

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DU CADMIUM SUR LES VOIES DE SIGNALISATION ERK ET AHR
DANS LES CELLULES CACO-2 EN FONCTION DE L'ÉTAT DE
DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CHARBEL GEBRAËL

NOVEMBRE 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, le Dr Catherine Jumarie, pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses qualités humaines m'ont inspiré une grande admiration à son égard. Je la remercie beaucoup pour sa gentillesse, son soutien, sa clairvoyance et sa modestie qui m'ont profondément touché.

Ensuite, j'exprime mon appréciation à mon épouse Lara qui m'a fourni le support moral et intellectuel nécessaire pour la réalisation de ce travail. Je remercie ma famille au Liban pour le support financier qu'ils m'ont accordé.

Je désire aussi remercier le Dr Louise Brissette pour son encouragement qui m'a accompagné tout au long de ma démarche.

Enfin, je souhaite remercier les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	VIII
RÉSUMÉ.....	XIII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1. Le cadmium (Cd).....	1
1.1 Sources d'exposition au Cd.....	1
1.1.1 Le Cd dans l'air.....	1
1.1.2 Le Cd dans l'eau.....	2
1.1.3 Le Cd dans la nourriture.....	2
1.2 Toxicocinétique du Cd.....	3
1.2.1 Voies d'absorption du Cd.....	3
1.2.1.1 Voie d'absorption pulmonaire.....	3
1.2.1.2 Voie d'absorption orale.....	4
1.2.2 Transport et distribution du Cd dans l'organisme.....	5
1.2.3 Excrétion du Cd.....	5
1.3 Toxicité du Cd.....	6
1.3.1 Mécanismes de toxicité.....	6
1.3.1.1 Génération de radicaux libres.....	6
1.3.1.2 Interférence avec l'homéostasie calcique.....	7
1.3.1.3 Inhibition de la réparation de l'ADN.....	8
1.3.2 Intoxications aiguës.....	9
1.3.3 Intoxications chroniques.....	9

2. Voie de signalisation MAPK.....	11
2.1 Extracellular signal-Regulated Kinases ou ERK.....	13
2.2 Effet du Cd sur ERK1/2, p38 MAPK et JNK.....	13
3. Récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR	15
3.1 Voie d'activation du récepteur AhR.....	16
3.1.1 Le complexe cytoplasmique de AhR.....	16
3.1.2 Voie d'activation de AhR ligand-dépendante	18
3.1.3 Voies de signalisation indépendantes de la liaison à un ligand.....	20
3.2 Effet du Cd sur AhR	21
4. Épithélium intestinal.....	22
4.1 Physiologie	22
4.2 Différenciation entérocytaire et voies de signalisation impliquées	24
4.2.1 Mécanisme de différenciation	24
4.2.2 Voies de signalisation impliquées dans la différenciation	25
4.3 Absorption intestinale et accumulation entérocytaire du Cd.....	27
5. Modèle cellulaire Caco-2	29
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	31
CHAPITRE III	
Cd interferes with ERK1/2 and AhR signaling cascade without evidence for cross-talk	32
1. Abstract.....	33
2. Introduction	34
3. Materials and methods.....	37
4. Results and Discussion	40
5. Conclusion	46
6. References	48
7. Figures	54

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE 60

RÉFÉRENCES 64

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1 Voie de signalisation MAPK.....	12
1.2 Voie de transduction de AhR	19
1.3 Les cellules de l'épithélium intestinal	23
1.4 Mécanismes de survie entérocytaire selon l'état de différenciation.....	26
3.1 MTT activity in Caco-2 cells.....	54
3.2 ERK1/2 activation in undifferentiated Caco-2 cells.....	55
3.3 ERK1/2 activation in differentiated Caco-2 cells.....	56
3.4 AhR nuclear levels in undifferentiated Caco-2 cells	57
3.5 AhR nuclear levels in differentiated Caco-2 cells.....	58
3.6 CYP1A1 expression in differentiated Caco-2 cells.....	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Récepteur aux hydrocarbures aromatiques
AIP	<i>AhR interacting protein</i>
Akt	Protéine kinase B
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
A.P.U.D	<i>Amine precursor uptake and decarboxyl system</i>
Ara9	<i>AhR associated protein 9</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNT	<i>AhR nuclear translocator</i>
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
BaP	Benzo[a]pyrène
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Cytosine
Caco-2	<i>Carcinoma colon cell line</i>
Cd	Cadmium
Cd ²⁺	Ion cadmium
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
Co ²⁺	Ion cobalt
COS-1	Lignée cellulaire de fibroblastes dérivée de tissu de rein de singe
CYP450	Cytochrome P-450
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole

DCT1	<i>Divalent cation transporter 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DRE	<i>Dioxin responsive element</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ERA	Espèces réactives de l'azote
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROD	<i>Ethoxyresorufin-O-deethylase</i>
Fak	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
G	Guanine
G1 phase	<i>Growth-1 phase of mitosis</i>
GluT-5	Transporteur de fructose
Go 6976	Inhibiteur spécifique de PKC- α et PKC- β 1 dépendantes du Ca
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion S transférase
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
H1	Histone 1
H2A	Histone 2A
H2B	Histone 2B
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H3	Histone 3
HCl	Chlorure d'hydrogène
HEK293	<i>Human embryonic kidney cell line</i>

Hepa-1	<i>Murine hepatocellular carcinoma cells</i>
HepG2	<i>Human hepatocellular liver carcinoma cells</i>
HIEC	<i>Human intestinal epithelial crypt cells</i>
HO23	<i>Human granulosa cell line</i>
hOGG1	8-oxoguanine ADN glycosylase de type I de l'homme
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HT-29	<i>Cultured human colon cancer cell line</i>
IgG	Immunoglobuline de type G
IP3	Inositol trisphosphate
JNK	<i>c-JUN N-terminal kinase</i>
JNKI1	Inhibiteur de JNK
K ⁺	Ion potassium
kDa	Kilodalton
LH	Hormone lutéinisante
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK-APK	MAPK-activated protein kinase
MAPKK	MAPK kinase / MAP2K / MKK / MEK
MAPKKK	MAPK kinase kinase / MAP3K / MKKK / MEKK
MCF-7	<i>Human breast cancer cell line</i>
MKP	MAPK phosphatase
MT	Métallothionéine
MTT	<i>3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide</i>
Myr-PKC	Inhibiteur de proteines kinases de grande spécificité pour PKC
Na ⁺	Ion sodium
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaHCO ₃	Hydrogénocarbonate de sodium
Ni ²⁺	Ion nickel

NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NPN	Nitrophényl phosphonamidate
NRAMP-2	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 2</i>
·OH	Radical hydroxyle
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PAS	PER-ARNT-SIM
Pb ²⁺	Ion plomb
PCB	Polychlorobiphényles
PCDD	Polychlorodibenzo-p-dioxines
PCDF	Polychlorodibenzo-p-furanes
PD98059	Inhibiteur de MAP2K
PER	<i>Drosophila genes period</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PVC	Polychlorure de vinyle
Raf-1	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma / c-Raf</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RAW264,7	<i>Murine macrophage cell line</i>
S phase	<i>Synthesis phase of mitosis</i>
SAPK	<i>Stress activated protein kinase</i>
SB 203580	Inhibiteur de p38 MAPK / <i>Pyridinyl imidazole inhibitor</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGLT-1	<i>Sodium glucose linked transporter-1</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>

SH3	<i>Src Homology 3</i>
SIM	<i>Single-minded</i>
SOD	Superoxyde dismutase
Src	<i>Rous sarcoma tyrosine kinase</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier protein</i>
T	Thymine
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
Thr	Thréonine (T)
Tyr	Tyrosine (Y)
U0126	Inhibiteur sélectif de MEK1 et MEK2
UV	Ultraviolet
XAP-2	<i>X-associated protein 2</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group A</i>
Xpo1	Exportine-1
XRE	<i>Xenobiotic responsive element</i>
Zn ²⁺	Ion zinc

RÉSUMÉ

Le Cadmium (Cd), un métal toxique, est retrouvé dans la chaîne alimentaire. La voie d'absorption principale du Cd chez la population en général est la voie orale. L'épithélium intestinal constitue la première barrière contre le Cd ingéré, ce qui en fait aussi un tissu cible. Le Cd affecte le cycle cellulaire en inhibant ou stimulant la prolifération cellulaire. En plus d'induire des espèces réactives d'oxygène, le Cd interfère avec un certain nombre de voies de signalisation incluant ERK (Extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-JUN N-terminal kinase), et p38-kinase dans différents types cellulaires.

Des études ont montré que le Cd peut influencer l'expression ou l'activité des enzymes de détoxification, notamment le CYP450 1A1 qui est le gène cible de AhR principalement étudié. Le récepteur AhR est impliqué dans la réponse cellulaire aux xénobiotiques (substances exogènes) et possède aussi des rôles dans la physiologie cellulaire. En effet, c'est un récepteur nucléaire qui agit comme facteur de transcription pour les enzymes de biotransformation. Des résultats publiés du laboratoire ont montré que le Cd augmente l'activité MTT (bromure de 3-[4,5-diméthyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) dépendamment de la concentration et du temps dans les cellules Caco-2 qui expriment spontanément à confluence un phénotype entérocytaire. Cet effet, uniquement observé dans les cellules différenciées et non dans les cellules prolifératives, n'est pas lié à de la prolifération cellulaire mais à une augmentation de la synthèse protéique impliquant ERK1/2. D'autres auteurs ont montré que ERK1/2 peut phosphoryler et activer AhR. Tous ces résultats nous permettent de suggérer que le Cd serait impliqué dans un chevauchement des voies de signalisation ERK et AhR. Nos objectifs étaient donc de vérifier: 1) si ERK peut activer AhR; 2) si le Cd en activant ERK peut aussi indirectement activer AhR. Nos résultats d'analyse de Western blot et les données d'immunofluorescence montrent que le Cd et la TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine), un ligand de AhR, augmentent la translocation nucléaire de AhR, mais seule la TCDD augmente l'expression de CYP1A1. Contrairement au Cd, la TCDD n'augmente pas l'activité MTT ni la phosphorylation de ERK1/2. L'insuline, bien connue comme activateur de ERK1/2, n'a aucun effet sur l'activation de AhR et sur l'expression de CYP1A1.

Ces résultats nous amènent à conclure que la phosphorylation de ERK n'est pas indispensable à l'activation de AhR et ne conduit pas nécessairement à l'activation de AhR. De même, nous pouvons stipuler que les mécanismes d'activation de AhR diffèrent entre les ligands et les métaux non-ligands d'autant que le Cd augmente la translocation nucléaire de AhR sans modifier son activité transcriptionnelle.

MOTS-CLÉS: Cd, cellules Caco-2, différenciation entérocytaire, ERK, récepteur AhR.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Le Cadmium (Cd)

Le Cd est un métal lourd dont la toxicité a été remarquée à partir des années cinquante avec l'apparition de la maladie Itai-Itai au Japon. Le déversement du Cd dans les cours d'eau des montagnes par les industries minières (durant la période des deux guerres mondiales) a entraîné une intoxication massive chez la population. A travers les années, le Cd s'est accumulé au fond des rivières et dans les eaux de surface qui ont été utilisées pour irriguer les rizières. Par la suite, le Cd a été accumulé dans le riz et absorbé par la population puisque cette dernière considérait le riz comme source de nourriture principale. La maladie Itai-Itai était responsable de fragilité osseuse, surtout chez les personnes âgées et les femmes ménopausées, ainsi que d'insuffisance rénale (Bourdin, 2009).

1.1 Sources d'exposition au Cd

1.1.1 Le Cd dans l'air

Dans l'air ambiant, le Cd se trouve sous forme de particules ou de vapeurs. Diverses sources rejettent du Cd dans l'atmosphère: l'incinération des ordures ménagères, l'application de produits phytosanitaires et les industries métallurgiques. Le traitement de métaux, notamment du zinc, et le grillage des minerais de cuivre et de nickel peuvent dégager des vapeurs de Cd (Santé Canada, 1986). Les fonderies et les usines d'affinage sont responsables de fortes concentrations atmosphériques de Cd dans les villes très industrialisées. De même, les cendres et les résidus

d'incinération résultant de la combustion d'objets contiennent du Cd (peintures, PVC, etc. comme colorant, additif ou catalyseur).

Le tabagisme représente une importante source de Cd; en effet, une cigarette contient 1 à 2 µg de Cd. Plus le tabac est cultivé à proximité d'une zone industrialisée, plus il contient du Cd (Santé Canada, 2010).

1.1.2 Le Cd dans l'eau

Dans l'eau, le Cd peut provenir des réseaux d'aqueduc et d'égouts, des usines de pâtes et papier et de carton, de la production et du traitement de métaux non ferreux et de la sidérurgie, ainsi que de la fabrication de produits chimiques de base (pétrole et charbon). Une eau dont la teneur est inférieure à 1 µg/L est considérée non contaminée et des niveaux inférieurs à 5 µg/L sont considérés acceptables pour la consommation (Environnement Canada, 2011).

1.1.3 Le Cd dans la nourriture

Le Cd présent dans l'air et l'eau entre dans la chaîne alimentaire en contaminant les sols agricoles. 90 à 95 % du Cd ingéré n'est pas absorbé et se retrouve directement dans les fèces. Ainsi, le contenu des fèces en Cd représente un bon indicateur de la consommation quotidienne par voie alimentaire (Nordberg et al., 2007). On estime que l'apport quotidien de Cd par la nourriture, l'eau et l'air pour un adulte canadien non exposé au Cd dans son travail varie de moins de 0,01 à environ 0,05 mg (Santé Canada, 1986). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande de ne pas dépasser un apport hebdomadaire de 0,4 à 0,5 mg (soit 1 µg/Kg de poids corporel par jour).

Certains aliments sont connus pour concentrer le Cd, plus particulièrement certains tissus de mollusques et de crustacés tels les crabes (partie crémeuse) et les

huîtres (Friberg et *al.*, 1985), ainsi que les reins et le foie des mammifères. Le Cd est présent également dans certains végétaux comme le chou, les épinards, la salade, les pêches et en quantité moindre dans les céréales (Sherlock, 1984). Ceci est dû au dépôt d'aérosols de Cd sur les feuilles des végétaux, mais aussi à l'absorption, par les racines, du Cd présent dans le sol. Les lichens, les mousses et les champignons peuvent accumuler des doses très élevées, voire mortelles, de Cd et d'autres métaux lourds, faisant de ces espèces de bons indicateurs de l'état de pollution de l'environnement.

1.2 Toxicocinétique du Cd

1.2.1 Voies d'absorption du Cd

L'Homme est exposé d'une façon quotidienne au Cd. En fait, ce métal est présent surtout dans la nourriture, l'eau et la fumée de tabac. Ainsi, les deux voies d'absorption du Cd chez l'humain sont l'ingestion et l'inhalation, ce qui implique que les épithéliums intestinaux et pulmonaires constituent les premières barrières biologiques que le métal doit franchir avant d'entrer dans la circulation sanguine (l'exposition par contact cutané est très négligeable, voire quasi-nulle) (Nordberg et *al.*, 2007). Cependant, la voie d'absorption principale chez la population en général est la voie orale puisque la voie pulmonaire est limitée à l'exposition des employés en milieux de travail industriel (à l'exception du tabagisme).

1.2.1.1 Voie d'absorption pulmonaire

Le Cd et ses sels sont présents dans l'air sous forme d'aérosols. Le dépôt pulmonaire et la biodisponibilité de ces poussières dépendent de leur taille. La biodisponibilité pulmonaire du Cd inhalé est estimée entre 25 et 50 %, mais cette

proportion varie selon la solubilité des composés du Cd et selon la taille des particules (Rapport ToxProbe Inc. for Toronto Public Health, 1994). L'absorption du Cd est d'autant plus importante que celui-ci se trouve sous forme de particules fines. De 10 à 50 % des particules inhalées sont déposées au niveau des alvéoles pulmonaires et la majeure partie restante, au niveau de la muqueuse trachéo-bronchiale ciliée. Après avoir pénétré dans les voies respiratoires, une partie du Cd est repoussée par action mucociliaire vers l'œsophage où il sera absorbé par voie orale.

Les fumeurs actifs et passifs inhalent le métal sous forme particulaire (Nordberg et *al.*, 2007). L'inhalation de fumée de cigarette représente la principale source d'exposition au Cd chez les fumeurs. Au Canada, le tabac d'une cigarette normale contient environ 1 µg de Cd, dont 6 à 20 % peut être rejeté dans la fumée principale (Hammond et O'Connor, 2008). La consommation de 20 cigarettes par jour peut donc occasionner une exposition quotidienne additionnelle d'environ 1,2 à 4 µg de Cd (Santé Canada, 2010).

1.2.1.2 Voie d'absorption orale

On estime que 4 à 7 % du Cd présent dans les aliments ingérés est absorbé au niveau gastro-intestinal (Kitamura et *al.*, 1970; Rahola et *al.*, 1971). La biodisponibilité orale varie selon le sexe. Elle est d'environ 5 % chez les hommes. Par contre elle peut augmenter jusqu'à 10 % chez les femmes d'âge fertile qui présentent un déficit en fer. En effet le Cd est, en partie, transporté et absorbé par compétition avec le fer et en cas d'anémie le transporteur est surexprimé (Canone-Hergaux et *al.*, 1999).

1.2.2 Transport et distribution du Cd dans l'organisme

Indépendamment de la voie d'absorption, le Cd est transporté par la circulation sanguine vers différents organes. Dans le sang, il est principalement fixé à l'hémoglobine (90-95%) et à l'albumine (5%) (Bureau européen des substances chimiques, 2007). Donc, la fraction libre circulante disponible pour la distribution aux tissus est relativement faible. Sa pénétration cellulaire s'effectue entre autres par les canaux calciques (Biomnis, 2012). Dans le foie, il se dissocie et induit la synthèse de la métallothionéine (MT). C'est une protéine ayant un poids moléculaire de 6000-7000 g/mol, composée de 60 à 70 acides aminés et très riche en cystéine (30%). La MT fixe les métaux, dont le cation métallique Cd^{2+} , par l'intermédiaire des groupements thiols (-SH) de ses nombreuses cystéines. Dans ce cas, il y a formation du complexe MT-Cd. Sous forme complexée, le Cd ne peut exercer son effet toxique et ainsi l'organisme est protégé. La MT libre est appelée thionéine. La synthèse de la MT sanguine et tissulaire est induite par la présence de certains métaux dont le Cd (Nordberg et al., 2007). Ainsi, le complexe MT-Cd est transporté vers les autres organes. Le Cd s'accumule dans le foie et les reins. On en trouve également dans les poumons, le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et les glandes salivaires. De plus, il traverse la barrière placentaire (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for cadmium, 2008).

