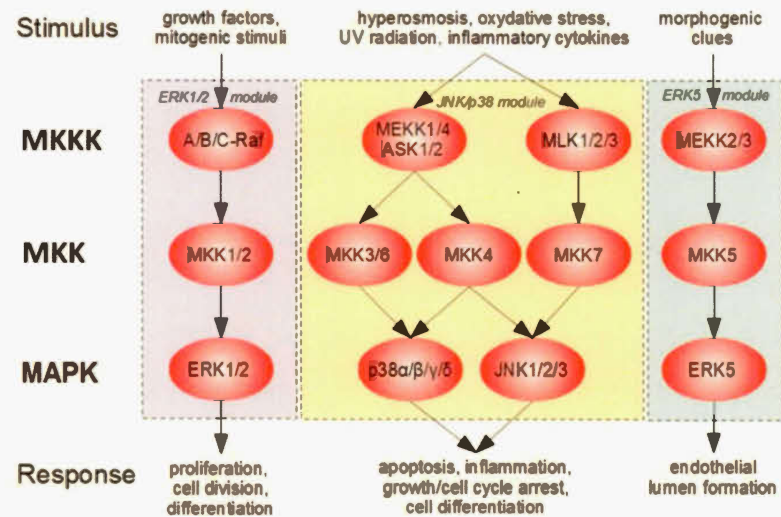


Figure 1.8 : Voie de signalisation simplifiée des MAPK chez les mammifères (figure inspirée des figures 2, 7 et 8 de Cargnello et Roux, 2011)

### 1.5.2 Activation de ERK1/2 par le Cd

L'activation de ERK1/2 par le Cd a été observée à de nombreuses reprises et dans de nombreux types de lignées cellulaires d'espèces variées (Elbirt *et al*, 1998; Wang et Templeton, 1998; Galan *et al*, 2000). Une étude a montré une modulation de l'activité de ERK1/2 en fonction des concentrations de Cd, l'activité diminuant en présence de faibles concentrations et inversement. L'ajout de l'inhibiteur PD98059 de la MKK1/2, la kinase en amont de ERK1/2, suggérait que MKK1/2 contribuait grandement à la survie des cellules en présence de Cd, puisqu'il y avait une importante diminution de la viabilité des cellules CL3 exposées à 80  $\mu$ M de Cd (Chuang *et al*, 2000). Cette kinase est également bien connue pour son implication dans la prolifération cellulaire. Une étude a montré dans les cellules de carcinome épidermoïde œsophagique (ESCC) qu'une exposition aiguë au Cd active ERK1/2 et induit l'inhibition de kinases cycline-dépendantes par p21<sup>Clp1</sup>. Les auteurs de cette même étude ont montré qu'inhiber

ERK1/2 avait eu pour effet d'augmenter le taux d'apoptose induit par le Cd, suggérant que la kinase possède un rôle protecteur et aide à la survie cellulaire en présence du métal (Thévénod, 2009; Weiss, 2003). Par contre, certaines études arrivent à des conclusions radicalement contraires. Les travaux de Martin *et al.* (2006) ont montré que l'activation de ERK1/2 peut être maintenue lorsque des cellules embryonnaires rénales humaines HEK293 sont exposées chroniquement à de faibles concentrations de Cd et que ceci est corrélé avec l'activation des caspases 8 et 3 et l'induction de l'apoptose. Il semblerait donc que les effets d'une exposition chronique sur l'activité de ERK1/2 aient des répercussions différentes de celles générées par une exposition aiguë au Cd. Une autre étude a suggéré que la voie de signalisation de ERK1/2 pourrait moduler l'apoptose induite par une exposition aiguë au Cd dans des lymphoblastes humains. En effet, la suppression de l'activation de ERK1/2 par l'inhibiteur de MEK U0126 était alors corrélée à une diminution du taux d'apoptose (Iryo *et al.*, 2000).

Comme il a été mentionné dans le chapitre II, normalement les cellules épithéliales atteignent leur quiescence dans la partie supérieure de la crypte intestinale suite à l'inactivation de la voie comprenant ERK1/2. Cependant, les travaux de Mantha et Jumarie (2010) ont montré qu'une petite concentration non létale (10  $\mu$ M) de Cd dans des cellules intestinales Caco-2 matures pouvait réactiver ERK1/2. Cette perturbation, induite par le Cd, d'une voie de signalisation importante et qui influe sur le renouvellement de l'épithélium intestinal est très intéressante à étudier, car elle pourrait avoir de graves répercussions sur l'équilibre entre prolifération et différenciation entérocytaire. L'activation de ERK1/2 par le Cd et ses conséquences sur l'activité transcriptionnelle de la cellule seront étudiés dans ce mémoire.

### 1.5.3 Lien entre ERK1/2 et eiF4E

Le facteur de traduction eiF4E joue un rôle important dans l'initiation de la traduction des ARNm et il est également impliqué dans le processus d'exportation des ARNm du noyau vers le cytoplasme (Goodfellow et Roberts, 2008). Il existe plusieurs voies de signalisation pouvant affecter l'activité de eiF4E. La famille de protéines liant eiF4E (4EBP) a pour fonction d'inhiber la traduction coiffe-dépendante en se liant à eiF4E et ainsi empêcher son interaction avec eiF4G (Lin *et al*, 1994). Aussi, ERK1/2 peut déclencher plusieurs cascades qui auront pour effet de stimuler la phosphorylation du facteur (figure 3.2). Une des premières cascades est plutôt directe: ERK1/2 peut phosphoryler Mnk1/2 qui à son tour phosphoryle eiF4E, ce qui initie la traduction (Hou *et al*, 2012). Également, ERK1/2 peut déclencher d'autres cascades plus complexes, soulevant une inhibition plutôt que d'activer par phosphorylation. Normalement, le complexe TSC2 exerce une régulation négative sur mTOR, ce qui entraîne la complexation du facteur 4EBP avec eiF4E, entraînant l'inactivation de eiF4E. ERK1/2 peut par contre, en inhibant le complexe TSC2, lever cette cascade de régulation négative et permettre l'activation de eiF4E. ERK1/2 peut aussi phosphoryler RSK90 qui peut avoir le même effet que ERK1/2 sur le complexe TSC2 et mener aussi à l'activation de eiF4E (Fruman et Rommel, 2014).

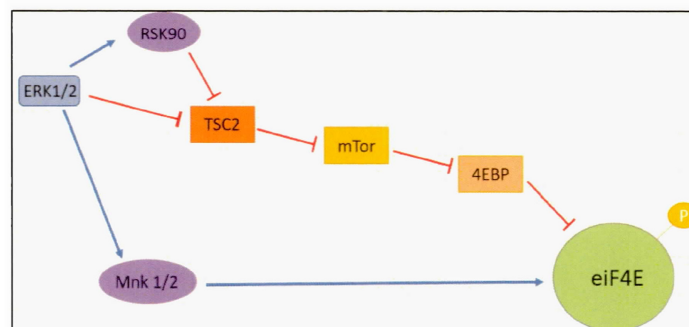


Figure 1.9 : Schématisation simplifiée des différentes voies de signalisation de l'activation de eiF4E par ERK1/2 (figure inspirée de la figure 2 de Fruman et Rommel, 2014)



## 1.6 Le Zinc

### 1.6.1 Propriétés physico-chimiques

Le Zn occupe le numéro 30 dans le tableau périodique et possède une masse atomique de 65,38. Avec une densité de  $7,13 \text{ g/cm}^3$ , il possède une forme cristalline hexagonale d'apparence blanc-argenté et malléable (Choudhury *et al*, 2005).

### 1.6.2 Importance biologique du Zn

Le Zn, contrairement au Cd, est un métal essentiel et il possède, à notre connaissance actuelle, une fonction biologique dans tous les organismes vivants. Il est estimé qu'environ 10% des protéines humaines ont le potentiel de se lier au Zn. Par exemple, il entre dans la composition de motifs en doigt de zinc que l'on retrouve dans beaucoup de protéines chez les mammifères (Iwasa et Marshall, 2016). Il est aussi essentiel pour l'activité catalytique de plus de 200 enzymes (Sansted, 1994; McCarthy *et al*, 1992). Par exemple, la carboxypeptidase a pour fonction de cliver les liens peptidiques durant la digestion des protéines. Comme un lien covalent est formé entre le peptide et le groupe C=O rattaché au Zn, cela confère au carbone une charge positive et aide à former une zone hydrophobe sur la partie de l'enzyme contenant le Zn. Cette région permet d'attirer la partie non polaire de la protéine en voie de digestion (Zundahl, 1998).

### 1.6.3 Le Zn et le stress oxydatif

Le Zn est un métal rédox neutre et peut facilement se lier à un vaste catalogue de protéines. Pourtant, il fait de plus en plus l'objet d'un débat quant à sa nature oxydante. L'ion  $Zn^{2+}$  possède la capacité d'interagir avec les groupements thiols. C'est cette capacité qui suscite le questionnement sur son potentiel toxique, puisque s'il peut lier les thiols il a donc aussi la possibilité de perturber l'équilibre rédox régulé par l'homéostasie des thiols et d'induire ainsi un stress oxydatif (Sauer et Thauer, 2000). Un autre moyen pour le Zn d'induire un stress oxydatif impliquerait l'interaction avec la lipoamide déhydrogénase (LADH). Cette enzyme peut catalyser la réduction des acides lipoïques libres par le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et la LADH aide ainsi à maintenir l'environnement réducteur des mitochondries, une caractéristique essentielle pour la défense mitochondriale contre les ERO. Il a été démontré que le Zn pouvait inhiber la réaction catalysée par la LADH purifiée d'un cœur porcine. La hausse de la concentration de Zn entraînerait aussi l'inhibition de la production de NADH, ce qui provoque l'interruption du cycle de Krebs et perturbe le métabolisme énergétique des mitochondries, menant à l'augmentation de  $H_2O_2$  dans l'environnement intramitochondriale (Gazaryan *et al*, 2002). Le Zn pourrait donc avoir davantage de capacités oxydatives qu'on lui connaît actuellement. Par contre, beaucoup d'autres études ont montré qu'au contraire, le Zn offrait une protection contre le stress oxydatif, agissant plutôt comme un antioxydant. Par exemple, une étude a démontré chez des sujets humains âgés entre 57 et 87 ans et également distribués entre les deux sexes qu'une déficience en Zn entraînait une augmentation des marqueurs de stress oxydatif malondialdéhyde et 4-hydroxyalkenales, des sous-produits de la peroxydation des lipides (Prasad *et al*, 2007). Aussi, il a été observé qu'en conditions de stress oxydatif sévères, le changement de l'équilibre rédox amenait la séparation du Zn de la MT par un échange de sulfide/disulfide, reliant la concentration cellulaire de Zn au maintien de l'équilibre rédox cellulaire (Maret, 2008). La question reste encore

entière, les conditions variant beaucoup entre les différentes situations où divers effets ont été observés. Il faut donc conclure prudemment sur l'effet du Zn sur le statut redox de la cellule.

#### 1.6.4 Le Zn et ERK1/2

Certaines études ont montré l'induction des MAPK ERK1/2 et p38 par le Zn. Les travaux de Ohashi *et al.* (2015) menés sur des cellules myogéniques C2C12 ont suggéré que le Zn activerait ERK1/2, mais n'augmenterait pas son activité significativement. Mais, le Zn pourrait moduler l'activité de ERK1/2 indirectement, en agissant sur le *epidermal growth factor* (EGF), puisqu'il a été démontré que le Zn pouvait stimuler la phosphorylation du récepteur de EGF et qu'il a aussi été observé que ERK1/2 pouvait être activée via le déclenchement de la voie de signalisation de EGF (Wu *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2010). Dans les cellules Caco-2, la liaison du Zn aux thiols sur le résidu du site actif de la protéine tyrosine phosphatase (PTP) inhibe celle-ci. Le blocage de l'activité de la PTP favorise ensuite l'activation de ERK1/2 et de p38, puisque normalement l'action de PTP consiste à permettre à p-ERK1/2 de retourner à un état inactif (Talukder *et al.*, 2011; Maret *et al.*, 1999; Hogstrand *et al.*, 2009). Au contraire, certaines études ont rapporté qu'il n'y aurait pas d'activation de ERK1/2 par le Zn. C'est le cas des travaux de Shih et Chiou (2012) sur les cellules de muscles lisses des voies respiratoires (ASMC) lors desquels ils ont constaté que la phosphorylation de ERK1/2 était inhibée par le ZnSO<sub>4</sub>. Dans ce cas-ci, le Zn aurait pu stimuler l'activation de la protéine kinase A qui peut réguler négativement la phosphorylation de la MAPK. Ici, cette inhibition était un mécanisme de protection puisque l'activation de la voie des MAPK induit dans ces conditions la production de cytokines inflammatoires, incluant le TNF- $\alpha$  (Prasad *et al.*, 2011).



