

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CONSÉQUENCES DE L'ACTIVATION DE ERK PAR LE CADMIUM SUR
L'ACTIVITÉ AUTOPHAGIQUE INTESTINALE EN FONCTION DE L'ÉTAT DE
DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MYRIAM MIREAULT

JANVIER 2020

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

Un énorme merci à ma directrice de recherche, le Pr. Catherine Jumarie, sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Elle a été présente pour moi tout au long de ma maîtrise, elle m'a soutenue et m'a encouragée à poursuivre mes idées. C'est une directrice de recherche exceptionnelle et j'ai eu beaucoup de chance de la côtoyer pendant ces deux années de maîtrise. Je la remercie pour sa confiance, son dévouement, sa patience, ses conseils et pour l'opportunité qu'elle m'a donnée d'accomplir ce beau parcours.

Merci à Denis Flipo qui m'a permis d'apprendre de nouvelles techniques de laboratoire telles que la microscopie confocale ainsi que la cytométrie en flux (FACs). Merci à mes collègues de laboratoire, Daphnée Gariépy, Joannie Lemaire et Charbel Hanna pour les belles discussions partagées, les rires et les fous rires.

Merci à mes ami-es d'avoir été présents pour moi et de m'encourager. Ils ont été d'un support incroyable et je les adore. Merci à ma partenaire de laboratoire et amie, Maggy Lépine, sur qui je peux toujours compter quoi qu'il arrive. Depuis le début du baccalauréat, nous accomplissons notre parcours académique ensemble et ce parcours se poursuit au doctorat. Je suis choyée de partager cette aventure avec elle.

Merci à ma famille pour tout le soutien qu'elle m'apporte au quotidien.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents, qui m'encouragent depuis que je suis toute petite à poursuivre mes rêves. Si je suis rendue où je suis présentement, c'est grâce à eux. Je les aime énormément et je leur dédie tout ce beau travail.

DÉDICACE

À mes parents

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
RÉSUMÉ.....	xvi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Cadmium.....	1
1.1.1 Source d'exposition.....	2
1.1.2 Toxicité	4
1.2 Processus cellulaires étudiés.....	6
1.2.1 Stress oxydatif.....	6
1.2.2 ERK.....	8
1.2.3 Autophagie	9
1.3 Épithélium intestinal.....	13
1.3.1 Physiologie intestinale	13
1.3.2 Transport paracellulaire vs transcellulaire	16
1.3.3 Dommages épithéliaux.....	17
1.4 Lignée cellulaire Caco-2.....	18
1.5 Objectifs et hypothèse.....	21
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	24
2.1 Culture cellulaire	24
2.2 Immunobuvardage	25
2.3 Analyse des autolysosomes par un marquage à l'acridine orange (AO).....	27
2.4 Analyse des ROS à l'aide de la sonde 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (effectué par Joannie Lemaire).....	27

2.5	Accumulation cellulaire de Cd (effectué par Daphné Gariépy)	28
2.6	Tests statistiques	28
CHAPITRE III RÉSULTATS.....		29
3.1	L'activité de ERK et le nombre d'autolysosomes diminuent lors de la différenciation entérocytaire	29
3.2	L'activité de ERK modifie l'autophagie dans les cellules indifférenciées.....	32
3.3	Un sevrage en FBS modifie les niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques	33
3.4	Une exposition de 24 h au Cd est nécessaire pour optimiser les niveaux de p-ERK et du marqueur autophagique LC3	35
3.5	Une exposition au Cd modifie les niveaux de LC3-II et de SQSTM1	37
3.6	Un sevrage en glucose modifie l'activité de ERK et celle de l'autophagie.....	39
3.7	L'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd impliquent l'induction des ROS.....	42
CHAPITRE IV DISCUSSION		47
4.1	L'activité de ERK et celle de l'autophagie diminuent considérablement dans les cellules différenciées	47
4.2	L'activité de ERK, basale ou induite par le Cd, influence l'autophagie	49
4.3	Une exposition de 24 h au Cd est nécessaire pour optimiser l'activation de ERK et les niveaux de LC3.....	50
4.4	L'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd impliquent l'induction de ROS	51
4.5	L'induction de l'activité autophagique par un sevrage en glucose implique l'activation de ERK	54
4.6	Un sevrage en FBS modifie les niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques	55
4.7	La β -actine comme contrôle de chargement.....	56
4.8	Étudier le flux autophagique permettrait de connaître à quelle étape du processus autophagique le Cd agit.....	57
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		59

ANNEXE A FIGURE SUPPLÉMENTAIRE.....64

BIBLIOGRAPHIE65

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Trois différentes formes d'autophagie présentes dans la cellule.....	11
1.2 Répartition des cellules indifférenciées et différenciées dans la crypte intestinale.....	15
1.3 Images en microscopie des différents stades de croissance des cellules Caco-2.....	19
1.4 Courbe dose-réponse de l'activité MTT en fonction des jours de cultures.	22
3.1 Comparaison des niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 ainsi que du nombre d'autolysomes entre les cellules indifférenciées (7 jours) et les cellules différenciées (21 jours).....	31
3.2 Corrélation entre les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 des cellules indifférenciées (7 jours).....	33
3.3 Effet du temps de sevrage en FBS sur les niveaux de p-ERK et les marqueurs autophagiques LC3 et SQSTM1.....	35
3.4 Effet du temps d'exposition au Cd sur les niveaux de p-ERK et sur les niveaux des marqueurs autophagiques LC3 et SQSTM1.....	37
3.5 Corrélation entre les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 des cellules différenciées (21 jours).....	39
3.6 Corrélation entre les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 lors d'un sevrage de 48 h en glucose.....	41

3.7	Implication d'un déséquilibre redox dans la formation d'autolysosomes par le Cd.....	43
3.8	Effet de conditions prooxydantes sur les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 en présence de Cd.....	44
3.9	Effet de conditions antioxydantes sur les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 en présence de Cd.....	46
5.1	Schéma qui résume la voie de signalisation suggérée menant à l'autophagie suite à une exposition à 10 μ M de Cd ou à un sevrage en glucose.	61
5.2	Exemple d'un résultat de cytométrie en flux avec double marquage FITC-Annexine V/PI.	63
S1	Effet de l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) et du prooxydant L-buthionine-sulfoximine (BSO) sur l'induction d'un déséquilibre redox par le Cd.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Concentration de Cd dans certains végétaux.....	3

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

3-MA	3-methyladenine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Atg7	<i>Autophagy related 7</i>
BSO	L-Buthionine sulfoximine
Ca ²⁺	Ion calcium
Caco-2	<i>Carcinoma colon cell line</i>
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
Cd ²⁺	Ion cadmium
CdCl ₂	Dichlorure de cadmium
CO ₂	Dioxyde de carbone

DCFH-DA	2,7-dichlorofluorescein diacetate
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAO	Organisation pour l'alimentation et l'agriculture
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fe ²⁺	Ion ferreux
GDP	Guanosine diphosphate
GLUT-5	<i>Glucose-transporter 5</i>
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GTP	Guanosine triphosphate

H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
hFOB 1,19	<i>Human fetal osteoblastic cell line</i>
HNO ₃	Acide nitrique
HO [•]	Hydroxyle
HSP70	Protéines de choc thermique 70
IARC	Centre international de recherche sur le cancer
ICP-MS	Spectromètre de masse à plasma à couplage inductif
JECFA	Comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires
K562	<i>Human CML cell line</i>
KU812	<i>Human CML cell line</i>
LAMP-2a	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2a</i>
LC3	Chaîne légère 3
LOAEL	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MEK	<i>Mitogen protein kinase kinase</i>
MES-13	<i>Mesangial cells</i>
MKP	<i>Mitogen-activated protein phosphatase</i>
MTs	Métallothionéine
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAC	N-acétylcystéine
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NER	Réparation par excision de nucléotide
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
Nramp2	<i>Natural resistance associated macrophage protein</i>
NRCC	<i>National Research Council of Canada</i>
O ₂ ⁻	Superoxyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Tampon phosphate salin
PD98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-J-benzopyran-4-one

PI	Iodure de propidium
PI	<i>Phosphoinositide</i>
PI3-K III	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3P	<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PS	Phosphatidylsérine
PTWL	<i>Provisional tolerable weekly intake</i>
P62/SQSTM1	<i>Sequestosomes 1</i>
PVDF	Membrane de polyfluorure de vinylidène
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Proto-Oncogene Proteins p21</i>
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGLT1	<i>Sodium-glucose transporter 1</i>
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>

SOS	<i>Son of Sevenless</i>
TBS	Tampon Tris Salin
U0126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene

RÉSUMÉ

Le cadmium (Cd) est un métal toxique principalement relâché par les métallurgies auquel la population générale est exposée par voie orale via l'ingestion d'aliments contaminés. L'épithélium intestinal devient alors la principale barrière de protection contre le Cd. Ce métal affecte les cascades de signalisation dont celle de la kinase ERK qui régule la différenciation entérocytaire. Des études antérieures menées sur les cellules intestinales humaines Caco-2 ont montré que le Cd, à des concentrations non cytotoxiques, active ERK en p-ERK dans les entérocytes matures où ERK est normalement peu active et que cela se manifeste par une augmentation de l'activité mitochondriale déshydrogénase (MTT). Par ailleurs, d'autres études ont montré que p-ERK peut activer l'autophagie. L'ensemble de ces observations nous suggère que l'activation de ERK par le Cd peut modifier l'activité autophagique. Plus précisément, l'activation de ERK par le Cd dans les cellules différenciées augmenterait l'activité autophagique normalement faible. Nos résultats montrent que l'activité de ERK et de l'autophagie varient en fonction du stade de différenciation entérocytaire. Elles sont plus élevées dans les cellules indifférenciées et elles diminuent considérablement dans les cellules différenciées. Une exposition de 24 h à 10 μ M de Cd permet l'activation maximale de ERK dans les entérocytes matures. Tel que révélé par les variations protéiques de deux marqueurs d'autophagie, LC3 et SQSTM1, l'activité de ERK, basale ou induite par le Cd, active l'autophagie dans les cellules Caco-2. Finalement, l'implication d'un déséquilibre redox a été étudiée en utilisant la N-acétylcystéine (NAC) comme antioxydant et le L-buthionine-sulfoximine (BSO) comme prooxydant. La NAC diminue l'activation de ERK et de l'autophagie induites par le Cd alors que le BSO a l'effet inverse. Ainsi, l'induction des ROS par le Cd active ERK qui active à son tour l'autophagie. Ces résultats suggèrent que de faibles concentrations de Cd pourraient perturber les mécanismes de régulation du renouvellement de l'épithélium intestinal.

Mots clés : Autophagie, Cd, Caco-2 et ERK

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Cadmium

Le cadmium (Cd) est un métal de transition cristallin de couleur blanc argenté présent dans les sols, les sédiments, l'air et l'eau. Il se caractérise par un poids moléculaire de 112,4 g/mol, une densité de 8,6 g/ml et un état d'oxydation de 2+. Ce métal est également malléable, ce qui facilite son utilisation dans l'industrie (Nordberg *et al.*, 2011).

La forme toxique du Cd est le cation Cd^{2+} qui possède des propriétés physico-chimiques semblables à celles du calcium et du zinc (Nordberg *et al.*, 2011; Thevenod et Lee, 2013). Étant un métal non essentiel, le Cd ne possède pas de transporteur à la surface de la cellule. Ses caractéristiques physico-chimiques lui confèrent la capacité de compétitionner avec les métaux essentiels pour utiliser leur transporteur et s'accumuler dans la cellule (Thevenod et Lee, 2013). Chez l'humain, le Cd possède une demi-vie d'environ 20 ans ce qui le rend préoccupant comme substance toxique (Thevenod, 2009).

1.1.1 Source d'exposition

Environ 30 000 tonnes de Cd sont relâchées dans l'atmosphère chaque année dont 13 000 tonnes proviennent de l'industrialisation (Rani *et al.*, 2014; Thevenod, 2009). Les métallurgies et les secteurs énergétiques, tels que les batteries et les réacteurs nucléaires, sont les principales sources de contamination au Cd. Toutefois, il peut se retrouver dans le secteur agricole dans le cas des engrais phosphatés et dans les boues d'épuration contaminées (Cardin *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2014; Thevenod, 2009; Waisberg *et al.*, 2003). L'industrialisation n'est pas la seule cause de libération de Cd, il peut également provenir de sources naturelles. Par exemple, la croûte terrestre se compose de Cd en association avec le zinc. Lors des dépôts atmosphériques, il y a un relâchement de Cd dans l'environnement (Thevenod, 2009). Les vents déplacent les particules du sol et permettent d'étendre et d'augmenter la zone de contamination. Les feux de forêt et l'activité volcanique sont d'autres sources pouvant contribuer à la libération de Cd dans l'environnement (Waisberg *et al.*, 2003).

L'exposition au Cd peut se faire en milieu de travail ou dans le confort de la maison. Le cadmium est inhalé chez les travailleurs via l'air contaminé alors que pour la population en général, il est soit inhalé via la fumée de cigarette ou absorbé par voie orale via l'alimentation (Cardin *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2014). Environ 75% de la contamination alimentaire provient des végétaux (Olsson *et al.*, 2005). En effet, une fois relâché dans l'environnement, le Cd s'accumule dans les sols où il est absorbé par les végétaux via le système racinaire. Dans la plante, il se localise principalement au niveau des feuilles et des racines. De cette façon, il fait son entrée dans la chaîne alimentaire (Cardin *et al.*, 2009; Nordberg *et al.*, 2014). Dans ce contexte, l'épithélium intestinal devient le premier tissu exposé au Cd ingéré (Mantha et Jumarie, 2010). Par la suite, il entre dans la circulation sanguine et il s'accumule dans le foie, les reins, le cerveau et les testicules où il peut causer divers dommages (Rani *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

La concentration de Cd dans les aliments varie selon le niveau de contamination des sols et de l'emplacement des champs. Certains aliments possèdent des niveaux très élevés de Cd, dont la laitue où les concentrations peuvent atteindre 100 µg/g (Tableau 1.1). La laitue est uniquement constituée de feuilles, soit le site d'accumulation du Cd. Cela peut expliquer les niveaux élevés de Cd dans cette plante. Le chou est un autre végétal feuillu où les concentrations moyennes de Cd sont élevées, soit une moyenne de 15,17 µg/g. Les végétaux racinaires tels que les carottes et les radis ont des concentrations de Cd un peu plus faibles, mais qui restent tout de même élevées. La concentration moyenne de Cd dans les carottes est de 3,7 µg/g alors que celle dans les radis est de 5,51 µg/g (Alloway *et al.*, 1990).

Tableau 1.1 Concentration de Cd dans certains végétaux

Végétaux	Moyenne (µg/g)	Intervalle (µg/g)
Carottes	3,71	0,30 - 8,60
Choux	15,17	0,50 - 79,5
Laitue	18,04	LOD - 100
Radis	5,51	0,40 - 54,00

*LOD correspond à la concentration se trouvant sous la limite de détection. Adapté de Alloway *et al.* (1990)

Suite à plusieurs intoxications au Cd, l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et le comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA) se sont réunis en 1989 afin d'établir une dose hebdomadaire tolérable provisoire (PTWL). Basée sur la plus faible dose ayant eu un effet observable chez l'espèce la plus sensible (LOAEL), la PTWL est établie à 7 µg/kg de poids corporel/semaine, ce qui correspond à 1 µg/kg de poids corporel/jour ou à 70 µg/jour (Satarug et Moore, 2004). Toutefois, dans certains pays, l'exposition au Cd se rapproche des limites fixées par ces organisations, alors que, dans d'autres pays, même si elle se situe en dessous, des effets reliés à l'intoxication au Cd

sont observés. Cela préoccupe les organisations qui prennent conscience que les restrictions ne sont pas assez sévères pour protéger la population contre les effets néfastes de ce métal (Satarug et Moore, 2004).

1.1.2 Toxicité

Le cadmium a été découvert en 1817 comme élément chimique par le chimiste allemand F. Strohmeier, mais ce n'est qu'en 1919 que les premières études de toxicité ont vu le jour. En 1968, il a été découvert qu'une exposition chronique au Cd était responsable de la maladie de Itai-itai observée au Japon dans les années suivant la Seconde Guerre mondiale. Celle-ci était provoquée par de l'émission de Cd provenant des mines. Ce métal s'accumulait dans les rivières et les japonais utilisaient cette eau pour irriguer les plantations de riz. Cette exposition entraînait l'anémie, des dysfonctionnements gastro-intestinaux et rénaux ainsi que des fractures des os qui causaient des douleurs intenses. Suite à ce cas majeur de contamination, les recherches sur la toxicité du Cd se sont multipliées (Nordberg, 2009).

Depuis, les études ont montré que le Cd entraîne plusieurs dommages au niveau des organes et des tissus d'accumulation. Par exemple, dans le cerveau, le Cd peut réduire la durée de l'attention, entraîner des dysfonctions olfactives ainsi que des déficits de mémoire. De plus, il peut être impliqué dans des maladies dégénératives, telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Wang *et al.*, 2015). Son accumulation dans les reins entraîne des dysfonctions rénales, une insuffisance rénale ainsi qu'une augmentation de l'excrétion urinaire de protéines de faible poids moléculaire (Rani *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009b). Lorsqu'il est inhalé par les travailleurs ou les fumeurs, il s'accumule dans les poumons où il altère les voies respiratoires. Tout dépendamment de la dose inhalée, le Cd peut provoquer un emphysème, l'anosmie et la rhinite (Rani *et al.*, 2014).

En 1993, ce métal a été classé cancérigène de type 1 par le centre international de recherche sur le cancer (IARC). Le cadmium interfère avec des mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN favorisant ainsi la carcinogenèse suite à des dommages oxydatifs (Rani *et al.*, 2014). Toutefois, il est un co-mutagène puisqu'il n'engendre pas directement de mutations de l'ADN (Thevenod, 2009). Le cadmium inhibe plusieurs mécanismes de la réparation de l'ADN, soit la réparation par excision de base, la réparation par excision de nucléotide (NER), la réparation des mésappariements de l'ADN et l'élimination du précurseur de l'ADN pré-mutagène 8-oxodGTP (Rani *et al.*, 2014). Par exemple, lors de la réparation de l'ADN par excision d'une base, le Cd induit un déséquilibre redox qui diminue la transcription de la protéine hOGG1, une enzyme qui possède une activité glycosylase de l'ADN. Celle-ci est responsable de l'initiation de la réparation de la 8-oxoguanine, soit la forme mutagène de la guanine oxydée (Rani *et al.*, 2014). Le cadmium interfère également avec le mécanisme d'action des protéines essentielles à la réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER). Ce métal perturbe leur association et leur dissociation inhibant ainsi la réparation de type NER. Par exemple, la protéine suppressive de tumeur p53 se lie à l'ADN à partir de son domaine de liaison au zinc. Toutefois en présence de Cd, la conformation de p53 est modifiée. Cela empêche sa liaison avec l'ADN et diminue la transcription de gènes impliqués dans la réparation de type NER (Rani *et al.*, 2014). Un autre mécanisme perturbé par ce métal est la réparation des mésappariements de l'ADN (*mismatch repair* (MMR)). Le cadmium inhibe la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) permettant l'hydrolyse du complexe MSH2-MSH6 du MMR nécessaire à la réparation des mésappariements. Cela peut provoquer des erreurs de réplication entraînant des mutations de gènes et des fonctions défectueuses, dont une prolifération cellulaire aberrante ou bien une apoptose imparfaite (Rani *et al.*, 2014).