1.2.3 Excrétion du Cd

La demi-vie du Cd est de l'ordre de 20 à 30 ans chez l'humain en raison de la lenteur de son excrétion par l'organisme (Santé Canada, 1986). Donc, le Cd est fortement retenu dans l'organisme et s'accumule dans les reins et le foie. Cela provoque des effets nocifs sur la santé humaine suite à une exposition aigue ou chronique au Cd.

Le Cd n'est pas éliminé par la sueur, les cheveux ou les ongles. Par contre, une faible proportion est éliminée par l'urine et les fèces (quotidiennement de 0,01 à 0,02% de la charge corporelle totale de Cd). L'élimination urinaire augmente avec l'âge (ainsi que son accumulation dans l'organisme), tandis que l'excrétion fécale n'est pas liée à l'âge mais partiellement proportionnelle à la charge corporelle de Cd. Une faible proportion du Cd provenant de la bile du foie et du suc pancréatique est excrétée dans les fèces sous forme complexée au glutathion réduit (GSH) (tripeptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine qui complexe le Cd au niveau du groupement thiol, -SH, de la cystéine) (Braunwald et *al.*, 2001).

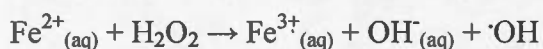
1.3 Toxicité du Cd

1.3.1 Mécanismes de toxicité

1.3.1.1 Génération de radicaux libres

Les effets toxiques du Cd sont essentiellement indirects car le Cd, lui-même, est incapable de générer directement des radicaux libres. La formation indirecte des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des espèces réactives de l'azote (ERA) impliquant le radical superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxyde nitrique a été rapporté (Waisberg et *al.*, 2003). Des expériences ont également confirmé la génération du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) non-radical qui peut, à son tour, être une source importante de radicaux par la réaction de Fenton (Elinder et *al.*, 1976). Un mécanisme intéressant expliquant le rôle indirect du Cd dans la production de radicaux libres propose que le Cd peut remplacer le fer et le cuivre dans diverses protéines cytoplasmiques et membranaires (par exemple, la ferritine, l'apoferritine), augmentant ainsi la quantité des ions cuivre et fer non liés participant au stress oxydatif via la réaction de Fenton. La réaction de Fenton est une réaction

d'oxydation avancée aboutissant à la formation du radical hydroxyle OH qui est le deuxième oxydant le plus puissant présent dans la nature après le fluor (Price et Joshi, 1983; Watjen et Beyersmann, 2004).



De plus, le Cd provoque la diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants. Des expositions courtes au Cd semblent inhiber les enzymes de stress comme la superoxyde dismutase (SOD). Cette inhibition correspond au déplacement des métaux constituant la structure de la SOD (Filipic et *al.*, 2006; Huang et *al.*, 2006), ce qui induit une perte des fonctions enzymatiques aboutissant à l'augmentation des ERO (Aramini et *al.*, 1995; Predki et Sarkar, 1994). Par contre, des expositions prolongées au Cd entraînent une augmentation de l'expression de ces enzymes de même que de certaines protéines comme les métallothionéines (Potts et *al.*, 2001; Waisberg et *al.*, 2003).

1.3.1.2 Interférence avec l'homéostasie calcique

Le Cd peut altérer l'homéostasie du calcium qui est un messenger intracellulaire versatile (Berridge et *al.*, 2000). Il a été démontré que le Cd inhibe significativement l'entrée du calcium par les canaux calciques dans les cellules. Le Cd bloque les canaux calciques en s'y fixant; sa perméabilité à travers ces mêmes canaux varie considérablement avec le type de canal (Lansman et *al.*, 1986; Taylor, 1988). D'autre part, une intoxication au Cd peut augmenter les taux de calcium intracellulaire. En fait, le Cd agit comme ligand aux récepteurs sensibles aux cations qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Faurkov et Bjerregaard, 2002). L'activation de la phospholipase C et la production de l'IP3 (Inositol triphosphate) par hydrolyse de la phosphatidylinositol s'ensuivent (Faurkov et Bjerregaard, 2002; Misra et *al.*, 2002). Cette cascade de signalisation induite par le Cd, déclenche la libération du calcium de ses compartiments de

stockage dans le reticulum endoplasmique. Par conséquent, et suite à son action inhibitrice sur les pompes (Kiss et Osipenko, 1994), le Cd peut induire une augmentation des concentrations cellulaires de calcium et ce dernier peut engendrer l'apoptose. Le Cd peut donc interférer directement avec l'homéostasie et le métabolisme calcique et ces deux processus sont d'autant plus affectés que l'accumulation de Cd est importante (Staessen et *al.*, 1996).

1.3.1.3 Inhibition de la réparation de l'ADN

La carcinogénicité du Cd peut être expliquée par sa capacité à induire, indirectement, des dommages à l'ADN, principalement par son interférence avec les facteurs de réparation de l'ADN (Filipic et *al.*, 2006; Filipic et Hei, 2004). Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont de la famille des protéines à doigts de zinc et l'effet inhibiteur du Cd est lié au remplacement de ce zinc (Hartwig, 2001). Des chercheurs ont utilisé une méthode spectrochimique pour étudier l'effet du Cd sur la structure de la protéine XPA impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN pendant la réparation par excision de nucléotides. Ces auteurs ont démontré que le Cd pouvait se lier aux groupements thiols des cystéines de XPA. Le complexe s'établit entre le Cd et les quatre cystéines de la région doigt de zinc de XPA. Par conséquent XPA ne peut plus se fixer à l'ADN (Asmuss et *al.*, 2000; Buchko et *al.*, 2000; Kopera et *al.*, 2004; Waisberg et *al.*, 2003).

L'exposition au Cd inhibe et modifie certaines protéines de la réparation par excision de base telle que la 8-oxoguanine ADN glycosylase de type I de l'homme (hOGG1). Cette enzyme permet la réparation de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Plusieurs études ont démontré que le Cd réprime les gènes hOGG1 (Bertin et Averbeck, 2006; Potts et *al.*, 2003). Le Cd peut également inhiber la synthèse de l'ADN (Cao et *al.*, 2007). Toutes ces actions d'inhibition sont une

contribution indirecte du Cd aux effets mutagènes et/ou à la carcinogénicité (Giaginis et *al.*, 2006).

1.3.2 Intoxications aiguës

L'inhalation de fortes concentrations de fumées de Cd (sous forme d'oxyde) cause une irritation pulmonaire sévère. Les symptômes peuvent apparaître après un certain délai. Dans les premières heures après l'exposition, on rapporte de la toux et une légère irritation de la gorge et des muqueuses. Par la suite (4 à 10 heures suivant l'exposition), des symptômes similaires à ceux de la fièvre des fondeurs sont observés: toux, fièvre, maux de tête, frissons, douleurs musculaires, raideurs, etc. Dans les jours qui suivent, une pneumonite chimique peut se développer, ainsi qu'un œdème pulmonaire et dans certains cas la mort. Le taux de mortalité est d'environ 20 % (Parkes, 1994).

Suite à l'ingestion de composés de Cd, les symptômes suivants ont été observés: irritation de l'épithélium gastro-intestinal, nausées, vomissements, salivation, douleurs abdominales, crampes, diarrhée. Des cas d'intoxication mortelle ont été rapportés suite à l'ingestion d'iodure et de chlorure de Cd (Bureau européen des substances chimiques, 2007).

1.3.3 Intoxications chroniques

L'exposition chronique au Cd par inhalation ou ingestion a comme conséquences des atteintes rénales qui peuvent continuer de progresser même après la cessation de l'exposition (Nordberg et *al.*, 2002; Orłowski et *al.*, 1998). L'exposition de longue durée par inhalation à de bas niveaux peut causer une diminution de la fonction pulmonaire et de l'emphysème.

L'absorption du Cd par ingestion est quantitativement faible, mais l'exposition chronique à des niveaux élevés de Cd dans la nourriture peut causer des désordres osseux graves, incluant l'ostéoporose et l'ostéomalacie (décalcification osseuse induite par un manque d'ions calcium et phosphate de la trame protéique du squelette). L'ingestion à long terme, par une population japonaise, d'eau et de nourriture contaminées par le Cd a été associée à une condition incapacitante, la maladie itaï-itaï (ce qui signifie « aïe-aïe » en japonais). Elle se caractérise par d'intenses douleurs au dos et dans les articulations, de l'ostéomalacie (rachitisme adulte), des fractures osseuses et, occasionnellement, des défaillances rénales. Cette maladie affecte le plus souvent les femmes (Kjellström, 1992).

Ainsi, certains effets du Cd varient selon le sexe (Nishijo et *al.*, 2004). Les femmes de 53 à 64 ans sont celles chez qui le taux de rétention du Cd est le plus élevé, et sont les plus sensibles à l'ostéoporose. En fait, chez la femme, une exposition à de faibles doses de Cd pendant une longue durée augmente la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne, ce qui peut causer des lésions osseuses ainsi qu'une diminution des fonctions rénales (Nogawa et *al.*, 1984). La gravité des effets osseux augmente après la ménopause (Vahter et *al.*, 2004). Une faible exposition a aussi des effets osseux négatifs chez l'homme (Alfvén et *al.*, 2000; Åkesson et *al.*, 2005). Chez le rat, le Cd perturbe le système hormonal (Brzoska et *al.*, 2005) et chez la souris, il aggrave la perte osseuse induite par un déficit hormonal (Bhattacharyya et *al.*, 1988).

Des effets sur les testicules ont été démontrés chez les rongeurs. On a récemment montré que le Cd est aussi un perturbateur endocrinien (Iavicoli et *al.*, 2009). A de fortes doses, une répression de l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes pro-apoptotiques ont été constatées. Ces altérations génétiques surviennent même à des doses qui ne causent pas de lésions apparentes chez l'animal (Zhou et *al.*, 2004).

Plusieurs composés inorganiques du Cd causent des tumeurs malignes chez l'animal. L'exposition professionnelle au Cd peut être considérée comme responsable d'une augmentation significative du cancer du poumon. Le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) a déterminé qu'il y a suffisamment de preuve chez l'homme quant à la cancérogénicité du Cd et de ses composés (<http://www.iarc.fr/indexfr.php>, les monographies du CIRC sur l'évaluation des risques carcinogènes pour l'homme, 1993). De même, l'exposition non professionnelle (habitation dans des zones proches d'une industrie utilisant du Cd) semble augmenter le nombre de cancers (Nawrot et *al.*, 2006). D'autres conséquences de l'exposition chronique au Cd sont: l'anémie, la coloration jaunâtre des dents, la rhinite, l'ulcération occasionnelle du septum nasal, et des dommages au nerf olfactif associés à une perte d'odorat.

2. Voie de signalisation MAPK

Les MAPK ou mitogen-activated protein kinases sont des sérine/thréonine kinases qui sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation déclenchées par l'activation de divers types de récepteurs. Ces kinases régulent un grand nombre d'événements cellulaires allant de la différenciation à la mobilité des cellules (Pearson et *al.*, 2001).

Chaque MAPK possède ses activateurs, substrats et inactivateurs propres. L'activité des MAPK est régulée par phosphorylation par des MAPKK ou MAPK kinase qui phosphorylent à leur tour des protéines kinases MAPK-APK ou MAPK-activated protein kinases. La déphosphorylation des MAPK est assurée par des MKP ou MAPK-phosphatases (Pearson et *al.*, 2001). Le contrôle de la cascade des MAPK est réalisé via différents types de récepteurs. Beaucoup de ligands se lient à des récepteurs tyrosine kinase induisant l'autophosphorylation des tyrosines du récepteur lui même. Le résidu tyrosine ainsi phosphorylé se lie au domaine SH2 des

adaptateurs liant par leur domaine SH3 un autre adaptateur. Cette liaison promouvoit l'association de Ras au GTP qui lie Raf-1 et B-Raf, deux protéines kinases qui elles aussi phosphoryleront la 1ère kinase de la cascade à savoir la MAP3K. Les MAPK peuvent également être activées via des récepteurs couplés aux protéines G comme par exemple le récepteur de la LH (luteinizing hormone) (Pearson *et al.*, 2001).

La cascade d'activation consiste donc en l'activation d'une série de 3 enzymes: la MAP kinase (MAPK), la MAP kinase kinase (MKK, MEK ou MAP2K) et la MAP kinase kinase kinase (MKKK, MEKK ou MAP3K). La séquence d'activation est la suivante: la stimulation de la cellule par un stimulus extracellulaire induit l'activation de la MAP3K qui viendra phosphoryler en sérine/thréonine la MAP2K qui, à son tour, phosphoryle en thréonine/tyrosine la MAPK (par exemple les Tyr-185 et Thr-183 de ERK2) (Pearson *et al.*, 2001) (Figure 1.1).

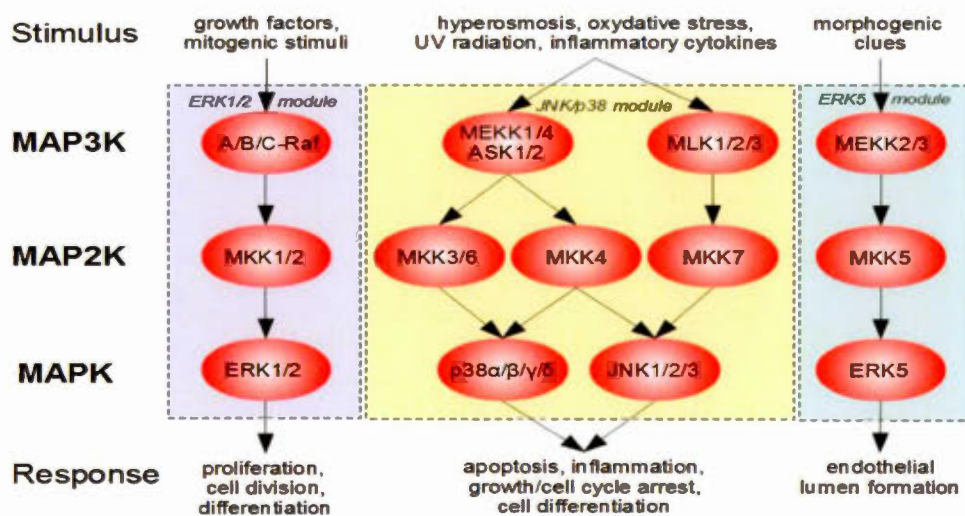


Figure 1.1: Voie de signalisation MAPK (tirée de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d6/MAPK-pathway-mammalian.png>).

Les protéines ERK1/2 sont activées par des facteurs de croissance et des stimuli mitogéniques et jouent un rôle dans la prolifération, la division et la différenciation cellulaires. Les protéines p38 α / β / γ / δ et JNK1/2/3 peuvent être activées par des radiations UV et par le stress oxydatif et sont impliquées dans l'apoptose, l'inflammation, la différenciation cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire. Les protéines ERK5 sont activées par des facteurs de croissance et interviennent dans la formation de la lumière endothéliale et le développement cardiovasculaire.

2.1 Extracellular signal-Regulated Kinases ou ERK

La voie de signalisation ERK est activée en réponse aux facteurs de croissance et à l'ester de phorbol (qui a la capacité d'agir comme promoteur tumoral par l'activation de la protéine kinase C) et régule la prolifération ainsi que la différenciation cellulaires (Pearson et *al.*, 2001; Chang et Karin, 2001). Elle répond notamment au stress cellulaire et est impliquée dans la différenciation et l'apoptose (Pearson et *al.*, 2001). Les protéines ERK1/2 sont 2 isoformes (83% d'homologie) respectivement de 43 kDa et 41 kDa. Cette famille comprend également ERK3 (MAPK6), ERK4 (MAPK4) et ERK7/8 (MAPK15). L'activation des deux kinases ERK1 et 2 est assurée par l'ajout de deux groupements phosphate à une thréonine et une tyrosine: T202 et Y204 pour ERK1, T184 et Y186 pour ERK2. Elles pourront, à leur tour, phosphoryler leurs cibles en sérine/thréonine/tyrosine (Pearson et *al.*, 2001; Chang et Karin, 2001). La cascade MAP kinase aboutissant à l'activation des ERK est très importante pour le cycle cellulaire puisque les ERK1/2 phosphorylent plusieurs substrats cytoplasmiques et nucléaires nécessaires à la transcription de gènes impliqués dans le passage de la phase G1 à S (Meloche et Pouyssegur, 2007).

2.2 Effet du Cd sur ERK1/2, p38 MAPK et JNK

Le Cd peut interférer avec différentes étapes d'un certain nombre de voies de signalisation et favoriser l'apoptose ou inversement, la prolifération cellulaire.

L'exposition de fibroblastes pulmonaires embryonnaires humains et de cellules HEK293 pendant 24 h à 0,5 μM de Cd induit parallèlement l'activité mitochondriale MTT (test colorimétrique pour évaluer la prolifération ou la viabilité cellulaire) et active ERK1/2 (Hao et *al.*, 2009; Jiang et *al.*, 2009). Dans les cellules Caco-2 différenciées, une exposition pendant 24 h à 10 μM de Cd induit l'activité MTT et active ERK1/2 (Mantha et Jumarie, 2010). Par contre, une exposition de 5 μM de Cd pendant seulement 1 h augmente rapidement le niveau de ERK1/2 phosphorylée dans les cellules chromaffines surrénales bovines (Leal et *al.*, 2007), ainsi que seulement 2,5 min d'exposition à 0,5 μM de Cd dans les cellules tumorales mammaires humaines MCF-7 (Liu et *al.*, 2008). Des différences dans les temps de réponse de ERK1/2 ont été également observées entre les cellules pulmonaires de Clara et les cellules alvéolaires de type II chez le rat (Lag et *al.*, 2005). Le temps et la concentration nécessaire à l'activation de ERK1/2 par le Cd semblent donc varier entre les phénotypes cellulaires.

L'activation de p38 par le Cd est généralement associée à l'apoptose cellulaire (Thévenod, 2009). Par contre, des auteurs ont démontré une augmentation des niveaux de ERK1/2 et p38 phosphorylées en réponse à une exposition au Cd à des concentrations qui n'affectent pas la viabilité cellulaire (Leal et *al.*, 2007). Cette augmentation diminue faiblement en présence de SB203580 (inhibiteur de p38) (Mantha et Jumarie, 2010).