## 1.7 Objectifs et Hypothèses de recherche

### 1.7.1 Résumé de la problématique et objectifs

Notre recherche découle des résultats obtenus préalablement au sein de notre laboratoire qui démontraient l'activation de ERK1/2 par le Cd dans les cellules entérocytaires Caco-2 différenciées, ce phénomène étant absent des cellules indifférenciées (Mantha et Jumarie, 2010). Les objectifs de ce mémoire consistaient à comprendre comment le Cd active ERK1/2 dans la lignée cellulaire Caco-2 et à identifier les conséquences de cette activation. L'intérêt de comparer l'effet du Zn et du Cd permet: i) d'évaluer dans quelle mesure les phénomènes observés sont spécifiques au Cd; ii) de comparer les conséquences d'une exposition à un métal non essentiel à celle d'un métal essentiel. Aussi, comme il avait déjà été observé dans la lignée cellulaire bronchique BEAS que le Zn peut activer ERK1/2 (Samet *et al*, 1998), il devenait intéressant d'étudier si le Zn pouvait, comme le Cd, induire un effet d'hormèse sur l'activité MTT corrélé à la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules intestinales Caco-2. Mantha et Jumarie (2010) avaient montré que l'augmentation de l'activité MTT dans les cellules différenciées n'était pas le résultat d'une stimulation de la prolifération cellulaire et il avait été suggéré qu'elle serait plutôt attribuable à une expression accrue de l'enzyme suite à une plus grande activité traductionnelle. Nous avons donc visé le facteur eiF4E et testé son activation soit par Mnk1/2, soit par RSK90 à l'aide d'inhibiteurs sélectifs.

### 1.7.2 Hypothèses

Comme il a été possible de le constater dans l'introduction, le Cd peut induire la formation d'un environnement cellulaire pro oxydant de différentes manières. En

tenant compte du potentiel d'induction de stress oxydatif du Cd nous avons émis l'hypothèse suivante :

- i) Un déséquilibre rédox serait impliqué dans le mécanisme d'activation de ERK1/2 par le Cd et, mais pas dans le cas du Zn.

Comme l'augmentation de l'activité MTT est corrélée à une activation de ERK sans augmentation de la prolifération cellulaire et que ERK peut moduler l'activité du facteur de traduction eIF4E, nous avons émis l'hypothèse suivante:

- ii) L'augmentation de l'activité MTT dépendante de l'activation de ERK1/2 serait le résultat d'une activité traductionnelle accrue impliquant le facteur eIF4E.

## CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire Caco-2 a été utilisée pour toute la durée de l'étude (obtenue par Dr Alain Zweibaum). Les cultures étaient maintenues dans des bouteilles de plastique de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc.) et étaientensemencées à  $1 \times 10^6$  cellules/bouteilles dans du milieu DMEM (Gibo, Life Technologies). Le milieu est riche en glucose (25 mM) et il y est ajouté 15% de sérum FBS (Wisent Inc.) préalablement inactivé à 56 °C pendant 30 minutes. Les cultures cellulaires ont été maintenues dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et le milieu a été changé à une fréquence de deux jours. Chaque semaine les cultures des bouteilles de maintien étaient trypsinisées (0.05% trypsine-0.53 mM EDTA) pour ensemenecer de nouvelles bouteilles ou d'autres supports pour les différents protocoles qui ont été effectués dans ce projet, toujours à une densité de  $12 \times 10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>.

### 2.2 Activité MTT

Le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) peut être utilisé pour tester la viabilité cellulaire dans le cadre d'études de cytotoxicité, mais dans le cadre de ce projet ce test a servi à mesurer la variation de l'activité de synthèse protéique (voir résultats). Le principe de ce test repose sur la réduction du substrat MTT par les réductases NADPH mitochondriales. Au départ, le sel de tétrazolium est jaune et une fois réduit il forme un produit sous forme de cristaux de formazan bleu-violet qui seront solubilisés dans du DMSO et la densité optique sera mesurée par un lecteur de microplaques (SpectraFluorPlus, Tecan) à une longueur d'onde de 575 nm. Les

cellules ont étéensemencées sur des microplaques de 96 puits (VWR) à une densité de 5000 cellules par puits. Au 21<sup>e</sup> jour, elles étaient traitées avec 100  $\mu$ L de milieux de différentes conditions de traitement en absence de sérum pendant 24 heures à 37 °C et dans la dernière heure et demie de la période de traitement, 10  $\mu$ L de la solution de MTT (stock à 5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, CAS 298-93-11) ont été ajoutés. Les cellules ont été remises à l'incubateur. Ensuite, le milieu a été aspiré et 200  $\mu$ L de DMSO ont été ajoutés dans chaque puits de la plaque qui par la suite a été mise sur une plaque agitatrice pour homogénéiser la solution pendant environ 15 minutes avant de lire la densité optique par un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 575 nm. Les résultats de l'activité déshydrogénase (par la suite dite « activité MTT ») sont exprimés en fonction de leurs contrôles respectifs mesurés dans des cellules incubées 24 heures en absence de sérum et dans les mêmes milieux de traitements, mais ne contenant pas de métaux.

### 2.3 Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Les protéines ont été dosées avec le réactif de Bradford (BioRad) qui a été préalablement dilué avec un facteur de 1:4 dans de l'eau. La courbe d'étalonnage a été faite avec du BSA dilué dans de l'eau nanopure (0, 10, 20, 40, 60, 80 et 100  $\mu$ g/mL) et les échantillons ont été préalablement dilués également dans de l'eau nanopure, afin que les mesures de DO entrent dans la courbe d'étalonnage. Ensuite, 50  $\mu$ L de chaque échantillon cellulaire et des concentrations de BSA ont été déposés dans des puits en triplicatas auxquels ont été ajoutés 200  $\mu$ L du réactif dilué. Après cinq minutes de repos à température pièce, la densité optique de chaque puits était prise à une longueur d'onde de 595 nm.

## 2.4 Dosage des thiols totaux

Le principe repose sur la liaison de l'acide 2,2-dinitro-5-5'-dithiobenzoïque (DTNB) à un groupement SH, ce qui mène à la formation de TNB (anion 2-nitro-5-thiobenzoate) qui prend une couleur jaunâtre et qui absorbe fortement la lumière à une longueur d'onde de 410 nm. On utilise le glutathion (GSH) dilué dans du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M-EDTA 5 mM pour la courbe d'étalonnage (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750 et 1000  $\mu\text{M}$ ) et la solution stock de GSH se garde 1 semaine à  $-20^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière. Au 21<sup>e</sup> jour, les cultures étaient traitées pendant 24 heures selon différentes conditions préalablement établies en absence de sérum. Les cultures cellulaires ont ensuite été récoltées dans 1.5 mL de tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -EDTA et homogénéisées sur glace une minute à vitesse maximale (Polytron PT1600E). Les échantillons ont ensuite été dilués dans du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -EDTA afin que les valeurs de DO soient comprises dans la courbe d'étalonnage puis 50  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon dilué et de chaque concentration de la courbe d'étalonnage étaient déposés dans des plaques de 96 puits auxquelles 200  $\mu\text{L}$  de DTNB à 0.5 mM ont été ajoutés. Après cinq minutes de repos à température pièce, la densité optique a été lue par un lecteur de microplaques. On a également effectué un dosage de protéines selon la méthode de Bradford pour exprimer les résultats de thiols en fonction de la quantité de protéine.

## 2.5 Mesure des ERO par la sonde DCFH-DA en microscopie confocale

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 5000 cellules par puits sur une plaque de 96 puits pour une durée de 21 jours. Après une exposition de 24 heures à différentes conditions, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS à température pièce, le dernier rinçage était fait en incubant 10 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Une solution stock de DCFH-

DA (Sigma-Aldrich, CAS 4091-99-0) à 5 mM dans de l'éthanol a été diluée 1:1000 dans du PBS et 100  $\mu$ L de cette solution à 5  $\mu$ M ont été ajoutés aux puits. Après à une incubation de 30 minutes à 37 °C à l'abri de la lumière, les cellules étaient ensuite photographiées à l'aide d'un système de microscopie confocale à laser Nikon A1R (Japon, 2011).

## 2.6 Dosage des métaux internalisés par spectrophotométrie d'émission de flamme

Après les traitements de 24 heures, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS pour ensuite être récoltées dans le plus petit volume d'eau possible, entre 1 et 2 ml/pétri de 100 mm de diamètre, et transférées dans un tube conique Sarsted de 50 mL. Après homogénéisation, 100  $\mu$ L ont été utilisés pour le dosage de protéine selon la méthode de Bradford et le reste était digéré par l'ajout de 6 mL de HNO<sub>3</sub> (68-70 %) et de 4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/w). Les bouchons étaient légèrement dévissés pour laisser s'échapper un peu de pression et les tubes étaient mis au four micro-ondes jusqu'à ce qu'il ne reste aucun liquide. Ensuite, 5 mL de HNO<sub>3</sub> 1% ont été ajoutés et la lecture était prise par un spectrophotomètre d'émission de flamme (SpectrAA 220FS, Varian).

## 2.7 Immunobuvardage

Après avoir été traitées, les cellules de 21 jours ont été rincées deux fois avec du PBS froid et les pétris ont été conservés sur glace pour les prochaines étapes, pour éviter la dégradation des protéines. Les cellules ont été récoltées dans du tampon de lyse

fraîchement préparé composé de 0.05 M d'HEPES, de 0.125 M de NaCl, de NaF à 0.1 M, de Napyrophosphate à 0.01M, de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  à 1.5 mM, de 1 mM d'EGTA, de 10% de glycérol, de 1% de Triton X-100 et de 0.5% de déoxycholate de Na auquel on a ajouté 1X d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche, #11836170001) et 2 mM de vanadate de Na. Les cellules récoltées dans le tampon de lyse ont été transférées dans des eppendorfs et ensuite passées trois fois à l'intérieur d'une aiguille 26G1/2. Les eppendorfs ont été par la suite centrifugés à 14000 g à 4 °C pendant 25 minutes. La partie cytosolique dans le surnageant a été récupérée et conservée sur glace, devenant l'échantillon utilisé pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford et la migration sur gel. Des gels de séparation à 15% d'acrylamide et des gels d'entassement à 4% d'acrylamide ont été coulés dans les supports appropriés dont les puits ont par la suite été chargés avec les échantillons contenant 30 µg de protéines totales et un standard de poids moléculaires (Cell Signaling #7727P4), chauffés à 104 °C pendant 5 minutes et auxquels 15 µL du tampon d'échantillon 5X ont été ajoutés. La séparation des échantillons a été effectuée à 160 V pendant approximativement une heure à température pièce. Les protéines sur gel ont été ensuite transférées sur des membranes de PVDF (Milipore) et celles-ci ont été incubées pendant 1 heure dans du tampon de blocage contenant 1X de TBS, 0.2% de Tween-20 et 5% de lait écrémé. Les membranes étaient ensuite incubées *overnight* avec un des anticorps suivants dilué dans du tampon composé de TBS 1X, 0.1% de Tween-20 et 5% de BSA (Cell Signaling Technology): phospho-ERK1/2 (1:1000), ERK (1:1000),  $\beta$ -actine (1:1000); (abcam): phospho-eiF4 (1:1000), eiF4 (1:500). Les membranes ont ensuite été incubées dans du tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire anti-biotine (1:1000) couplé à la HRP (1:2000) (Cell Signaling Technology). Elles ont été immergées dans un agent révélateur HyGLO (Denville Scientific Inc #E-2500) et exposées à un appareil Fusion Fx7 (MBI Lab equipment) afin de révéler les bandes.

## 2.8 Analyse du cycle cellulaire par marque au PI

Les cellules sont récoltées par trypsinisation et centrifugées à 3000 rpm pendant 3-4 minutes puis rincées au PBS. Les cellules ont ensuite été fixées dans 1 mL d'éthanol froid, ajouté goutte à goutte en vortexant pour bien fixer toutes les cellules du culot. Les échantillons ont par la suite été mis au congélateur à -20 °C pendant plusieurs jours, mais pour un maximum de 3 mois. Les échantillons ont été centrifugés et rincés deux fois avec du PBS et, pour s'assurer de marquer seulement l'ADN, 50 µL de Ribonucléase A (RNase A) à 100 µg/mL ont été ajoutés pour se débarrasser de l'ARN. Ensuite les culots dans la solution de RNase A recevaient 400 µL de la solution de IP à 50 µg/mL et étaient incubés 10 minutes à température pièce. Les échantillons étaient ensuite analysés par cytométrie en flux (BD FACSCalibur).

## 2.9 Analyses statistiques

Les manipulations ont été faites au minimum en 3 réplicas et chaque réplicas correspondait à un passage de culture indépendant. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 et dépendamment des conditions par un test t non-apparié avec une correction de Welch ou par une analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Dunn.



### CHAPITRE III : RÉSULTATS

Précédemment, il a été observé que le Cd induit un effet d'hormèse sur l'activité MTT des cellules intestinales Caco-2 et nous nous sommes demandé si cet effet était spécifique au Cd. Nous avons donc utilisé un autre métal, le Zn, afin de comparer les réponses induites par le Zn, un métal essentiel, avec celles induites par le Cd, qui est non-essentiel. Effectivement, nous avons obtenu un effet d'hormèse avec le Zn, mais à de plus hautes concentrations, aux alentours de 100-150  $\mu\text{M}$ , comparativement à environ 10-15  $\mu\text{M}$  dans le cas du Cd (figure 3.1 A et B). Il a été préalablement démontré par Mantha et Jumarie (2010) que le pic d'activité MTT induit par le Cd était relié à l'activation de ERK1/2 et nous avons vérifié si le Zn pouvait aussi induire l'activation de ERK1/2 puisqu'il provoque un effet d'hormèse sur l'activité MTT. L'état de phosphorylation de ERK1/2 a été étudié par immunobuvardage et les résultats montrent, comme il était attendu, que le Cd induit une activation de la protéine ERK1/2 (figure 3.1 C et D). Cependant, nous n'avons pas observé d'activation induite par la présence de Zn. Aussi, nous avons utilisé l'inhibiteur U0126 en présence de Cd ou de Zn pour nous assurer que l'effet n'était pas aléatoire et que même en présence de Cd, l'inhibiteur de MEK préviendrait l'activation de ERK1/2. Les résultats obtenus le confirment puisqu'en présence de l'inhibiteur on perd la phosphorylation de ERK1/2 induite par le Cd.