Le cadmium peut également affecter la signalisation de seconds messagers, tels que le Ca^{2+} , l'AMPC et le NF- κ B. Puisque la forme ionique du Cd (Cd^{2+}) est semblable à celle

du calcium (Ca^{2+}), il peut le déplacer de ses sites de liaison affectant ainsi l'homéostasie du Ca^{2+} dans la cellule. Cela affecte ses fonctions physiologiques, dont la mobilité, l'endocytose et l'apoptose. L'AMPc est un second messenger impliqué dans l'activation de certaines enzymes métaboliques, de canaux ioniques et de transporteurs. De plus, il a un rôle dans la prolifération cellulaire. Le Cd modifie les niveaux de l'AMPc et par le fait même ses fonctions. Une autre voie affectée par le Cd est celle de NF- κ B. En empêchant la liaison de NF- κ B à l'ADN, le Cd inhibe l'apoptose, l'adhésion cellulaire, la prolifération, l'inflammation et la réponse cellulaire à un stress (Thevenod, 2009; Thevenod et Lee, 2013). Par ailleurs, des études ont montré que le Cd, notamment via l'induction d'espèce réactive de l'oxygène (ROS), affecte la cascade de signalisation de la kinase ERK qui régule la différenciation entérocytaire ainsi que l'activité autophagique (Lv *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2009b; Xu *et al.*, 2016).

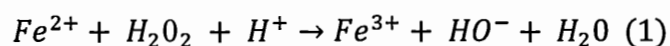
1.2 Processus cellulaires étudiés

1.2.1 Stress oxydatif

Le stress oxydatif se produit lorsqu'il y a un déséquilibre redox, c'est-à-dire lorsqu'il y a un déséquilibre entre les mécanismes de défense antioxydante et les pro-oxydants favorisant l'augmentation des pro-oxydants. Cela provoque des dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines et à l'ADN (Thevenod, 2009). Il y a deux classes de métaux impliqués dans le stress oxydatif, les métaux redox-actifs et les métaux redox-inactifs. Les métaux redox-actifs dont le fer, le cuivre et le chrome possèdent plusieurs états d'oxydation leur permettant de participer aux réactions d'oxydo-réduction. La seconde classe, comprenant le plomb et le mercure, ne participent pas aux réactions redox puisqu'ils possèdent un seul état d'oxydation. Ils agissent sur les mécanismes de défense de la cellule en épuisant les antioxydants et les enzymes avec des groupements thiols responsables de neutraliser les ROS. Cela a pour effet d'augmenter les ROS, tels

que les radicaux hydroxyles (HO^-), les radicaux superoxydes (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la cellule (Rani *et al.*, 2014).

Le cadmium possède un seul état d'oxydation ($2+$), ce qui le classe parmi les métaux redox-inactifs. Il ne participe pas directement aux réactions d'oxydo-réduction (Nordberg *et al.*, 2011; Rani *et al.*, 2014). Toutefois, il participe indirectement à la formation de ROS en compétitionnant avec les métaux redox-actifs pour leur protéine de liaison augmentant ainsi les niveaux de métaux libres dans la cellule (Thevenod et Lee, 2013). Par exemple, le Cd compétitionne avec le fer pour la ferritine et l'apoferritine. Cela augmente la disponibilité du fer libre à l'état ferreux (Fe^{2+}) pour la réaction de Fenton (Waisberg *et al.*, 2003). Cette réaction utilise les métaux sous leur forme libre réduite pour réduire le peroxyde d'hydrogène et former le radical hydroxyle (éq. 1) (Imlay *et al.*, 1988).



De plus, le Cd agit sur les mécanismes de défenses antioxydantes. Ce métal possède une forte affinité avec les thiols, ce qui lui permet de se lier aux enzymes contenant ce groupement. Cette liaison modifie la conformation et la fonction de l'enzyme, la rendant moins disponible pour neutraliser les ROS. De cette façon, le Cd inhibe plusieurs enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) (Rani *et al.*, 2014; Thevenod et Lee, 2013). Lors d'une exposition au Cd, il y a une augmentation de ces enzymes afin de neutraliser la forme libre du Cd et de protéger les cellules d'un stress oxydatif. Toutefois, lorsque les niveaux sont trop élevés, le Cd surcharge les défenses antioxydantes, induisant ainsi un stress oxydatif (Liu *et al.*, 2009). Le cadmium a également un effet sur les niveaux des antioxydants. Par exemple, la cystéine est un antioxydant possédant un groupement thiol qui lie le Cd^{2+} et l'élimine du système. Elle est également un précurseur dans la synthèse du GSH. Une augmentation de Cd dans

la cellule cause un déséquilibre redox en diminuant la disponibilité de la cystéine pour la synthèse du GSH, en se liant directement au GSH réduit et en l'oxydant en GSSG, diminuant ainsi la capacité cellulaire à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (Thevenod, 2009). En pharmacologie, la cystéine est administrée sous forme de N-acétylcystéine où elle assure les mêmes fonctions que la cystéine cellulaire.

1.2.2 ERK

La kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) est une sérine/thréonine protéine kinase provenant de la famille des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) (Xu *et al.*, 2016). Elle se compose de deux isoformes, soit ERK1 et ERK2, qui régulent la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire (Cagnol et Chambard, 2010; Wang *et al.*, 2009a).

ERK est activée par une cascade de phosphorylation séquentielle, RAS-MAPK. Celle-ci amplifie le signal cellulaire provenant de la membrane pour le transmettre au noyau. Cette voie est activée par un facteur de croissance qui se lie à son récepteur. Cette liaison permet le recrutement de la protéine GRB2 qui recrute à son tour la protéine SOS. Cette dernière catalyse l'échange de la GDP à la GTP de la protéine RAS située à la membrane et permet son activation. RAS active interagit avec l'une des kinases RAF (A, B ou C) qui s'activent par phosphorylation. RAF phosphoryle par la suite deux sérines de la protéine kinase mitogène (MEK1/2) qui phosphoryle à son tour la thréonine et la tyrosine de ERK pour l'activer. Une fois active, ERK est transloquée dans le noyau où elle active des facteurs de transcription par phosphorylation (Aliaga *et al.*, 1999; Cagnol et Chambard, 2010; Thevenod et Lee, 2013). Inversement, l'inhibition de ERK est régulée par les phosphatases, en particulier par la Map phosphatase 1 et 3 (MKP1 et MPK3) et la protéine Ser/Thr phosphatase 2A (PP2A) (Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). La PP2A possède une sous-unité catalytique (PP2Ac) qui est régulée par une méthylation ou par une phosphorylation. La méthylation permet l'activation de la phosphatase alors que la déméthylation et la

phosphorylation permettent de l'inactiver (Chen *et al.*, 2008). Les MKP sont plutôt régulées par la voie de dégradation de l'ubiquitination par le protéasome. Un déséquilibre phosphatases (MKP, PP2A)/kinases (MEK) causé par un xénobiotique modifie l'activation de ERK et par le fait même modifie la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration et/ou la mort cellulaire (Martin et Pognonec, 2010).

Des études, essentiellement effectuées dans les neurones, ont montré que le Cd prolonge l'activation de ERK via la production de ROS (Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). En effet, une exposition au Cd augmente la déméthylation et/ou la phosphorylation de la PP2Ac ainsi que la dégradation de la MKP3 par la voie ubiquitine-protéasome de dégradation des protéines. Cette diminution de l'activité phosphatase entraîne un déséquilibre entre la phosphorylation de ERK par les MEK et sa déphosphorylation par les phosphatases en faveur de l'activation de ERK. Toutefois, en présence de l'antioxydant N-acétylcystéine, l'induction de ERK par le Cd est inhibée, ce qui confirme la présence des ROS dans l'induction de ERK par le Cd (Chen *et al.*, 2008; Martin et Pognonec, 2010; Xu *et al.*, 2016). Le prolongement de l'activation de ERK serait un moyen de survie pour les cellules (Martin et Pognonec, 2010).

1.2.3 Autophagie

L'autophagie est un processus de survie cellulaire déclenché par un stress extra ou intracellulaire, tel qu'un sevrage en nutriments ou un stress du réticulum endoplasmique (protéines mal repliées, déplétion du stockage de Ca^{2+}) (Thevenod et Lee, 2015). Les composantes cytosoliques, les protéines et les organelles endommagées sont dégradées lors d'une autodigestion afin de maintenir la balance énergétique de la cellule et la qualité des protéines et des organelles (Colecchia *et al.*, 2012; Ellington *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2015). Toutefois, lorsque les niveaux d'autophagie sont trop élevés, cela peut mener à la mort cellulaire (Groulx *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

L'autodigestion des composantes peut se faire de trois façons : par la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macroautophagie (Fig. 1.1). La microautophagie est l'engloutissement direct dans le lysosome de petites molécules présentes dans le cytoplasme. La seconde voie est l'autophagie médiée par les chaperonnes qui dégrade les protéines mal repliées avec une séquence KFERQ-like. Cette voie nécessite des chaperonnes cytosoliques et lysosomales pour faciliter le transport des protéines. Le complexe chaperonne-protéine se lie au récepteur lysosomal LAMP-2a qui permet leur translocation et leur dégradation dans le lysosome. Finalement, la macroautophagie, plus connue sous le nom « d'autophagie », est la forme d'autophagie la plus abondante. Elle consiste en la séquestration de macromolécules, telles que les organelles et les protéines endommagées ou en agrégats, dans des autophagosomes. Plus précisément, il y a la formation et l'expansion d'une double membrane (phagophore) autour des macromolécules pour former l'autophagosome. Ce dernier fusionne avec le lysosome pour former l'autolysosome. L'acidification du milieu permet aux hydrolases lysosomales de dégrader les composantes endommagées (Moruno *et al.*, 2012; Thevenod et Lee, 2015). La macroautophagie est le processus étudié dans cet ouvrage et le terme « autophagie » sera utilisé pour désigner cette voie.

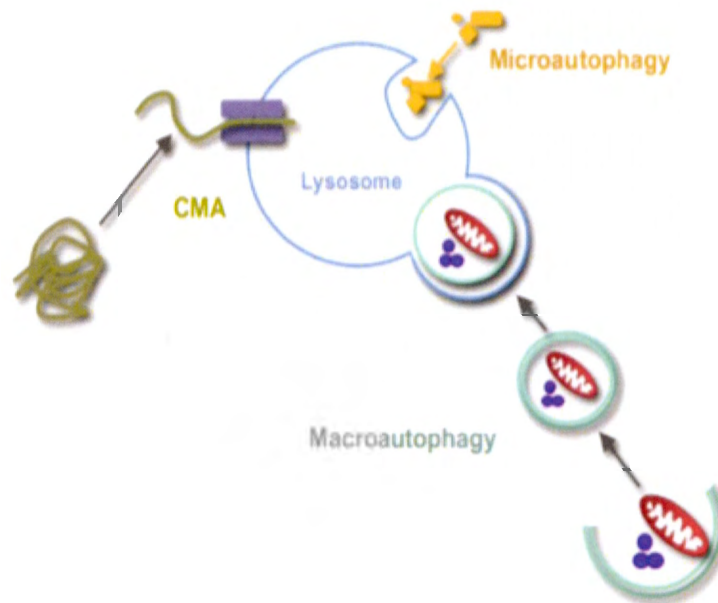


Figure 1.1 Trois différentes formes d'autophagie présentes dans la cellule. La microautophagie est l'engloutissement direct des micromolécules par les lysosomes, l'autophagie médiée par les chaperonnes facilite le transport de certaines protéines dans les lysosomes alors que la macroautophagie consiste à séquestrer les macromolécules dans des autophagosomes afin qu'elles soient dégradées par le lysosome (Moruno *et al.*, 2012).

Pour étudier l'activité autophagique, des marqueurs, tels que la chaîne légère 3 (LC3) et le Sequestosome 1 (p62/SQSTM1), peuvent être utilisés. LC3 est une protéine impliquée dans la formation de l'autophagosome. Une fois synthétisée, elle est clivée afin d'obtenir la forme cytosolique LC3-I. Lorsque l'autophagie débute, LC3-I subit une lipodation en se liant avec la phosphatidyléthanolamine pour former LC3-II. Ce processus s'effectue par un système d'ubiquitination impliquant Atg7 (Kang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015). LC3-II est recrutée au niveau de la membrane où elle est impliquée dans la formation et dans l'élongation de l'autophagosome (Groulx *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). SQSTM1 est impliqué dans la dégradation de protéines ubiquitinées (Groulx *et al.*, 2012). Il se lie aux protéines pour former un agrégat et

interagit avec LC3-II pour permettre la séquestration de ces protéines dans l'autophagosome et par le fait même permettre leur dégradation (Groulx *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Puisque SQSTM1 et LC3 sont tous les deux localisés au niveau de la membrane de l'autophagosome, ils sont dégradés par l'autolysosome tout comme les macromolécules présentes dans l'autophagosome (Wang *et al.*, 2016). Une augmentation de ces marqueurs autophagiques sera alors corrélée avec une augmentation des autophagosomes (Liuzzi et Yoo, 2013; Son *et al.*, 2011; Thevenod et Lee, 2015). Normalement, lorsque l'autophagie est induite, il y a une diminution des niveaux de SQSTM1 due à une dégradation des autolysosomes alors que les niveaux de LC3-II ont tendance à augmenter. Cela provient d'une augmentation de la conversion de LC3-I en LC3-II nécessaire à l'élongation des autophagosomes qui se caractérise par une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I. Dans la majorité des articles, ce ne sont pas les niveaux de LC3-II qui sont étudiés, mais plutôt le ratio LC3-II/LC3-I. Ce dernier permet de suivre précisément le flux autophagie alors que les niveaux de LC3-II peuvent varier lors d'activités autres que l'autophagie, telle que l'endocytose (Klionsky *et al.*, 2016).

Des études effectuées dans l'épiderme, le foie, les neurones et les poumons ont montré que le Cd induit l'autophagie et que cela se manifeste par une augmentation du marqueur autophagique LC3-II (Lv *et al.*, 2018; Pi *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). En présence de NAC, l'activation de l'autophagie par le Cd est inhibée, ce qui suggère un rôle important des ROS induits par le Cd dans l'activité autophagique (Lv *et al.*, 2018). Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'activation de ERK est essentielle à l'induction de l'autophagie dans les cellules. En effet, une inhibition de ERK par U0126 ou par PD98059 diminue les niveaux de LC3-II normalement augmentés en présence de Cd (Meng *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009a). Quelques études ont fait un lien entre l'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd dont celle de Wang *et al.* (2008). Ces derniers ont montré que l'induction de ERK par le Cd active l'autophagie dans les cellules mésangiales (MES-13) puisqu'en

présence de l'inhibiteur de ERK (PD 98059), l'autophagie induite par le Cd est inhibée. Toutefois, selon la dose et la durée d'exposition au Cd, certaines études ont montré que l'activation prolongée de ERK par le Cd entraîne la mort cellulaire par apoptose. En effet, lorsque ERK est inhibée, cela diminue partiellement l'apoptose (Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016). Malgré qu'il y ait eu beaucoup d'études réalisées sur l'activation de l'autophagie par le Cd et par ERK, peu d'études ont été effectuées sur l'épithélium intestinal, soit le premier tissu exposé au Cd ingéré.

1.3 Épithélium intestinal

1.3.1 Physiologie intestinale

L'intestin est un organe important du système digestif dont la fonction principale est l'absorption des nutriments (sucres et acides aminés), soit la dernière étape de la digestion. Il constitue également une barrière pour les enzymes digestives, les composés ingérés ainsi que les bactéries, ce qui lui confère un rôle de protection (Hillgren *et al.*, 1995).

L'intestin est composé de quatre couches : la séreuse, les muscles lisses, la sous-muqueuse et la muqueuse. La séreuse est la couche profonde de l'intestin et devient le péritoine qui enveloppe les organes du système digestif. La séreuse renferme deux couches de muscles lisses, soit les muscles circulaires et les muscles longitudinaux, impliqués dans la mobilité de l'intestin. Les muscles circulaires régulent le diamètre de la lumière intestinale lors de sa contraction alors que les muscles longitudinaux régulent la longueur de l'intestin. Ces couches de muscles se situent sur la sous-muqueuse où se retrouvent les vaisseaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins. Finalement, la muqueuse est la couche superficielle faisant face à la lumière intestinale. Elle est responsable de l'absorption des nutriments (Silverthorn, 2007).

La muqueuse possède trois structures (plis circulaires, villosités, microvillosités) qui augmentent sa surface et améliorent l'absorption des nutriments. Les plis circulaires sont de profonds replis qui ralentissent le mouvement du chyme afin d'optimiser l'absorption. Les villosités sont le prolongement externe de la muqueuse et elles sont recouvertes d'une monocouche de cellules épithéliales. Ces cellules permettent l'absorption des nutriments pour qu'ils atteignent les vaisseaux sanguins. Finalement, les microvillosités se retrouvent à la surface des villosités et forment la membrane en bordure en brosse des cellules épithéliales. Elles sont recouvertes de glycocalyx qui renferme des enzymes (disaccharidases et peptidases) responsables de la dégradation des glucides et des protéines ainsi que des transporteurs de nutriments (ions, monosaccharides, acides aminés, peptides et acides gras) afin de compléter la digestion (Hillgren *et al.*, 1995; Marieb, 2005).

L'épithélium intestinal se renouvelle rapidement le long de l'axe crypte-villosité, soit à tous les 3 à 6 jours (Marieb, 2005). La crypte est la cavité interne de la muqueuse où le premier tiers est recouvert de cellules épithéliales indifférenciées. Ces cellules prolifèrent puis migrent vers le haut de la crypte lors de la différenciation. Les cellules matures poursuivent leur migration jusqu'à la pointe des villosités où elles sont remplacées par les suivantes pour assurer un bon renouvellement (Fig. 1.2) (Aliaga *et al.*, 1999; Eastwood. G, 1977; Jumarie et Malo, 1991; Marieb, 2005). Les cellules indifférenciées peuvent engendrer quatre types de cellules différentes : les cellules absorbantes aussi appelées entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines et les cellules de Paneth, ces dernières n'étant présentes qu'au niveau des cryptes (Traber, 1999). Les entérocytes sont les cellules les plus abondantes dans les villosités puisqu'elles sont responsables de l'absorption des nutriments (Hillgren *et al.*, 1995). Entre les entérocytes se retrouvent les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus, les cellules entéro-endocrines qui produisent les hormones gastro-intestinales et les cellules de Paneth qui sécrètent les peptides antimicrobiens (Marieb, 2005; Traber, 1999).

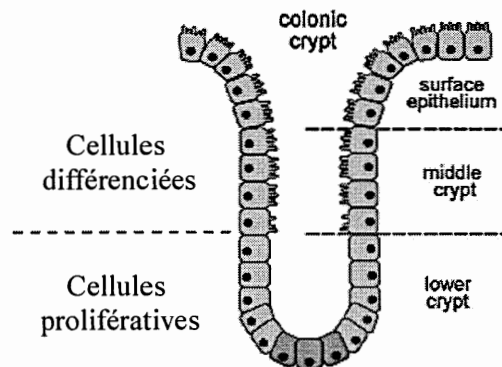


Figure 1.2 Répartition des cellules indifférenciées et différenciées dans la crypte intestinale. Les cellules indifférenciées se situent dans le premier tiers de la crypte puis migrent vers la pointe lors de la différenciation cellulaire. Figure adaptée de Groulx *et al.* (2012)

Une étude effectuée par Aliaga *et al.* (1999) sur des cellules entérocytaires a montré que ERK régule la prolifération et la différenciation cellulaire, soit deux processus coordonnés essentiels au renouvellement de l'épithélium intestinal. Les niveaux de sa forme active (p-ERK) sont élevés dans les cellules indifférenciées alors qu'ils diminuent considérablement dans les cellules différenciées. En effet, les cellules perdent leur capacité de proliférer lorsqu'elles sont différenciées et l'activation de ERK n'est plus requise. L'activation de cette kinase est corrélée avec une augmentation de la synthèse d'ADN et de l'activité transcriptionnelle nécessaire à la prolifération. Inversement, une diminution de p-ERK est corrélée avec l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et une augmentation des enzymes dont la sucrase-isomaltase impliquée dans la dégradation des sucres. Ces enzymes se retrouvent seulement au niveau de la membrane en bordure en brosse des cellules différenciées où elles permettent la digestion des aliments. Elles sont donc utilisées comme marqueur de différenciation entérocytaire (Aliaga *et al.*, 1999).

