

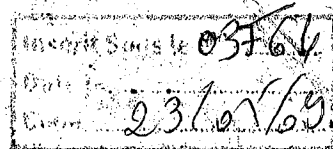
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen

Faculté des Sciences

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Thèse



En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée par

Saïd NEMMICHE

Doc: 62/09

Stress oxydant et mécanismes de défense induits par l'exposition au plomb et au cadmium. Etudes chez le rat Wistar et sur modèles cellulaires.

Date de soutenance : 05 avril 2009

Devant le jury composé de:

Pr. Hafida MERZOUK	Présidente	Université de Tlemcen
Pr. Daoudi CHABANE SARI	Directeur de thèse	Université de Tlemcen
Pr. Pascale GUIRAUD	Co-promoteur	Univ. Joseph Fourier– Grenoble1
Pr. Jacques BOHATIER	Examinateur	Université d'Auvergne Clermont 1
Pr. Ahcene BOUMENDJEL	Examinateur	Univ. Joseph Fourier–Grenoble1
Dr. Yahia HAREK	Examinateur	Université de Tlemcen

Remerciements

Il m'est très agréable de pouvoir enfin exprimer à Mme Pascale GUIRAUD et Mr Daoudi CHABANE SARI, qui ont assuré la direction de ce travail, mes plus vifs remerciements. Je leur témoigne mon entière gratitude pour leurs disponibilités et leur gentillesse. J'ai été sensiblement marqué par leurs qualités humaines.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Jacques BOHATIER, professeur à l'Université d'Auvergne Clermont 1, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Hafida MERZOUK, professeur à l'Université de Tlemcen, qui a bien voulu rapporté ce travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance à Mrs Ahcene BOUMENDJEL et Yahia HAREK qui ont bien voulu juger ce travail de thèse en qualité d'examineur.

J'adresse également un grand merci à Mme Régine STEIMAN et Malika KADRI pour leur aide efficace et désintéressée.

Tout ce parcours n'aurait, bien sûr, pas été possible sans la bienveillance de mes proches. Une pensée particulière va à mon épouse et mes enfants pour le courage et la patience qu'ils ont manifesté tout le long de ma thèse.

Et je ne saurais clore ces remerciements sans mentionner l'aide et le soutien inestimable des mes beaux parents.

A toutes les personnes dont les noms ne sont pas cités mais qui se reconnaîtront, je leur adresse un hommage particulier pour tous les encouragements qu'ils n'ont eu cesse de me prodiguer.

Sommaire

Introduction

Partie I : Analyse bibliographique

Chapitre 1: Généralités sur le stress oxydant cellulaire

I. Systèmes oxydants et systèmes antioxydants	14
I.1. Radicaux libres en biologie.....	14
I.1.1. Définition.....	14
I.1.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	14
I.1.2.1 Sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène.....	16
I.1.2.1.1 NAD (P)H oxydase.....	16
I.1.2.1.2 Xanthine oxydase.....	17
I.1.2.1.3 Lipo-oxygénases et cyclo-oxygénases.....	17
I.1.2.1.4 Enzymes des organites cellulaires.....	17
I.1.2.2 Sources Exogènes des espèces réactives de l'oxygène.....	19
I.2. Systèmes de défenses antioxydants	19
I.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	19
I.2.1.1 Superoxydes dismutases (SOD).....	19
I.2.1.2 Catalase (CAT).....	20
I.2.1.3 Glutathion peroxydase (GPx) et reductase.....	20
I.2.1.4 Système thiorédoxine (Trx) et glutarédoxine (Grx).....	21
I.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	22
I.2.2.1 Glutathion réduit.....	23
I.2.2.2 Vitamine C.....	25
I.2.2.3 Vitamine E	25
I.3 Les principaux rôles physiologiques des radicaux libres	26
II. Le stress oxydant	26
II.1. Définition du stress oxydant	26
II.2. Dommages oxydatifs cellulaires et marqueurs biologiques du stress oxydant.....	27
II.2.1 Peroxydation lipidique.....	27
II.2.2 Oxydation des protéines.....	30
II.2.3 Dommages oxydatifs de l'ADN.....	32
III. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes.....	34
III.1. Mécanismes d'action moléculaire des espèces réactives de l'oxygène.....	34
III.2. Régulation des facteurs de transcription.....	36
III.3. Facteurs de transcription liés aux stress.....	37
III.3.1. NF- κ B.....	37
III.3.2. AP-1.....	38

III.3.3. Nrf2.....	39
--------------------	----

Chapitre 2: Environnement redox cellulaire

II.1. Notion de potentiel d'oxydoréduction.....	40
II.2. Le glutathion et le statut redox intracellulaire.....	40
II.3. La glutathionylation et l'équilibre thiol/disulfure.....	43
II.4. Protéines régulées par S-glutathionylation.....	46
II.4.1. Enzymes avec sites thiols actifs.....	46
II.4.2. Protéines de signalisation.....	46
II.4.3. Facteurs de transcription.....	47
II.4.4. Protéines Ras.....	48
II.4.5. Les protéines de choc thermique (HSP- <i>Heat Shock Proteins</i>).....	48
II.4.6. Protéines Mitochondriales.....	49
II.5. Comparaison entre signalisation phosphorylative et signalisation redox	50

Chapitre 3: Revue bibliographique sur le cadmium

I. Effets physiopathologiques liés à l'exposition au cadmium.....	52
I.1 Présentation du cadmium.....	52
I.2. Principales sources d'exposition.....	53
I.3 Effets physiopathologiques.....	53
1.3.1 Effets cancérigènes.....	53
1.3.2 Effets sur le système rénal	53
1.3.3 Effets sur le système nerveux.....	53
1.3.4 Effets sur l'os	54
1.3.5 Effets sur le système de reproduction	54
II. Systèmes d'entrée-sortie cellulaires du cadmium.....	55
2.1 <i>Divalent Metal Transporter 1</i>	55
2.2 Les transporteurs du zinc.....	55
2.3 Les canaux calciques.....	57
2.4 Les pompes d'efflux.....	58
2.5 Les transporteurs de manganèse.....	58
III. Mécanismes moléculaires de toxicité du cadmium.....	59
3.1 Interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels.....	59
3.2 Production d'espèces réactives de l'oxygène.....	59
3.3 Effet du cadmium sur les gènes de réparation de l'ADN.....	59
3.4 Effets du cadmium sur la régulation des gènes.....	61
3.5 Effets du cadmium sur la signalisation cellulaire.....	67

Chapitre 4: Revue bibliographique sur le Plomb

I. Effets physiopathologiques liés à l'exposition au plomb.....	70
I.1 Présentation du plomb.....	70

I.2. Principales sources d'exposition.....	70
I.3. Effets physiopathologiques du plomb.....	71
1.3.1 Effets sur le système nerveux.....	71
1.3.1.1 Effets sur le système nerveux central.....	71
1.3.1.2 Effets sur le système nerveux périphérique.....	73
1.3.2 Effets hématologiques.....	74
1.3.3 Effets rénaux.....	75
1.3.4 Effets sur le système cardio-vasculaire.....	76
II. Systèmes d'entrée-sortie cellulaires du Plomb.....	76
III. Mécanismes de neurotoxicité moléculaire du plomb.....	76
3.1 Interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels.....	76
3.2 Récepteurs glutamatergiques NMDA.....	77
3.3 Protéine kinase A.....	77
3.4 Voie de signalisation MAPK (<i>Mitogen activated protein kinase</i>).....	78
3.5 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II.....	78
3.6 Cyclic-AMP response element binding protein (CREB).....	79
3.7 Protéine kinase C.....	79
Objectifs de la thèse	81

Partie II : Matériel et méthodes

1. Animaux et lignées cellulaires

1.1 Animaux.....	82
1.1.1. Traitement et conditions d'élevage.....	82
1.1.2. Sacrifice et préparation des échantillons.....	82
1.2 Lignées cellulaires	82
1.2.1. Caractéristiques des lignées cellulaires	82
1.2.2. Test de la viabilité cellulaire	84

2. Méthodes d'analyse

2.1. Analyse biochimique	84
2.1.1. Paramètres du stress oxydant.....	84
2.1.1.1. Mesure des malondialdéhydes.....	84
2.1.1.2. Mesure des carbonyles.....	84
2.1.1.3. Dosage du glutathion.....	84
2.1.1.4. Mesure des cassures de l'ADN par la méthode des COMET	84
2.1.1.5. Mesure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine	85
2.1.1.6. Dosage des thiols.....	86
2.1.2. Enzymes antioxydantes.....	87
2.1.2.1. Catalase (CAT)	87
2.1.2.2. Superoxyde dismutase (SOD).....	87
2.1.2.3. Glutathion peroxydase (GPx).....	88
2.1.2.4. Glutathion réductase (GR).....	88
2.1.2.5. Thiorédoxine reductase (Thr).....	88
2.2. Mesure de l'activité Caspase-3	88

2.3. Mesure de l'apoptose (méthode ELISA).....	89
2.4. Dosage des ROS intracellulaire (marquage des radicaux libres par des sondes fluorescentes).....	90
2.5. Dosage des oligoéléments intracellulaires par ICP-MS.....	91
2.6. Analyse des protéines par Western blot	93
2.6.1 Préparation d'échantillons	93
2.6.2 Mise en évidence des métallothioneines.....	93
2.6.3 L'hème oxygénase.....	94
2.7. qRT-PCR.....	94
2.7.1 Extraction des ARN totaux.....	95
2.7.2 Dosage et contrôle qualité des extractions des ARN totaux.....	95
2.7.3 Transcription Reverse : Préparation de l'ADNc par la reverse transcriptase.....	96
2.7.4 qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).....	96
2.7.4.1 Design des amorces.....	97
2.7.4.2 Primers utilisés	97
2.7.4.3 Conditions	99
2.8 Etude histologique.....	100
2.8.1 Etape de confection des coupes	100
2.8.1.1 Prélèvements.....	100
2.8.1.2 Fixation	100
2.8.1.3 L'inclusion.....	101
2.8.1.4 Exécution des coupes	102
2.8.1.5 Collage des coupes.....	102
2.8.2 Coloration par la méthode Hémalun – Eosine.....	102
2.8.2.1 Réactifs.....	102
2.8.2.2 Mode opératoire.....	102

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre 1 : Etude des effets du plomb et du cadmium sur le statut antioxydant des rats Wistar.

1. Présentation de l'article 1.....104
2. *Article 1: Antioxidant status and oxidative damage in the liver, brain and kidney of Wistar rats co-exposed to lead and cadmium.....*105
3. Résultats complémentaires

Chapitre 2: Etude de l'effet du cadmium sur le statut antioxydant et l'homéostasie des métaux essentiels des cellules Jurkat.

1. Présentation de l'article 2.....124
2. *Article 2: Cadmium chloride induced oxidative DNA damage in a human Jurkat T cell line.....*125
3. Résultats complémentaires sur les voies d'Entrée du Cd: Znt, Zip & DMT.....146

Chapitre 3: Mécanismes de défenses induits par le cadmium

1. Présentation de l'article 3.....149
2. Rappels bibliographiques sur l'hème oxygénase.....149
3. *Article 3: Cadmium-induced apoptosis in the BJAB human B cell line: Role of heme oxygenase-1*.....151
4. Résultats complémentaires
 - 4.1 Effet du cadmium sur l'ADN.....167
 - 4.2 Induction des MTF-1 et expression des métallothionéines.....168

Chapitre 4 : Rôle du α -tocophérol vis-à-vis du stress oxydant induit par le cadmium

1. Présentation de l'article 4.....170
 2. Rappels bibliographiques.....171
 - 2.1 La thérapie par chélation pour la détoxification des métaux.....171
 - 2.2 La vitamine E.....172
 - 2.2.1 La structure moléculaire de la vitamine E172
 - 2.2.2 Mode d'action de la vitamine E173
 3. *Article 4: Role of α -tocopherol in cadmium - induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain*.....174
- Discussion générale.....192
- Conclusions et perspectives.....196
- Références bibliographiques.....199
- Annexe.....219

Liste des abréviations

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

Plomb : Pb

Cadmium : Cd

CAT: Catalase

SOD: Superoxyde dismutase

GSH: Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly)

GPx: Glutathion peroxydase

GRase: Glutathion réductase

MDA: Malondialdehyde

HO: Hème oxygénase

HSE: Heat Shock Element

HSF: Heat Shock Factor

Hsp: Heat Shock Proteins

ARE: Antioxidant Responsive Element

ZIP: Zrt/Irt-like Proteins

DMT1: Divalent Metal Transporter 1

MTF-1: Metal-responsive element-binding transcription factor-1

MRE: Metal Responsive Element

ERK1/2: Extracellular-regulated protein kinases 1 and 2

JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MK2: MAP kinase activated kinase 2

NF κ B: Nuclear factor kappa B

I κ B: Inhibitory kappa B

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Sources des espèces oxygénées réactives et systèmes de défense antioxydants	15
Figure 2 : Représentation schématique de la chaîne de transport électronique mitochondriale	18
Figure 3 : Résumé de l'activation du glutarédoxine 2 (Grx2) et de ses effets <i>in vivo</i>	22
Figure 4. Les voies de formation des ROS, le processus de peroxydation lipidique, rôle du glutathion (GSH) et d'autres antioxydants (Vitamine E, Vitamine C, acide lipoïque) dans le management du stress oxydant.	24
Figure 5 : Rôle du glutathion (GSH) dans l'oxydation des groupements sulfhydriles protéiques.	25
Figure 6 : Balance oxydants-antioxydants intracellulaire	27
Figure 7: Les différentes voies de la peroxydation lipidique	29
Figure 8 : Processus de la peroxydation lipidique	30
Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	31
Figure 10: Produits oxydés des résidus amino-acides	31
Figure 11: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.	32
Figure 12: Principales lésions oxydatives de l'ADN	33
Figure 13: Modification redox de la cystéine	35
Figure 14: Anion superoxyde / H ₂ O ₂ : régulation redox de l'expression des gènes et métabolisme cellulaire	35
Figure 15: Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) et ions métalliques inducteurs des voies de signalisation	36
Figure 16: Subdivision nucléaire et cytoplasmique des processus redox dans la régulation des facteurs de transcription	37
Figure 17: Contrôle redox du facteur de transcription humain, NF- κ B	38
Figure 18: L'activation redox du Nrf2 aboutit à l'induction des gènes antioxydants et de détoxification	39
Figure 19: Le destin cellulaire en fonction du potentiel du glutathion	40
Figure 20 : Cycle redox du glutathion	41
Figure 21: Le niveau régulier des potentiels redox du GSH/GSSG, Trx(SH) ₂ /Trx(SS), et cystéine/cystine dans le cytoplasme, la mitochondrie, le noyau, l'espace extracellulaire et le réticulum endoplasmique	43

Figure 22: Effet des ERO sur l'état redox des cystéines.	44
Figure 23: Rôle de la S-glutathionylation dans la signalisation redox et les réponses au stress oxydant	44
Figure 24: Mécanisme catalytique de la déglutathionylation (ou déthiolation).	45
Figure 25: (A) la voie de signalisation NF- κ B, (B) rôle critique des cystéines dans la transduction de signal	47
Figure 26: Représentation schématique des mécanismes de transport de cadmium au niveau des entérocytes et des hépatocytes	56
Figure 27: Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium	60
Figure 28: Cycle redox des métallothionéines	62
Figure 29: Structure tridimensionnelle de métallothionéine hépatique de lapin (Cd7-MT-IIA).	63
Figure 30: Représentation schématique du gène MTF-1	63
Figure 31: Le hMTF-1 et les voies d'activation en aval du MTF-1	64
Figure 32 : Métabolisme du glutathion	64
Figure 33 : Mécanisme d'activation des HSP 70	67
Figure 34: Les voies de signalisation MAPK induites par les espèces réactives de l'oxygène réactives	68
Figure 35: Les voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'ARE (<i>antioxidant-response element</i>) via l'activation du Nrf2 (<i>Nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2</i>)	69
Figure 36: Rôle des propriétés physico-chimiques du plomb dans sa biodisponibilité	71
Figure 37 : Inhibition de δ -aminolevulinate deshydratase (δ -ALAD) par le plomb	74
Figure 38: Impact multi organe de la réduction du pool de l'hème corporel par le plomb	75
Figure 39: catabolisme de l'hème	145
Figure 40: Structure chimique de quelques agents chélateurs des métaux	167
Figure 41 : Structure chimique de la vitamine E	168
Figure 42: Niveau d'action antioxydant de la vitamine E	168

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Fonctions physiologiques importantes impliquant les radicaux libres ou leurs dérivés	26
Tableau 2 : Principaux marqueurs biologiques du stress oxydant	28
Tableau 3. Principales protéines chaperons impliquées dans la réponse cellulaire au choc thermique.	49
Tableau 4. Similarités entre signalisations redox et phosphorylative	50
Tableau 5. Différence entre signalisation redox et phosphorylative.	51
Tableau 6 : Effets du cadmium sur les systèmes de réparation de l'ADN	61
Tableau 7: Concentrations de la plombémie et du plomb des os correspondants aux effets délétères sur la santé.	73
Tableau 8: Actions du plomb sur l'homéostasie calcique et les processus cellulaires et moléculaires médiés par le calcium	77
Tableau 9: Résumé des différentes fonctions des isoformes de l'hème oxygénase et de leur distribution tissulaire	146
Tableau 10 : Combinaison des antioxydants avec des agents chélateurs du plomb	165

Introduction

Introduction

La recherche Environnement-Santé est focalisée vers la découverte des voies pour réduire la morbidité et la mortalité qui résulte de l'exposition aux substances hasardeuses. Pour se prévenir des maladies, l'exposition humaine aux substances hasardeuses doit être minimisée, celle-ci est une tâche difficile car un peuple au cours de sa vie journalière est exposé aux contacts multiples et variés, de manière directe ou indirecte, à des agents exogènes d'origines diverses. Les micropolluants présents dans l'environnement ont des origines très variées. Leur devenir environnemental ainsi que leur impact potentiel sur les différents écosystèmes sont très dépendants de leurs interactions avec le milieu environnant. Les activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier constituent les principales sources de rejet atmosphérique. L'utilisation des produits phytosanitaires est à l'origine d'un problème majeur à l'interface de l'agriculture (amélioration de la productivité) et de la préservation des ressources en eau.

La toxicité environnementale au plomb est un problème de santé publique persistant à travers le monde et les enfants sont les plus sensibles au plomb (effets sur le développement intellectuel) que les adultes. Les problèmes très étendus avec le plomb, de quelques manières reviennent à l'histoire plus moderne, de son emploi dans les peintures, les essences, etc., qui ont pour résultat une incorporation omniprésente de cet élément toxique dans les poussières, les sols, la nourriture, et l'eau, induisant une exposition répandue de la population générale.

Le cadmium est un métal toxique disséminé par l'homme dans l'environnement au cours ces dernières décennies. Malgré une recherche active sur son mode d'action et ses cibles de toxicité, ceux-ci restent encore mal compris.

Le comportement d'une cellule est en permanence contrôlé par les informations qu'elle échange avec son environnement. Les variations dans la nature et la concentration des signaux qu'elle reçoit permettent une régulation fine de l'activité cellulaire. Lorsque ces signaux sortent des limites physiologiques, la cellule doit gérer un déséquilibre de régulation appelé stress cellulaire. La réponse à ce stress est un mécanisme protecteur nécessaire à une défense optimale de la cellule. Le programme de défense aboutit soit à une réponse positive de la cellule qui contrecarre l'attaque environnementale, soit, en cas d'échec, à l'apoptose pour protéger les cellules environnantes. Le déséquilibre entre les systèmes de défense et de production de radicaux entraîne des dysfonctionnements des macromolécules et des cellules. Il constitue, de ce fait, le stress oxydant. Chez l'homme, ces dysfonctionnements sont à

l'origine de très nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives et/ou certains cancers. En réponse à un stress, l'activation des systèmes de détoxification est liée à l'action des enzymes du métabolisme antioxydant d'une part, et à la régulation redox différentielle des facteurs de transcription d'autre part. Ce mécanisme semble être impliqué dans les processus d'adaptation et de résistance au stress oxydant.

Le but général du travail présenté est d'essayer de progresser dans la compréhension des mécanismes par lesquels le plomb et le cadmium induisent des effets délétères et de ceux qui peuvent préserver les cellules animales de cette toxicité.

Analyse Bibliographique

Chapitre 1: Généralités sur le stress oxydant cellulaire

I. Systèmes oxydants et systèmes antioxydants

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques tels que signalisation cellulaire, défense immunitaire, et cycle cellulaire. Ces espèces (NO^\bullet , H_2O_2 , $^\bullet\text{OH}$, peroxy-nitrite) présentent une extrême réactivité chimique vis à vis de l'ensemble des biomolécules (ADN, protéines, lipides, composés redox). Leur surproduction, généralement liée à un déséquilibre de la balance redox, est la source d'un **Stress Oxydant** cellulaire associé au développement de nombreux processus physiopathologiques tels que cancers, maladies neurodégénératives ou cardio-vasculaires. Cette double activité des ERO et ERN (bénéfique et toxique) nécessite un contrôle subtil et très précis de leur production, de leur diffusion et de leur concentration locale. L'homéostasie redox est donc très finement régulée.

I.1. Radicaux libres en biologie

I.1.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante. La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques; leurs constantes de vitesse réactionnelles, variables selon leurs natures, sont très élevées et peuvent aller de 10^5 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

II. 1. 2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Parmi les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer celles dites "primaires", qui jouent un rôle particulier en physiologie, et de celles dites "secondaires" qui dérivent des premières par réaction avec des composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle $^\bullet\text{OH}$. D'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet (O_2^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le

nitroperoxyde (ONOOH) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Figure 1).

Le peroxyde d'hydrogène, qui n'est pas un radical libre mais une molécule avec tous ses électrons appariés, présente une toxicité par l'intermédiaire des réactions de type Fenton auxquelles il peut participer sous l'influence de cations métalliques comme Fe^{2+} ou Cu^+ (Valko *et al.*, 2006) donc l'état redox de la cellule est largement lié au couple redox fer ou cuivre, maintenu dans des limites physiologiques strictes.

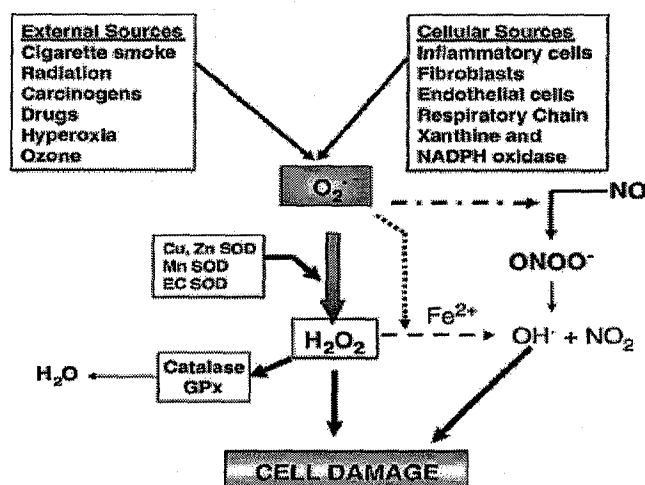
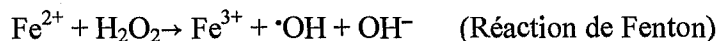


Figure 1 : Sources des espèces oxygénées réactives et systèmes de défense antioxydants (Rahman *et al.*, 2006)

Sous des conditions de stress, l'anion superoxyde facilite et participe à la production des radicaux hydroxyles à partir du H_2O_2 , selon les réactions suivantes :



Le radical hydroxyle ($\cdot OH$) généré par les réactions de Fenton et de Haber Weiss est très réactif (demi-vie très court de l'ordre de 10^{-9} s) (Valko *et al.*, 2007) alors que le peroxyde d'hydrogène est plus stable que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (demi-vie 1ms versus 1 μ s) (Reth, 2002). La réaction de H_2O_2 avec les thiols de faibles poids moléculaires incluant le glutathion (GSH) semble être moins lente (approximativement $20 M^{-1}s^{-1}$), alors que la réaction des thiols avec $O_2^{\cdot-}$ est rapide (estimée à plus de $1000 M^{-1}s^{-1}$) (Jacob *et al.*, 2006).

Les espèces réactives de l'azote issues du métabolisme de l'azote (via les NO synthases) sont représentées principalement par l'oxyde nitrique (NO[•]) qui est un radical, les oxydes de l'azote, comme l'anhydride nitreux N₂O₃ et l'ion peroxydite (ONOO⁻).

NO[•] provient notamment de la réaction catalysée par la NO synthase mitochondriale entre l'atome d'azote appartenant à la L-Arginine et une molécule d'oxygène.

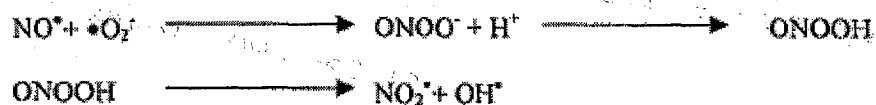


NO[•] est peu réactif et il est diffusible dans les milieux biologiques. Sa durée de vie est de l'ordre de quelques secondes en système aérobie et de plus de 15 secondes lorsqu'il se trouve dans un milieu pauvre en O₂. Il est oxydable en ion nitrosonium NO⁺ et peut être réduit en ion nitroxyle NO⁻.

De plus, NO[•] peut être produit par la NO synthase endothéliale et possède dans ce cas des capacités vasodilatatrices au niveau cardiovasculaire. NO[•] a de nombreux autres rôles, notamment dans la signalisation intra et intercellulaire ou dans l'apoptose, dans les mécanismes de défense et dans la relaxation des cellules musculaires lisses. Cependant, le NO[•] n'est pas dénué de toxicité car il est capable de générer des ions nitrites (NO₂⁻) ou de fixer un groupement nitroxyle sur les acides aminés, comme la tyrosine, pour générer la nitrotyrosine. Lorsque l'on se trouve en présence d'un excès de NO[•], on parle souvent de «*stress nitrant* ». La réaction de NO[•] avec l'O₂⁻ entraîne la formation de l'ion peroxydite (ONOO⁻) selon la réaction suivante :



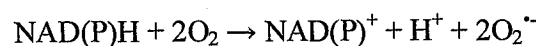
L'ion ONOO⁻ est considéré comme une espèce réactive de l'azote mais aussi de l'oxygène. Sa protonation en acide peroxydite (ONOOH) donne une espèce très oxydante.



1.1.2.1 Sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène

1.1.2.1.1 NAD(P)H oxydase

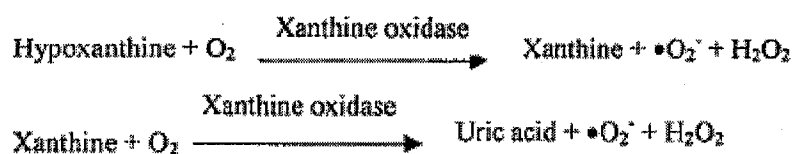
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH ou le NAD comme donneur d'électrons :



La NAD(P)H oxydase est un complexe multimérique, de structure similaire mais non identique dans les cellules phagocytaires où elle a été initialement étudiée d'une part, et dans les cellules non phagocytaires d'autre part. Elle est présente de façon constitutionnelle dans toutes les cellules, sous une forme inactive dans les phagocytes quiescents, et sous forme active dans les autres types cellulaires puisqu'une activité basale peut être retrouvée dans ces cellules (Beaudeau et Vasson, 2005).

1.1.2.1.2 Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une molybdo-enzyme catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines.



Cette enzyme est ubiquitaire, et les concentrations les plus élevées ont été retrouvées aux niveaux hépatique et intestinal. La localisation cellulaire est principalement cytoplasmique.

1.1.2.1.3 Lipo-oxygénases et cyclo-oxygénases

L'action de la phospholipase A₂ sur les phospholipides membranaires libère l'acide arachidonique, dont la destinée est double : permettre la synthèse des leucotriènes d'une part, et des prostaglandines et thromboxanes d'autre part. Ces deux voies sont régulées par l'action catalytique des lipo-oxygénases et des cyclo-oxygénases, respectivement.

1.1.2.1.4 Enzymes des organites cellulaires

- Mitochondrie :

La chaîne de transport des électrons est composée de nombreuses espèces moléculaires ou ioniques (des flavoprotéines, le coenzyme Q ou ubiquinone, les cytochromes, plusieurs protéines à centre fer-soufre, et une protéine à cuivre), regroupés sous la forme de quatre complexes distincts. La fuite des électrons dans cette chaîne de transport peut intervenir aux niveaux des complexes I et III, elle représente 1 à 3% de la production électronique (Figure 2).

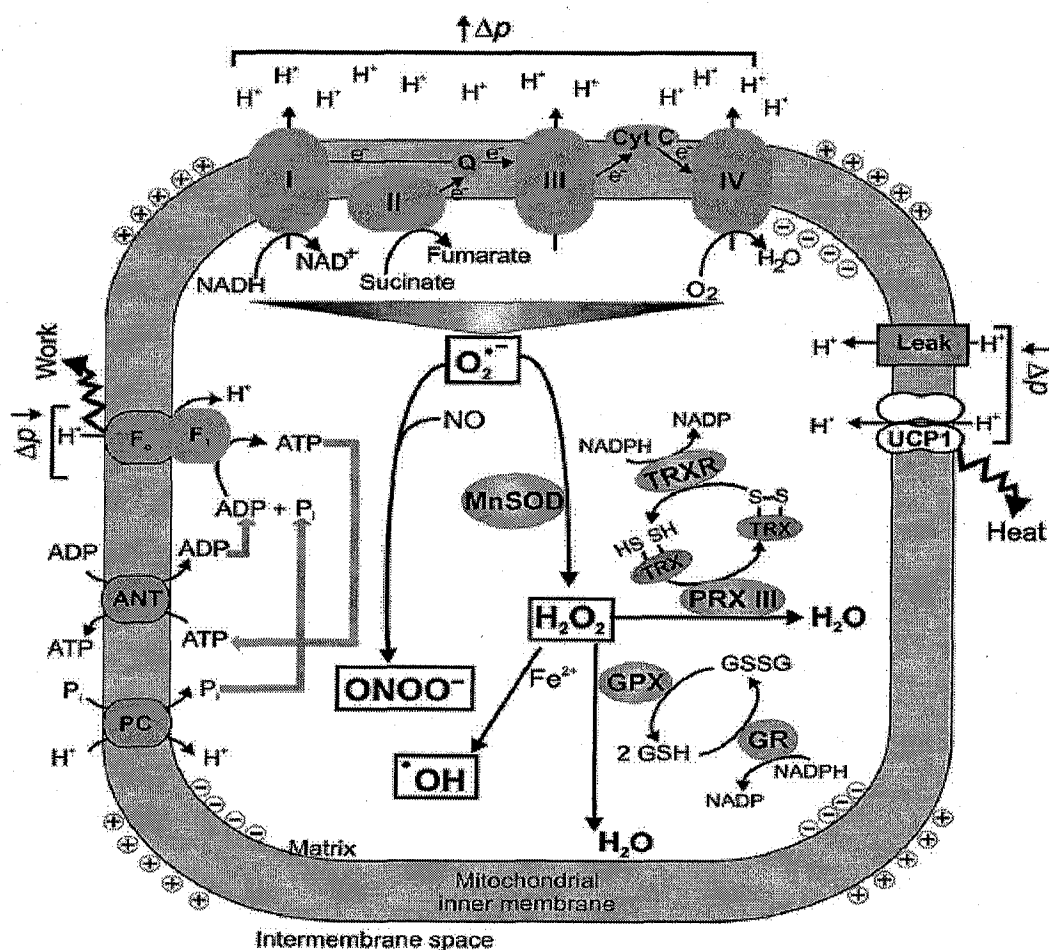


Figure 2 : Représentation schématique de la chaîne de transport électronique mitochondriale (Echtay, 2007)

- Lysosomes :

La myéloperoxydase (MPO) lysosomale est l'enzyme responsable de la formation de l'acide hypochloreux (HOCl). Cette enzyme peut catalyser l'oxydation de l'ion nitrite NO_2^- , formant ainsi des espèces réactives de l'azote. L'intérêt actuel pour la MPO au cours du stress oxydant résulte de sa fonction primaire de transformation du peroxyde d'hydrogène en d'autres espèces hautement réactives de l'oxygène, qui pourrait en faire un possible marqueur du stress oxydant (Beaudeux et Vasson, 2005).

- Réticulum endoplasmique lisse

Dans ce compartiment cellulaire, les ERO produits par les enzymes tels que les cytochromes P_{450} , qui assurent l'oxydation des acides gras insaturés et de certains xénobiotiques, et réduisent l'oxygène moléculaire pour former $\text{O}_2^{\cdot-}$ et/ou H_2O_2 , semblent intervenir dans la régulation redox de certaines fonctions essentielles du réticulum endoplasmique telles que l'adressage et la sécrétion des protéines.

1.1.2.2 Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène

De part notre environnement nous sommes exposés quotidiennement, directement ou indirectement à des agents exogènes d'origines diverses. Ces agents (physiques ou chimiques), regroupés sous le terme de xénobiotiques, comprennent par exemple la fumée de tabac, des médicaments, des polluants de l'environnement (pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux lourds), et des radiations (rayonnements radioactifs ou ultraviolets).

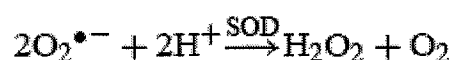
1.2. Systèmes de défenses antioxydants

Pour lutter contre les effets néfastes du stress oxydant, les cellules sont équipées de divers systèmes antioxydants. Des enzymes et des réducteurs recyclables coopèrent pour prévenir la formation des radicaux (R•). Par ailleurs, afin d'éviter la réaction de Fenton, les ions du fer et du cuivre sont séquestrés et les structures héminiques libres sont dégradées. De même, les quinones (potentiellement génératrices de radicaux), sont désactivées par la quinone réductase. Enfin, une chaîne de réactions chimiques, chargée de piéger les radicaux libres, fait intervenir les vitamines C et E, cette dernière étant régénérée par le NADP+, un constituant cellulaire important.

1.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

1.2.1.1 Superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases (EC 1.15.1.1) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène.



Il existe plusieurs isoformes qui se différencient selon leur cofacteur métallique, leur séquence d'acides aminés, le nombre des sous unités et leur localisation chromosomique et cellulaire. Chez l'humain, on distingue trois formes de SOD : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire également à cuivre et zinc (ecSOD ou SOD3).

La SOD à cuivre et à zinc est un homodimère de 32kDa, par contre la MnSOD est un homo tétramère de 96 kDa (Valko et al., 2006). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant,

la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (Huang et *al.*, 2001). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (Sentman et *al.*, 2006).

1.2.1.2 Catalase (CAT)

La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et les érythrocytes.



La catalase humaine est formée de quatre sous unités, chaque sous unité comporte un groupement ferri-protoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe³⁺.

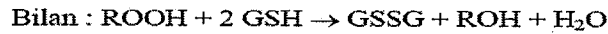
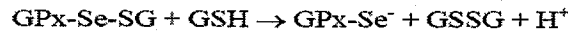
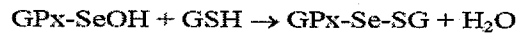
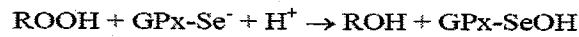
✕ Cette enzyme à une vitesse de turnover élevée par rapport à toutes les autres enzymes, une molécule de catalase peut convertir chaque minute environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Valko et *al.*, 2006).

1.2.1.3 Glutathion peroxydases (GPx) et reductase (GR)

Les glutathion peroxydases (GPx, EC 1.11.1.9) constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases) (Thérond et Denis, 2005).



Toutes les glutathion peroxydases contiennent dans leurs sous unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme. On distingue 5 isoenzymes de la GPx chez les eucaryotes : la ✕ GPx1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmatique, la GPx4 ou Phospholipid Hydroperoxide GPx (PH-GPx) localisée à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme et la GPx5 épидidymaire. La plus abondante est la GPx1 et elle est exprimée dans la plupart des cellules (Thérond et Bonnefont-Rousselot, 2005). Elles fonctionnent toutes selon le mécanisme catalytique suivant :

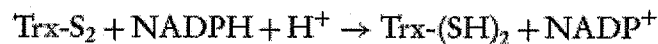


La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction.



1.2.1.4 Système thiorédoxine (Trx) et glutarédoxine (Grx)

Les protéines dans le milieu extracellulaire ou à la surface des membranes sont riches en ponts disulfures traduisant des conditions oxydantes. En revanche, le milieu intracellulaire est plutôt réducteur. L'antioxydant intracellulaire majeur ubiquitaire responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine (Trx-(SH)₂) qui est réduite à son tour par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) selon le schéma ci-dessous :



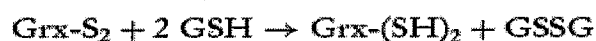
Chez les mammifères, trois isoenzymes ont été décrites : TrxR1 cytosolique, TrxR2 mitochondriale et une forme spécifique aux testicules TGR (Trx GSH reductase) (Holmgren et al., 2005). Le niveau de la thiorédoxine est 100 à 1000 fois plus bas que celui du GSH (Valko et al., 2006). Elle régule l'activité des facteurs de transcription.

Les glutarédoxines sont de petites protéines capables, à l'instar des thiorédoxines, d'activité thiol-transférase. A la différence des thiorédoxines, elles utilisent le pouvoir réducteur du NADPH via le glutathion et la glutathion réductase pour catalyser la réduction de ponts disulfures ou de disulfures mixtes protéine-glutathion.