Une augmentation transitoire de l'activation de JNK, concomitante avec celle de p38, est observée après exposition de cellules cérébrovasculaires endothéliales humaines à des concentrations de Cd qui ne sont pas susceptibles de modifier la viabilité cellulaire (Parc et *al.*, 2009). Cependant, 20 μM de JNKI1 (inhibiteur de JNK) ne modifient pas de manière significative l'effet stimulant du Cd sur l'activité de MTT associée à l'activation de ERK1/2 (Mantha et Jumarie, 2010). D'autres recherches montrent qu'une exposition de cellules Boeth, une lignée lymphoblastoïde humaine, à des concentrations létale (350 μM) et sub-létale de Cd

induit une augmentation des niveaux de ERK1/2, p38, et JNK phosphorylées. A concentration létale seulement, les trois protéines sont activées de façon rapide et séquentielle. L'inhibition de l'activité des protéines ERK1/2, p38 et JNK n'a pas d'incidence sur la survie des cellules. Cela suggère que ces voies ne sont pas impliquées dans la régulation de l'apoptose provoquée par le Cd, mais plutôt leur inhibition induit le blocage du cycle cellulaire (Bravard et *al.*, 2006).

3. Récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR

AhR a été découvert en 1976 par l'équipe du Dr D.W. Nebert qui évoque dans un article l'existence d'un ensemble de gènes contrôlant l'induction d'enzymes à activité «arylhydroxylase» (Poland et *al.*, 1976). Ce récepteur est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines bHLH/PAS (« basic-Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-SIM »). Plus précisément, le AhR appartient à la classe 1 de la famille bHLH/PAS. Cette classe inclut des facteurs qui ne peuvent ni s'hétérodimériser, ni s'homodimériser entre eux. Ainsi, ces protéines se complexent à des facteurs bHLH/PAS de classe 2 comme l'ARNT (« Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ») (Kim et *al.*, 2004). Les acteurs de la voie de signalisation de AhR furent identifiés dans les années 90 avec le clonage du récepteur et de son partenaire (ARNT) (Burbach et *al.*, 1992, Hoffman et *al.*, 1991). Traditionnellement, la principale fonction de AhR décrite dans la littérature est la régulation de l'expression des enzymes de biotransformation des xénobiotiques.

Les xénobiotiques sont de petites molécules étrangères à l'organisme. Du fait de leur caractère lipophile, ils diffusent librement à travers la membrane plasmique des cellules et se lient alors aux récepteurs intracellulaires (comme AhR). Ainsi, ils initient leur activation en facteurs de transcription qui augmentent l'expression d'enzymes et de transporteurs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques afin de les éliminer. Le processus d'élimination des xénobiotiques comporte deux

étapes: tout d'abord, ils reçoivent un groupe fonctionnel (la plupart des temps hydroxyle) par les enzymes de phase I comme par exemple les cytochromes P450 (CYP). Ensuite ils sont conjugués par les enzymes de phase II (ex: « glutathion S transferase » ou GST) qui ajoutent généralement un groupement hydrophile (ex: glutathion) sur la fonction hydroxylée. Cette fonctionnalisation augmente la solubilité du xénobiotique dans les fluides biologiques (urines, sueurs) favorisant ensuite son élimination. Enfin, ces composés sont expulsés hors de la cellule par des transporteurs actifs (troisième étape) et éliminés dans les urines.

Le AhR est communément appelé récepteur aux « dioxines », mais plus généralement à de nombreux polluants persistants. Les PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines (PCDD) et les PolyChloroDibenzo-*p*-Furanes (PCDF), des dioxines fréquentes, ainsi que les PolyChloroBiphenyles (PCB) agissent comme ligands. Le ligand exogène le plus affine pour le AhR est la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD, appelée également dioxine de Seveso), polluant environnemental libéré lors de combustions incomplètes de matières organiques chlorées, naturelles ou industrielles (Chevallier, 2012).

3.1 Voie d'activation du récepteur AhR

3.1.1 Le complexe cytoplasmique de AhR

Le AhR est généralement représenté comme faisant partie intégrante d'un complexe cytoplasmique constitué d'un dimère de protéines chaperonnes ou « Heat shock proteins » 90 (Hsp90), d'une protéine XAP2/Ara9/AIP et d'une protéine co-chaperonne p23 (Lees et Whitelaw, 1999).

Les protéines chaperonnes Hsp90 se lient au niveau du domaine bHLH et du domaine PAS-B masquant ainsi les séquences de localisation nucléaire et empêchant ainsi la translocation de AhR au noyau (Ikuta et *al.*, 1998; Lees et

Whitelaw, 1999). Les Hsp90 sont également impliquées dans la stabilité de AhR; ainsi la demi-vie de AhR au sein du complexe cytoplasmique est beaucoup plus élevée que celle de AhR libre. Les Hsp90 contribuent à protéger AhR de l'action du système « ubiquitine-protéasome ». De plus, elles maintiennent le récepteur dans une conformation favorisant la liaison d'un ligand. Cette propriété est critique puisque la dissociation *in vitro* des Hsp90 rend la protéine AhR incapable de lier son principal ligand exogène, la TCDD (Petrulis et Perdew, 2002). Il est possible que le AhR nucléaire soit en mesure de lier d'autres ligands (endogènes) ou que sa forme phosphorylée (sur la sérine 68) soit capable d'agir indépendamment de la liaison à un ligand dans une voie de signalisation alternative (Petrulis et Perdew, 2002). Enfin, les Hsp90 ont la propriété de réprimer la liaison entre AhR et ARNT (Petrulis et Perdew, 2002).

La liaison du ligand provoque la dissociation de la première Hsp90 liée au domaine bHLH et ainsi démasque le domaine de localisation nucléaire entraînant la migration nucléaire de AhR. Dans le noyau, la libération de la protéine Hsp90 liée au domaine PAS-B intervient simultanément avec l'hétérodimérisation de AhR avec son partenaire ARNT (Lees et Whitelaw, 1999).

La protéine p23 interagit également avec ce complexe cytoplasmique mais ne lie pas directement le AhR et est donc considérée comme une co-chaperonne. Elle est associée à la partie N-terminale d'une des deux protéines chaperonnes Hsp90 de manière ATP-dépendante. Cette protéine joue un rôle dans la dissociation entre Hsp90 et AhR après liaison du ligand (Kekatpure et *al.*, 2009).

La protéine XAP2 (« X-Associated Protein 2 ») est aussi appelée AIP (« AhR Interacting Protein ») (Ma et Whitlock, 1997) ou ARA9 (« AhR associated protein 9 ») (Carver et Bradfield, 1997). XAP2 interagit avec AhR au niveau de son domaine PAS-A et avec les Hsp90 au niveau de leur domaine C terminal. Elle possède un rôle important dans le maintien de la conformation initiale et de la stabilité de AhR non lié à son ligand en limitant son ubiquitinylation et sa

dégradation par le protéasome, comme le font également les Hsp90 (Kazlauskas et *al.*, 2000). L'équipe du Pr Perdew a montré que l'expression transitoire de XAP2 et de AhR dans des cellules COS-1 augmente les niveaux de la protéine AhR et, ainsi, une augmentation de son activité transcriptionnelle en présence de ligand (Meyer et Perdew, 1999). Cette protéine module également la localisation cellulaire de AhR. En effet, dans le cytoplasme, XAP2 liée aux protéines Hsp90 permet l'ancrage du récepteur au cytosquelette d'actine, ce qui empêche sa translocation nucléaire (Traber et *al.*, 2012). De plus, XAP2 modifie la localisation cellulaire du AhR en perturbant l'interaction entre le NLS (Nuclear Localization Signal) et l'importine β (récepteur permettant l'importation de AhR dans le noyau) (Petrulis et Perdew, 2002). Dans la cellule, en absence de ligand exogène, il existe ainsi deux populations de AhR, une population cytoplasmique liée à XAP2 et une population nucléaire sans XAP2 (Petrulis et Perdew, 2002). Cette observation suggère que chaque complexe de AhR pourrait fonctionner de manière distincte. Cependant, aucune étude n'a été entreprise pour étudier cette question.

3.1.2 Voie d'activation de AhR ligand-dépendante

Les ligands de AhR sont en général très lipophiles et diffusent à travers la membrane plasmique des cellules. La liaison entre le ligand et AhR induit un changement de conformation du récepteur qui provoque l'exposition du signal de localisation nucléaire présent dans la région N-terminale du récepteur. Le complexe formé de AhR, de la protéine Hsp90 restante, de p23 et du ligand, migre alors dans le noyau. Les protéines chaperonnes vont alors se dissocier et le AhR se lier avec son partenaire ARNT. L'hétérodimère AhR/ARNT se lie à des éléments de réponse appelés « Xenobiotic Responsive Element » (XRE) localisés dans le promoteur de gènes cibles et dont la séquence consensus est 5'-TNGCGTG-3'. Lors de la liaison du complexe à l'ADN, ARNT reconnaît la partie « GTG » de la séquence alors que

le AhR se lie au demi site « TNGC » (Bacsi et *al.*, 1995; Schmidt et Bradfield, 1996). Plusieurs gènes cibles sont des enzymes de biotransformation des xénobiotiques telles que le cytochrome P4501A1 (Figure 1.2).

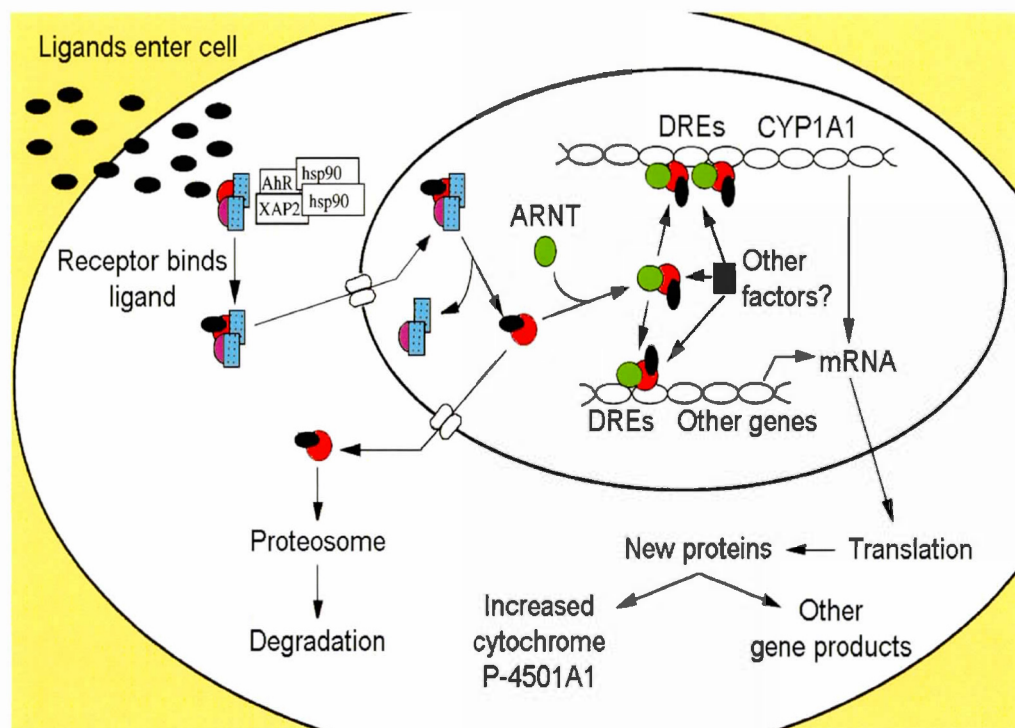


Figure 1.2: Voie de transduction de AhR (tirée de http://upload.wikimedia.org/wiki-pedia/commons/c/cf/AhRSignaling_colour.png).

AhR fait partie d'un complexe cytoplasmique qui comprend 2 protéines chaperonnes HSP90, une protéine co-chaperonne p23 et la protéine XAP2 (X-associated protein 2) ou AIP (AhR Interacting Protein). Après liaison de son ligand, le AhR migre dans le noyau et s'hétérodimérise avec son partenaire ARNT (Aryl Hydrocarbon receptor Nuclear Translocator). Cet hétérodimère se lie à l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) ou l'élément de réponse aux dioxines (DRE) dans le promoteur des gènes cibles dont il active la transcription. Ensuite, le récepteur se dirige vers le protéosome où il sera dégradé.

3.1.3 Voies de signalisation indépendantes de la liaison à un ligand

En plus de l'action de ligands, l'activité de AhR peut également être modulée par différents processus post-traductionnels.

Phosphorylation. AhR et son partenaire ARNT peuvent être phosphorylés au niveau de résidus sérine/thréonine par différentes kinases dont c-Src, les protéines kinases A et C (PKA, PKC) (Henklova et *al.*, 2008), la p38 MAPK, et les kinases p42 et p44, soient ERK1/2 (Yim et *al.*, 2004; Mukai et *al.*, 2010). La phosphorylation par la PKC des sérines S12, S16, S68 et la phosphorylation de la sérine S68 par la p38 MAPK régulent la localisation et/ou l'activité de AhR. Des études ont montré que l'augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (AMPc, activateur de la protéine kinase A) provoque la phosphorylation de AhR par la PKA et sa translocation nucléaire dans les cellules Hepa-1 (lignée murine d'hépatocyte) (Oesch-Bartlomowicz et *al.*, 2005). Cette translocation n'influence pas l'expression du CYP1A1, ce qui suggère une action autre que celle d'induire l'expression de gènes cibles.

SUMOylation. La SUMOylation joue un rôle important dans la régulation des fonctions de AhR. Récemment, des sites de SUMOylation ont été mis en évidence: un premier site dans le domaine bHLH et un deuxième dans le domaine de transactivation (domaine impliqué dans le recrutement de coactivateurs permettant la régulation de l'activité transcriptionnelle de AhR). La SUMOylation augmente la stabilité de AhR en inhibant son ubiquitinylation. De plus, cela entraîne également une répression de l'activité du domaine de transactivation du AhR. Le traitement de cellules MCF-7 par la TCDD entraîne une diminution du niveau de AhR « SUMOylé » dans le noyau. La TCDD induit donc l'activité transcriptionnelle du récepteur en inhibant sa SUMOylation (Xing et *al.*, 2012).

Ubiquitynylation. L'ubiquitynylation de AhR est aussi une modification post-traductionnelle importante. Après liaison à son ligand, le AhR est rapidement dégradé. En effet, la fraction nucléaire de AhR suite à la liaison de la TCDD est maximale après 1 à 2 heures de traitement puis décline (Pollenz *et al.*, 1994). Dans le noyau, la dissociation de la protéine chaperonne Hsp90, liée au domaine PAS-B, intervient simultanément avec l'hétérodimérisation de AhR avec son partenaire ARNT. Le complexe ligand-AhR-ARNT peut ainsi se lier à des éléments de réponse XRE. Parfois, l'expression faible d'ARNT provoque rapidement la dissociation du complexe et l'exportation rapide de AhR suivie de sa dégradation dans le cytoplasme (Davarinos et Pollenz, 1999): en l'absence de liaison à ARNT, AhR est ainsi pris en charge par les récepteurs d'exportation comme Xpo1 (Exportin 1). Ce transporteur permet le relargage de AhR dans le cytoplasme où il subit une ubiquitynylation et est ensuite dégradé par le protéasome.

3.2 Effet du Cd sur AhR

Des études menées en 2009 par Chao *et al.*, montrent que le Cd a un effet inhibiteur sur l'activation du récepteur AhR par son ligand, la TCDD, dans les cellules d'hépatome humain. Par contre, un co-traitement des cellules avec le Cd et la TCDD induit l'activation du CYP1A1, un gène cible de AhR. D'autres études montrent que le Cd inhibe l'induction de CYP1A1 par la TCDD dans les cellules HepG2, mais augmente les niveaux d'ARNm du CYP1A1 aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels en stabilisant l'ARNm. De plus, le Cd augmenterait la demi-vie de la protéine CYP1A1. Des mécanismes post-traductionnels seraient responsables de l'inhibition de l'activité du CYP1A1 induite par le Cd (Elbekai et El-Kadi, 2007).

4. Épithélium intestinal

4.1 Physiologie

L'épithélium intestinal est tapissé d'une seule couche de cellules d'une épaisseur qui varie entre 40 et 70 μm . Son rôle principal est de protéger et absorber. Dans l'intestin grêle, on trouve des cellules entérocytaires absorbantes, des cellules caliciformes qui produisent du mucus, des cellules entéroendocrines sécrétant des hormones lors de leur migration ascendante le long de la villosité et des cellules de Paneth qui produisent des agents antimicrobiens lors de leur migration descendante à la base de la crypte (Van Der Flier et Clevers, 2009) (Figure 1.3).

Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses. Ce sont des cellules cylindriques de 25 microns de haut. Des microvillosités apicales régulières (1 à 2 microns x 0,1 micron), au nombre de 3000/cellule, constituent la membrane en bordure en brosse. L'axe des microvillosités est occupé par des microfilaments d'actine ancrés sur un réseau de microfilaments soutenant l'ensemble des microvillosités et appelé « terminal web ». La cohésion cellulaire est assurée par des interdigitations, des desmosomes et, au pôle apical, par des complexes de jonctions assurant l'obstruction de l'espace intercellulaire. Le noyau ovoïde et les organites classiques se situent dans le tiers basal.

Les cellules caliciformes sont des cellules à mucus, dites à pôle muqueux ouvert. Elles sont moins nombreuses que les entérocytes et généralement isolées parmi les entérocytes. En forme de calice évasé vers le haut, les 2/3 apicaux sont occupés par des grains de mucus. Le noyau triangulaire est refoulé au pôle basal.

Les cellules endocrines sont dispersées tout le long du tube digestif mais aussi dans les glandes annexes et les canaux excréteurs. En fait, les cellules endocrines du tube digestif appartiennent à un système plus vaste: « le système neuro-endocrinien diffus ». Ces cellules se retrouvent au niveau de nombreux

organes: bronches, appareil urinaire, trompes et muqueuse utérine. Une quarantaine de types cellulaires ont été identifiés. Cette complexité n'est qu'apparente. En effet, elles ont toutes un caractère commun qui est la capacité de fixer et de décarboxyler les précurseurs des amines biogènes (qui sont des acides aminés: le tryptophane, l'histidine, la tyrosine et la phénylalanine) et de former respectivement de la sérotonine, de l'histamine, de la dopamine et de la noradrénaline. Ces cellules sont donc regroupées sous le terme de système « A.P.U.D. » (A.P. = Amine Précurseur, U = captent = Uptake, D = Decarboxyl).

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes. Ce sont des cellules sécrétrices exocrines, des cellules séreuses basophiles, avec de grosses granulations apicales éosinophiles. Elles possèdent une action anti-microbienne avec sécrétion de peptidases, de lysozymes et de plusieurs peptides de la famille des défensines. Elles contiennent des grains de zymogène dans leur cytoplasme.