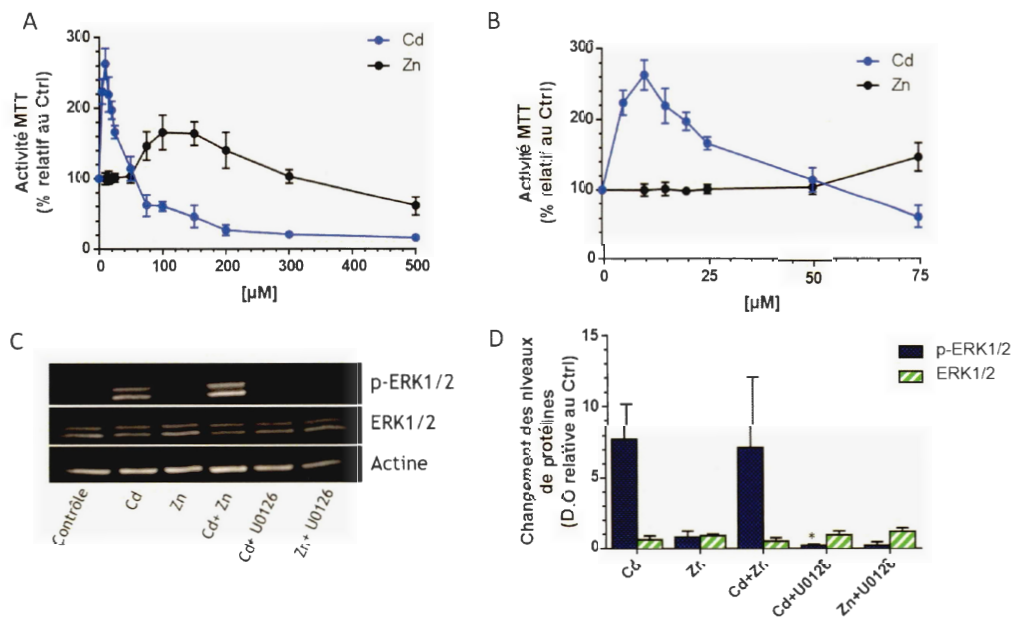


Figure 3.1 : Effet d'hormèse sur l'activité MTT induit par le Cd et le Zn et stimulation de la phosphorylation de ERK1/2. (A) Variation de l'activité MTT dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours et exposées 24 heures à des concentrations croissantes (0 à 500 μM) de Cd ou de Zn. (n = 4-7) (B) Agrandissement des courbes en (A) entre 0 et 75 μM (C) Exemple d'immunobuvardage de l'expression des protéines ERK1/2 et p-ERK1/2 dans les cellules traitées 24 heures au Cd (10 μM) ou au Zn (100 μM) en présence ou en absence de U0126 (20 μM) (D) Analyses densitométriques normalisées sur les niveaux d'actine et exprimées relativement au niveau contrôle (n = 4). \* statistiquement différent comparativement à la condition Cd (test t non-apparié avec une correction de Welch,  $p < 0.05$ ).

Comme le test MTT est également utilisé pour mesurer la viabilité ou la prolifération cellulaire, nous avons vérifié si les pics induits par les métaux étaient dus à une augmentation de la prolifération cellulaire. Par un marquage à l'IP, il a été possible d'observer la répartition des échantillons cellulaires entre les différentes phases du cycle cellulaire selon le nombre de jours de culture, soit en fonction de l'état de différenciation (figure 3.2). Nous avons observé qu'il y a une augmentation

significative du pourcentage de cellules en phase G1 entre le jour 3 (44%) et le jour 21 (69,4%). Il y a aussi une baisse significative dans la portion de cellules en phase G2 entre le jour 3 (28%) et le jour 21 (10,8%) et c'est aussi le cas de la phase S, avec une diminution marquée entre le jour 3 (26,5%) et le jour 21 (13,1%). Donc très peu de cellules sont dans les phases de préparation pour la mitose ou en phase de division cellulaire au jour 21, un changement observé dès le jour 7, le jour où la confluence est atteinte. Cela nous confirme donc qu'au jour 21, les cellules Caco-2 différenciées ne sont pas en mode prolifération. De plus, nous avons observé que lorsque les cellules au jour 21 sont exposées au Cd ou au Zn, il n'y a pas de changements significatifs dans la quantité de cellules en phase S comparé aux cellules témoins (figure 3.3).

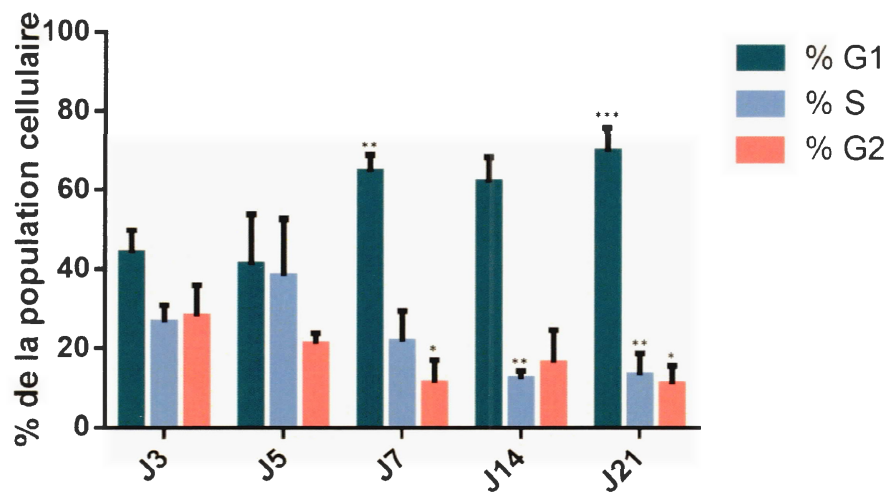


Figure 3.2 : Variation de la répartition des cellules dans les différentes phases G1, S et G2 du cycle cellulaire mesurée en cytométrie en flux dans des cellules Caco-2 au jour 3, 5, 7, 14 et 21 de culture (n = 4-5). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : statistiquement différents comparativement à la valeur mesurée au jour 3 (test t non-apparié avec une correction de Welch).

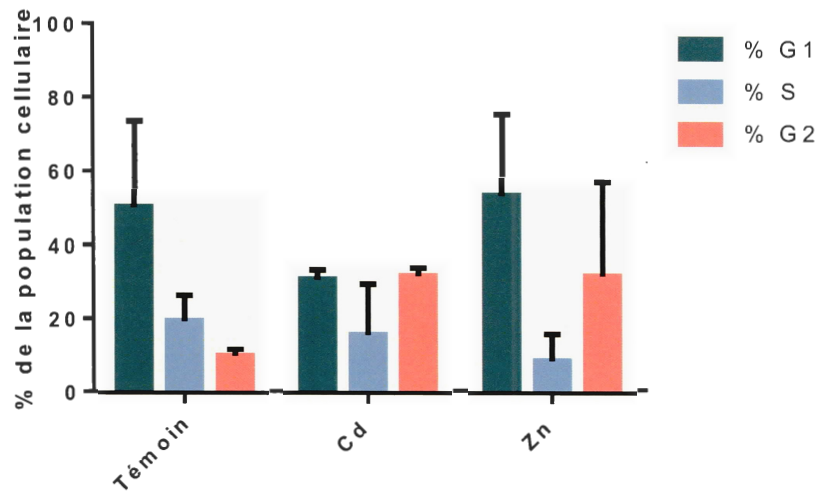


Figure 3.3 : Variation de la répartition des cellules dans les différentes phases G1, S et G2 du cycle cellulaire mesurée en cytométrie en flux dans des cellules Caco-2 au jour 21 de culture exposées au Cd (10  $\mu$ M) ou au Zn (150  $\mu$ M) (n = 4).

Pour confirmer que nous pouvons relier l'activité MTT à de la synthèse protéique stimulée par le Cd et le Zn, nous avons effectué un test MTT avec du Cd et du Zn en présence ou en absence de cycloheximide (CHX), un inhibiteur générique de la synthèse protéique qui bloque l'étape de l'élongation dans la traduction des protéines (Schneider-Poetsh, 2010). Cela nous permettait de vérifier si la hausse d'activité MTT induite par les métaux persistait en présence de l'inhibiteur (figure 3.4). Les résultats indiquent qu'effectivement nous pouvons relier le pic d'activité MTT à de la synthèse de protéines, car l'ajout de CHX diminue cette induction d'activité MTT par chacun

des métaux . Cela confirme donc que l'activité MTT induite par le Cd et le Zn est liée à de la synthèse protéique.

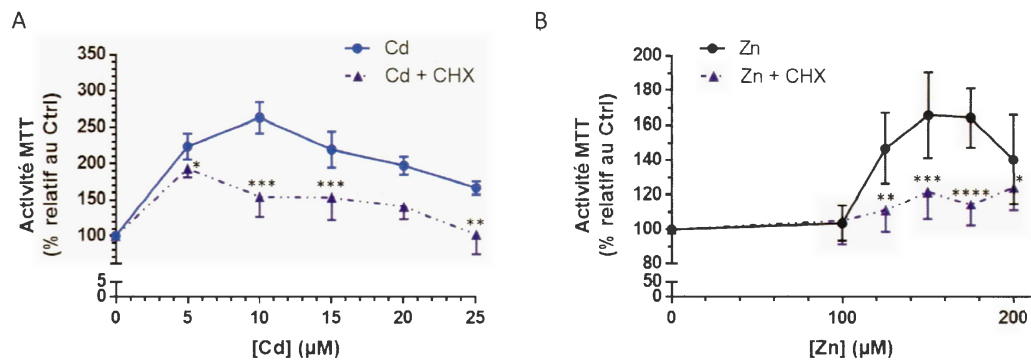


Figure 3.4: Variation de l'activité MTT en fonction de concentrations de Cd ou de Zn en présence ou en absence de CHX (5 µM) dans des cellules Caco-2 au jour 21 à la suite d'une exposition de 24 heures (n = 6-9) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ : statistiquement différent comparativement à la valeur mesurée en absence de CHX (test t non-apparié avec une correction de Welch).

Cardin *et al* (2009) ont démontré qu'en favorisant une situation pro-oxydante, cela modifiait la courbe MTT induite par le Cd. Nous avons donc exploré l'hypothèse de l'implication d'un déséquilibre rédox dans l'induction de l'activité MTT par le Cd et le Zn. D'abord, nous avons effectué un test MTT en situation pro-oxydante en utilisant deux inhibiteurs influençant les contenus intracellulaires en GSH: le BSO, qui a pour mécanisme d'action d'inhiber la glutathion synthase, et le BCNU ou carmustine, un inhibiteur de la glutathion réductase (figure 3.5 A). Les deux inhibiteurs ont produit un effet semblable sur la courbe dose-réponse au Cd, soit un décalage du pic d'activité MTT vers la gauche, de 10-15 µM vers 5 µM. Une situation favorisant le stress oxydatif semble donc rendre les cellules plus sensibles à l'effet d'hormèse induit par le Cd. Ensuite, nous avons testé une situation antioxydante de deux façons: en coexposant les cellules au Cd et au NAC, un antioxydant analogue au GSH, ou en effectuant un

prétraitement de 24 h au NAC avant l'exposition au Cd seul, afin de déterminer si la protection antioxydante fournie pendant ou avant l'exposition au Cd modifie la réponse cellulaire. Les résultats montrent qu'une coexposition des cellules au Cd et au NAC déplace le pic de la courbe dose-réponse vers la droite, les cellules seraient donc moins sensibles au Cd. Cependant, une préexposition au NAC n'a apporté aucun changement significatif à la courbe d'activité MTT (figure 3.5 B). Ces résultats mènent à deux conclusions: soit le NAC offre réellement une protection, mais seulement en coexposition, soit le déplacement de la courbe est le résultat d'une diminution d'accumulation cellulaire de Cd suite à la formation de complexes entre le NAC et le Cd. Donc, nous avons mesuré par spectrométrie à flamme les contenus cellulaires en Cd (figure 3.5 C). Le résultat confirme la première hypothèse, à savoir que le NAC offre une protection antioxydante, puisqu'aucune différence significative n'est observée dans les niveaux de Cd internalisé. Donc, la formation de complexes NAC-Cd ne diminue pas les niveaux d'accumulation intracellulaire totaux de Cd mesurés à 24 heures, et ce même si la complexation est suspectée de ralentir la vitesse initiale du transport du Cd à travers la membrane plasmique. À noter qu'aucune contamination n'a été mesurée dans les cellules témoins dont les contenus en Cd étaient inférieurs à la limite de détection de 0,001 µg/L.