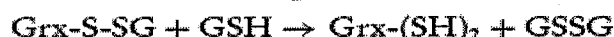
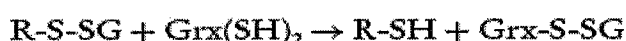
Les glutarédoxines (Grx) se répartissent en deux grandes familles, selon la composition de leur centre rédox actif : les glutarédoxines à dithiol (possédant un site actif de type

CysXXCys) et les glutarédoxines à monothiol (avec un site actif de type CysXXSer). Ainsi, le système glutarédoxine catalyse la réduction de protéines oxydées par deux mécanismes :

Dithiol mechanism:



Monothiol mechanism:



Les cellules de mammifères contiennent deux Grx : une glutarédoxine cytosolique (Grx1) qui participe à des processus cellulaires multiples, et une Grx2 récemment identifiée dans le noyau et la mitochondrie (Holmgren et al., 2005) dont l'activité est résumée ci-dessous :

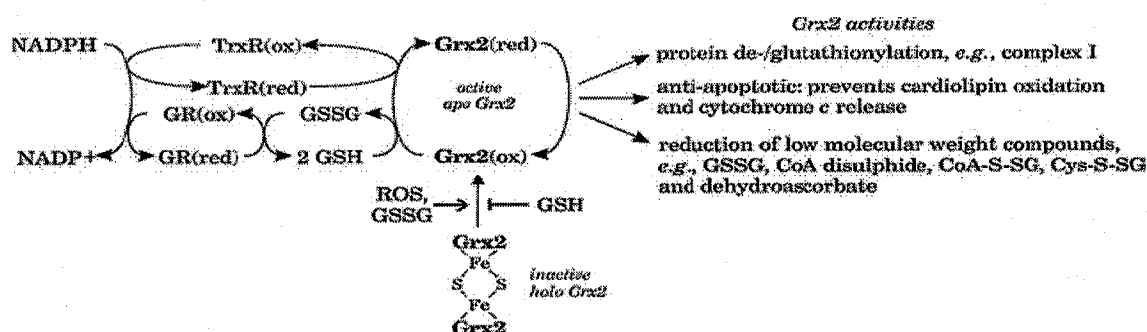


Figure 3 : Résumé de l'activation du glutarédoxine 2 (Grx2) et de ses effets *in vivo* (Holmgren et al., 2005)

1.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain comprennent le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque, alors que les antioxydants non enzymatiques exogènes comprennent les vitamines E et C, caroténoïdes, les oligoéléments. Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant.

Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer et le cuivre, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

I.2.2.1 Glutathion réduit

Le glutathion est un tripeptide composé d'acide glutamique de cystéine et de glycine (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl glycine), très abondant dans le cytosol (1-11 mM), le noyau (3-15 mM) et la mitochondrie (5-11 mM) (Valko et *al.*, 2006) où il est considéré comme l'antioxydant majeur de ces compartiments cellulaires (Figure 4). Le glutathion y est présent principalement sous forme réduite, et le ratio glutathion oxydé/glutathion réduit est compris entre 1/30 et 1/100.

Dans le noyau, il maintient l'état redox critique des sulfhydriles protéiques nécessaire pour les systèmes d'expression et de réparation de l'ADN. L'environnement oxydatant induit une modification rapide des sulfhydriles protéiques (protéines-SH). Ainsi, l'oxydation des résidus cystéines induit un changement de structure et de fonction des protéines. Les principaux états d'oxydation de cystéine qui peuvent être générés sont: disulfide (-S-S), acide sulfénique (-SOH), acide sulfinique (-SO₂H) et acide sulfonique (-SO₃H) (Winyard et *al.*, 2005) (Figure 5).

En tant qu'antioxydant, le glutathion peut intervenir par deux types de mécanismes : la capture d'espèces radicalaires et la participation à l'activité d'enzymes antioxydantes. Ainsi, la réaction du glutathion avec le radical R[•] permet une réparation des radicaux R[•] en RH et conduit aux radicaux thiyles (GS[•]) qui dimerisent pour donner le glutathion oxydé (GSSG) :



La régénération de la fonction thiol GSH à partir de la forme oxydée GSSG se fait grâce à la glutathion réductase qui nécessite un apport de NADPH+H⁺ par la voie des pentoses phosphates.

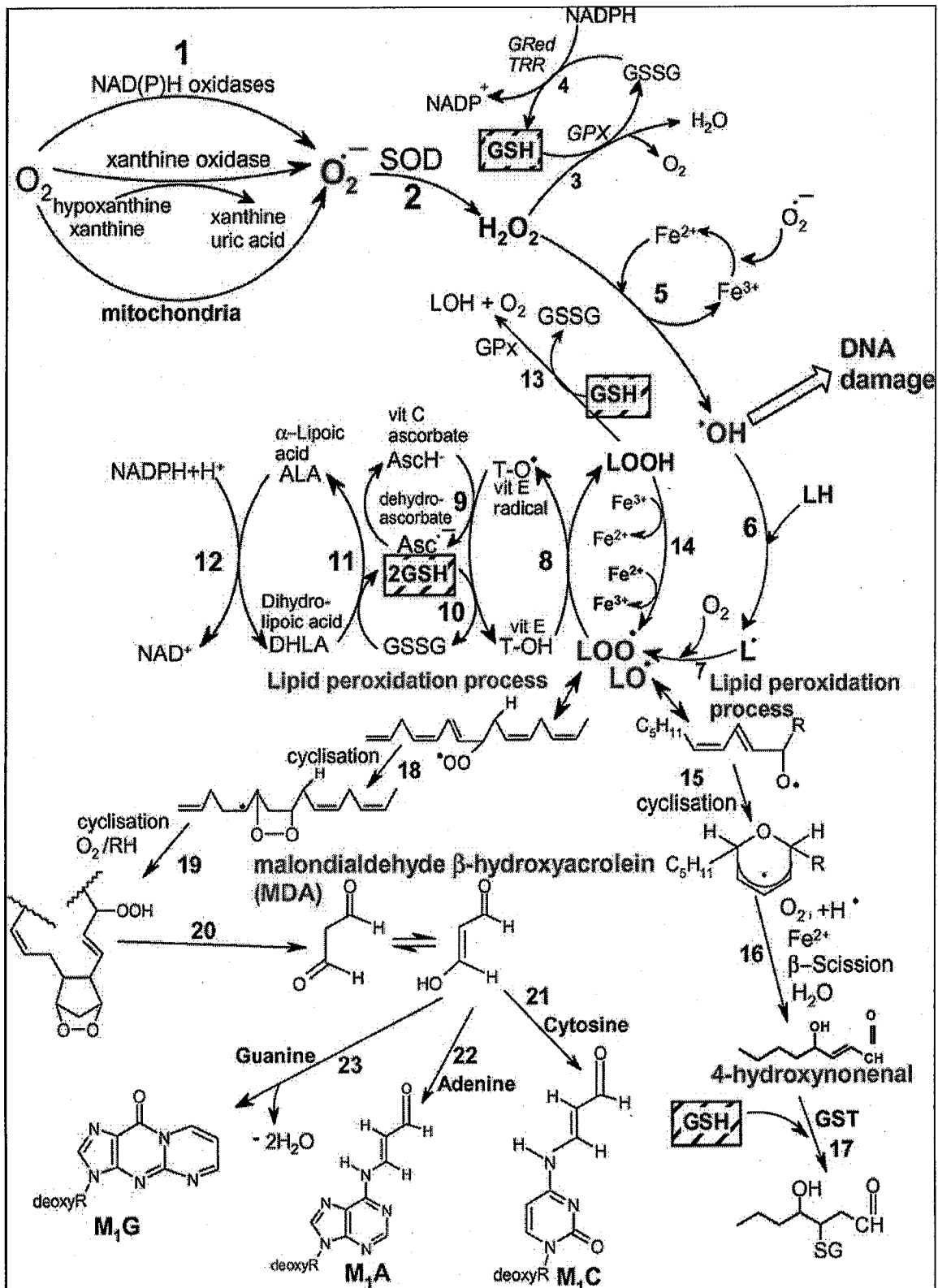


Figure 4. Les voies de formation des ROS, le processus de peroxydation lipidique, rôle du glutathion (GSH) et d'autres antioxydants (Vitamine E, Vitamine C, acide lipoïque) dans le management du stress oxydant (Valko et al., 2007).

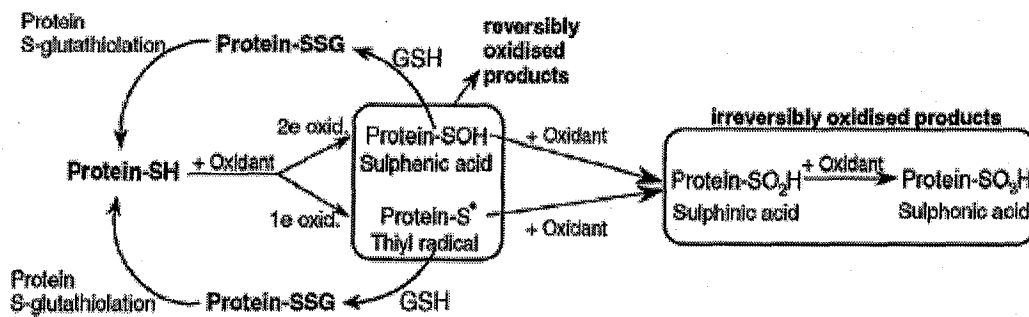
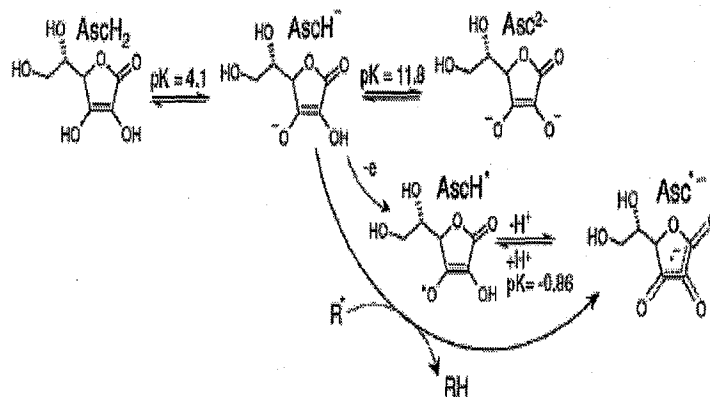


Figure 5 : Rôle du glutathion (GSH) dans l'oxydation des groupements sulphydriques protéiques (Valko *et al.*, 2006).

1.2.2.2 vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant très important du milieu aqueux, elle intervient en piégeant très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, et contribue avec la vitamine E à la régénération de l' α -tocopherol (vitamine E). L'acide ascorbique possède deux groupements hydroxyles ionisables pour donner un diacide (AscH_2). Au pH physiologique, 99.9% de la vitamine C est sous forme AscH^- , 0.05% sous forme AscH_2 et 0.004% sous forme Asc^{2-} (Valko *et al.*, 2006). La forme AscH^- réagit avec les radicaux et conduit à la formation d'un radical semidehydroascorbate ($\text{Asc}^{\bullet-}$), produit terminal très peu réactif.



1.2.2.3 Vitamine E

La vitamine E est une molécule lipophile, qui existe sous 8 formes différentes. L' α -tocophérol est la forme la plus active. Elle protège principalement la cellule de la

peroxydation lipidique. Il est nécessaire que la vitamine E agisse en synergie avec d'autres systèmes antioxydants (vitamine C, GSH et Se), capables de la régénérer.

I.3 : Les principaux rôles physiologiques des radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont naturellement produites dans les organismes vivants. Ils ont un rôle important dans plusieurs processus biologiques (tableau 1) dont certaines voies de signalisation cellulaire. Chez les mammifères, ils ont un rôle de messenger secondaire dans ces voies métaboliques en interaction avec des ligands spécifiques. Les ERO sont aussi impliquées dans la modulation de l'activité de facteurs de transcription spécifiques tels que NF- κ B (Nuclear Factor-kappaB) et AP-1 (Activator Protein-1). Ainsi, NF- κ B devient actif transcriptionnellement suite à la réaction des ERO avec I κ B, son inhibiteur, le séquestrant dans le cytosol. Ces messagers cellulaires sont très réactifs mais aussi très instables. Des modifications fines de leur métabolisme ont donc des effets cellulaires importants.

Tableau 1 : Fonctions physiologiques importantes impliquant les radicaux libres ou leurs dérivés (Dröge, 2002).

Type of Radical	Source of Radical	Physiological Process
Nitric oxide (NO \cdot)	Nitric oxide synthase	Smooth muscle relaxation (control of vascular tone) and various other cGMP-dependent functions
Superoxide (O $_2^{\cdot-}$) and related ROS	NAD(P)H oxidase	Control of ventilation Control of erythropoietin production and other hypoxia-inducible functions Smooth muscle relaxation Signal transduction from various membrane receptors/enhancement of immunological functions
Superoxide (O $_2^{\cdot-}$) and related ROS	Any source	Oxidative stress responses and the maintenance of redox homeostasis

II. Le stress oxydant

II.1. Définition du stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défense anti-oxydants. Néanmoins, une meilleure définition du stress oxydative serait une perturbation de la signalisation redox et de son contrôle (Hansen et *al.*, 2006). Les espèces oxygénées réactives peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques. Il est régulé par une balance « prooxydants-antioxydants » intracellulaire (Figure 6).

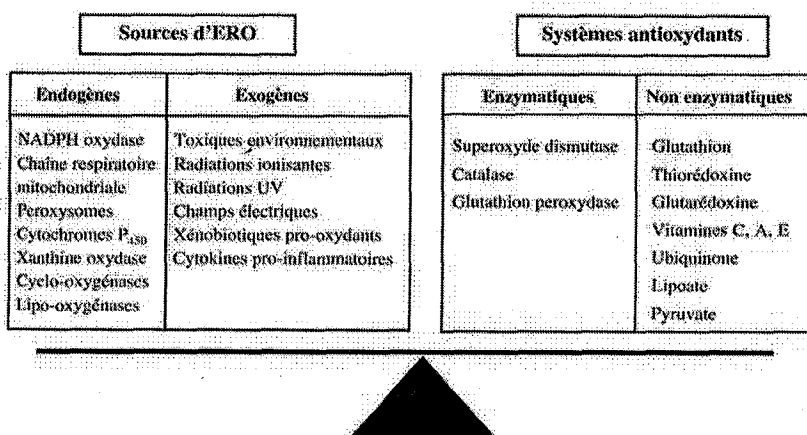


Figure 6 : Balance oxydants-antioxydants intracellulaire (Beaudeau et Vasson, 2005)

II.2. Dommages oxydatifs cellulaires et marqueurs biologiques du stress oxydant

En absence de systèmes antioxydants suffisamment efficaces, une surproduction de radicaux libres est capable de provoquer des lésions directes de molécules biologiques telles que l'oxydation des acides nucléiques, des lipides, des glucides et des protéines (Tableau 2), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites issus du stress oxydant, notamment de l'oxydation des lipides. Les molécules biologiques cibles, sous l'effet direct des radicaux libres, peuvent être soit oxydées sur des sites spécifiques, soit être clivées, soit au contraire être polymérisées.

II.2.1 Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont plus susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes qui sont eux-mêmes très réactifs. Le processus de peroxydation lipidique est initié par la formation d'un radical peroxy et se termine finalement par la formation d'aldéhydes. Il fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Figure 7).

Tableau 2 : Principaux marqueurs biologiques du stress oxydant (Favier, 2003)

Marqueurs	In vitro	Cellule	Animal	Homme
Mesure directe des ERO et ERN				
ESR directe	X			
ESR spin trapping	X	X	X	±
Luminescence	X	X	X	
Mesure chimique H ₂ O ₂	X	X		
Mesure chimique O ₂ [•]	X	X		
Mesure chimique OH [•]	X	X		
Nitrates-Nitrites		X		
Dérivés d'oxydation des lipides				
Peroxydes organiques	X	X	X	X
Diènes conjugués	X	X	X	X
Réaction au TBA	X	X	X	X
Aldéhydes : MDA, hydroxynonéal, hexanal	X	X	X	X
Cholestérol oxydé			X	X
Hydrocarbures aliphatiques			X	X
Diminution des acides gras polyinsaturés	X	X	X	X
Phospholipides hydroperoxydes	X	X	X	X
Acide cis 9-trans-11 octadécadiénoïque			X	X
8 épi-prostagladine F2 α			X	X
LDL oxydées	X		X	X
Dérivés d'oxydation de l'ADN				
Bases oxydées (HPLC, CG-MS)		X	X	X
Dérivés d'oxydation des protéines				
Méthionine sulfoxyde	X			
Echange boro hydrure tritié	X		X	X
Nitrotyrosine	X	X	X	X
Thiols protéiques	X	X	X	X
Ortho-tyrosine	X		X	±
Carbonyles (DPNH)			X	X
Bi-tyrosine	X			
Dérivés d'oxydation des "scavengers"				
GSH, rapport GSH/GSSG		X	X	X
Tocophérol, tocophérylquinone			X	X
Ascorbate, radical ascorbyl			X	X
Dérivés d'oxydation des composés exogènes				
Dimethylsulfoxyde	X	X		
Aspirine			X	X
Dérivés de conjugaison				
Lipofuschines			X	X
MDA-protéine			X	X
Tyrosine-thymine	X	X		
MDA-guanine	X	X		
Auto-anticorps				
Anti-LDL oxydés			X	X
Anti-conjugué AIP (iminopropène)			X	X
Anti-ADN oxydé			X	X

Abréviations : RPE (résonance para-électronique), 2,4-DPNH (2,4-dinitrophénylhydrazine), TBA (acide thiobarbiturique).

Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique : l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) ont été très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Figure 8). Le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule. Cependant, récemment Ehtay (2003) a observé que le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP (uncoupling proteins) et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale d'ERO.

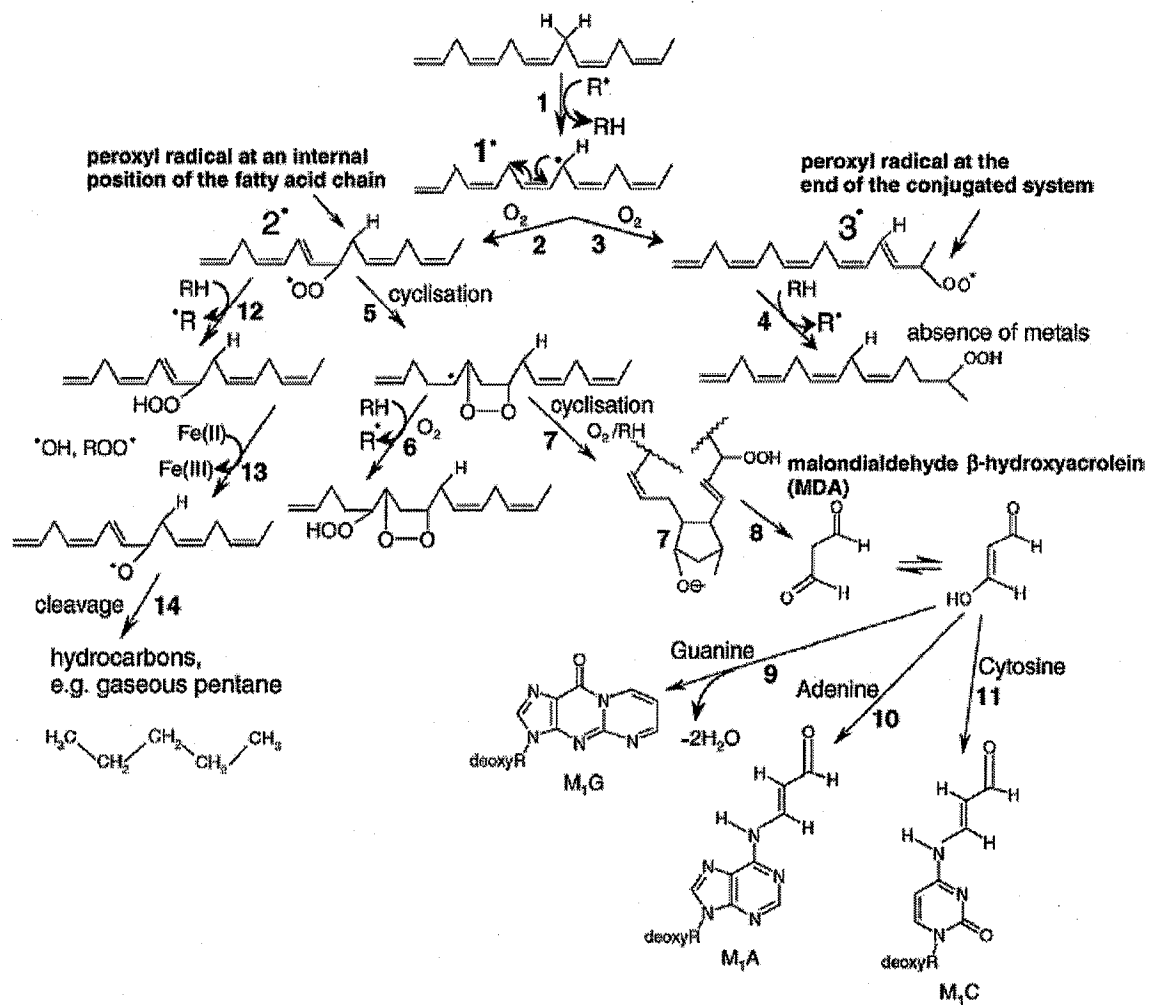


Figure 7: Les différentes voies de la peroxydation lipidique (Valko et al., 2006)

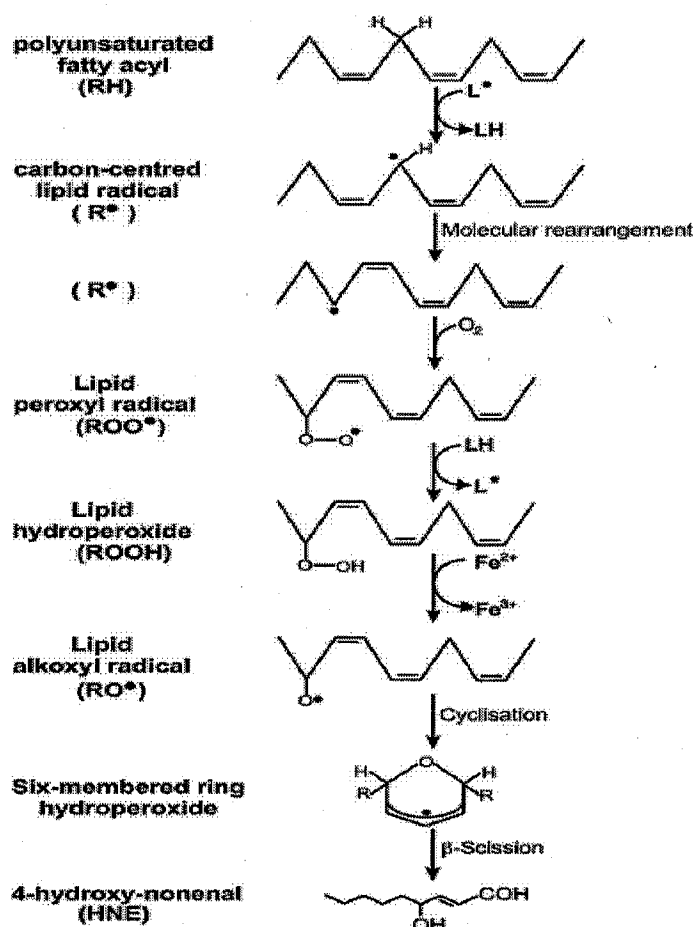


Figure 8 : Processus de la peroxydation lipidique (Echtay et al., 2007)

II.2.2 Oxydation protéique

L'oxydation protéique induit l'apparition de nouveaux groupements chimiques comme des hydroxyles et des carbonyles qui contribuent à altérer les fonctions des protéines. Ces modifications structurales peuvent entraîner des modifications fonctionnelles avec perte d'activité enzymatique par exemple. Les acides aminés contenant des chaînes aromatiques ou des groupements thiols sont plus susceptibles à l'attaque oxydative. On observe donc souvent une diminution des groupements thiols. La présence de métabolites oxydés dans l'urine est un élément indicateur de la dégradation de protéines modifiées. De nombreux produits de l'oxydation protéique ont été étudiés mais il en ressort que ceux susceptibles d'être les meilleurs candidats pour être des biomarqueurs, sont représentés par les protéines carbonylées, la bityrosine, la L-dopamine et l'ortho-tyrosine (cf. Figure 9 et 10).

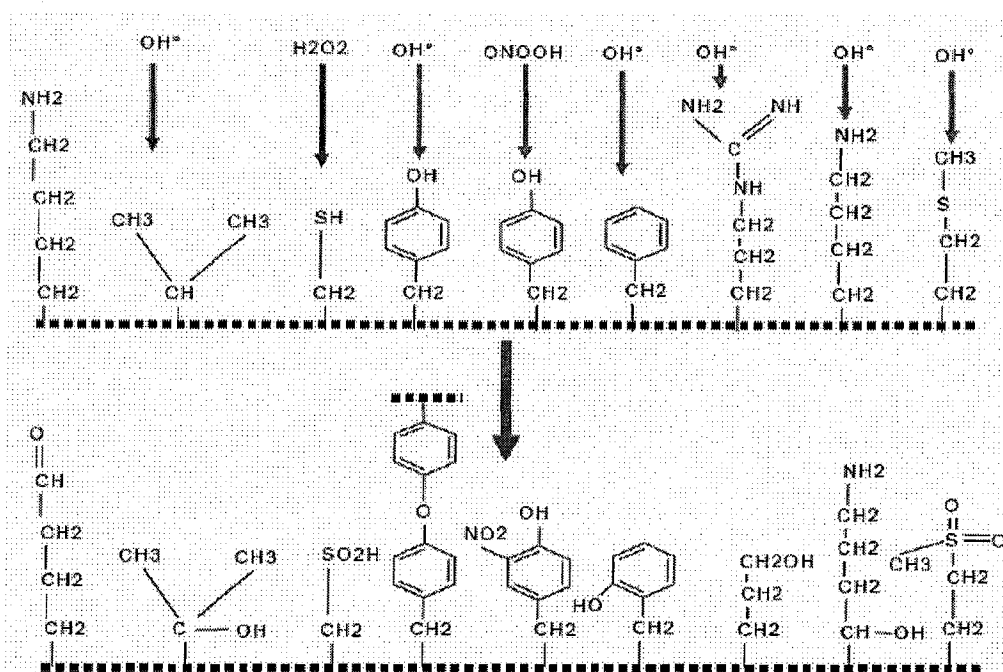


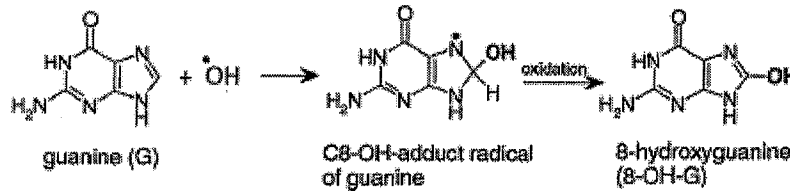
Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

Residue	Products
Phenylalanine	2,3-dihydroxyphenylalanine, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenylalanine
Tyrosine	3,4-dihydroxyphenylalanine, 3-nitrotyrosine, chlorotyrosine, dityrosine (2,2'-biphenyl derivatives)
Tryptophan	kynurenine, 3-hydroxy-kynurenine, oxindole, hydroxytryptophan, N-formyl-kynurenine
Histidine	2-oxohistidine, 4-OH-glutamate, aspartate, asparagine
Lysine	2-aminoadipic semialdehyde
Arginine	glutamic semialdehyde
Proline	glutamic semialdehyde
Threonine	2-amino-3-ketobutyric acid
Glutamic acid	pyruvic acid
Aspartic acid	pyruvic acid
Cysteine	nitrosothiols, thiol radicals, cystine, conjugates with glutathione
Methionine	methionine sulfoxide, methionine sulfone

Figure 10: Produits oxydés des résidus amino-acides (Lushchak, 2007)

II.2.3 Dommages oxydatifs de l'ADN

De nombreuses lésions de l'ADN sont générées par l'attaque des radicaux libres, soit par une oxydation directe, soit par une modification de base et formation d'adduits de l'ADN (Figure 11). La plus abondante des bases oxydées est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (**8-oxodG** ou **8-OH-dG**).



En effet, la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants tels que l' HO^\cdot et le peroxy-nitrite. Sa présence dans l'ADN peut conduire, en l'absence de réparation, à des transversions (passage des bases puriques en bases pyrimidiques) GC vers TA. D'autres lésions sont potentiellement mutagènes (Figure 12) : c'est le cas de la 2-hydroxyadénine qui peut entraîner des transversions de A vers T ou de A vers C et des transitions de A à G. La 5-hydroxycytosine semble également avoir des propriétés de lésions pré-mutagéniques conduisant à une transition de GC vers AT et une transversion de GC vers CG. Les glycols de thymine sont des lésions dites bloquantes qui empêchent la réplication de l'ADN.

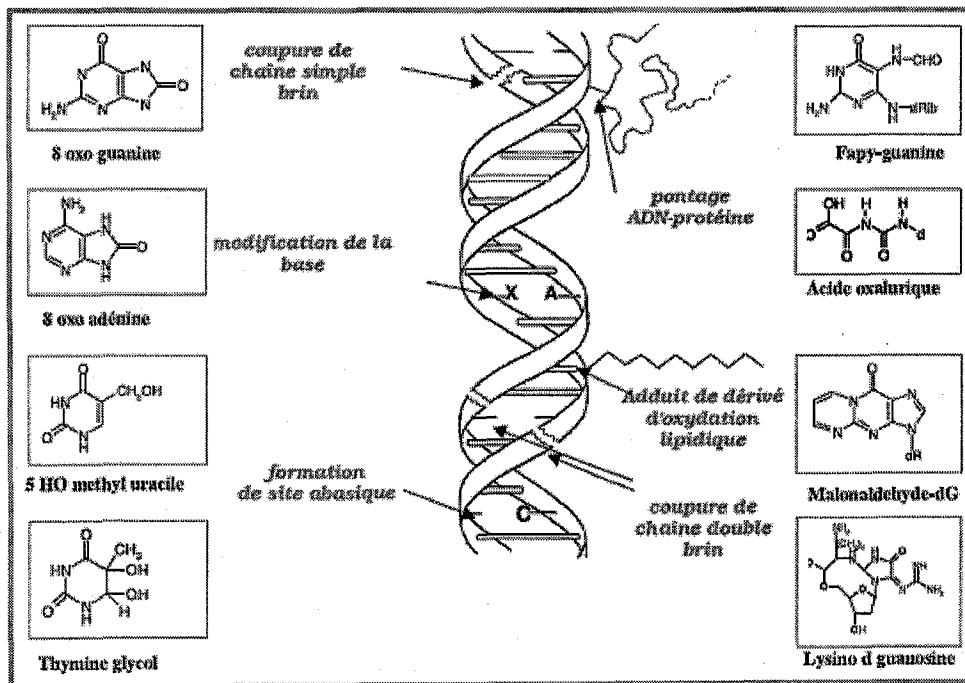


Figure 11: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

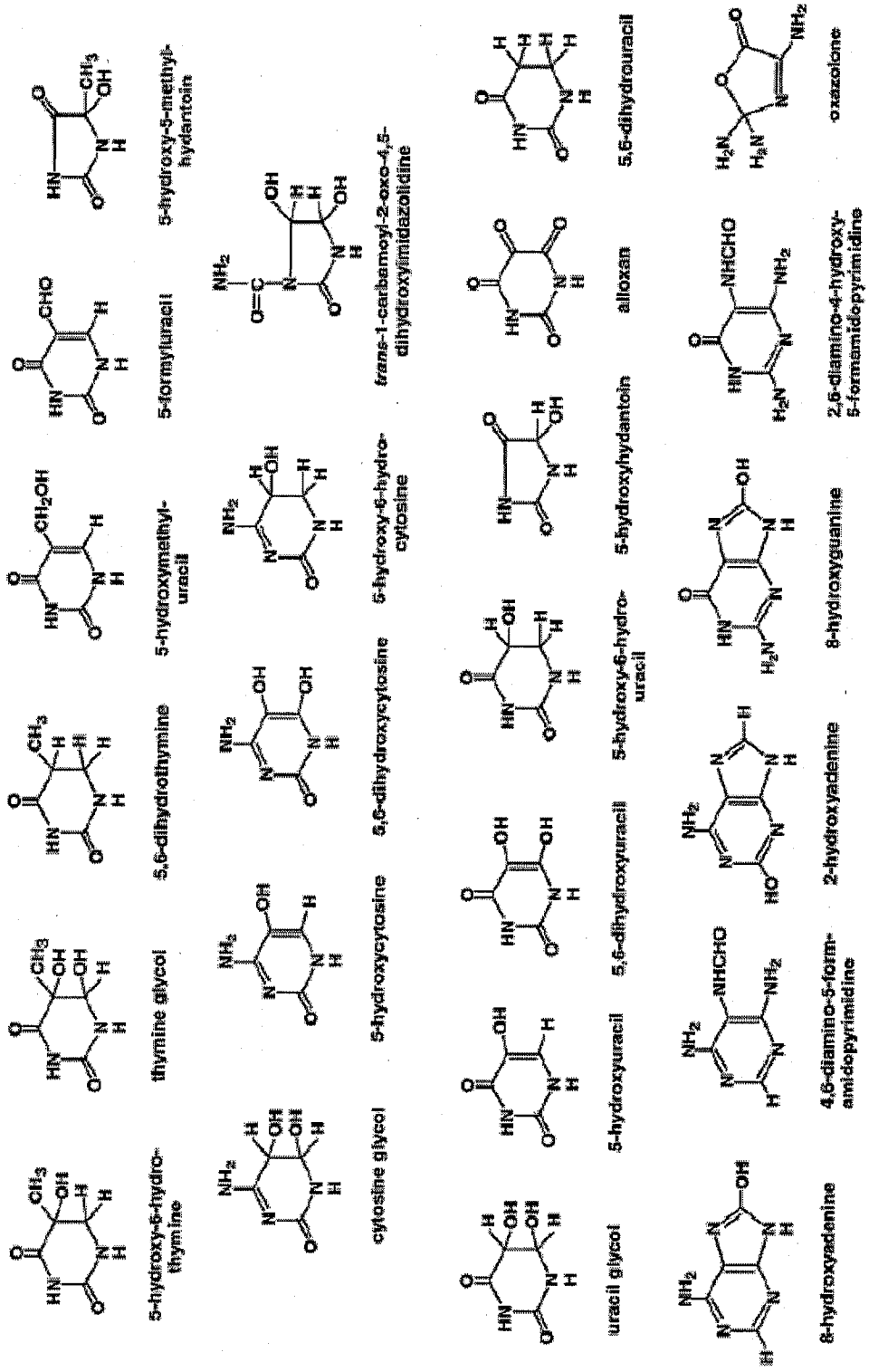


Figure 12: Principales lésions oxydatives de l'ADN (Evans et al., (2004))

II.2.3.1 Modification de base et formation d'adduits de l'ADN

Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN. Le MDA réagit avec les acides nucléiques et forme des adduits aux bases dG. Le 4-HNE peut se fixer aux bases nucléotidiques pour former préférentiellement la 4-HNE-Guo.

II.2.3.2 Systèmes de réparation de l'ADN

L'élimination des lésions oxydatives de l'ADN est un mécanisme très important pour limiter leurs effets mutagènes et cytotoxiques. Ainsi, de nombreux systèmes de réparation de l'ADN sont utilisés par la cellule. Les bases oxydées ou modifiées sont éliminées essentiellement par deux mécanismes : la réparation par excision de base (*BER, base excision repair*) et un processus plus complexe pour les lésions contenant un oligonucléotide anormal, appelé réparation par excision de nucléotide (*NER, nucléotide excision repair*).

III. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes

III.1. Mécanismes d'action moléculaire des espèces réactives de l'oxygène

Le mode d'action moléculaire des ERO est principalement axé sur une modification de l'homéostasie redox par le biais d'une modification redox des cystéines (Figure 13).

Les conditions redox sont une facette de l'environnement chimique intracellulaire (au même titre que le pH, la pression osmotique, etc.). Le potentiel redox intracellulaire est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Par rapport à l'environnement extracellulaire, le cytosol est maintenu dans un état réducteur, lié aux capacités « tampons » des thiols intracellulaires, principalement le couple glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) et la Trx. La production intracellulaire d'ERO peut perturber l'homéostasie redox. L'activité de certains facteurs de transcription est modifiée par la production d'ERO (Figure 14). Certains sont activés (AP-1, NF- κ B), d'autres sont inhibés (Sp-1, NFI, récepteur des glucocorticoïdes...), la plupart du temps *via* l'oxydation d'une cystéine critique pour la fonction de la protéine.

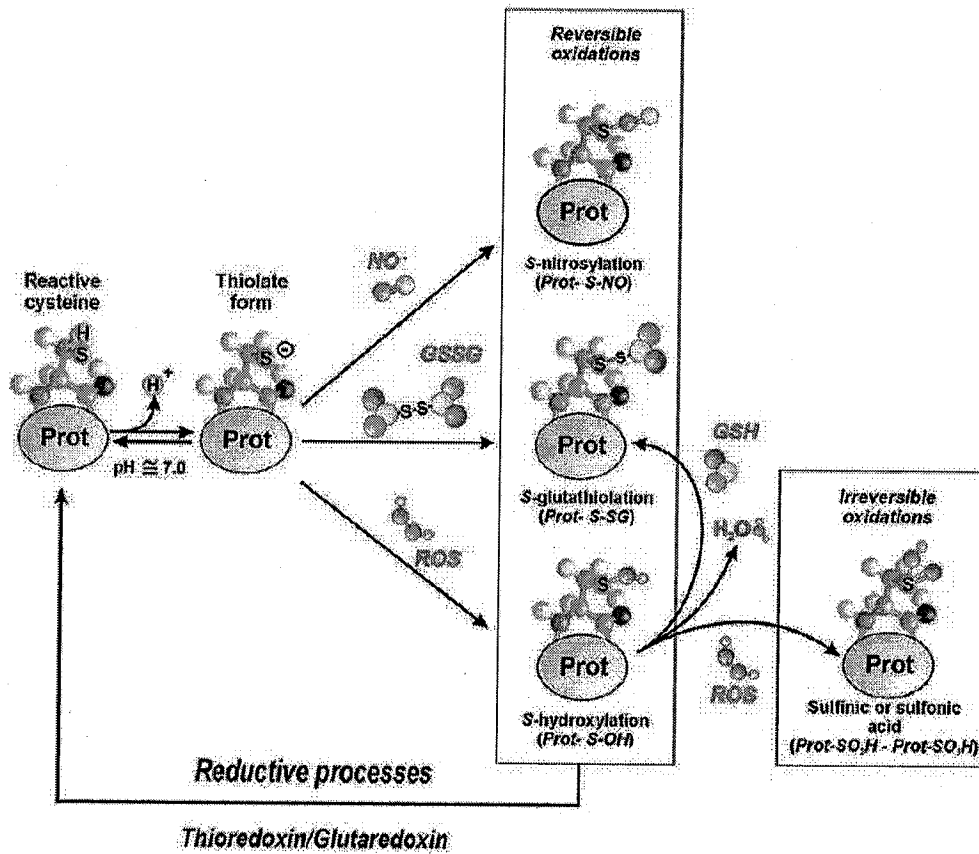


Figure 13: Modification redox de la cystéine (Filomeni et al., 2005).