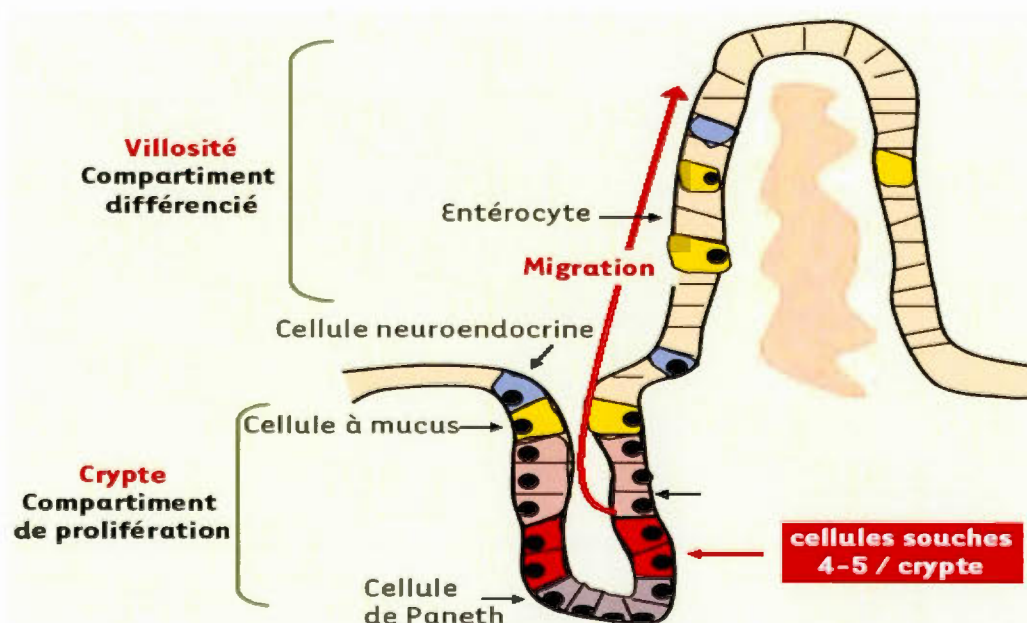


Figure 1.3: Les cellules de l'épithélium intestinal (tirée de http://www.intestin-carrefour-de-mon-destin.fr/tableaux/cryptes_et_villosites.html).

Les entérocytes, les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth prennent naissance dans la crypte à partir de cellules souches et y prolifèrent. Elles migrent ensuite (à l'exception des cellules de Paneth) le long des villosités pour se différencier et sont éliminées par anoïkose une fois qu'elles atteignent le sommet des villosités.

4.2 Différenciation entérocytaire et voies de signalisation impliquées

4.2.1 Mécanisme de différenciation

L'épithélium intestinal fait partie de la muqueuse de la paroi intestinale et se renouvelle très rapidement (tous les 3 à 6 jours). Le renouvellement des cellules intestinales épithéliales implique des cellules souches à la base des cryptes de Lieberkühn qui donnent naissance à des cellules progénitrices. Ces cellules se multiplient par mitoses et se différencient au cours de leur trajet le long de l'axe crypte-villosité jusqu'à atteindre le sommet des villosités où elles seront éliminées par anoïkose. Le cycle recommence pour remplacer les cellules éliminées par de nouvelles cellules (Eastwood, 1977; Smith, 1985).

Arrivé à la villosité, l'entérocyte a acquis les caractéristiques morphologiques et structurales d'une cellule absorbante. Cela se caractérise par une bordure en brosse apicale et une structure polarisée (un pôle apical et un pôle basal). Quant aux caractéristiques fonctionnelles, elles se manifestent par les enzymes digestives (utilisées comme marqueurs de différenciation): la lactase et la sucrase-isomaltase pour la digestion des glucides, les aminopeptidases, les dipeptidases et les carboxypeptidases pour la digestion des polypeptides. Toutes ces enzymes se trouvent au côté apical. Les protéines de transport apparaissent également au cours de la différenciation: les transporteurs d'hexose (SGLT-1) (Blais et *al.*, 1987) et les

transporteurs de fer (NRAMP2 « Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 2 ») (Canonne-Hergaux et *al.*, 1999; Tallkvist et *al.*, 2000; Bergeron et Jumarie, 2006) sont exclusivement exprimés à la membrane apicale alors que d'autres (GLUT-5, Na⁺-K⁺-ATPase) ne sont présents qu'à la membrane basolatérale.

4.2.2 Voies de signalisation impliquées dans la différenciation

Les entérocytes différenciés entrent en anoïkose lorsqu'ils atteignent l'apex des villosités, en guise d'exfoliation. De leur côté, les cellules de la crypte peuvent entrer « spontanément » en apoptose, un processus, rare dans les conditions physiologiques normales, qui sert à évacuer les cellules filles endommagées ou défectueuses. Cette apparente dualité de destinée entre les entérocytes indifférenciés et différenciés, couplée à des patrons différentiels d'expression d'homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité, suggère l'existence d'une régulation distincte de la survie entérocytaire selon l'état de différenciation (Vachon et *al.*, 2000; Vachon et *al.*, 2001).

Les voies PI3K/Akt et MEK/ERK sont impliquées distinctement dans la suppression de l'apoptose, ainsi que dans la modulation de l'expression d'homologues Bcl-2, toujours selon l'état de différenciation. PI3K favorise l'assemblage des jonctions serrées et contrôle l'activation de p38 ainsi que la différenciation enterocytaire (Rivard et *al.*, 2001). La voie MEK/ERK ne joue aucun rôle dans la survie des entérocytes humains indifférenciés, tandis qu'elle intervient dans la survie des entérocytes humains différenciés (Gauthier et *al.*, 2001; Harnois et *al.*, 2004) (Figure 1.4).

La kinase p38 est impliquée dans la réponse au stress, l'arrêt de la croissance et l'apoptose (Xia et *al.*, 1995; Galan et *al.*, 2000; Lag et *al.*, 2005). Cependant, la voie de signalisation de p38 peut également favoriser la différenciation dans

diverses cellules, y compris les cellules intestinales (Wu et *al.*, 2000; Rivard et *al.*, 2001). De même, les protéines kinases ERK1 et ERK2 stimulent la prolifération des cellules intestinales. En fait, des niveaux élevés de ERK1/2 phosphorylé ont été trouvés dans les entérocytes indifférenciés. Par contre, ces niveaux diminuent beaucoup au cours de la différenciation entérocytaire. Donc, la voie MAPK constitue une voie de signalisation clé dans le développement normal de l'épithélium intestinal (Aliaga et *al.*, 1999).

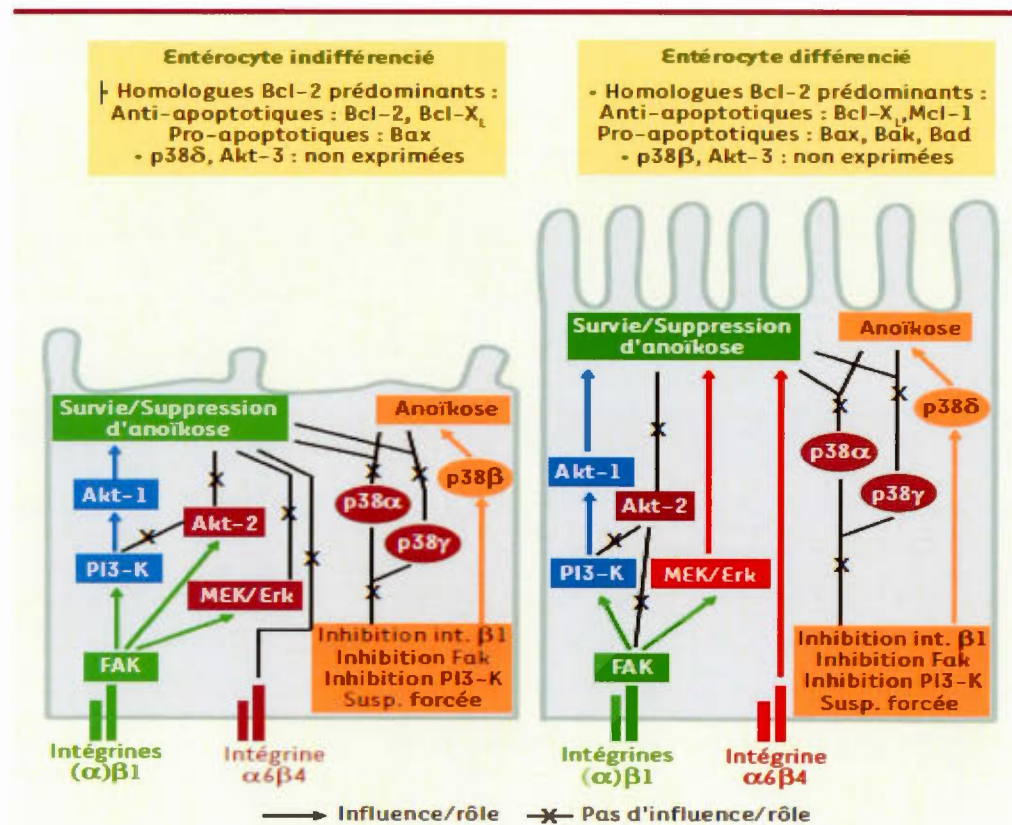


Figure 1.4: Mécanismes de survie entérocytaire selon l'état de différenciation (tirée de Vachon, 2006).

Dans les entérocytes indifférenciés (à gauche), les intégrines β1, Fak, PI3-K et Akt-1 sont cruciales pour la survie et la suppression de l'anoïkose. Cependant,

Akt-2 et la voie MEK/Erk ne jouent pas de rôle dans ces processus, bien que la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak contribue à les stimuler. Akt-2 est indépendante de PI3-K, tandis qu'Akt-3 n'est pas exprimée. Les isoformes de la MAP kinase de stress (SAPK) p38 α , p38 γ et p38 β (mais pas p38 δ) sont exprimées, mais seule p38 β est requise pour l'induction de l'anoïkose. Enfin, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ne contribue pas au maintien de la survie. Dans les entérocytes différenciés (à droite), les intégrines $\beta 1$, Fak, PI3-K et Akt-1 demeurent cruciales pour la survie, tandis que c'est p38 δ (et non p38 β qui n'est plus exprimée) qui est maintenant requise pour induire l'anoïkose. p38 α et p38 γ (mais pas p38 β) sont encore exprimées, mais ne jouent toujours pas de rôle dans la survie ou l'induction de l'anoïkose. La voie MEK/Erk demeure influençable par la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak et, ici, contribue à la survie. De plus, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ contribue maintenant à la suppression de l'anoïkose. D'un autre côté, Akt-2 demeure indépendante de PI3-K, tout en étant maintenant indépendante de la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak; elle ne joue toujours pas de rôle dans la survie ou dans l'induction de l'apoptose/anoïkose. Enfin, Akt-3 n'est toujours pas exprimée.

4.3 Absorption intestinale et accumulation entérocytaire du Cd

Les nutriments traversent l'épithélium pour rejoindre la circulation sanguine. Ce processus peut se faire de deux façons différentes: soit par passage paracellulaire, c'est-à-dire entre les entérocytes, soit par passage transcellulaire à travers les entérocytes. Le Cd utilise le passage transcellulaire. Dans ce cas, il a deux membranes à traverser ce qui augmente la charge épithéliale en Cd (Jumarie et al., 1999).

Dans l'entérocyte, le Cd peut: soit être stocké puis éliminé dans les fèces lors du renouvellement de l'épithélium intestinal, soit traverser la membrane basolatérale et pénétrer dans les capillaires sanguins. Pour traverser la membrane cytoplasmique de la cellule intestinale, le Cd a besoin de transporteurs transmembranaires apicaux et basolatéraux qui peuvent varier selon les espèces (Sherlock, 1984).

Le Cd présent dans les nutriments est absorbé au niveau du duodénum. Des études ont montré que la protéine DMT1 (« Divalent Metal Transporter 1 »), ou

DCT1 (« Divalent Cation Transporter 1 ») l'homologue murin de NRAMP2, présente chez les mammifères, est fortement exprimée dans le duodénum (Park et *al.*, 2002; Gunshin et *al.*, 1997). En fait, cette protéine est localisée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et a pour rôle principal de transporter le fer ferreux (Fe^{2+}) non hémique. Par mimétisme ionique, des éléments traces essentiels comme le Ni^{2+} , le Co^{2+} , et le Zn^{2+} peuvent être aussi transportés, ainsi que des cations métalliques toxiques comme le Cd^{2+} et le Pb^{2+} . D'autres études ont montré, selon des résultats d'inhibition en conditions de spéciation contrôlées, que la protéine NRAMP2 transporte le Cd^{2+} par inhibition du transport du Fe^{2+} (Elisma et Jumarie, 2001).

La protéine NRAMP2 subit une régulation post-transcriptionnelle dépendante du stock de fer intracellulaire. Elle est donc surexprimée en cas de carence en fer (Canonne-Hergaux et *al.*, 1999). Puisqu'il existe une compétition entre le Fe^{2+} et le Cd^{2+} pour se fixer au niveau de la protéine de transport NRAMP2 (Park et *al.*, 2002; Nordberg et *al.*, 2007), en cas de carence en fer, l'absorption intestinale du Cd est très élevée (Zalups et Ahmad, 2003). Ceci est très clair chez les femmes fertiles qui présentent des carences en fer. En fait, ces femmes absorbent quatre fois plus de Cd (Nordberg et *al.*, 2007; Flanagan et *al.*, 1978).

Un rôle de l'épithélium intestinal à excréter le Cd a été suggéré. Des études ont montré que les entérocytes peuvent subir une exposition apicale au Cd ainsi qu'une exposition baso-latérale. Pour une même concentration d'exposition, le Cd s'accumule plus du côté baso-latéral que du côté apical. Donc, le système de transport baso-latéral semble être plus efficace que le système de transport apical (Jumarie et *al.*, 1999; Carrière et *al.*, 2001).

5. Modèle cellulaire Caco-2

Pour étudier l'effet du Cd sur les voies de signalisation MAPK et de AhR, nous avons choisi le modèle cellulaire Caco-2 qui ressemble morphologiquement et fonctionnellement aux cellules entérocytaires. De plus, ce modèle est utilisé très souvent pour comprendre l'absorption intestinale des xénobiotiques (Hidalgo et *al.*, 1989).

La lignée cellulaire Caco-2 est issue d'un adénocarcinome colorectal d'un homme caucasien de 72 ans (Fogh et *al.*, 1977). Contrairement à d'autres lignées entérocytaires (HIEC et HT-29), ces cellules se différencient spontanément en cellules intestinales polarisées, possèdent à leur pôle apical une membrane en bordure en brosse et établissent des jonctions serrées entre elles. Elles expriment également des transporteurs à leur surface.

Après ensemencement, les cellules commencent à proliférer et à se multiplier de façon exponentielle jusqu'à couvrir toute la surface de culture; la confluence est alors atteinte, généralement au jour 6-7. Par inhibition de contact, les cellules cessent alors de se diviser et entrent spontanément en phase de différenciation (Tian et Quaroni, 1999). La différenciation est hétérogène deux semaines post-confluence, puis devient homogène quatre semaines post-confluence (Vachon et Beaulieu, 1992).

Cette différenciation se traduit par la polarisation des cellules et par la formation des jonctions serrées; on distingue un domaine apical, caractérisé par la bordure en brosse, et un domaine basolatéral (Pinto et *al.*, 1983; Hidalgo et *al.*, 1989; Zweibaum, 1993). Des enzymes spécifiques telles que l'aminopeptidase N, la γ -glutamyltranspeptidase et les hydrolases comme la lactase et la maltase, ainsi que des marqueurs de différenciation tels que la sucrase-isomaltase (protéine spécifique à l'entérocyte) et la phosphatase alcaline (Jumarie et Malo, 1991) sont exprimées au niveau des microvillosités. La sucrase-isomaltase s'exprime dans les cellules Caco-

2 à un niveau comparable à celui observé dans l'intestin grêle adulte (Rousset et *al.*, 1985).

Les cellules Caco-2, comme les entérocytes différenciés, expriment également à leur surface des protéines de transport de nutriments dont des transporteurs responsables de l'absorption d'acides aminés (Blais et *al.*, 1987; Mahraoui et *al.*, 1992). Une fois différenciées, les cellules Caco-2 ont tendance à former des dômes sur Pétri mettant en évidence leur capacité à transporter des ions, des nutriments, et de l'eau du pôle apical vers le pôle basolatéral. Ainsi, leur processus de maturation est comparable à celui des entérocytes *in vivo* lors de leur migration tout au long de l'axe crypte villosité (Tian et Quaroni, 1999).

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Notre recherche est basée sur des expériences préalablement faites au laboratoire. Des résultats publiés montrent que le Cd peut activer ERK1/2 dans les cellules Caco-2 différenciées, mais pas dans les cellules indifférenciées (Mantha et Jumarie, 2010). D'autre part, il a été suggéré par d'autres auteurs que ERK1/2 peut phosphoryler AhR (Mukai et *al.*, 2010). Par ailleurs, des recherches menées par Tan et *al.*, en 2002 ont montré que la TCDD induit l'activation de ERK1/2 sans l'intervention de AhR. Par contre, d'autres études montrent que la TCDD peut induire la phosphorylation de p38 sans affecter le niveau de ERK1/2 phosphorylées (Weiss et *al.*, 2005). De plus, la TCDD activerait ERK1/2 qui, à son tour, favoriserait l'interaction entre AhR et son partenaire ARNT (Yim et *al.*, 2004). Enfin, le U0126 (inhibiteur de ERK1/2) induit l'activité de CYP1A1 (principal gène cible de AhR) (Andrieux et *al.*, 2004).

Ces résultats suggèrent un chevauchement entre les voies de signalisation ERK1/2 et AhR et nous permettent de stipuler que le Cd, en phosphorylant ERK, mènerait à l'activation de AhR. L'objectif général de cette étude est d'évaluer si le Cd peut ainsi augmenter les processus de biotransformation intestinale. Les objectifs spécifiques sont:

- i) Vérifier si l'activation de AhR par la TCDD est précédée d'une phosphorylation de ERK1/2.
- ii) Évaluer si le Cd active AhR par un processus dépendant de ERK1/2.
- iii) Estimer s'il y a un effet additif entre le Cd et la TCDD sur l'activation de AhR.

CHAPITRE III

Cd interferes with ERK1/2 and AhR signaling cascade without evidence for cross-talk

Gebraël C, Jumarie C

Département des Sciences Biologiques, Centre TOXEN, Université du Québec à
Montréal.
Montréal, Québec, Canada.

Contributions des co-auteurs:

Gebraël: Expérimentation et essais biologiques, analyse de l'essentiel des résultats, contribution à la recherche bibliographique, participation à la rédaction de l'article.