1.3.2 Transport paracellulaire vs transcellulaire

Le cadmium ingéré doit traverser l'épithélium intestinal afin d'atteindre la circulation sanguine pour que l'absorption soit complète. Cela peut se faire par voie paracellulaire et/ou par voie transcellulaire. La voie paracellulaire est le passage de molécules entre les cellules via l'espace intercellulaire. Ce processus dépend de la perméabilité de l'épithélium. Les cellules épithéliales, en particulier les entérocytes, sont liées entre elles par des jonctions serrées, des desmosomes ainsi que des jonctions adhérentes qui régulent la perméabilité. Cela rend plus difficile le passage de molécules par la voie paracellulaire. Seules des molécules hydrophiles de petite taille peuvent passer à travers l'épithélium intestinal par cette voie (Boveri *et al.*, 2004; Hillgren *et al.*, 1995; Jumarie *et al.*, 1999; Marieb, 2005). Le transport transcellulaire est le passage des molécules à travers les cellules. Ce transport est beaucoup plus complexe puisque les molécules doivent franchir la mucoasée, traverser la membrane cellulaire apicale et ressortir par la membrane basolatérale pour finalement entrer dans la circulation sanguine. Cette voie peut se faire en présence (transport spécifique) ou en absence de transporteurs (transport non-spécifique). Cela va dépendre des propriétés physico-chimiques, telles que la taille, la charge et la lipophilicité, des molécules (Hillgren *et al.*, 1995; Jumarie *et al.*, 1999).

Jumarie *et al.* (1999) ont étudié le transport intestinal du Cd dans un modèle cellulaire entérocytaire. Ils ont montré que, malgré sa petite taille, la présence de jonctions serrées empêche le passage du Cd dans l'espace intercellulaire. Ce métal emprunte la voie transcellulaire en passant par la membrane apicale pour entrer dans la cellule et ressortir par la membrane basolatérale. Toutefois, peu de Cd traverse la membrane basolatérale. Celui-ci a tendance à s'accumuler dans la cellule plutôt que de traverser la membrane pour atteindre la circulation sanguine. Ces observations concordent avec la littérature qui montre une faible biodisponibilité orale pour le Cd. Seulement 5% de ce métal provenant de l'alimentation est absorbé (Jumarie *et al.*, 1999; Rani *et al.*, 2014).

L'accumulation du Cd dans les entérocytes se fait à la fois par un système de transport spécifique et par diffusion passive à travers la membrane. Cependant, le Cd n'est pas un métal essentiel et il est peu probable qu'un transporteur lui soit exclusif. Afin de s'accumuler dans la cellule, le Cd doit entrer en compétition avec les autres métaux essentiels, tels que le fer, le calcium et le zinc (Elisma et Jumarie, 2001; Thevenod et Lee, 2013). Dans les cellules intestinales, un des transporteurs utilisés est le transporteur de fer Nramp2. Ce dernier est une glycoprotéine intégrale de la famille des transporteurs membranaires exprimée à la membrane en bordure en brosse. Nramp2 est un système de transport pour le Fe^{2+} dépendant du pH stimulé par un gradient de proton entrant. Une diminution du pH entraîne une augmentation de l'absorption de l'ion Fe^{2+} et l'effet inverse est également observé. L'ion Cd^{2+} emprunte le transporteur Nramp2 par mimétisme ionique avec le Fe^{2+} . Lorsqu'il est présent en plus grande quantité que le Fe^{2+} , l'ion Cd^{2+} déplace l'ion ferreux de son transporteur afin de franchir la membrane et de s'accumuler dans les entérocytes (Elisma et Jumarie, 2001). D'autres formes de Cd, dont les complexes de chlorure (CdCl_n^{2-n}), peuvent également traverser la membrane en utilisant possiblement des co-transporteurs de chlorure ou par diffusion passive, mais ils n'utilisent pas le système de transport Nramp2 (Jumarie *et al.*, 2001).

1.3.3 Dommages épithéliaux

L'épithélium intestinal est composé de jonctions (serrées, adhérente, desmosomes) qui régulent la perméabilité et constituent une barrière paracellulaire. Les jonctions serrées sont celles qui sont les plus importantes dans le maintien de cette barrière favorisant ainsi un transport transcellulaire. Toutefois, une exposition aigue à des fortes concentrations de Cd altère ces jonctions et augmente l'espace entre elles (Boveri *et al.*, 2004; Duizer *et al.*, 1999). Ainsi une exposition de 24 h à 6.3 μM de Cd diminue la résistance transépithéliale de 50% alors que 16.2 μM de Cd augmente de moitié la perméabilité paracellulaire (Boveri *et al.*, 2004). Cette augmentation de la perméabilité

de l'épithélium permet alors le passage de plus grosses molécules hydrophiles, telles que le mannitol et le polyéthylène glycol 4000 (Duizer *et al.*, 1999).

De plus, le Cd stimule les réponses inflammatoires et les protéines de stress dans l'épithélium (Berzina *et al.*, 2007; Boveri *et al.*, 2004). Les métallothionéines (MTs) sont des protéines riches en cystéines qui contiennent des groupements thiols. Le cadmium possédant une forte affinité pour ces groupements se lie aux MTs afin d'être éliminé par les reins (Liu *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2014). Les MTs sont de bon biomarqueur d'une exposition au Cd puisque la présence de ce métal stimule leur expression dans les cellules intestinales. Le complexe MTs-Cd protège la cellule d'un stress oxydatif induit par le Cd. Toutefois, lors d'une exposition aiguë au Cd, les MTs sont saturées et ne peuvent plus prendre en charge le Cd. Cela peut entraîner une mort cellulaire par nécrose (Berzina *et al.*, 2007; Cardin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Une autre protéine de stress stimulée par ce métal est la protéine de choc thermique HSP70 qui intervient pour prévenir les dommages tissulaires (Boveri *et al.*, 2004).

1.4 Lignée cellulaire Caco-2

Les cellules Caco-2 sont un modèle cellulaire très utilisé afin d'étudier l'impact de xénobiotiques, dont celui du Cd, sur l'épithélium intestinal. Cette lignée cellulaire provenant d'un adénocarcinome colorectal humain se différencie spontanément une fois la confluence atteinte. Lors de la différenciation, les cellules acquièrent des propriétés structurales et fonctionnelles d'une cellule absorbante mature (entérocyte), telles que les jonctions serrées impliquées dans la barrière paracellulaire ainsi que les enzymes et les transporteurs impliqués dans la digestion et l'absorption des nutriments. Dans ce modèle *in vitro*, les cultures pré-confluentes correspondent donc aux cellules indifférenciées qui se situent dans le premier tiers de la crypte alors que les cultures confluentes et post-confluentes correspondent aux cellules différenciées qui migrent le long de l'axe crypte-villosité pour atteindre le sommet des villosités. De ce fait, il est

possible d'affirmer que ce modèle cellulaire mime assez bien les différents états de différenciation observés *in vivo* lors du renouvellement de l'épithélium (Aliaga *et al.*, 1999; Cardin *et al.*, 2009; Jumarie et Malo, 1991).

La prolifération des cellules Caco-2 passe par trois stades; la pré-confluence où les cellules sont indifférenciées de façon homogène (Fig. 1.3B), la post-confluence où certaines cellules sont différenciées et polarisées alors que d'autres sont indifférenciées et 30 jours après la confluence où les cellules sont différenciées et polarisées de façon homogène (Fig. 1.3C) (Vachon et Beaulieu, 1992). Lors de la première semaine de culture, les cellules sont en phase de prolifération exponentielle. En général, la confluence est atteinte entre 6 à 8 jours après l'ensemencement puis les cellules entrent dans une phase de prolifération stationnaire. Cette dernière se caractérise par l'établissement de jonctions serrées entre les cellules adjacentes (Fig. 1.3C), la formation d'une monocouche polarisée, la formation de dômes ainsi que le développement des microvillosités au niveau de la membrane apicale (Cardin *et al.*, 2009; Jumarie et Malo, 1991; Meunier *et al.*, 1995).

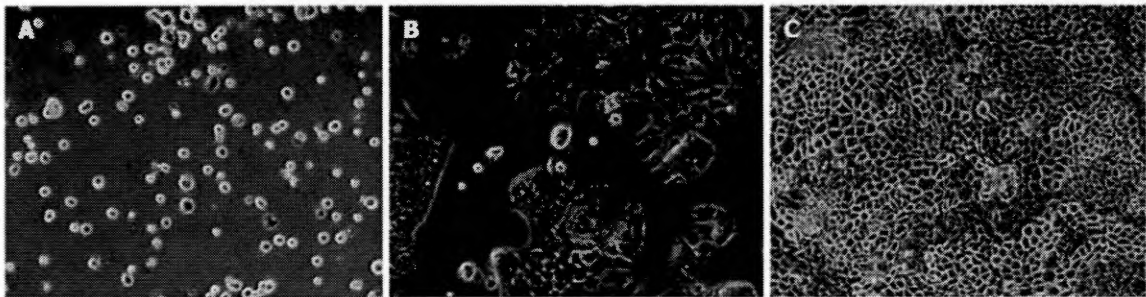


Figure 1.3 Images en microscopie des différents stades de croissance des cellules Caco-2. A) Les cellules ont été ensemencées, il y a quelques heures, et elles adhèrent à la paroi. B) La culture cellulaire n'a pas atteint sa confluence et les cellules sont indifférenciées de façon homogène. C) Les cellules sont différenciées de façon homogène. Elles sont liées entre elles par des jonctions serrées (mosaïque blanche). Elles possèdent également leur membrane en bordure en brosse où se situent les enzymes et les transporteurs responsables de l'absorption des nutriments. Figure provenant de Lehner *et al.* (2010)

Au niveau des microvillosités, les cellules expriment alors plusieurs enzymes et transporteurs essentiels à l'absorption des nutriments parmi lesquels se retrouvent les transporteurs de glucose (GLUT-5 et le co-transporteur Na⁺-glucose SGLT1) et plusieurs hydrolases (la sucrase-isomaltase, la lactase, la N aminopeptidase, la dipeptidyl dipeptidase IV et la phosphatase alcaline) (Bissonnette *et al.*, 1996; Chantret *et al.*, 1988; Mahraoui *et al.*, 1992). De plus, des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la GPx, la GR et la CAT, sont exprimées dans les cellules Caco-2 pour neutraliser les ROS (Hillgren *et al.*, 1995). Finalement, les dômes formés dans les cultures sur Pétri témoignent d'un transport transépithélial des ions. Les solutés et l'eau s'accumulent sous la monocouche de cellules et la soulève légèrement formant ainsi un dôme (Jumarie et Malo, 1991).

Dans les cellules épithéliales, ERK régule la prolifération et la différenciation cellulaire, soit deux processus essentiels au renouvellement de l'épithélium intestinal. L'activation de cette voie de signalisation dans les cellules Caco-2 concorde avec les stades de différenciation d'un modèle *in vivo*, c'est-à-dire que ERK est active dans les cellules indifférenciées et inactive dans les cellules différenciées. Lors de la régulation de ERK, le modèle entérocytaire Caco-2 se distingue des autres modèles cellulaires, dont celui des cellules neuronales PC-12. L'activation de cette kinase n'est pas régulée par la phosphatase PP2A contrairement aux autres modèles cellulaires. Lorsque les cellules Caco-2 sont différenciées et que l'activation de ERK n'est plus requise, ce sont les phosphatases MKP-1 et MKP-3 qui sont responsables de la déphosphorylation de p-ERK entraînant ainsi son inactivation. Aliaga *et al.* (1999) ont montré que les niveaux de la MKP-1 sont plus élevés dans les cellules différenciées alors que les niveaux de MPK-3 augmentent graduellement lorsque la confluence est atteinte puis ils diminuent. Ce phénomène est corrélé avec la faible activité de ERK dans les cellules différenciées

causée par un déséquilibre phosphatases (MKP)/kinases (MEK) favorisant la déphosphorylation et l'inhibition de ERK (Aliaga *et al.*, 1999).

L'activité autophagique varie en fonction de l'état de différenciation entérocytaire. Dans les cellules Caco-2, les niveaux de LC3-II et de SQSTM1 sont élevés dans les cellules indifférenciées puis diminuent au cours de la différenciation cellulaire. Cette modulation *in vitro* se rapproche du processus présent dans l'organe puisque l'activité autophagique est plus élevée dans les cellules intestinales se situant au fond de la crypte et elle diminue lorsque les cellules migrent vers la pointe des villosités. Toutefois, les niveaux de SQSTM1 ne suivent pas la même tendance *in vivo*. Ce dernier se localise principalement à la surface de la crypte et son expression est faible dans le premier tiers de la crypte. Cette différence entre l'organe et les cellules Caco-2 peut être causée par la provenance des cellules puisque ce sont des cellules cancéreuses (Groulx *et al.*, 2012).

1.5 Objectifs et hypothèse

Depuis plusieurs années, des études de toxicité sur le Cd ont été réalisées afin de mieux comprendre son mécanisme d'action. Toutefois, peu d'études ont été réalisées sur l'épithélium intestinal. Pourtant, ce tissu est le premier tissu exposé au Cd lors d'une exposition chronique via l'alimentation et constitue la première ligne de défense (Mantha et Jumarie, 2010). Les études se consacrent davantage sur les organes et tissus où le Cd est transporté et où il s'accumule (foie, reins, cerveau).

Une étude antérieure menée sur les cellules intestinales Caco-2 ont montré que le Cd, à des concentrations non cytotoxiques (10 μ M de Cd *i.e.* 1,12 μ g/g), augmente l'activité mitochondriale déshydrogénase (« activité MTT ») (Fig. 1.4). Cette activité est utilisée afin de mesurer indirectement la viabilité cellulaire. L'étude a également montré que l'augmentation de l'activité MTT n'est pas due à de la prolifération, mais

plutôt à de la synthèse protéique suite à l'activation de ERK. En effet, les niveaux d'incorporation de $[H^3]$ -thymidine en présence de Cd sont comparables à ceux observés en absence de Cd alors que l'inhibition de ERK par U0126 (inhibiteur de MEK en amont de ERK) inhibe l'augmentation de l'activité MTT induite par le Cd. De plus, cette augmentation n'est pas présente dans les cellules indifférenciées, là où ERK est déjà fortement active (Fig. 1.4). Cela suggère que le Cd induit l'activation de ERK seulement dans les entérocytes matures là où ERK est normalement peu active (Mantha et Jumarie, 2010). Cette activation de ERK par le Cd a par la suite été largement étudiée au laboratoire.

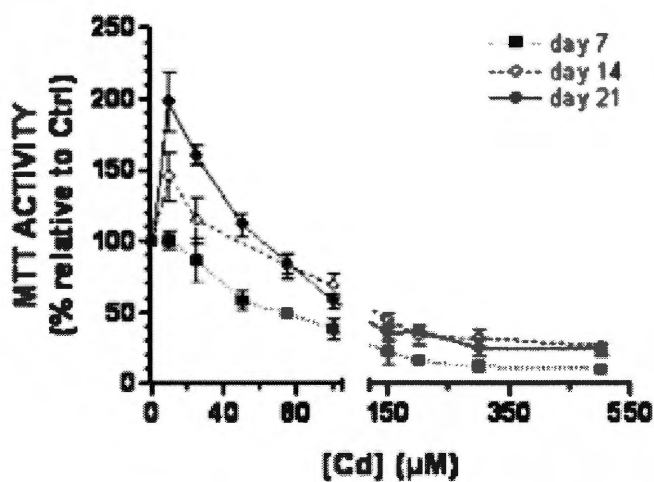


Figure 1.4 Courbe dose-réponse de l'activité MTT en fonction des jours de cultures. Les cellules de 7 jours correspondent aux cellules indifférenciées alors que les cellules de 14 jours et de 21 jours sont les cellules différenciées hétérogènes. Une exposition à 10 μ M de Cd (concentration non cytotoxique) augmente l'activité MTT qui est corrélée à la synthèse protéique suite à l'activation de ERK par le Cd (Mantha et Jumarie, 2010).

Par ailleurs, d'autres études dont celle de Meng *et al.* (2015) ont montré que ERK était essentielle dans l'induction de l'activité autophagique. En effet, l'activation de ERK augmente les niveaux du marqueur autophagique LC3-II alors qu'une inhibition de ERK diminue considérablement ses niveaux (Meng *et al.*, 2015). Il est alors possible

d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'activation de ERK par le Cd modifie l'activité autophagique dans les cellules intestinales Caco-2.

Dans le cadre de ce projet, les conséquences de l'activation de ERK par le Cd sur l'activité autophagique intestinale seront étudiées en fonction de l'état de différenciation entérocytaire. Pour ce faire, l'activation maximale de ERK en p-ERK par le Cd ainsi que celle des marqueurs autophagiques LC3 et SQSTM1 seront caractérisées. Par la suite, la corrélation entre p-ERK et l'autophagie sera vérifiée et l'implication des ROS dans cette corrélation sera étudiée afin de vérifier si l'induction des ROS par le Cd modifie l'activation de ces deux voies. Cette étude permettra de mieux comprendre les impacts du Cd sur les voies de signalisation et sur l'autophagie impliquées dans le contrôle du renouvellement de l'épithélium intestinal ainsi que la toxicité intestinale du Cd à des concentrations telles que retrouvées dans les aliments.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les cellules entérocytaires Caco-2 issues d'un adénocarcinome de colon ont été obtenues du Dr. A. Zweibaum (Chantret *et al.*, 1988). Elles sont maintenues dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle minimum (DMEM) (GibcoBRL, Grand Island, NY) contenant 25 mM de glucose (Gibco Life Technologies, Co, Grand Island, NY, USA) et dans lequel sont ajoutés 15 % de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) préalablement désactivé à 56 °C pendant 30 min, 0,1 mM d'acides aminés non-essentiels, de la pénicilline-streptomycine [50 U/ml - 50 µg/ml] (Gibco Life Technologies) et 19 mM de NaHCO₃. La solution d'acides aminés non-essentiels se compose de L-acide aspartique et de L-glycine obtenues de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) et de L-alanine, L-asparagine, L-acide glutamique, L-proline et de L-sérine provenant de GibcoBRL. Les cellules sont par la suite conservées à une atmosphère de 5 % de CO₂ à 37 °C et le milieu est changé à tous les deux jours afin que les cultures ne manquent pas de nutriments.

Chaque semaine, les cellules sont trypsinisées (0,05% de trypsine et 0,53 mM d'EDTA) (Gibco Life Technologies) pendant 15 min à 37 °C et ensemencées à une densité de 12×10^3 cellules/cm² dans des flasques de 75 cm² (Corning, Inc., Corning, NY, USA) (cellules de maintien), des plaques de 24 puits (puits de 1,5 cm de diamètre) ou de 96

puits (puits de 0,7 cm de diamètre) (Sarstedt), des boîtes de Pétri de 60 mm ou de 100 mm (Sarstedt) pour les diverses mesures. Les cellules sont par la suite maintenues dans du milieu DMEM pendant 7 jours (cellules indifférenciées) ou 21 jours (cellules différenciées) (Jumarie et Malo, 1991).

2.2 Immunobuvardage

Les cellules de 7 jours ou de 21 jours sont rincées 2 fois avec du milieu DMEM sans FBS et incubées à 37 °C pendant 24 h ou 48 h en absence ou en présence de 10 µM de Cd (ajouté sous forme de CdCl₂, Sigma Aldrich, 99.99% purity), 20 µM de U0126 (EMD millipore Corp. USA), inhibiteur de p-ERK, 1 mM de N-acétylcystéine (NAC) (Sigma Aldrich) et/ou de 3 mM de L-buthionine-sulfoximine (BSO) (Sigma Aldrich) dans du milieu DMEM en absence ou en présence de glucose. Il est à noter que pour ces études et les suivantes, la pré-exposition à la NAC (NAC → Cd) se fait 24 h avant l'exposition au Cd. Les cellules sevrées dites contrôles sont les cellules sevrées en FBS pendant 24 h. Les cellules sont rincées 2 fois avec du tampon phosphate salin (PBS) et récoltées dans un tampon de lyse hypotonique contenant une solution d'inhibiteurs de protéases (compagnie Roche EDTA free) ainsi qu'une solution de sodium ortho vanadate à 0,2 mM, inhibiteur de phosphatases. Elles sont congelées à -80 °C jusqu'à ce qu'elles soient utilisées.