Nous avons également testé la réponse cellulaire au Zn en situation pro- et antioxydante afin d'évaluer si un déséquilibre rédox pouvait influencer l'activité MTT induite par la présence de ce métal (figure 3.5 D). Contrairement aux résultats obtenus avec le Cd, nous remarquons qu'il n'y a pas de déplacement de la courbe selon les concentrations de Zn, mais plutôt un changement dans les niveaux de stimulation de l'activité MTT. L'ajout de NAC semble augmenter les niveaux d'activité, alors que les inhibiteurs BSO et BCNU pro-oxydants semblent les diminuer, quoique pas de façon significative.

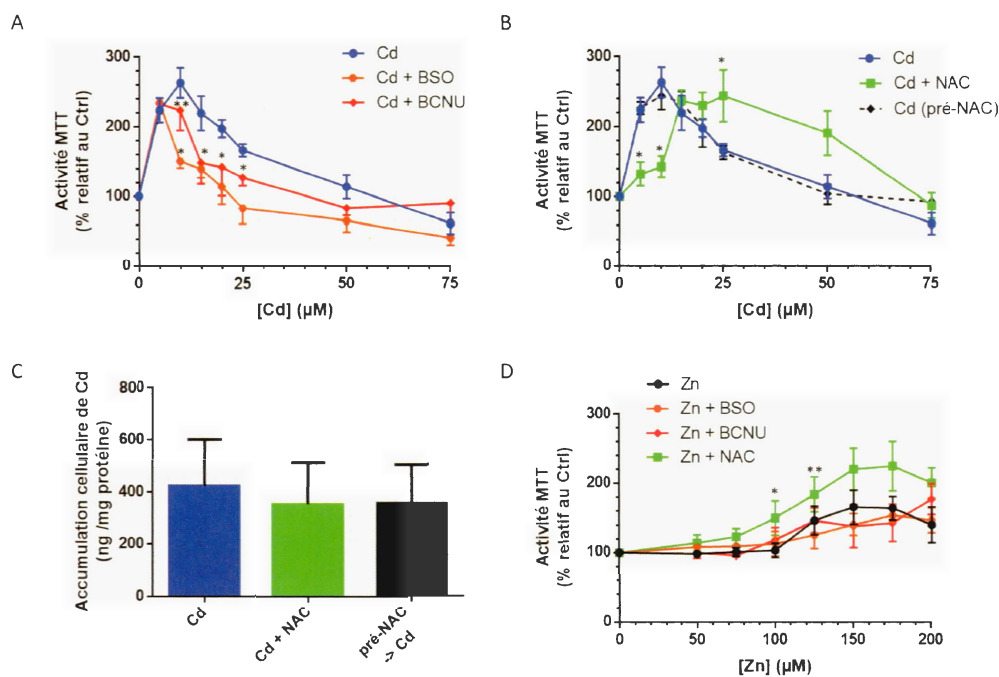


Figure 3.5: Effets d'un déséquilibre rédox sur l'activité MTT induite par le Cd et le Zn. (A) Variation de l'activité MTT de cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours puis exposées 24 heures à des concentrations de Cd variant entre 0 et 75  $\mu\text{M}$  seul ou en présence de BSO (3 mM) ou de BCNU (30  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 4$ ). (B) Variation de l'activité MTT de cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours puis exposées 24 heures à des concentrations de Cd variant entre 0 et 75  $\mu\text{M}$  de Cd, seul ou en présence de NAC (1 mM). L'effet du Cd a aussi été testé sur des cellules prétraitées à du NAC (1 mM) pendant 24 heures avant l'exposition de 24 heures au Cd seul ( $n = 6$ ) (C) Accumulation cellulaire de Cd dans des cellules Caco-2 de 21 jours exposées 24 heures au métal seul ou en présence de NAC (1 mM). L'accumulation de Cd a aussi été mesurée dans des cellules prétraitées à 1mM de NAC pendant 24 heures. ( $n = 3$ ) (D) Variation de l'activité MTT dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours exposées 24 heures à des concentrations de Zn variant entre 0 et 200  $\mu\text{M}$ , seul ou en présence de BSO (3 mM), de BCNU (30  $\mu\text{M}$ ) ou de NAC (1 mM) ( $n = 4$ ). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  significativement différent comparativement à la valeur obtenue avec le métal seul (test non paramétrique ANOVA avec un test post-hoc de Dunn).



La prochaine étape consistait à vérifier l'état du déséquilibre rédox directement dans les cellules à l'aide de la sonde DCFH-DA (figure 3.6). Il apparaît clairement, par la hausse de fluorescence liée à la hausse de ERO, que le Cd induit du stress oxydatif. Au contraire, la fluorescence observée dans les cellules exposées au Zn n'est pas très différente de celle obtenue dans les cellules témoins. La conclusion d'une protection conférée par le NAC en coexposition avec le Cd est supportée par les résultats obtenus en microscopie confocale, puisque la fluorescence obtenue dans cette condition diminue et la morphologie des cellules se compare à celle des cellules témoins. Par contre les niveaux de fluorescence ainsi que la forme des cellules observées suite à un prétraitement au NAC sont plus semblables à ceux obtenus suite au traitement au Cd seul. Aussi, contrairement à ce que nous nous attendions, nous avons remarqué que l'ajout de BSO au Cd n'augmente pas les niveaux de ERO produits par le métal.

Un des mécanismes de défense contre le stress oxydatif bien documenté est la surexpression, en situation oxydante, de molécules riches en groupement thiols. Nous avons donc dosé les groupements thiols totaux après avoir exposé les cellules au Cd, seul ou en présence de BSO, et au Zn (figure 3.7). Bien que non statistiquement significative, les résultats montrent que le Cd induit une augmentation du niveau de thiols totaux, suggérant le déclenchement d'un processus de protection contre les ERO. L'ajout de BSO au Cd semble diminuer l'augmentation du contenu en thiols, mais sans l'annuler complètement. Le BSO réduit alors les thiols à des niveaux semblables à ceux mesurés en présence de Zn seul.



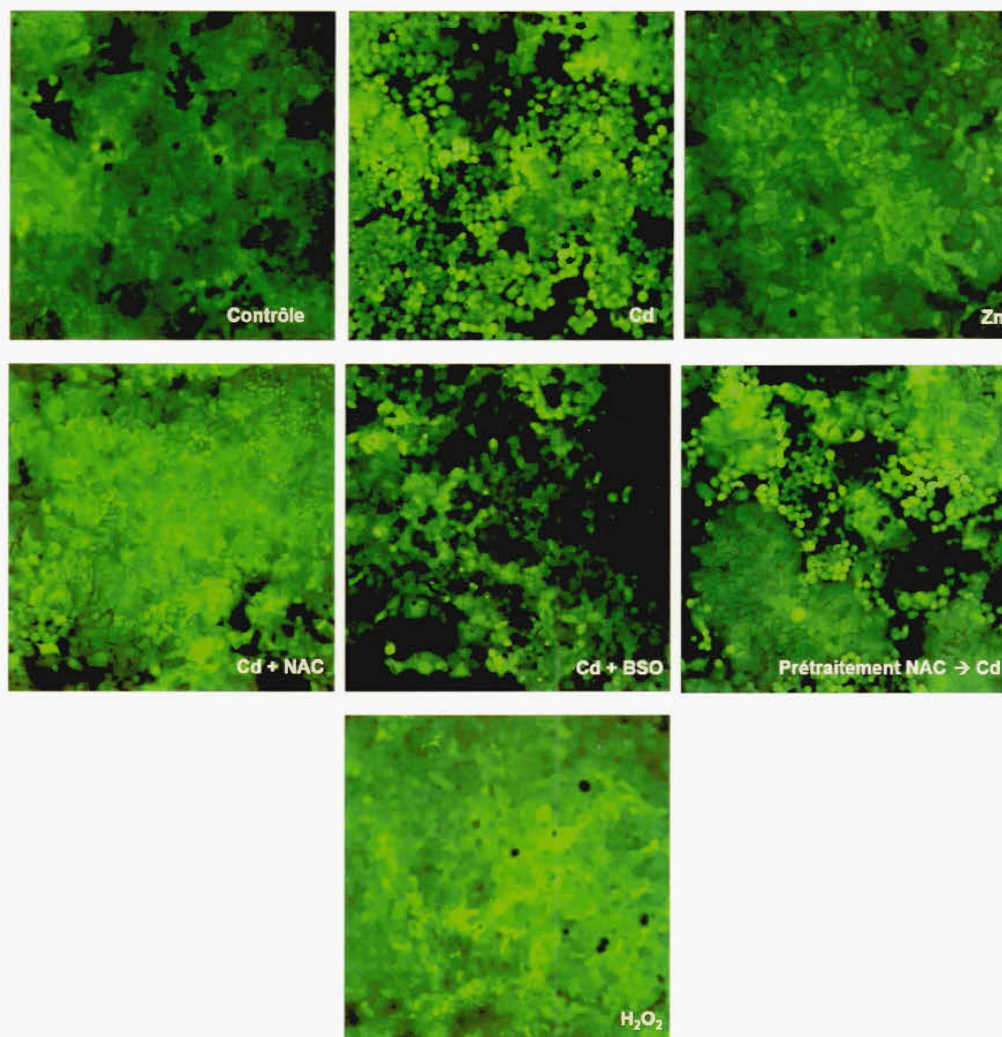


Figure 3.6: Contenus en ERO détectés par fluorescence avec la sonde DCF-DA en microscopie confocale dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours et exposées 24 heures à du Cd (10  $\mu$ M) en présence ou en absence de BSO (3 mM), de NAC (1 mM), suite à un prétraitement de NAC (1 mM) ou exposées à du Zn (150  $\mu$ M) pendant 24 heures ou à du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) pendant 1 heure (n = 4)

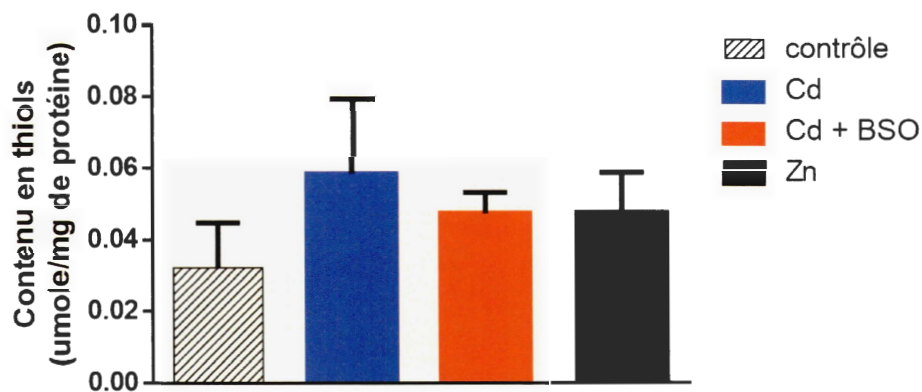


Figure 3.7: Contenus en thiols dans des cellules Caco-2 cultivées pendant 21 jours et exposées au Cd (10  $\mu$ M) en présence ou en absence de BSO (3 mM) ou au Zn (150  $\mu$ M) pendant 24 heures (n = 4).

Les résultats obtenus en présence de CHX indiquent que la hausse d'activité MTT peut être liée à une stimulation de synthèse protéique. Nous avons donc testé l'implication possible du facteur de traduction eIF4E, en aval de la cascade de signalisation dont ERK1/2 fait partie, dans la synthèse protéique corrélée à la stimulation de l'activité MTT par le Cd. Plusieurs voies de signalisation peuvent aboutir à l'activation de eIF4E, nous avons donc choisi deux inhibiteurs LJI308 et ETP-46464 bloquant respectivement RSK90 et Mnk1/2, deux kinases activées par ERK1/2, et nous avons testé leur effet sur l'hormèse induite par le Cd sur l'activité MTT. Les niveaux d'activité MTT et la sensibilité des cellules au Cd n'ont pas changé en présence des inhibiteurs (figure 3.8 A). Malgré ces résultats, nous avons vérifié par un immunobuvardage si le Cd stimule l'état de phosphorylation d'eIF4E, (figure 3.8 B et C). La présence du Cd seul ne stimule pas l'activation d'eIF4E et les inhibiteurs LJI308 et ETP-46464 ajoutés au métal font diminuer le taux d'eIF4E phosphorylé, surtout dans le cas de ETP-46464 avec lequel un résultat significatif a été obtenu. Par contre, nous n'avons pas observé

d'activation significative de ERK1/2 avec le Cd seul et nous avons également remarqué que lorsque les niveaux de eiF4E phosphorylés diminuent, ceux de eiF4E total diminuent aussi, ce qui influencera l'interprétation de ces résultats.