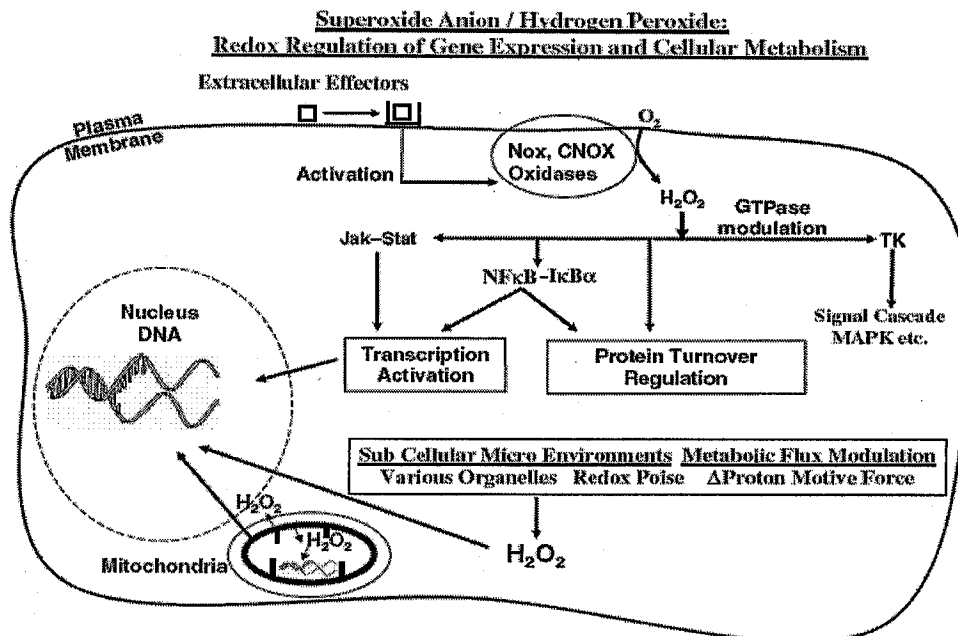


Figure 14: Anion superoxyde / H₂O₂: régulation redox de l'expression des gènes et métabolisme cellulaire (Linnane et al., 2007).

III.2. Régulation des facteurs de transcription

La plupart des facteurs de transcription comportent dans leur séquence protéique des cystéines (sensibles aux variations redox par leur groupe thiol) fonctionnellement très importantes (Barouki et *al.*, 2005). Premièrement, elles peuvent se situer dans le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription et assurer la reconnaissance d'un site donné par des interactions électrostatiques (en particulier des liaisons hydrogènes) avec les bases de l'ADN. Deuxièmement, elles peuvent donner naissance à des ponts disulfures inter- ou intramoléculaires essentiels pour la conformation tridimensionnelle de la protéine. Enfin, des cystéines participent à la coordination de cations métalliques (principalement Zn^{2+}). C'est le cas des protéines dites «à doigt de zinc» dont la conformation assurée par la coordination du cation peut permettre une interaction avec le grand sillon de l'ADN. L'oxydation d'une cystéine peut donc modifier le comportement d'un facteur de transcription.

De nombreuses cascades de signalisation sont activées par le stress oxydant (le plus souvent des cascades de kinases) (Figure 15), et un grand nombre de fonctions physiologiques est contrôlé par les voies de signalisation de la réponse redox (*redox-responsive signalling*) (Dröge, 2002).

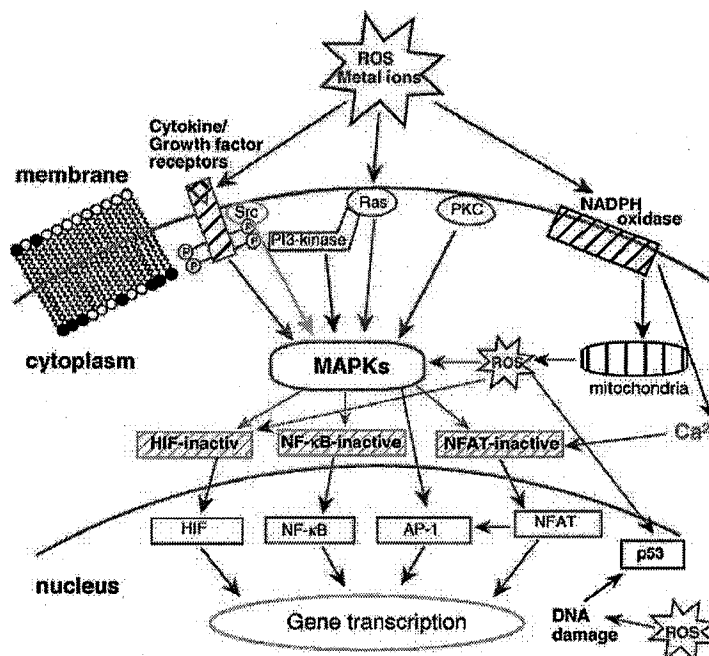


Figure 15: Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) et ions métalliques inducteurs des voies de signalisation (Valko et *al.*, 2006).

III.3. Facteurs de transcription liés au stress

De nombreux facteurs de transcription sont affectés par une variation de l'état redox intracellulaire en fonction de son intensité et de l'action spécifique de certaines protéines kinases sensibles au stress oxydant d'où une régulation redox différentielle des facteurs de transcription. L'activation de certains facteurs (NF- κ B, AP-1, Nrf-2) rend compte de l'adaptation au stress oxydant (Figure 16). Cependant, on ne connaît pas toutes les implications biologiques de l'inhibition d'un très grand nombre de facteurs.

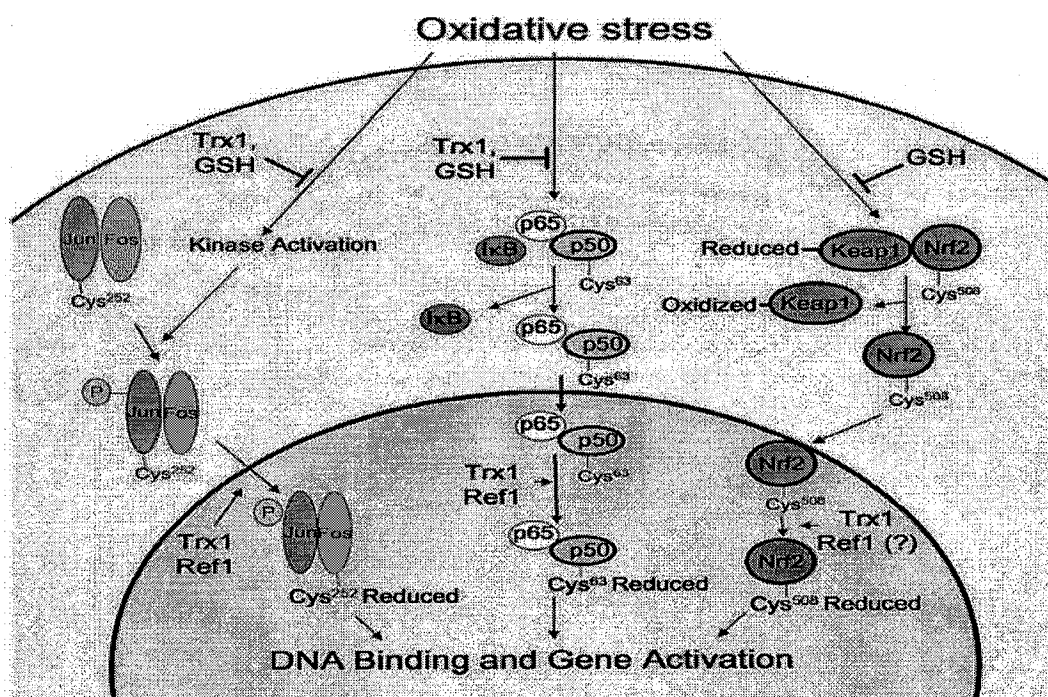


Figure 16: Subdivision nucléaire et cytoplasmique des processus redox dans la régulation des facteurs de transcription (Hansen *et al.*, 2006).

AP-1, NF- κ B and Nrf2 nécessitent un signal oxydatif dans le cytoplasme pour initier la signalisation d'activation (phosphorylation de Jun ou dissociation de NF- κ B ou Nrf2 des complexes protéiques inhibiteurs). Après activation et translocation dans le noyau, les résidus cystéine à l'intérieur de DNA binding domain de chaque facteur de transcription sont réduits par Trx1 et redox factor-1 (Ref-1).

III.3.1 NF- κ B (nuclear factor κ B)

NF- κ B est un facteur ubiquiste impliqué dans une grande variété de réponses cellulaires et dont l'activité est mise en jeu dans beaucoup de pathologies. La famille NF- κ B est constituée de Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, p50/p105 (NF- κ B1), et p52/p100 (NF- κ B2) (Papa *et al.*, 2004). Les dimères NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices I κ B (I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ), et elles sont rapidement activées par un stimuli qui

induit des phosphorylation séquentielles et la protéolyse des protéines IκBs (processus dépendant du complexe IκB kinase (IKK) et de la voie ubiquitin/protéosome) (Papa et *al.*, 2004), ceci libère NF-κB qui peut être transloqué dans le noyau et réguler l'expression de nombreux gènes de l'inflammation, du cycle cellulaire, de l'apoptose et du métabolisme oxydatif. Récemment, un nouveau corépresseur du NF-κB a été mis en évidence, dénommé MYBBP1a il interagit directement avec p65 (Owen et *al.*, 2007).

La régulation redox de NF-κB s'effectue en deux niveaux apparemment antagonistes : translocation nucléaire et liaison à l'ADN. Les espèces réactives oxygénées pourraient activer la voie IKK-IκB - NF-κB en favorisant l'activation de la kinase et la dégradation d'IκB, ou par un mécanisme alternatif qui implique la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase). A cette régulation qui aboutit à la translocation nucléaire du NF-κB s'ajoute une autre régulation sur une cystéine que comporte NF-κB dans son domaine de liaison avec l'ADN qui doit être sous forme réduite pour se lier à l'ADN, cette réduction serait assurée par la thiorédoxine ou une autre protéine appelé Ref-1 (*Redox factor 1*) (Figure 17).

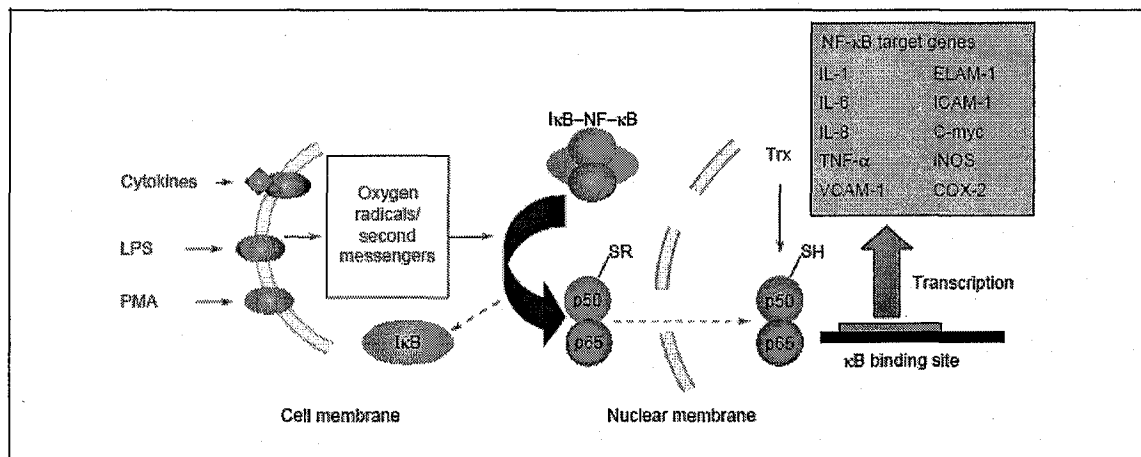


Figure 17: Contrôle redox du facteur de transcription humain, NF-κB (Winyard et *al.*, 2005) (LPS, lipopolysaccharide; PMA, phorbol myristate acetate)

III.3.2 AP-1 (Activator protein 1)

Le facteur de transcription AP-1 est composé d'un dimère Jun-Jun ou Fos-Jun (Barrouki et *al.*, 2005), et est très impliqué dans le processus de différenciation cellulaire, la modulation de l'expression des cytokines et autres médiateurs (Beaudeau et Vasson, 2005). L'activation du facteur de transcription AP-1 peut être provoquée par des modifications du statut redox intracellulaire qui induit l'activation de JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*) et de p38MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinases*), mais non des protéines ERK1 et ERK2 (*Extracellular signal-regulated protein kinase*).

III.3.3 Facteur Nrf2

C'est un facteur de transcription membre de la famille *basic-leucine zipper NF-E2*, dont la structure est similaire à celle de Jun et Fos et interagit avec ARE (*antioxidant response element*) (Kwak et al., 2004). Le facteur Nrf2 est associé à l'état basal avec la protéine Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) qui l'ancre aux microfilaments d'actine, est localisée dans le cytoplasme. Cette association se fait par l'intermédiaire du domaine Neh2 (*Nrf2-Ech homology 2*) du facteur Nrf2 (Motohashi and Yamamoto, 2004). Dans le cytosol, les situations de stress oxydant permettent de promouvoir l'activation du Nrf2 via l'oxydation des groupements thiols du Keap1 qui se dissocie du Nrf2, libéré il est transloqué dans le noyau pour se lier avec une séquence cible de l'ARE (Figure 18).

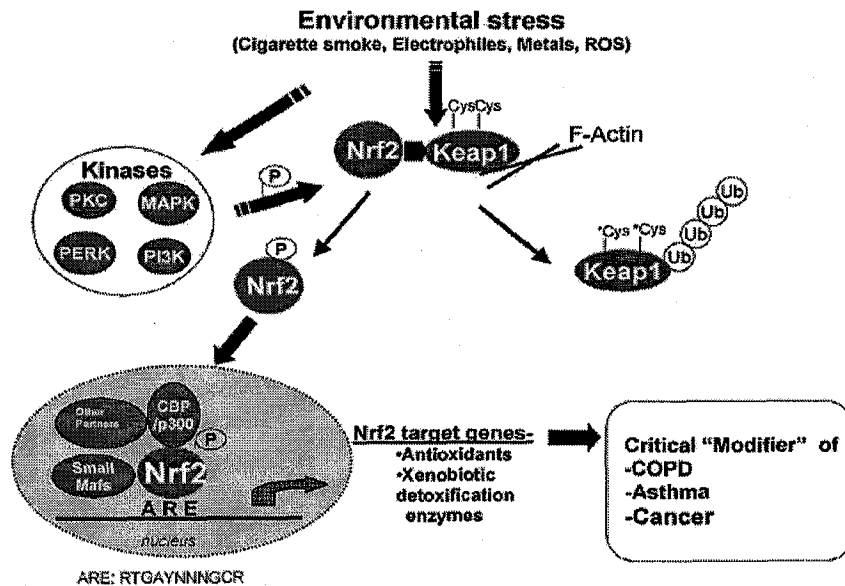


Figure 18: L'activation redox du Nrf2 aboutit à l'induction des gènes antioxydants et de détoxification (Biswas et al., 2006).

Chapitre 2: Environnement redox cellulaire

Introduction

Le maintien de l'homéostasie redox des thiols, dépendant du pouvoir réducteur du NADPH, est un processus vital pour la cellule. Il régule la transduction du signal, l'activité d'une variété de différentes enzymes et de facteurs de transcription et ainsi les fonctions cellulaires (plus particulièrement le destin des cellules : prolifération, différenciation ou mort cellulaire) (cf. figure 19).

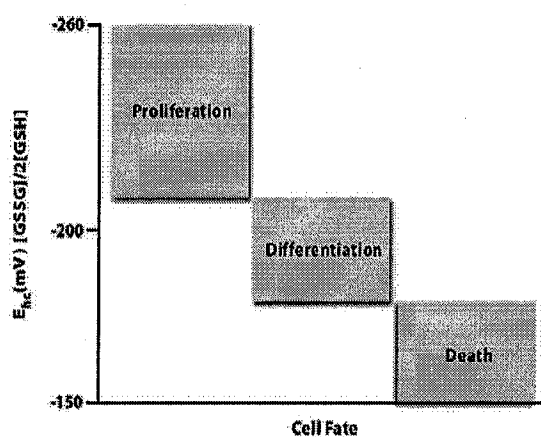


Figure 19: Le destin cellulaire en fonction du potentiel du glutathion (Maher, 2006).

II.1. Notion de potentiel d'oxydoréduction

Le métabolisme redox implique des cascades de transferts d'électrons entre les partenaires des différentes voies de signalisation cellulaire. Les équations chimiques correspondant aux réactions d'oxydoréduction peuvent être décrites en utilisant les couples redox, sous réserve de satisfaire à certaines conditions thermodynamiques. Les acteurs protéiques participant à ces réactions existent sous deux formes : l'une réduite, l'autre oxydée. Le passage de la forme oxydée à la forme réduite nécessite le gain d'un ou plusieurs électrons. La force réductrice de chaque acteur redox est caractérisée par un potentiel d'oxydoréduction ou potentiel redox.

II.2. Le glutathion et le statut redox intracellulaire

Le potentiel redox intracellulaire, reflet du statut redox intracellulaire, peut se définir comme étant la somme des produits des potentiels de réduction des différents couples redox intracellulaires et des équivalents réducteurs correspondants (Schafer and Buettner, 2001).

$$\text{redox environment} = \sum_{i=1}^{n(\text{couple})} E_i \times [\text{reduced species}]_i$$

E_i : Potentiel de demi-cellule du couple redox i ;
 $[\text{reduced species}]_i$: Concentration intracellulaire de l'espèce réduite du couple i .

Ce potentiel de demi-cellule peut être calculé par la formule de Nernst :

$$\Delta E = \Delta E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad \text{Nernst Equation}$$

$$E_i = E_i^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[i_{\text{ox}}]}{[i_{\text{red}}]}$$

E_i° : Potentiel de réduction standard du couple i
 n : Nombre d'électrons échangés
 R : Constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
 T : Température absolu
 F : Constante de Faraday ($9.6485 \times 10^4 \text{ cal mol}^{-1}$)

Les couples redox intracellulaires les plus réducteurs sont le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP⁺), la thioredoxine (Trx réduite/oxydée) et le glutathion (GSSG/GSH) (Figure 20), mais il en existe de nombreux autres, parmi lesquels toutes les protéines portant un groupement sulfhydryle.

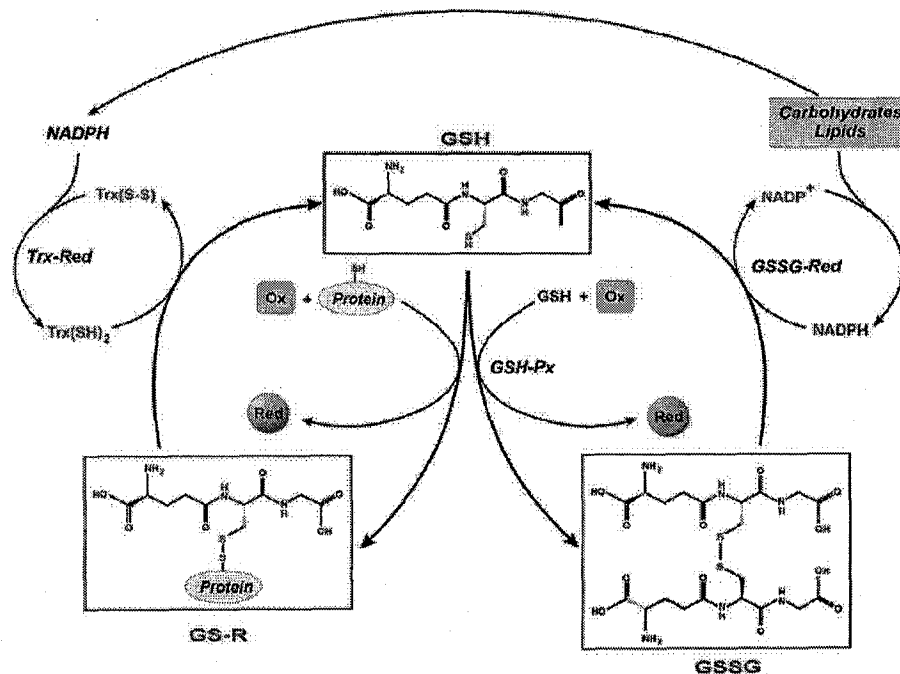
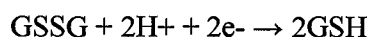


Figure 20 : Cycle redox du glutathion (Filomeni et al., 2005)

[Dans ce diagramme schématique sont représentés la forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG et GS-R) du glutathion. La réduction de GSSG et GS-R par l'action de GSSG réductase (GSSG-Red) et thioredoxine (Trx) avec la contribution en amont de NADPH. (GSH-Px (glutathion peroxydase))]

Par conséquent la mesure absolue du potentiel redox intracellulaire n'est pas réalisable. En revanche, il peut être estimé à l'aide du potentiel de réduction d'un couple choisi. On considère que le potentiel redox du couple redox du glutathion en est le plus représentatif. En effet, bien que le E° du couple redox du glutathion soit moins négatif que celui du couple redox du NADPH (-240 mV et -316 mV, respectivement), les concentrations intracellulaires de glutathion sont très supérieures à celles du NADPH. Ainsi, le potentiel redox intracellulaire est mieux apprécié par le potentiel de demi-cellule du glutathion que par celui de tout autre couple redox (Schafer and Buettner, 2001).

Le calcul du ratio [GSH/GSSG] est une manière simple d'apprécier le niveau d'oxydation du couple GSSG/GSH. Cette approche ne donne cependant pas une image fidèle du potentiel d'oxydo-réduction du glutathion. Dans le cas du glutathion, et contrairement à d'autres couples comme celui du NADPH par exemple, le potentiel de demi-cellule dépend en effet non seulement du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit, mais aussi de la concentration en glutathion réduit. Cette particularité s'explique par le fait que l'espèce oxydée est le résultat d'une condensation de deux molécules de glutathion réduit.



Par conséquent, pour estimer le potentiel du glutathion (ou statut en glutathion), il est plus juste d'utiliser le potentiel de demi-cellule du glutathion en appliquant la formule de Nernst :

$$E_{hc} = -240 - (59.1/2) \log ([\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]) \text{ mV}$$

at 25°C, pH 7.0.

Le couple redox du glutathion est considéré comme le tampon redox de la cellule, non seulement parce qu'il fournit le pool le plus important d'espèces sous forme réduite, mais aussi parce que dans des conditions de stress oxydant, plusieurs mécanismes permettent le maintien du potentiel de demi-cellule du glutathion, et par conséquent celui du statut redox intracellulaire (Figure 21). D'une part, la forme réduite du glutathion peut être facilement régénérée à partir de la forme oxydée, sous l'action de la glutathion réductase. Lors de cette réaction, l'oxydation du NADPH en NADP⁺ fournit les unités réductrices nécessaires au recyclage du glutathion. Le statut redox du glutathion est donc affecté par celui d'autres couples redox, comme le couple NADPH/NADP⁺ (Wu *et al.*, 2004).

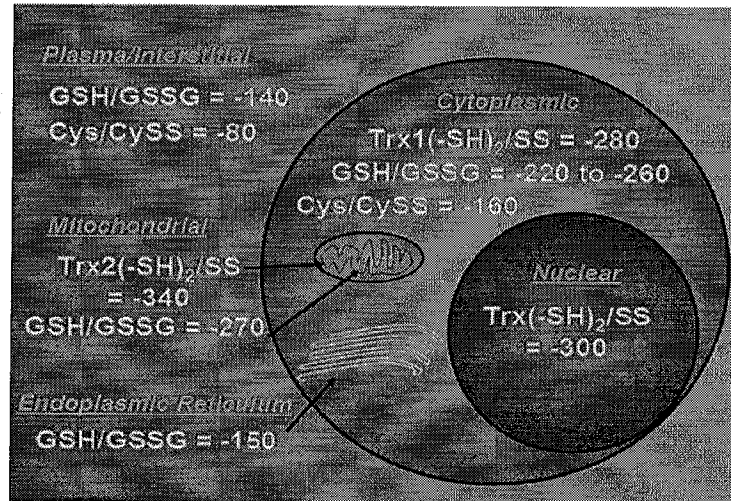
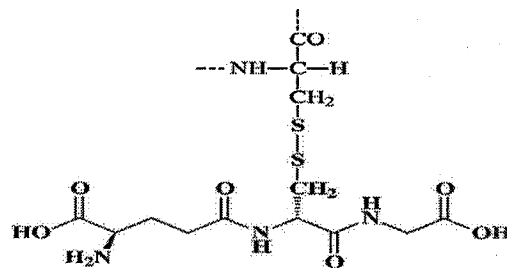
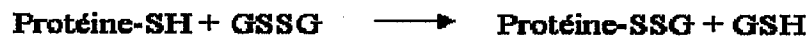


Figure 21: Le niveau régulier des potentiels redox du GSH/GSSG, Trx(SH)₂/Trx(SS), et cystéine/cystine dans le cytoplasme, la mitochondrie, le noyau, l'espace extracellulaire et le réticulum endoplasmique (Hansen *et al.*, 2006).

II.3. La S-glutathionylation et l'équilibre thiol/disulfure

Le glutathion (GSH) joue un rôle important dans la régulation du statut thiol/disulfure des groupements sulfhydryles des protéines et ainsi conditionne leur fonction. Dans des conditions physiologiques normales, il les maintient sous une forme réduite; dans des conditions de stress oxydant, il forme avec les groupements sulfhydryles des protéines des formes mixtes disulfures de manière réversible, par une réaction de glutathionylation (Beer *et al.*, 2004). La glutathionylation est une modification post-traductionnelle au cours de laquelle la cystéine d'une molécule de glutathion (GSH) se lie au groupement -SH d'un résidu cystéine d'une protéine via un pont disulfure après réaction avec la forme oxydée du glutathion (GSSG). Seules les protéines possédant des cystéines et donc des résidus -SH réactifs ont la propriété de pouvoir être glutathionylées.



Mixed disulfide [Glutathionylation]

D'un point de vue réactionnel, la fixation d'une molécule de glutathion sur une cystéine peut être interprétée comme un blocage transitoire de sa réactivité, mais elle peut aussi être considérée comme une protection de toute autre oxydation (réversible ou

irréversible) due par exemple au stress oxydant où les réactions entre les groupements thiols des cystéines et les ERO peuvent conduire à la formation de formes glutathionylées des protéines (Figure 22). Elles peuvent aussi conduire à la formation de modifications irréversibles.

Ainsi, la glutathionylation jouerait un rôle central dans l'initiation de la réponse au stress (Figure 23) et la régulation des cycles cellulaires (Moriarty-Craige and Jones, 2004). Elle peut être spontanée ou catalysée par des enzymes telles que la glutaredoxine, elle modifie la stabilité des protéines et les protège de certaines réactions irréversibles pouvant avoir lieu dans des conditions de stress oxydant, comme la carbonylation, la glycation ou la nitration (Maher, 2006).

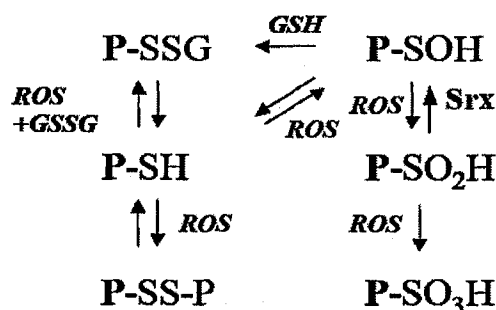


Figure 22: Effet des ERO sur l'état redox des cystéines.

Forme réduite (PSH), forme glutathionylée (P-SSG), forme acide sulfénique (PSOH), forme acide sulfinique (PSO₂H) et forme acide sulfonique (PSO₃H), glutathion réduit (GSH), glutathion oxydé (GSSG) et espèces réactives de l'oxygène (ERO), sulphirédoxine (Srx).

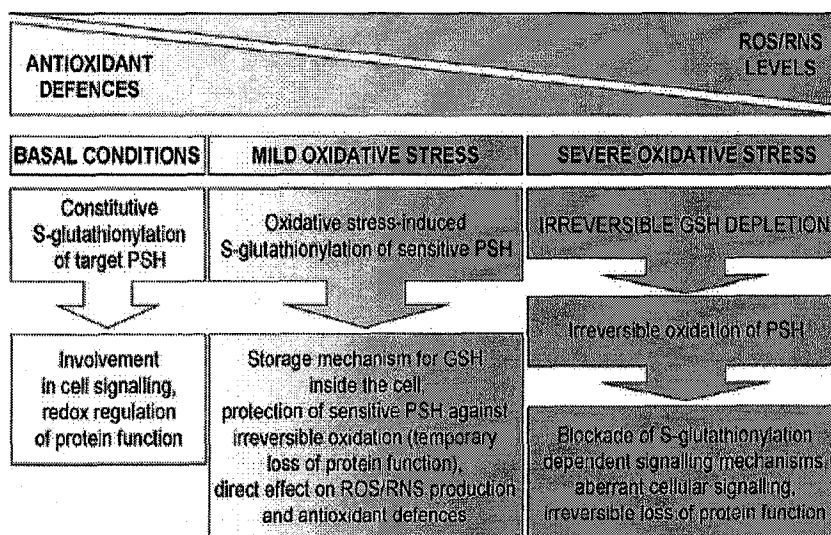


Figure 23: Rôle de la S-glutathionylation dans la signalisation redox et les réponses au stress oxydant (Dalle-Donne et al., 2007)

Ces réactions sont souvent associées à la perte de la fonction des protéines. La glutathionylation peut à l'inverse faire émerger une nouvelle fonction ou modifier l'activité d'enzymes ou de facteurs de transcription.

De nombreuses enzymes sont sensibles aux échanges thiol/disulfure, notamment les enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes, comme la superoxyde dismutase, ou les enzymes du métabolisme énergétique, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Cotgreave *et al.*, 1998). L'inhibition de cette-dernière par les espèces réactives de l'oxygène déclenche plusieurs mécanismes délétères associés au stress oxydant (Brownlee, 2001); sa glutathionylation la protégerait de l'inactivation par les espèces réactives de l'oxygène.

La glutathionylation modulerait également l'expression de certains gènes, notamment impliqués dans l'inflammation, les mécanismes de l'apoptose et de la prolifération cellulaire (Cotgreave *et al.*, 1998; Arrigo, 1999). Ainsi, la glutathionylation du site de reconnaissance de la c-jun kinase – (une protéine impliquée dans les voies de signalisation de réponse au stress) sur l'ADN permet un control direct et réversible de l'activation de ces voies de signalisation (Klatt *et al.*, 1999). Elle pourrait contribuer à une modification réversible du phénotype de la cellule en réponse à des modifications du statut redox intracellulaire et constituerait une réponse cellulaire adaptative qui serait impliquée dans la protection contre le stress oxydant (Cotgreave and Gerdes, 1998).

Les glutarédoxines ont la propriété de catalyser la déglutathionylation. Les glutarédoxines peuvent catalyser les réactions de déglutathionylation. Cette réaction entraîne la libération d'un groupement –GS– immédiatement pris en charge par les glutarédoxines (sous la forme Grx-SSG) (cf. figure 24). Cette propriété des glutarédoxines de prendre en charge les radicaux est basée sur leur faible pKa (environ 3,5) ainsi que sur la stabilité de la forme transitoire Grx-SSG. La glutarédoxine, à son tour glutathionylée, retourne à un état standard par réaction avec une molécule de glutathion réduit (GSH). Seules les glutarédoxines ont la propriété de déglutathionyer les formes protéine-SSG, les thiorédoxines ne l'ont pas. Le glutathion réduit (GSH) est indispensable à cette réaction.

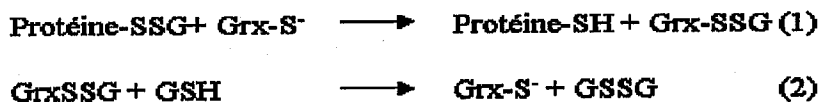


Figure 24: Mécanisme catalytique de la déglutathionylation (ou déthiolation).
La cystéine réactive est représentée par le groupement thiol (–SH).

II.4. Protéines régulées par S-glutathionylation.

II. 4.1. Enzymes avec sites thiols actifs

L'activité des enzymes métaboliques, incluant l'anhydrase carbonique III (Mallis et al., 2002; Cabisco and Levine, 1996), la tyrosine hydroxylase (Borges et al., 2002), l' α -cetoglutarate deshydrogenase (Nulton-Persson et al., 2003), l'aldose réductase (Cappiello et al., 2001), la créatine kinase (Reddy et al., 2000), la GAPDH (Eaton et al., 2002; Mohr et al., 1999; Ghezzi et al., 2002) et d'autres, est sujette à une régulation par S-glutathionylation, dans la majorité des cas il s'agit d'une inhibition de l'activité enzymatique.

Dans le cas de l'anhydrase carbonique III, la S-glutathionylation du résidu Cys¹⁸⁶ est requise pour son activité, tandis que la S-glutathionylation du résidu Cys¹⁸¹ bloque l'activité (Cabisco and Levine, 1996).

Le clivage et l'activation de la caspase-3 jouent un rôle central dans l'apoptose. Cependant, les mécanismes qui régulent le clivage de la caspase-3 restent élusifs. Récemment, il a été observé que la glutaredoxine (Grx) jouerait un rôle essentiel dans le clivage de la caspase-3 via la régulation de sa S-glutathionylation. L'activité Grx est significativement surrégulée par le TNF- α chez les cellules endothéliales (Pan and Berk, 2007). En particulier, une corrélation inverse a été observée entre la S-glutathionylation de la caspase-3 et le clivage.

II. 4.2. Protéines de signalisation

Dans la signalisation, le statut redox a des effets à la fois, en amont sur les systèmes de signalisation, et en aval sur les facteurs de transcription. Ainsi, beaucoup de molécules de signalisation et des facteurs de transcription indispensables pour la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose semblent être régulés par la S-glutathionylation (Klatt and Lamas, 2000; England et al., 2005). La sous unité catalytique de la protéine kinase A (cAMP dependent protein kinase) est susceptible à l'inactivation par la S-glutathionylation de la Cys¹⁹⁹, qui est localisée près du site actif (Humphries et al., 2002). La S-glutathionylation joue un rôle clé dans la régulation de l'activité kinase de MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1; MAP3K), activateur en amont de la voie SAPK/JNK (*stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*), en réponse à un stress oxydant par l'inhibition d'un résidu cysteinyl du domaine de fixation de l'ATP (Cross and Templeton, 2004).

II. 4.3. Facteurs de transcription

La S-glutathionylation inhibe l'activité de liaison des facteurs de transcription c-Jun et NF- κ B à l'ADN, par l'introduction de charges négatives apportées par le GSH à l'intérieur de leurs sites de liaison à l'ADN (Klatt et al., 1999; Qanungo et al., 2007).

Ainsi, la S-glutathionylation de la Cys⁶² de la sous unité p50 de NF- κ B, prévient la liaison du facteur de transcription au site κ B, dans les régions promoteur des gènes (Pineda-Molina et al., 2001). La S-glutathionylation de la sous unité p65 de NF- κ B, qui est principalement responsable de l'activation transcriptionnelle, inhibe la liaison de p65–NF- κ B à l'ADN, induisant une diminution de la résistance à l'hypoxie chez les cellules cancéreuses de pancréas supplémentées avec du GSH via la N-acétylcysteine (Qanungo et al., 2007).

Il a été rapporté que la Cys¹⁷⁹ de la sous unité β IkB kinase (IKK- β) est une cible centrale pour l'inactivation oxydative par le biais de la S-glutathionylation, responsable de la répression de l'activité kinase par H₂O₂. Cette S-glutathionylation de IKK- β Cys¹⁷⁹ est reversée par la glutarédoxine (GRX), qui restore l'activité kinase (Reynaert et al., 2006) (Figure 25).