Avant d'être utilisées, les cellules sont passées à plusieurs reprises dans une aiguille 26 G1/2 et centrifugées à 10 000 rpm à 4 °C pendant 25 min. Le surnageant est récupéré et un dosage de protéines est effectué par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Lors de la préparation des échantillons, 20 µg de protéines du surnageant sont mélangées à 62 mM de tampon Tris-HCl à pH 6.8 contenant 2 % de SDS, 0,01 % de bleu de bromophénol, 10 % de glycérol et 5 % de β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chauffés à 95 °C pendant 5 min, puis une électrophorèse effectuée dans un gel

contenant 10 % de sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) permet la séparation des protéines. Ces dernières sont par la suite transférées sur une membrane PVDF (Millipore, Billerica, MA) dont le blocage est effectué en l'incubant pendant une heure à température pièce dans du tampon Tris salin (TBS) contenant 0,1 % de Tween-20 et 5 % de lait écrémé. Puis la membrane est incubée à 4 °C toute la nuit dans une solution d'anticorps primaire et incubée une heure à température pièce dans une solution d'anticorps secondaire. La membrane est par la suite incubée à la noirceur à température pièce dans du HyGlo (Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA) et lue en chemiluminescence via l'appareil Fusion FX7 (Montreal Biotech Inc. Laboratory Equipment). Les densités optiques sont analysées à partir du logiciel ImageJ 1.48p software (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) et normalisées sur celles de la β -actine. Les résultats présentés dans les figures sont les densités optiques normalisées sur celles des cellules contrôles.

Les anticorps primaires utilisés sont: l'anti-phospho-p44/42 MAP kinase (p-ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000) (9101), l'anti-p44/42 MAP kinase (ERK1/2) (1:1000) (9102), l'anti-LC3B (1:500) (2775) et l'anti- β -actine (1:1000) (4967) provenant de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA) ainsi que l'anti-SQSTM1/p62 (1:2000) (ab56416) provenant de Abcam (Cambridge, Royaume-Uni). L'ensemble des anticorps primaires sont produits chez le lapin et sont donc reconnus par des anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la HRP (1:2000) (7074) à l'exception de l'anti-SQSTM1/p62 qui est produit chez la souris et donc reconnu par un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la HRP (1:10000) (7076). Les standards de poids moléculaires biotinylés sont reconnus par des anticorps anti-biotine conjugués à la HRP (1:1000) (7075).

2.3 Analyse des autolysosomes par un marquage à l'acridine orange (AO)

Les cellules de 7 jours ou de 21 jours sont rincées 2 fois avec du milieu DMEM sans FBS et incubées à 37 °C pendant 24 h ou 48 h en absence ou en présence de 10 µM de Cd, 20 µM de U0126, 1 mM de NAC et/ou de 3 mM de BSO dans du milieu DMEM en absence ou en présence de glucose. Par la suite, les cellules sont rincées une fois avec du PBS à 37 °C et incubées dans du PBS contenant 15 µM d'acridine orange (Sigma Aldrich) à 37 °C pendant 15 min. Un lavage supplémentaire au PBS est effectué sur les cellules à la noirceur et le marquage est observé sur un système de microscopie confocale à laser Nikon A1R (Japan 2011) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et à une longueur d'onde d'émission de 525 ± 50 nm pour la fluorescence en vert (ADN) et 595 ± 50 nm pour la fluorescence en rouge (vacuoles acides).

2.4 Analyse des ROS à l'aide de la sonde 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (effectué par Joannie Lemaire)

Les cellules de 21 jours sont rincées 2 fois avec du milieu DMEM sans FBS et incubées à 37 °C pendant 24 h en absence ou en présence de 10 µM de Cd, 1 mM de NAC et/ou de 3 mM de BSO dans du milieu DMEM. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du PBS à température pièce et incubées dans 100 µl de PBS pendant 10 min à température pièce. 100 µl de DCFH-DA à 5 µM sont ajoutés au PBS pour une concentration finale de 2,5 µM et les cellules sont incubées pendant 30 min à 37 °C. La fluorescence produite par la forme oxydée du DCF est observée sur un système de microscopie confocale à laser Nikon A1R (Japan 2011) à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et une longueur d'émission de 520 nm.

2.5 Accumulation cellulaire de Cd (effectué par Daphné Gariépy)

Les cellules de 21 jours sont rincées 2 fois avec du milieu DMEM sans FBS et incubées à 37 °C pendant 24 h en absence ou en présence de 10 µM de Cd et/ou de 1 mM de NAC dans du milieu DMEM. Elles sont homogénéisées sur glace dans du tampon Tris (25 mM, pH 7,4) (Bio-Shop/Bio-Ultra) dans un ratio 3:1 [poids humides de cellules (mg) : volume de tampon µl] à l'aide d'un pilon de granulés (Kontes) sur un intervalle de 2 à 30 sec pendant 10 min. Les cellules sont par la suite digérées dans 500 µl d'acide nitrique (HNO₃) (Optima grade, Fisher Chemical) pendant 24 h, chauffées pendant 4 h à 65 °C, puis digérées avec 300 µl de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Optima grade, Fisher Chemical) pendant 24 h à température pièce. Les échantillons sont transférés dans des tubes de 15 ml où ils sont dilués avec de l'eau ultrapure pour un volume final de 10 ml à une concentration finale de 5% de HNO₃. La concentration en Cd est mesurée sur un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS, XSeries 2, Thermofisher Scientific). Le contrôle de la quantification correspond à un mélange de HNO₃ et de H₂O₂, soit les réactifs utilisés lors de la digestion, dilués dans de l'eau ultrapure. Des échantillons de matériels certifiés (environ 15 mg), tels que le foie de chien de mer (DOLT-5) (National Research Council of Canada, NRCC), ont été digérés et analysés par ICP-MS. Le pourcentage de Cd récupéré dans les échantillons certifiés est de 95% ± 4%. Les données sur la teneur en Cd sont exprimées en µg de métal par mg de poids sec d'homogénat.

2.6 Tests statistiques

Les données sont les moyennes ± écart-types obtenues sur 3 à 8 cultures indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique Wilcoxon à l'aide du logiciel JMP Pro 14.0.0 (Software). La signification statistique a été évaluée à $P < 0,01$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 L'activité de ERK et le nombre d'autolysosomes diminuent lors de la différenciation entérocytaire

Dans des études antérieures, nous avons montré qu'une exposition de 24 h à 10 μ M de Cd stimule ERK dans les cellules différenciées (Mantha et Jumarie, 2010). Or, les cellules intestinales sont maintenues dans du milieu contenant 15% de FBS pour qu'elles puissent proliférer et se différencier. Cependant, lorsqu'elles sont exposées au Cd, le traitement s'effectue dans du milieu sans FBS pour optimiser l'accumulation du Cd dans les cellules puisque l'albumine présente dans le FBS se lie au Cd. La liaison albumine-Cd diminue l'accumulation du Cd dans les cellules (Pham *et al.*, 2004). L'activité de ERK et de l'autophagie en fonction de l'état de différenciation entérocytaire ont été étudiées en présence et en absence de sérum. Pour ce faire, les cellules ont été maintenues dans du milieu DMEM en présence de FBS pendant 7 (cellules indifférenciées) ou 21 jours (cellules différenciées) puis marquées à l'acridine orange (Fig. 3.1A). Cette dernière fluoresce en rouge lorsqu'elle se distribue dans les vacuoles acides, telles que les autolysosomes impliqués dans l'activité autophagique (Dong *et al.*, 2009). Un grand nombre d'autolysosomes sont présents dans les cellules indifférenciées et ces derniers diminuent considérablement dans les cellules différenciées pour être quasiment inexistantes (Fig. 3.1A). Le même phénomène est observé dans les cellules contrôles ayant subi un sevrage en FBS de 24 h (Fig. 3.1B).

Par la suite, les niveaux protéiques de p-ERK et des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 ont été analysés par immunobuvardage. Les niveaux de SQSTM1 et le ratio LC3-II/LC3-I sont plus élevés dans les cellules différenciées alors que les niveaux de p-ERK diminuent (Fig. 3.1D). L'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I provient d'une diminution de la forme LC3-I alors que la forme LC3-II ne varie pas (Fig. 3.1F). Les mêmes variations sont observées dans les cellules privées de sérum à l'exception du ratio LC3-II/LC3-I. Celui-ci ne varie pas lors de la différenciation cellulaire (Fig. 3.1E et G). Ces résultats confirment les faibles niveaux de la forme active de ERK dans les cellules différenciées et suggèrent une corrélation entre l'activité de ERK et celle de l'autophagie en fonction du stade de différenciation entérocytaire. Les cellules Caco-2 présentent les mêmes variations d'activité de ERK et d'autophagie que celles observées *in vivo* le long de la crypte-villosité et un sevrage de 24 h en sérum ne modifie pas ces variations. Pour cette raison, les prochaines expositions se feront dans un milieu DMEM sans sérum.

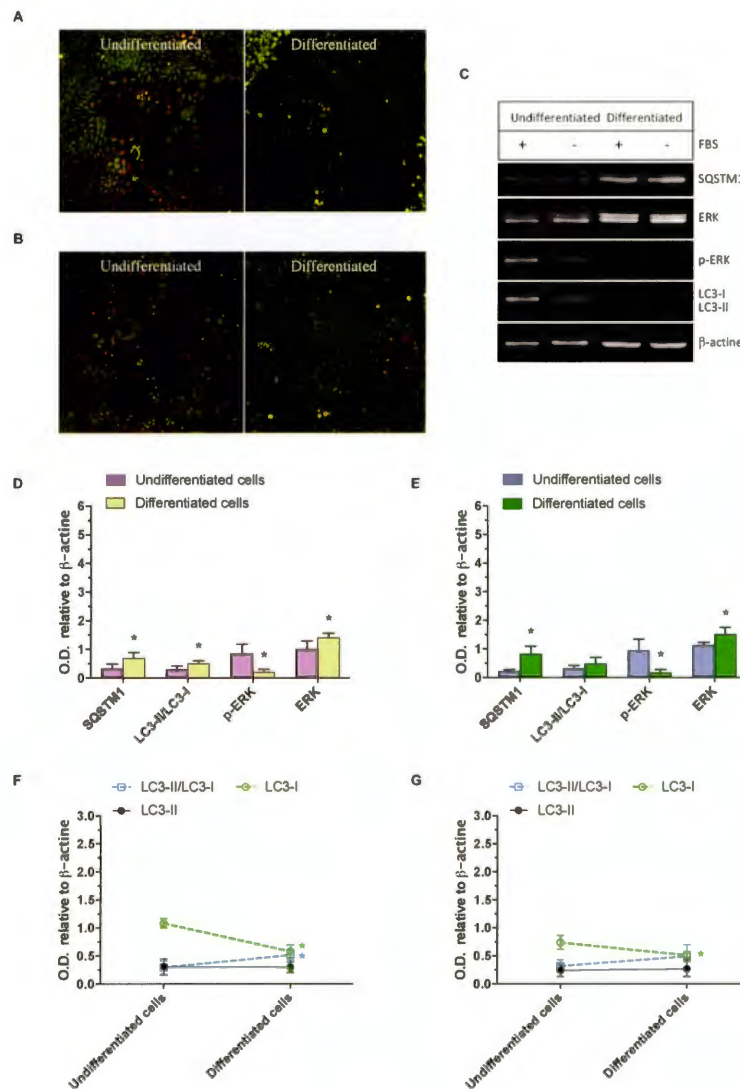


Figure 3.1 Comparaison des niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 ainsi que du nombre d'autolysomes entre les cellules indifférenciées (7 jours) et les cellules différenciées (21 jours). Images confocales de cellules indifférenciées et différenciées non sevrées (milieu contenant du FBS) (A) ou contrôles (milieu DMEM sans FBS) (B) marquées avec l'acridine orange. (C) Immunobuvardage de protéines de cellules indifférenciées et différenciées. Niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques des cellules indifférenciées et différenciées non sevrées (D) ou contrôles (E) normalisés sur les niveaux de β-actine. Niveaux des deux formes du marqueur autophagique LC3 des cellules indifférenciées et différenciées non sevrées (F) ou contrôles (G) normalisés sur les niveaux de β-actine. Les données sont les moyennes ± écart-types obtenues sur 3 à 8 cultures indépendantes. * Statistiquement différents des niveaux observés dans les cellules indifférenciées. $P < 0,01$

3.2 L'activité de ERK modifie l'autophagie dans les cellules indifférenciées

Pour étudier l'implication de ERK dans l'activité autophagique basale des cellules indifférenciées sevrées en FBS (Ctrl), les cellules ont été traitées à 20 μ M de U0126 (inhibiteur de MEK en aval de ERK). Par la suite, les cellules ont été marquées à l'acridine orange ou lysées afin d'analyser les niveaux de protéines de p-ERK et des marqueurs autophagiques par immunobuvardage. En présence de U0126, la fluorescence diminue dans les cellules indifférenciées (Fig. 3.2A). Une exposition au U0126 diminue les niveaux protéiques de p-ERK, mais augmente ceux de SQSTM1 et le ratio LC3-II/LC3-I (Fig. 3.2C). Cette augmentation du ratio LC3-II/LC3-I provient d'une diminution de la forme cytosolique LC3-I plus marquée (50%) que de la forme lipidique LC3-II (25%) (Fig. 3.2D). Ces résultats suggèrent que ERK module en partie l'activité autophagique basale.

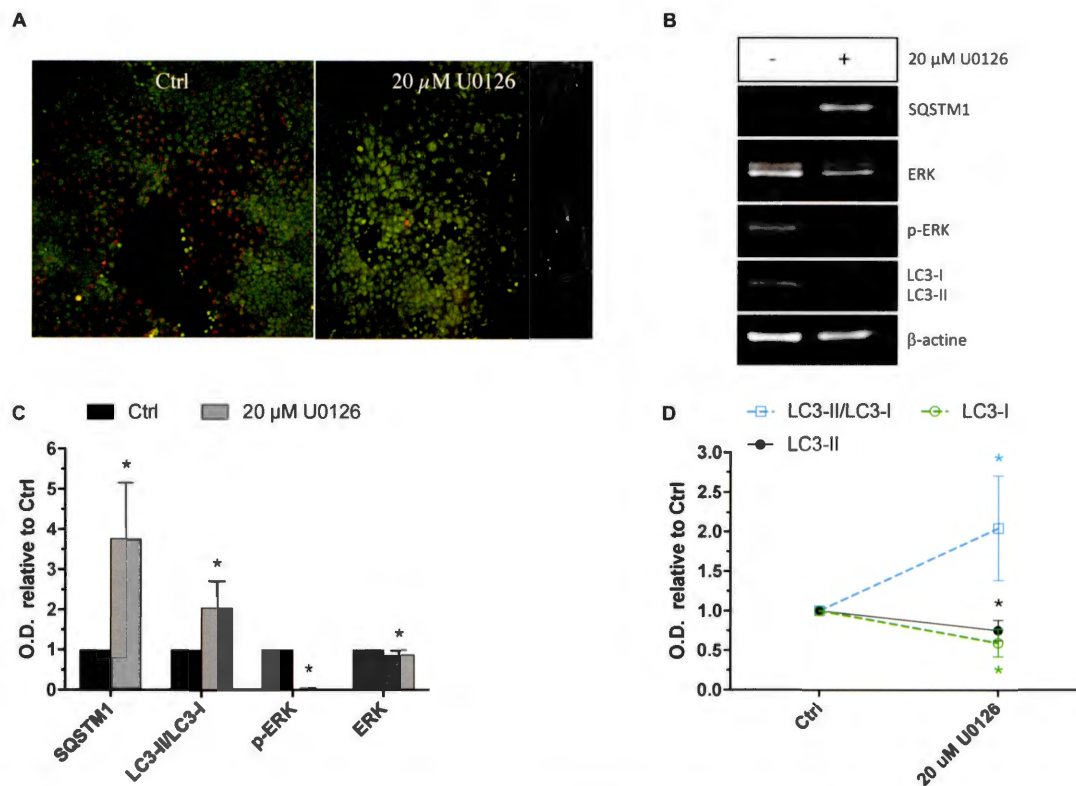


Figure 3.2 Corrélation entre les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 des cellules indifférenciées (7 jours). A) Images confocales de cellules indifférenciées marquées avec l'acridine orange. B) Immunobuvardage de protéines de cellules indifférenciées. C) Niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques des cellules indifférenciées normalisés sur ceux des cellules contrôles (seulement milieu DMEM sans FBS). D) Niveaux des deux formes du marqueur autophagique LC3 normalisés sur ceux des cellules contrôles. Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 5 cultures indépendantes. * Statistiquement différents des valeurs contrôles correspondantes. $P < 0,01$

3.3 Un sevrage en FBS modifie les niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques

Afin d'étudier l'effet du Cd sur l'autophagie dans les cellules de 21 jours, nous avons d'abord voulu vérifier que 24 h est le temps de traitement optimal. Toutefois, les expositions des cellules au Cd ont préalablement été faites au laboratoire dans du milieu sans FBS pour éviter la complexation du Cd par l'albumine (Pham *et al.*, 2004). Nous devons donc vérifier si un sevrage en FBS peut modifier les niveaux protéiques de p-

ERK et ceux des marqueurs autophagiques en fonction du temps. Pour ce faire, les cellules ont été maintenues dans du milieu DMEM sans FBS pendant 0, 6, 12, 24, 36 et 48 h, puis les protéines ont été analysées par immunobuvardage. Un pic est observé dans les niveaux de p-ERK lors d'un sevrage de 6 h et à partir de 12 h de sevrage, ils deviennent comparables à ceux observés dans les cellules non sevrées (milieu DMEM en présence de FBS). Contrairement à p-ERK, les niveaux de ERK totale atteignent un plateau lors d'un sevrage de 12 h (Fig. 3.3B) tandis que les niveaux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3-II sont respectivement optimaux dès 6 h et 12 h de sevrage (Fig. 3.3C et D). Finalement, les niveaux de la forme cytosolique LC3-I n'augmentent pas de façon significative lors du sevrage, toutefois, ils diminuent après 24 h (Fig. 3.3C). Ces résultats suggèrent qu'un sevrage en FBS modifie l'activité de ERK et possiblement celle de l'autophagie. Pour analyser l'effet d'une exposition au Cd sur les entérocytes matures, il est préférable de normaliser les prochains résultats sur ceux obtenus dans les cellules maintenues en absence de FBS (Ctrl).