Jumarie: Conception et financement du projet, réalisation de la recherche bibliographique, participation à la rédaction de l'article et à l'analyse des résultats.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a highly toxic metal that enters the food chain. Following oral ingestion, the intestinal epithelium is the first barrier against Cd toxicity which makes it also a target tissue. Cd affects a number of signaling cascades including ERK, JNK, and p38 kinase. Some studies have shown that Cd may influence the expression or the activity of enzymes of detoxification, notably CYP1A1, which is one of the most extensively studied AhR-target gene. AhR is a transcription factor involved in the cellular response to xenobiotics. Our previous results have shown a concentration and time-dependent increase in MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay) activity in differentiated human enterocytic-like Caco-2 cells exposed to 10 μ M Cd. This effect was not related to cell proliferation but to increased protein synthesis which involves ERK1/2 activation. Studies from other investigators have suggested that ERK1/2 can phosphorylate and activate AhR. These results suggest that Cd may be involved in cross-talk between AhR and ERK signaling pathways. Our objective was to test whether Cd may activate AhR via ERK phosphorylation. Western blot analysis and immunofluorescence data showed that Cd and TCDD (AhR ligand) both increased the nuclear translocation of AhR, but only TCDD increased CYP1A1 expression. Contrary to Cd, TCDD did not increase MTT activity and ERK1/2 phosphorylation. Insulin, a well-known ERK1/2 activator, did not have any effect on AhR activity and CYP1A1 expression. We conclude that ERK phosphorylation is not prerequisite to AhR activation and it does not necessarily lead to AhR activation. Although Cd does not increase the transcriptional activity of AhR, it favours its translocation to the nucleus which may have an impact on the overall AhR signaling.

Introduction

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated helix-loop-helix protein that exists as cytoplasmic aggregates bound to two 90-kDa heat-shock proteins (HSP90), the cochaperone p23 and the 43-kDa protein termed hepatitis B virus X-associated protein (Perdew et al., 1998). Upon interaction with xenobiotics, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and benzo[a]pyrene (BaP), the agonist-receptor complex dissociates from HSP90 and translocates to the nucleus where it associates with the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). The whole complex then acts as a transcription factor that binds to DNA promoter sequences termed xenobiotic responsive element (XRE), or dioxin responsive element (DRE), thereby enhancing the transcription of the target genes. Among these genes are those encoding a number of drug metabolizing enzymes, including the phase I enzyme cytochrome P4501A1 (CYP1A1) which oxygenates aryl hydrocarbons during detoxification process (Whitlock, 1999). AhR also plays an important role in cell and tissue homeostasis by participating in other signaling mechanisms controlling cell proliferation and differentiation without a requirement for exogenous ligands, as shown in mouse hepatoma cells (Ma and Whitlock, 1996). Thus AhR is not solely involved in cell response to xenobiotics, and the generation of AhR-deficient mice demonstrated the important role AhR plays in organ development (Fernandez-Salguero et al., 1995; Benedict et al., 2000; Lahvis et al., 2000).

Evidence have been shown that AhR function might be affected by processes involving the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade (Reiners et al., 1997). MAPKs are important intracellular signaling mediators, controlling gene expression by modulating transcription factors activities via phosphorylation.

The serine/threonine extracellular signal-regulated kinases ERK1/2 (p44/p42MAPK) are involved in many signaling events such as those controlling proliferation and differentiation, and a number of studies have suggested cross-talk between ERK1/2 and AhR pathways. ERK activation has been shown to be critical for TCDD-induced activation of AhR as well as increased CYP1A1 expression (Tan et al., 2002; Yim et al., 2004; Mukai et al., 2010). Exogenous AhR ligands, i.e. TCDD or BaP, would activate ERK in an AhR-independent manner which in turn would activate AhR. These conclusions came essentially from the observation that PD98059 or U0126, two inhibitors of MEK upstream of ERK, abolished AhR activation or CYP1A1 expression. Because some data also suggest that PD98059 may directly inhibit TCDD binding to AhR (Reiners et al. 1998) whereas U0126 could bind to and activate AhR (Andrieux et al., 2004; Aguilera-Montila et al. 2013), the absolute requirement of ERK in AhR activation can be criticized. Moreover, the direct phosphorylation of AhR by ERK remains doubtful and the role that phosphorylation plays in AhR activity has been a matter of debate. Phosphorylation sites have been identified in the C-terminal region of AhR (Mahon and Gasiewicz, 1995), and most studies investigating the effect of phosphatases on AhR activity converge to the conclusion that some phosphorylation events are needed for AhR activity. TCDD does not modify AhR phosphorylation, and AhR phosphorylation does not seem to be essential for ligand binding or AhR-Arnt dimerization. However, phosphorylation events (involving PKC per se or other phosphoproteins) would be critical either for the DNA binding step (Mahon and Gasiewicz, 1995; Yim et al., 2004) or for the subsequent transcriptional activity of AhR (Chen and Tukey, 1996; Li and Dougherty, 1997).

Cadmium (Cd) is a highly toxic metal that enters the food chain. Chronic oral absorption of contaminated food products and water may represent an important exposure source in addition to contaminated air and cigarette smoking (Olsson et al., 2005). Cd is classified as a type I carcinogen by the International Agency for

Research on Cancer, but depending on the concentration and time of exposure, it may also induce apoptosis (for review see Thévenod and Lee, 2013). Immunosuppression, anemia, osteoporosis, and renal dysfunction are well-known long-term toxic effects of Cd (Kazantzis, 2004; Olsson et al., 2005; Chatterjee et al., 2008). Cd also affects cell cycle progression by inhibiting or stimulating cell proliferation (Misra et al., 2002; Cao et al., 2007; Ronchetti et al., 2013; Sinha et al., 2014). In addition of promoting the production of reactive oxygen species (Liu et al., 2009), Cd affects a number of signaling cascades, including ERK, c-JUN N-terminal kinase (JNK), or p38 kinase in various cell types (Thévenod and Lee, 2013). Some studies have also shown that Cd may influence the expression or the activity of enzymes of detoxification, notably CYP1A1, which is one of the most extensively studied AhR-target gene. However data vary considerably. In rats treated with Cd by gavage or in drinking water, Cd significantly decreased intestinal *cyp1a1* mRNA (Kluxen et al., 2013). In vitro, mouse hepatoma cells exposure to 25 μM Cd for 6 h was found to increase *cyp1a1* mRNA without modifying protein level or CYP1A1 activity (Elbekai and Al-Kadi, 2004). However, a 48h-exposure to micromolar level of Cd did not modify *Cyp1a1* gene expression in the liver cell line HepG2 (Tchouwou et al., 2001), and exposure to 1 μM Cd for 5 days led to a 20% lower *Cyp1a1* mRNA levels in Caco-2 cells (Kluxen et al. 2013).

In a previous study, we have shown that a 24h-exposure to 10 μM Cd increases both ERK1/2 and p38 kinase phosphorylation in differentiated human enterocytic-like Caco-2 cells (Mantha et Jumarie, 2010). We pursue this study by investigating the possibility of cross-talk between ERK and AhR signaling in these cells and by testing the hypothesis that Cd could indirectly activate AhR via ERK1/2 phosphorylation. The data show that contrary to Cd, TCDD does not increase ERK1/2 phosphorylation in the differentiated Caco-2 cells. However

TCDD induces AhR activation as well as CYP1A1 overexpression. In contrast, Cd stimulates AhR nuclear translocation but failed to induce CYP1A1 expression.

Materials and Methods

Cell culture

A Caco-2 cell line (obtained from Dr. A. Zweibaum, Pinto et al., 1983) was used between passages 201 and 249. Stock cultures were grown in 75 cm² flasks (Corning, Inc., Corning, NY, USA) at 13×10^3 cells/cm², and were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle minimum essential medium (DMEM) containing 25 mM glucose (Gibco Life Technologies, Co, Grand Island, NY, USA), supplemented with 15% inactivated (56°C for 30 min) fetal bovine serum (FBS) (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada), 0.1 mM non-essential amino acids, penicillin–streptomycin (50 U/ml to 50 mg/ml) (Gibco Life Technologies) and 19 mM NaHCO₃. The non-essential amino acids L-aspartic acid and glycine were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), whereas L-alanine, L-asparagine, L-glutamic acid, L-proline, and L-serine were obtained from GibcoBRL. Cell confluence was achieved approximately 7 days after seeding. For subcultures for the experiments, the cells were passaged by trypsinization (0.05% trypsin–0.53 mM EDTA) (Gibco Life Technologies) for 15 min and seeded in 100 x 20 mm diameter culture dishes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), 96-well plates (Sarstedt), 0.15 mm Delta T Dish (Bioprotechs, Inc., Butler, PA, USA) or 0.15 mm Nunc Lab-tek II chambered coverglass (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The medium was changed every 2 days, and the cell cultures were maintained for 21 days to allow functional differentiation (Jumarie and Malo, 1991).

MTT activity measurements

Cytotoxicity was estimated by the MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich) assay which measures MTT (yellowish solution) reduction to blue formazan crystals by mitochondrial dehydrogenase of viable cells (Mosmann, 1983). Cells grown for 7 and 21 days on 96-well plates were rinsed twice with FBS-free DMEM prior to incubation with various concentrations of Cd ranging from 0 to 30 μM (prepared from 1 and 10 mM sterile stock solutions in ultra pure water) for 24 h. In parallel experiments, cells were incubated with 1 or 2 nM TCDD (Sigma Aldrich) or with 2 or 4 μM BaP (Sigma Aldrich) for 24 h.

At the end of the incubation period, 10 μL MTT (0.5 mg/mL final concentration) were added to each well and cells were incubated for 1.5 h at 37°C. The medium was discarded and changed to 200 μL DMSO to dissolve the formazan crystals before measuring absorbance at 575 nm with a Tecan SpectraFluor Plus microplate spectrophotometer (Esbe Scientific Industries, Inc., Markham, Canada). MTT data are expressed relative to their respective controls measured following a 24-h incubation in FBS-free DMEM.

Immunoblotting

Six and twenty-day-old cell cultures were rinsed twice with FBS-free DMEM before incubation in the presence of 1 or 2 nM TCDD, 0.2 or 0.4 μM BaP, 10 μM Cd, 100 nM bovine insulin (Sigma Aldrich), with or without 20 μM U0126 (Sigma Aldrich), in FBS-free medium for 24 h at 37°C. Cells were then harvested in ice-cold hypotonic lysis buffer, passed through a 26 G needle, and centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C. The pellet was discarded and 20 μg protein of the supernatant was mixed with 62.5 mM Tris-HCl buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, pH 6.8), heated to 95°C for 5 min, and separated by electrophoresis in 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE).

Proteins were detected immunologically following electrotransfer to PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA). Membranes were blocked by a 1-h incubation with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 and 5% non-fat milk at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA): p44/42MAPkinase (9102), phospho-p44/42MAPkinase (Thr202/Tyr204) (9101), β -actin (4967), and CYP1A1/2 (3112249, Assay BioTech, USA). Membranes were then incubated with a mixture of secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA): horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000) (7074) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-biotin (1:1000) (7075) for 1 h. Biotinylated molecular weight markers (7727, Cell Signaling) were used and membranes were developed by adding the substrate HyGLO (Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA), and visualized using a Chemiluminescence-Fluorescence and Advanced Fluorescence Fusion FX7 instrument (Montreal Biotech Inc. Laboratory Equipment). Densitometry values of treated cell samples were normalized relative to that of β -actin and compared to control cells, using ImageJ 1.48p software (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Confocal microscopy

Six and twenty-day-old cells, maintained in 0.15 mm Nunc Lab-tek II chambered coverglass or 0.15 mm Delta T Dish were rinsed twice with FBS-free DMEM before incubation in the presence of 1 or 2 nM TCDD, 0.2 or 0.4 μ M BaP, 10 μ M Cd, 100 nM insulin, with or without 20 μ M U0126 in FBS-free medium for 24 h at 37°C. Cells were then rinsed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, exposed to 0.2% Triton X-100 for 5 min at 4°C (for intracellular detection), blocked with 5% BSA solution for 1 h at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody AhR (1:200) (H-211,

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA). The next day, cells were incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor® 568 conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L, A-11011, Life technologies), then exposed for 5 min also at room temperature to 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue) (P36935, Life technologies), and finally visualized with a Nikon A1R confocal laser microscope system (Japan, 2011). The intensity of fluorescence of the regions of interest (nuclei) was evaluated using ImageJ 1.48p software.

Statistical analysis

Statistical analyses of nuclear location of AhR were performed by one-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison tests. ERK, phospho-ERK and CYP1A1 levels were compared using the unpaired Student's *t*-test. Statistical significance was assessed at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

Cd but not AhR activators increases MTT activity

MTT activity was measured following a 24h-exposure to increasing concentrations of Cd in confluent but undifferentiated 6-day-old cells, and in 2 week-post-confluent differentiated cell cultures. A 150% increase in MTT activity was observed at 10 – 15 μ M Cd in 20-day-old cells, whereas levels similar to control were observed at higher concentrations (Fig. 3.1A). This effect was not observed in undifferentiated cultures. Contrary to Cd, TCDD or BaP did not stimulate MTT activity independently of days in culture (Figs. 3.1B and 3.1C).

MTT activity measurement was originally used as an indicator of cell survival and the chemosensitivity of drug-resistant tumor cells (Carmichael et al., 1987). It has been widely used in cytotoxicity studies as well as for measuring cell proliferation. However, we have previously shown that Cd may enhance MTT

activity without stimulating cell proliferation, as revealed by the lack of increased [³H]-thymidine incorporation. Cd effect on MTT activity in the Caco-2 cells would rather be the result of increased protein synthesis (Mantha and Jumarie, 2010). Such transient increase in MTT activity without correlation with cell proliferation has been reported by others in osteoblastic cells exposed to oxidized low-density lipoproteins, and this effect was related to increased NAD(P)H oxidase activity (Hamel et al. 2008). Variation in MTT data should be interpreted with care. The present study shows that the Cd-induced hormetic-like effect on MTT activity in the Caco-2 cells is a differentiation stage-specific phenomenon that is not observed with xenobiotics acting as AhR ligands.

Increase in MTT activity is related to ERK activation

Cd-induced MTT activity in the Caco-2 cells has been related to ERK activation (Mantha and Jumarie, 2010). Indeed, 7 to 9-fold increases in the levels of phospho-ERK1/2 were observed in 21-days old differentiated cells following a 24-h exposure to 10 μ M Cd (Fig. 3.3) whereas Cd failed to activate ERK1/2 in undifferentiated cultures (Fig. 3.2). As expected, the ERK1/2 inhibitor U0126 completely eliminated Cd effect: co-exposure to both Cd and U0126 led to levels of phosphorylated protein similar to that estimated in the unexposed control cells. No significant increase in phospho-ERK1/2 was observed in differentiated cells exposed to either 1 and 2 nM TCDD or 0.2 and 0.4 μ M BaP (Fig. 3.3). Moreover, significant lower levels of phospho-ERK1/2 were observed in undifferentiated 6-days old cells exposed to 0.2 μ M BaP (Fig. 3.2).

The Cd-induced MTT activity in differentiated Caco-2 cells was abolished by the presence of U0126, which shows correlation between Cd-induced MTT stimulation and ERK1/2 activation (Mantha and Jumarie, 2010). Such a correlation has also been observed in embryo lung fibroblasts and HEK293 cells following a 24-h exposure to only 0.05 – 1 μ M Cd (Hao et al., 2009; Jiang et al., 2009). A

number of studies reported that 1 – 10 μM Cd may rapidly increase ERK phosphorylation within few hours or even minutes (Leal et al., 2007; Liu et al., 2008; Arbon et al., 2012; Chang et al., 2013; Jiang et al., 2014). Our previous study showed that 10 μM Cd increases MTT activity after 12 h with optimal induction at 24 h and levels back down to the control values at 48 h (Mantha and Jumarie, 2010). The kinetic of Cd-induced phosphorylation of ERK1/2 was not studied but the observed correlation between variation in MTT activity and level of phospho-ERK1/2 suggests that ERK1/2 activation by Cd would be a transient phenomenon with optimal induction for 10-15 μM Cd at 24 h.

Contrary to Cd, TCDD did not stimulate ERK1/2 phosphorylation in the Caco-2 cells under our experimental conditions. This result is in accordance with the lack of MTT induction by TCDD (Fig. 3.1). However, some studies have shown ERK activation in murine macrophage cell line RAW264.7 following a 10-min or 2-h exposure to 10 nM and 1 nM TCDD, respectively (Tan et al., 2002; Yim et al., 2004). Increased levels of phospho-ERK were also observed in the human ovarian granulosa cells HO23 exposed to 10 nM TCDD for 15 min (Fang et al., 2013). Moreover, some studies have shown that ERK activation by TCDD is not sustained. In murine leukemia cells exposed to 10 nM TCDD, significant increases in ERK (mostly ERK1) phosphorylation were observed at 4 h with levels decreasing to control values at 12 h (Park et al., 2005). In the human T-cell line Jurkat, the transient activation of ERK was most effective for ERK2 and began 30 min after exposure to 10 nM TCDD with levels of phosphorylation no longer significantly higher than control values after 12 h (Kwon et al., 2003). Thus the possibility that TCDD could rapidly activate ERK1/2 transiently with different kinetics of induction compared to Cd cannot be excluded.

ERK activation is not prerequisite to AhR activation

To evaluate whether ERK activation is prerequisite to or favour AhR activation, the nuclear translocation of the receptor was studied by confocal microscopy. Cell nuclei were stained with blue DAPI and AhR was conjugated to a red fluorochrome. As shown in figure 3.4, a weak nuclear localization of AhR was observed in unexposed control undifferentiated cells, and cells treatment with Cd, TCDD or BaP did not stimulate AhR. However, in differentiated cells, exposure to Cd and TCDD led to 2- and 1.5-fold increases in the nuclear localization of AhR, respectively (Fig. 3.5). It is thus tempting to conclude that the lack of effect of TCDD in 7-day-old cultures is related to the cells developmental stage. However, although most studies on TCDD, BaP and CYP1A1 in the Caco-2 cells have been conducted in differentiated cultures, a couple of studies have shown that TCDD may increase EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) activity or CYP1A1 expression in 1 to 2-days old (undifferentiated) cells (de Waard et al., 2008; Perdrew et al., 2010). To the best of our knowledge, there is no evidence for an AhR-independent mechanism of TCDD-induced expression of CYP1A1; results reported by de Waard et al. (2008) and Perdrew et al. (2010) suggest that TCDD may also activate AhR in undifferentiated Caco-2 cells. We may hypothesize that the cells' responsiveness to AhR activating ligands varies with culture conditions. In most studies, cells were treated using standard medium containing serum. Cd binds to bovine serum albumin (BSA) and we have previously shown that Cd complexation by BSA considerably lower the total cellular accumulation of metal (Pham et al., 2004). For this reason, serum-free exposure conditions have been used for cells treatment with Cd as well as with TCDD and BaP. In the absence of serum, the Caco-2 cells sensitivity to TCDD-induced activation of AhR could vary with the differentiation status.