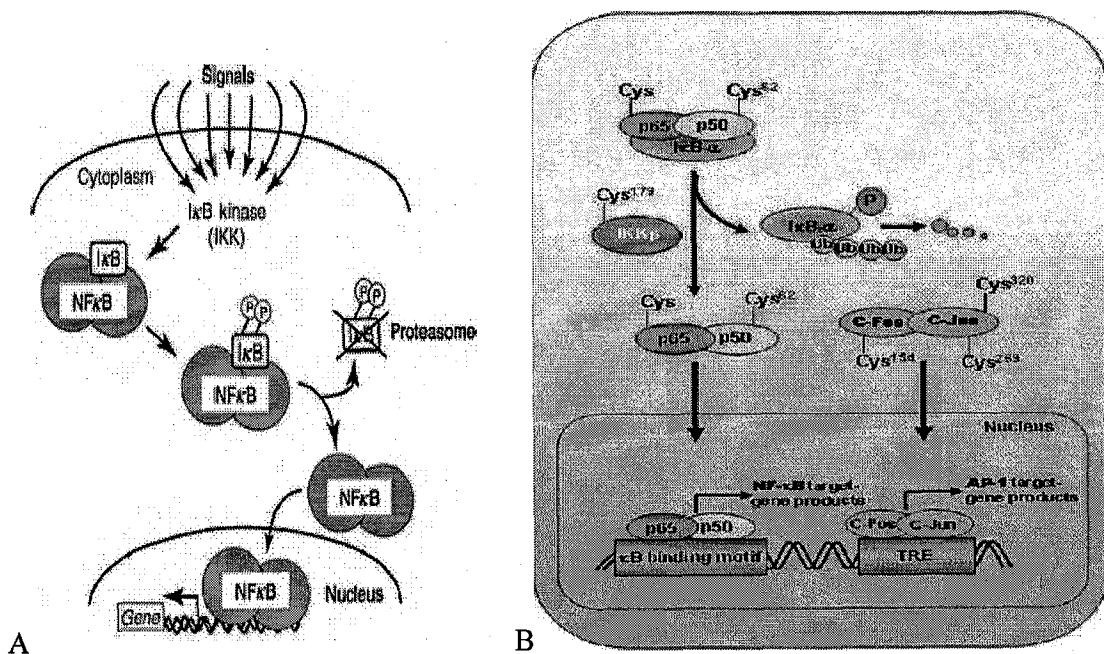


Figure 25: (A) la voie de signalisation NF- κ B, (B) rôle critique des cystéines dans la transduction de signal

II. 4.4. Protéines Ras

Les protéines Ras font partie de la famille des petites protéines G. Les protéines G (guanine nucleotide binding proteins) sont des transductrices de signaux. Elles jouent un rôle critique comme capteurs de signal de transduction, dans la régulation d'un certain nombre de processus cellulaires, y compris la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose.

Les réactions des ERO/ERN avec la Cys¹¹⁸, qui réside près du site de liaison du GTP, ont été impliquées dans l'activation de p21ras ce qui conduit à la signalisation en aval au Raf-1/MEK/ERK pour médier des réponses cellulaires (Finkel, 2000). Récemment, il a été démontré que les niveaux élevés d'oxydants tant chez les cellules endothéliales que les cellules de muscle lisses peuvent directement activer p21ras par S-glutathionylation du thiol réactif sur la cys¹¹⁸ et déclencher en aval la signalisation par phosphorylation d'ERK et AKT (Adachi et al., 2004; Clavreul et al., 2006).

II. 4.5. Les protéines de choc thermique (HSP - *Heat Shock Proteins*)

Des conditions ou agents déstabilisant l'environnement cellulaire altèrent souvent le repliement des protéines. Les protéines présentent alors à leur surface des zones hydrophobes qui, dans des conditions physiologiques normales, sont enfouies au sein de la macromolécule (état de conformation du type globule fondu, *molten globule*). Les protéines de choc thermique (HSP) (Tableau 3) permettent de stabiliser les surfaces des zones hydrophobes et de faciliter un repliement correct dans des structures fonctionnelles (Arrigo, 2005). Chez les lymphocytes T stressés par H₂O₂ ou du diamide, il a été observé une modification des HSP60 et HSP70 par la S- glutathionylation (Fratelli et al., 2002). La protéine HSP70 appartient à une famille dont certains membres, telle HSC70, sont constitutivement exprimés et non induits par le stress. Ces HSP constitutives sont impliquées dans l'homéostasie cellulaire et agissent également comme chaperons de reformation protéique. La S-glutathionylation de HSC70, homologue constitutivement exprimé de HSP70, dans l'épithélium de pigment rétinien augmente sa fonction de chaperon au quintuple (comparé à HSP réduit non glutathionylé) pour éviter une dénaturation irréversible des protéines (Hoppe et al., 2004).

Le maintien de chaperons actifs est important pour la régulation de repliement des protéines. Ainsi, la régulation redox de l'activité chaperon des HSP peut être une réponse physiologique au stress oxydant.

Tableau 3. Principales protéines chaperons impliquées dans la réponse cellulaire au choc thermique (Arrigo, 2005)

Chaperons	Fonctions
Hsp90	Protéine constitutivement exprimée dans les cellules. Stimulation de l'expression en conditions de stress Chaperon ATP-dépendant impliqué dans le repliement des protéines Peut agir comme cochaperon de Hsp70 Transport intracellulaire des protéines (exemple : récepteurs nucléaires stéroïdes et glucocorticoïdes) Masquage des mutations
Hsp70	Protéine dont l'expression est induite en conditions de choc thermique Chaperon majeur ATP-dépendant impliqué dans le repliement des protéines après un stress
Hsc70	Protéine de la famille Hsp70, constitutivement exprimée ; son expression n'est pas stimulée par le choc thermique. Chaperon ATP-dépendant impliqué dans le repliement des protéines dans la cellule non stressée
Hsp40	Protéine constitutivement exprimée dans les cellules. Stimulation de l'expression en conditions de stress Interagit avec les protéines mal conformées Cochaperon présentant le polypeptide à replier au chaperon Hsc70/Hsp70 (via son domaine J) Stimule l'hydrolyse de l'ATP associé à Hsc70/Hsp70
Hsp27	Protéine souvent constitutivement exprimée, dont l'expression est stimulée en conditions de stress Activité chaperon ATP-indépendante, moins intense que celle de Hsp70 et Hsp90 Forme des structures oligomériques avec des protéines dépliées : inhibition de l'agrégation et présentation à Hsp40 Stimule la dégradation ubiquitine-dépendante de certaines protéines

II. 4.6. Protéines Mitochondriales

La mitochondrie représente un environnement oxydant à l'intérieur des cellules et la S-glutathionylation de protéines mitochondriales comme le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) (Beer et *al.*, 2004; Taylor et *al.*, 2003) et l'aconitase, peut réguler la génération et/ou le métabolisme des ERO/ERN. Particulièrement, la production d'ERO par le complexe mitochondrial I augmente en réponse à l'oxydation du pool de GSH mitochondrial en GSSG (Han et *al.*, 2005). Cela est corrélé avec la S-glutathionylation de thiols sur les sous-unités 51- et 75- kDa du complexe I, complexe isolé des membranes mitochondriales de cœur de bovin, et des mitochondries intactes.

La S-glutathionylation du complexe I augmente la production de superoxyde par ce complexe et, quand la forme mixte disulfure est réduite, la production de superoxyde retourne au niveau basal. Chez la mitochondrie intacte, la plupart de ce superoxyde produit après S-glutathionylation du complexe I est convertie en peroxyde d'hydrogène qui diffuse dans le cytoplasme.

Ce mécanisme mitochondrial réversible de la production d'ERO permet de suggérer comment la mitochondrie pourrait réguler la signalisation redox, et comment l'oxydation du pool de GSH mitochondrial pourrait contribuer aux changements pathologiques de la mitochondrie au cours du stress oxydant (Taylor et *al.*, 2003).

II.5. Comparaison entre signalisation phosphorylative et signalisation redox

La formation des liaisons phospho-ester par l'action des protéines kinases est capable d'altérer la conformation et la fonction des protéines, et par voie de conséquence la fonction cellulaire. L'importance de la transduction du signal par l'intermédiaire des modifications phosphorylantes reflète le nombre élevé des sous-unités catalytiques (500-600) de protéines kinases distinctes (Hunter, 1987).

En analysant les mécanismes par lesquels la transduction par l'intermédiaire des voies redox et de phosphorylation est développée, nous pouvons constater des ressemblances et des distinctions. Parmi les ressemblances, un aspect à considérer est la spécificité. En fait, dans la transduction du signal par la voie redox, la modification oxydative d'une cystéine est concevable seulement si l'environnement chimique dans lequel le résidu est placé détermine une diminution du pKa qui favorise la déprotonation de sulfhydryle (-SH) en forme thiolate (-S-) (Filomeni et al., 2005). Cette condition implique que seulement un ou peu de cystéines deviennent réactives. Les modifications oxydatives de cystéines réactives spécifiques semblent être fortement sélectives et dépendent de la structure tridimensionnelle de chaque protéine ; et la phosphorylation de sérine/thréonine ou des résidus tyrosine n'aura pas lieu si la reconnaissance spécifique protéine/protéine n'a pas lieu.

La similitude entre signalisation redox et signalisation phosphorylative est également la réversibilité du processus (Tableau 4). Concernant les différences les plus importantes entre les deux voies de signalisation sont la modalité de la réponse cellulaire et le mécanisme mis en jeu : cascade de réactions avec contrôles à différents niveaux pour la signalisation phosphorylative, et modulation directe de type ON/OFF pour la signalisation redox (Tableau 5).

Tableau 4. Similarités entre signalisations redox et phosphorylative (Filomeni et al., 2005).

Redox +++	Specificity	Phospho ++
Single aminoacid (cys) Sensitivity to oxidation (chemical environment)		polar -OH aminoacids (Ser-Thr) Protein/protein recognition (external surface)
Redox ++	Reversibility	Phospho +++
Enzyme dependent (Irx/Irx-Red-Grx/Grx-Red) Energy-dependent (NADPH-reducing power)		Enzyme dependent (protein phosphatases-PP) Energy-dependent (ATP-PP phosphoactivation)

Tableau 5. Différence entre signalisation redox et phosphorylative (Filomeni et al., 2005).

Modality of response	
Redox	Phospho
<i>'Buffer' response</i> Passive Energy independent Proportional to the oxidation degree	<i>'Explosive' response</i> Active Energy dependent Highly inducible
Downstream effects	
Redox	Phospho
<i>Direct modulation</i> Target protein is the final effector of signaling ↓ Unidirectional one-step modulation (ON/OFF)	<i>Cascade reaction</i> Sequential steps of phosphoactivation ↓ Coordinated network (control at multiple steps)

Chapitre 3: Revue bibliographique sur le cadmium

I. Effets physiopathologiques liés à l'exposition au cadmium

I.1. Présentation du cadmium

Le cadmium est un métal lourd du groupe IIB de la classification de Mendeleïev. Il se trouve dans l'environnement sous forme de sel inorganique (oxyde de cadmium (CdO), chlorure de cadmium (CdCl₂), ou sulfate de cadmium (CdSO₄)). Le cadmium a été désigné par l'IAIRC (*International Agency for Research on Cancer*) comme un cancérigène de catégorie 1 par inhalation.

Les deux principales voies d'absorption sont l'inhalation et l'ingestion. Néanmoins, Le tabagisme constitue la principale source d'exposition au cadmium, chaque cigarette contient 1 à 2 µg de Cd et 40 à 60% du cadmium inhalé passe à travers l'épithélium pulmonaire (ATSDR, 1999). Par voie pulmonaire, une fraction du cadmium se dépose le long du tractus respiratoire en fonction de la taille des particules. Puis selon l'hydro solubilité, les sels les plus solubles : chlorures et oxydes sont absorbés à environ 90-100 % et les sulfures sont absorbés à hauteur de 10 %. Cette absorption peut se poursuivre pendant plusieurs semaines même après une inhalation unique. Par voie digestive, l'absorption est d'environ 5%. Le taux d'absorption du cadmium est directement lié à la forme chimique. Ce taux d'absorption peut être augmenté lors de carences alimentaires en calcium, en fer, en zinc, en cuivre ou en protéines. Le cadmium est transporté dans le sang fixé à l'hémoglobine ou aux métallothionéines. Le cadmium se concentre principalement dans le foie et les reins (entre 50 % et 70 % de la charge totale). Il est également retrouvé dans le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et les glandes salivaires. Dans les différents tissus, le cadmium se fixe sélectivement sur les métallothionéines. Les différents dommages cellulaires suite à une exposition chronique s'expliquent par le fait que seulement une très faible proportion de cadmium est excrétée de l'organisme (< 10%) principalement dans l'urine et les selles (Jarup, 2002). Les dommages qui en résultent sont des lésions hépatiques ou rénales, des dommages pulmonaires plus ou moins intenses pouvant engendrer des cancers, ainsi qu'une perturbation de la calcification/décalcification conduisant même pour des expositions extrêmement prolongées à un remodelage osseux.

Les mécanismes par lesquelles le cadmium engendre ces pathologies ne sont pas entièrement compris mais sa capacité à produire un stress oxydant semble importante dans le mécanisme de cancérogenèse.

1.2. Principales sources d'exposition

Le cadmium rejeté dans l'atmosphère provient de sources naturelles et anthropiques. Cependant, les activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier constituent les principales sources de rejet atmosphérique.

Dans l'eau, le cadmium provient de l'érosion naturelle, du lessivage des sols ainsi que des décharges industrielles et du traitement des effluents industriels et des mines.

1.3 Effets physiopathologiques

1.3.1 Effets cancérigènes

Différentes études réalisées en milieu professionnel, et correspondant à des expositions par inhalation, ont montré une augmentation significative de la mortalité par cancer pulmonaire (IARC, 1993). Chez le rat, l'inhalation de chlorure de cadmium, d'un mélange de sulfure et de sulfates de cadmium, de fumée ou de poussières d'oxyde de cadmium induit une augmentation des tumeurs pulmonaires malignes pour de faibles niveaux d'exposition et de courtes durées d'exposition (IARC, 1993). Il existe cependant des différences de réponse en fonction de l'espèce étudiée

1.3.2 Effets sur le système rénal

Le principal organe cible est le rein. L'exposition chronique au cadmium entraîne l'apparition d'une néphropathie irréversible pouvant évoluer vers une insuffisance rénale. Une dégénérescence des cellules tubulaires rénales se manifeste précocement, elle est suivie par une réaction inflammatoire interstitielle puis une fibrose. Classiquement, une élimination accrue des protéines de faible poids moléculaire est observée : bêta2-microglobuline, protéine de liaison du rétinol (RBP), protéine de liaison de la vitamine D, lysosyme, ribonucléase, alpha1-microglobuline. Cette protéinurie peut s'accompagner de glucosurie et d'aminocidurie et d'une fuite de calcium (Thun *et al.*, 1989; Lauwerys, 1990; Chia *et al.*, 1989; Bernard *et al.*, 1990; Roels *et al.*, 1991; Jakubowski *et al.*, 1992).

1.3.3 Effets sur le système nerveux

L'administration orale prolongée de chlorure de cadmium à des rats conduit à une poly-neuropathie périphérique (Haguenoer et Furon, 1982). La principale lésion est une dégénérescence myélinique, l'examen ultrastructural des racines et des nerfs sciatiques a révélé une démyélinisation segmentaire commençant au nœud de Ranvier, il y'a aussi une autophagocytose des cellules de Schwann. D'autre part, il se produit une remyélinisation,

mais plus fine ou anormale. Les modifications au niveau des axones sont minimes, on note une accumulation de glycogène sous forme de glycogénosomes avec perturbation fonctionnelle axonale (Haguenoer et Furon, 1982).

1.3.4 Effets sur l'os

Les lésions osseuses apparaissent tardivement chez les sujets exposés après environ 15 à 20 ans, mais des cas sont apparus après moins de 5 ans d'exposition. Il s'agit souvent de douleurs au niveau des membres inférieurs ou des extrémités, parfois au niveau du thorax. Ces douleurs sont diffuses. La radiologie révèle des stries osseuses transversales, pseudo-fracturaires, sans déplacement. Ces traits siègent surtout au niveau du bassin, du col du fémur, aux omoplates, aux cubitus (Berglund et al, 2000). Dans certains cas, et particulièrement au Japon, on a également observé une déminéralisation du squelette chez les individus souffrant de la maladie « itai-itai ». Cette maladie est la conséquence de plusieurs facteurs concomitants, une contamination par le cadmium associée à une déficience nutritionnelle, surtout en calcium, et à des perturbations hormonales. C'est ainsi que l'itai-itai apparaît surtout chez des femmes âgées de 45 à 70 ans, ou après des facteurs inducteurs comme la grossesse ou la lactation. Ces femmes vivaient le long d'une rivière, en aval d'une usine de cadmium qui contaminait l'eau et les rizières (Verougstraete and Bernard, 2001).

Si la toxicité osseuse du cadmium lors d'une exposition est clairement établie chez les populations souffrant de troubles du métabolisme du calcium, les études les plus récentes montrent que des atteintes osseuses ont également été mises en évidence chez des personnes ayant un métabolisme calcique normal pour des concentrations n'induisant pas de lésions rénales. Les mécanismes osseux affectés par l'exposition au cadmium ne sont pas clairement identifiés ; cependant un rôle dans la genèse de l'ostéoporose et de l'ostéomalacie est probable (INERIS, 2005).

1.3.5 Effets sur le système de reproduction

Chez l'animal, le cadmium s'est montré expérimentalement très toxique pour des concentrations assez faibles chez le rat et la souris. Il provoque des hémorragies testiculaires suivies d'une nécrose irréversible de l'épithélium des tubes séminifères, alors que les lésions de la glande interstitielle seraient temporaires. Le cadmium provoquerait des cancers du tissu de Leydig.

Chez l'homme, le cadmium provoque une nécrose des tubes séminifères associée à une intense fibrose interstitielle avec insuffisance androgène modérée et impuissance sexuelle. Le cadmium a été incriminé comme agent étiologique possible du faible poids de naissance

observé chez des enfants de mères exposées professionnellement ou indirectement par l'alimentation et / ou la consommation de tabac au cadmium.

II. Systèmes d'entrée-sortie cellulaires du cadmium

Le cadmium ne possède aucune voie d'entrée spécifique, il agit par mimétisme avec des métaux physiologiques ou d'autres molécules afin de traverser les membranes cellulaires et ce par divers mécanismes dépendants du type cellulaire et du tissu biologique.

2.1. Divalent Metal Transporter 1

DMT1 est une protéine de la membrane plasmique permettant l'import de fer non hémérique à travers certaines barrières biologiques comme la membrane apicale des entérocytes du duodenum. Quatre isoformes principales de DMT1 ont été identifiées (Hubert and Hentze, 2002). L'ARNm de deux d'entre elles contient un motif IRE (*Iron Responsive Element*), leur traduction est favorisée par la fixation des protéines IRP (*Iron Regulatory Proteins*). DMT1 est impliqué dans l'absorption du cadmium intestinal (Tallkvist et al, 2001) (Figure 26) car une répression de ce transporteur dans les entérocytes humains induit par un traitement riche en fer ou par extinction de l'ARNm de DMT-1 provoque une diminution de l'entrée de fer et de cadmium (Bannon et al., 2003). Au contraire une surproduction de DMT-1 augmente fortement la concentration de cadmium intracellulaire (Bressler et al., 2004).

2.2. Les transporteurs du zinc

Le cadmium a la structure électronique $[\text{Kr}] 5s^2 4d^{10}$ qui peut se comparer à celle du zinc $[\text{Ar}] 4s^2 3d^{10}$. Ces deux éléments font ainsi partie de la même colonne du tableau périodique ce qui confère au cadmium certaines propriétés physico-chimiques semblables à celle du zinc. Plusieurs études mettent en évidence le rôle protecteur du zinc vis-à-vis du cadmium.

- Les protéines de la superfamille ZIP (*Zrt/Irt-like Proteins, SLC39*) ont pour rôle la captation du zinc à partir du milieu extracellulaire ou des organites internes vers le cytosol, et assurent ainsi l'approvisionnement de la cellule en métal. Elles ne contiennent pas de sites de fixation pour l'ATP, ni de domaine ATPase. Quatorze protéines de cette famille ont été identifiées chez les mammifères (Cousins et al., 2006); certaines d'entre elles sont tissu- et organite-dépendantes. Récemment, un nouveau transporteur d'intérêt pour la prise en charge du cadmium a été identifié : il s'agit de Zip8. La présence de ce transporteur au niveau de la membrane plasmique des cellules vasculaires endothéliales de testicules de souris conduit à

une augmentation de l'influx du cadmium. Le transport du Cd s'effectue de façon optimale à 37°C et pH 7.5 et dépend de la présence de carbonate. Le manganèse est le seul cation testé parmi une douzaine d'autres capables d'inhiber le transport de cadmium. Il est donc suggéré que le manganèse soit le substrat physiologique de Zip8 qui fonctionnerait comme un symport d' HCO_3^- (He et al., 2006).

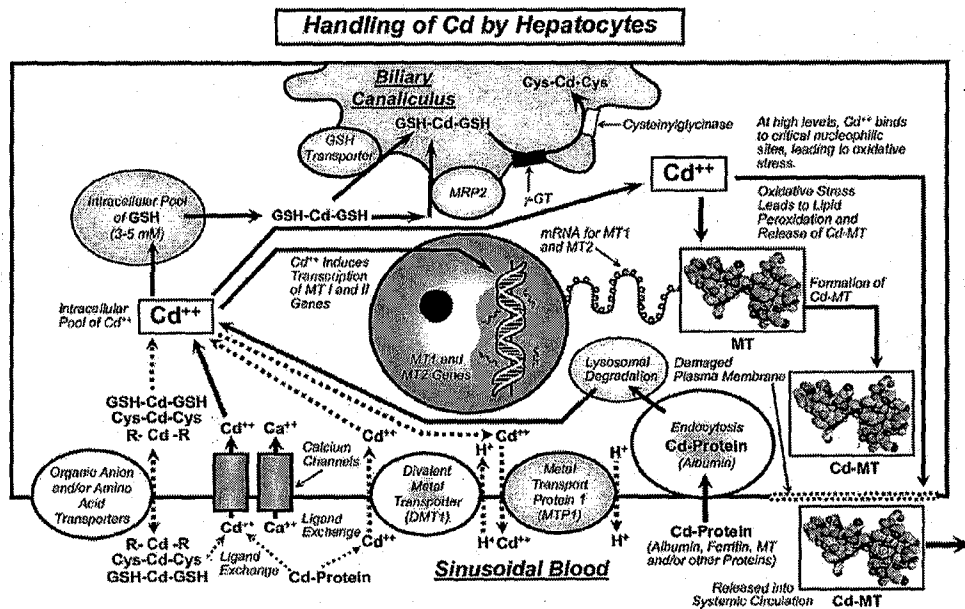
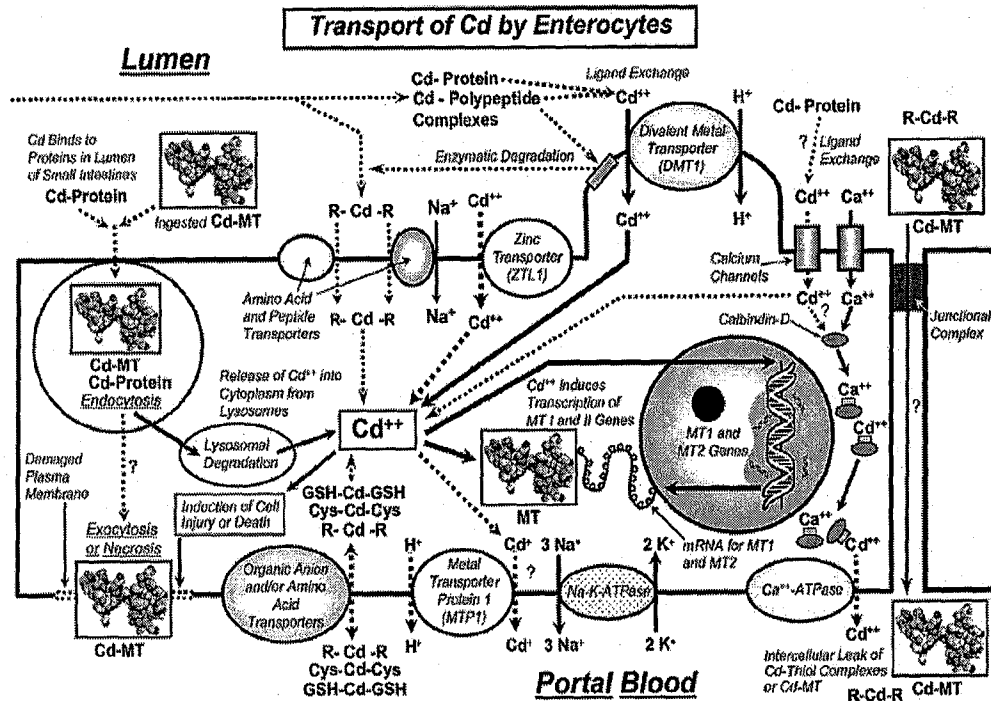


Figure 26: Représentation schématique des mécanismes de transport de cadmium au niveau des entérocytes et des hépatocytes (Zalups and Ahmad, 2003).

- Les transporteurs ZnT assurent l'efflux de l'excès de zinc hors du cytosol. Néanmoins, ces transporteurs fonctionnent de manière bidirectionnelle (Valentine et *al.*, 2007). La plupart des ZnT sont localisés dans des compartiments cellulaires et associés aux endosomes, à l'appareil de Golgi ou encore au réticulum endoplasmique. Seul ZnT-1 est ubiquitaire dans la membrane cytoplasmique, ce qui s'accorde avec son rôle de régulation par efflux du zinc intracellulaire (Palmiter and Findley, 1995). Le promoteur du gène ZnT-1 contient deux éléments de réponse aux métaux ou MRE (*Metal Responsive Element*), qui fixent le facteur de transcription MTF-1. Alors qu'aucune évidence directe sur l'efflux de cadmium par ZnT-1 ou d'autres ZnT n'a été rapportée, l'expression du gène ZnT-1 est rapidement induite via les éléments MRE par le zinc et le cadmium dans des viscères de l'endoderme d'embryons de souris et dans des lignées cellulaires fibroblastiques d'embryon de souris (Langmade et *al.*, 2000), ainsi que dans des cellules cancéreuses de prostate humaine (Hasumi et *al.*, 2003). Récemment, ZnT-1 a été proposé comme jouant un rôle dans l'entrée de cations divalents via les canaux calciques de type L (LTCC) (Ohana et *al.*, 2006).

2.3. Les canaux calciques

Les canaux calciques, notamment voltage dépendants, sont hautement sélectifs pour le calcium ; cependant le transport d'autres cations divalents comme le cadmium est possible dans certaines conditions. En effet, le cadmium possède un rayon ionique (0.99\AA) proche de celui du calcium (0.97\AA), ce qui lui permet d'emprunter certains de ces canaux.

- **Canaux calciques de type T**

Ils sont activés pour des potentiels de membrane faibles, ils possèdent une faible conductance, une cinétique d'inactivation rapide et une désactivation lente (la désactivation d'un canal correspond au retour à l'état fermé d'un canal ouvert sans que celui-ci ne transite par un état inactivé). Ce type de canal est très fortement exprimé dans la plupart des régions du cerveau ainsi qu'à plus faible niveau dans le cœur, le placenta, les poumons et les reins. Trois sous unités ont été identifiées : α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} . Une étude effectuée sur des fibroblastes murins ne possédant pas de métallothionéines a permis de mettre en évidence le rôle de la sous unité α_{1G} d'un canal calcique de type T nommé $\text{Cac}\alpha_{1G}$ dans l'entrée de cadmium. La présence ou non de ce canal est responsable de la résistance de ces cellules vis-à-vis du cadmium (Leslie et *al.*, 2006).

- **Canaux calciques de type L**

Les canaux calciques de type L sont activés pour des potentiels de membrane élevés, ils possèdent une forte conductance et une cinétique d'inactivation lente. Ce type de canal

représente une voie d'influx de cadmium importante dans les cellules excitables telles que les hépatocytes (Souza et al., 1997) ou les neurones (Usai et al., 1999).

2.4. Les pompes d'efflux

Les protéines de la famille des MRP (*Multidrug Resistance Proteins*) sont impliquée dans l'efflux de nombreux xénobiotiques. Ces protéines ont un rôle protecteur vis-à-vis de l'accumulation de xénobiotiques et notamment les métaux lourds (Leslie et al., 2005). Les protéines MRP appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*) (Deeley and Cole, 2006) responsables du transport actif à travers les membranes d'un large panel de composés (stéroïdes, polysaccharides, etc.).

La distribution tissulaire des transporteurs ABC chez l'homme tels que MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2) et la P-glycoprotéine (ABCB1) concorde avec la sensibilité de certains organes aux toxiques environnementaux. La MRP1 a une grande affinité pour le cysteinyl leucotriène C₄, elle est responsable de la libération de cytokine en réponse à un stimuli inflammatoire (Deeley and Cole, 2006).

La P-glycoprotéine (P-gp) est la pompe MDR (*Multidrug Resistance*) qui permet l'efflux préférentiel des composés hydrophobes et des molécules chargées positivement contrairement aux MRP qui prennent en charge indifféremment les composés cationiques et anioniques. L'expression de P-gp est proportionnelle à la concentration en cadmium dans les cellules intestinales Caco-2 (Huynh-Delerme et al., 2005). MRP2 a été mis en évidence comme principal transporteur intervenant dans l'efflux du cadmium biliaire conjugué au GSH (Paulusma et al., 1997), chez des rats Wistar TR⁻ (transport déficient) et des rats Sprague-Dawley EHBR (*Eisai hyperbilirubinic*) dont la protéine MRP2 n'était pas fonctionnelle suite à une mutation (Ballatori et al., 2005).

2.5. Les transporteurs de manganèse

En plus du Zip8 dont le substrat physiologique serait le manganèse, d'autres systèmes sont impliqués dans l'influx du manganèse chez les mammifères et semblent être responsables de l'entrée de cadmium. Ainsi dans divers types cellulaires comme les cellules épithéliales HeLa, les ostéoblastes ou des cellules issues de tubules proximaux ou distaux de rein, une concentration de manganèse dix fois supérieure à celle du cadmium permet de bloquer son entrée (Martin et al., 2006). Cela a aussi été mis en évidence grâce à l'utilisation d'une lignée cellulaire résistante vis-à-vis du cadmium développée à partir de fibroblastes d'embryons de souris déficientes en MT-I et -II et exposée au cadmium pendant une longue durée (Himeno et al., 2002).

Dans la lignée résistante, il a été observé une diminution de l'incorporation et de très faibles concentrations de manganèse et de cadmium, ce qui suggère que la suppression d'un transporteur de haute affinité du manganèse soit impliquée dans la résistance au cadmium (Himeno et al., 2002). Des expériences d'incorporation compétitive ont révélé que les deux métaux partagent la même voie d'entrée de haute affinité et que l'entrée optimale des deux métaux est obtenue à pH neutre (Yanagiya et al., 2000).

III. Mécanismes moléculaires de toxicité du cadmium

3.1 Interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels

Les mécanismes de toxicité du cadmium par interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels interviennent à plusieurs niveaux. Ce processus est complexe du fait que le cadmium ne possède pas une voie d'influx qui lui soit propre. Il interfère avec le zinc au niveau de certaines métallothioneines, ou des facteurs de transcription à doigts de zinc. Il modifie les signaux calciques intracellulaires avec des conséquences sur les voies de signalisation. Il dérégule l'homéostasie du fer, etc.

3.2 Production d'espèces réactives de l'oxygène

Le cadmium n'est pas un métal redox et donc ne catalyse aucune réaction de type Fenton. Il ne peut générer directement des espèces réactives de l'oxygène mais il agit indirectement en induisant un dysfonctionnement des systèmes antioxydants et une modification du potentiel redox intracellulaire, reflet du statut redox intracellulaire, qui peut se définir comme étant la somme des produits des potentiels de réduction des différents couples redox intracellulaires et des équivalents réducteurs correspondants (Schafer and Buettner, 2001).

3.3 Effet du cadmium sur les systèmes de réparation de l'ADN

La carcinogénicité du Cd peut être expliquée par sa capacité à induire les ERO, les dommages de l'ADN et par son interférence avec les systèmes de réparation de l'ADN (Filipic and Hei, 2004) (Figure 27). Cette interférence est associée avec une inhibition des différentes protéines impliquées dans le système MMR (*mismatch repair*), NER (*nucleotide excision repair*) et BER (*base excision repair*) (Giaginis et al., 2006) (Tableau 6).

Bravard et al. (2006) ont montré qu'une exposition aiguë de cellules humaines au cadmium entraîne une inhibition transitoire quasi totale de l'activité la 8-oxoguanine DNA

glycosylase de type I de l'homme (hOGG1) nécessaire à la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN.

Le stress oxydatif induit en effet la formation de dommages oxydatifs de l'ADN dont le plus fréquent est l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine. En l'absence de réparation, cette lésion entraîne l'apparition de mutations. Elle est normalement reconnue et excisée par la 8-oxoguanine glycosylase : hOGG1. Les chercheurs ont démontré que le stress oxydant intense induit non seulement l'oxydation des bases de l'ADN mais également une oxydation de la protéine OGG1 qui entraîne son incapacité à réparer les dommages. Lorsque l'état cellulaire se normalise la protéine hOGG1 retrouve un état redox normal, et recouvre entièrement son activité. Ces résultats confirment donc le rôle central du stress oxydatif dans les mécanismes d'action du cadmium et mettent en évidence un nouveau mécanisme de régulation de la protéine hOGG1.

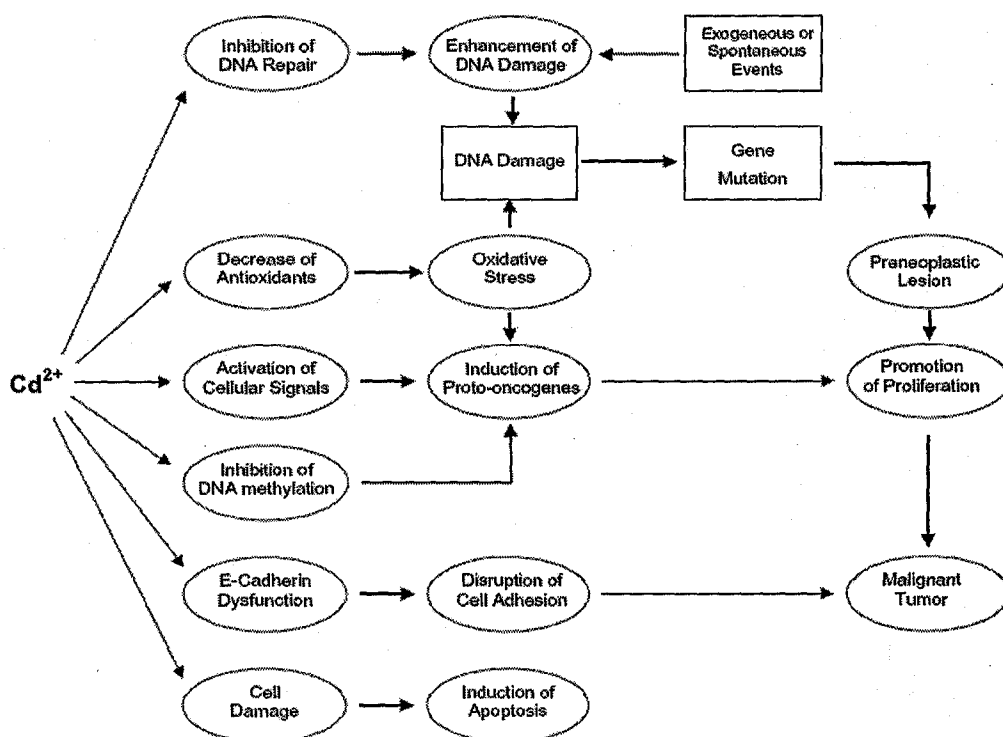


Figure 27: Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium (Waisberg et al., 2003).

Dans la première colonne, sont décrites les cibles biochimiques immédiates du Cd. La deuxième colonne présente les conséquences au niveau de la physiologie cellulaire : inhibition de la réparation de l'ADN; inhibition des antioxydants entraînant ainsi le stress oxydant; activation des signaux et induction des proto-oncogènes cellulaires; inhibition de la méthylation de l'ADN; rupture de l'adhérence cellule-cellule. La colonne de droite montre les liens probables entre les différentes étapes dans la carcinogenèse.

Tableau 6 : Effets du cadmium sur les systèmes de réparation de l'ADN (Bertin and Averbeck, 2006).

DNA repair system	Consequences	References
<i>MMR</i>		
Msh2-Msh6 complex	↓ ATP hydrolysis ↓ DNA binding	Clark and Kunkel, 2004 Banerjee and Flores-Rozas, 2005
Msh2-Msh3 complex	↓ Activity	Clark and Kunkel, 2004
<i>NER</i>		
XPA	↓ DNA binding capacity	Hartmann and Hartwig, 1998; Hartwig et al., 2002
<i>BER</i>		
Fpg (<i>E. coli</i>)	↓ Fpg activity	Asmuss et al., 2000
hOGG1	↓ mRNA and protein levels, caused by an inhibition of the DNA binding capacity of Sp1 transcription factor.	Potts et al., 2003; Youn et al., 2005
Apel	↓ Nuclease activity	McNeill et al., 2004
PARP	↓ Activity	Hartwig et al., 2002

3.4 Effets du cadmium sur la régulation des gènes

3.4.1 Induction des métallothionéines (MT) et MTF-1

Les MT sont des protéines de faibles masses moléculaires (6–7 kDa), riches en cystéines (30% de cystéines, pas d'acides amines aromatiques, ni d'histidine), ce qui leur permet de complexer les cations métalliques par leurs groupements thiols et ainsi d'avoir une teneur importante en métal. Les MT diminuent ainsi la disponibilité du cadmium dans la cellule ce qui réduit sa toxicité (Beattie et al., 2005). Le cycle redox des métallothionéines joue un rôle crucial dans les fonctions biologiques (Figure 28). Les métallothionéines constituent une superfamille de protéines avec 4 isoformes (MT-I, MT-II, MT-III et MT-IV) identifiés (Nielsen et al., 2006). Elles sont caractérisées par la présence de motifs Cys – X – Cys, Cys – X – X – Cys, où X est un acide aminé autre que la cystéine, et par la présence de cystéines vicinales. La chaîne polypeptidique forme deux domaines globulaires appelés α et β . Les MT peuvent lier jusqu'à sept atomes de cuivre, de zinc ou de cadmium. Le domaine α lie 4 atomes de métal alors que β en lie 3 (Figure 29). En présence de cadmium, il se produit une redistribution des atomes de zinc préférentiellement sur la chaîne β . Chez l'homme la majeure partie des tissus n'exprime que deux isoformes de MT désignées MT-I et MT-II.