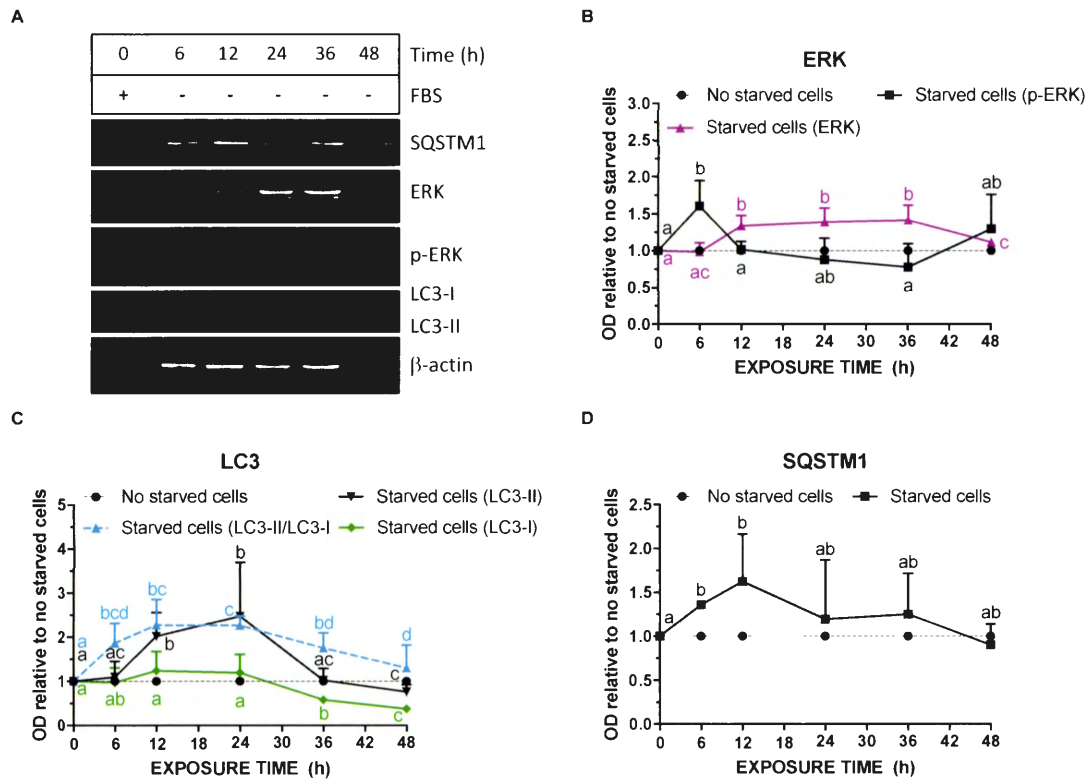


Figure 3.3 Effet du temps de sevrage en FBS sur les niveaux de p-ERK et les marqueurs autophagiques LC3 et SQSTM1. A) Immunobuvardage de protéines de cellules différenciées (21 jours). Niveaux de p-ERK (B), de LC3 (C) ou de SQSTM1 (D) des cellules différenciées maintenues dans du milieu DMEM sans FBS normalisés sur ceux des cellules non sevrées (milieu DMEM en présence de FBS). Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 4 cultures indépendantes. Une différence significative entre chaque traitements est représentée par une lettre alphabétique différente. $P < 0,01$

3.4 Une exposition de 24 h au Cd est nécessaire pour optimiser les niveaux de p-ERK et du marqueur autophagique LC3

Afin de déterminer le temps d'exposition nécessaire à l'activation maximale de ERK en p-ERK, de LC3-I en LC3-II et à l'augmentation d'expression de SQSTM1 par le Cd, les cellules Caco-2 ont été traitées à 10 μ M de Cd sur une période de 0, 6, 12, 24, 36 et 48 h. Par la suite, les niveaux de protéines ont été analysés par immunobuvardage. Après une exposition de 24 h au Cd, les niveaux de p-ERK atteignent un plateau alors

que l'activation maximale de SQSTM1 et de LC3-II s'effectuent dès 36 h d'exposition (Fig. 3.4B, C et D). L'induction maximale de LC3-I est observée dès 24 h (Fig. 3.4C). Afin d'optimiser l'activation de ERK, LC3-II et SQSTM1 dans leur ensemble, il faudrait utiliser un temps d'exposition de 36 h au Cd, mais pour des raisons de logistique, 24 h d'exposition a été choisi puisque ce temps donne aussi de très bonnes réponses. En effet, il permet d'obtenir des niveaux élevés de LC3-I, LC3-II, et de p-ERK. Il permet également une importante augmentation du ratio LC3-II/LC3-I et d'augmenter légèrement les niveaux de SQSTM1. Une exposition de 48 h aurait également pu être choisie. Toutefois puisque une réponse semblable est détectée à 24 h et que l'ensemble des études préalablement effectuées au laboratoire sont sur 24 h, nous avons choisi de poursuivre en utilisant une exposition de 24 h.

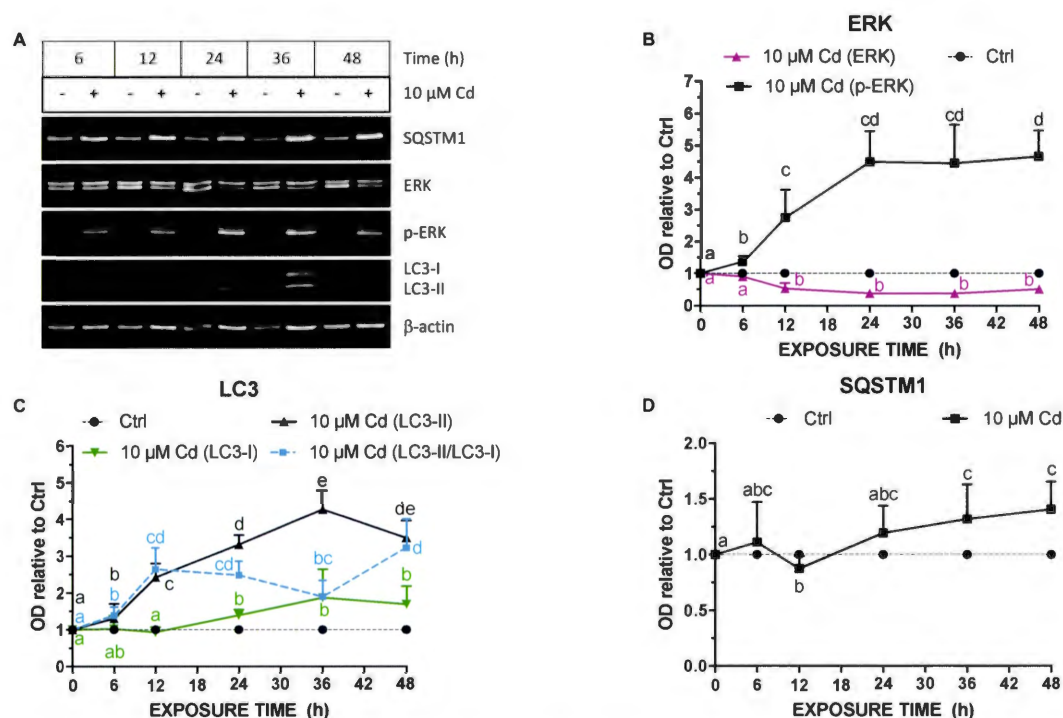


Figure 3.4 Effet du temps d'exposition au Cd sur les niveaux de p-ERK et sur les niveaux des marqueurs autophagiques LC3 et SQSTM1. A) Immunobuvardage de protéines de cellules différenciées (21 jours). Niveaux de p-ERK (B), de LC3 (C) ou de SQSTM1 (D) des cellules différenciées normalisés sur ceux des cellules contrôles (milieu DMEM sans FBS). Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 4 cultures indépendantes. Une différence significative entre chaque traitements est représentée par une lettre alphabétique différente. $P < 0,01$

3.5 Une exposition au Cd modifie les niveaux de LC3-II et de SQSTM1

Pour étudier la corrélation entre l'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd, les cellules ont été traitées à 10 μM de Cd en présence ou en absence de 20 μM de U0126, puis marquées à l'acridine orange. En présence de Cd, le nombre d'autolysosomes augmente dans les entérocytes matures et cette augmentation est inhibée par U0126 (Fig. 3.5A). Par la suite, les niveaux protéiques de p-ERK, LC3 et SQSTM1 ont été analysés par immunobuvardage pour confirmer l'implication de l'activation de ERK par le Cd dans l'activité autophagique. Une exposition à 10 μM de Cd augmente à la fois les niveaux de p-ERK, SQSTM1 et le ratio LC3-II/LC3-I

provenant d'une augmentation de la forme lipidique LC3-II alors qu'elle diminue les niveaux de ERK totale (Fig. 3.5C et D). Une co-exposition à 10 μ M de Cd et 20 μ M de U0126 diminue considérablement les niveaux de p-ERK par rapport à l'exposition au Cd seul et augmente les niveaux de ERK totale. Toutefois, SQSTM1 ne varie pas et le ratio LC3-II/LC3-I augmente (Fig. 3.5C). En regardant plus précisément la variation des formes de LC3, on remarque une diminution de LC3-I alors que la forme lipidique LC3-II ne varie pas expliquant ainsi l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I (Fig. 3.5D). Le marquage à l'acridine orange suggère que l'activation de ERK par le Cd a un rôle important dans l'activité autophagique, mais l'augmentation des niveaux des marqueurs LC3-II et SQSTM1 par une exposition au Cd n'est pas modifiée par la présence de U0126. Donc empêcher l'activation de ERK par U0126 ne prévient pas l'effet du Cd sur LC3-II et SQSTM1. Le lien entre l'activation de ERK par le Cd et l'activité autophagique reste encore à discuter.

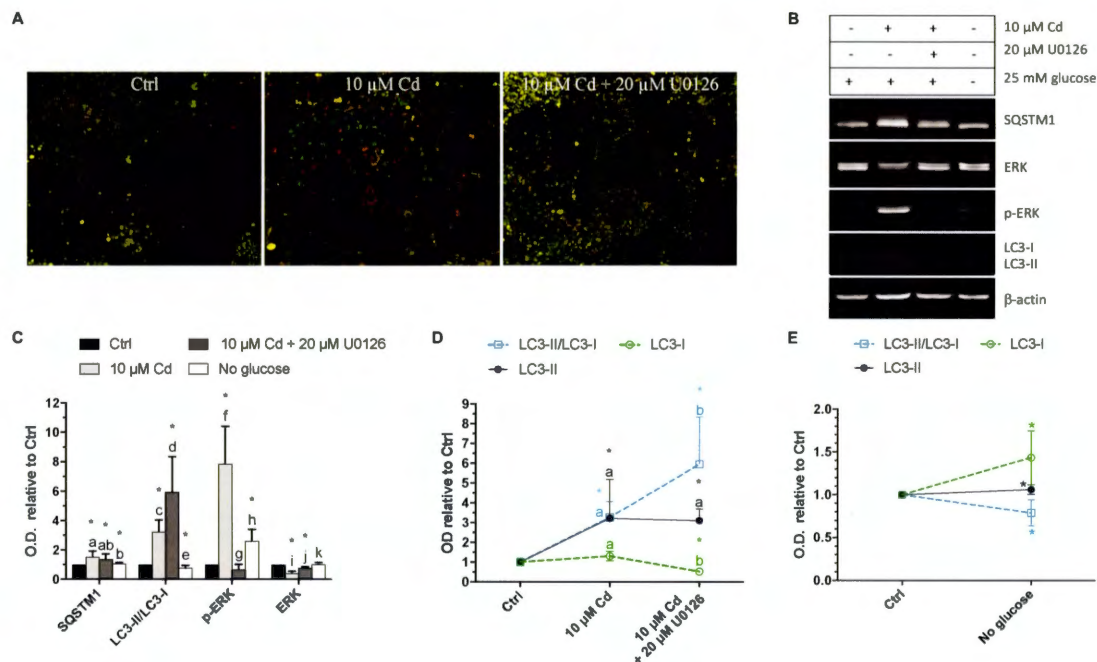


Figure 3.5 Corrélation entre les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 des cellules différenciées (21 jours). A) Images confocales de cellules différenciées marquées avec l'acridine orange. B) Immunobuvardage de protéines de cellules différenciées. C) Niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques des cellules différenciées normalisés sur ceux des cellules contrôles (milieu DMEM sans FBS). D) et E) Niveaux des deux formes du marqueur autophagique LC3 normalisés sur ceux des cellules contrôles. Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 8 cultures indépendantes. * Statistiquement différents des valeurs contrôles correspondantes (milieu DMEM sans FBS). Une différence significative entre chaque traitements est représentée par une lettre alphabétique différente. $P < 0,01$

3.6 Un sevrage en glucose modifie l'activité de ERK et celle de l'autophagie

Le sevrage en glucose cause un stress nutritionnel qui entraîne l'activation de l'autophagie (Roberts *et al.*, 2014). Pour comparer ce mécanisme à celui d'une exposition au Cd, les cellules Caco-2 ont été sevrées en glucose sur une période de 24 h. Ce sevrage augmente les niveaux de p-ERK et de SQSTM1, sans toutefois augmenter le ratio de LC3-II/LC3-I (Fig. 3.5C). En effet, il diminue le ratio LC3-II/LC3-I en augmentant la forme cytosolique LC3-I et légèrement la forme LC3-II (Fig.

3.5E). Cela peut suggérer qu'un sevrage de 24 h en glucose n'est pas suffisant pour induire l'autophagie.

Pour avoir un meilleur aperçu de l'effet d'un sevrage en glucose sur l'activité autophagique, le temps de sevrage a été augmenté à 48 h. Suite au marquage à l'acridine orange, il est possible d'observer une augmentation du nombre d'autolysosomes (fluorescence rouge) et celle-ci est inhibée par la présence de 20 μ M de U0126 (Fig. 3.6A). Au niveau protéique, le sevrage en glucose de 48 h augmente le ratio LC3-II/LC3-I suite à une importante augmentation de LC3-II comparativement à la très faible augmentation de LC3-I (Fig. 3.6C et D). Un sevrage de 48 h en glucose permet également d'augmenter les niveaux de SQSTM1 alors qu'il diminue les niveaux de p-ERK. Toutefois, une exposition à 20 μ M de U0126 lors du sevrage diminue davantage les niveaux de p-ERK (Fig. 3.6C). Par ailleurs, la présence de U0126 diminue l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I induite par le sevrage en glucose, en diminuant fortement les niveaux de la forme LC3-II (Fig. 3.6C et D). Cela suggère qu'un sevrage en glucose modifie l'activité de ERK et celle de l'autophagie.

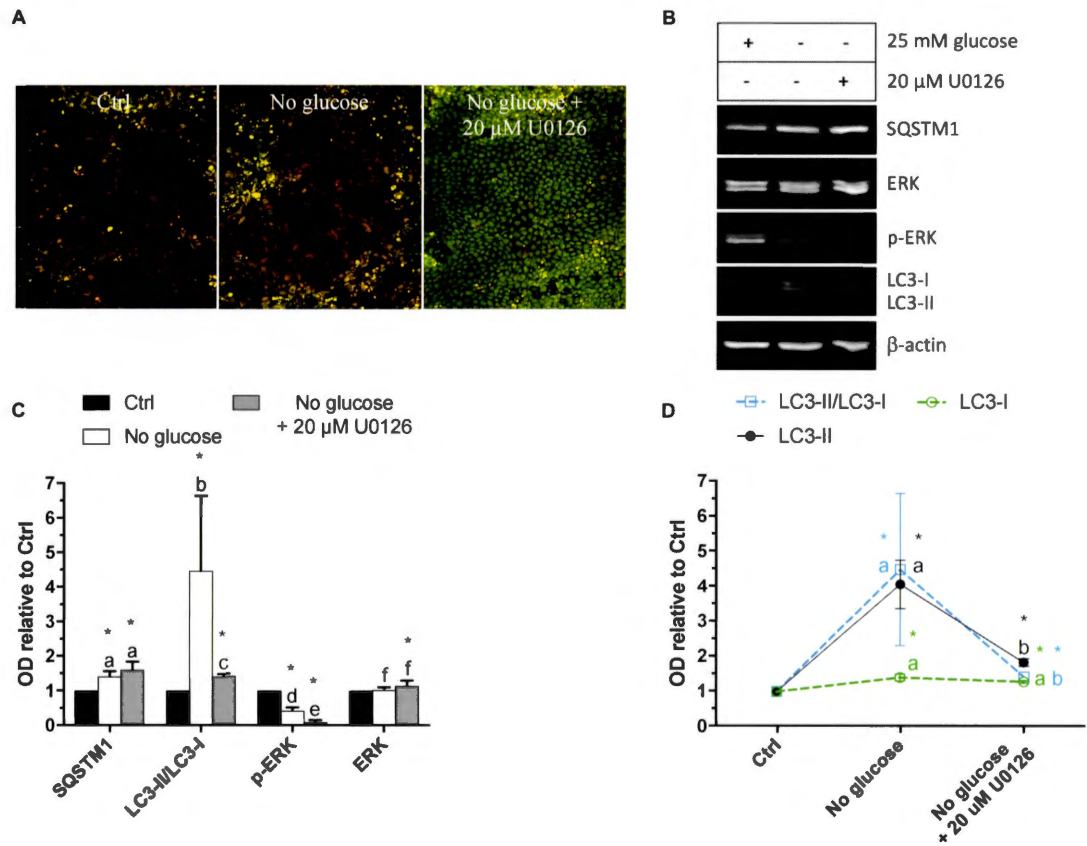


Figure 3.6 Corrélation entre les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 lors d'un sevrage de 48 h en glucose. A) Images confocales de cellules différenciées (21 jours) marquées avec l'acridine orange. B) Immunobuvardage de protéines de cellules différenciées. C) Niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 des cellules différenciées normalisés sur ceux des cellules contrôles (milieu DMEM sans FBS). D) Niveaux des deux formes du marqueur autophagique LC3 normalisés sur ceux des cellules contrôles. Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 4 cultures indépendantes. * Statistiquement différents des valeurs contrôles correspondantes (milieu DMEM sans FBS). Une différence significative entre chaque traitements est représentée par une lettre alphabétique différente. $P > 0,01$

3.7 L'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd impliquent l'induction des ROS

Plusieurs articles ont montré qu'une exposition au Cd induisait un stress oxydatif (Liu *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2014; Thevenod et Lee, 2013). Il serait alors intéressant de vérifier si les ROS éventuellement produits suite à l'exposition au Cd seraient responsables de l'activation de ERK et celle de l'autophagie dans les entérocytes matures. Cependant, il faut tout d'abord s'assurer qu'une exposition au Cd ou au prooxydant L-buthionine-sulfoximine (BSO) induit la formation de ROS et que les traitements contenant l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) neutralisent les ROS. Pour ce faire, les cellules Caco-2 ont été traitées à 10 μ M de Cd en présence ou en absence de 1 mM de NAC et 3 mM de BSO et marquées avec la sonde 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) qui émet une fluorescence verte en présence de ROS (Fig. S1). Le traitement au Cd augmente la fluorescence et modifie la forme des cellules. Ces dernières sont beaucoup plus arrondies et elles ne sont plus reliées entre elles par des jonctions serrées. Une pré-exposition au NAC ne diminue pas la fluorescence induite par le Cd, mais restaure légèrement la forme des cellules. Il y a toujours des cellules arrondies et dépourvues de jonctions serrées, mais celles-ci sont moins nombreuses. Une co-exposition NAC-Cd prévient la perte de jonctions et diminue la fluorescence alors qu'une co-exposition BSO-Cd augmente légèrement la fluorescence et altère davantage la forme des cellules. Ces résultats confirment que les traitements contenant du BSO et du Cd induisent un stress oxydatif alors que le traitement avec du NAC les neutralise. Toutefois, une pré-exposition au NAC n'est pas suffisante pour protéger totalement les cellules d'un stress oxydatif induit par le Cd.

Afin de vérifier si l'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd implique l'induction des ROS dans les entérocytes matures, les cellules préalablement traitées au Cd, au NAC et/ou au BSO ont été marquées à l'acridine orange (Fig. 3.7). Une exposition à 10 μ M de Cd augmente le nombre de vacuoles acides et cet effet est

amplifié lors d'une co-exposition avec 3 mM de BSO. Toutefois, une exposition au BSO seul n'est pas suffisante pour augmenter la fluorescence. En présence de 1 mM de NAC seule, la fluorescence est comparable à celle observée dans les cellules contrôles et une co-exposition au Cd avec de la NAC inhibe l'augmentation du nombre d'autolysosomes induite par le Cd (Fig. 3.7).