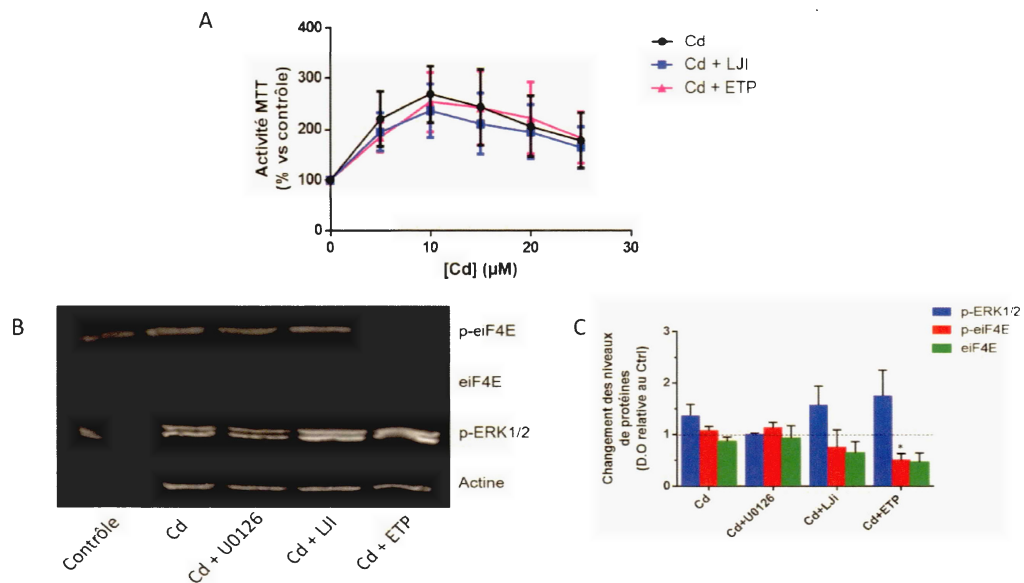


Figure 3.8: Effet du Cd sur l'activation de ERK1/2 et de eiF4E. (A) Variation de l'activité MTT dans des cellules Caco-2 au jour 21 exposées à du Cd seul ou en présence de LJI308 (10 µM) ou de ETP-46464 (20 µM) pendant 24 heures (n = 4). (B) Exemple d'immunobuvardage de l'expression des protéines p-eiF4E et p-ERK1/2 dans des cellules Caco-2 exposées pendant 24 heures au Cd (10 µM) en présence ou en absence de U0126 (20 µM), de LJI308 (10 µM) ou de ETP-46464 (20 µM) (C) Analyses densitométriques normalisées sur les niveaux d'actine et exprimées relativement aux niveaux contrôles dans les cellules Caco-2 exposées pendant 24 heures au Cd (10 µM) en présence ou en absence de U0126 (20 µM), de LJI308 (10 µM) ou de ETP-46464 (20 µM) (n = 3-4). \* $p < 0,05$ : significativement différent de la valeur obtenue avec le Cd seul (test t non-apparié avec une correction de Welch).



## CHAPITRE IV : DISCUSSION

Nous avons reproduit l'effet d'hormèse sur l'activité MTT induit par le Cd dans les cellules Caco-2 cultivées durant 21 jours, avec le même maximum d'induction atteint à 10  $\mu\text{M}$  qui avait été observé par Mantha et Jumarie (2010). Afin de comparer la réponse induite par le Cd avec un métal essentiel, nous avons mesuré l'activité MTT induite par le Zn et un effet d'hormèse similaire à celui induit par le Cd a été observé dans le cas du Zn, mais à une concentration de 150  $\mu\text{M}$ . Puisque l'effet d'hormèse induit par le Cd avait été corrélé à l'activité de ERK1/2, nous nous sommes demandé si le Zn pouvait aussi induire la phosphorylation de ERK1/2. Après vérification par immunobuvardage, nous en avons conclu qu'à cette concentration, le Zn n'induisait pas la phosphorylation de ERK1/2. Pourtant, l'activation de cette kinase induite par le Zn avait été observée dans les cellules C2C12 et Caco-2 (Ohashi *et al*, 2015; Talukder *et al*, 2011). Par contre, dans le cas de l'expérience de Talukder *et al* (2011), l'activation de ERK1/2 avait été observée suite à l'exposition des cellules à 50  $\mu\text{M}$  de Zn et les auteurs n'ont pas vérifié si cette induction était dose-dépendante. Cependant, nous ne nous attendions pas à une phosphorylation de ERK1/2 à cette concentration, puisque nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activité MTT à 50  $\mu\text{M}$ . Aussi, il est possible que l'effet d'hormèse induit par le Zn sur l'activité MTT ne soit en effet pas relié à ERK1/2, mais à l'activation d'une autre protéine. Par exemple, il a été démontré par les travaux de Talukder *et al* (2011) que l'activité de la kinase p38 était régulée par le Zn. Il serait intéressant de vérifier par immunobuvardage si la concentration de 150  $\mu\text{M}$  de Zn à laquelle nous observons la plus importante activité MTT stimule la phosphorylation de p38. Pour cela il faudrait tester plusieurs concentrations de Zn, puisqu'une exposition à seulement 20  $\mu\text{M}$  de Zn avait activé la kinase (Talukder *et al*, 2011) et nous n'avons pas observé de pic dans l'activité MTT à cette concentration. Nous avons également observé que la présence de Zn ajouté au Cd

ne modifiait pas l'induction de la phosphorylation de ERK1/2. Il serait donc probable que le mécanisme d'induction de ERK1/2 par le Cd ne soit pas affecté par le Zn, que le Cd ait une meilleure affinité pour celui-ci ou qu'il n'y ait pas d'inhibition de l'accumulation cellulaire du Cd par le Zn.

Le test de réduction MTT est utilisé afin de quantifier la prolifération cellulaire ou le pourcentage de viabilité cellulaire. Afin de nous assurer que l'induction de l'activité MTT par le Cd et le Zn observé n'était pas due à de la prolifération cellulaire, nous avons vérifié si la présence de Cd ou de Zn pouvait influencer la prolifération cellulaire, puisque les travaux de Von Zglinicki *et al.* (1992) avaient démontré une augmentation de la prolifération cellulaire induite par une exposition à 0.1-1 nM de Cd dans le cas de myoblastes de rat L6J1 et à  $10^2 - 10^5$  pM de Cd dans le cas de cellules rénales porcines LLC-PK. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence significative dans la répartition de la population cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire en présence de Cd ou de Zn. Donc l'augmentation d'activité MTT que nous avons observée dans les cellules de jour 21 exposées à 10  $\mu$ M de Cd ou 150  $\mu$ M de Zn ne peut être due à une induction de prolifération cellulaire. Nous avons aussi étudié la répartition de la population cellulaire entre les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des jours de cultures afin de montrer que l'on pouvait mesurer des variations dans le cycle cellulaire entre pré et post-confluence. Nous avons démontré qu'à partir du jour 7, il y a une forte baisse de la population cellulaire en phase G2/S comparativement au jour 3 et qu'au jour 21, la majorité des cellules se trouvent en phase G1. Il avait été préalablement observé que le jour 7 coïncidait avec l'atteinte de la confluence dans le pétri et le début de la différenciation, puisque l'activité enzymatique de la membrane avec bordure en brosse augmentait considérablement à partir du jour 7 (Jumarie et Malo, 1991). Nous pouvons donc constater, tel qu'attendu, que les cellules de 21<sup>e</sup> jour de culture ne sont plus en phase de prolifération. Nous remarquons sur les figures 3.2 et 3.3 que la somme des pourcentages de cellules réparties dans les différentes phases du cycle n'est pas toujours égale à 100%. Cela est

expliqué par l'erreur d'analyse du logiciel utilisé pour quantifier les cellules dans chaque phase du cycle qui parfois n'ajuste pas l'aire sous la courbe parfaitement.

Puisque l'induction d'activité MTT n'était pas reliée à de la prolifération cellulaire, nous avons vérifié si elle pouvait être corrélée à une modulation de la synthèse protéique par le Cd et le Zn. Nous avons donc testé l'effet d'un inhibiteur de synthèse protéique agissant à l'étape de la traduction, la cycloheximide (CHX), sur l'augmentation de l'activité MTT dans les cellules Caco-2 exposées au Cd ou au Zn. Dans le cas des deux métaux, l'ajout de CHX a fait diminuer l'activité MTT, ce qui signifie que l'activité MTT induite par le Cd et le Zn serait corrélée à l'augmentation de la synthèse protéique par ces derniers. Cela a déjà été observé, entre autres dans les travaux de Park *et al.* (2012) où ils avaient démontré l'augmentation de l'expression de la cyclooxygénase (COX-2) induite par 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdSO}_4$  dans des cellules C6 de gliomes et l'augmentation de synthèse protéique par le Cd avait été démontré dans les cellules humaines HCC HepG2 dans lesquelles seulement 5  $\mu\text{M}$  de Cd avait suffi à augmenter les niveaux de  $\beta$ -caténine (So et Oh, 2015). Il a aussi été démontré que le Zn induit de la synthèse protéique par de la régulation transcriptionnelle, puisqu'une exposition à 10  $\mu\text{M}$  de Zn induisait l'augmentation du contenu en ADN et l'activité de IGF dans des cellules d'ostéoblastes  $\text{MC}_3\text{F}_3\text{-E1}$ , le facteur IGF stimulant la formation de collagène et la synthèse d'ADN, une fonction vitale pour la formation de la matrice osseuse (Hashizume et Yamaguchi, 1933; Matsui et Yamaguchi, 1995). Nous pouvons donc en conclure qu'il y a modulation de la synthèse de protéines dans les cellules intestinales Caco-2 par le Cd et le Zn. Il y aurait également un lien intéressant à faire entre la synthèse protéique à l'origine de l'activité MTT induite par le Zn et l'activation de p38 et non de ERK1/2. Cette kinase peut effectivement influencer l'activité transcriptionnelle, puisqu'elle peut, entre autres, activer le facteur de transcription MEF2C dans les monocytes THP-1 et U937 (Han *et al.*, 1997).

Notre hypothèse impliquait un déséquilibre rédox dans le mécanisme d'activation de ERK1/2 par le Cd, mais pas dans le cas du Zn. Nous avons donc testé l'effet d'un



déséquilibre rédox sur la réponse d'activité MTT par le Cd. D'abord, les cellules ont été incubées conjointement avec du Cd et du BSO, un inhibiteur de la glutathion synthase ou du BCNU, un inhibiteur de la glutathion réductase afin de créer un environnement prooxydant. L'ajout des deux inhibiteurs ayant rendu les cellules plus sensibles à l'effet d'hormèse du Cd, nous concluons de ce résultat que le déséquilibre rédox causé par le Cd enclenche une voie sensible à ce déséquilibre. En effet, il avait été préalablement observé qu'en favorisant les prooxydants, l'effet du Cd sur les voies de signalisation apoptotique était augmenté: l'ajout de 500  $\mu\text{M}$  de BSO pendant 20 heures suivi d'une exposition de 6 heures à 25  $\mu\text{M}$  de Cd avait augmenté le pourcentage de splénocytes murins en apoptose comparativement aux cellules seulement exposées au Cd (Pathak et Khandelwal, 2006).

La déplétion des réserves de GSH est une des conditions qui mène le Cd à se lier aux protéines fonctionnelles et à altérer ainsi le fonctionnement cellulaire normal. Nous avons aussi vérifié s'il était possible qu'un environnement offrant une protection antioxydante, ici le NAC, en co- ou prétraitement, puisse modifier l'activité MTT corrélée à la phosphorylation de ERK1/2 induite par le Cd. La coexposition NAC+ Cd a rendu les cellules moins sensibles à l'effet d'hormèse du métal, alors qu'une préexposition n'a apporté aucun changement dans l'activité MTT induite par le Cd. Nous nous serions attendus à ce qu'une préexposition induise aussi un changement dans l'activité MTT stimulée par le Cd, car il avait été préalablement observé dans les splénocytes murins qu'une préexposition à 10 mM de NAC pendant seulement 10 minutes suffisait pour diminuer la production de ERO intracellulaire et diminuer la proportion de cellules en apoptose (Pathak et Khandelwal, 2006). Cependant, nous avons utilisé une concentration 10 fois plus faible que dans cette étude, il serait donc intéressant de vérifier si en augmentant la concentration de NAC en prétraitement nous pourrions induire un changement de l'activité MTT induite par le Cd semblable à celui que nous avons observé en coexposition. Nous nous sommes questionnés sur deux conclusions possibles: est-ce que le NAC annihile le déséquilibre rédox induit par le



Cd, mais seulement en coexposition ou est-ce que le déplacement de la courbe était le résultat d'une diminution d'accumulation cellulaire de Cd suite à la formation de complexes entre le NAC et le Cd. Nous avons quantifié l'accumulation intracellulaire de Cd des cellules qui étaient prétraitées au NAC ou coexposées NAC+Cd et les résultats n'ont démontré aucune différence significative entre les conditions, ce qui signifie que la formation de complexes NAC+Cd n'empêche pas l'accumulation du métal dans la cellule et que le NAC peut réduire l'effet du déséquilibre rédox induit par le Cd sur la voie de signalisation de ERK1/2, mais seulement en coexposition. Nous en concluons donc que le stress oxydant induit par le Cd dans les entérocytes module l'activité MTT, que l'on corrèle à l'activation la voie de signalisation de ERK1/2.