The present study reveals that Cd and TCDD do not have additive effect since co-exposure to Cd and TCDD did not result in higher level of AhR activation. The

fact that, unlike TCDD, BaP did not increase the nuclear location of AhR is difficult to explain especially that comparable effects of BaP and TCDD on the expression of more than 20 genes have been observed in the Caco-2 cells (de Waard et al., 2008). However, complete inhibition of AhR expression has also been observed in cells exposed to BaP (Fang et al., 2013), whereas others reported that CYP1A1 induction by BaP is transient and completed within 24 h (Sergent et al., 2009). The possibility of a faster transient AhR activation by BaP compared to by TCDD in the Caco-2 cells cannot be ruled out.

The data also show that U0126 decreased by half the nuclear localization of AhR in undifferentiated cells. This effect was also observed in differentiated cells but to a much less extent (Figs. 3.4 and 3.5). Thus, the direct stimulatory effect of U0126 on AhR that has been reported by others is unlikely to occur under our experimental conditions (Andrieux et al. 2004). Notably, the TCDD- as well as Cd-induced nuclear translocation of AhR in differentiated cells was inhibited by U0126 (Fig. 3.5). Cells treatment with 100 nM insulin, which led to a 35-fold increase in phospho-ERK1/2 (data not shown), did not modify AhR nuclear location. Thus ERK1/2 phosphorylation does not necessarily lead to AhR activation, the possibility that the Cd-induced activation of AhR involves elements other than ERK1/2 that need to be identified deserves to be investigated. Interestingly, higher basal levels of activated AhR were observed in differentiated cells compared to undifferentiated cultures, whereas the opposite was measured for the basal levels of phosphorylated ERK1/2. No correlation could be observed between phospho-ERK and AhR activity.

Although no increase in phospho-ERK1/2 was observed following a 24-h exposure to TCDD (Figs. 3.2 and 3.3), TCDD-induced AhR activation in differentiated cells was inhibited by U0126. This, in addition with the lower AhR nuclear location in cells exposed to U0126 alone suggest that: i) ERK1/2 activation would not be prerequisite to AhR activation but basal ERK1/2 activity would be

necessary or ii) a rapid transient (not observed) activation of ERK1/2 precedes AhR activation. The results suggest different mechanisms of activation for AhR between ligands and non-ligand metals such as Cd.

Cd-induced AhR nuclear location does not necessarily stimulate CYP1A1 expression

To get further insights on Cd effect on AhR signaling, we tested whether AhR target genes could be overexpressed by estimating the level of CYP1A1 in differentiated cells (Fig. 3.6). Western blot analysis showed a clear induction of CYP1A1 expression in differentiated cells treated with 1 nM TCDD. ERK1/2 activation would not be required since TCDD itself did not increase ERK1/2 phosphorylation (Fig. 3.3). Conversely, Cd which increased the level of phospho-ERK1/2 as well as the nuclear translocation of AhR failed to induce CYP1A1 (Fig. 3.6). Lack of CYP1A1 induction by Cd has also been reported by others. In mouse hepatoma cells which respond within minutes to TCDD stimulation, Cd (20 μ M) failed to induce CYP1A1 expression as well as AhR activity using a luciferase reported gene (Maier et al., 2000). In contrast, some authors did observe increases in CYP1A1 mRNA in mouse hepatoma cells exposed to 5 - 25 μ M Cd, but without modification in the protein level of CYP1A1 (Elbekai and El-Kadi, 2004; Elbekai and El-Kadi 2007). In Caco-2 cells, a 5-day exposure to 1 μ M Cd, which succeeded in inducing metallothionein mRNA (a well-known metal biomarker), reduced CYP1A1 mRNA by 20% (Kluxen et al., 2013). This study was conducted probably in undifferentiated cells because exposure began 24 h post seeding. Thus one may ask how differentiated cultures would have responded. However similar results were obtained in vivo, in the intestinal tissues of rat receiving Cd orally (Kluxen et al., 2013).

Given the lack of CYP1A1 induction by Cd, we must specify that increased nuclear translocation of AhR does not guarantee its transcriptional activity. Indeed, in an attempt to better understand the role that protein kinases play in AhR

activation, numerous studies have dissected the steps of AhR signaling, from ligand binding to gene expression, and they have shown that AhR may indeed translocate to the nucleus without being active as a transcription factor. Phosphorylation steps, with the possible involvement of PKC, would be required either for AhR-ARNT binding to XRE (Carrier et al., 1992; Berghard et al., 1993) or for the subsequent transcriptional activity of the dimer (Mahon and Gasiewicz 1995; Chen and Tukey 1996, Li and Dougherty 1997). Although our previous data have suggested the involvement of PKC in the Cd-induced ERK activation in Caco-2 cells, this would not be sufficient to induce the transcriptional activity of AhR (Mantha and Jumarie, 2010). Otherwise, some studies have shown that stress-induced signaling may also modulate CYP1A1 expression (for review see Delescu et al. 2000), and it has been suggested that oxidative stress could be involved in Cd-induced CYP1A1 expression (Elbekai and El-Kadi 2005). Thus one may hypothesize that, whatever AhR stimulation, the Cd-induced CYP1A1 expression involves AhR-independent mechanisms triggered by oxidative stress signaling. This could explain the absence of CYP1A1 induction despite AhR stimulation observed in the present study. In fact, we have previously shown that a 24h-exposure to 10 μ M Cd is unlikely to induce oxidative stress in differentiated Caco-2 cells (Cardin et al., 2009).

Conclusion

The present study demonstrates that the Cd-induced hormetic-like effect on MTT activity in the Caco-2 cells is a differentiation stage-specific phenomenon that is not observed with xenobiotics acting as AhR ligands. The nuclear location of AhR is more pronounced in differentiated cells compared to undifferentiated cultures, whereas the opposite effect was seen for phospho-ERK1/2. TCDD promotes the nuclear translocation of AhR and stimulates CYP1A1 expression exclusively in differentiated cells. Contrary to Cd, TCDD does not stimulate ERK

phosphorylation. Conversely, Cd which increases the level of phospho-ERK and AhR nuclear location does not enhance CYP1A1 expression. Insulin, which considerably increases ERK phosphorylation, has no effect on AhR nuclear translocation. Thus, ERK phosphorylation is not prerequisite to AhR activation and does not necessarily lead to AhR activation. Cd does not stimulate the transcriptional activity of AhR but it increases its nuclear localisation and may interfere with AhR signaling.

REFERENCES

- Aguilera-Montila N, Chamorro S, Nieto C, Sanchez-Cabo F, Dopazo A, Fernandes-Salguero PM, Rodriguez-Fernandez JL, Pello OM, Andrés V, Cuenda A, Alonso B, Dominguez-Soto, A, Sanchez-Ramon S, Corbi AL. 2013. Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. *Blood* 121:e108-17.
- Andrieux L, Langouët S, Fautrel A, Ezan F, Krauser JA, Savouret JF, Guengerich FP, Baffet G, Guillouzo A. 2004. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P4501A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Mol Pharmacol* 65:934-943.
- Arbon KS, Christensen CM, Harvey WA, Hegglang SJ. 2012. Cadmium exposure activates the ERK signaling pathway leading to altered osteoblast gene expression and apoptotic death in Saos-2 cells. *Food Chem Toxicol* 50:198-205.
- Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA. 2000. Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci* 56:382-388.
- Berghard A, Gradin K, Pongratz I, Whitelaw M, Poellinger L. 1993. Cross-coupling of signal transduction pathways: the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 13:677-689.
- Cao XJ, Chen R, Li AP, Zhou JW. JWA gene is involved in cadmium-induced growth inhibition and apoptosis in HEK-293T cell. *J Toxicol Environ Health A* 70:931-937.
- Cardin GB, Mantha M, Jumarie C. 2009. Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cells differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms. *Biometals* 22:753-769.
- Carmichael J, De Graff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942.

- Carrier F, Owens RA, Nebert DW, Puga A. 1992. Dioxin-dependent activation of murine *Cypta-1* gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 12:1856-1863.
- Chang KC, Hsu CC, Liu SH, Su CC, Yen CC, Lee MJ, Chen KL, Ho TJ, Hung DZ, Wu CC, Lu TH, Su YC, Chen YW, Huang CF. 2013. Cadmium induces apoptosis in pancreatic β -cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *PLoS ONE* 8(2): e54374.
- Chatterjee S, Kundu S, Bhattacharyya A. 2008. Mechanism of cadmium induced apoptosis in the immunocyte. *Toxicol Lett* 177:83-89.
- Chen Y-H, Tukey RH. 1996. Protein kinase c modulates regulation of the *CYP1A1* gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 271:26261-26266.
- Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R. 2000. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* 153: 73-82.
- De Waard WJ, Aarts JMMJG, Peijnenburg AACM, Baykus H, Talsma E, Punt A, De Kok TMCM, Van Schooten FJ, Hoogenboom LAP. 2008. Gene expression profiling in Caco-2 human colon cells exposed to TCDD, benzo[a]pyrene, and natural Ah receptor agonists from cruciferous vegetables and citrus fruits. *Toxicol In Vitro* 22:396-410.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. 2004. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* 202:249-269.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As^{3+} , Cd^{2+} , and Cr^{6+} . *Free Rad Biol Med* 39:1499-1511.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. 2007. Transcriptional activation and posttranslational modification of *Cyp1a1* by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicol Letters* 172:106-119.
- Fang CC, Chen FY, Chen CR, Liu CC, Wong LC, Liu YW, Su JG. 2013.

- Cyprodinil as an activator of aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology* 304:32-40.
- Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268:722-726.
- Hamel P, Abed E, Brissette L, Moreau R. 2008. Characterization of oxidized low-density lipoprotein-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1021-C1033.
- Hao C, Hao W, Wei X, Xing L, Jiang J, Shang L. 2009. The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. *Toxicol In Vitro* 23:660-666.
- Jiang C, Yuan Y, Hu F, Wang Q, Zhang K, Wang Y, Gu J, Liu X, Bian J, Liu Z. 2014. Cadmium induces PC12 cells apoptosis via an extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial apoptotic pathway. *Biol Trace Elem Res* 158:249-258.
- Jiang G, Duan W, Xu L, Song S, Zhu C, Wu L. 2009. Biphasic effect of cadmium on cell proliferation in human embryo lung fibroblast cells and its molecular mechanism. *Toxicol In Vitro* 23:9773-978.
- Jumarie C, Malo C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 149:24-33.
- Kazantzis G. 2004. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals* 17:493-498.
- Kluxen FM, Diel P, Höfer N, Becker E, Degen GH. 2013. The metallohormone cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol. *Arch Toxicol* 87:633-643.
- Kwon MJ, Jeong KS, Choi EJ, Lee BH. 2003. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in Jurkat T cell. *Pharmacol Toxicol* 93:186-190.
- Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA. 2000. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10442-10447.

- Leal RB, Posser T, Rigon AP, Oliviera CS, Gonçalves CA, Gelain DP, Dunkley PR. 2007. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 234:34-43.
- Li S-Y, Dougherty JJ. 1997. Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys* 340:73-82.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:209-214.
- Liu Z, Yu X, Shaikh ZA. 2008. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 228:286-294.
- Ma Q, Whitlock JP, Jr. 1996. The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1ci cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol* 16:2144-2150.
- Mahon MJ, Gasiewicz TA. 1995. Ah receptor phosphorylation: localization of phosphorylation sites to the C-terminal half of the protein. *Arch Biochem Biophys* 318:166-174.
- Maier A, Dalton TP, Puga A. 2000. Disruption of dioxin-inducible phase I and Phase II gene expression patterns by cadmium, chromium, and arsenic. *Mol Carcinogenesis* 28:225-235.
- Mantha M, Jumarie C. 2010. Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *J Cell Physiol* 224:250-261.
- Misra UK, Gawdi G, Akabanni G, Pizzo AV. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 14:327-340.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 65:55-63.
- Mukai R, Shirai Y, Saito N, Fukuda I, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. 2010. Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 501:134-141.

- Olsson IM, Erikson J, Oborn I, Skerfving S, Oskarsson A. 2005. Cadmium in food production systems: a health risk for sensitive population groups. *Ambio* 34:344-351.
- Park SJ, Yoon, WK, Kim HJ, Son HY, Cho SW, Jeong KS, Kim TH, Kim SH, Kim SR, Ryu SY. 2005. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in RAW 264.7 cells. *Anticancer Res* 25:2831-2836.
- Perdrew GH, Hollingshead BD, DiNatale BC, Morales JL, Labrecque MP, Takhar MK, Tam KJ, Beischlag TV. 2010. Estrogen receptor expression is required for low-dose resveratrol-mediated repression of aryl hydrocarbon receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 335:273-283.
- Pham TND, Ségui JA, Fortin C, Campbell PGC, Denizeau F, Jumarie C. 2004. Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *J Cell Physiol* 201:320-330.
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assman P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. 1983. Enterocytic-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323-330.
- Reiners JJ Jr, Jones CL, Hong N, Clift R, Elferink C. 1997. Downregulation of aryl hydrocarbon receptor function and cytochrome P450 1A1 induction by expression of Ha-ras oncogenes. *Mol Carcinog* 19:91-100.
- Reiners JJ Jr, Lee J, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP. 1998. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol* 53:438-445.
- Ronchetti SA, Miler EA, Duvilanski BH, Cabilla JP. 2013. Cadmium mimics estrogen-driven cell proliferation and prolactin secretion from anterior pituitary cells. *Plos One* 8:e81101.
- Sergent T, Dupont I, Jassogne Coralie, Ribonnet L, Van Der Heiden E, Scippo ML, Muller M, McAlister D, Pussemier L, Larondelle Y, Schneider YJ. 2009. CYP1A1 induction and CYP3A inhibition by the fungicide imazalil in the human intestinal Caco-2 cells – Comparison with other conazole pesticides. *Toxicol Letters* 184:159-168.
- Sinha K, Pal PB, Sil PC. 2014. Cadmium (Cd^{2+}) exposure differentially elicits both

cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. *Toxicol In Vitro* 28:307-318.

Tan Z, Chang X, Puga A, Xia Y. 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol* 64:771-780.

Tchouwou PB, Ishaque AB, Schneider J. 2001. Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. *Mol Cell Biochem* 222:21-28.

Thévenod F, Lee W-K. 2013. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch Toxicol* 87:1743-1786.

Whitlock JP Jr. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:103-125.

Yim S, Myoungsuk O, Choi SM, Park H. 2004. Inhibition of the MEK-1/p42 MAP kinase reduces aryl hydrocarbon receptor-DNA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 322:9-16.

FIGURES

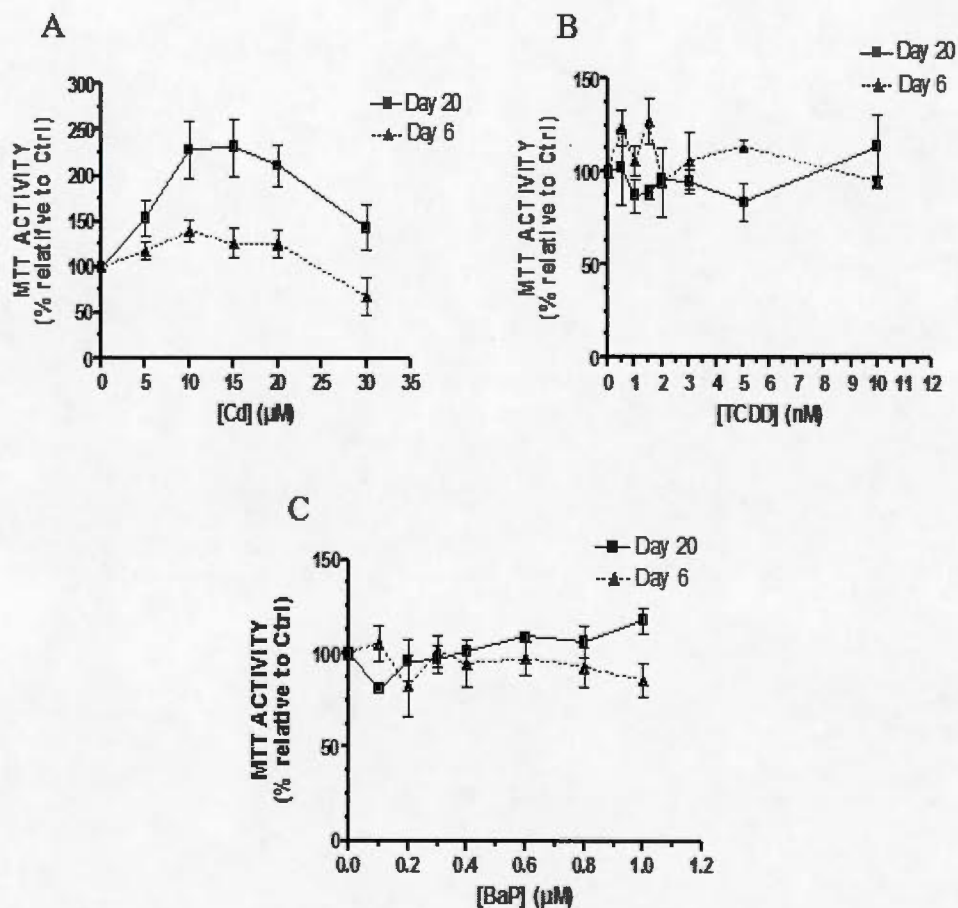


Fig. 3.1: MTT activity concentration–response curves as a function of increasing concentrations of Cd, TCDD, and BaP in Caco-2 cells. Cells were grown in FBS-containing DMEM for 6 and 20 days and were then exposed to increasing concentrations of (A) Cd, (B) TCDD, and (C) BaP in the absence of FBS for 24h. MTT activity was estimated as described in the Materials and Methods Section. Data shown are means \pm SD estimated on three to ten independent cell cultures.