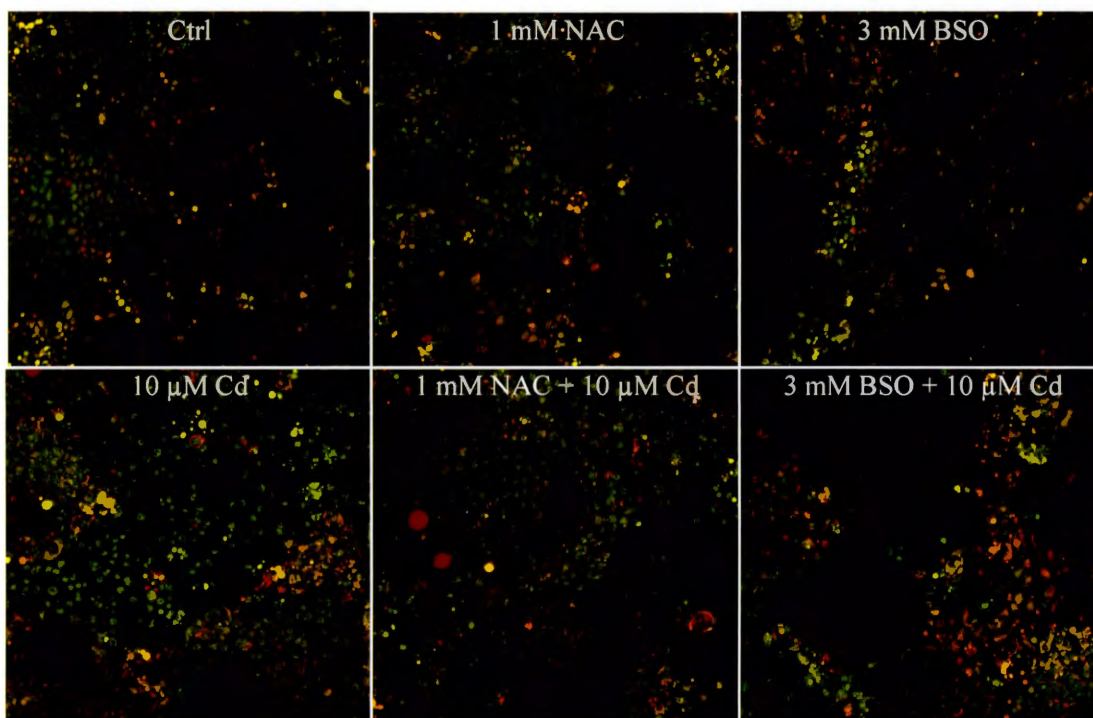


Figure 3.7 Implication d'un déséquilibre redox dans la formation d'autolysosomes par le Cd. Images confocales de cellules différenciées (21 jours) marquées à l'acridine orange.

Par la suite, les niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 ont été analysés par immunobuvardage. Une co-exposition des cellules au Cd et au BSO augmente les niveaux de p-ERK par rapport à une exposition au Cd seul, mais elle n'augmente pas les niveaux de SQSTM1 ni le ratio LC3-II/LC3-I (Fig. 3.8B). Ce dernier se manifeste par une augmentation de LC3-I de façon significative et de LC3-II de façon non significative, ce qui peut expliquer qu'il n'y ait pas de variation du ratio

LC3-II/LC3-I (Fig. 3.8D). Une exposition à 3 mM de BSO augmente les niveaux de p-ERK et le ratio LC3-II/LC3-I en augmentant à la fois les niveaux de LC3-I et de LC3-II par rapport au contrôle (Fig. 3.8B et C). Comparée à une exposition au BSO seul, la co-exposition BSO-Cd amplifie l'augmentation de ces protéines en plus d'augmenter les niveaux de SQSTM1. Toutefois, l'augmentation de LC3-II n'est pas statistiquement significative (Fig. 3.8B et C). Ces résultats suggèrent que l'induction des ROS suite à l'exposition au Cd ou au BSO est responsable de l'activation de ERK et celle de l'autophagie dans les entérocytes matures.

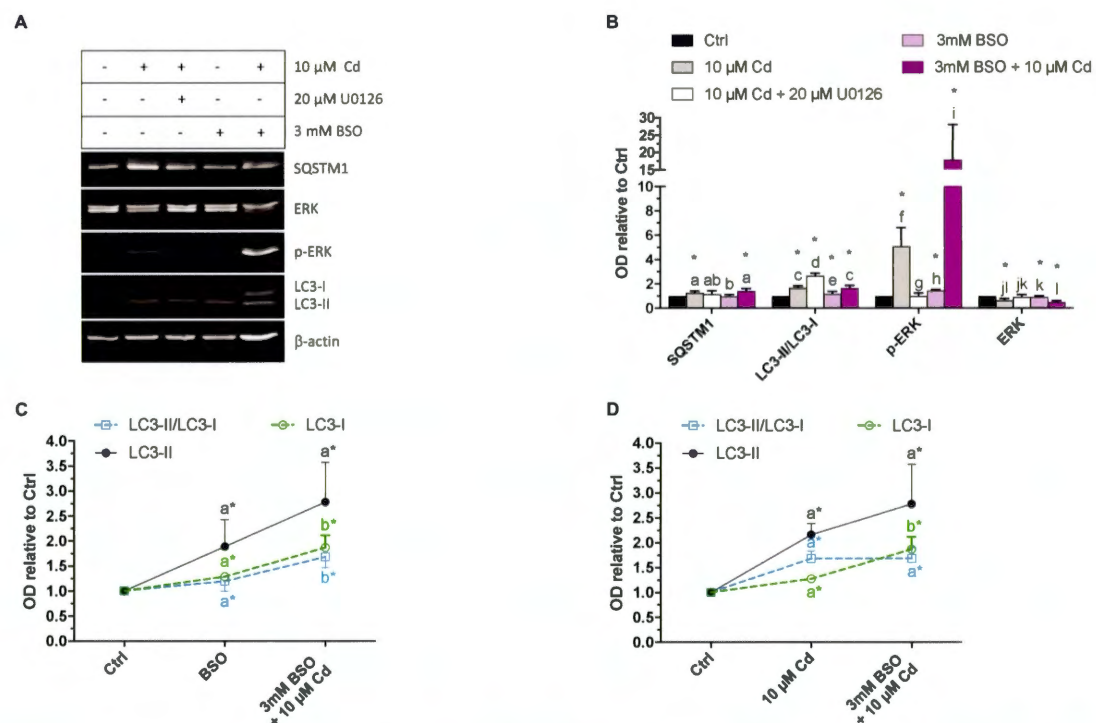


Figure 3.8 Effet de conditions prooxydantes sur les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 en présence de Cd A) Immunobuvardage de protéines de cellules différenciées. B) Niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques des cellules différenciées normalisés sur ceux des cellules contrôles (milieu DMEM sans FBS). C) et D) Niveaux des deux formes du marqueur autophagique LC3 normalisés sur ceux des cellules contrôles. Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 4 cultures indépendantes. * Statistiquement différents des valeurs contrôles correspondantes (milieu DMEM sans FBS). Une différence significative entre chaque traitements est représentée par une lettre alphabétique différente. $P < 0,01$

Une pré-exposition à 1 mM de NAC suivie d'une exposition à 10 μ M de Cd a été effectuée afin de vérifier si augmenter préalablement la capacité antioxydante peut diminuer l'effet d'un traitement au Cd dans les cellules intestinales. Cette pré-exposition augmente les niveaux de p-ERK et diminue légèrement le ratio LC3-II/LC3-I par rapport à une exposition au Cd. Toutefois, il n'y a pas de variations significatives du marqueur SQSTM1, ni des formes LC3-II et LC3-I (Fig. 3.9B et C). Par la suite, l'effet de NAC a été testé en condition de co-exposition des cellules au Cd. La présence de NAC n'a pas d'effet sur l'augmentation des niveaux de SQSTM1 induite par le Cd, mais elle diminue l'induction de p-ERK et l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I que provoque le Cd (Fig. 3.9B). En regardant plus en détail la variation des formes de LC3, on remarque une augmentation de LC3-I alors que LC3-II ne varie pas de façon significative expliquant ainsi la diminution du ratio LC3-II/LC3-I observée en présence de NAC ajouté au traitement de Cd (Fig. 3.9D). Comparer l'effet de la NAC utilisée en pré- ou en co-traitement des cellules avec le Cd permet de distinguer que l'antioxydant NAC diminue davantage les niveaux de LC3-II et augmente davantage les niveaux de LC3-I lorsqu'il est présent lors du traitement au Cd. Cependant, ces variations ne sont pas significativement différentes (Fig. 3.9E). Ces résultats suggèrent qu'augmenter la capacité antioxydante des cellules intestinales prévient l'activation de ERK et celle de l'autophagie induite par le Cd. Toutefois, afin de protéger les cellules contre une exposition au Cd, il est préférable d'utiliser le NAC au moment même du traitement au Cd; un prétraitement au NAC ne suffit pas.

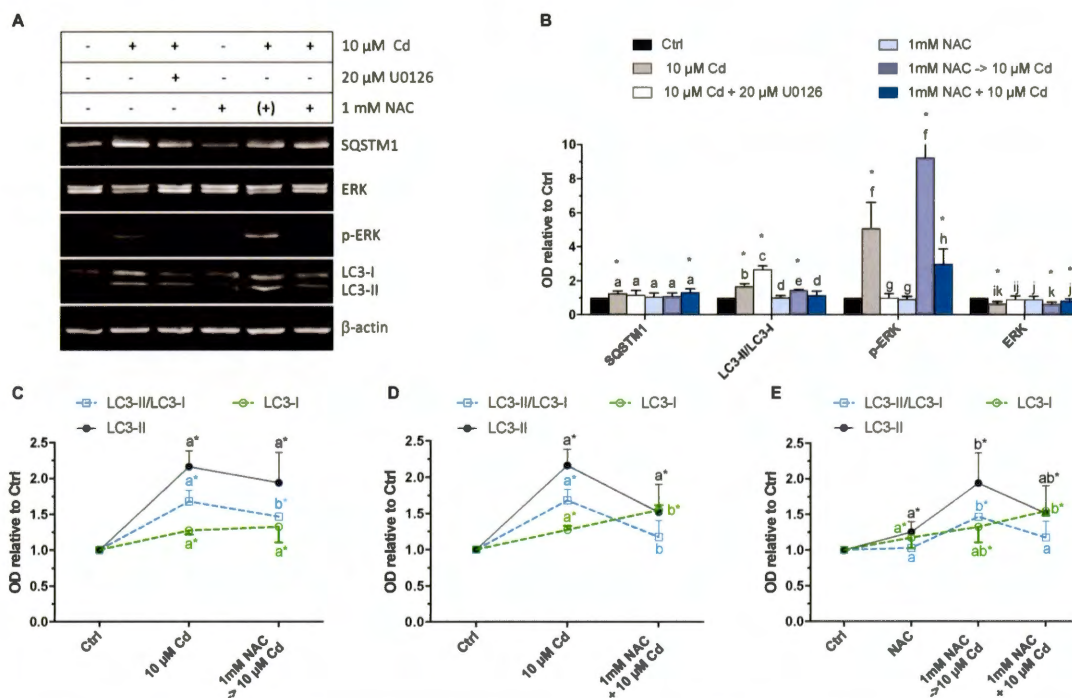


Figure 3.9 Effet de conditions antioxydantes sur les niveaux de p-ERK et ceux des marqueurs autophagiques SQSTM1 et LC3 en présence de Cd A) Immunobuvardage de protéines de cellules différenciées. B) Niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques des cellules différenciées normalisés sur ceux des cellules contrôles (milieu DMEM sans FBS). C) à E) Niveaux des deux formes du marqueur autophagique LC3 normalisés sur ceux des cellules contrôles. Les données sont les moyennes \pm écart-types obtenues sur 3 à 4 cultures indépendantes. * Statistiquement différents des valeurs contrôles correspondantes (milieu DMEM sans FBS). Une différence significative entre chaque traitements est représentée par une lettre alphabétique différente. $P < 0,01$

Le NAC pouvant former des complexes avec le Cd, l'accumulation de Cd dans les cellules a été analysée par ICP-MS afin de vérifier que la diminution de l'expression des protéines ne provient pas d'une diminution de l'accumulation de Cd. La concentration cellulaire de Cd mesurée au bout de 24 h d'exposition à 10 μ M de Cd est comparable en présence ou en absence de 1 mM de NAC ($15,2 \pm 2,8$ μ g/mg de poids sec vs. $13,9 \pm 0,5$ μ g/mg de poids sec). Cela suggère que l'effet observé provient bien de la présence de l'antioxydant et non d'une diminution de l'accumulation du Cd dans la cellule.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 L'activité de ERK et celle de l'autophagie diminuent considérablement dans les cellules différenciées

L'autophagie est un processus d'auto-digestion des organelles et des protéines endommagées afin de maintenir la balance énergétique ainsi que la qualité des composantes cytosoliques. À l'instar de ERK, elle est active dans les cellules indifférenciées et elle diminue au cours de la différenciation entérocytaire pour être quasiment inexistante dans les cellules intestinales différenciées (Aliaga *et al.*, 1999; Groulx *et al.*, 2012). Dans notre étude, autant dans les cellules maintenues en présence de FBS que dans les cellules sevrées en FBS pendant 24 h, on remarque que la différenciation cellulaire influence le nombre d'autolysosomes marqués à l'acridine orange et les niveaux de LC3-I, de SQSTM1 et de p-ERK sans affecter les niveaux de LC3-II (Fig. 3.1). La formation des autolysosomes, les niveaux de LC3-I et l'activité de ERK sont plus faibles dans les cellules différenciées. L'activation de ERK nécessaire à la prolifération n'étant plus requise dans les cellules différenciées, les niveaux de p-ERK sont plus faibles dans les cellules matures. Toutefois, les niveaux de LC3-II ne varient pas alors que le nombre d'autolysosomes présents dans les cellules diminuent. Cela peut provenir de la localisation ainsi que de la fonction de LC3-II. En général, il est localisé au niveau de la membrane des autophagosomes pour permettre l'élongation de la membrane et une diminution du nombre d'autolysosomes (fusion de l'autophagosome avec le lysosome) est corrélée à une diminution de la forme LC3-II.

Toutefois, il peut également se lier à la membrane de l'endosome impliqué dans l'endocytose. Cela peut expliquer pourquoi les niveaux de LC3-II ne varient pas lors de la différenciation cellulaire malgré une diminution des autolysosomes (Klionsky *et al.*, 2016). Il est à noter qu'aucune quantification du nombre de vacuoles acides n'a pu être effectuée sur les images confocales de marquage à l'acridine orange. Lorsque les cellules sont différenciées, certaines sont plus polarisées que d'autres et cela se caractérise par une forme plus arrondie. En imagerie confocale, ces cellules forment de petits points jaunes et verts alors que les cellules moins polarisées sont moins surélevées. Nous observons également une différence de fluorescence plus remarquable entre les différents traitements dans les cellules moins polarisées que dans les cellules plus polarisées. Cette différence de morphologie entre les cellules a contribué à augmenter l'écart-type sur l'estimation du nombre de vacuoles acides, malgré un essai de dénombrement distinct en fonction de la morphologie. Pour cette raison, les images confocales doivent être considérées comme des résultats qualitatifs et non quantitatifs. Finalement, les niveaux de SQSTM1 sont plus élevés dans les cellules différenciées. En générale, l'autophagie permet la dégradation des protéines ubiquitinées qui sont liées à SQSTM1. Ce dernier se lie à LC3 pour permettre la séquestration de ces protéines dans les autophagosomes. En absence d'autophagie, les protéines ubiquitinées et par le fait même SQSTM1 s'accumulent dans les cellules, ce qui explique l'augmentation des niveaux de SQSTM1 et une corrélation négative avec l'activité autophagique dans les cellules indifférenciées (Klionsky *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Cependant, l'étude de Groulx *et al.* (2012) a montré que les cellules Caco-2, soit le modèle cellulaire utilisé dans notre étude, faisait exception à la règle, c'est-à-dire que les niveaux de SQSTM1 diminuaient au cours de la différenciation cellulaire. Ils avaient attribué cette exception à la provenance des cellules issues d'un adénocarcinome. Pourtant, nos résultats suggèrent que les cellules Caco-2 suivent la même tendance que les cellules normales, soit une corrélation négative des niveaux de SQSTM1 avec l'activité autophagique. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activité autophagique et celle de ERK sont plus élevées dans les cellules

indifférenciées et ces activités diminuent considérablement dans les cellules différenciées.

4.2 L'activité de ERK, basale ou induite par le Cd, influence l'autophagie

ERK est généralement activée par des facteurs de croissance pour permettre la prolifération et la différenciation cellulaire. Cependant, Mantha et Jumarie (2010) ont montré que le Cd, à des concentrations non cytotoxiques, stimule l'activité de ERK dans les entérocytes matures là où ERK est peu active alors qu'il n'a pas d'effet sur les cellules indifférenciées où ERK est fortement active. Par ailleurs, des études effectuées sur la lignée cellulaire ostéoblastique fœtale humaine (hFOB 1,19) et sur des cellules provenant d'une leucémie myéloïde chronique (K562, KU812) ont montré que l'activité autophagique requiert l'activation de ERK (Meng *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009a). Nos résultats montrent qu'une exposition à 10 μ M de Cd permet l'activation de ERK et augmente les niveaux de p-ERK (Fig. 3.5). Elle augmente également les niveaux de LC3-II et le nombre d'autolysosomes sans toutefois modifier les niveaux de LC3-I. Cela peut provenir de la conversion rapide de LC3-I en LC3-II nécessaire à la formation des autophagosomes et à l'augmentation des autolysosomes dans les cellules empêchant ainsi l'accumulation de LC3-I (Groulx *et al.*, 2012; Klionsky *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013). Cette exposition au Cd augmente l'abondance de SQSTM1 déjà élevée dans les cellules différenciées. Les niveaux de SQSTM1 peuvent être influencés de différentes façons. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation RAF1/Raf-MAP2K/MEK-MAPK/ERK peut surexprimer SQSTM1 (Klionsky *et al.*, 2016). En présence de U0126, les niveaux de LC3-I et le nombre d'autolysosomes diminuent, mais il ne prévient pas l'augmentation de SQSTM1 et de LC3-II induite par le Cd (Fig. 3.5). Comme discuté précédemment, l'absence de diminution de la forme LC3-II malgré une diminution d'autolysosomes peut provenir de la présence d'endosomes dans les cellules alors que l'augmentation de SQSTM1 provient d'une accumulation des protéines ubiquitinées suite à la

diminution de l'activité autophagique par U0126 (Klionsky *et al.*, 2016). Dans les cellules indifférenciées, une inhibition de l'activité basale de ERK par U0126 diminue le nombre d'autolysosomes ainsi que les niveaux de LC3-I et de LC3-II (Fig. 3.2). Cependant, la conversion de LC3-I en LC3-II augmente expliquant ainsi une diminution moins prononcée de LC3-II. Finalement, l'expression de SQSTM1 augmente en présence de U0126 puisqu'une inhibition de l'autophagie entraîne une accumulation de protéines ubiquitinées. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité basale de ERK et son activation par le Cd module de façon importante l'activité autophagique.