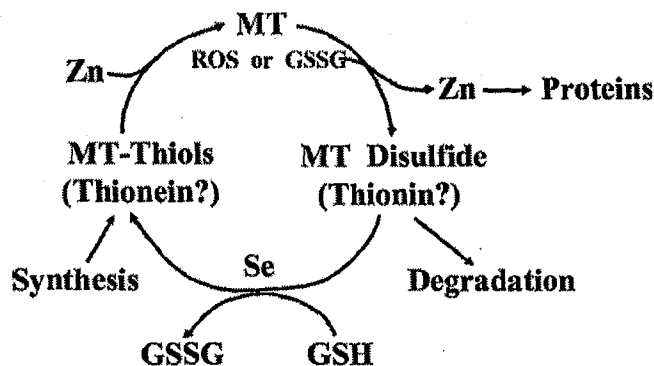


Figure 28: Cycle redox des métallothionéines (Kang, 2006)

Les séquences capables de réguler l'activité transcriptionnelle des gènes de métallothionéines sous l'effet d'ions métalliques sont appelées MRE (*Metal Responsive Element*). La séquence consensus MRE est de type TGCRCNC, où R représente A ou G et N représente l'un des quatre nucléotides (Stuart et al., 1985). Les séquences régulatrices des gènes de métallothionéines contiennent également une région de type « GC box » (GGGGCGGGG) sur laquelle se fixe le facteur de transcription Sp1 permettant ainsi d'augmenter l'efficacité de la transcription. Il existe également une région répondant aux radicaux libres et autres agents oxydants appelée ARE (*Antioxidant Responsive Element*) sur laquelle se fixe la protéine leucine zipper (structure hélice-boucle-hélice) USF (*Upstream Stimulatory Factor*) en réponse, entre autres, au cadmium et au peroxyde d'hydrogène.

Le promoteur de MT-I de souris contient une séquence consensus ARE qui se superpose avec un site de liaison d'USF. Ce motif USF/ARE répond directement à l'administration de cadmium mais pas de zinc. La délétion de ce motif dans la MT-1 de souris réduit de moitié la réponse au cadmium (Andrews, 2000).

La structure de MTF-1 (*Metal-responsive element binding transcription factor-1*) est bien conservée (Jiang et al., 2003) (Figure 30). C'est une protéine possédant six doigts de zinc Cys₂-His₂ qui se fixe sur les motifs MRE de MT, de ZnT-1 ou de la chaîne lourde de la γ -glutamate-cystéine ligase, et d'autres gènes (Jiang et al., 2003) (Figure 31). MTF-1 est régulé positivement par le zinc uniquement, bien que le cadmium induise l'expression des gènes des MT. La liaison de hMTF-1 au motif MREa est spécifique d'une séquence consensus TGCRCNC. MTF-1 humaine possède également un variant appelé ZRF (*Zinc Regulatory Factor*) décrit dans les cellules HeLa mais ne différant de hMTF-1 que d'un acide aminé dans le second motif à doigt de zinc (Koizumi et al., 1999).

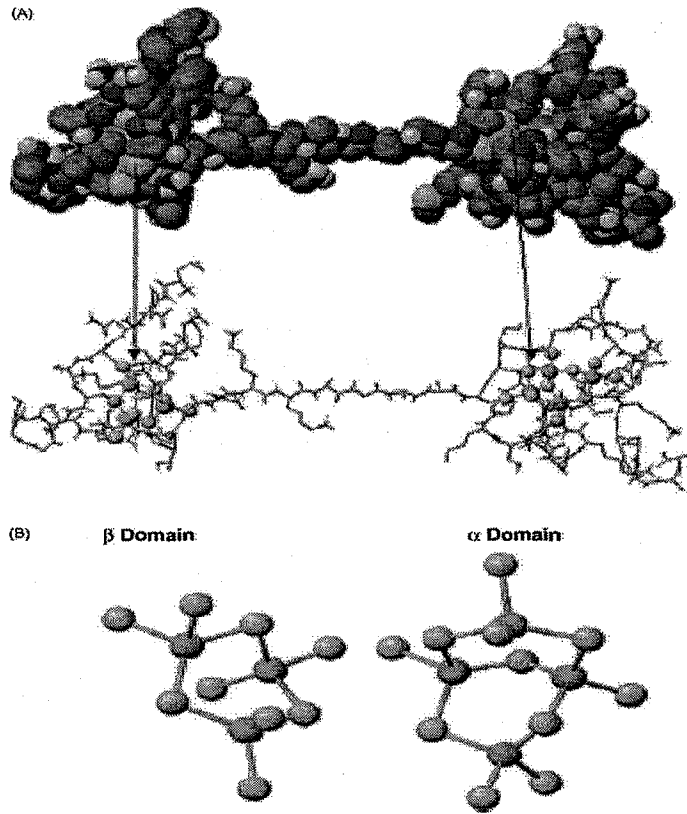


Figure 29: Structure tridimensionnelle de métallothionéine hépatique de lapin (Cd7-MT-IIA). [Légende des atomes: vert, Cd²⁺; jaune, S; gris, C; bleu, N; rouge, O] (Stankovic et al., 2007)

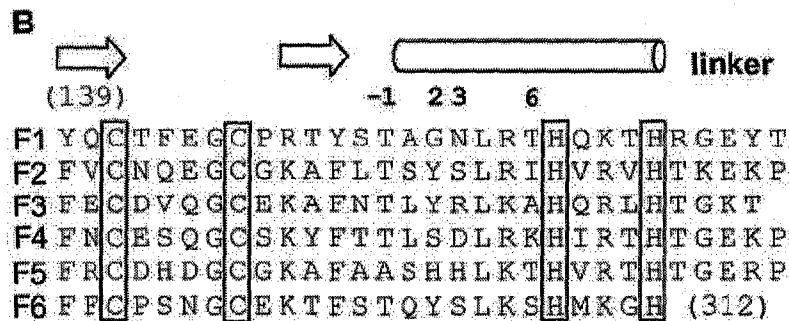
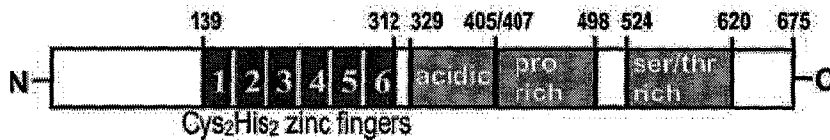


Figure 30: Représentation schématique du gène MTF-1 (Potter et al., 2005)
 A, MTF-1 constitué de six Cys₂His₂ Zinc finger suivi d'une région acide riche en Proline et une autre riche en Ser/thr . B, séquence d'acides aminés du domaine zinc finger du MTF-1 (résidus 139 à 312).

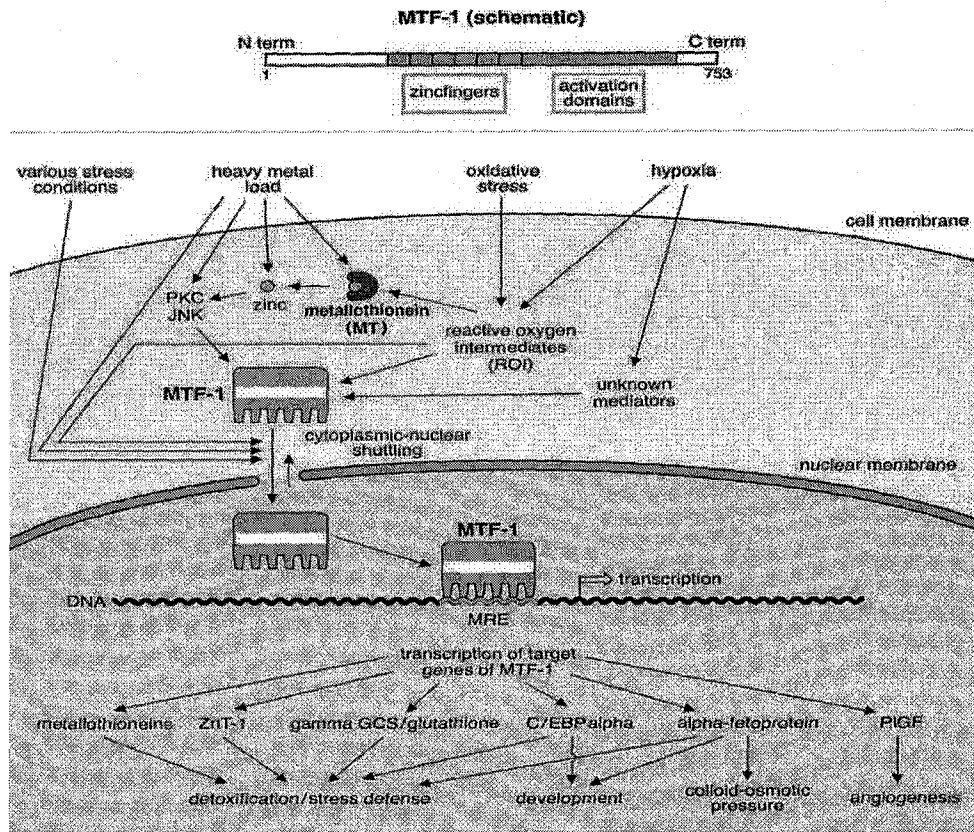


Figure 31: Le hMTF-1 et les voies d'activation en aval du MTF-1 (Lichtlen and Schaffner, 2001)

3.4.2. Induction de la synthèse du glutathion

La synthèse de glutathion, consommatrice d'ATP, est assurée par l'action séquentielle de deux enzymes cytosoliques ubiquitaires, la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) et la glutathion synthétase (Figure 32). La formation de γ -glutamylcystéine étant l'étape limitante de la synthèse de glutathion, la synthèse *de novo* de glutathion est principalement influencée par l'activité γ -GCS, les concentrations de ses substrats et celle du glutathion, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité γ -GCS.

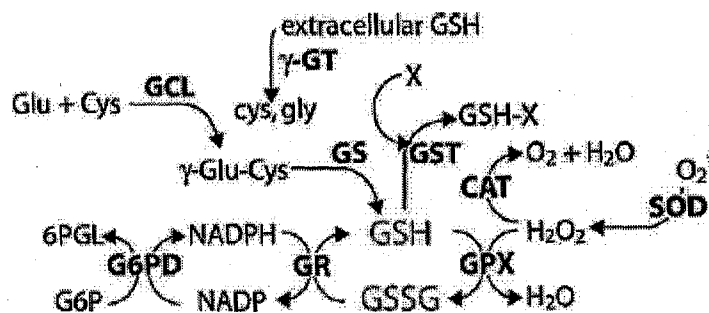


Figure 32 : Métabolisme du glutathion

La γ -GCS est une enzyme constituée de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice et une sous-unité catalytique (Huang *et al.*, 1993). Les quantités relatives et absolues de ces deux sous-unités varient d'un tissu à un autre et, pour un même tissu, d'une espèce à une autre (Griffith, 1999). En l'absence de sous-unité régulatrice, la sous-unité catalytique, qui présente tous les sites de fixation pour les substrats de l'enzyme et l'ATP, est fonctionnelle, mais son activité est 3 à 15 fois plus faible que celle de l'holoenzyme, selon les espèces (Huang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2006). La sous-unité régulatrice module l'affinité de la sous-unité catalytique pour ses substrats et ses inhibiteurs (Seelig *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1993). La régulation de l'activité γ -GCS est complexe et modulée par de nombreux facteurs susceptibles d'agir simultanément à différents niveaux : transcription, stabilité des ARN messagers, traduction, modulations post-traductionnelles par phosphorylation et formation de l'holoenzyme (Griffith, 1999). La transcription des gènes codant pour la γ -GCS est principalement influencée par des facteurs associés au stress et à l'inflammation. Il a été montré que le cadmium à faibles concentrations, pouvait induire la transcription des gènes de la γ -GCS et des glutathion-S-transférases (GST- α et GST- π) qui contiennent des motifs MRE. La biosynthèse accrue de GSH en présence de cadmium serait un mécanisme de protection dans lequel le cadmium se fixe aux groupements thiols du GSH, ce qui prévient contre des dommages cellulaires. Dans des conditions de stress oxydant et/ou de stress nitrosant, la transcription des gènes codant pour les deux sous-unités de l'enzyme est accrue (Shi *et al.*, 1994; Moellering *et al.*, 1998), ainsi que la formation de l'holoenzyme (Pastore *et al.*, 2003). L'effet du stress oxydant sur la transcription des gènes codant pour la γ -GCS implique un site de type ARE/EpRE (*antioxydant and electrophile response element*) présent sur les promoteurs des gènes de chacune des sous-unités de la γ -GCS (Dickinson *et al.*, 2004). De même, les cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-1 β , activent la transcription des gènes codant pour la γ -GCS, par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription NF- κ B, qui possède un site de liaison sur le promoteur de la Glutamate Cysteine Ligase (GCL) (Dickinson *et al.*, 2004).

In vitro, la disponibilité en glutamate est également susceptible d'affecter la synthèse de glutathion (Griffith, 1999). Un premier mécanisme implique la modulation de la captation de cystine par l'intermédiaire d'un échangeur cystine/glutamate. Cet échangeur fonctionne principalement dans le sens d'un efflux de glutamate (gradient sortant de concentration), qui s'accompagne d'une entrée de cystine dans la cellule. En présence d'un excès de glutamate extracellulaire, l'activité du transporteur est réduite, limitant ainsi l'entrée de cystine dans la cellule. Un second mécanisme a été proposé sur des modèles de cellules qui captent

directement la cystéine et non sa forme oxydée, la cystine. Dans ces cellules, de fortes concentrations en glutamate favoriseraient la synthèse de glutathion en levant le rétrocontrôle négatif exercé par le glutathion sur l'activité γ -GCS. Cependant, la signification physiologique de cette modulation par le glutamate observée *in vitro* est très incertaine, au vu de la stabilité des concentrations intra et extracellulaires de cet acide aminé. Enfin, l'activité γ -GCS est sensible à une inhibition compétitive exercée par le glutathion et la γ -glutamylcystéine. Les résidus glutamyl et cysteinyl de ces peptides viennent occuper respectivement les sites de fixation du glutamate et de la cystéine, réduisant ainsi l'activité enzymatique. La formation de l'holoenzyme est associée à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le glutathion et la γ -glutamylcystéine (Huang *et al.*, 1993).

3.4.3. Induction de l'expression des HSP

Chez l'humain, les Hsp majeures ont des masses moléculaires de 90, 70, 60, 40 et 27 kDa et sont dénommées Hsp90, Hsp70, Hsp60, etc. Les gènes eucaryotes codant pour les Hsp possèdent un promoteur particulier, HSE (*heat shock element*), contenant au moins trois motifs nGAAn en répétition inversée. Les différents agents ou conditions induisant la réponse au stress agissent sur le facteur de transcription HSF-1 (*heat shock transcription factor-1*), présent et inactif dans le cytoplasme. Après une étape de phosphorylation et de trimérisation, HSF-1 migre dans le noyau, se lie aux sites HSE sur l'ADN et active la transcription des gènes codant pour les Hsp (Arrigo, 2005) (Figure 33).

L'activation des MAP (*mitogen activated proteins*)-kinases telles que ERK ou p38 par le cadmium conduit à une augmentation de phosphorylation de HSF-1 qui aboutit à l'induction de Hsp70 (Hung *et al.*, 1998). Diverses Hsp sont surproduites suite à des expositions au cadmium; cela varie en fonction de la dose administrée et de la sensibilité des types cellulaires utilisés.

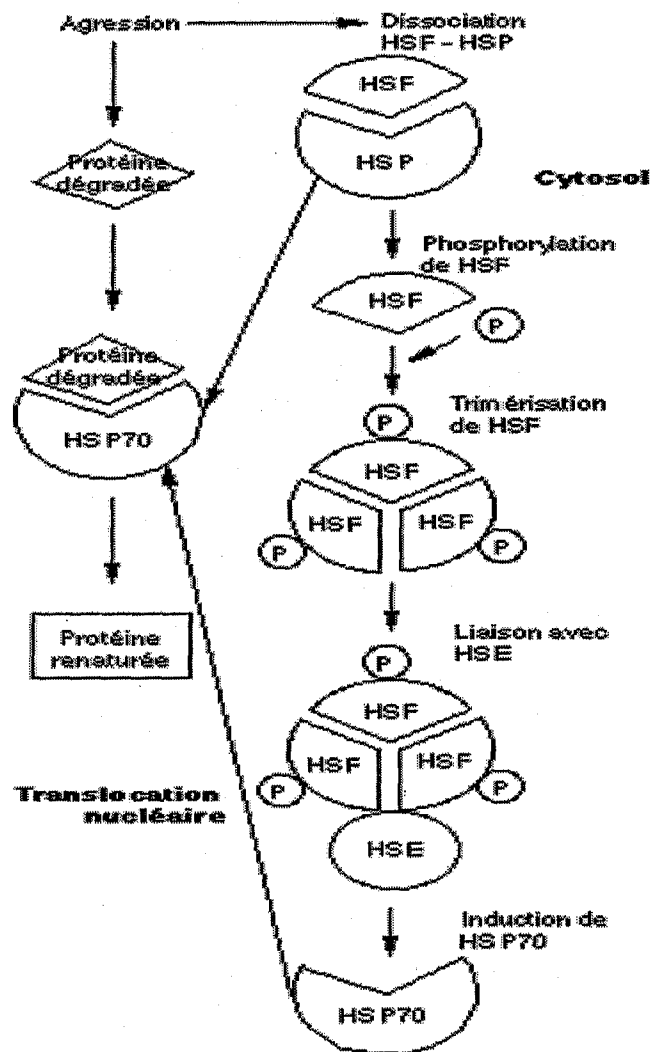


Figure 33: Mécanisme d'activation des HSP 70 (David, 2001)

3.5 Effets du cadmium sur la signalisation cellulaire

Un des aspects majeur relevé au cours de la régulation de la réponse au stress et de l'apoptose est la participation des kinases MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), une famille de sérine/thréonine kinases, qui assurent la transduction du signal intracellulaire en réponse à des différents stimulus (Galan *et al.*, 2000). Chez les mammifères, trois catégories majeures de la famille des MAPK sont principalement distinguées : *Extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK, incluant ERK1 et 2 isoformes), *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK, incluant JNK1, 2 et 3 isoformes), aussi appelé *stress-activated protein kinase* (SAPK), et p38 (incluant les isoformes p38 α , β , γ et δ) (Roux and Blenis, 2004 ; Fugino *et al.*, 2006) (Figure 34).

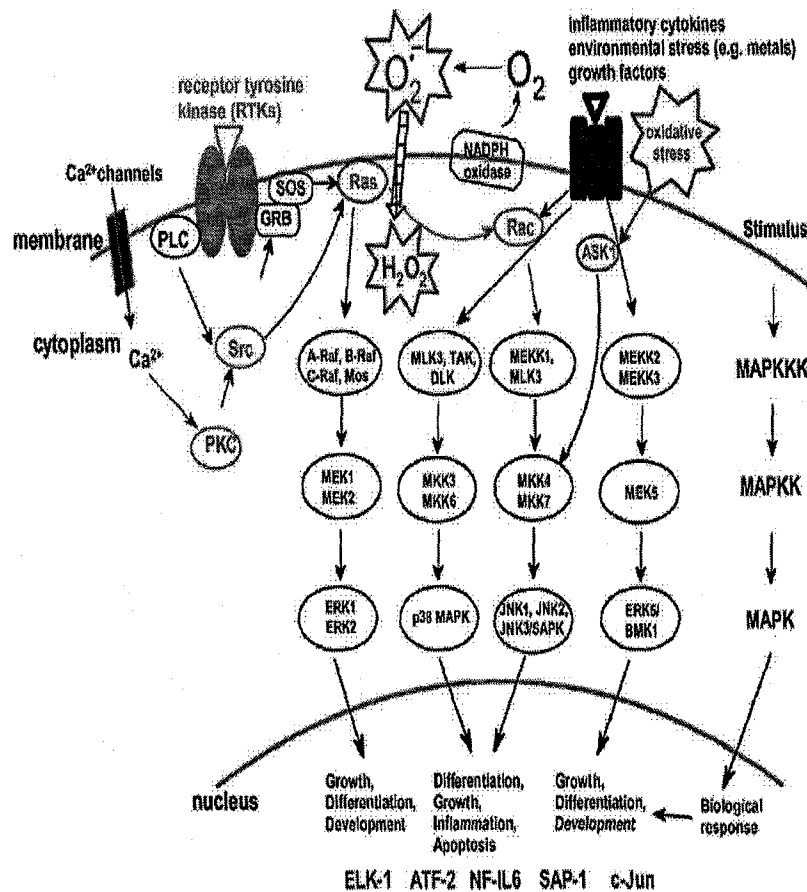


Figure 34: Les voies de signalisation MAPK induites par les espèces réactives de l'oxygène réactives (Valko et al., 2007).

[PKC (Protein Kinase C); PLC (PhosphoLipase C); GRB (Growth-factor Receptor Bound protein); SOS (Son of Sevenless); Ras (protéine monomérique G); ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase); MLK (Mixed Lineage Kinase); DLK (dual leucine zipper kinase); TAK (transforming growth factor- β (TGF β)-activated kinase)]

L'activation des MAPKs est modulée par une double phosphorylation sur une thréonine (Thr) et une tyrosine (Tyr) au niveau du motif Thr-Glu-Tyr (ERK), Thr-Pro-Tyr (JNK) ou Thr-Gly-Tyr (p38) dans le sous-domaine VIII du domaine catalytique (Chuang et al., 2000). Récemment, Cuadrado et al (2007) ont identifié une nouvelle p38 MAPK qui a été baptisée p18^{Hamlet}.

De nombreuses études *in vitro* ont montré l'implication de JNK1, p38 kinase, et ERK dans la régulation du ARE via l'activation de Nrf2 (Nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2) (Figures 35); d'autres études mentionnent en plus l'implication du phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) et les tyrosines kinases (Bloom and Jaiswal, 2003). L'activation du facteur de transcription Nrf2 est l'étape clef dans l'initiation de la protection cellulaire contre un large panel de facteurs de stress (Li et al., 2007)

Les résultats de l'étude de Chuang *et al* (2000) suggèrent que JNK et p38 participent à l'induction de l'apoptose et que la diminution du signal ERK induit par des faibles doses de cadmium contribue à inhiber la croissance. Une autre étude réalisée sur diverses lignées cellulaires, telles que HEK (human embryonic kidney), HepG2 (human liver) et HeLa (human cervix), ainsi que sur des ostéoblastes de rat et macrophages de souris a mis en évidence la susceptibilité des cellules à de faibles concentrations de cadmium, ainsi que la phosphorylation soutenue de ERK conduisant à la mort cellulaire (Martin *et al.*, 2006).

Une faible concentration (1 μ M) d'exposition au cadmium d'une lignée cellulaire lymphoblastique engendre la phosphorylation de ERK et de p38 tandis que JNK est phosphorylée en présence de 20 μ M (Iryo *et al.*, 2000). La JNK, est impliquée par exemple dans l'apoptose neuronale déclenchée par l'activation consécutive de Ask1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase*) puis de MKK4 suite à l'exposition au cadmium (Kim *et al.*, 2005) ou encore dans l'apoptose de macrophages de souris suite à une augmentation du calcium intracellulaire et d'espèces réactives de l'oxygène (Kim and Sharma, 2004).

Les différentes données expérimentales suggèrent que l'activation de p38 est le premier événement responsable de l'initiation de l'apoptose induit par le cadmium (Pulido and Parrish, 2003), et même si le cadmium induit la phosphorylation de plusieurs MAP kinases, une voie est souvent privilégiée par rapport aux autres suivant le type cellulaire et la dose d'exposition.

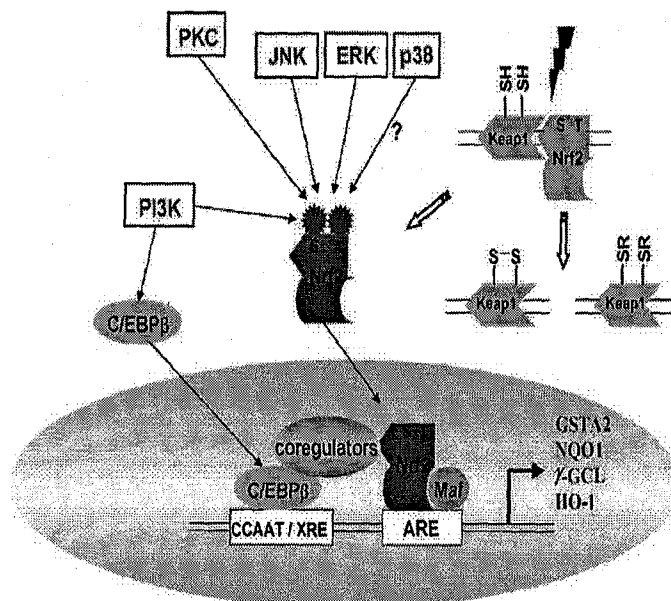


Figure 35: Les voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'ARE (*antioxidant-response element*) via l'activation du Nrf2 (*Nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2*) (Lee et Surh, 2005).

Chapitre 4: Revue bibliographique sur le Plomb

I- Effets physiopathologiques liés à l'exposition au plomb

I-1. Présentation du plomb

Le plomb est un métal lourd, membre du groupe 14 (IVA) du tableau périodique. Le plomb naturel est un mélange de quatre isotopes stables : ^{208}Pb (51–53%), ^{206}Pb (23.5–27%), ^{207}Pb (20.5–23%), et ^{204}Pb (1.35–1.5%). Il existe trois niveaux d'oxydation : Pb(0), le métal; Pb(II); et Pb(IV) (ATSDR, 2007).

Le plomb pénètre dans l'organisme essentiellement par voie digestive et par voie pulmonaire. La biodisponibilité du plomb (Figure 36) dépend de sa solubilité dans le tractus intestinal. Pour être absorbé, il doit en effet être transformé en sel hydrosoluble. Plusieurs auteurs s'accordent à donner des taux d'absorption par voie orale chez l'adulte compris entre 5 et 10 %. Chez l'enfant, les taux d'absorption digestive sont beaucoup plus élevés que chez l'adulte. Ils sont de l'ordre de 20 % chez les enfants âgés d'une dizaine d'années et voisins de 50 % chez les enfants de moins de 2 ans (Ziegler *et al.*, 1978; DeMichele, 1984). De nombreux facteurs favorisent l'absorption du plomb : ainsi en est-il de la vitamine D, un régime riche en graisse, les carences en fer, calcium, phosphore, zinc, vitamine B1, magnésium, fibres végétales (Demichele, 1984; Ito *et al.*, 1987).

Le taux de dépôt des particules inhalées est de l'ordre de 30 à 50 % et dépend de la taille des particules et de la ventilation pulmonaire (Friberg *et al.*, 1986). Après absorption pulmonaire ou digestive, le plomb passe dans le sang où il se répartit entre une forme fixée aux hématies (95 %) non diffusible et une forme plasmatique qui sera stockée dans les tissus ou éliminée dans les urines. Si l'exposition par ingestion prédomine dans la population générale, et l'inhalation en milieu professionnel, ces deux voies sont le plus souvent indiscernables l'une de l'autre.

I-2. Principales sources d'exposition

Les sources d'intoxication sont variées, représentées surtout par le saturnisme hydrique qui touche toutes les personnes exposées sans distinction d'âge, de sexe ou d'état physiologique ou pathologique, les peintures murales et les poussières, les rejets industriels et gaz d'échappement et d'autres sources plus anecdotiques.

Les rejets atmosphériques du plomb sont principalement anthropiques, ils proviennent d'abord des industries de fusion du plomb.

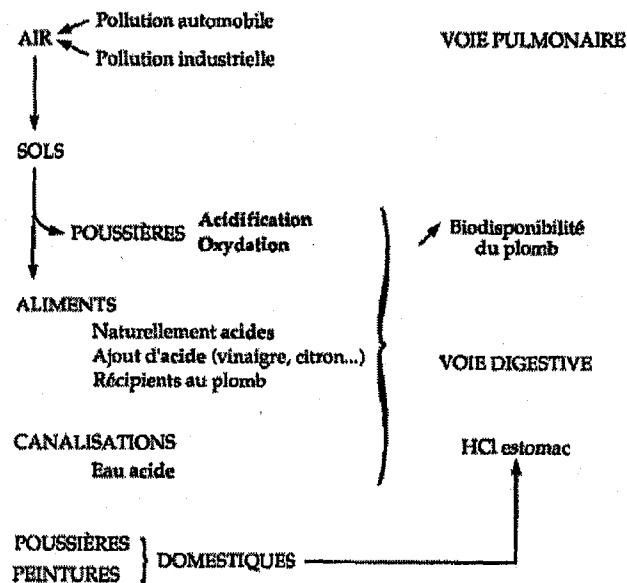


Figure 36: Rôle des propriétés physico-chimiques du plomb dans sa biodisponibilité

1.3. Effets physiopathologiques du plomb

1.3.1. Effets sur le système nerveux

Le plomb exerce une action neurotoxique périphérique et centrale.

1.3.1.1 Effets sur le système nerveux central

Le système nerveux central est un organe cible critique du plomb. L'exposition aux fortes doses, avec élévation rapide de la plombémie est source d'encéphalopathie. L'exposition à doses faibles peut être à l'origine de nombre de symptômes comme l'irritabilité, une tendance dépressive, les troubles de l'attention, de la concentration, de la mémoire, du sommeil. Chez l'adulte, les intoxications chroniques sévères (plombémies > 150 µg/dL) se traduisent par une encéphalopathie saturnique grave, heureusement devenue très rare en milieu professionnel (Lauwerys, 1998).

Pour des intoxications moins importantes (plombémies < 100 µg/dL) des troubles d'ordre neurologique ont été observés chez l'adulte comme chez l'enfant : irritabilité, troubles du sommeil, anxiété, perte de mémoire, confusion, sensation de fatigue (Haenninen *et al.*, 1979; Awad *et al.*, 1986; Pasternak *et al.*, 1989).

Chez des travailleurs dont la plombémie oscillait entre 26 et 66 µg/dL, les auteurs ont décelé des perturbations de la mémoire, du temps de réaction et de l'habileté manuelle (Hogstedt *et al.*, 1983). A partir de symptômes similaires, des relations de type dose-réponse ont pu être observées sur des travailleurs répartis en fonction de leur taux de plombémies en trois groupes correspondant à de faibles (environ 200 µg/L), moyennes (de 210 à 400 µg/L)

ou fortes expositions (de 410 à 800 µg/L) (Zimmerman-Tanselia *et al.*, 1983; Campara *et al.*, 1984; Stollery *et al.*, 1991). Les sujets les plus exposés ont de plus montré de fortes perturbations neurocomportementales et psychomotrices, avec notamment une réduction des capacités de raisonnement et des performances visuo-motrices.

Si la plupart des études réalisées en milieu professionnel mentionnent l'apparition fréquente de ces troubles subjectifs d'ordre neurologique pour des taux de plombémie compris entre 400 et 800 µg/L, d'autres auteurs estiment qu'il n'existe pas de niveau seuil pour l'action toxique du plomb sur le système nerveux central (Mantere *et al.*, 1982; Betta, 1983).

Enfin, de fortes corrélations ont été obtenues entre l'altération des fonctions psychologiques et l'absorption cumulée de plomb, qui constituerait un meilleur indicateur que la mesure ponctuelle de la plombémie effectuée en même temps que l'examen psychologique (Lindgren *et al.*, 1996).

Chez l'enfant, on observe un effet sur le développement cérébral et les fonctions cognitives. A la différence des intoxications aiguës, la symptomatologie d'une intoxication à long terme est subtile et peu spécifique chez l'enfant. Ce sont les études épidémiologiques qui ont mis en évidence les conséquences à long terme de l'intoxication chronique par le plomb (plombémie inférieure à 400 µg/L) sur le développement psychomoteur ou intellectuel et sur le comportement scolaire des enfants.

Les études transversales portant sur des enfants d'âge scolaire entre 6 et 12 ans montrent dans leur majorité un effet de l'exposition au plomb sur la baisse du QI qui peut varier selon les auteurs de 4 à 7 points (Needleman *et al.*, 1979; Winnecke *et al.*, 1982; Lansdown *et al.*, 1986; Dudek et Merez, 1997). Les méta-analyses donnent par ailleurs une fourchette de 1 à 3 points de baisse de Q.I. pour une augmentation de la plombémie de 100 µg/L, et ceci pour des niveaux compris entre 100 et 400 µg/L (Needleman *et al.*, 1990; Bellinger *et al.*, 1994). Des troubles du comportement portant en particulier sur l'hyperactivité, l'inattention, l'impulsivité sont également souvent associés à plombémies supérieures à 110 µg/L ou taux de plomb dentaire >8µg/g (Winnecke *et al.*, 1983; Fulton *et al.*, 1987; Thomson *et al.*, 1989; Fergusson *et al.*, 1993).

Des études longitudinales ont mis en exergue le lien entre l'exposition prénatale, consécutive à la mobilisation du plomb contenu dans l'os de la mère, et le développement psychomoteur des enfants de 3 mois à 2 ans (Bellinger *et al.*, 1987; Dietrich *et al.*, 1987, 1991; Wasserman *et al.*, 1992). Ce type d'études confirme également les effets à long terme d'une exposition au plomb en période postnatale sur le développement psychomoteur, la

fonction cognitive et l'intégration visuomotrice de l'enfant (McMichael *et al.*, 1988; Baghurst *et al.*, 1995).

L'étude de Tong *et al.* (1998) a montré que les diminutions de plombémie les plus importantes, enregistrées chez les enfants suivis entre l'âge de 2 ans et l'âge de 11-13 ans, ne sont associées qu'à une amélioration partielle des fonctions cognitives. Ce résultat illustre la grande vulnérabilité du système nerveux en développement et des conséquences à long terme des atteintes précoces. Certaines études suggèrent que pour éviter les effets sur le système nerveux central de l'exposition *in utero*, la plombémie des femmes en âge de procréer ne devrait pas dépasser 100 µg/L (Sciarillo *et al.*, 1992; Shukla *et al.*, 1991).

L'existence ou non d'un seuil de plombémie (Tableau 7) est encore très discutée et la toxicité neurologique du plomb reste particulièrement préoccupante chez l'enfant. Actuellement, le CDC (Center of Disease Control, USA) fixe la limite à 10 µg/dl.

Tableau 7: Concentrations de la plombémie et du plomb des os correspondants aux effets délétères sur la santé (ATSDR, 2007)

Age	Effect	Blood lead ^a (µg/dL)	Bone lead ^a (µg/g)
Children	Depressed ALAD	<5	ND
Children	Neurodevelopmental effects	<10	ND
Children	Sexual maturation	<10	ND
Children	Depressed vitamin D	>15	ND
Children	Elevated EP	>15	ND
Children	Depressed NCV	>30	ND
Children	Depressed hemoglobin	>40	ND
Children	Colic	>60	ND
Adults (elderly)	Neurobehavioral effects	>4	>30
Adults	Depressed ALAD	<5	ND
Adults	Depressed GFR	<10	>10
Adults	Elevated blood pressure	<10	>10
Adults	Elevated EP (females)	>20	ND
Adults	Enzymuria/proteinuria	>30	ND
Adults	Peripheral neuropathy	>40	ND
Adults	Neurobehavioral effects	>40	ND
Adults	Altered thyroid hormone	>40	ND
Adults	Reduced fertility	>40	ND
Adults	Depressed hemoglobin	>50	ND

^aConcentration range associated with effect.

ALAD = δ-aminolevulinic acid dehydratase; EP = erythrocyte protoporphyrin; GFR = glomerular filtration rate; NCV = nerve conduction velocity; ND = no data

1.3.1.2 Effets sur le système nerveux périphérique

La méta-analyse de Davis *et al.* (1990) ou encore l'étude de Chia *et al.* (1996) suggèrent que le niveau sans effet sur les nerfs périphériques est inférieur à 400 µg/L. Il semblerait cependant que le seuil d'apparition de ces effets soit légèrement supérieur au seuil d'apparition des effets au niveau du système nerveux central.

Chez l'enfant, le réexamen par Schwartz (1988) d'études antérieures a permis de déterminer un seuil de 200 à 300 µg/L correspondant à l'apparition de la baisse de vitesse de conduction. Ces taux sont inférieurs à ceux que l'on croyait antérieurement nécessaires pour provoquer une démyélinisation. Une perte d'amplitude des muscles péroniers a pu être observée sur un groupe de jeunes adultes exposés pendant leur enfance, qui présentaient également une diminution de la sensibilité vibrotactile au niveau des doigts (Stokes *et al.*, 1998).

1.3.2. Effets hématologiques

Un des effets classiques du plomb est l'anémie liée, d'une part, à l'inhibition de la synthèse de l'hème et, d'autre part, à la réduction de la durée de vie des érythrocytes. L'inhibition de l'activité δ -aminolevulinate deshydratase (enzyme intervenant dans la synthèse de l'hème) a pu être corrélée de manière inversement proportionnelle aux taux de plombémies. La diminution de la biosynthèse de l'hème entraîne l'augmentation de produits intermédiaires tels que l'acide delta aminolévulinique (ALA), les protoporphyrines érythrocytaires, généralement mesurées sous forme de protoporphyrine-zinc (PPZ) ou sous forme protoporphyrine IX libre (FEP) (Figure 37) avec un impact général sur les différents organes (Figure 38).