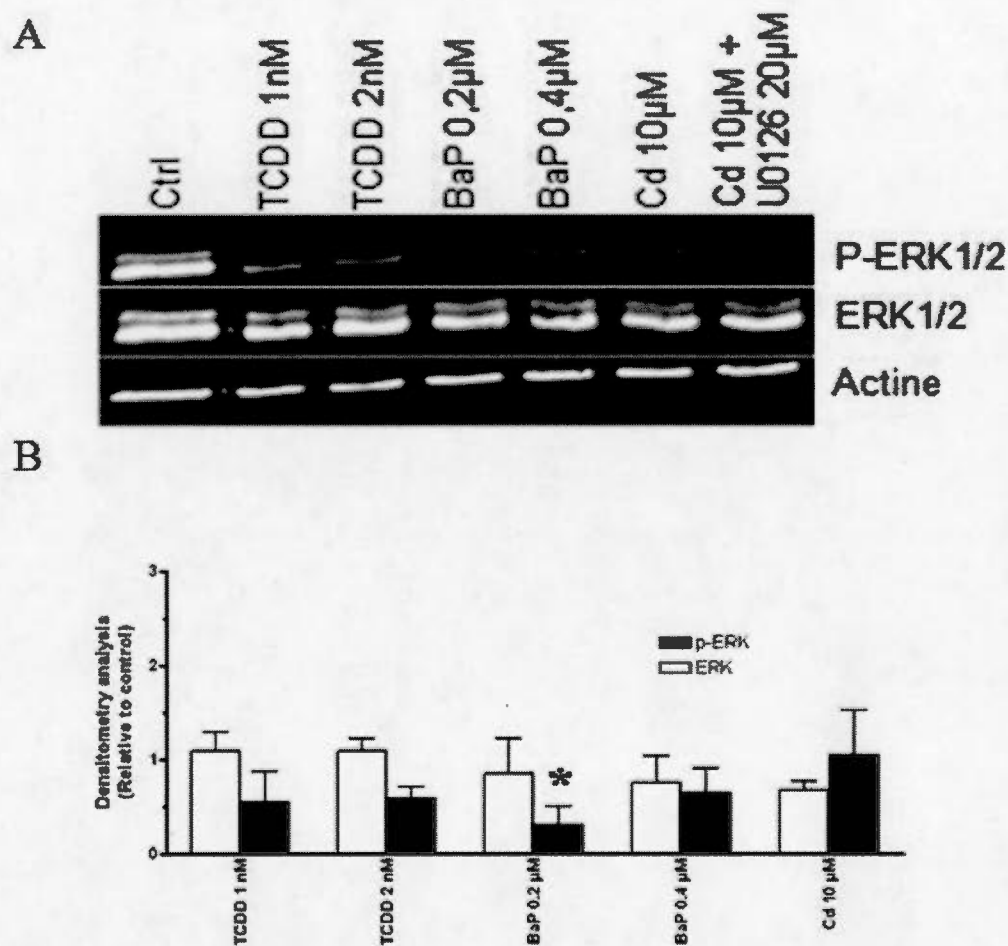


Fig. 3.2: ERK1/2 activation as investigated by Western blot analysis as described in the Materials and Methods Section. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then incubated for 24 h in FBS-free DMEM in the presence of 1 nM TCDD, 2 nM TCDD, 0.2 μ M BaP, 0.4 μ M BaP, 10 μ M Cd or 10 μ M Cd and 20 μ M U0126. A: Representative blot of ERK1/2 phosphorylation, total ERK1/2, and β -actin. B: Densitometry analysis normalized to β -actin expressed relative to control levels. Data shown are means \pm SD estimated on three to seven independent cell cultures. (* significant compared to Ctrl $p < 0.05$).

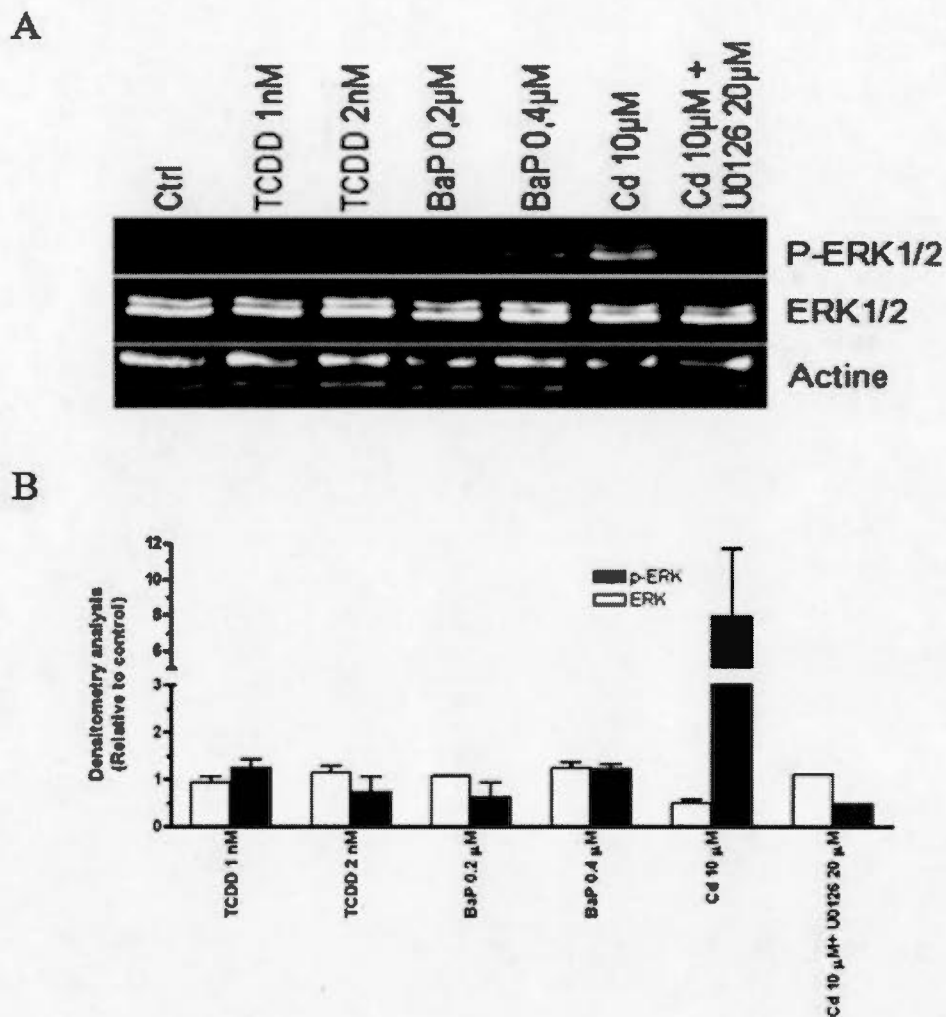


Fig. 3.3: ERK1/2 activation as investigated by Western blot analysis as described in the Materials and Methods Section. Cells were cultured in the presence of FBS for 20 days and were then incubated for 24 h in FBS-free DMEM in the presence of 1 nM TCDD, 2 nM TCDD, 0.2 μ M BaP, 0.4 μ M BaP, 10 μ M Cd or 10 μ M Cd and 20 μ M U0126. A: Representative blot of ERK1/2 phosphorylation, total ERK1/2, and β -actin. B: Densitometry analysis normalized to β -actin expressed relative to control levels. Data shown are means \pm SD estimated on three to seven independent cell cultures.

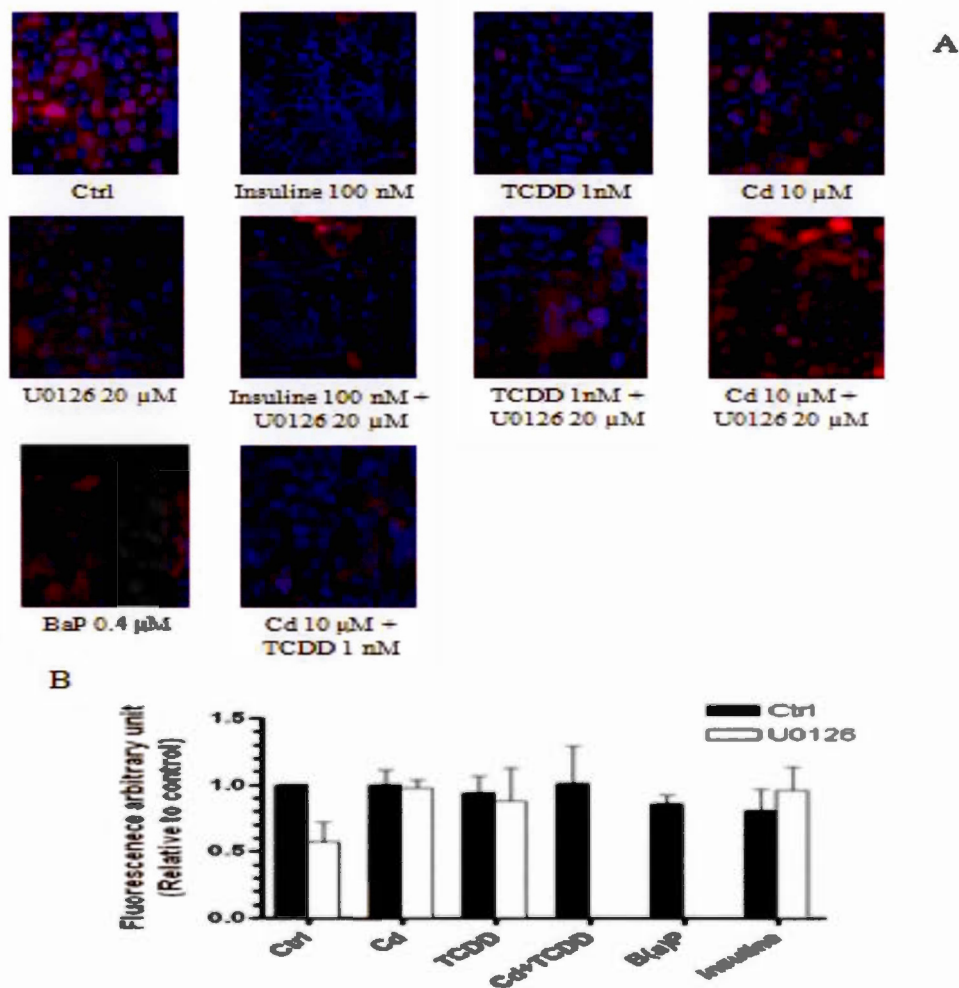


Fig. 3.4: Evaluation of AhR nuclear levels in undifferentiated cultures (6 day-old). Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then incubated for 24 h in FBS-free DMEM in the presence of 10 μ M Cd, 1 nM TCDD, 10 μ M Cd and 1 nM TCDD, 0.4 μ M BaP, 100 nM insulin, with or without 20 μ M U0126. A: Confocal microscopy images: Cell nuclei were stained with blue DAPI and AhR was conjugated to a red fluorochrome (Alexa Fluor 568). B: Analysis of the intensity of fluorescence of the regions of interests (nuclei) relative to control. Data shown are means \pm SD estimated on three to five independent cell cultures.

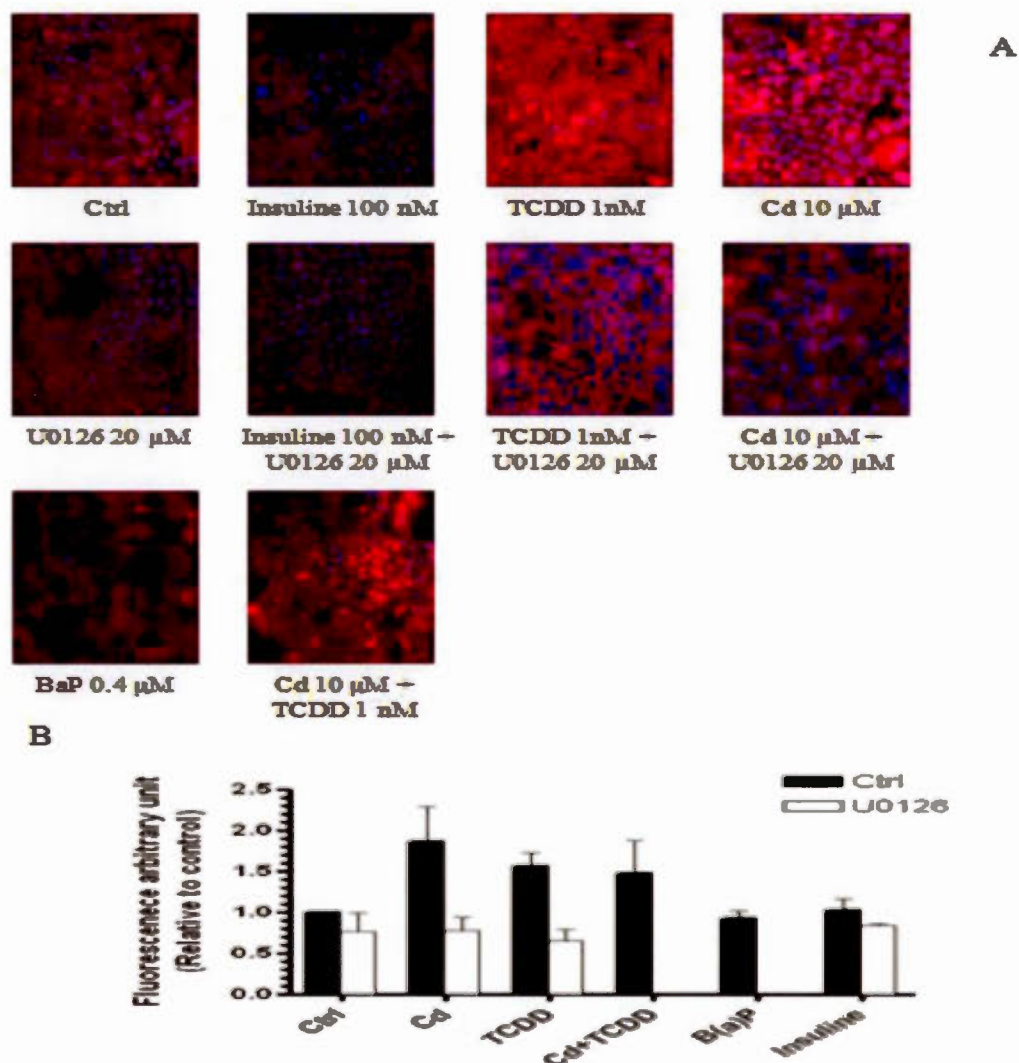


Fig. 3.5: Evaluation of AhR nuclear levels in differentiated cultures (20 day-old). Cells were cultured in the presence of FBS for 20 days and were then incubated for 24 h in FBS-free DMEM in the presence of 10 μ M Cd, 1 nM TCDD, 10 μ M Cd and 1 nM TCDD, 0.4 μ M BaP, 100 nM insulin, with or without 20 μ M U0126. A: Confocal microscopy images: Cell nuclei were stained with blue DAPI and AhR was conjugated to a red fluorochrome (Alexa Fluor 568). B: Analysis of the intensity of fluorescence of the regions of interests (nuclei) relative to control. Data shown are means \pm SD estimated on three to five independent cell cultures.

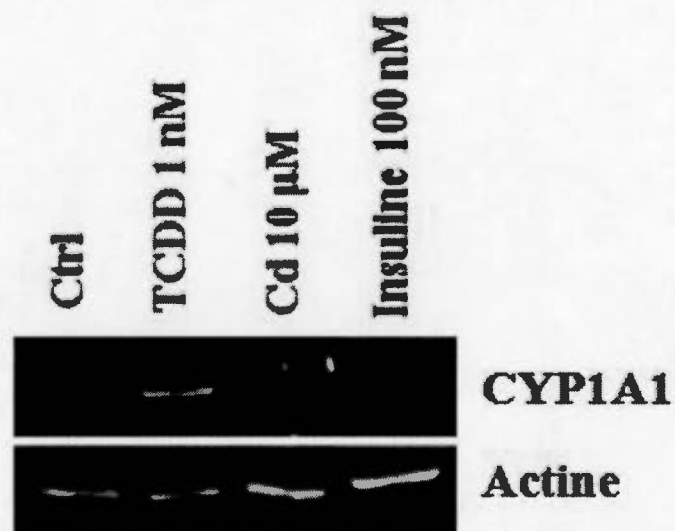


Fig. 3.6: CYP1A1 expression as investigated by Western blot analysis as described in the Materials and Methods Section. Cells were cultured in the presence of FBS for 20 days and were then incubated for 24 h in FBS-free DMEM in the presence of 1nM TCDD, 10 μM Cd, 100 nM insulin.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

La population en général est exposée au Cd, un métal lourd très toxique même à de faibles concentrations, principalement par l'ingestion d'aliments contaminés. Une fois ingéré, le Cd est fortement accumulé dans l'épithélium intestinal, ce qui fait de lui un organe cible. Le Cd interfère avec un certain nombre de voies de signalisation incluant ERK, JNK, et p38-kinase dans différents types cellulaires. Des études ont montré que le Cd peut influencer l'expression ou l'activité des enzymes de détoxification, notamment le CYP450 1A1 qui est le gène cible du récepteur AhR principalement étudié (Elbekai et El-Kadi, 2005). A l'aide du modèle Caco-2, une lignée cellulaire humaine développant spontanément un phénotype entérocytaire une fois la confluence atteinte, nous avons cherché à estimer si le Cd peut interférer avec les voies de signalisation ERK et AhR en favorisant l'activation du récepteur via ERK.

Nos résultats ont montré que le Cd et la TCDD permettent la translocation de AhR dans le noyau dans les cellules Caco-2 différenciées. Cette translocation a été inhibée en présence de l'inhibiteur de ERK1/2 (U0126), mais aucune activation de ERK n'a été observée en présence de TCDD. Donc, l'activation de AhR par la TCDD ne nécessiterait pas de phosphorylation accrue préalable de ERK, mais serait impossible sans un niveau de base de phospho-ERK. Inversement, l'activation de AhR par le Cd pourrait impliquer ERK. Cependant, une activation de ERK ne mène pas nécessairement à une activation de AhR car l'insuline, qui augmente beaucoup les niveaux de phospho-ERK, ne modifie pas la localisation nucléaire de AhR. En fait, l'insuline et par une cascade signalétique impliquant des protéines, des kinases, et des facteurs de transcription, active par une série de réactions de phosphorylation,

la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) activant la protéine kinase B (PKB) impliquée en priorité dans les effets métaboliques. De plus, l'insuline, par une série de réactions de phosphorylation, active la voie des MAP kinases (ERK1 et 2) impliquée en priorité dans la synthèse protéique, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les voies PI3 kinase/PKB et MAP kinase sont interconnectées entre elles et participent à l'activation l'une de l'autre (Capeau, 2003).

De plus, comme la localisation nucléaire de AhR ne révèle pas nécessairement l'activité transcriptionnelle, nous avons étudié les niveaux d'expression du CYP1A1. Les résultats montrent une induction du CYP1A1 par la TCDD et non par le Cd. Cela nous permet de suggérer que le Cd induit la première étape de l'activation de AhR caractérisée par la translocation nucléaire du récepteur sans augmenter son activité transcriptionnelle. Par contre, la TCDD est capable d'induire une translocation nucléaire du récepteur suivie d'une activation de AhR.