Nous avons par la suite testé les conditions pro et anti oxydante dans des cellules exposées au Zn afin de comparer les effets d'un déséquilibre rédox sur la réponse induite par le Cd avec celle induite par un métal essentiel. Malgré l'absence de différence significative entre les différentes conditions sur la réponse d'activité MTT au Zn (figure 3.5 D), nous remarquons que contrairement aux changements observés en présence de BSO/BCNU et de NAC dans le cas du Cd, le déséquilibre rédox en présence de Zn semble plutôt changer les niveaux d'induction d'activité et non pas les concentrations efficaces. Cependant, nous devons faire preuve de précaution dans l'interprétation de ces résultats puisqu'en majorité ils ne sont pas statistiquement significatifs. Ainsi, un déséquilibre rédox semble être impliqué dans l'activité MTT induite par le Cd, mais il faudrait probablement évaluer l'effet d'un déséquilibre rédox sur l'activité MTT induite par le Zn d'une manière différente puisque les résultats ne sont pas concluants. Certaines études ont déjà montré une modulation des effets induits par le Zn dans une situation de déséquilibre rédox. Par exemple dans les cellules neuronales embryonnaires murines différenciées P212 il a été démontré que l'activation de ERK1/2 par le Zn mène à une augmentation de la mort cellulaire, mais qu'une incubation des cellules en présence de Zn et de NAC diminuait autant l'activation de ERK1/2 que le nombre de cellules apoptotiques (Seo *et al*, 2001). Une

autre étude avait aussi déterminé qu'un environnement prooxydant augmentait l'inhibition de la synthèse protéique induite par le Zn dans les trois lignées cellulaires pulmonaires A549, L2 et 11Lu (Walther *et al*, 1998). Nous en concluons que l'équilibre rédox est une composante importante dans la voie de signalisation de ERK1/2 induite par le Cd et le Zn, même si celui-ci n'impliquerait pas la phosphorylation de ERK1/2 et que la modulation de l'activité MTT induite par le Zn par un déséquilibre rédox demande davantage d'étude.

Afin de quantifier les ERO directement dans les cellules, nous avons utilisé la microscopie confocale afin d'analyser la fluorescence émise par la sonde DCFH-DA qui réagit à différent ERO. Le Cd induit sans aucun doute des ERO dans les cellules Caco-2 et la comparaison entre les niveaux de ERO induits par le Cd en coexposition avec le NAC ou suite à un prétraitement au NAC vient appuyer nos conclusions précédentes sur l'implication d'un déséquilibre rédox dans la stimulation de l'activité MTT. En effet, la coexposition au Cd avec du NAC permet à la fois de diminuer la fluorescence et d'améliorer la morphologie cellulaire alors que le prétraitement au NAC n'apporte aucun changement comparativement à ce qui est observé avec le Cd seul. L'effet d'une exposition simultanée aux Cd et NAC a également été observé *in vivo* pendant une expérience menée sur des rates Sprague-Dawley dans laquelle l'ajout de NAC au Cd à la diète permettait de réduire la peroxydation des lipides induite par le Cd, démontrant donc une protection contre le stress oxydatif généré par le Cd (Shaikh *et al*, 1999). Quant à l'absence d'effet du prétraitement au NAC sur la génération d'ERO par le Cd, la période de 24 heures de pré-traitement était peut-être trop longue. En effet, beaucoup d'études semblent privilégier des courtes durées de prétraitement avant l'exposition au Cd, créant un «spike» de NAC avant l'incubation avec le métal (Rao *et al*, 2000; Aueviriyavit *et al*, 2014). Cependant, le niveaux de GSH n'ont pas été mesurés durant la période de traitement au NAC, ce qui nous aurait permis de vérifier que traitement augmente bien les niveaux de GSH disponible pour la protection anti-oxydante. Cela sera considéré pour les futures études.

Aussi, il a été intéressant de constater que les conditions ayant induit le plus de ERO ont entraîné un changement morphologique des cellules qui au lieu de former une mosaïque continue devenaient très vacuolées et séparées les unes des autres. La vacuolisation du contenu cellulaire est un des signes de stress de la cellule et est souvent reliée au type de mort cellulaire caractérisé par l'accumulation de vacuoles autophagiques (González-Polo *et al*, 2005). À notre étonnement, l'ajout de BSO au Cd n'a pas augmenté les ERO comparativement au Cd seul, un résultat auquel on aurait pu s'attendre en considérant le mécanisme d'action du BSO. En déplaçant le GSH, la génération de ERO par le Cd aurait pu être exacerbée, mais il est possible que l'effet pro-oxydant du BSO se confonde dans celui du Cd qui cause probablement déjà à lui seul un grand déséquilibre rédox. Il aurait fallu vérifier l'efficacité du traitement sur les niveaux de GSH en confirmant les niveaux d'inhibition de la glutathion synthase qui est normalement ciblé par le BSO, soit en dosant directement l'activité enzymatique ou en vérifiant les niveaux de GSH. Cependant, un pré-traitement au BSO suivi d'une exposition au Cd aurait peut-être eu davantage d'impact, puisqu'il a été observé qu'un prétraitement au BSO suivi d'une exposition au Cd augmente la fluorescence de DCFH-DA comparativement à ce qui est observé avec du Cd seul (Pathak et Kandelwal, 2006). Comme il serait possible qu'une déplétion du GSH avant l'exposition au Cd ait davantage d'impacts sur la génération de ERO par le Cd que si sa synthèse est inhibée en même temps que l'exposition au Cd, nous pourrions prétraiter les cellules Caco-2 au BSO avant d'exposer au Cd pour vérifier si nous pouvons obtenir des résultats semblables à ceux de Pathak et Kandelwal (2006). Il serait intéressant par la suite de faire un parallèle avec les résultats obtenus par une situation semblable avec le NAC, qui aurait un impact seulement en coexposition avec le Cd et qui est sans effets en préexposition de 24 heures.

Les résultats obtenus en microscopie confocale ne montre pas d'augmentation de la fluorescence en présence de Zn. Comment concilier ce résultat avec ceux obtenus à la figure 3.5, où les courbes d'activité MTT induites par le Zn semblaient réagir à la

situation anti oxydante par l'ajout de NAC au métal? Le Zn contribue entre autres à l'activité de l'enzyme Cu/Zn superoxide dismutase, qui participe à la défense cellulaire contre les ERO (Zödl *et al*, 2003). Ayant relié la stimulation de l'activité MTT à de l'activité de synthèse protéique, nous pourrions corrélérer cette courbe induite par le Zn à l'activité de la Cu/Zn superoxide dismutase et cela expliquerait aussi l'absence de ERO en confocale.

Un des mécanismes de défense contre les prooxydants est la présence de molécules riches en groupement thiols: synthétisées à la suite d'un stimulus ou déjà présentes dans le milieu intracellulaire et pouvant agir comme agent réducteur pour les ERO (Sen, 2000). Le GSH a ce rôle. Nous avons vérifié l'impact de l'exposition au Cd et au Zn sur la quantité intracellulaire de thiols totaux, mais nous n'avons pas obtenu de résultats statistiquement significatifs. Toutefois, un résultat intéressant a été obtenu après avoir ajouté du BSO au Cd, le contenu en thiols a tendance à diminuer et atteint le même niveau de contenu en thiols stimulé par le Zn. La portion de thiols réduite par le BSO serait donc attribuable au GSH (Rivabene *et al.*, 1999), alors que la portion résiduelle insensible au BSO pourrait être corrélée à de la MT, puisque les MTs sont riches en thiols et leur expression, induite par la présence de nombreux métaux, incluant le Cd et le Zn, a été depuis longtemps longuement documentée dans de nombreuses lignées cellulaires incluant Caco-2 (Kägi et Valle, 1960; Bremner et Davies, 1975; Coyle *et al*, 2002; Shen *et al*, 2008; Sreenivasulu *et al*, 2010). Les travaux de Cardin *et al.* (2009) effectués dans notre laboratoire ont déjà démontré par RT-PCR que le Cd et le Zn augmente les niveaux d'ARNm de MT-IIa dans les cellules Caco-2 au jour 21. Il serait intéressant de vérifier l'effet d'un déséquilibre rédox induit par le Cd avec des conditions pro et antioxydantes sur l'induction de la MT afin de déterminer si l'induction des MTs est davantage médiée par le déséquilibre rédox induit par le Cd que celle des thiols totaux. Nous pouvons aborder cette situation de deux façons : déterminer comment les conditions pro et antioxydantes modulent les niveaux de MTs ou inhiber la synthèse de MTs pour déterminer l'importance des MTs dans la réponse

cellulaire face au déséquilibre rédox induit par le Cd et le Zn. Comme il est très difficile de doser la MT en immunobuvardage, il serait probablement plus aisé de procéder par l'inhibition de l'expression de la MT en utilisant des siARN inhibant l'expression du facteur de transcription régulant la MT (MTF-1), une pratique utilisée couramment et son efficacité a déjà été démontrée pour inhiber l'expression de MTF-1 et réguler les MTs dans la lignée Caco-2 (Yap *et al*, 2009; Kim *et al*, 2011; Hardyman *et al*, 2016).

Les résultats obtenus avec l'ajout de CHX au Cd et au Zn indiquent que la hausse d'activité MTT serait liée à une stimulation de synthèse protéique. Nous avons donc testé l'implication possible du facteur de traduction eIF4E dans la synthèse protéique corrélée à la stimulation de l'activité MTT par le Cd, car en aval de la cascade de signalisation menant à son activation se trouve ERK1/2 dont l'activité est modulée par le Cd. Nous avons vérifié si l'inhibition de RSK90 ou de Mnk1/2 avait un impact sur l'activité MTT induite par le Cd, mais nous n'avons pas obtenu de résultats significatifs. Comme il a été expliqué dans la section 3.3 du chapitre III deux voies différentes liées à ERK1/2 peuvent mener à l'activation de eIF4E, mais l'activation d'une de ces voies n'implique pas l'inhibition de l'autre. Aussi, il pourrait être pertinent de refaire le test d'activité MTT en ajoutant une autre condition, celle d'une exposition au Cd en présence des deux inhibiteurs de RSK90 et de Mnk1/2, respectivement LJ1308 et ETP-46464: cela permettrait de vérifier si le Cd peut affecter autrement l'activité de synthèse protéique induite par eIF4E, mais sans l'implication de RSK90 ou de Mnk1/2. Le Cd peut entre-autres activer la protéine kinase C (PKC) qui est connue pour induire la phosphorylation de eIF4E (Beyersmann *et al*, 1994; Whalen *et al*, 1996). Cependant, le résultat que nous avons obtenu pourrait signifier que la synthèse protéique induite par le Cd ne serait pas nécessaire dû à l'activité du facteur eIF4E. Le Cd peut aussi stimuler l'activité traductionnelle de nombreux facteurs, par exemple Joseph *et al* (2002 a,b) a démontré que l'exposition au Cd de fibroblastes murins BALB/c-3T3 entraînait la surexpression du «translation initiation factor-3» (TIF3) et du «translation elongation factor-1δ» (TEF-1δ).

Nous avons ensuite vérifié par immunobuvardage si l'activation de eiF4E est stimulée lorsque les cellules étaient exposées au Cd seul ou en présence de LJI308, de ETP-46464 ou de U0126. Le seul résultat statistiquement significatif est la diminution de la phosphorylation de eiF4E lorsque les cellules étaient coexposées au Cd + ETP-46464. Ce résultat pourrait nous indiquer que Mnk1/2 prime dans la régulation de l'activation de eiF4E, possiblement parce que cette activation est directe comparativement à l'activation par RSK90 qui est davantage indirecte, puisqu'il y a deux protéines intermédiaires (figure 3.2). Cependant, nous avons observé que lorsque les niveaux de eiF4E phosphorylés diminuent, ceux de eiF4E total diminuent aussi et nous n'avons pas observé d'activation significative de ERK1/2 avec le Cd seul. Malheureusement, il est difficile de se fier aux résultats obtenus, puisqu'il serait possible que la diminution de phosphorylation de eiF4E ne soit pas due au Cd, mais plutôt à la diminution de son expression totale. Aussi, le fait que nous n'avons pas eu d'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 stimulé par le Cd dans cette étude ne nous permet aucune conclusion sur l'action ultime du Cd sur eiF4E via ERK1/2. Cependant, dû à une erreur de manipulation, ERK1/2 total n'a pas été quantifié et cela pourrait expliquer l'absence de signal de p-ERK1/2. En effet, la perte de l'activation de ERK1/2 par le Cd est peut-être seulement dû à une inégalité dans la quantité de ERK1/2 total entre les différents échantillons. Il serait donc nécessaire de reproduire l'expérience afin d'éclaircir cette incertitude quant à l'activation de ERK1/2 dans cette étude en particulier, en prenant soin d'inclure ERK1/2 total dans les analyses.

Cependant, il faut garder à l'esprit qu'il demeure possible que l'activité de synthèse protéique soit due à l'activation d'un facteur de traduction autre que eiF4E, puisque le Cd peut influencer de nombreux mécanismes pouvant modifier la synthèse (Park *et al* 2012; So et Oh, 2015). Une autre perspective qui serait intéressante d'explorer davantage serait de vérifier l'impact que le Zn pourrait avoir sur la phosphorylation de eiF4E considérant la possibilité que le pic d'activité MTT induit par le Zn soit relié à l'activation de p38. En effet, il a été préalablement observé dans les cellules rénales



embryonnaires humaines 293T que p38 activait Mnk1 (Waskiewicz *et al*, 1997), il serait donc possible d'observer le même phénomène dans la lignée Caco-2. Le Zn pourrait modifier l'activité de eiF4E grâce à son activation par Mnk1/2. Il serait donc intéressant d'estimer les concentrations de Zn nécessaires à l'activation de p38 et d'étudier leur effet sur la phosphorylation de eiF4E.