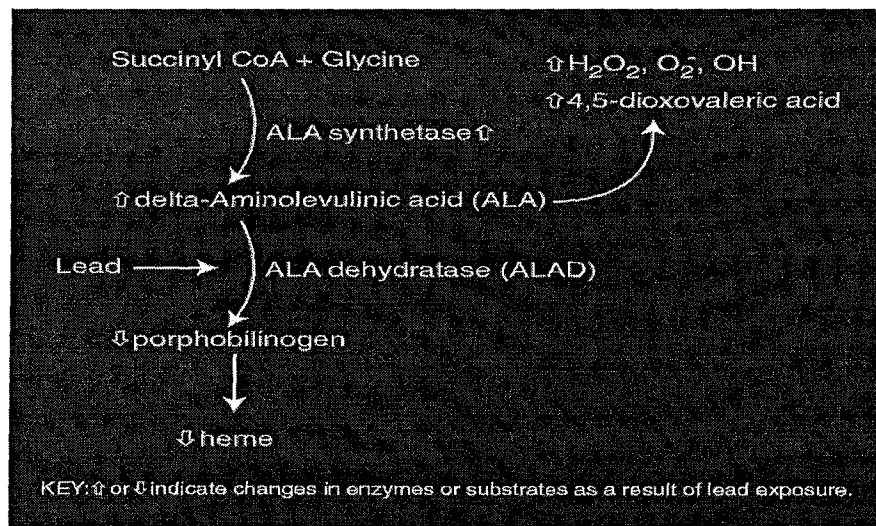


Figure 37 : Inhibition de δ -aminolevulinate deshydratase (δ -ALAD) par le plomb (Lyn, 2006)

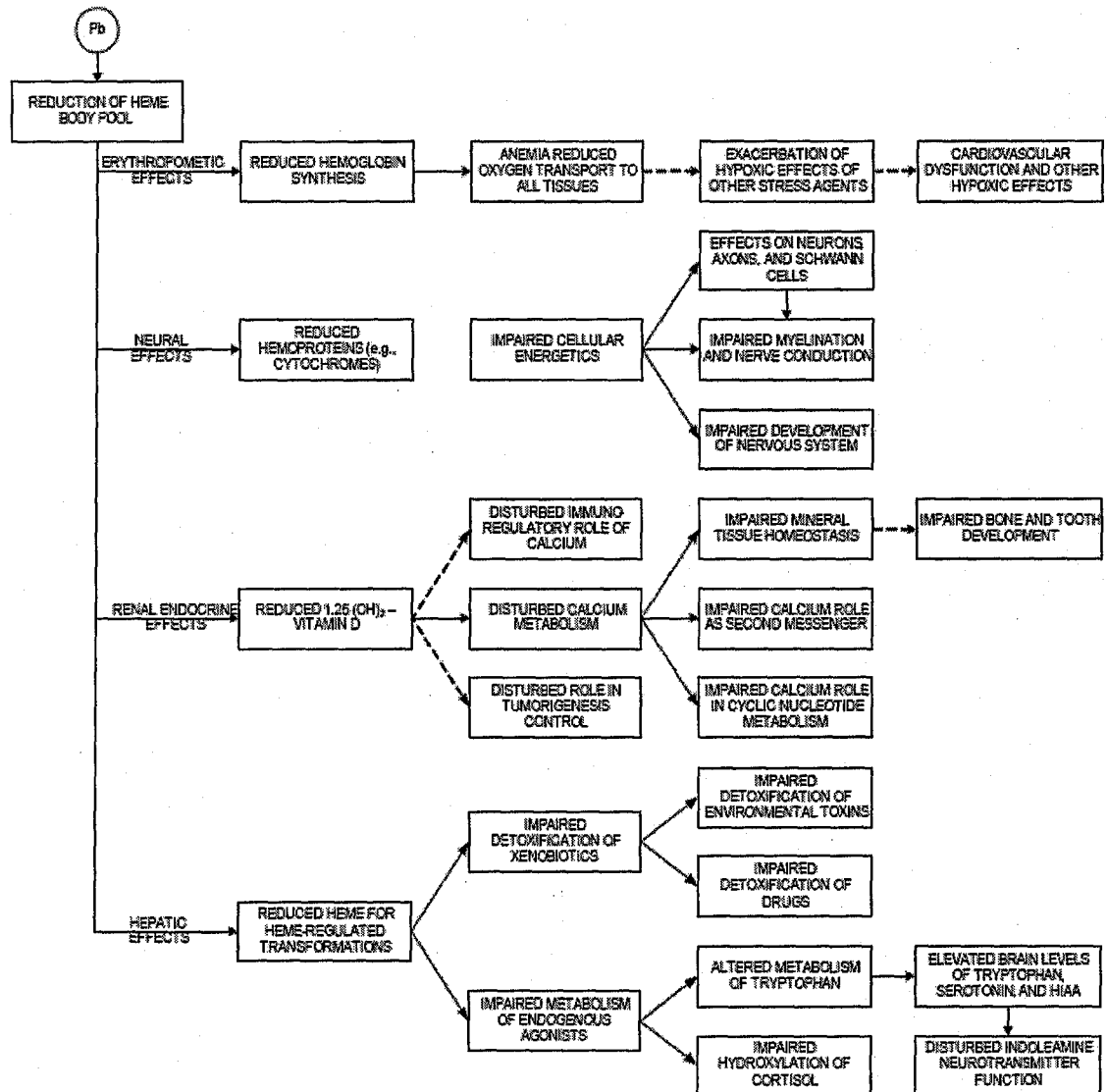


Figure 38: Impact multi organe de la réduction du pool de l'hème corporel par le plomb (ATSDR, 2007)

1.3.3 Effets rénaux

Plusieurs enquêtes épidémiologiques en milieu professionnel, où prédomine l'exposition par inhalation, ont mis en évidence un excès de mortalité par insuffisance rénale chez les sujets qui avaient subi des expositions chroniques intenses au plomb (Davies, 1984; Selevan *et al.*, 1985; McMichael *et al.*, 1988; Cooper, 1988). De nombreuses autres études montrent que les altérations de la fonction glomérulaire et/ou tubulaire du rein ne semblent pas associées à des niveaux de plombémie inférieurs à 600 µg/L (Goyer, 1985; Gennart *et al.*, 1992; Gerhardsson *et al.*, 1992; Cardenas *et al.*, 1993). Cependant dans l'étude de Verschoor, un coefficient de corrélation significatif a été obtenu entre plombémies et activité de la NAG

(N-acétyl β -D glucosaminidase) urinaire dans une cohorte dont les plombémies étaient comprises entre 207 et 1030 $\mu\text{g/L}$ (Verschoor *et al.*, 1987). Pour la population générale, certaines études suggèrent que le plomb, même à des faibles niveaux de plombémie, pourrait exercer un effet négatif sur la fonction rénale.

1.3.4 Effets sur le système cardio-vasculaire

Plusieurs études réalisées en milieu professionnel font apparaître des corrélations positives entre plombémies (à des taux dépassant 300 $\mu\text{g/L}$) et l'augmentation de la pression artérielle systolique (Pollock et Ibels, 1986; De Kort *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1986, 1988). Ces résultats sont largement contredits par des études aussi nombreuses qui ne montrent aucune augmentation du nombre de sujets hypertendus parmi les salariés manipulant des composés inorganiques du plomb (Parkinson *et al.*, 1987; Staessen *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1996). Plusieurs des méta-analyses réalisées sur des cohortes professionnelles et des études environnementales insistent sur le rôle important de facteurs de confusion tels que le taux d'hématocrite, la consommation d'alcool ou de tabac qui, lorsqu'ils sont pris en compte, réduisent considérablement l'intensité de l'association entre le plomb et la tension artérielle (Hense *et al.*, 1993; Staessen *et al.*, 1996).

II. Systèmes d'entrée-sortie cellulaires du Plomb

Les hypothèses sur les systèmes d'entrée-sortie cellulaire du plomb sont similaires à celles émises pour le cadmium. Le DMT-1, les canaux calciques voltages dépendants et les ATPases de type P 1B semblent être les principales voies d'entrée.

- **Canaux calciques voltage-dépendants**

Plusieurs études indiquent que le plomb libre ionisé à très faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire) peut traverser certains canaux calciques voltage dépendants, comme les canaux de type L (sensibles aux dihydropyridines, s'ouvrant à la suite d'une dépolarisation relativement importante et s'inactivant lentement) (Audesirk, 1993). Le plomb libre ionisé s'oppose à l'influx de calcium par ces canaux, mais ne semble pas pénétrer dans le cytosol par cette voie. L'effet du plomb est rapide, réversible et spécifique (Busselberg *et coll.*, 1994).

III. Mécanismes moléculaires de neurotoxicité du plomb

3.1. Interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels

Le plomb altère l'homéostasie calcique et interfère sur les processus cellulaires et moléculaires médiés par le calcium aux niveaux membranaire et cytoplasmique (Tableau 8).

Au niveau de la membrane cellulaire, le plomb entre en compétition avec le calcium au niveau des systèmes de transports membranaires comme les canaux calciques voltage dépendants, (Busselberg et *al.*, 1994) et les Ca²⁺ ATPases membranaires (Bettaïya et *al.*, 1996) qui sont des éléments importants dans le maintien de l'homéostasie calcique.

Tableau 8: Actions du plomb sur l'homéostasie calcique et les processus cellulaires et moléculaires médiés par le calcium (Pounds et *al.*, 1991).

Interaction	Transduction du signal Ca ²⁺ et homéostasie	Récepteur Ca ²⁺ et systèmes de réponse
Directe	Canaux Ca ²⁺ de la membrane plasmique	Troponine C Ostéocalcine Calbindine Oncomoduline
Indirecte	Adénylate cyclase Na ⁺ ,K ⁺ /ATPase	Adénylate cyclase
Secondaire	Hydrolyse de l'ATP Diminution de l'hème Liaison groupements thiols des protéines	Liaison groupements thiols des protéines

3.2. Récepteurs glutamatergiques NMDA

Les multiples effets du plomb sur les différents systèmes neuro-transmetteurs conduisent à penser que l'altération par le plomb de certaines fonctions cérébrales ne résulterait pas de la modification d'un type bien défini de neurotransmission. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une action du plomb sur la transmission neuroexcitatrice glutamatergique, notamment sur les récepteurs canaux glutamatergiques de type NMDA (*N-methyl-D aspartate*) (Alkondon et *al.*, 1990; Ujihara and Albuquerque, 1992; Ishihara et *al.*, 1995). Ces récepteurs sont particulièrement impliqués pendant le développement dans la synaptogénèse et participent aux mécanismes élémentaires de mémorisation et d'apprentissage, tels que la potentialisation à long terme (LTP) (Altman et *al.*, 1991). L'effet inhibiteur du plomb sur les récepteurs NMDA semble dépendre du stade de maturation cellulaire et de développement.

3.3. Protéine kinase A

Les niveaux d'activité de protéine kinase A (PKA) dépendent de la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par l'adénylate cyclase et de son métabolisme par la phosphodiesterase. La modulation de l'activité de ces protéines est contrôlée par des niveaux de calcium via l'interaction avec la calmoduline qui lie le calcium (Taylor et *al.*, 2004). Des études *in vivo* et *in vitro* examinant l'effet de l'exposition au Pb²⁺ sur les activités adénylate cyclase et phosphodiesterase démontrent que le Pb²⁺ conduit à une faible activité

adenylate cyclase avec une augmentation simultanée de l'activité phosphodiesterase dans le cerveau (Sandhir et Gill, 1994).

3.4. Voie de signalisation MAPK (Mitogen activated protein kinase)

La première protéine dans la cascade de la voie de signalisation MAPK est une G-protéine, Ras, qui est activée par la liaison avec un GTP. Une fois le GTP lié, Ras déclenche l'activation de Raf, la première protéine kinase dans la cascade de MAPK. Ras est désactivée par l'hydrolyse de GTP en GDP (Colbran, 2004). L'activation de Raf induit la phosphorylation de MEK ou le MAPK/ERK Kinase. La phosphorylation d'ERK a été observée dans les dendrites et les corps cellulaires des neurones qui ont été activés par l'activité synaptique (Giovannini et al., 2001). Cependant, cette phosphorylation d'ERK $\frac{1}{2}$ n'est pas spécifique aux neurones et a été observée dans des cellules gliales (Ferrer et al., 2001). Ramesh et al. (2001) ont rapporté que les rats exposés à 50 ppm d'acétate de plomb dans l'eau de PN21 (postnatal 21) à PN90 (postnatal 90) ont eu une augmentation de 5 fois de la phosphorylation d'ERK $\frac{1}{2}$ dans les extraits hippocampes avec absence de changement dans l'expression totale d'ERK $\frac{1}{2}$. Une autre étude a récemment démontré des augmentations de phosphorylation d'ERK $\frac{1}{2}$ dans l'hippocampe de rats PN14 exposés au Pb²⁺ par des injections intra péritonéal (Cordova et al., 2004). Il est toujours peu clair si l'augmentation de phosphorylation d'ERK1/2 est associée et/ou partie intégrante du mécanisme moléculaire étant à la base des déficits cognitifs associés à la neurotoxicité du Pb²⁺.

L'inhibition du NMDAR (*N-methyl-D aspartate receptor*) induit une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 (Chandler et al., 2001; Friguls et al., 2002; Kalluri and Ticku, 2003; Paul et al., 2003). Sachant que le Pb²⁺ est un antagoniste puissant du NMDAR (Xu and Rajanna, 2006), cela permet de donner une explication possible de l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2. De plus, l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptique contenant des sous-unités NR2B induit cette augmentation de phosphorylation d'ERK1/2 (Ehlers, 2003). Des études ultérieures sont nécessaires pour déterminer l'importance du mécanisme de l'augmentation de phosphorylation d'ERK1/2 chez des animaux exposés au plomb.

3.5. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

La calcium/calmoduline - dépendant protéine kinase II (CAMKII) est une kinase multimérique composée de quatre sous-types distincts. Elle joue un rôle important dans l'apprentissage, la mémoire et la plasticité synaptique (Cammarota et al., 1998). Elle est localisée dans la densité post synaptique, ancrée à proximité du NMDAR (Leonard et al.,

1999). *In vitro*, l'activation synaptique du NMDAR conduit à l'expression de CAMKII (Murray et al., 2003), elle est activée par une élévation du calcium intracellulaire qui permet la liaison de CAMKII au complexe calcium/calmoduline par une autophosphorylation du résidu thréonine 286 (Hudmon and Schulman, 2002). La phosphorylation du résidu thréonine-286 de CAMKII est cruciale pour l'apprentissage, la mémoire et la plasticité synaptique. L'absence de phosphorylation du résidu 286 chez les souris provoque des dommages dans l'induction de potentiation à long terme (LTP) et des déficits cognitifs (Bejar et al., 2002; Hardingham et al., 2003). Toscano et al. (2005) suggèrent que l'exposition au Pb^{2+} affecte et altère la cinétique du CAMKII cérébral, spécialement par une diminution du V_{max} (maximal velocity) et une augmentation de l'affinité au substrat (Km).

3.6. Cyclic-AMP response element binding protein (CREB)

L'afflux de calcium via NMDAR et les canaux calciques à voltage dépendant active les voies de signalisation qui convergent sur des facteurs de transcription spécifiques importants pour la plasticité synaptique (Lonze and Ginty, 2002). Un de ces facteurs de transcription cruciaux qui est activé par le flux de calcium via NMDAR actif est la protéine CREB (*Cyclic-AMP response element binding protein*) (Hardingham and Bading, 2003). C'est une protéine membre de la famille de facteurs de transcription bZip (*basic Leucine zipper*) qui lie CRE (*Cyclic-AMP response element*) (Montminy and Bilezikjian, 1987). Trois voies calcium-dépendantes à savoir PKA (protein kinase A), CAMK (Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase) et MAPK (the mitogen activated protein kinase) activent CREB par la phosphorylation de la sérine 133 (Lonze and Ginty, 2002). Plusieurs auteurs ont observé que CREB est nécessaire pour l'apprentissage, la mémoire, la plasticité synaptique et participe à la propagation du signal à partir des synapses jusqu'au noyau (Toscano and Guilarte, 2005). La phosphorylation et l'activité de CREB est altérée chez des rats exposés au plomb durant leur développement (Toscano et al., 2002 et 2003).

3.7. Protéine kinase C

Les protéines kinases C (PKC) sont une famille de protéine serine/thréonine kinases constitué de 12 isozymes qui diffèrent par leur cofacteurs enzymatiques, l'expression tissulaire et la distribution cellulaire (Newton, 1995). Il a été formulé l'hypothèse que les formes Ca^{2+} -dependent protein kinase C sont des cibles impliquées dans la neurotoxicité du Pb^{2+} puisque ces isoformes contiennent des domaines connus de liaison pour le Ca^{2+} , le Pb^{2+} entrant en compétition avec le Ca^{2+} (Bressler et al., 1999); et en particulier la Ca^{2+} /phospholipid-

dependent protein kinase C est nécessaire pour la transition de la forme STM (*short-term memory*) en LTM (*long-term memory*) (Vazquez and Pena de Ortiz, 2004). En outre, les inhibiteurs spécifiques de PKC bloquent l'induction de LTP (*long term potentiation*) (Malinow et al., 1988). La caractérisation extensive de l'effet du Pb^{2+} sur la PKC a été réalisée sur des systèmes *in vitro*. Markovac et Goldstein (1988) ont indiqué que le Pb^{2+} peut agir directement sur PKC à la place de Ca^{2+} pour des concentrations picomolaires de Pb^{2+} . Cependant, Murakami et al. (1993) rapportent que des concentrations micromolaires de Pb^{2+} inhibent PKC *in vitro*, alors que Long et al. (1994) ont observé une activation de PKC induite par le Pb^{2+} . Tomsig and Suszkiw (1995) suggèrent que la variation de l'effet dépend de la dose de Pb^{2+} additionnée au système *in vitro*.

Le Pb^{2+} active PKC à des concentrations picomolaires en interagissant avec le site de haute affinité, et produit à des concentrations nanomolaires et micromolaires une inhibition compétitive et non compétitive en interagissant avec PKC sur les autres sites de liaison. Récemment, les études utilisant des lignes cellulaires ont démontré la capacité de PKC à être activée par le Pb^{2+} (Lu et al., 2002; Olivi et al., 2003).

Alors que l'effet significatif du Pb^{2+} sur PKC a été bien caractérisé *in vitro*, *in vivo* peu d'études ont démontré le changement de l'activité de PKC ou de son expression. Une augmentation de l'activité PKC membranaire (Chen et al., 1998) ou cytosolique et membranaire (Reinholz et al., 1999) a été observée uniquement chez des jeunes rats exposés au Pb^{2+} (postnatal 5–7j), et pas de changement chez les animaux adultes pour lesquels on a cependant observé des déficits cognitifs induits par le plomb (Nihei and Guilarte, 1999). Une augmentation de l'activité PKC cytosolique a été observée chez des rats adultes exposés au Pb^{2+} (Chen et al., 1998), mais n'a pas été observée dans une autre étude où les rats avaient pourtant une plombémie semblable (20–30 μ g/dl) (Reinholz et al., 1999).

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Disséminés dans l'environnement par les activités humaines, le cadmium et le plomb sont des métaux toxiques dont les mécanismes de toxicité restent encore mal compris.

Le but général du travail présenté a été d'essayer de progresser dans la compréhension des mécanismes par lesquels le cadmium, en particulier, induit des effets délétères et de ceux qui peuvent préserver les cellules animales de cette toxicité.

Ainsi, les objectifs généraux de ce travail de thèse ont été de quantifier les effets délétères du cadmium et du plomb chez le rat et sur des modèles de cellules animales et humaines, d'étudier le rôle du stress oxydant dans les mécanismes impliqués et d'étudier le moyen de contrer ces effets en particulier en terme de protection contre le stress oxydant induit par le cadmium et le plomb.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à examiner l'effet du plomb et du cadmium sur le statut antioxydant chez des rats Wistar comme modèle animal d'étude et sur modèles cellulaires (cellules lymphocytaires humaines Jurkat T et BJAB), tout en étudiant les hypothèses mécanistiques pouvant expliquer la production d'espèces réactives de l'oxygène par ces métaux lourds. Une possibilité est la perturbation de l'homéostasie des thiols et l'interférence de ces métaux toxiques avec des métaux de transition essentiels pour la cellule et possédant des propriétés redox.

En second lieu, nous avons étudié un des mécanismes antioxydants induit par le cadmium, à savoir l'induction de l'expression de l'hème oxygénase, étude réalisée sur des cellules lymphocytaires BJAB.

Enfin, nous avons investigué la possibilité d'utiliser l' α -tocopherol comme moyen de protection contre le cadmium, par l'étude de son impact sur les marqueurs du stress oxydant chez des rats Wistar traités par du cadmium.

Matériel et méthodes

Partie II. Matériel et méthodes

1. Animaux et lignées cellulaires utilisés

1.1 Animaux

Les expérimentations sont menées chez le rat de souche Wistar selon les recommandations de la Convention Européenne de Protection des Animaux Vertébrés utilisés dans un but expérimental et Scientifique (Conseil Européen n° 123, Strasbourg 1985).

1.1.1. Traitement et conditions d'élevage

Des rats jeunes de souche Wistar (IFFA CREDO, France), âgés de 30 jours sevrés, ont été répartis dans des cages individuelles (dimension : 22/18/18 cm) pour une semaine d'adaptation, la nourriture et l'eau de boisson sont à volonté. Les paramètres du milieu contrôlé sont : un cycle lumière/obscurité de 12/12 heures, humidité de $70 \pm 10\%$ et une température de 22 ± 1 °C. Pour nos études, la dose retenue était de 2 mg d'acétate de Pb et 2 mg chlorure de Cd/kg de poids corporel.

1.1.2. Sacrifice et préparation des échantillons

Après le sacrifice des rats Wistar, le sang est collecté pour le dosage des paramètres hématologiques selon les techniques standard, et les différents organes sont enlevés, rincés par le tampon Tris (20mM Tris-HCl, 0.14M NaCl, pH 7.4), pesés, et finement broyés dans le même tampon et homogénéisés. Les homogénats (10 % w/v) sont stockés à -20°C jusqu'au dosage des paramètres biochimiques.

1.2 Lignées cellulaires

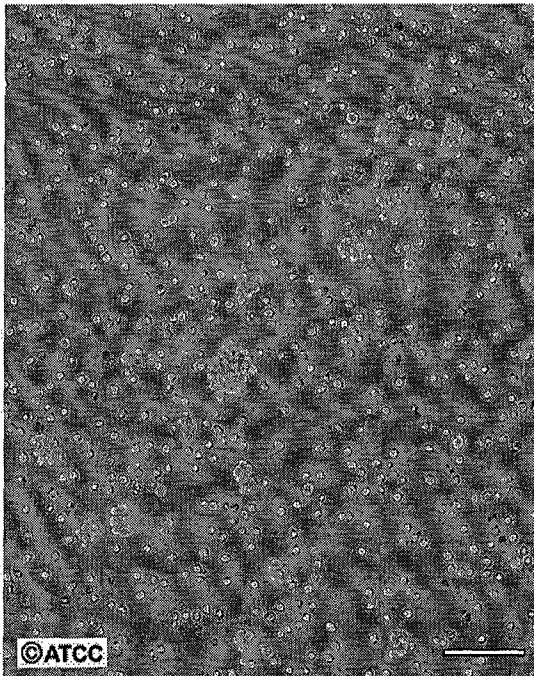
1.2.1. Caractéristiques des lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été utilisées de type lymphocytaire, à savoir : les cellules Jurkat (lymphocyte T), les cellules BJAB (lymphocyte B) dont les caractéristiques essentielles sont :

Jurkat	Clone E6-1
ATCC Number	TIB-152
Cell Type	T lymphocyte
Propagation	RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine Temperature: 37 °C ; Atmosphere: 95% air et 5% CO ₂

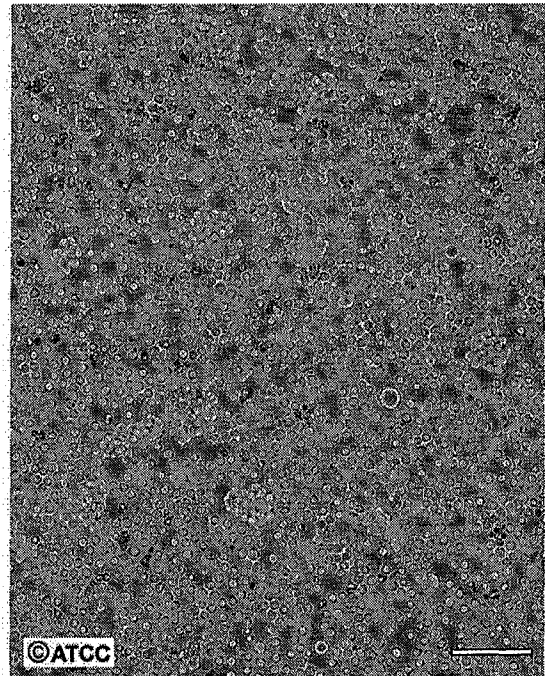
Subculturing	<p>Protocol: Cultures can be maintained by the addition of fresh medium or replacement of medium. Alternatively, cultures can be established by centrifugation with subsequent resuspension at 1×10^5 viable cells/ml. Do not allow the cell density to exceed 3×10^6 cells/ml.</p> <p>Interval: Maintain cultures at a cell concentration between 1×10^5 and 1×10^6 viable cells/ml.</p> <p>Medium Renewal: Add fresh medium every 2 to 3 days (depending on cell density)</p>
---------------------	--

ATCC Number: **TIB-152**
 Designation: **Jurkat (Clone E6-1)**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Cellules BJAB	
ATCC® Number	HB-136™
Growth Properties	suspension
Cell type	B lymphocyte
Morphology:	lymphoblast
Propagation:	BJAB cells were cultured in RPMI-1640 medium 85% supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine at 37°C in a humidified incubator with 5% CO ₂ .
Subculturing:	Cultures can be maintained by addition or replacement of fresh medium. Start cultures at 2×10^5 cells/ml and maintain between 1×10^5 and 1×10^6 cells/ml. Medium renewal: Every 2 to 3 days

1.2.2. Test de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité de cadmium est mesurée par le test de MTT (Ehrlich and Sharova, 2000). Le sel de tetrazolium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide (MTT) est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en sel de formazan de couleur pourpre insoluble en milieu aqueux, solubilisé par le diméthylsulfoxyde (DMSO), la densité optique est lu à 570 nm par un spectrophotomètre Shimadzu UV-160A.

2. Méthodes d'analyse

2.1. Analyse biochimique

2.1.1. Paramètres du stress oxydant

2.1.1.1. Mesure des malondialdehydes

Le dialdéhyde malonique (MDA) est utilisé comme un index de peroxydation des lipides. Les fonctions du MDA, libérées par hydrolyse acide à 95°C, réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner un complexe coloré en rose (MDA-TBA₂) qui est mesuré soit au fluorimètre (λ_{exc} 532 nm/ λ_{em} 553nm) ou au spectrophotomètre (532 nm). Le protocole utilisé est basé sur la méthode décrite par Ohkawa et al. (1979).

2.1.1.2. Mesure des carbonyles

Le dommage oxydative des protéines est mesuré par la quantification des groupes carbonyles, basée sur la réaction avec le dinitrophenyl hydrazine (DNPH), dont l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 370 nm. La méthode de dosage utilisée est celle décrite par Levine et al. (1990).

2.1.1.3. Dosage du glutathion

Le glutathion total (glutathion réduit + oxydé) est dosé selon la méthode Akerboom and Sies (1981), basée sur la réaction dite d'Elmann entre les thiols (groupements S du GSH et du GSSG) et le DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic acid) dont l'absorbance est mesurée à 412 nm.

2.1.1.4. Mesure des cassures de l'ADN par la méthode des COMET

Le protocole utilisé est basé sur la méthode décrite par Tice et al. (1990). Une suspension cellulaire (20000 cellules) diluée au 1/2 dans de l'agarose à point de fusion à basse température (Low-Melt) (1,2 % dans PBS). Un volume de 110 μ l de ce mélange est ensuite déposé sur une sous-couche d'agarose (1% dans du PBS) coulée préalablement sur une lame de verre dépolie puis recouvert d'une lamelle et déposé sur un lit de glace et recouverte de papier aluminium pendant 10 minutes pour une prise en masse rapide du Low-

Melt. Les membranes plasmiques et nucléaires sont éliminées par un tampon de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-acide, 1% de sarcosinate de sodium, pH 10, additionné extemporanément par 1 % de triton X100 et de 10 % de DMSO). Les lames sont immergées dans ce tampon pendant une nuit à 4°C et à l'abri de la lumière. L'ADN ainsi libéré peut se dérouler dans des conditions dénaturantes. La dénaturation de l'ADN est effectuée en milieu basique pH = 13. Les lames sont placées dans la cuve d'électrophorèse et recouvertes du tampon d'électrophorèse (10 N NaOH, 200 mM EDTA), pendant 40 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette étape permet de débobiner l'ADN et de mettre en évidence des sites alcali-labiles. L'ADN est soumis à une électrophorèse. Le matériel génomique cassé migre alors vers l'anode, ce qui forme la comète. L'expérience peut se faire en milieu neutre ou alcalin, ce qui permet la détection respectivement des cassures doubles et simples de brin d'ADN. Une tension de 25 V et un ampérage de 300 mA est appliquée pendant 30 minutes afin d'obtenir la migration des fragments d'ADN. Après électrophorèse, les lames sont retirées de la cuve, égouttées, et rincées avec le tampon de neutralisation (Tris-base 0,4 M, pH 7,5, trois fois 5 minutes). Enfin, l'ADN est visualisé grâce à un intercalant (BET à 20 µg/ml, $\lambda_{ex}=510$ nm et $\lambda_{em}=595$ nm) qui le rend fluorescent. Une lamelle est ensuite délicatement déposée sur chaque lame et l'ensemble est gardé à l'abri de la lumière et à 4 °C dans un milieu humide jusqu'à la lecture.

Les comètes sont lues sous microscope à fluorescence Zeiss Axioscope 20 (Leitz, Germany) par le logiciel Komet (version 4, Kinetic Imaging Ltd, Liverpool). Les résultats sont exprimés en Tail DNA, qui représente le pourcentage de l'ADN dans la queue de la comète.

2.1.1.5. Dosage des bases oxydées (8-OH-dG) de l'ADN extrait des cellules BJBAB

- **Extraction de l'ADN cellulaire**

La technique d'extraction de l'ADN cellulaire consiste à isoler ce polymère biologique de tous les autres constituants cellulaires. Pour cela, l'extraction s'effectue en plusieurs étapes et commence, quel que soit le protocole, par une lyse des membranes plasmiques nucléaires. Les cellules sont centrifugées à 20°C et 1400 tours/min pendant 3 min. Le culot cellulaire (10-12 10^6 cellules/échantillon) est repris deux fois dans 2 ml de tampon de lyse A (MgCl₂ 5 mM Tris-HCL 10 mM, deferoxamine 0,1mM, 320 mM sucrose, 1% TritonX-100) et centrifugé à 3500 tours/min à 4°C pendant 10 min. Puis ce culot est repris dans 0,6 ml de tampon de lyse B (5 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris/HCL, 0,15 mM deferoxamine). Du SDS (35 µl, 10 %) est ajouté, et le mélange est agité vigoureusement avant l'addition de 30 µl de

ribonucléase A (1 mg/ml) et de 8 µl de ribonucléase T1. Les échantillons sont incubés à 50°C pendant 15 min. Ensuite, 30 µl de la protéase Qiagen (20 mg/ml) sont ajoutés, et les échantillons sont incubés pendant 1 heure à 37°C. L'ADN est précipité par l'ajout de 1,2 ml de solution NaI (20 mM Na₂EDTA, 7,6 M NaI, 40 mM Tris/HCl, 0,3 mM deferoxamine) et 2 ml d'isopropanol à 100 %. L'ADN obtenu est centrifugé à 1000 g à 4°C pendant 12 min et rincé successivement avec 1 ml d'isopropanol à 40 %. Le culot est ensuite dissous dans 175 µl d'une solution de déféroxamine à 0,1 mM.

- **Hydrolyse enzymatique de l'ADN sous forme de nucléosides**

L'hydrolyse de l'ADN sous forme de nucléosides par le couple d'enzymes nucléase P1 phosphatase / phosphatase alcaline permet la mesure de la 8-oxo-dG par CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Performance). L'ADN extrait est incubé à 37°C pendant 1 heure en présence de 10 µl de tampon 10X de la nucléase P1 (300 mM acétate de sodium, 1 mM Zn SO₄, 2,5 mM deferoxamine pH 5,3), de 10 µl de P1 et de 15 µl de la phosphatase alcaline. Les échantillons sont ultrafiltrés à l'aide d'un kit d'ultrafiltration par centrifugation 15 min à 2500 tours/min.

- **Mesure de la 8-oxo-dG**

Après ultrafiltration, les échantillons sont analysés par CLHP. Le mélange de nucléosides est injecté sur la colonne de chromatographie. En sortie de colonne, un détecteur UV recueille le signal des nucléosides normaux et un détecteur électrochimique celui de la 8-oxo-dG selon Gedik *et Collins* (2005).

Deux gammes étalons sont préparées : l'une de déoxyguanosine [332 à 66,4 µM] est obtenue à partir d'une solution mère à 600µM ; l'autre est une gamme de 8OXODG (4,83 à 0,302 nM) préparée à partir d'une solution mère de 4,83nM. Un volume de 50 µl d'échantillons de gamme et d'ADN cellulaire sont analysés par chromatographie liquide haute pression (HPLC detector 430; biotek-kontron, Montigny le Bretonneau, France) couplée à une détection électrochimique (ESA coulochem, Bedford, MA, USA), équipé d'un détecteur Jasco UV1565 (Jasco, Nantes, France). La phase mobile est un tampon phosphate 50 mM, PH 5,5, qui contient 12% de méthanol. La séparation par HPLC se fait à 26°C. Dans ces conditions, le temps d'élution de la 8 oxo dGua est de 12 minutes (Mousseau *et al.*, 2005).

2.1.1.6. Dosage des thiols

C'est une méthode colorimétrique qui repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH) (Bulaj *et al.*, (1998) ; Ellman, 1959). En présence des groupements

thiols de l'échantillon, le pont disulfure (SS) contenu dans le réactif d'Ellman (10 mg de DTNB dans 10 ml de tampon phosphate pH 8) ou DTNB (5-5' dithionitrobenzoic acid) va être réduit et donner des dérivés thiols aromatiques [RNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque))] colorés et possédant une absorbance entre 412 et 415 nm. La vitesse de la réaction sera différente selon que le DTNB se trouve en présence de SH protéiques ou non protéiques. Cette différence peut, dans certaines conditions de pH et de forme ionique, être accentuée et permettre ainsi la mesure des SH protéiques et celle des SH totaux. Les groupements thiols protéiques sont très sensibles à l'oxydation, y compris par l'oxygène moléculaire. Il convient de manipuler rapidement les échantillons à 4°C (glace), d'utiliser des centrifugeuses réfrigérées. Il est possible de conserver les échantillons à - 80°C.

Dans des microcuvettes, rajouter pour la courbe standard : 750 µl de tampon phosphate (50 mM) pH 8 et 500 µl du point de gamme et pour le dosage des SH : 1200 µl de tampon phosphate et 50 µl d'échantillon. Agiter doucement et lire l'absorbance à 412 nm (DO1). 5 min après, rajouter 250 µl de DTNB, agiter et laisser 15 min à l'abri de la lumière. Lire l'absorbance à 412 nm (DO2). Sur la courbe d'étalonnage lire $DO = DO1 - DO2$

2.1.2. Enzymes antioxydantes

2.1.2.1. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

Le principe de dosage est basé sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et O_2 par la catalase continue dans l'échantillon mesuré. L'activité de la catalase est directement proportionnelle à la concentration en H_2O_2 et à la vitesse de sa décomposition mesurée au spectrophotomètre à 240 nm suivant la méthode d'Aebi (1984). Une unité d'activité de catalase correspond à 1 µmole du peroxyde d'hydrogène décomposé par minute.

2.1.2.2. Dosage de l'activité de superoxyde dismutase (SOD)

Les activités de SODs sont déterminées par le test d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol par la SOD totale décrit par Marklund and Marklund (1974). Le principe de dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l'anion superoxyde et sa dismutation par la SOD mesurée à 420 nm. Une unité enzymatique de SOD est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de l'auto-oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage. La Cu/Zn SOD cytoplasmique est spécifiquement inhibée par le cyanure de potassium (KCN), et l'activité Mn-SOD mitochondriale est mesurée. Celle de la SOD cuivre-zinc est déduite par soustraction de l'activité SOD totale.

$$\text{Cu/Zn-SOD} = \text{SOD totale} - \text{Mn-SOD}$$

2.1.2.3. Dosage de l'activité glutathion peroxydase (GPx)

L'activité GPx est mesurée par la méthode de Flohé et Günzer (1984). Ce dosage est basé sur un couplage entre la réaction de la GPx qui réduit le *tert*-butyl hydroperoxyde (tBOOH) et oxyde le glutathion en glutathion oxydé (GSSG) et celle de la glutathion réductase (GRase) qui réduit le GSSG formé tout en oxydant le NADPH. La quantité de glutathion oxydé (GSSG) est mesurée en suivant la décroissance d'absorption du NADPH (consommé par la GRase pour recycler GSSG en GSH) à 340 nm. Une unité enzymatique correspond à 1 μ mole de NADPH oxydé par minute.

2.1.2.4. Mesure de l'activité glutathion réductase (GR)

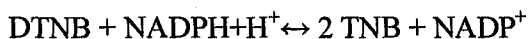
Le dosage de l'activité, d'après la méthode de Carlberg and Mannervik (1985), est basé sur la mesure de décroissance d'absorption du NADPH à 340 nm d'après la réaction suivante :

$$\text{GSSG} + \text{NADPH}_2 \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}$$

Une unité de l'activité enzymatique GR est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la réduction d'1 μ mole de NADPH par minute.