4.3 Une exposition de 24 h au Cd est nécessaire pour optimiser l'activation de ERK et les niveaux de LC3

Plusieurs études ont analysé la progression des niveaux de LC3-I et II dans le temps lors d'une exposition au Cd dont celle de Son *et al.* (2011) menée sur les cellules de l'épiderme et celle de Pi *et al.* (2013) qui a utilisé des cellules normales de foie humain comme modèle *in vitro* ainsi que le foie de souris comme modèle *in vivo*. Ces études ont montré que les niveaux de LC3-II augmentaient en fonction du temps d'exposition au Cd. Cependant, ils ont gardé un intervalle de 24 h et ils n'ont pas vérifié si l'augmentation observée se poursuivait au-delà de 24 h. Wang *et al.* (2013) ont également utilisé un intervalle de 24 h, mais avec une concentration plus élevée de Cd. Ils ont utilisé une concentration de 20 μ M de Cd, soit le double de la concentration en Cd utilisée dans notre étude et dans celle de Pi *et al.* (2013) et de Son *et al.* (2011). Ces derniers ont montré que les niveaux de LC3-I et de LC3-II sont optimaux lors d'une exposition de 4 h. Nos résultats montrent des niveaux maximaux de LC3-I dès 24 h d'exposition au Cd qui correspond également au temps d'exposition pour atteindre l'activation maximale de ERK (Fig. 3.4). La conversion de LC3-I en LC3-II est maximale dès 12 h d'exposition au Cd, ce qui permet d'obtenir des niveaux de LC3-II optimaux à 36 h d'exposition. Ce temps correspond aussi au temps d'expression

maximale de SQSTM1. Les niveaux de LC3-II maximaux sont atteints après avoir obtenu les plus hauts niveaux de LC3-I et l'activation maximale de ERK puisque LC3-I est le précurseur de LC3-II et que p-ERK est importante pour l'activité autophagique. Toutefois, ces temps d'exposition nécessaires à l'induction maximale de LC3-I et LC3-II sont beaucoup plus élevés que ceux déterminés dans l'étude de Wang *et al.* (2013). Cette différence peut provenir de la concentration de Cd utilisée ainsi que de la provenance des cellules. En effet, ces auteurs ont utilisé une concentration de 20 μM de Cd, soit le double de la concentration utilisée dans notre étude et le modèle cellulaire avec lequel ils ont travaillé est un modèle neuronal, ce qui peut expliquer le temps d'exposition beaucoup plus court. De plus, les niveaux de LC3-II varient beaucoup plus rapidement que dans le cas de SQSTM1. Nos résultats montrent des variations significatives dans les niveaux de LC3-II à partir de 6 h d'exposition au Cd alors que les niveaux de SQSTM1 ne varient qu'après 24 h d'exposition, soit aux mêmes temps que discutés par Klionsky *et al.* (2016).

4.4 L'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd impliquent l'induction de ROS

Le cadmium et le L-buthionine-sulfoximine (BSO) sont des prooxydants, c'est-à-dire qu'ils favorisent la formation indirecte des ROS dans la cellule causant un déséquilibre redox. Le cadmium interagit avec les groupements thiols des antioxydants diminuant ainsi leur disponibilité dans la cellule alors que le BSO inhibe la synthèse du glutathion (GSH). Ce dernier, en présence de ROS, s'oxyde (GSSG) pour neutraliser un éventuel stress oxydatif. Des enzymes, dont la glutathion réductase, peuvent catalyser la réduction du GSSG en GSH en présence du cofacteur $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Liu et Templeton, 2008; Rani *et al.*, 2014; Thevenod et Lee, 2013). Dans les entérocytes matures, on remarque qu'une exposition au Cd et au BSO induit la formation de ROS détectés par la sonde DCFH-DA et altère les jonctions serrées rendant les cellules plus arrondies (Fig. S1). Ces jonctions relient les cellules entre elles et constituent une barrière

paracellulaire qui régule la perméabilité de l'épithélium intestinal. Duizer *et al.* (1999) ont montré que l'altération des jonctions serrées par le Cd augmente le transport paracellulaire favorisant ainsi le passage de molécules de tailles plus élevées. La N-acétylcystéine est un antioxydant utilisé en laboratoire et assure les mêmes fonctions que la cystéine dans les cellules. Elle se compose d'un groupement thiol qui neutralise les ROS et diminue les dommages cellulaires causés par un stress oxydatif (Thevenod, 2009). Dans les cellules intestinales, une pré-exposition des cellules à la NAC ne suffit pas à inhiber complètement la formation des ROS ni à restaurer la forme des cellules contrairement à l'exposition conjointe avec le Cd (Fig. S1). Ces résultats suggèrent que la cellule ne stocke pas d'antioxydant au-delà de ces besoins et que suite à une pré-exposition au NAC, elle diminue la synthèse d'antioxydants endogènes. Il serait alors intéressant de vérifier cette hypothèse lors d'une pré-exposition à la NAC.

Les ROS ont également un rôle important dans l'activation de ERK et celle de l'autophagie. Nos résultats montrent qu'une co-exposition au BSO et au Cd amplifie l'augmentation du nombre de lysosomes, l'activation de ERK ainsi que des niveaux de LC3-I induits par le Cd (Fig. 3.7 et 3.8). Elle augmente également les niveaux de LC3-II de façon non significative. Une exposition au BSO seul augmente l'activité de ERK, les niveaux de LC3-I ainsi que ceux de LC3-II par rapport aux cellules contrôles, ce qui suggère qu'un déséquilibre redox provoqué par une situation prooxydante peut activer ERK et l'autophagie. Cependant, le BSO seul ne permet pas d'augmenter les niveaux de SQSTM1 ni le nombre d'autolysosomes dans la cellule. Dès l'ajout de Cd au BSO, on observe une plus grande augmentation des niveaux de p-ERK, SQSTM1, LC3-I et de LC3-II par rapport au BSO. Il est à noter que l'augmentation de LC3-II n'est pas significative. De plus, l'ajout de Cd augmente le nombre d'autolysosomes mesurés dans les cellules traitées au BSO. La situation prooxydante induite par 3 mM de BSO pendant 24 h n'est pas suffisante pour induire l'activité autophagique et nécessite la présence de Cd. La NAC prévient l'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd lors d'une co-exposition NAC-Cd (Fig. 3.7 et 3.9). Elle diminue

l'augmentation du nombre d'autolysosomes, des niveaux de p-ERK et de LC3-II alors qu'elle favorise l'augmentation des niveaux de LC3-I par le Cd. Cependant, la diminution de LC3-II n'est pas significative. Cela signifie qu'une diminution de la conversion de LC3-I en LC3-II permet une accumulation de LC3-I dans les cellules. Traiter les cellules à la NAC avant de les exposer au Cd augmente l'activation de ERK par le Cd sans avoir d'effet sur les niveaux de LC3-I et II. Comme discuté, l'hypothèse serait que la cellule ne peut pas stocker des niveaux d'antioxydants supérieurs à ses besoins et réduirait ses niveaux d'antioxydants endogènes en présence d'antioxydants exogènes, mais cette hypothèse reste à confirmer. Bastola *et al.* (2017) ont étudié l'effet d'une pré-exposition à la NAC sur des cellules provenant d'un neuroblastome lors d'un traitement au cearoin. Ce dernier est un anti-inflammatoire qui induit l'activation de ERK et celle de l'autophagie. Ces auteurs ont montré qu'une pré-exposition à la NAC diminue les niveaux de p-ERK et de LC3-II ainsi que la formation de ROS induite par le cearoin. Lv *et al.* (2018) et So *et al.* (2017) ont respectivement étudié l'effet de la NAC sur des cellules cancéreuses du poumon et sur des cellules cancéreuses de l'épiderme oral humain lors d'une exposition au Cd. Ces derniers ont également montré qu'une pré-exposition à la NAC diminuait les niveaux de LC3-II induits par le Cd. Les résultats de ces trois études ne concordent pas avec ceux que nous avons obtenus lors de la pré-exposition à la NAC puisque dans leur étude, cette pré-exposition diminue l'effet du Cd dans les cellules. Cela peut provenir du temps de pré-traitement à la NAC. Dans ces études, le pré-traitement était d'une à deux heures ce qui, selon l'hypothèse préalablement énoncée, laisserait peu de temps aux cellules pour diminuer leur capacité antioxydante endogène. Pour résumer, le BSO stimule l'effet du Cd dans les cellules alors que la NAC réduit l'effet du Cd dans les cellules, ce qui suggère que l'activation de ERK et celle de l'autophagie par le Cd implique l'induction de ROS.

4.5 L'induction de l'activité autophagique par un sevrage en glucose implique l'activation de ERK

L'autophagie peut être influencée par un stress nutritionnel, tel qu'un sevrage en glucose. Toutefois, nos résultats montrent qu'un sevrage de 24 h en glucose n'est pas suffisant pour induire l'autophagie et ce malgré une activation de ERK (Fig. 3.5). Les niveaux de LC3-I augmentent, mais la conversion de LC3-I en LC3-II diminue, ce qui provoque une faible augmentation des niveaux de LC3-II dans les entérocytes matures. Selon Roberts *et al.* (2014), un sevrage en glucose de 16 h est suffisant pour induire l'autophagie dans les cardiomyocytes alors que Nighot *et al.* (2015) montrent qu'il faudrait un sevrage de 48 h en glucose dans les cellules Caco-2 pour avoir une augmentation plus remarquable du ratio LC3-II/LC3-I et qu'un sevrage de 72 h permettrait d'obtenir une augmentation maximale de ce ratio. Pour cette raison, nous avons augmenté le temps de sevrage à 48 h, ce qui a permis d'augmenter de façon plus flagrante les niveaux de LC3-II et de SQSTM1 alors que l'augmentation de LC3-I était beaucoup plus légère: la variation du ratio LC3-II/LC3-I était d'autant plus importante (Fig. 3.6). Cela signifie que la conversion de LC3-I en LC3-II est beaucoup plus élevée que celle obtenue lors d'un sevrage de 24 h. De plus, le nombre d'autolysosomes augmente lors du sevrage de 48 h, ce qui suggère que les protéines LC3-II formées sont impliquées dans la formation des autophagosomes. Lors d'un sevrage en glucose prolongé, l'expression de SQSTM1 est corrélée négativement avec l'activité autophagique, par contre ce sevrage stimule la transcription de SQSTM1 expliquant ainsi l'augmentation des niveaux protéiques de SQSTM1 dans notre étude (Klionsky *et al.*, 2016). Toutefois, les niveaux de p-ERK diminuent lors d'un sevrage en glucose de 48 h alors qu'ils augmentent lors du sevrage de 24 h. Si l'on considère que l'activation de ERK est en amont du processus autophagique, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle ERK permet de déclencher l'autophagie lors d'un sevrage en glucose, mais l'activation de ERK ne serait pas maintenue lors de ce processus. Lorsque l'autophagie est à son apogée (*i.e* sevrage en glucose de 48 h), l'activation de ERK n'est plus requise,

ce qui expliquerait la diminution des niveaux de p-ERK. Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules ont été à la fois sevrées en glucose et exposées à 20 μ M de U0126 pendant 48 h. Une inhibition de l'activation de ERK par U0126 prévient l'augmentation du nombre d'autolysosomes et des niveaux de LC3-II induite par le sevrage (Fig. 3.6). Les niveaux de LC3-I restent stables en présence de U0126, mais la conversion de LC3-I en LC3-II diminue entraînant par le fait même une diminution des niveaux de LC3-II. Toutefois, il ne prévient pas l'augmentation significative des niveaux de SQSTM1. Une inhibition de l'autophagie empêche la dégradation des protéines ubiquitinées et par le fait même de SQSTM1 qui est lié à ces protéines augmentant ainsi les niveaux de SQSTM1. Ces résultats suggèrent que l'activation de ERK a un rôle important dans l'induction de l'activité autophagique lors d'un sevrage en glucose.

4.6 Un sevrage en FBS modifie les niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques

Dans le cadre de cette étude, le FBS est nécessaire à la prolifération et à la différenciation cellulaire (Jumarie et Malo, 1991). Un sevrage en FBS peut causer un stress nutritionnel tout comme le sevrage en glucose et modifier l'activité de ERK et celle de l'autophagie. En effet, les cellules de 21 jours sevrées en FBS possèdent des niveaux plus élevés de p-ERK, SQSTM1 et LC3-II alors que les niveaux de LC3-I restent constants puis diminuent après 24 h de sevrage (Fig. 3.3). C'est l'augmentation de la conversion de LC3-I en LC3-II qui est responsable de l'augmentation des niveaux de LC3-II. Les niveaux de SQSTM1 sont corrélés positivement avec ceux de LC3-II, ce qui suggère qu'un sevrage en FBS peut agir comme un sevrage en glucose sur l'expression de SQSTM1 et augmenter la transcription de son gène (Klionsky *et al.*, 2016). De plus, l'activation de ERK s'effectue en même temps que l'augmentation de SQSTM1 et de la conversion de LC3-I en LC3-II, mais une fois que les niveaux de LC3-II augmentent, les niveaux de p-ERK diminuent. Cela suggère que la voie de

signalisation de ERK déclenche l'autophagie lors d'un sevrage en FBS et en glucose, mais que l'activation de ERK n'est pas maintenue alors qu'une exposition au Cd maintient l'activation de ERK (Fig. 3.3, 3.4, 3.5 et 3.6). Malgré les variations des niveaux de p-ERK et des marqueurs autophagiques, le sevrage en FBS est nécessaire lors des traitements au Cd afin de garder une concordance avec l'étude de Mantha et Jumarie (2010) qui ont observé une stimulation de ERK après 24 h d'exposition à 10 μ M de Cd en absence de FBS. Pour s'assurer que l'effet observé provient uniquement des traitements au Cd, les résultats ont été normalisés sur ceux des cellules sevrées en FBS, ici utilisées comme cellules contrôles.

4.7 La β -actine comme contrôle de chargement

Les immunobuvardages sont utilisés comme analyse quantitative pour déterminer les niveaux de certaines protéines dans un échantillon (Taylor et Posch, 2014). Toutefois, il faut s'assurer que les variations obtenues dans les niveaux de protéines ne proviennent pas de différentes quantités d'échantillons chargées sur le gel, mais bien des traitements effectués. Il est donc important d'utiliser un contrôle de chargement (Vigelso *et al.*, 2015). Celui-ci permet de normaliser les résultats en fonction des niveaux de protéines chargées sur le gel et il ne doit pas lui-même varier en fonction des traitements (Taylor et Posch, 2014). Trois contrôles de chargement sont couramment utilisés pour les immunobuvardages: la β -actine, la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) et l' α -tubuline (Vigelso *et al.*, 2015). Dans le cas présent, la β -actine a été utilisée pour normaliser les niveaux des protéines étudiées. Toutefois, cette dernière a tendance à varier entre les puits dans certains immunobuvardages ce qui peut nous mener à nous interroger sur le choix de cette protéine comme contrôle de chargement. Cependant, en portant plus attention à ces variations, nous remarquons qu'elles ne sont pas reproduites dans chacun des immunobuvardages, ce qui suggèrent qu'elles ne proviennent pas des traitements, mais plutôt du chargement des échantillons. Cependant, lorsque l'autophagie est induite, dans certains organismes

cela peut influencer les niveaux de la β -actine (Klionsky *et al.*, 2016). C'est pourquoi dans les études futures sur le flux autophagique, nous utiliserons la GAPDH comme contrôle de chargement.

4.8 Étudier le flux autophagique permettrait de connaître à quelle étape du processus autophagique le Cd agit

Une approche complémentaire pour étudier l'effet d'un traitement sur l'activité autophagique est d'étudier le flux autophagique en utilisant des inhibiteurs autophagiques qui agissent à différentes étapes du processus autophagique. Par exemple, la bafilomycine et la chloroquine agissent sur l'acidité des lysosomes nécessaire à la dégradation des composantes cytosoliques dans les autolysosomes. La bafilomycine inhibe la pompe V-ATPase essentielle au maintien du gradient de protons alors que la chloroquine pénètre dans le lysosome par osmose pour interférer avec le pH (Rubinsztein *et al.*, 2007; Yoshimori *et al.*, 1991). Cela a pour effet d'augmenter le pH dans les autolysosomes et d'inhiber les hydrolases lysosomales responsables de la dégradation. Dans ce contexte, les autolysosomes s'accumulent dans les cellules, ce qui augmente les niveaux de SQSTM1 et de LC3-II (Klionsky *et al.*, 2016). L'inhibiteur 3-méthyladenine (3-MA) inhibe l'enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3-K III) qui catalyse la formation du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) à partir de phosphoinositides (PI). Le PI3P est nécessaire à la formation de l'autophagosome, soit la première étape du processus autophagique. En présence de 3-MA, il n'y a pas d'autophagosome et par le fait même, l'activité autophagique est inhibée (Blommaart *et al.*, 1997). Cela a pour effet de diminuer les niveaux de LC3-II alors que les niveaux de SQSTM1 augmentent suite à une augmentation de protéines ubiquitinées.

En étudiant l'effet d'un traitement sur le flux autophagique, il est possible de déterminer à quelle étape de l'autophagie il agit. En présence de bafilomycine, de

chloroquine et de 3-MA comme inhibiteurs d'autophagie, il y a trois scénarios possibles: 1) si en présence de bafilomycine ou de chloroquine, il y a une augmentation de LC3-II alors qu'en présence de 3-MA, il n'y a pas d'augmentation de LC3-II, cela signifie que le traitement stimule la formation d'autophagosomes; 2) si en présence de bafilomycine, de chloroquine et de 3-MA, il y a une augmentation de LC3-II, cela signifie qu'il favorise l'élongation d'autophagosomes; 3) si en présence de bafilomycine, de chloroquine et de 3-MA, il n'y a pas d'augmentation de LC3-II, cela signifie que le traitement n'a pas d'effet sur le flux autophagique. Afin de vérifier à quelle étape du processus autophagique l'activité basale de ERK ou celle stimulée par le Cd agit, les cellules indifférenciées (où ERK et l'autophagie sont constitutivement actives) ont été traitées à la bafilomycine, à la chloroquine, au 3-MA et au U0126 alors que dans le cas des cellules différenciées (où ERK et l'autophagie sont induites par le Cd), ces inhibiteurs ont été ajoutés à l'exposition au Cd. Les résultats sont toujours en attente suite à certains problèmes éprouvés lors des manipulations. Les niveaux de p-ERK, SQSTM1 et LC3 sont analysés par immunobuvardage. Cependant, lors de la détection des anticorps, nous avons observé récemment la présence de halos jamais apparus auparavant. Nous avons procédé à des essais où chaque étape de l'immunodétection a été vérifiées afin de trouver la provenance de ces halos et pouvoir les éliminer pour obtenir ces résultats très importants sur le flux autophagique. Tout récemment, nous avons résolu ce problème, mais trop tardivement pour que les résultats puissent être présentés dans ce mémoire. Cependant, ils seront inclus dans l'article que nous soumettrons bientôt dans l'un des journaux suivants; Cell Biology and Toxicology (IF : 5.097), Toxicological Sciences (IF :4.081) ou Journal of Cellular Physiology (IF :4.522).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Comme souvent discuté plus haut, une augmentation des niveaux de LC3-II ne signifie pas seulement qu'il y a une augmentation d'autophagosomes dans les cellules et par le fait même une augmentation de l'activité autophagique. En plus de se localiser au niveau de la membrane de l'autophagosome, LC3-II est aussi présent dans les membranes des phagophores dans les cellules apoptotiques ou au niveau des membranes des endosomes. Cela signifie qu'une augmentation de LC3-II peut aussi bien provenir d'une augmentation de l'endocytose ou d'une augmentation de l'apoptose que d'une augmentation de l'activité autophagique (Klionsky *et al.*, 2016). De plus, une diminution de LC3-II ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a pas d'autophagie, puisqu'elle peut provenir d'une dégradation rapide des autolysosomes par les hydrolases lysosomales. LC3-II étant localisé au niveau de la membrane des autophagosomes, il est dégradé en même temps que les composantes cytosoliques pour être recyclé en LC3-I (Klionsky *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Afin de mieux évaluer l'effet d'un traitement sur l'activité autophagique, il est préférable d'utiliser un deuxième marqueur autophagique. Le second marqueur utilisé dans cette étude est SQSTM1. En général, l'expression de SQSTM1 est inversement proportionnelle à l'activité autophagie, mais il y a des exceptions. Son expression peut varier selon le modèle cellulaire et selon le contexte du traitement. Par exemple, un sevrage en glucose induit l'autophagie et stimule la transcription de SQSTM1 augmentant ainsi ces niveaux dans la cellule. Il n'est donc plus corrélé négativement avec l'activité autophagique (Klionsky *et al.*, 2016). Afin de s'assurer d'une activation de l'autophagie, un marquage à l'acridine orange a également été effectué. Ce composé

fluoresce en rouge en présence de vacuoles acides, telles que les autolysosomes. La fluorescence permet de suivre la formation de ces vacuoles dans les cellules (Dong *et al.*, 2009). L'utilisation combinée des deux marqueurs autophagiques et de l'acridine orange a permis d'avoir un bon aperçu de l'effet d'un traitement au Cd et d'un sevrage en glucose sur l'activité autophagique ainsi que de suivre les niveaux basaux de l'autophagie en fonction de l'état de différenciation entérocytaire.