## CHAPITRE V : CONCLUSION

La population se retrouve majoritairement exposée au Cd par son alimentation (WHO, 1992) et l'épithélium intestinal est la première barrière qu'il doit franchir pour atteindre la circulation sanguine. Les travaux du Dr Jumarie ont démontré que le Cd a tendance à s'accumuler dans les cellules entérocytaires (Jumarie *et al*, 1997; Jumarie *et al*, 1999) et une fois dans la cellule, le Cd a le potentiel d'induire des effets carcinogènes, surtout par l'induction de ERO causant du stress oxydatif (Ding et Templeton, 2000; Joseph *et al*, 2002a,b; Peraza *et al*, 1998). Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi d'utiliser la lignée de cellules entérocytaires Caco-2 afin d'étudier les effets du Cd sur l'épithélium intestinal, puisqu'elles se différencient spontanément et expriment les caractéristiques que l'on retrouve dans les cellules *in vivo*.

Des travaux précédents effectués dans notre laboratoire ont démontré que le Cd active ERK1/2 dans les cellules Caco-2 différenciées dans lesquelles ERK1/2 est normalement inactive. Ils ont corrélé cette activation à une hausse de l'activité MTT induite par le Cd et ont étudié les étapes en amont de ERK1/2 possiblement impliquées dans son activation par le Cd (Mantha et Jumarie, 2010). Suite à ces résultats, nous nous sommes demandé ce qui pouvait déclencher l'activation de ERK et avons émis l'hypothèse de l'implication d'un déséquilibre rédox. Nous avons donc comparé les effets du Cd avec ceux du Zn. D'abord, nous avons démontré que le Cd et le Zn induisent un pic d'activité MTT, mais à des concentrations différentes. Mantha et Jumarie (2010) avait corrélé ce pic d'activité MTT induit par le Cd à l'activation de ERK1/2, mais après vérification par immunobuvardage nous concluons que ce n'est pas le cas du Zn même à la concentration stimulant l'activité MTT. Cette activité induite par le Zn pourrait être due à une autre MAP kinase, la kinase p38 dont la phosphorylation par le Zn a été observée (Talukder *et al*, 2011). Nous avons ensuite réussi à écarter l'hypothèse de l'influence du Cd et du Zn sur la prolifération des cellules de 21 jours, car une augmentation de la prolifération par les métaux aurait pu

expliquer les pics d'activité MTT observés. Au 21<sup>e</sup> jour de culture, les cellules sont majoritairement en phase G1 et l'ajout des métaux n'y a rien changé. La diminution de l'activité MTT par la CHX en présence de Cd ou de Zn nous permet de conclure que l'on peut relier cette hausse d'activité MTT dans les cellules Caco-2 exposées au Cd ou au Zn à de l'induction de synthèse protéique. Cette induction de production de protéines par le Cd ou le Zn a déjà été observée dans d'autres lignées cellulaires, mais il y a peu de documentation concernant un phénomène semblable dans la lignée Caco-2 (Park *et al*, 2012; Hashizume et Yamaguchi, 1993). Nous avons démontré qu'un déséquilibre rédox par le Cd et le Zn peut moduler l'activité MTT et qu'un environnement pro- ou antioxydant peut modifier la réponse cellulaire. Nous nous étions aussi demandé par quelle voie l'activation de ERK1/2 pouvait-elle mener à une augmentation de la synthèse protéique et avons émis l'hypothèse de l'activation du facteur de traduction eIF4E. Nous n'avons pu déterminer avec assurance si le Cd pouvait moduler l'activité traductionnelle de eIF4E car les niveaux d'expression n'étaient pas significativement différents du contrôle. Il est possible que la diminution significative de la phosphorylation de eIF4E en présence de Cd et de ETP-46464 ne soit pas due à la modulation de son activation par le Cd mais plutôt à une diminution de son expression. Aussi, comme nous n'avons pas observé d'activation de ERK1/2 par le Cd sur les échantillons utilisés pour quantifier la phosphorylation de eIF4E, il est impossible de déterminer si l'activation de ERK1/2 par le Cd mène aussi à l'activation de eIF4E. Il est nécessaire de reproduire cette expérience afin de clarifier si nos résultats sont dus à des problèmes de manipulations ou à un manque de réponse cellulaire. Avec les résultats que nous avons obtenus, il pourrait aussi être intéressant d'évaluer en immunobuvardage l'effet de la modulation du déséquilibre rédox, que nous avons testé sur l'activité MTT dans ce présent mémoire, sur les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 induits par le Cd, afin de déterminer précisément si ERK1/2 dans les cellules Caco-2 est sensible au statut rédox. Nous nous attendrions qu'en présence de BSO, l'activation de ERK1/2 soit sensible au déséquilibre rédox induit par une concentration plus faible Cd, puisque l'ajout de BSO avait diminué la concentration de Cd induisant

le pic d'activité MTT et que nous avons corrélé le pic d'activité MTT à une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2. Nous pourrions aussi nous attendre à une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 en présence de Cd et de NAC, puisque l'effet stimulateur du Cd sur l'activité MTT est modifiée en présence de NAC (déplacement de la courbe dose-réponse vers la droite). Cela serait en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature, puisqu'il a été observé dans les cellules épithéliales DLD-1 de colon humain que l'ajout de NAC diminuait la phosphorylation de ERK1/2 (El-Najjar *et al*, 2010).

Depuis l'étude de Mantha et Jumarie (2010), nous avons déterminé que l'activité MTT induite par le Cd qui avait été préalablement observée est modulée par le déséquilibre rédox engendré par le Cd et que le Zn, un métal essentiel, semblait aussi induire une activité MTT médiée par un déséquilibre rédox. L'activation de ERK1/2 par le Cd dans les cellules différenciées pourrait avoir de graves conséquences puisque ERK1/2 est normalement active seulement dans les cellules prolifératives et la chute d'activité de ERK1/2, couplée à l'activation de la kinase p38, déclenche le processus de différenciation *in vitro* et *in vivo* (Aliaga *et al*, 1999). Il est important de mieux comprendre comment le Cd peut activer cette ERK1/2 qui possède un rôle important dans la prolifération cellulaire. Comment des cellules qui ne doivent pas se diviser réagiraient-elles au déclenchement d'une voie favorisant la prolifération? Quelles seraient les conséquences sur le maintien du phénotype différencié? Il est important de souligner, comme montré dans le tableau 1.1 et la figure 1.1 de l'introduction, que le Cd est présent non seulement dans l'atmosphère, mais aussi dans un très vaste éventail d'aliments. La concentration de Cd ayant induit un pic dans l'activité MTT était de 10  $\mu$ M, soit environ 1,12 ppm, ce qui est légèrement plus élevé que la plus haute concentration retrouvée au tableau 1.1 (0.4 ppm). Les effets du déséquilibre rédox induit par le Cd démontrés dans ce travail deviennent donc d'autant plus pertinents à étudier puisqu'ils reflètent une conséquence de notre exposition environnementale au Cd à long terme.



## BIBLIOGRAPHIE

- Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM et Waalkes MP (2000) *Cadmium induces c-myc, p53, and cjun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 164; 291-300
- Aliaga JC, Deschênes C, Beaulieu JF, Calvo EL et Rivard N (1999) *Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human cells*. Am. J. Physiol. 277; 631-641
- Ambrosino C et Nebreda AR (2001) *Cell cycle regulation by p38 MAP kinases*. Biol. Cell. 93; 47-51
- Angel P, Szabowski A et Schorpp-Kistner M (2001) *Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology*. Oncogene 20; 2413-2423
- Aueviriyavit S, Phummirate D et Maniratanachote (2014) *Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells- Induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles*. Tox. Let. 224; 73-83
- Aziz R, Rafiq MT, Li T, Liu T, He Z, Stoffella PJ, Sun K et Xiaoe Y (2015) *Uptake of cadmium by rice grown on contaminated soils and its bioavailability/toxicity in human cell lines (Caco-2/HL-7702)*. J. Agric. Food Chem. 63; 3599-3608
- Beyersmann D, Block C et Malviya AN (1994) *Effects of cadmium on nuclear protein kinase C*. Environ. Health Perspect. 102; 177-180
- Bissonnette P, Gagné H, Coady MJ, Benabdallah K, Lapointe JY et Berteloot A (1996) *Kinetic separation and characterization of three sugar transport mode in Caco-2 cells*. Am. J. Physiol. 270; 833-843
- Blais A, Lecoœur S, Milhaud G, Tomé D, Kolf-Clauw M (1999) *Cadmium uptake and transepithelial transport in control and long-term exposed Caco-2 cells: the role of metallothionein*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 160; 76-85
- Bremner I et Davies NT (1975) *The induction of metallothionein in rat liver by Zinc injection and Restriction of food intake*. Biochem. J. 149; 733-738
- Buechner J, Tømt E, Haug BH, Henriksen JR, Løkke C, Flaegstad T et Einvik C (2011) *The tumour-suppressor miRNAs let-7 and mir-101 target MYCN and inhibit*

*proliferation and clonogenic growth of MYCN-amplified neuroblastoma cells. Brit. J. Cancer* 105; 296-303

Cardin GB, Mantha M et Jumarie C (2009) *Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium but not zinc-induced adaptation mechanisms. Biometals* 22; 753-769

Cargnello M et Roux PP (2011) *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75; 50-83

Chalkley SR, Richmond J et Barltrop D (1998) *Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium. Occup. Environ. Med.* 55; 446-452

Cheng, H et Bjercknes M (1985) *Whole population cell kinetics and postnatal development of the mouse intestinal epithelium. Anat. Rec.* 211; 420-426

Choudhury H, Stedeford T, Donohue J *et al.* (2005). *Toxicological review of zinc and compounds. Review. Report No. EPA/635/R-05/002. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.*

Chuang SM, Wang IC et Yang JL (2000) *Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. Carcinogenesis* 21; 1423-1432

Clarkson TW (1993) *Molecular and ionic mimicry of toxic metals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32; 545-71

Coyle P, Philcox JC, Carey LC et Rofe AM (2002) *Metallothionein: the multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci.* 59; 627-47

Cuenda A et Rousseau S (2007) *p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim. Biophys. Acta;* 1358-1375

Cuenda A, Lizcano JM et Lozano J (2017) *Editorial: Mitogen Activated Protein Kinases. Front. Cell Dev. Biol.* 5; 80

Cui Y-J, Zhu Y-G, Zhai R-H, Chen D-U, Huang Y-Z, Qiu Y et Liang J-Z (2004) *Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. Envir. Inter.* 30; 785-791

Dally H et Hartwig A (1997) *Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells*. Carcinogenesis 18; 1021-1026

Deren JJ (1968) *Development of intestinal structure and function*. Handbook of Physiology. C.F. Code and W. Heidel, eds. Section 6. Alimentary Canal, Vol III, American Physiological Society, Washington, DC; 1099-1123

Ding W et Templeton DM (2000) *Activation of parallel mitogenactivated protein kinase cascades and induction of c-fos by cadmium*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 162; 93-99

Dorta DJ, Leite S, DeMarco KC, Prado IM, Rodrigues T, Mingatto FE, Uyemura SA, Santos AC et Curti, C (2003) *A proposed sequence of events for cadmiuminduced mitochondrial impairment*. J. Inorg. Biochem. 97; 251-257

Dziubla T et Butterfield DA (2016) *Oxidative Stress and Biomaterials*. AP Inc, London, UK; 35

EFSA (2009) *Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food*. EFSA J. 980; 1-139

El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Schneider-Stock R et Gali-Muhtasib H (2010) *Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling*. Apoptosis 15; 183-195

Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ et Bonkovsky HL (1998) *Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases*. J. Biol. Chem. 273; 8922-8931

Fortin C et Campbell PGC (2000) *Silver uptake by the green alga Chlamydomonas Reinhardtii in relation to chemical speciation: Influence of chloride*. Environ. Toxicol. Chem. 19; 2769-2778

Fruman DA et Rommel C (2014) *PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities*. Nat. Rev. Drug Discov. 13; 140-156

Galan A, Garcia-Bermejo ML, Troyano A, Vilaboa NE, de Blas E, Kazanietz MG et Aller P (2000) *Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells*. J. Biol. Chem. 275; 11418-11424



- Gazaryan IG, Krasnikov BF, Ashby GA, Thorneley RNF, Kristal BS et Brown AM (2002) *Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase*. J. Biol. Chem. 272; 10064-10072
- Gonzalez-Polo R-A, Boya P, Pauleau A-L, Jalil A, Larochette N, Souquère S, Eskelinen E-L, Pierron G, Saftig P et Kroemer G (2005) *The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death*. Jour. Cell Sci. 118; 3091-3102
- Goodfellow IG et Roberts LO (2008) *Molecules in focus eukaryotic initiation factor 4E*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40; 2675-2680
- Gordon JI et Hermiston ML (1994) *Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium*. Cur. Opin. Cell Biol. 6; 795-803
- Groulx J-F, Khalfaoui T, Benoit YD, Bernatchez G, Carrier JC, Basora N et Beaulieu J-F (2012) *Autophagy is active in normal colon mucosa*. Autophagy 8; 893-902
- Grune T (2005) *Oxidants and antioxidant defense systems*. Springer, NY; 110-129
- Hamel P, Abed E, Brissette L, Moreau R (2008) *Characterization of oxidized low-density lipoprotein-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells*. Am. J. Physiol. 294; 1021-1033
- Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV et Ulevitch RJ (1997) *Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation*. Nature 38; 296-299
- Hao C, Hao W, Wei X, Xing L, Jiang J et Shang L (2009) *The role of MAPK in the biphasic dose response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells*. Toxicol. In Vitro 23; 660-666
- Hardyman JEJ, Tyson J, Jackson KA, Aldridge C, Cockbell SJ, Wakeling LA, Valentine RA et Ford D (2016) *Zinc sensing by metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) controls metallothionein and ZnT1 expression to buffer the sensitivity of the transcriptome response to zinc*. Metallomics 8; 337-343
- Hashizume M et Yamaguchi M (1993) *Stimulatory effect of  $\beta$ -alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells*. Mol. Cell. Bioch. 122; 59-64