2.1.2.5. Mesure de l'activité thiorédoxine réductase

L'activité thiorédoxine réductase est déterminée par kit Sigma-Aldrich. Le principe de dosage est basé sur la réduction de l'acide 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) (DTNB) par la thiorédoxine réductase en acide 5-thio-2-nitrobenzoic (TNB) de couleur jaune intense mesuré à 412 nm. La réaction de catalyse est la suivante :



2.2. Mesure de l'activité Caspase-3

Le dosage de l'activité Caspase 3 est un test « fluorometric immunosorbent enzyme assay (FIENA) » (kit Roche Applied Science). Le lysat cellulaire est testé pour l'activité protéase par l'ajout de substrat peptide Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp (Ac-DEVD) qui est conjugué à la molécule fluorescente 7-amino-4-trifluorométhyl coumarine (AFC). Le clivage du peptide par la caspase libère les fluorochromes que, lorsqu'excité par la lumière à 400 nm, émet de fluorescence à 505 nm. Le niveau de l'activité enzymatique de la caspase dans le lysat cellulaire est directement proportionnel au signal de fluorescence détectée avec un lecteur de microplaques fluorescentes. Le principe de l'essai est indiqué dans la figure 1 suivante :

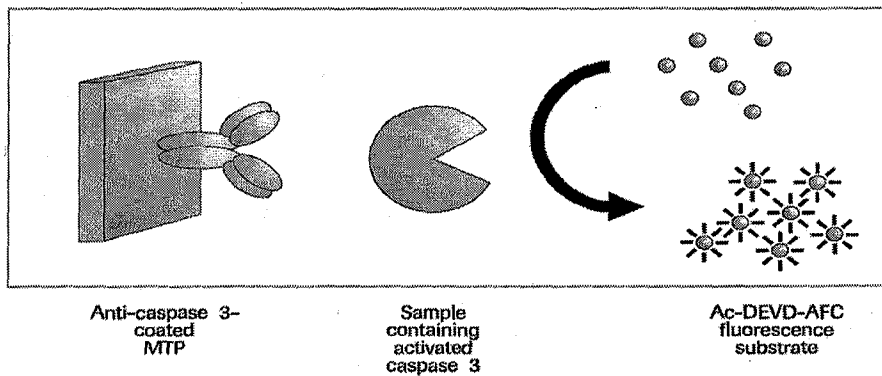


Figure 1 : Principe de dosage de l'activité caspase 3
(Ac-DEVD-AFC = Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluorométhyl-coumarin)

Principales étapes:

1. Caspase 3 des lysats cellulaire est capturé par un anticorps monoclonal.
2. Après l'étape de lavage, le substrat ajouté est clivé proportionnellement à la teneur de la caspase 3 activé et ce clivage protéolytique du substrat libère les molécules 7-amino-4-trifluorométhyl coumarine (AFC) fluorescentes.
3. La fluorescence est déterminé à $\lambda_{ex} = 404$ nm et $\lambda_{em} = 505$ nm. Le fluorochrome développé est proportionnelle à la concentration de la caspase 3 activé et pourrait être quantifiée par une courbe d'étalonnage.

2.3. Mesure de l'apoptose (méthode ELISA)

La fragmentation de l'ADN (histone associé aux mono-et oligo nucléosomes) a été mesurée par le kit « Cell Death detection ELISA^{PLUS} colorimetric assay » (Roche Applied Science, France). Le principe de l'essai est indiqué dans la figure 1 suivante :

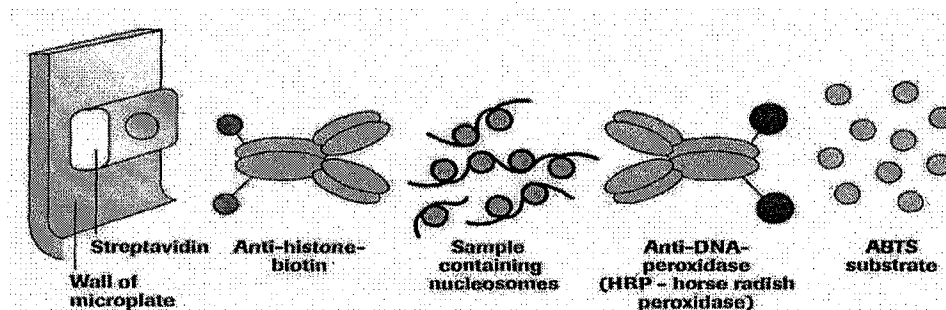


Figure 2 : Principe de dosage de l'apoptose

L'échantillon est placé dans streptavidin-coated MP.

1. Un mélange d'Anti-histone-biotine et Anti-DNA-POD sont ajoutés et incubés. Au cours de l'incubation, l'anticorps Anti-histone se lie aux histones des nucléosomes et simultanément capture l'immunocomplexe au streptavidin-coated MP via son

biotinylation. Additionnellement, l'anticorps Anti-DNA-POD réagit avec le DNA des nucléosomes.

2. Etape de lavage (enlever les anticorps non liés)
3. Détermination quantitative de la quantité de nucléosome par le POD retenu dans l'immunocomplexe. POD est déterminé par photométrie avec ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulfonate(6)) comme substrat.

Les résultats sont exprimés par un ratio de cellules apoptotiques des cellules traitées vs les cellules non traitées et défini comme facteur d'enrichissement

$$\text{enrichment factor} = \frac{\text{mU of the sample (dying/dead cells)}}{\text{mU of the corresponding negative control (cells without CAM treatment)}}$$

mU = absorbance $[10^{-3}]$

2.4. Dosage des ROS intracellulaire (marquage des radicaux libres par des sondes fluorescentes)

La production des espèces réactives de l'oxygène a été mesurée en détectant l'intensité de fluorescence du 5-(et 6)-dichlorométhyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes). Il est non-fluorescent et peut facilement diffuser à travers les membranes cellulaires et hydrolysé par des estérases intracellulaires en un produit non-fluorescent 2', 7'-dihydrodichlorofluorescein, qui est converti en une substance très fluorescentes 2', 7'-dichlorofluorescein après avoir réagit avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaire. Les cellules ont été incubées avec 5 μ M CM-H₂DCFDA pour 30 min à 37 ° C en présence de diverses concentrations de cadmium, l'intensité de fluorescence a été enregistrée par le lecteur de fluorescence BertholdTech Tristar (LB 941). L'excitation à 488 nm et émission à 530 nm. Les lectures ont été numérisées en utilisant MikroWin logiciel (version 4.37).

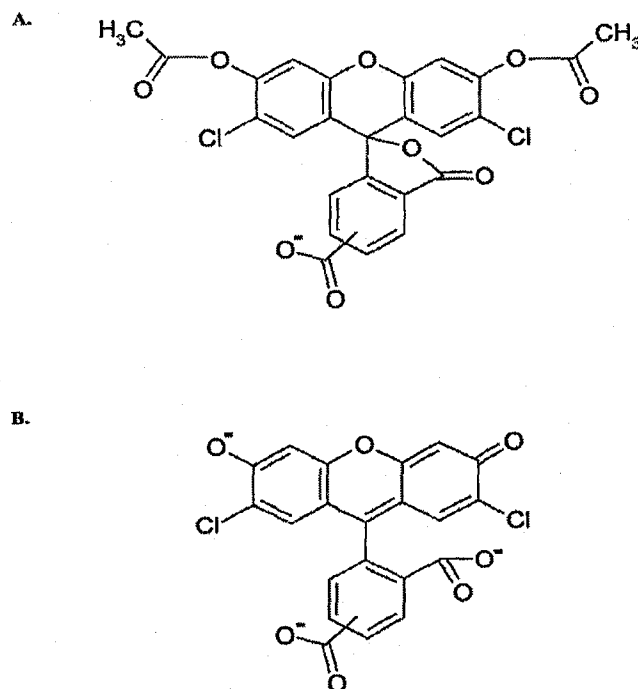


Fig. 1. Structure of nonfluorescent diacetate promoiety 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA) (A) and fluorescent 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) (B) at pH 7.4.

Probes	Reactive Oxygen Species (ROS)					
	Hydrogen Peroxide	Hydroxy radical	Hypochlorous acid	Peroxy radical	Peroxynitrite anion	Superoxide anion
	H ₂ O ₂	HO·	HOCl	COO·	ONOO ⁻	O ₂ ⁻
CM-H2DCFDA	+	+	+	+		
Dihydrorhodamine 123	+		+		+	
H2DCFDA	+			+	+	
Lucigenin*	+					
Coelenterazine					+	+
MCLA*		+				+

2.5. Dosage des oligoéléments intracellulaires par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

Les cellules sont récoltées et les culots cellulaires obtenus sont trois fois par la solution physiologique NaCl 0.9%. Les culots secs sont ensuite resuspendus dans l'eau désionisé à 0°C. Les cellules sont lysées par cinq cycles successifs de congélation (-196°C) et décongélation (37°C). Les dosages des oligoéléments intracellulaires des cellules lymphocytaires sont effectués par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) (Thermo-Electron X). Les limites de détection des oligoéléments sont : 1nMol Se, 52

nMol Zn, 110 nMol Cu, 34 nMol Fe, et 2 nMol Mn par litre ; 72 nM Cd/l. Les résultats sont exprimés en nMol/g protéines solubles.

La spectrométrie de masse est une technique instrumentale d'analyse reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction de leur masse. Elle est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et d'un spectromètre de masse quadripolaire (dans le cas de l'ICP—MS Thermolectron X7) qui sépare ces ions en masse. L'analyse des échantillons par ICP-MS peut être divisée en quatre étapes : introduction-nébulisation, ionisation, séparation en masse, détection. L'échantillon est mis en solution. Un passeur automatique d'échantillons (type AS 90) couplé à une pompe péristaltique introduit la solution dans une chambre de vaporisation où le nébuliseur la transforme en un aérosol liquide composé de micro-gouttelettes de quelques μm à l'aide d'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans une torche à plasma d'argon ($13 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$) à très haute température, suffisante pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments.

Une partie de ce plasma (10%) est échantillonnée par un premier orifice de 1 mm de diamètre environ au sommet d'un cône Xt en nickel, puis se détend sous l'effet du vide modéré (1—2 mbar) qui règne dans une chambre de pompage différentiel (qui permet de passer de la pression atmosphérique au vide secondaire du spectromètre de masse) et passe ensuite dans un deuxième orifice (« le skimmer »). Un système de vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extrait les ions chargés positivement et les transporte vers un filtre de masse quadripolaire. Cet ensemble de lentilles est aussi appelé lentille ionique.

Ce filtre de masse transmet seulement les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Le principe du spectromètre est basé sur la séparation des éléments en fonction de leur charge et de leur masse. Les quatre barres cylindriques qui composent le spectromètre sont séparées en deux paires opposées et soumises à un courant continu (DC) et alternatif (RF). Les deux paires ont des tensions continues opposées et des tensions alternatives de même amplitude et de signe opposé. Dans le plan formé par la paire positive les ions légers sont trop déviés et heurtent les barres. L'ion à analyser et ceux ayant une masse supérieure restent entre les deux barres. Dans ce plan le quadripôle joue le rôle de filtre passe-haut. Dans le plan de la paire négative, ce sont les ions lourds qui sont déviés, ce qui équivaut à un filtre passe-bas. En combinant ces

deux filtres, seuls les ions ayant le rapport m/z (masse/charge) désiré seront transmis au détecteur.

2.6. Analyse des protéines par Western blot

2.6.1 Préparation des échantillons

Les cellules traitées et non traitées ont été collectées, lavées dans du PBS, mis en suspension dans du tampon de lyse [0,5% Triton X-100, 0,5% de sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA et un mélange d'inhibiteur de protéases (1 mM Pefabloc + 2µg/ml aprotinin + 10µg/ml pepstatin + complete EDTA free tablet)]. Les protéines extraites sont dosées; puis les lysats cellulaires (20-40 µg de protéines) sont dilués dans le tampon Laemmli et déposés dans le gel.

2.6.2 Mise en évidence des métallothioneines

Le western blot des métallothioneines (MTs) est réalisé d'après la méthode de Mizzen *et al.* (1996). L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes : 20 µg de protéines totales sont dénaturées par chauffage à 100°C dans du tampon de dénaturation (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 10 mM EDTA ; 20% (v/v) glycérol ; 1% (w/v) SDS ; 0,005% (w/v) bleu de bromophénol ; 100 mM dithiothreitol (DTT)), suivie d'une migration en SDS-PAGE (gel de séparation à 15%).

Transfert sur membrane et traitement à la glutaraldéhyde.

Deux tampons de transfert ont été testés : (a) Après électrophorèse, les gels sont incubés dans le tampon de transfert [192 mM de glycine, 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) 20% (v/v) méthanol (Towbin *et al.* 1979)] à la température ambiante pendant 20 min et (b) dans le tampon CAPS (10 mM 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid pH 10,8 dans 10% méthanol (LeGendre 1989) avec l'ajout de 2 mM CaCl₂ pour chaque tampon. Le chlorure de calcium enlève le SDS fixé aux protéines, favorisant ainsi leur fixation maximale sur la membrane. Les protéines sont ensuite transférées à 40 V et à 4°C sur une membrane de nitrocellulose (PROTAN) pendant 1h à l'aide de l'appareil Bio-Rad transblotting. La membrane a été incubée pendant 1h dans du glutaraldéhyde (2,5% final) qui permet d'augmenter de 1,5 à 12 fois la rétention des protéines de faible masse molaire par rapport à la membrane non traitée (Karey and Sirbasku 1989; McKeon and Lyman 1991; Mizzen *et al.* 1996), puis lavée 3 fois 5 min dans du tampon phosphate (8,1 mM Na₂HPO₄ ; 1,2 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl, pH 7,4). Au troisième lavage, on rajoute 50 mM de monoéthanolamine pour arrêter la réactivité résiduelle du glutaraldéhyde.

Immunodétection. La membrane de nitrocellulose est saturée dans TBS/tween/lait (TBS : 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 ; 154 mM NaCl) et 0,1% (v/v) Tween-20 à température ambiante pendant 2h. La membrane est ensuite incubée la nuit dans l'anticorps primaire (monoclonal mouse anti-horse metallothionein, Dako, clone E9) dilué au 1/1000ème dans 10% de lait-TBS-tween à température ambiante avant lavage dans du TBS-tween et incubation pour 4h en température ambiante dans l'anticorps secondaire anti-mouse couplé à la peroxydase de raifort (goat anti-mouse IgG (Bio-Rad) dilué 1/1000ème dans 10% lait-TBS-Tween. Après 3 lavages dans du TBS-Tween, la révélation est effectuée par la technique ECL (Enhanced chemiluminescence, Amersham), puis les membranes sont exposées sur un film photographique (Hyperfilm™ ECL™, Life Science, Amersham).

2.6.3 L'hème oxygénase

Electrophorèse : SDS-PAGE avec gel de séparation à 12% et gel de concentration à 4%

Blotting: blotter sur une membrane de nitrocellulose à 150 mA pendant 2H dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine) à 20% de méthanol.

Immunodétection. La membrane de nitrocellulose est saturée une nuit dans TBS/lait à 5% (TBS : 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 ; 154 mM NaCl) à 4°C. La membrane est ensuite lavée au TBST (TBS tween 0.1%) (2x15min et 2x5min) et incubée pendant 1h dans l'anticorps primaire (Heme Oxygenase 1 (C-20): sc-7695 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) dilué au 1/1000ème dans 5% de lait-TBS-tween à température ambiante.

Ensuite lavage dans du TBS-tween (3x10 min) et incubation 1H dans l'anticorps secondaire (donkey anti-goat IgG-HRP) dilué 1/4000ème dans 5% lait-TBS-Tween. Après 2 lavages (2x10 min) dans du TBS-Tween et lavages rapide dans TBS, la révélation est effectuée par le kit ECL plus western blotting detection (Enhanced chemiluminescence, Amersham), puis les membranes sont exposées sur un film photographique (Hyperfilm™ ECL™, Life Science, Amersham). Les films sont analysés par Gel-Pro analyser software version 4.

2.7. qRT-PCR

La RT PCR en temps réel permet de suivre l'amplification du transcrit en temps réel grâce à l'incorporation d'un fluorochrome, le Sybr Green dans l'ADN double brin. Le Sybr Green possède un maximum d'excitation à 497 nm et un maximum d'émission à 520 nm.

Dans l'état non lié, le colorant n'a que peu de fluorescence alors que, lorsqu'il se lie à l'ADN double brin produit à chaque cycle d'amplification, la fluorescence augmente. Ceci permet de suivre « en direct » l'accumulation du produit. Au moment de la dénaturation, tous les ADN sont simples brins et le Sybr Green est libre en solution, au cours de l'étape

d'hybridation/élongation (réalisée simultanément avec l'enzyme utilisée), les amorces s'hybrident à la séquence cible et servent à former l'ADN double brin auquel se lie le Sybr Green. À partir d'un certain nombre de cycles que l'on appelle Ct (*cycle threshold*), la fluorescence commence à augmenter significativement au-dessus du bruit de fond. Le Ct est inversement proportionnel au logarithme de la quantité initiale de transcrite dans l'échantillon ; plus la quantité de matrice initiale est importante, plus faible sera le nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence est au-dessus du bruit de fond. Cette méthode quantitative basée sur la détermination du cycle seuil Ct est précise car les mesures sont prises pendant la phase d'amplification exponentielle au moment où l'efficacité n'est pas influencée par la limitation en réactifs.

2.7.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par le RNeasy® mini Kit (50) commercialisé par Qiagen, à partir de culots cellulaires secs congelés à -80 °C, contenant 6.10^6 cellules. Brièvement, les cellules subissent une étape de lyse (Tampon RLT® enrichi de β mercaptoéthanol 10 %). Le lysat est alors déposé sur une colonne à base de silica-gel qui a des affinités de liaison sélectives pour les ARNs. Une digestion à la DNase (1 X de tampon de l'enzyme, 10 U DNase dans de l'eau DEPC) est effectuée avant les étapes de lavage.

Après trois lavages qui permettent l'élimination des contaminants, l'ARN total est élué dans 30 μ l d'eau sans RNase.

2.7.2. Dosage et contrôle qualité des extractions des ARN totaux

Les ARN totaux extraits sont dosés par spectrophotométrie (NanoDrop 1000A Spectrophotometer). Les lectures sont effectuées à 260 nm (dosage des acides nucléiques), 280 nm (contamination par les protéines), 220 et 230 nm (contamination par le phénol et l'urée) et 310 nm (contaminations et saleté des cuvettes). Le rapport 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2, et la concentration de l'ARNt est exprimée en μ g/ μ l.

Les extraits d'ARN ont ensuite été dilués dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, de façon à obtenir une concentration comprise entre 25 et 500 ng/ μ l afin d'être analysée qualitativement et quantitativement avec précision par le bio analyseur Agilent 2100 (RNA 6000 Nano). Les échantillons sont déposés sur des puits constituant des micro-réseaux dans lesquels est également déposé un gel pour l'analyse qualitative. La durée de migration est de 30 minutes à 100 volts. Pour chaque échantillon déposé, l'analyse quantitative est déterminée par fluorescence en fonction du temps de rétention des sous-unités (su) 18 S et 28S au sein du micro-réseau. Le temps de rétention (données qualitatives) et l'intensité de la fluorescence

(données quantitatives) sont validés par rapport au marqueur de poids moléculaire. Les résultats quantitatifs sont exprimés en ng/μl d'ARN. L'analyse qualitative est déterminée par l'aspect des bandes de la sous-unité 28S et de celle de la sous-unité 18S, la bande 28S devant être deux fois plus intense que la 18S.

2.7.3. *Transcription Reverse : Préparation de l'ADNc par la réverse transcriptase*

La transcriptase réverse est une enzyme isolé de rétrovirus qui a une activité ADN polymérase ARN dépendante ce qui permet de synthétiser un ADNc à partir de l'ARN. Elle fonctionne dans le sens 5' à 3'.

La transcription reverse est réalisé par le kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen) sur 2 μg d'ARN par tube.

2.7.4. *qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)*

La qPCR est réalisé par le kit QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Qiagen) dont le contenu est :

HotStarTaq DNA Polymerase:	HotStarTaq DNA Polymerase is a modified form of a recombinant 94 kDa DNA polymerase, originally isolated from <i>Thermus aquaticus</i> , cloned into <i>E. coli</i> . (Deoxynucleoside-triphosphate: DNA deoxynucleotidyltransferase, EC 2.7.7.7).
QuantiTect SYBR Green PCR Buffer:	Contains Tris-Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 mM MgCl ₂ , pH 8.7 (20°C)
dNTP mix:	Contains dATP, dCTP, dGTP, and dTTP/dUTP; ultrapure quality
Fluorescent dyes:	SYBR Green I and ROX
RNase-free water:	Ultrapure quality, PCR-grade

Les expériences de Real-time PCR pour chacun des transcrits, ont été réalisées avec l'appareil Stratagene Mx3005P. Le mélange de réaction est composé de 12.5 μl de SYBR Green QPCR Master Mix, 1 μl primer sens (10 μM), 1 μl primer antisens (10 μM) et 2 μl d'ADNc (2 ng/μl), le tout est ajusté à 25 μl avec de l'eau sans RNase.

2.7.4.1 *Design des amorces*

Length	18–30 nucleotides
GC content	40–60%
T_m	Simplified formula for estimating melting temperature (T _m): $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$ Whenever possible, design primer pairs with similar T _m values. Optimal annealing temperatures may be above or below the estimated T _m . As a starting point, use an annealing temperature 5°C below T _m .
Sequence	<ul style="list-style-type: none"> ☑ Ideally, the length of the PCR product is 100–150 bp. ☑ Avoid complementarity of 2 or more bases at the 3' ends of primer pairs to reduce primer-dimer formation. ☑ Avoid mismatches between the 3' end of the primer and the target-template sequence. ☑ Avoid runs of 3 or more Gs or Cs at the 3' end.

2.7.4.2 Primers utilisés

1. RPL27

GenBank Accession [NM_000988](#)
Ribosomal protein L27; 60S ribosomal protein L27
Gene Description [Homo sapiens].

PrimerBank ID	4506623a2			
Amplicon Size	125			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	TGGCTGGAATTGACCGCTAC	20	62.2	128-147
Reverse Primer	CCTTGTGGGCATTAGGTGATTG	22	61.2	252-231

2. HSP32

GenBank Accession [NM_002133](#)
Heme oxygenase (decyclizing) 1 [Homo sapiens].
Gene Description [Homo sapiens].

PrimerBank ID	4504437a2			
Amplicon Size	112			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	CAGTGCCACCAAGTTCAAGC	20	61.8	519-538
Reverse Primer	GTTGAGCAGGAACGCAGTCTT	21	62.9	630-610

3. MTF1

GenBank Accession [NM_005955](#)
Metal-regulatory transcription factor 1 [Homo sapiens].
Gene Description [Homo sapiens].

PrimerBank ID	5174589a2			
Amplicon Size	143			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	GGACAGTGC GGAGA AACTT	20	62.1	193-212
Reverse Primer	GTGGAACCA GGGTTTATTGTCA	22	60.2	335-314

4. DMT

GenBank Accession

NM_000578

Gene Description

solute carrier family 11 (proton-coupled
divalent metal ion transporters)

PrimerBank ID	10835151a2			
Amplicon Size	103			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	GCCCTGTCCGTCTCCTTATC	21	61.9	871-891
Reverse Primer	TGTTGGCACAGATGTTGAACG	21	61.4	973-953

5. ZIP1

GenBank Accession

NM_014437

Gene Description

solute carrier family 39 (zinc transporter),
member 1; zinc transporter [Homo sapiens].

PrimerBank ID	21361423a2			
Amplicon Size	144			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	ACTACCTGGCTGCCATAGATG	21	61.1	272-292
Reverse Primer	GCCCTGACTGCTCCTTGTAAAG	21	62.4	415-395

6. ZIP3

GenBank Accession

NM_144564

Gene Description

solute carrier family 39 (zinc transporter),
member 3; zinc transporter [Homo sapiens].

PrimerBank ID	32490561a1			
Amplicon Size	118			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	TGGCCGAAACCATCCTCCT	19	63.0	257-275
Reverse Primer	GATCCGCGTTGAAGGTCTC	20	62.6	374-355

7. ZIP8

GenBank Accession

NM_022154

PrimerBank ID	24586665a3			
Amplicon Size	140			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	TGCTACCCAAATAACCAGCTCC	22	62	264-285
Reverse Primer	ACAGGAATCCATATCCCCAAACT	23	60.8	403-381

8. ZnT1

GenBank Accession

NM_021194

Gene Description

solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1; zinc
transporter 1 [Homo sapiens].

PrimerBank ID	14141726a2			
Amplicon Size	113			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	CCCCGCAGACCCAGAAAAC	19	62.9	615-633
Reverse Primer	GTTGTCCAGCCCTATCTTCTTC	22	60.1	727-706

9. ZnT5

GenBank Accession [NM_022902](#)

zinc transporter ZTL1; zinc transporter 5; likely ortholog of mouse solute carrier family 30 (zinc transporter), member 5

Gene Description [Homo]

PrimerBank ID	20070323a1			
Amplicon Size	108			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	ACCAAAACACCAGTGGATCAAAA	22	60.3	262-283
Reverse Primer	CAGCAAAGTCCTTAGTGGTCC	21	60.3	369-349

10. T calcium channel alpha1G subunit

GenBank Accession [AF134985](#)

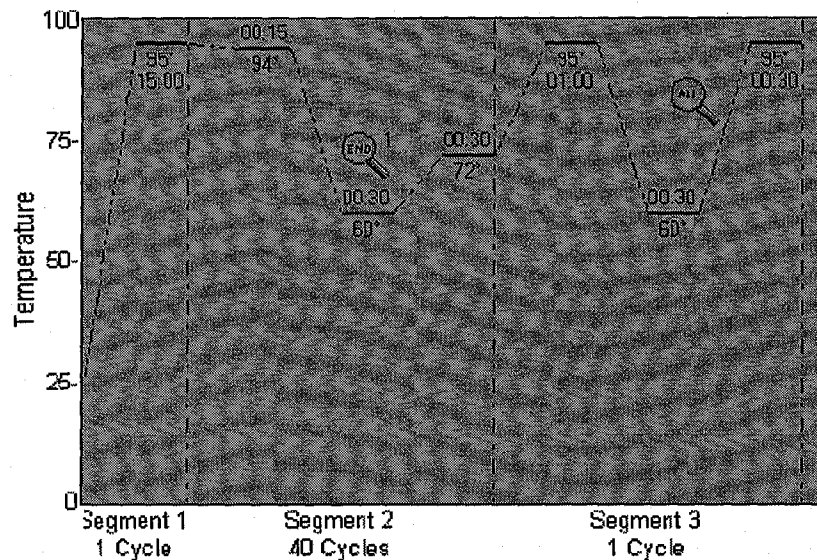
Gene Description T calcium channel alpha1G subunit [Homo sapiens].

PrimerBank ID	6625657a3			
Amplicon Size	97			
	Sequence (5' -> 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	AAGAGAAGGAGTAAGGAGAAGCA	23	60.2	4627-4649
Reverse Primer	TGCACAAGTGGTGGACGAG	19	62.2	4723-4705

2.7.4.3 Conditions

Step	Time	Temperature	Additional comments
PCR			
Initial activation step	15 min	95°C	HotStar Taq DNA Polymerase is activated by this heating step.
3 (4)-step cycling:			
Denaturation*	15 s	94°C	
Annealing	30 s	50-60°C	Approximately 5 to 8°C below T_m of primers.
Extension	30 s	72°C	Perform fluorescence data collection, unless an additional data acquisition step has been integrated.
Optional: Data acquisition	15 s	x°C	T_m dimer < x < T_m product: see steps 7 and 8 for details.
Cycle number	35-45 cycles		Cycle number depends on the amount of template DNA.

Thermal Profile

**Calcul**

$$0) \text{ ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001 (Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408.)

or

$$1) \text{ ratio} = \frac{E^{\Delta C_T(\text{target})}}{E^{\Delta C_T(\text{internal standard})}}$$

Pfaffl, M.W. 2001. (A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45.)

2.8 Etude histologique**2.8.1 Etape de confection des coupes****2.8.1.1 Prélèvements**

Le prélèvement devra être réalisé le plus rapidement possible; les pièces ont intérêt à être aussi large et aussi mince que possible, afin de permettre à la fois une bonne étude topographique et une fixation satisfaisante. Leur épaisseur ne doit pas dépasser 5 mm.

2.8.1.2 Fixation

Les fragments tissulaires (3 mm) sont plongés rapidement dans des piluliers contenant des fixateurs. La fixation est le temps essentiel de la technique histologique, car un défaut de fixation est irrémédiable et il est inutile d'entreprendre l'examen d'une pièce mal fixée.

La fixation a pour but :

- ♦ De durcir les tissus pour leur permettre de subir sans déformation les manipulations à venir.
- ♦ De provoquer la mort des cellules par coagulation en préservant leur aspect morphologique.

- ♦ D'assurer l'insolubilité des éléments constitutifs lors des lavages.
- ♦ De protéger la pièce prélevée contre les attaques bactériennes et l'autolyse, et de préparer les structures aux traitements ultérieurs (Brugère-picoux et Silim, 1991).

Des fixateurs doivent pouvoir assurer les buts de la fixation évoqués ci-dessus. Ils ne remplissent pas systématiquement toutes les conditions. Le fixateur choisi est le *formol* (100 ml Formol de commerce (à 40%), 10 g carbonate de calcium en excès, eau distillée Q.S.P 1000 ml, pH 7) (durée de fixation 6 à 12h), et le *mélange de Bouin* (solution aqueuse saturé d'acide picrique (30 vol.), formol (40% formaldéhyde) (10 vol.), acide acétique (2 vol.)) (durée de fixation de 48h) (Culling et al., 1988).

2.8.1.3 L'inclusion :

L'inclusion consiste en une imprégnation totale de la pièce, à l'échelle cellulaire, par une substance plastique, chimiquement neutre, appelée milieu d'inclusion ou d'imprégnation. Après le prélèvement et la fixation que l'on a effectuée précédemment, on lave les pièces fixées dans le *formol* et dans le *mélange de Bouin* à l'alcool (70°), ensuite on passe à l'*inclusion* qui comprend les étapes suivantes:

- **Déshydratation :**

On débarrasse le tissu de l'eau qu'il contient grâce à un agent déshydratant miscible à l'eau; une mauvaise déshydratation a des effets à court et long terme sur la réalisation des coupes et la conservation des blocs. Cette étape comporte trois bains successifs:

(i) Alcool (95°)6h

(ii) Alcool absolu4h

(iii) Alcool absolu4h

- **Eclaircissement:**

L'agent déshydratant étant rarement miscible au milieu d'inclusion on le remplace par un liquide miscible avec le milieu; durant cette étape le tissu devient transparent, d'où le nom de l'opération. Un mauvais éclaircissement donne des blocs de consistance hétérogène, des rétractions ou distorsions excessives. Cette étape comporte deux bains successifs:

(i) Toluène I.....3h

(ii) Toluène II.....3h

- **Imprégnation:**

La pièce est placée dans le milieu d'inclusion qui pénètre dans toutes les cellules, imprégnation par le paraffine fondue (55 à 57°C) trois bains successifs chacun à trois heures.

Ensuite l'inclusion proprement dite: elle se fait dans des moules (ou barres de Leuckart) sur une plaque de verre.

2.8.1.4 Exécution des coupes au microtome

Les pièces incluses doivent être débitées en coupes aussi fines et régulières que possible, de 4 à 6µm.

2.8.1.5 Collage des coupes

Les collages se font sur des lames parfaitement dégraissées et couvertes d'une couche mince de l'eau gélatinée (3g de gélatine dans 100 ml d'eau Distillée). Sur une plaque chauffante, le séchage définitif des lames se fait à l'étuve à une température voisine de 40°C (une journée ou deux).

2.8.2 Coloration par la méthode Hémalum-Eosine :

2.8.2.1 Réactifs

- Hémalum de Mayer :

Eau distillée.....	1000 ml
Hématoxyline cristalisable.....	1g
Iodate de sodium NaIO ₃	0.2g
Alun de potassium Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄	50g
Acide citrique.....	1g

- Solution d'Eosine Y à 1%

2.8.2.2 Mode opératoire

- 1- Déparaffiner au toluène et hydrater (alcool absolu, 95°, 70°, alcool 70° (4 volumes) + formol (1 volume))
- 2- Colorer dans Hémalum de Mayer 5-10 min
- 3- Laver rapidement à l'eau courant
- 4- Virer dans une solution aqueuse à saturation de carbonate de lithium
- 5- Différencier à l'eau chlorhydrique à 0.1% jusqu'à décoloration complète du cytoplasme.
- 6- Laver à l'eau
- 7- Colorer dans solution aqueuse d'Eosine Y à 1%
- 8- Laver à l'eau courant
- 9- Déshydrater (alcool à 95°, alcool absolu, toluène) et monter.

Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Etude des effets du plomb et du cadmium sur le statut antioxydant des rats Wistar.

Présentation de l'article 1:

L'exposition des animaux et des humains à différents composants métalliques par l'eau ou l'atmosphère contaminée peut entraîner un large éventail de conditions cliniques délétères. Les conséquences toxicologiques qui découlent de l'exposition répétée à de multiples contaminants métalliques ne sont pas connues. Le but de la présente étude est d'évaluer le stress oxydatif induit par un mélange de deux métaux (cadmium et plomb) et d'examiner si l'exposition à plus d'un métal lourd pourrait causer un effet additif, synergique ou antagoniste.

Nos résultats indiquent que l'exposition des rats Wistar au plomb ou au cadmium a des conséquences importantes sur les paramètres hématologiques et modifie considérablement les différents paramètres du stress oxydant dans les tissus. La co-exposition au plomb et au cadmium ne montre, par contre, pas d'effet additif ou synergique.

Article 1: Antioxidant status and oxidative damage in the liver, brain and kidney of Wistar rats co-exposed to lead and cadmiumSaïd Nemmiche^{a, b}, Daoudi Chabane-Sari^a, Pascale Guiraud^{b, c}

^a Laboratoire de physio pharmacologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen cedex 13000, Algérie ; ^b Laboratoire Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xénobiotiques (ORSOX), EA-3776, CEA-LRC 8M, UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche, France ; ^c Laboratoire de Biochimie et Génétique moléculaire (LBGM), EA 2526, Faculté des Sciences et Technologies, Université de La Réunion, 97715 St Denis Messag, La Réunion, France.

Abstract:

Human and animal exposure to environmental chemicals is rarely limited to a single compound. Concerning heavy metals, lead (Pb) and cadmium (Cd) may cause adverse health effects at lower exposure levels than previously anticipated. The aim of the present study was to examine if the exposure to more than one heavy metal could cause an additive, synergistic, or antagonistic effect, by assessment of the oxidative damage induced by a mixture of two metals (Pb and Cd) in Wistar rat's blood, brain, liver and kidney. Male albino rats were treated intravenously with lead acetate (2 mg/kg body weight/day), and cadmium chloride (2 mg/kg body weight/day), or with both metal salts simultaneously. The activities of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as the concentration of malondialdehyde (MDA) and proteins carbonyl contents, respectively as indicators of lipid and protein oxidation, were measured in brain, liver and kidney homogenates.

Current findings showed that MDA levels and protein carbonyl contents were increased with significant decrease in GSH level and antioxidant enzymes (SOD and CAT) activities in rats exposed group compared to control group. On the other hand, a strong relationship between oxidative stress parameters, δ -aminolevulinatase and chronic renal failure was shown. Histological evaluation of liver injury revealed that acute toxicity was accompanied by hepatocellular swelling and sinusoidal congestion. Our results indicate that exposure of rats to lead and cadmium has consequences on haematological parameters and change various oxidative stress parameters in the tissues. Lead and cadmium in combination did not show additive or synergistic effects indicating a probable competition due to their similarity in electronic affinities.

Keys Words: Oxidative Stress, Lead, Cadmium, Liver, Brain, Kidney, Rats.

1. Introduction

Human and animal exposure to environmental chemicals is rarely limited to a single compound. Rather, they are exposed concurrently or sequentially to multiple chemicals from a variety of sources (Jadhav *et al.*, 2007). Cadmium (Cd) and lead (Pb) are ubiquitous toxic contaminants in our environment which pose a substantial threat to animal and human health. They are accumulating in specific organs of the human body, and as it is the case with other heavy metals, humans and animals have difficulty eliminating these compounds.

Cd occupies a unique place among metals because of its diverse toxic effects: it has a long biological half-life (20–30 years in humans), low rate excretion from the body (1–2 µg/day), and its predominant long term storage in soft tissues (Goering *et al.*, 1995). Cd accumulates and proves to be very toxic in many organs, such as kidney, liver, testis, brain, bone, blood system, and lung.

It is known that enhanced production of reactive oxygen species (ROS) is harmful for cells, because they overwhelm cellular intrinsic antioxidant defense mechanisms, resulting in oxidative stress. ROS can oxidatively damage cellular thiol groups in proteins, nucleic acids, or lipids.

Oxidative stress has been associated with Cd and Pb exposure in humans and experimental animal models. Increasing evidence indicates that multifactorial mechanisms might be involved in metal-induced oxidative stress. Evidence is accumulating to support the role of oxidative stress in the pathophysiology of Pb or Cd poisoning (Ercal *et al.*, 2001; Stohs and Bagchi, 1995). Until now, data on Pb- or Cd-induced oxidative stress have been mostly obtained with *in vitro* experiments (Gaubin *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005; Nzengue *et al.*, 2008) or animal studies (Tandon *et al.*, 2003; Farmand *et al.*, 2005; Nemmiche *et al.*, 2007).