Il faut noter que le récepteur AhR retourne au cytosol où il sera dégradé rapidement après avoir agit comme facteur de transcription. Cela défavorise l'hypothèse qui considère qu'une augmentation des niveaux nucléaires de AhR peut être expliquée par une stabilisation des niveaux de AhR dans le noyau et non pas par une translocation nucléaire du récepteur.

Un des résultats obtenus non présenté dans l'article est difficile à expliquer. L'inhibiteur de ERK1/2, U0126, ne semblait pas inhiber l'induction du CYP1A1 par la TCDD, malgré qu'il inhibe la translocation de AhR. Cette observation pourrait être expliquée par une induction du CYP1A1 par la TCDD mais indépendante de AhR, ce qui n'a cependant jamais été rapporté dans la littérature.

Pour aller encore plus loin dans notre recherche, nous allons vérifier l'impact de la protéine kinase C (PKC), située en amont de ERK, sur l'activité de AhR

surtout que des études évoquent le rôle de la PKC dans la phosphorylation de AhR et de son hétérodimère Arnt (Long et *al.*, 1998; Nishiumi et *al.*, 2007). De plus, des études précédentes du laboratoire ont montré que l'induction de l'activité MTT par le Cd, attribuée à une activation de ERK, est abolie en présence d'un inhibiteur de la PKC (Mantha et Jumarie, 2010). La PKC aurait donc un rôle dans l'activation de ERK. Pour tester l'implication de la PKC dans l'activation de AhR, nous allons utiliser le Myr-PKC (inhibiteur de protéines kinases avec une grande spécificité pour PKC sur PKA), le Go⁶⁹⁷⁶ (inhibiteur spécifique de PKC- α et PKC- β 1 Ca-dépendent), et la staurosporine (inhibiteur non spécifique de protéines kinases) pour étudier leur influence sur la translocation nucléaire de AhR et sur l'expression du CYP1A1.

Un problème que nous avons rencontré au cours d'une des différentes manipulations, est la détection de beaucoup de bandes non spécifiques en Western blot par les anticorps anti-AhR et anti-phospho-AhR. Le problème n'a pas été résolu en essayant les anticorps de plusieurs compagnies (CedarLane, Cell Signaling, et Santa Cruz). Nous avons donc décidé d'utiliser l'anticorps anti-AhR (qui détecte les deux formes de AhR) sur des fractions cytoplasmiques et nucléaires. Cette étape avait pour but de confirmer par Western blot les résultats obtenus par microscopie confocale. Malheureusement, les résultats ne sont pas concluants car de très nombreuses bandes non spécifiques très près de la taille prédite ont aussi été obtenues dans la fraction nucléaire, ce qui complique l'analyse des résultats. Cela peut être dû à la lignée cellulaire utilisée (des collègues qui travaillent sur d'autres lignées cellulaires ont obtenu un signal beaucoup plus spécifique). D'autre part, une contamination entre les deux fractions peut biaiser les résultats. Pour mesurer la pureté des fractions nucléaires et cytosoliques, nous allons utiliser des marqueurs nucléaires (nucléoline et NPN) et cytosolique (β -actine). De même, nous allons faire migrer les protéines sur un gel à 15% et le colorer au bleu de coomassie afin

de vérifier la présence des histones H2A et H2B (12 kDa), H3 (14 kDa), et H1 (10 kDa) dans la fraction nucléaire et leur absence de la fraction cytosolique.

Les résultats déjà obtenus font l'objet d'un article scientifique et permettent de conclure que: i) la phosphorylation de ERK n'est pas indispensable à l'activation de AhR et n'aboutit pas nécessairement à l'activation du récepteur; ii) le Cd favorise la translocation nucléaire de AhR sans augmenter son activité transcriptionnelle; iii) l'effet du Cd et de la TCDD sur AhR dépend de la différenciation enterocytaire. Le Cd interfère dans les voies de signalisation ERK et AhR qui ont un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaires.

RÉFÉRENCES

- Akesson A, Lundh T, Vahter M, Bjellerup P, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Strömberg U, Skerfving S. 2005. Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ Health Perspect* 113(11):1627-31.
- Alfvén T, Lars J, Elinder CG. 2002. Cadmium and lead in blood in relation to low bone mineral density and tubular proteinuria. *Environ Health Perspect* 110(7):699-702.
- Aliaga JC, Deschênes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. 1999. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1):G631-41.
- Andrieux L, Langouët S, Fautrel A, Ezan F, Krauser JA, Savouret JF, Guengerich FP, Baffet G, Guillouzo A. 2004. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P4501A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Mol Pharmacol* 65:934-943.
- Aramini JM, Hiraoki T, Ke Y, Nitta K, Vogel HJ. 1995. Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. *J Biochem* 117(3):623-8.
- Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A. 2000. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* 21(11):2097-104.
- Bacsi SG, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. 1995. Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence. *Mol Pharmacol*, 47, 432- 438.
- Bergeron PM, Jumarie C. 2006. Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology* 219(1-3):156-66.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):11-21.

- Bertin G, Averbek D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88(11):1549-59.
- Bhattacharyya MH, Whelton BD, Stern PH, Peterson DP. 1988. Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *PNAS USA* 85(22):8761-5.
- Blais A, Bissonnette P, Berteloot A. 1987. Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *J Membr Biol* 99(2):113-25.
- Bravard A, Vacher M, Gouget B, Coutant A, de Boisferon FH, Marsin S, Chevillard S, Radicella JP. 2006. Redox Regulation of Human OGG1 Activity in Response to Cellular Oxidative Stress. *Mol Cell Biol* 26(20):7430-7436.
- Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2005. Disorders in bone metabolism of female rats chronically exposed to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 202(1):68-83.
- Buchko GW, Hess NJ, Kennedy MA. 2000. Cadmium mutagenicity and human nucleotide excision repair protein XPA: CD, EXAFS and (1)H/(15)N-NMR spectroscopic studies on the zinc(II)- and cadmium(II)-associated minimal DNA-binding domain (M98-F219). *Carcinogenesis* (5):1051-7.
- Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. 1992. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *PNAS USA* 89(17):8185-8189.
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. 1999. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 15;93(12):4406-17.
- Cao XJ, Chen R, Li AP, Zhou JW. 2007. JWA gene is involved in cadmium-induced growth inhibition and apoptosis in HEK-293T cells. *J Toxicol Environ Health A* 70(11):931-7.
- Capeau J. 2003. Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *M/S: médecine sciences* 19(8-9):834-839.

- Carrière V, Chambaz J, Rousset M. 2001. Intestinal responses to xenobiotics. *Toxicol In Vitro* 15(4-5):373-8.
- Carver LA, Bradfield CA. 1997. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272(17):11452-6.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37-40.
- Chao HR, Tsou TC, Chen HT, Chang EE, Tsai FY, Lin DY, Chen FA, Wang YF. 2009. The inhibition effect of 2,3,7,8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin-induced aryl hydrocarbon receptor activation in human hepatoma cells with the treatment of cadmium chloride. *J Hazard Mater* 170(1):351-6.
- Chevallier A, Guyot E, Barouki R, Coumoul X. 2012. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov Today* 18(9-10):479-86.
- Davarinos NA, Pollenz RS. 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 274(40):28708-15.
- Eastwood GL. 1977. Small bowel morphology and epithelial proliferation in intravenously alimented rabbits. *Surgery* 82(5):613-20.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺. *Free Radic Biol Med* 39(11):1499-511.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. 2007. Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicol Lett* 172(3):106-19.
- Elinder CG, Lind B, Kjellström T, Linnman L, Friberg L. 1976. Cadmium in kidney cortex, liver, and pancreas from Swedish autopsies. Estimation of biological half time in kidney cortex, considering calorie intake and smoking habits. *Arch Environ Health* 31(6):292-302.

- Elisma F, Jumarie C. 2001. Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285(3):662-8.
- Faurskov B, Bjerregaard HF. 2002. Evidence for cadmium mobilization of intracellular calcium through a divalent cation receptor in renal distal epithelial A6 cells. *Pflugers Arch* 445(1):40-50.
- Filipic M, Fatur T, Vudrag M. 2006. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum Exp Toxicol* 25(2):67-77.
- Filipic M, Hei TK. 2004. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 546(1-2):81-91.
- Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian G, Chamberlain MJ, Valberg LS. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74(5 Pt 1):841-6.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59(1):221-6.
- Galán A, García-Bermejo ML, Troyano A, Vilaboa NE, De Blas E, Kazanietz MG, Aller P. 2000. Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 275(15):11418-24.
- Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vézina A, Vachon PH. 2001. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(6):C1540-54.
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 213(3):282-90.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388(6641):482-8.

- Hammond D, O'Connor RJ. 2008. Constituents in tobacco and smoke emissions from Canadian cigarettes. *Tob Control* 17 Suppl 1:i24-31.
- Hao C, Hao W, Wei X, Xing L, Jiang J, Shang L. 2009. The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. *Toxicol In Vitro* 23:660-666.
- Harnois C, Demers MJ, Bouchard V, Vallée K, Gagné D, Fujita N, Tsuruo T, Vézina A, Beaulieu JF, Côté A, Vachon PH. 2004. Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol* 198(2):209-22.
- Hartwig A. 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid Redox Signal* (4):625-34.
- Henklova P, Vrzal R, Papouskova B, Bednar P, Jancova P, Anzenbacherova E, Ulrichova J, Maurel P, Pavek P, Dvorak Z. 2008. SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 593(1-3):16-23.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96(3):736-49.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O. 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252(5008):954-8.
- Huang YH, Shih CM, Huang CJ, Lin CM, Chou CM, Tsai ML, Liu TP, Chiu JF, Chen CT. 2006. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem* 98(3):577-89.
- Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 12(3):206-23.

- Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. 1998. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 273(5):2895-904.
- Jiang G, Duan W, Xu L, Song S, Zhu C, Wu L. 2009. Biphasic effect of cadmium on cell proliferation in human embryo lung fibroblast cells and its molecular mechanism. *Toxicol In Vitro* 23(6):973-8.
- Jumarie C, Malo C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 149(1):24-33.
- Jumarie C, Campbell PG, Houde M, DenizEAU F. 1999. Evidence for an intracellular barrier to cadmium transport through Caco-2 cell monolayers. *J Cell Physiol* 180(2):285-97.
- Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. 2000. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 275(52):41317-24.
- Kekatpure VD, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. 2009. HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Biol Chem* 284(12):7436-45.
- Kim JH, Stallcup MR. 2004. Role of the coiled-coil coactivator (CoCoA) in aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* 279(48):49842-8.
- Kiss T, Osipenko ON. 1994. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol Rev* 46(3):245-67.
- Kitamura M, Sumiro K, Kamatanni N. 1970. Cadmium concentrations in livers, kidneys and bones of human bodies. *J Public Health* 17:507.
- Kjellström T. 1992. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Sci Publ* (118):301-10.
- Kopera E, Schwerdtle T, Hartwig A, Bal W. 2004. Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chem Res Toxicol* 17(11):1452-8.

- Låg M, Refsnes M, Lilleaas EM, Holme JA, Becher R, Schwarze PE. 2005. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology* 211(3):253-64.
- Lansman JB, Hess P, Tsien RW. 1986. Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol* 88(3):321-47.
- Leal RB, Posser T, Rigon AP, Oliviera CS, Gonçalves CA, Gelain DP, Dunkley PR. 2007. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 234:34-43.
- Lees MJ, Whitelaw ML. 1999. Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol* 19(8):5811-22.
- Liu Z, Yu X, Shaikh ZA. 2008. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 228:286-294.
- Long WP, Pray-Grant M, Tsai JC, Perdew GH. 1998. Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 53(4):691-700.
- Ma Q, Whitlock JP Jr. 1997. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272(14):8878-84.
- Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brot-Laroche E. 1992. Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am J Physiol* 263(3 Pt 1):G312-8.
- Mantha M, Jumarie C. 2010. Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *J Cell Physiol* 224(1):250-61.
- Meloche S, Pouyssegur J. 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26(22):3227-39.

- Meyer BK, Perdew GH. 1999. Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 38(28):8907-17.
- Misra UK, Gawdi G, Akabani G, Pizzo SV. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 14(4):327-40.
- Mukai R, Shirai Y, Saito N, Fukuda I, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. 2010. Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 501(1):134-41.
- Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA. 2006. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol* 7(2):119-26.
- Nishijo M, Nakagawa H, Morikawa Y, Kuriwaki J, Katsuyuki M, Kido T, Nogawa K. 2004. Mortality in a cadmium polluted area in Japan. *Biometals* 17(5):535-8.
- Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. 2007. Curcumin suppresses the transformation of an aryl hydrocarbon receptor through its phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 466(2):267-73.
- Nogawa K, Kobayashi E, Yamada Y, Honda R, Kido T, Tsuritani I, Ishizaki M. 1984. Parathyroid hormone concentration in the serum of people with cadmium-induced renal damage. *Int Arch Occup Environ Health* 54(3):187-93.
- Nordberg G, Jin T, Bernard A, Fierens S, Buchet JP, Ye T, Kong Q, Wang H. 2002. Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure in China. *Ambio* 31(6):478-81.
- Nordberg G, Gunnarsson D, Selstam G. 2007. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. *Toxicol Lett* 168(1):51-7.
- Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, Antoniou-Lipfert P, Dietrich C, Arand M, Weiss C, Bockamp E, Oesch F. 2005. Aryl hydrocarbon receptor

- activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *PNAS USA* 102(26):9218-23.
- Orlowski C, Piotrowski JK, Subdys JK, Gross A. 1998. Urinary cadmium as indicator of renal cadmium in humans: an autopsy study. *Hum Exp Toxicol* 17(6):302-6.
- Park SL, Kim YM, Ahn JH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS. 2009. Cadmium stimulates the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and JNK activation in cerebrovascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 110(3):405-9.
- Parkes JG, Templeton DM. 1994. Iron transport and subcellular distribution in Hep G2 hepatocarcinoma cells. *Ann Clin Lab Sci* 24(6):509-20.
- Pearson RB, Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS. 2001. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* 21(9):2981-90.
- Petruelis JR, Perdew GH. 2002. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* 141(1-2):25-40.
- Pinto M, Zweibaum A, Triadou N, Kedinger M, Augeron C, Robine-Léon S, Rousset M, Haffen K. 1983. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int J Cancer* 32(4):407-12.
- Poland A, Glover E, Kende AS. 1976. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251(16):4936-46.
- Pollenz RS, Sattler CA, Poland A. 1994. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 45(3):428-38.
- Potts RJ, Bernalov IA, Wallace SS, Melamede RJ, Hart BA. 2001. Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology* 161(1-2):25-38.

- Potts RJ, Watkin RD, Hart BA. 2003. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 184(2-3):189-202.
- Predki PF, Sarkar B. 1994. Metal replacement in "zinc finger" and its effect on DNA binding. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3:195-8.
- Price DJ, Joshi JG. 1983. Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions. *J Biol Chem* 258(18):10873-80.
- Rahola T, Aran RK, Miettinen JK. 1971. Symposium on the Assessment of Radioactive Organ and Body Burdens, Stockholm.
- Rivard N, Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C. 2001. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 276(24):21885-94.
- Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyer-Fessard C, Dussaulx E, Trugnan G, Boige N, Brun JL, Zweibaum A. 1985. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J Cell Physiol* 123(3):377-85.
- Schmidt JV, Bradfield CA. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:55-89.
- Sherlock JC. 1984. Cadmium in foods and the diet. *Experientia* 40(2):152-6.
- Smith MW. 1985. Expression of digestive and absorptive function in differentiating enterocytes. *Annu Rev Physiol* 47:247-60.
- Staessen JA, Buchet JP, Ginucchio G, Lauwerys RR, Lijnen P, Roels H, Fagard R. 1996. Public health implications of environmental exposure to cadmium and lead: an overview of epidemiological studies in Belgium. Working Groups. *J Cardiovasc Risk* 3(1):26-41.
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lönnerdal B. 2000. Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am J Clin Nutr* 72(3):770-5.

- Tan Z, Chang X, Puga A, Xia Y. 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol* 64:771-780.
- Taylor WR. 1988. Permeation of barium and cadmium through slowly inactivating calcium channels in cat sensory neurones. *J Physiol* 407:433-52.
- Thévenod F. 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):221-39.
- Tian JQ, Quaroni A. 1999. Dissociation between growth arrest and differentiation in Caco-2 subclone expressing high levels of sucrase. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1):G1094-104.
- Traber GL, Chen CC, Huang YY, Spoor M, Roos J, Frens MA, Straumann D, Grimm C. 2012. Albino mice as an animal model for infantile nystagmus syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 5737-5747.
- Vachon PH, Beaulieu JF. 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103(2):414-23.
- Vachon PH, Cardin E, Harnois C, Reed JC, Vézina A. 2000. Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int J Dev Biol* 44(8):891-8.
- Vachon PH, Tremblay E, Auclair J, Delvin E, Levy E, Ménard D, Pshezhetsky AV, Rivard N, Seidman EG, Sinnott D, Beaulieu JF. 2006. Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem* 99(4):1175-86.
- Vahter M, Berglund M, Akesson A. 2004. Toxic metals and the menopause. *J Br Menopause Soc* 10(2):60-4.
- Van der Flier LG, Clevers H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71:241-60.

- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192(2-3):95-117.
- Watjen W, Beyersmann D. 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17(1):65-78.
- Weiss C, Faust D, Dürk H, Kolluri SK, Pelzer A, Schneider S, Dietrich C, Oesch F, Göttlicher M. 2005. TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway. *Oncogene* 24(31):4975-83.
- Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, Karin M, Wang JY, Puri PL. 2000. p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol* 20(11):3951-64.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240):1326-31.
- Xing X, Bi H, Chang AK, Zang MX, Wang M, Ao X, Li S, Pan H, Guo Q, Wu H. 2012. SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination. *J Cell Physiol*, 227, 3812-3819.
- Yim S, Myoungsuk O, Choi SM, Park H. 2004. Inhibition of the MEK-1/p42 MAP kinase reduces aryl hydrocarbon receptor-DNA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 322:9-16.
- Zalups RK, Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 186(3):163-88.
- Zhou T, Jia X, Chapin RE, Maronpot RR, Harris MW, Liu J, Waalkes MP, Eddy EM. 2004. Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. *Toxicol Lett* 154(3):191-200.
- Zweibaum A. 1993. Differentiation of human colon cancer cells: a new approach to colon cancer. *Bull Acad Natl Med* 177(1):63-71; discussion 71-3.