Des études ont déjà montré que l'activité autophagique et l'activité de ERK sont plus élevées dans les cellules intestinales indifférenciées et qu'elles diminuent considérablement dans les cellules différenciées (Aliaga *et al.*, 1999; Groulx *et al.*, 2012). Or, en plus de montrer des niveaux plus élevés d'autophagie et de p-ERK dans les cellules indifférenciées par rapport aux cellules différenciées, nos résultats montrent que l'activité basale de ERK dans les cellules indifférenciées est impliquée dans l'activité autophagique.

Dans le cadre de ce projet, nous avons également montré qu'une exposition au Cd dans les entérocytes matures induit l'activation de ERK qui permet à son tour d'activer l'autophagie. Cette dernière se caractérise par une augmentation du nombre d'autolysosomes, de l'expression de SQSTM1 et de la conversion de LC3-I en LC3-II, ce qui augmente les niveaux de LC3-II nécessaires à la formation d'autophagosomes. De plus, l'induction de l'activation de ERK par le Cd et par le fait même celle de l'activité autophagique implique la formation de ROS. En effet, un prooxydant, tel que le BSO, stimule l'activation de ERK induite par le Cd et celle de l'autophagie alors qu'une augmentation des capacités antioxydantes des cellules, telle que fournie par un traitement à la NAC, prévient l'effet du Cd. Lorsque le mécanisme d'action d'une exposition au Cd est comparé avec celui d'un sevrage en glucose (Fig. 5.1), on s'aperçoit qu'ils sont semblables. Un sevrage en glucose induit l'activation de ERK qui stimule par la suite l'activité autophagique. De plus, des études ont montré que le sevrage en glucose induit un signal redox en amont de ERK et que celui-ci permettrait

d'activer ERK tout comme il est observé lors d'une exposition au Cd (Moruno *et al.*, 2012).

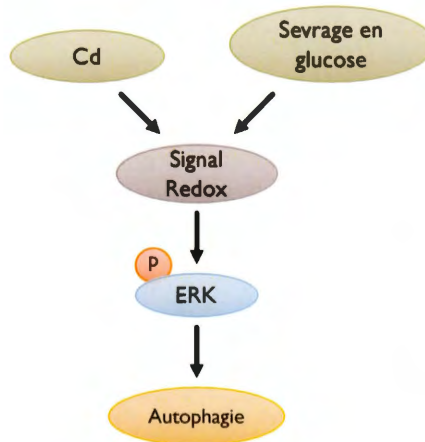


Figure 5.1 Schéma qui résume la voie de signalisation suggérée menant à l'autophagie suite à une exposition à 10 μ M de Cd ou à un sevrage en glucose.

Peu d'études ont été réalisées sur l'épithélium intestinal alors qu'il est le premier tissu exposé au Cd lors d'une exposition chronique via l'alimentation et constitue la première ligne de défense (Mantha et Jumarie, 2010). Les études précédentes se consacrent davantage à la toxicité du Cd dans les organes et les tissus d'accumulation, tels que le foie, les reins, le cerveau et les poumons. Pour la première fois, cette étude fait un lien entre l'activation de ERK par le Cd et l'autophagie dans ces cellules. Elle montre que l'activation de ERK par le Cd dans les entérocytes matures déclenche l'autophagie. Toutefois, le mécanisme d'action du Cd sur l'activité autophagique des cellules épithéliales intestinales doit être précisé. Afin d'avoir un meilleur aperçu de ce mécanisme, il faudrait déterminer à quelle étape du processus autophagique le Cd agit en étudiant le flux autophagique qui peut être modifié en amont ou en aval de la formation des autophagosomes. Pour ce faire, les expériences en cours avec les inhibiteurs autophagiques seront finalisées. De plus, il serait intéressant d'étudier la dynamique entre l'activité autophagique, apoptotique et la nécrose afin d'établir le rôle

de l'autophagie dans la protection contre le Cd. Cardin *et al.* (2009) ont montré que des concentrations élevées en Cd induisaient la mort cellulaire par nécrose sans provoquer d'apoptose. Est-ce que stimuler l'autophagie dans les cellules pourrait augmenter la viabilité cellulaire ou favoriser une mort par apoptose plutôt que par nécrose? L'apoptose serait moins dommageable pour les cellules aux alentours.

L'approche expérimentale proposée utiliserait la cytométrie en flux (FACs) avec marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium (PI). L'annexine V permet de différencier les cellules viables et les cellules mortes en se liant, de façon Ca^{2+} -dépendante, à la phosphatidylsérine (PS). Cette dernière est un phospholipide chargé négativement situé sur le feuillet interne de la membrane cellulaire. Puisque l'annexine V ne s'accumule pas dans les cellules vivantes, elle ne peut pas interagir avec les PS. Lors du processus apoptotique, il y a une translocation du feuillet interne vers l'extérieur de la cellule tandis que la nécrose entraîne la désintégration de la membrane et la libération des composantes cytosoliques exposant les PS à l'annexine V. Ainsi, dans les cellules apoptotiques et les cellules nécrosées, l'annexine V se lie aux PS. L'utilisation d'un second marqueur, tel que l'iodure de propidium qui fluoresce en rouge lorsqu'il interagit avec l'ADN, permet de distinguer les deux types de mort cellulaire. La membrane cytosolique des cellules nécrosées est endommagée ce qui permet l'interaction du PI avec l'ADN alors que la membrane des cellules apoptotiques est toujours intacte et empêche le passage du PI à l'intérieur de la cellule. De cette façon, l'utilisation combinée de l'annexine V et du PI permet de distinguer les cellules viables, les cellules apoptotiques et les cellules nécrosées. Dans un diagramme de cytométrie en flux FITC-Annexin V/PI, les cellules viables se retrouvent dans le cadran inférieur gauche (marquage négatif pour les deux sondes) puisque ni les PS ni l'ADN ne sont accessibles, les cellules apoptotiques se retrouvent dans le cadran inférieur droit (marquage annexine V+/PI-) puisque les PS sont transloquées dans le feuillet externe de la membrane cellulaire et accessible à l'annexine V, et le bri de la membrane des cellules nécrosées permet en plus la liaison du PI à l'ADN (marquage annexine V+/PI+).

Ces cellules se retrouvent donc dans le cadran supérieur droit (Fig. 5.2) (Vermes *et al.*, 1995). Il est à noter que les mêmes traitements que ceux utilisés pour étudier le flux autophagique seraient effectués, c'est-à-dire que les cellules indifférenciées seraient traitées à la bafilomycine, à la chloroquine, au 3-MA et au U0126 alors que dans le cas des cellules différenciées, ces inhibiteurs seraient présent lors de l'exposition au Cd.

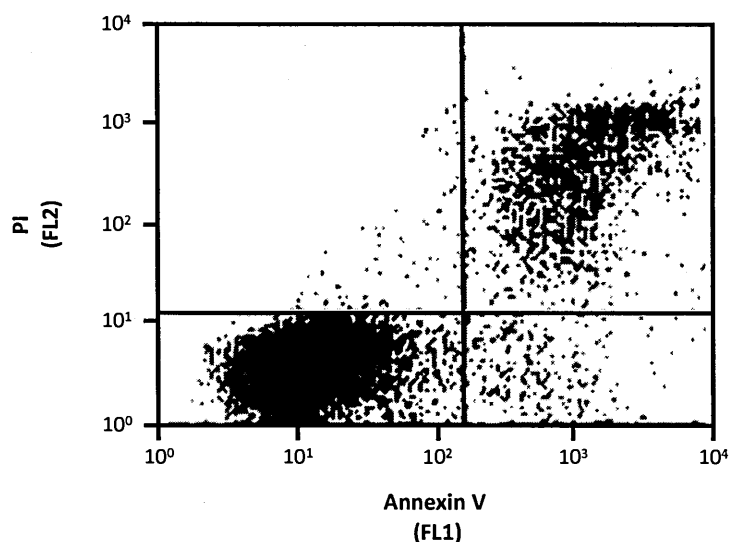


Figure 5.2 Exemple d'un résultat de cytométrie en flux avec double marquage FITC-Annexine V/PI. Les cellules viables sont dans le cadran inférieur gauche, les cellules apoptotiques sont dans le cadran inférieur droit et les cellules nécrosées sont dans le cadran supérieur droit. Figure adaptée de Vermes *et al.* (1995)

Une exposition chronique au Cd via la contamination alimentaire perturbe d'importantes voies de signalisation, dont celle de ERK qui contrôle le renouvellement de l'épithélium intestinal et déclenche l'autophagie. Activer l'autophagie dans les entérocytes matures pourrait assurer la viabilité cellulaire et empêcher l'élimination des cellules vieillissantes. Cela pourrait altérer le renouvellement des cellules épithéliales et avoir des répercussions sur la fonction intestinale dont augmenter l'absorption de composés ingérés et diminuer son rôle de protection.

ANNEXE A

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE

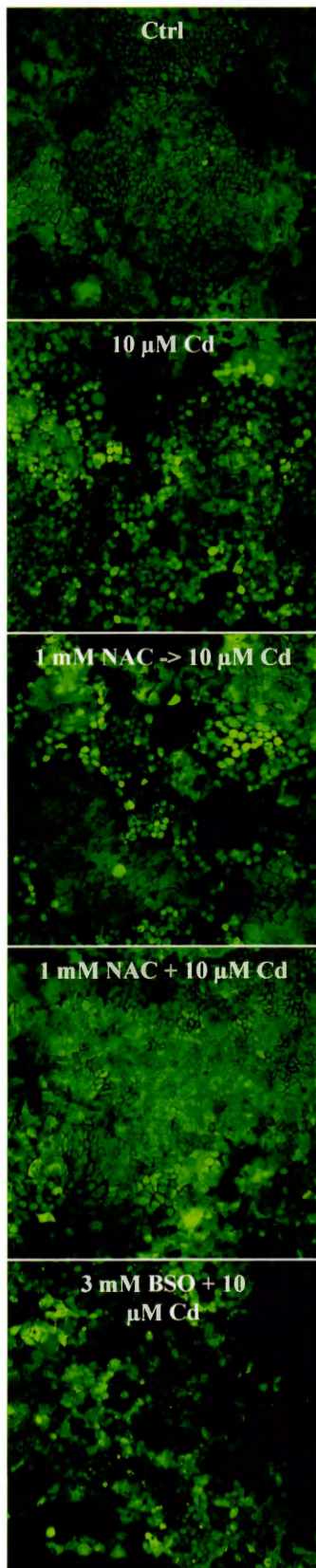


Figure S1 Effet de l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) et du prooxydant L-buthionine-sulfoximine (BSO) sur l'induction d'un déséquilibre redox par le Cd. Images confocales des cellules différenciées (21 jours) marquées avec la sonde 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)

BIBLIOGRAPHIE

- 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 intestinal cells. *American Journal of Physiology* 277: G631-G641.
- Alloway BJ, Jackson AP et Morgan H (1990) The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. *The Science of the Total Environment* 91: 223-236.
- Bastola T, An RB, Kim YC, Kim J et Seo J (2017) Cearoin Induces Autophagy, ERK Activation and Apoptosis via ROS Generation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Molecules* 22: 242-254.
- Berzina N, Markovs J, Isajevs S, Apsite M et Smirnova G (2007) Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: a biochemical and histological study after subchronic exposure. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 101: 29-34.
- Bissonnette P, Gagne H, Coady MJ, Benabdallah K, Lapointe JY et Berteloot A (1996) Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology* 270: G833-G843.
- Blommaert EFC, Krause U, Schellens JPM, Vreeling-Sindelarova H et Meijer AJ (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 243: 240-246.
- Boveri M, Pazos P, Gennari A, Casado J, Hartung T et Prieto P (2004) Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 cells after cadmium chloride treatment. *Archives of Toxicology* 78: 201-206.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Cagnol S et Chambard JC (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS Journal* 277: 2-21.
- 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.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG et Zweibaum A (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Research* 48: 1936 - 1942.
- Chen L, Liu L et Huang S (2008) Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biology and Medicine* 45: 1035-1044.
- Colecchia D, Strambi A, Sanzone S, Iavarone C, Rossi M, Dall'Armi C, Piccioni F, Verrotti di Pianella A et Chiariello M (2012) MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy* 8: 1724-1740.
- Dong Z, Wang L, Xu J, Li Y, Zhang Y, Zhang S et Miao J (2009) Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. *Toxicology in Vitro* 23: 105-110.
- Duizer E, Gilde AJ, Versantvoort CHM et Groten JP (1999) Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 155: 117-126.
- Eastwood. G L (1977) Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterology* 72: 962-975.

- Elisma F et Jumarie C (2001) Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285: 662-668.
- Ellington AA, Berhow MA et Singletary KW (2006) Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27: 298-306.
- Groulx JF, Khalfaoui T, Benoit YD, Bernatchez G, Carrier JC, Basora N et Beaulieu JF (2012) Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy* 8: 893-902.
- Hillgren KM, Kato A et Borchardt RT (1995) In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews* 15: 83-109.
- Imlay JA, Chin SM et Linn S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240: 640-642.
- Jumarie C, Campell PGC, Houde M et Denizeau F (1999) Evidence for an Intracellular barrier to cadmium transport through Caco-2 cell monolayers. *Journal of Cellular Physiology* 180: 285-297.
- Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell PG et Denizeau F (2001) Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 170: 29-38.
- Jumarie C et Malo C (1991) Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 149: 24 - 33.
- Klionsky DJ et Abdelmohsen K et Abe A et Abedin MJ et Abeliovich H et Acevedo Arozena A et Adachi H et Adams CM et Adams PD et Adeli K, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: 1-222.
- Lehner F, Kulik U, Klempnauer J et Borlak J (2010) Mapping of liver-enriched transcription factors in the human intestine. *World Journal of Gastroenterology* 16: 3919-3927.

- Liu J, Qu W et Kadiiska MB (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 209-214.
- Liu Y et Templeton DM (2008) Initiation of caspase-independent death in mouse mesangial cells by Cd²⁺: involvement of p38 kinase and CaMK-II. *Journal of Cellular Physiology* 217: 307-318.
- Lv W, Sui L, Yan X, Xie H, Jiang L, Geng C, Li Q, Yao X, Kong Y et Cao J (2018) ROS-dependent Atg4 upregulation mediated autophagy plays an important role in Cd-induced proliferation and invasion in A549 cells. *Chemico-Biological Interactions* 279: 136-144.
- 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. *American Journal of Physiology* 263: G312-G318.
- Mantha M et Jumarie C (2010) Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *Journal of Cellular Physiology* 224: 250-261.
- Marieb EN (2005) *Anatomie et physiologie humaines*. Édition du nouveau pédagogique Inc,
- Martin P et Pognonec P (2010) ERK and cell death: cadmium toxicity, sustained ERK activation and cell death. *The FEBS Journal* 277: 39-46.
- Meng HZ, Zhang WL, Liu F et Yang MW (2015) Advanced Glycation End Products Affect Osteoblast Proliferation and Function by Modulating Autophagy Via the Receptor of Advanced Glycation End Products/Raf Protein/Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (RAGE/Raf/MEK/ERK) Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 290: 28189-28199.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y et Fabre G (1995) The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* 11: 187-194.
- Moruno F, Perez-Jimenez E et Knecht E (2012) Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells* 1: 372-395.

- Nighot PK, Hu CA et Ma TY (2015) Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 290: 7234-7246.
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 192-200.
- Nordberg M, Nordberg GF, Fowler BA et Friberg L (2011) *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier,
- Pham TND, Segui JA, Fortin C, Campbell PGC, Denizeau F et Jumarie C (2004) Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *Journal of Cellular Physiology* 201: 320-330.
- Pi H, Xu S, Zhang L, Guo P, Li Y, Xie J, Tian L, He M, Lu Y, Li M, et al. (2013) Dynamin 1-like-dependent mitochondrial fission initiates overactive mitophagy in the hepatotoxicity of cadmium. *Autophagy* 9: 1780-1800.
- Rani A, Kumar A, Lal A et Pant M (2014) Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research* 24: 378-399.
- Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM et Miyamoto S (2014) Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Molecular Cell* 53: 521-533.
- Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO et Klionsky DJ (2007) Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 304-312.
- Silverthorn DU (2007) *Physiologie humaine : Une approche intégrée*. Pearson Education France, Paris.
- So KY, Kim SH, Jung KT, Lee HY et Oh SH (2017) MAPK/JNK1 activation protects cells against cadmium-induced autophagic cell death via differential regulation of catalase and heme oxygenase-1 in oral cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 332: 81-91.

- Son YO, Wang X, Hitron JA, Zhang Z, Cheng S, Budhraj A, Ding S, Lee JC et Shi X (2011) Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 255: 287-296.
- Song P, Ye L, Fan J, Li Y, Zeng X, Wang Z, Wang S, Zhang G, Yang P, Cao Z, et al. (2015) Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 6: 3861-3873.
- Taylor SC et Posch A (2014) The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014: 361590.
- Thevenod F (2009) Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 221-239.
- Thevenod F et Lee WK (2013) Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Archives of Toxicology* 87: 1743-1786.
- Thevenod F et Lee WK (2015) Live and Let Die: Roles of Autophagy in Cadmium Nephrotoxicity. *Toxics* 3: 130-151.
- Traber PG (1999) Differentiation of intestinal epithelial cells: lessons from the study of intestine-specific gene expression. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 123: 467-477.
- Vachon PH et Beaulieu JF (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103: 414-423.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H et Reutellingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods* 184: 39-51.
- Vigelso A, Dybboe R, Hansen CN, Dela F, Helge JW et Guadalupe Grau A (2015) GAPDH and beta-actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 118: 386-394.

- Waisberg M, Joseph P, Hale B et Beyersmann D (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192: 95-117.
- Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D et Denmark T (2009a) A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *Journal of Biological Chemistry* 284: 21412-21424.
- Wang Q, Zhu J, Zhang K, Jiang C, Wang Y, Yuan Y, Bian J, Liu X, Gu J et Liu Z (2013) Induction of cytoprotective autophagy in PC-12 cells by cadmium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438: 186-192.
- Wang SH, Shih YL, Ko WC, Wei YH et Shih CM (2008) Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 3640-3652.
- Wang SH, Shih YL, Kuo TC, Ko WC et Shih CM (2009b) Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3beta in mesangial cells. *Toxicological Sciences* 108: 124-131.
- Wang T, Wang Q, Song R, Zhang Y, Yang J, Wang Y, Yuan Y, Bian J, Liu X, Gu J, et al. (2016) Cadmium induced inhibition of autophagy is associated with microtubule disruption and mitochondrial dysfunction in primary rat cerebral cortical neurons. *Neurotoxicology and Teratology* 53: 11-18.
- Wang T, Wang Q, Song R, Zhang Y, Zhang K, Yuan Y, Bian J, Liu X, Gu J et Liu Z (2015) Autophagy Plays a Cytoprotective Role During Cadmium-Induced Oxidative Damage in Primary Neuronal Cultures. *Biological Trace Element Research* 168: 481-489.
- Xu C, Wang X, Zhu Y, Dong X, Liu C, Zhang H, Liu L, Huang S et Chen L (2016) Rapamycin ameliorates cadmium-induced activation of MAPK pathway and neuronal apoptosis by preventing mitochondrial ROS inactivation of PP2A. *Neuropharmacology* 105: 270-284.
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M et Tashiro Y (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 17707-17712.