- Hassanien MA et El Shahawy AM (2011) *Environmental heavy metals and mental disorders of children in developing countries*. Sprin. Sci. Busin. Media B.V.; 1-25
- Henning S et Kretchmer N (1973) *Development of intestinal function in mammals*. Enzyme 15; 3-23
- Heyno E, Klose C et Krieger-Liszkay A (2008) *Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasmamembrane NADPH oxidase*. New Phytol. 179; 687-699
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A et Karin M (1993) *Identification of an oncoprotein-and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the C-Jun Activation domain*. Gen. & Develop. 7; 2135-2148
- Hodes G (2013) *Perovskite-Based Solar Cells*. Science 342; 317-318
- Hogstrand C, Kille P, Nicholson R.I. et Taylor K.M. (2009) *Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation*. Trends Mol. Med. 15; 101-111
- Hou J, Lam F, Proud C et Wang S (2012) *Targeting Mnks for cancer therapy* Oncotarget, 3; 118-131
- Hyun JS, Satsu H et Shimizu M (2007) *Cadmium induces Interleukin-8 production via NF- $\kappa$ B activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2*. Cytokine 37; 26-34
- Iryo Y, Matsuoka M, Wispriyono B, Sugiura T et Igisu H (2000) *Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells*. Biochem. Pharmacol. 60; 1875-1882
- Iwasa J et Marshall W (2016) *Biologie cellulaire et moléculaire de Karp*. DeBoeck Supérieur, 4<sup>ème</sup> édition; 490
- Jarup L, Persson B, Edling C, Elinder CG (1993) *Renal function impairment in workers previously exposed to cadmium*. Nephron 64; 75-81
- Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G et Vahter M (1998) *Health effects of cadmium exposure-a review of the literature and a risk estimate*. Scand. J. Work Environ. Health 24; 1-52

- Jiang G, Duan W, Xu L, Song S, Zhu C et Wu L (2009) *Biphasic effect of cadmium on cell proliferation in human embryo lung fibroblast cells and its molecular mechanism*. *Toxicol. In Vitro* 23; 9773-9978
- Joseph P, Muchnok TK, Klishis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ et Ong TM (2001) *Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc protooncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species*. *Toxicol. Sci.* 61; 295-303
- Joseph P, Lei YX, Whong WZ et Ong TM (2002a) *Molecular cloning and functional analysis of a novel cadmium-responsive proto-oncogene*. *Cancer Res.* 62; 703-707
- Joseph P, Lei YX, Whong WZ et Ong TM (2002b) *Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene*. *J. Biol. Chem.* 277; 6131-6136
- Jumarie C et Malo C (1991) *Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 149; 24-33
- Jumarie C, Campbell PGC, Berteloot A, Houde M, Denizeau F (1997) *Caco-2 cell line used as an in vitro model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells*. *J. Membr. Biol.* 158; 31-48
- Jumarie C, Campbell PGC, Houde M et Denizeau F (1999) *Evidence for an Intracellular Barrier to Cadmium Transport Through Caco-2 Cell Monolayers*. *J. Cell. Physiol.* 180; 285-297
- Kägi JHR et Vallee BL (1960) *Metallothionein: a Cadmium- and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex*. *J. Biol. Chem.* 235; 3460-3465
- Kidambi S, Yarmush J, Berdichevsky Y, Kamath S, Fong W et SchianodiCola J (2010) *Propofol induces MAPK/ERK cascade dependant expression of cFos and Egr-1 in rat hippocampal slices*. *BMC Research Notes*; 3-201
- Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH et Jeong HG (2011) *Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells*. *FBS Lett.* 585; 421-428
- Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N et Lawrence JC (1994) *PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation*. *Science* 266; 653-656

- Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Cañadas S et Gonzalez MP (2006) *Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture*. Free Radic. Biol. Med. 40; 940-951
- Lou, M, Garay R et Alda JO (1991) *Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells*. J. Phys. 443; 123-136
- Malo C et Ménard D (1983) *Synergistic effects of insulin and thyroxine on the differentiation and proliferation of epithelial cells of suckling mouse intestine*. Biol. Neonate 44; 177-184
- Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A et Brot-Laroche E (1992) *Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon*. Am. J. Physiol. 263; 312-318
- Mantha M et Jumarie C (2010) *Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation*. J. Cell. Physiol. 224: 250-261
- Maret W, Jacob C, Valle BL et Fischer EH (1999) *Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96; 1936-1940
- Maret W (2008) *Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc*. Exp. Gerontol. 43; 363-369
- Marieb E (2005) *Anatomie et physiologie humaine*. 3<sup>ème</sup> édition française: ERPI, ch.23; 933-935
- Martin P, Poggi MC, Chambard JC, Boulukos KE et Pognonec P (2006) *Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 350; 803-807
- Matsui T et Yamaguchi M (1995) *Zinc modulation of insulin-like growth factor's effect in osteoblastic MC3T3-E1 cells*. Peptides 16; 1063-1068
- McCarthy TJ, Zeelie JJ et Krause DJ (1992) *The antimicrobial action of zinc ion/antioxidant combinations*. Clin. Pharma. Thera. 17; 51-54
- Moog F (1981) *Perinatal development of the enzymes of the brush border membrane*. Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy, Raven Press, New York; 139-147

Moog F et Goellner JJ (1982) *Chick embryo intestine in culture: Influence of insulin and other hormones on sucrase, maltase and alkaline phosphatase*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutri. 1; 401-410

Nohl H (1990) *Is redox-cycling ubiquinone involved in mitochondrial oxygen activation?* Free Radic. Res. Commun. 8; 307-315

Nordberg GF, Fowler BA et Nordberg M (2015) *Handbook on the toxicology of metals*. Quatrième édition, Elsevier, V I et II.

Ogawa T, Kobayashi E, Okubo Y, Suwazono Y, Kido T et Nogawa K (2004) *Relationship among prevalence of patients with Itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the Jinzu River basin, Toyama prefecture of Japan*. Int. J. Environ. Health Res. 14; 243-52

Pade V et Stavchansky S (1997) *Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the caco-2 cell culture model*. Pharma. Res. 14; 1210-1215

Pageot L-P, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P et Beaulieu J-F (2000) *Human cell models to study small intestinal functions: Recapitulation of the crypt-villus axis*. Micros. Res. Tech. 49; 397-406

Pandey NR, Vardatsikos G, Mehdi MZ et Srivastava AK (2010) *Cell-type-specific roles of IGR-1R and EGFR in mediating Zn<sup>2+</sup>-induced ERK1/2 and PKB phosphorylation*. J. Biol. Inorg. Chem. 15; 399-407

Park Y-K, Hong H et Jang B-C (2012) *Transcriptional and translational regulation of COX-2 expression by cadmium in C6 glioma cells*. Int. J. Mol. Med. 30; 960-966

Pathak N et Khandelwal S (2006) *Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium*. Toxicology, 220; 26-36

Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E et Rael LT (1998) *Effects of micronutrients on metal toxicity*. Enviro. Health Pers. 106; 203-216

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assman P, Haffen K, Fogh et J, Zweibaum A (1983) *Enterocytic-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture*. Biol. Cell. 47; 323-330

Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD et Cardozo LJ (2007) *Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress*. Am. J. Clin. Nutr. 85; 837-844

Prasad AS, Bao B, Beck FW et Sarkar FH (2011) *Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB*. Nutrition 27; 816-823

Rao RK, Li L, Baker RD, Baker SS et Gupta A (2000) *Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279; 332-340

Reeves PG et Chaney RL (2004) *Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets*. Environ. Res. 96; 311-22

Rivabene R, Mancini E et De Vincenzi M (1999) *In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implication for coeliac disease*. Biochim. Biophys. Acta 1453; 152-160

Roels HA, Van Assche FJ, Oversteyns M, De Groof M, Lauwerys RR, Lison D (1997) *Reversibility of microproteinuria in cadmium workers with incipient tubular dysfunction after reduction of exposure*. Am J Ind Med 31; 645-652

Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyer-Fessard C, Dussaulx E, Trugnan G, Boige N, Brun JL et Zweibaum A (1985) *Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin*. J. Cell. Physiol. 123; 377-385

Samet JM, Lee MG, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg PA et Reed W (1998) *Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals*. Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol. 275; 551-558

Sandstead HH (1994) *Understanding zinc: recent observations and interpretations*. J. Lab. Clin. Med. 124; 322-327

Sauer K et Thauer RK (2000) *Methyl-coenzyme M formation in methanogenic archaea. Involvement of zinc in coenzyme M activation*. Eur. J. Biochem. 267; 2498-2504

- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B et Liu JO (2010). *Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin*. Nat. Chem. Biol. 6; 209-217
- Sen CK (2000) *Cellular thiols and redox-regulated signal transduction*. Curr. Top. Cell. Regul. 36; 1-30
- Seo SR, Chong SA, Lee S-I, Sung JY, Ahn YS, Chung KS et Seo JT (2001) *Zn<sup>2+</sup>-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells*. J. Neurochem. 78; 600-610
- Shaikh ZA, Vu TT et Zaman K (1999) *Oxidative Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Renal Toxicity and Protection by Antioxidants*. Toxicol. App. Pharm. 154; 256-263
- Shen H, Qin H et Guo J (2008) *Cooperation of metallothionein and zinc transporters for regulating zinc homeostasis in human Caco-2 cells*. Nutri. Res. 28; 406-413
- Sigel, A et Sigel H (1999) *Metals ions in biological systems*. Marcel Dekker Inc, NY, Vol 36; 2-4
- Skipper A, Sims JN, Yedjou CG et Tchounwou PB (2016) *Cadmium chloride induces DNA damages and apoptosis of human liver carcinoma cells via oxidative stress*. Int. J. Environ. Res. Public Health 13; 88
- Suh E et Traber PG (1996) *An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation*. Mol. Cell. Biol. 16; 619-625
- Talukder P, Satho T, Irie K, Sharmin T, Hamady D, Nakashima Y, Kashige N et Miake F (2010) *Trace metal zinc stimulates secretion of antimicrobial peptide LL-37 from Caco-2 cells through ERK and p38 MAP kinase*. Int. Immuno. 11; 141-144
- Thévénod F (2009) *Review: Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be?* Toxicol. App. Pharm. 238; 221-239
- Thornton TM et Rincon M (2009) *Non-Classical p38 MAP kinase functions: cell cycle checkpoints and survival*. Int. J. Biol. Sci. 5; 44-52
- Traber PG (1994) *Differentiation of intestinal epithelial cells: lessons from the study of intestine-specific gene expression*. J. Lab. Clin. Med. 128; 467-477



- Vega-Avila E et Pugsley MK (2011) *An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells*. Proc. West. Pharmacol. Soc. 54; 10-14
- Waisberg M, Joseph P, Hale B et Beyersmann D (2003) *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology, 192; 95-117
- Wang Z et Templeton DM (1998) *Induction of c-fos proto-oncogene in mesangial cells by cadmium*. J. Biol. Chem. 273; 73-79
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG et Cooper JA (1997) *Mitogen-activated protein kinases activates the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2*. EMBO J. 16; 1909-1920
- Weast RC (1986) *Handbook of chemistry and physics*, sixty seventh ed. CRC Press, Boca Raton, FL
- Weiss RH (2003) *p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers*. Cancer Cell 4; 425-429
- Whalen SG, Gingras A-C, Amankwa, L, Mader S, Branton PE, Aebersold R et Sonenberg N (1996) *Phosphorylation of eIF-4E on Serine 209 by Protein Kinase C Is Inhibited by the Translational Repressors, 4E-binding Proteins*. J. Biol. Chem. 271; 11831-11837
- WHO (World Health Organization) (1992) *Cadmium*. Environmental Health Criteria, vol 134, WHO, Geneva.
- Wu W, Graves LM, Jaspers I, Devlin RB, Reed W et Samet JM (1999) *Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals*. Am. J. Physiol. 277; 924-931
- Yap X, Tan H-Y, Huang J, Lai Y, Yip G.W-C, Tan P-H et Bay B-H (2008) *Over-expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer*. J. Pathol. 217; 563-570
- Zödl B, Zeiner M, Sargazi M, Roberts NB, Marktl W, Steffan I et Ekmekcioglu C (2003) *Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells*. J. Inor. Biochem. 97; 3214-330
- Zundahl S (1998) *Chemical Principles*. 3rd edition, Houghton Mifflin Co., New York, pp 710-711 et 1019-1020