Different mechanisms can be involved in Pb-induced oxidative damage. Pb alters several cell signals, in particular those sensitive to calcium, affecting second messengers which subsequently modulate transcription factors and ultimately gene expression. Liver, kidneys and brain have been considered as the target organs for the toxic effects of lead (Sharma and Street, 1980). It is known that Pb has detrimental effects on the central and peripheral nervous systems (Adonaylo and Oteiza, 1999a; Nemmiche and Chabane-Sari, 2006), and the hematopoietic, cardiovascular and reproductive systems, kidneys (Oktem *et al.*, 2004) and liver (Hsu and Guo, 2002). Pb is considered a potential human carcinogen. Mechanisms of Pb carcinogenicity include direct DNA damage, clastogenicity and inhibition of DNA synthesis or repair. Pb may also generate ROS and cause oxidative damage to DNA. It can substitute

for Zn in several proteins, which function as transcriptional regulators, e.g., Zn finger (Sibergel *et al.*, 2000). Pb accumulates in different brain regions and high levels of lipid oxidation were found in the parietal cortex, striatum, hippocampus, thalamus, and cerebellum in rats exposed to Pb during gestation and until postnatal day 45 (Villeda-Hernandez *et al.*, 2001). The neurotoxic effect of Pb, particularly in the developing brain is a matter of serious concern and behavioral abnormalities, learning impairment, decreased hearing and impaired cognitive functions in humans and experimental animals have been recorded with blood lead levels as low as 10 µg/dl (Bressler *et al.*, 1999).

Several reports are dealing with the influence of Cd in synaptic neurotransmission in the brain of rats (*in vivo* microdialysis in rat amygdala) (Minami *et al.*, 2001), rat brain neurotransmitter levels (Andersson *et al.*, 1997), and brain antioxidant status (Carageorgiou *et al.*, 2004). Cd increased brain acetylcholinesterase activity and decreased brain total antioxidant status of adult male rats (Carageorgiou *et al.*, 2005).

Pb and Cd are considered to be cumulative poisons; thus, health effects from the exposure to Cd and Pb are rarely observed after a single exposure. Health effects from Cd and Pb exposure are chronic events, requiring time and repeated exposure for the heavy metals to bioaccumulate to toxic levels.

The aim of the present study was to examine if the exposure to both Cd and Pb could cause an additive, synergistic, or antagonistic effect.

2. Materials and methods

2.1 Animals and experimental design

All experiments were performed with male albino Wistar rats (Iffa Credo, France), weighing 80 ± 5 g at the beginning of the experiment. After 1 week of adaptation in a room with controlled temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) and lighting (12h light: 12h dark), the animals were feed pellet diet and water *ad libitum*. The rats were divided into four groups; each group consisted of six animals. Control rats (group 1) received intravenous injection of sterilized physiological saline solution. Groups 2 and 3 were treated with cadmium chloride and lead acetate, respectively, at a dose level of 2mg/kg body weight/day. Group 4 animals were treated with a combined dose of 2 mg cadmium chloride and 2mg lead acetate/kg body weight/day.

Control and treated groups were sacrificed by decapitation under ether inhalation anaesthesia at the end of the 15 days experimentation period and one day after the last treatment. They were treated, manipulated and killed according to the Principles of laboratory Animal Care.

2.2 Haematological parameters and sample preparation

Blood was collected into tubes containing EDTA as anticoagulant. After centrifugation (1600 x g) for 10 min, the plasma was carefully removed to avoid contamination with platelets, and the sample was, as rapidly as possible, frozen and stored at -20 °C until analysis.

The total red blood cells (RBCs) and white blood cells (WBCs) counts and haematocrit (Ht) value determination were performed by standard haematological techniques. The haemoglobin (Hb) concentration was determined by the cyanomethemoglobin method.

Brain, liver and kidney were immediately removed, rinsed in ice cold saline solution (20mM Tris-HCl, 0.14M NaCl buffer, pH 7.4), weighted and finely minced in the same solution and homogenized (10% w/v) in a Potter Elvehjem homogenizer. The homogenate tissue and plasma were used for immediate lipid peroxidation assay and homogenate aliquots were stored for further biochemical determination.

2.3 Antioxidant enzymes activity assay

2.3.1 Determination of catalase (CAT) activity

The catalase activity was determined according to the method of Aebi (1984). The rate of H₂O₂ decomposition was followed by monitoring absorption at 240 nm in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 mM H₂O₂. One unit of catalase activity is defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μmol of hydrogen peroxide in 1 min. The activity was calculated using the extinction coefficient for H₂O₂ ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.3.2 Determination of superoxide (SOD) activity

The activity of SOD was determined in tissue homogenates according to the method described by Spitz and Oberley (2001). The rate of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction to blue formazan by the superoxide anion generated by the xanthine oxidase reaction was monitored spectrophotometrically at 560 nm. One unit of SOD activity is defined as the amount of the enzyme that inhibits NBT reduction by 50%.

2.4 Other enzyme activities and markers assay

2.4.1 Serum transaminases activities assay

Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymes activities were used as biochemical markers for the early acute hepatic damage and

determined by the enzymatic methods according to manufacturer instructions (ChronoLab, Switzerland).

2.4.2 Markers of kidney damage

The urea and creatinine levels were determined using a commercially available kit from Bioassay Systems.

2.4.3 Determination of δ -aminolevulinatase (δ -ALAD) activity

ALAD activity was determined following the procedure of Fujita (1999). Samples were incubated with δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) at 37°C for 60 min. The reaction was terminated with trichloroacetic acid/HgCl₂ and mixed well. The mixture was centrifuged and the supernatant was incubated with the modified Ehrlich's reagent. The amount of enzymatically synthesized porphobilinogen (PBG) is estimated as an Ehrlich-PBG color salt with a molar absorption coefficient of 6.2×10^4 at 555 nm. One unit (U) of enzyme activity is defined as 1 μ mol of PBG formed per hr at 37°C.

2.5 Oxidative stress parameters

2.5.1 Glutathione (GSH) content

Total GSH contents were determined spectrophotometrically using the method described by Akerboom and Sies (1981). Protocol for total GSH was as follows: in 1 ml final volume sample, 730 μ l potassium phosphate buffer, 0.1M (pH 7.0) containing 1 mM EDTA, 50 μ l of 4 mg/ml NADPH in 0.5% NaHCO₃ and 20 μ l of 1.5 mg/ml 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma) in 0.5% NaHCO₃ were added. The reaction was started by adding 6 units of GSH reductase. The absorbance was measured for 1 min at 412 nm at 25°C, and the GSH level is expressed as nmol per mg of total protein.

2.5.2 Measurement of malondialdehyde (MDA)

Lipid peroxidation was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and was expressed in terms of malondialdehyde content, according to the method of Ohkawa et al., (1979) and Yagi (1976, 1984). Briefly, an aliquot of 200 μ l of serum or tissue homogenates (10% w/v) was mixed thoroughly with 0.8% aqueous solution of thiobarbituric acid and heated at 95°C for 30 min in a water bath. The suspension was then cooled to room temperature, centrifuged at 4 000 r/min for 10 min, and the pink colored supernatant was taken for spectrophotometry measurement at 532 nm for MDA assay. Malondialdehyde concentration was calculated by the absorbance coefficient of MDA-TBA complex (absorbance coefficient. = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Results are expressed as nmol MDA per mg Hb or nmol MDA per gram wet weight of tissue.

2.5.3 Measurement of protein carbonyls

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Levine *et al.*, 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in 10 mM DNPH in 2M HCl and allowed to stand at room temperature for 1 h, with vortexing every 10 min. Proteins were then precipitated with 500 μ l of 20% trichloroacetic acid, centrifuged and the pellet was washed three times with 1 ml ethanol-ethyl acetate (1:1) to remove free reagent. The final pellet was dissolved in 20% sodium dodecyl sulphate prepared in 20 mM Tris-HCl, 0.14 M NaCl buffer (pH 7.4). Carbonyl content was calculated from the maximum absorbance (370 nm) using a molar absorption coefficient of $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Results are expressed as nmol carbonyls per mg protein.

2.6 Determination of lead and cadmium concentration

Lead and cadmium were measured by atomic absorption spectrophotometry with graphite furnace (Pye Unicam SP9) and deuterium background correction. The tissue homogenates samples were digested with an acid mixture ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$). Twenty μ l aliquots of supernatants were dispensed into the graphite tube and peak heights measured at 283.3 nm (for lead) and at 228.8 nm (for cadmium) resonance line at the standard conditions as given in the manufacturer's analytical methods manual. All the labware was previously washed with 10% suprapure HNO_3 overnight and thoroughly rinsed with deionized water (18M Ω).

2.7 Protein measurement

Determination of the protein content was based on the Bradford method (Bradford, 1976) with BSA as a standard.

2.8 Histological examination

Portions of liver samples were fixed in Bouin's fixative, dehydrated through graded ethanol, embedded in paraffin, sliced into 5.0 μ m sections, and stained with hematoxylin and eosin. These sections were examined by light microscopy for histopathological changes (Lillie and Fuller, 1976).

2.9 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. Significance was tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and we compared means by the Newman-Keuls test. Values of $p < 0.05$ were considered of statistical significance.

3. Results

The results of the effects of lead and cadmium either alone or in combination on the haematological parameters of the Wistar rats are given in Table 1. A significant reduction in RBCs count, content of Hb and Ht rate were observed while WBCs count increased significantly when compared to the control group.

The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALAD) in blood were significantly inhibited after metal exposure with concurrent and significant elevation in lipid peroxidation level (Table 2), activities of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) (Table 3) and urea and creatinine levels (Table 3).

δ -ALAD activity in blood correlated positively with hemoglobin content ($r = 0.9987$, $P < 0.001$). In contrast, δ -ALAD correlated negatively with MDA ($r = -0.833$). Cd and Pb intoxication also led to increased lipid and protein oxidation and to alterations in antioxidant defenses in liver, brain and kidney.. In the treated groups a significant decrease in reduced glutathione content (Fig. 1), and a significant elevation in lipid peroxidation (Fig. 2) and protein carbonyl levels (Fig. 3) were shown compared to control animals. Significant inhibition was observed in the activity of CAT and SOD in brain, liver and kidney for the groups exposed to Pb and Cd (Table 3). The rats receiving combined treatment with both Pb and Cd exhibited intermediate values compared to individual metal treated groups. For instance, the liver activities of CAT and SOD decreased as a result of Cd administration (by 25%, $P < 0.001$ and 52%, $P < 0.001$, respectively) whereas the concentration of MDA increased about twofold ($P < 0.001$) vs control. Similar pattern of changes was observed after a treatment with Pb alone. CAT and SOD activities decreased by 21% ($P < 0.001$) and 47% ($P < 0.001$), and MDA concentration increased about two-fold ($P < 0.001$). In the rats co-exposed to Pb and Cd, the activities of CAT and SOD decreased (by 23% and 50%) compared to the control.

The concentrations of Pb and Cd determined in blood of Pb- and Cd-exposed groups were very significantly higher than in the control group (Table 4 and 5). The co-exposure to Pb and Cd did not influence significantly the final concentration of each metal in blood.

Microscopic examination of hepatic section of the both Pb- and Cd-exposed groups revealed signs of cell injury (Figure 4B) when compared to hepatocytes from the control group (Figure 4A). Vacuolar and granular degenerations, heterochromatic nucleuses and sinusoidal dilatations were observed in liver tissue.

Table 1. Effects of lead and cadmium separately or in combination on the haematological parameters of the Wistar rats.

	Groups			
	Control	Pb	Cd	Pb + Cd
Red blood cells ($10^6/\text{mm}^3$)	7.32 ± 0.37	5.44 ± 0.11***	5.91 ± 0.188***	5.87 ± 0.24***
White blood cells ($10^3/\text{mm}^3$)	6.46 ± 0.36	10.08 ± 0.19***	8.01 ± 0.29***	14.88 ± 0.29***
Haematocrit (%)	34.67 ± 0.95	23.74 ± 0.94***	25.16 ± 0.36***	26.84 ± 1.4***
Haemoglobin (g/dl)	12.58 ± 0.27	8.57 ± 0.13***	9.24 ± 0.35***	8.68 ± 0.28***

Each value represents the mean ± SD of five rats per group, with ***P < 0.001 vs. control group.

Table 2. Effects of lead and cadmium separately or in combination on the malondialdehyde (MDA) level, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and δ -aminolevulinic deshydratase (δ -ALAD) activities in the blood of the Wistar rats.

Parameters	Groups			
	Control	Pb	Cd	Pb + Cd
MDA (nMol /mg Hb)	0.043 ± 0.004	0.098 ± 0.004***	0.117 ± 0.008***	0.110 ± 0.004***
CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ decomposition/min/dl erythrocyte)	58.42 ± 7.91	43.26 ± 3.07***	42.02 ± 2.92***	42.46 ± 3.64***
SOD (units /mg protein)	4.88 ± 0.67	3.38 ± 0.27***	3.30 ± 0.49***	3.34 ± 0.43***
δ -ALAD (nmol PBG/ml erythrocyte/h)	65.4 ± 4.61	42.9 ± 3.13***	47.4 ± 3.97***	44.76 ± 3.45***

Each value represents the mean ± SD of five rats per group, with ***P < 0.001 vs. control group.

Table 3 Effects of lead and cadmium separately or in combination on antioxidant enzymes activities (catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD)) in brain, liver and kidney and on serum enzymes (alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)) reflecting the liver function in the Wistar rats.

Groups	Serum		Liver			Brain		Kidney		
	ALT (U/l)	AST (U/l)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)	
Control	54.72 ± 9.54	38.84 ± 2.84	42.42 ± 2.02	0.30 ± 0.03	367.34 ± 44.12	93.68 ± 2.65	6.55 ± 0.35	3.59 ± 0.32	172.38 ± 6.49	47.60 ± 2.35
Pb	79.16 ± 2.86***	55.30 ± 2.54***	54.22 ± 3.67***	0.41 ± 0.01***	289.60 ± 11.88***	49.28 ± 3.34***	4.53 ± 0.31***	2.55 ± 0.31***	146.40 ± 2.07***	39.92 ± 1.65***
Cd	86.5 ± 2.64***	62.90 ± 4.36***	53.46 ± 2.77***	0.39 ± 0.02***	278.10 ± 10.34***	44.80 ± 4.34***	4.20 ± 0.25***	2.22 ± 0.48***	140.40 ± 4.16***	35.76 ± 1.26***
Pb + Cd	81.2 ± 1.86***	56.32 ± 3.68***	53.78 ± 3.59***	0.40 ± 0.02***	282.30 ± 4.94***	46.56 ± 2.55***	4.50 ± 0.23***	2.42 ± 0.37***	154.04 ± 3.21***	38.29 ± 0.87***

Each value represents the mean ± SD of five rats per group, with ***P < 0.001 vs. control group.

Table 4. Dose dependent effect of lead and cadmium separately or in combination on plasma, brain, liver and kidney lead content in the Wistar rats.

Sample	Groups			
	Control	Pb	Cd	Pb + Cd
Plasma ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	2.58 ± 0.31	$40.84 \pm 0.79^{***}$	2.36 ± 0.32	$38.8 \pm 1.83^{***}$
Brain ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0.77 ± 0.06	$6.16 \pm 0.35^{***}$	0.81 ± 0.10	$6.00 \pm 0.15^{***}$
Liver ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0.85 ± 0.16	$11.8 \pm 1.18^{***}$	0.78 ± 0.04	$10.50 \pm 0.50^{***}$
Kidney ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0.79 ± 0.13	$23.2 \pm 0.85^{***}$	0.65 ± 0.03	$21.80 \pm 0.86^{***}$

Each value represents the mean \pm SD of five rats per group, with $***P < 0.001$ vs. control group.

Table 5. Dose dependent effect of lead and cadmium separately or in combination on plasma, brain, liver and kidney cadmium content in the Wistar rats.

Sample	Groups			
	Control	Pb	Cd	Pb + Cd
plasma ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	0.95 ± 0.11	0.91 ± 0.07	$24.7 \pm 0.66^{***}$	$23.86 \pm 0.53^{***}$
Brain ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0.108 ± 0.011	0.124 ± 0.025	$2.048 \pm 0.168^{***}$	$2.10 \pm 0.12^{***}$
Liver ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0.22 ± 0.04	0.202 ± 0.008	$18.16 \pm 0.28^{***}$	$17.46 \pm 1.31^{***}$
Kidney ($\mu\text{g}/\text{g}$)	0.34 ± 0.04	0.28 ± 0.01	$25.86 \pm 1.34^{***}$	$24.88 \pm 1.46^{***}$

Each value represents the mean \pm SD of five rats per group, with $***P < 0.001$ vs. control group.

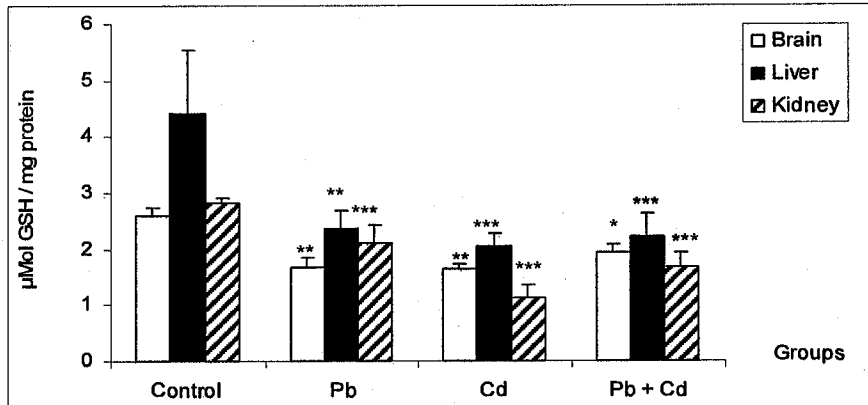


Fig.1. Effects of lead, cadmium and their combination on the glutathione content of the brain, liver and kidney of the wistar rats. Each value represents the mean \pm SD of five rats per group, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

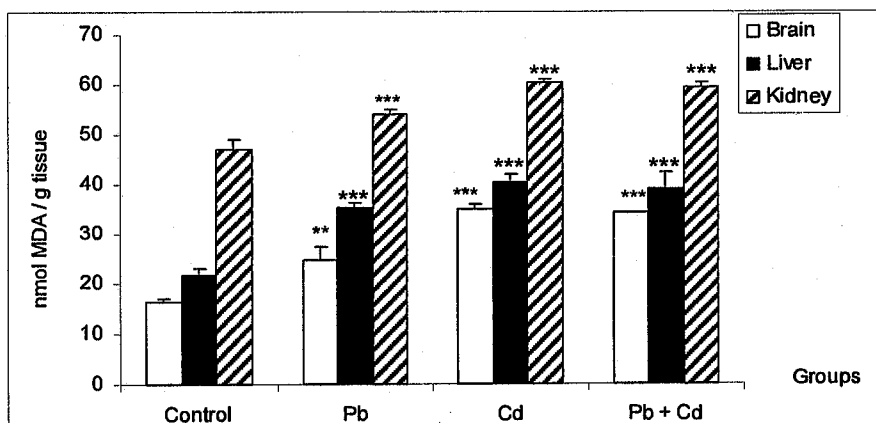


Fig. 2. Effects of lead, cadmium and their combination on the malondialdehyde (MDA) levels of the brain, liver and kidney of the wistar rats. Each value represents the mean \pm SD of five rats per group, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

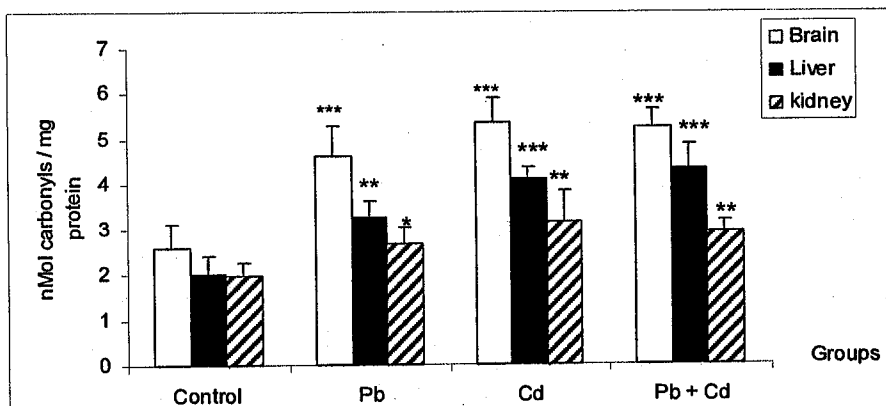


Fig. 3. Effects of lead, cadmium and their combination on the protein carbonyl levels of the brain, liver and kidney of the wistar rats. Each value represents the mean \pm SD of five rats per group, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

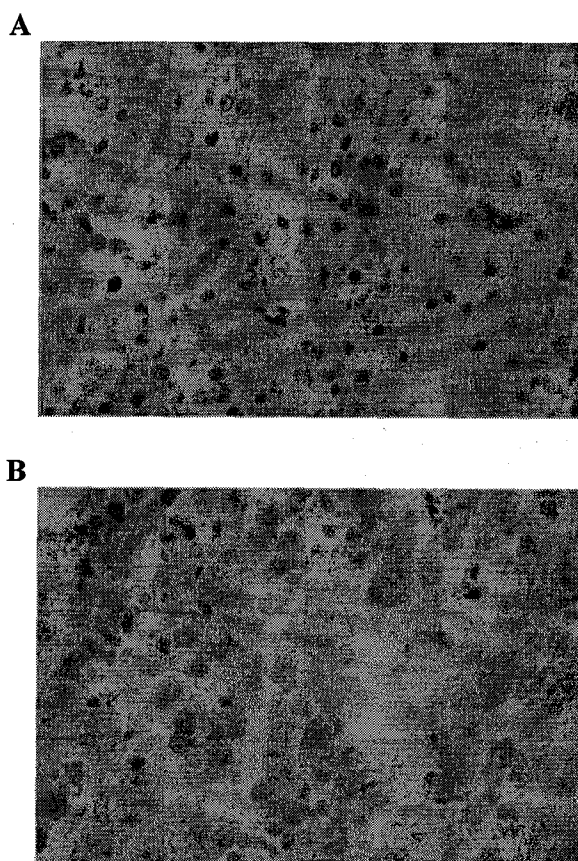


Fig. 4: Liver histopathology. (A) Normal liver tissue taken from the control group (Hematoxylin-Eosin, 40X); (B) Liver tissue from lead and cadmium co-exposed group (Hematoxylin-Eosin, 40X)

4. Discussion

The administration of lead and cadmium either alone or in combination appeared to have significant effects on rat's blood, liver, brain and kidney. The present results have demonstrated the ability of Pb and Cd to induce oxidative stress which was revealed by an increased lipid peroxidation (MDA) and a decreased glutathione content.

The observed changes in various oxidative stress parameters in the tissues of rats co-exposed to Pb and Cd may result from an independent effect of lead and /cadmium. This study showed a decrease in haematological parameters (RBCs, WBCs, Ht and Hb) and demonstrated a positive correlation between δ -ALAD activity and hemoglobin, suggesting that inhibition of this enzyme might enhance anemia. Pb intoxication causes anemia, which is partially due to a decreased life span of circulating RBC (Kempe *et al.*, 2005). Reduction in RBC antioxidant enzyme activities in lead-exposed workers (Kasperczyk *et al.*, 2004) and animals (Patra and Swarup, 2000) has been reported. Incubation of human whole blood for 24 h in the presence

of Pb caused a decrease in GSH, glutathione reductase and glutathione peroxidase in RBC (Hunaiti and Soud, 2000).

δ -Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALAD), an enzyme in the heme biosynthesis pathway, is essential for all aerobic organisms. It is a marker for oxidative stress because its active sulfhydryl group renders it highly sensitive to pro-oxidant elements (Maciel *et al.*, 2000; Folmer *et al.*, 2003), which impair its function (Farina *et al.*, 2001). Several studies have demonstrated that in vivo lead toxicity involves the hematological system by inhibiting δ -ALAD leading to ALA accumulation (Gurer-Orhan *et al.*, 2004). The inhibition of δ -ALAD may unfavourably affect the heme biosynthesis pathway that, in turn, may have pathological consequences, such as anemia, and can result in accumulation of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA), which may disturb the aerobic metabolism and also have some pro-oxidant activity. This study clearly showed a strong relationship between oxidative stress parameters, δ -ALAD and cell injury of liver and kidney.

Also, our results showed significant decrease in the activity of antioxidant enzymes, SOD and catalase, in the rats exposed to Pb and Cd either alone or in combination and the decreased levels of the antioxidant molecule GSH were strongly correlated with heavy metals intoxication. Several studies have suggested that Cd causes oxidative stress and induces oxidative damage by disturbing the antioxidant defense systems (Galan *et al.*, 2001; Waisberg *et al.*, 2003; Nzengue *et al.*, 2008). Cadmium may cause toxicity by disturbing the cellular homeostasis of essential metal ions, such as copper and zinc. Depletion of cellular sulfhydryl reserve is considered to be an important indirect mechanism for oxidative stress that is induced by redox-inactive metals (Valko *et al.*, 2005).

Depletion of GSH with phorone, diethyl maleate, or buthionine sulfoximine has been shown to increase sensitivity to both Cd-induced lethality and hepatotoxicity (Singhal *et al.*, 1987), and to increase Cd-induced damage in cultured cells (Nzengue *et al.*, 2008).

It has been observed that the joint effects of exposure to both Cd and Pb were slightly less than or equal to the effects observed after an exposure to each metal separately. Liver injury was clearly shown by the significant elevation of the liver markers, serum ALT and AST. These results are in agreement with a previous study and El-Maraghy *et al.*, (2001) who found similar increase in serum ALT after CdCl₂ administration to rats. Histopathological evaluation of the livers confirmed the observations concerning the serum indicators of hepatotoxicity, ALT and AST.

Compared to other organs the brain has some disadvantages regarding the generation and the detoxification of ROS. (i) The cells of the human brain utilize 20% of the oxygen consumed by the body but constitute only 2% of the body weight (Clarke and Sokoloff, 1999), indicating the potential generation of a high quantity of ROS during oxidative phosphorylation in brain. (ii) A high content of iron has been reported for some brain areas (Gerlach *et al.*, 1994), which can catalyze the generation of ROS. (iii) The brain is rich in lipids with unsaturated fatty acids, targets for lipid peroxidation (Halliwell, 1992). (iv) The brain contains only low to moderate activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) compared to liver or kidney (Cooper, 1997; Ho *et al.*, 1997). In addition, the loss of neurons in adult brain cannot generally be compensated by generation of new neurons (Dringen, 2000).

The activities of SOD and CAT in rat brain were very low compared to those measured in liver and kidneys. These activities were significantly inhibited after metals exposure with concurrent elevation in MDA and protein carbonyls. Different mechanisms could be involved in Pb-induced oxidative damage. Pb interacts with negatively charged phospholipids in membranes and through the induction of changes in membrane physical properties could facilitate the propagation of lipid oxidation (Adonaylo and Oteiza, 1999b). The well described interactions of Pb with glutamate could also potentiate oxidative-mediated damage (Oteiza *et al.*, 2004). Since both lead and cadmium can result in formation of covalent attachments with sulfhydryl groups of proteins, depletion of the cells' major sulfhydryl reserves seems to be an important mechanism for their toxicity. Loss of intracellular neuronal glutathione (GSH) is an important feature of neurodegenerative disorders (Du *et al.*, 2008). The consequences of GSH depletion include increased oxidative damage to proteins, lipids, and DNA and subsequent cytotoxic effects.

Pb competes with calcium at calcium-binding sites and may subsequently alter protein function and calcium homeostasis (Sauk and Somerman, 1991). There is also evidence that Pb, like other divalent toxic metals, is an oxidative toxin that can both directly and indirectly cause cell damage (Adonaylo and Oteiza, 1999a). Calcium deficiency has been shown to increase Pb absorption and Pb retention (Ettinger *et al.*, 2007). The activation of cellular functions due to its calcium mimicking effect and inhibition of the activity of different proteins through its binding to sulphhydryl (SH) groups of amino acids have been described as the main mechanisms of toxicity of Pb.

In the kidney, the lipid peroxidation end product, MDA, was significantly elevated compared to control group at the same time as the decrease in GSH levels and antioxidant enzymes activities.

El-Sharaky et al. (2007) suggest that cadmium causes renal toxicity by inducing lipid peroxidation, decreasing antioxidant systems, and also by altering lipid metabolism. Cd and Pb in the tissues are mobilizable to the kidney, providing an opportunity for nephrotoxicity with no additional exposure.

The nephrotoxicity of Cd results in changes in proximal tubular function, characterized by an increased excretion of beta 2-microglobulin and giving rise to the classical tubular proteinuria and in a glomerular dysfunction evidenced by an increased excretion of high molecular weight proteins and increased levels of beta 2-microglobulin and creatinine in plasma, and giving rise to a glomerular type proteinuria (Cooper, 2006). We have shown a strong relationship between oxidative stress parameters, δ -ALAD and chronic renal failure. Renal dysfunction in the form of proteinuria, aminoaciduria, glucosuria, and phosphaturia has been demonstrated in persons occupationally exposed to Cd.

In conclusion, our results indicate that exposure of rats to lead and cadmium appears to have a consequence on haematological parameters and changes in various oxidative stress parameters in the tissues. The association between increase in MDA level and decrease in SOD and CAT activities indicates that there is oxidant-induced tissue damage in liver, brain and kidney. Lead and cadmium in combination do not show additive or synergistic effect indicating the competition between them due to similarity in electronic affinities.

References

- Adonaylo, V.N., Oteiza, P.I., 1999a. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135, 77–85.
- Adonaylo, V.N., Oteiza, P.I., 1999b. Pb^{+2} promote lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology* 132, 19–32.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Akerboom, T.P.M., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Andersson, H., Petersson-Grawe, K., Lindqvist, E., Luthman, J., Oskarsson, A., Olson, L. 1997. Low level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring, *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 105–115.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

- Bressler, J., Kim, K.A., Chakraborti, T., Goldstein, G., 1999. Mechanism of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 24, 595-600.
- Carageorgiou, H., Tzotzes, V., Pantos, C., Mourouzis, C., Zarros, A., Tsakiris, S., 2004. In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase (Na^+ , K^+)-ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities: protection by L-cysteine, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94, 112-118.
- Carageorgiou, H., Tzotzes, V., Sideris, A., Zarros, A., Tsakiris, S., 2005. Cadmium effects on brain acetylcholinesterase activity and antioxidant status of adult rats: modulation by zinc, calcium and l-cysteine co-administration, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97, 320-324.
- Cooper, A.J.L., 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds.), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 1195-1230.
- Cooper Ross G., 2006. Effect of tobacco smoking on renal function. *Indian J Med Res* 124, 261-268.
- Dringen R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62, 649-671
- Tai Du, Giuseppe D. Ciccotosto, Greg A. Cranston, Gulcan Kocak, Colin L. Masters, Peter J. Crouch, Roberto Cappai, Anthony R. White, 2008. Neurotoxicity from glutathione depletion is mediated by Cu-dependent p53 activation. *Free Radical Biol. Med.* 44, 44-55
- El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., Hamdy, M.A., 2001. Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 207-214.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top Med. Chem.* 1, 529-539.
- Ettinger, Adrienne S., Hu, H., Hernandez-Avila, M., 2007. Dietary calcium supplementation to lower blood lead levels in pregnancy and lactation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 172-178
- Farina, M., Folmer, V., Bolzan, R.C., Andrade, L. H., Zeni, G., Braga, A.L., Rocha, J. B. T., 2001. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol. Lett.* 119, 27-37.
- Farmand, F., Ehdai, A., Roberts, C.K., Sindhu, R.K., 2005. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ. Res.* 98, 33-39.
- Folmer, V., Soares, J.C.M., Gabriel, D., Rocha, J.B.T., 2003. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J. Nutr.* 133, 2165-70.
- Fujita, H., 1999. Measurement of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity. In: *Current Protocols in Toxicology* 8.6.1-8.6.11 Edited by: Lucio G. Costa, Ernest Hodgson, David A. Lawrence, Donald J. Reed, William F. Greenlee; John Wiley & Sons, Inc.
- Galan, A., Garcia-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernandez, C., de Blas, E., Aller, P., 2001. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays, *Eur. J. Cell. Biol.* 80, 312-320.
- Gaubin, Y., Vaissade, F., Croute, F., Beau, B., Soleilhavoup, J., Murat, J., 2000. Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochim. Biophys. Acta* 1495, 4-13.
- Goering, P.L., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D., 1995. Toxicology of cadmium, in: R.A. Goyer, M.G. Cherian (Eds.), *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects*. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 115, Springer-Verlag, New York, pp.189-213.
- Gurer-Orhan, H., Handan, U.S., Hilal, O., 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 195, 147-154.

- Hsu, P., Guo, Y.L., 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180, 22–44.
- Hunaiti, A.A., Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Sci. Total Environ.* 248, 45–50.
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D., 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 16644–16651.
- Jadhav, S. H., Sarkar, S. N., Aggarwal, M., Tripathi, H. C., 2007. Induction of Oxidative Stress in Erythrocytes of Male Rats Subchronically Exposed to a Mixture of Eight Metals Found as Groundwater Contaminants in Different Parts of India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 145–151.
- Kasperczyk, S., Kasperczyk, A., Ostalowska, A., Dziwisz, M., Birkner, E., 2004. Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in RBC in workers exposed to lead. *Biol. Trace Elem. Res.* 102 (1–3), 61–72.
- Kempe, D.S., Lang, P.A., Eisele, K., Klarl, B.A., Wieder, T., Huber, S.M., Duranton, C., Lang, F., 2005. Stimulation of RBC phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288 (2), 396–402.
- Kim, SD., Moon, CK., Eun, SY., Ryu, PD., Jo, SA., 2005. Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signalling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 326–334.
- Lillie, R.D., Fuller, H.M., 1976. *Histopathologic Technique and Practical. Histochemistry.* Mcraw Hill Book Co, New York.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Maciel, EM., Bolzan, RC., Braga, AL., Rocha, JBT., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 310–9.
- Minami, A., Takeda, A., Nishibaba, D., Takefuta, S., Oku, N., 2001. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain, *Brain Res.* 894, 336–339.
- Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., Guiraud, P., 2007. Role of α -tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain, *Chemico-Biol. Int.* 170, 221–230
- Nemmiche, S., Chabane-Sari, D., 2006. Prenatal exposure of female rats to lead acetate. Effect on their progeny. In: *Metal Ions in Biology and Medicine - Vol. 9*, Eds. M.C. Alpoim, P.V. Morais, M.A Santos, A.J. Cristovao, J.A Centeno, Ph. Collery. John Libbey Eurotext, Paris, pp.411–417
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oktem, F., Arslan, M.K., Dundar, B., Delibas, N., Gultepe, M., Ergurhan Ilhan, I., 2004. Renal effects and RBC oxidative stress in long-term low-level lead-exposed adolescent workers in auto repair workshops. *Arch. Toxicol.* 78 (12), 681–687.
- Oteiza, P.I., Mackenzie, G.G., Verstraeten, S.V., 2004. Metals in neurodegeneration: involvement of oxidants and oxidant-sensitive transcription factors. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 103–115
- Patra, R.C., Swarup, D., 2000. Effect of lead on erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxide level and thiol groups in calves. *Res. Vet. Sci.* 68, 71–74.
- Sauk, J.J., Somerman, M.J., 1991. Physiology of bone: mineral compartment proteins as candidates for environmental perturbation by lead. *Environ. Health Perspect.* 91, 9–16.

- Singhal R. K., Anderson M. E. and Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1987, 1:220-223
- Sibergeld, EK., Waalkes, M., Rice, JM., 2000. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanism of action. *Am. J. Ind. Med.* 38, 316-23
- Stohs, SJ., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Spitz, D.R., Oberley, L.W., 2001. Measurement of MnSOD and CuZn-SOD activity in mammalian tissue homogenates, In: *Current Protocols in Toxicology 7.5.1-7.5.11* Edited by: Lucio G. Costa, Ernest Hodgson, David A. Lawrence, Donald J. Reed, William F. Greenlee; John Wiley & Sons, Inc.
- Tandon, SK., Singh, S., Prasad, S., Khandekar, K., Dwivedi, VK., Chatterjee, M., 2003. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol. Lett.* 145, 211-217.
- Valko, M, Morris, H., Cronin, MTD., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current. Med. Chem.* 12, 1161-1208
- Villeda-Hernandez, J., Barroso, R., Mendez, M., Nava, C., Huerta, R., Rios, C., 2001. Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res. Bull.* 55(2), 247-51.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology* 192, 95-117.
- Yagi, K., 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochem. Med.* 15 (2), 212-216.
- Yagi, K., 1984. Assay for blood plasma or serum, *Methods Enzymol.* 105, 328-331.

Résultats complémentaires :

Les ions métalliques sont indispensables au bon fonctionnement cellulaire car ils participent à de nombreux processus tels que la biosynthèse de l'ADN, la respiration. Ils sont soit directement impliqués dans les réactions enzymatiques, soit indispensables à la bonne structuration de la protéine qui les contient.

Le Pb et le Cd semblent induire une déplétion significative (Tableau 6) en oligoéléments physiologiques.

Tableau 6: Effets du plomb et du cadmium seul et/ou en mélange sur quelques éléments minéraux sérique chez les rats Wistar.

	Groupes			
	Témoin	Pb	Cd	Pb + Cd
Fe ⁺⁺ (mg/l)	9.37 ± 0.66	4.53 ± 0.34 ^{***}	5.94 ± 0.36 ^{***}	6.69 ± 0.25 ^{***}
Ca ⁺⁺ (mg/l)	127.4 ± 8.33	110.2 ± 9.73 ^{***}	77.92 ± 3.37 ^{***}	96.68 ± 5.50 ^{***}
Mg ⁺⁺ (mg/l)	515 ± 9.10	327.76 ± 11.71 ^{***}	352.4 ± 11.39 ^{***}	463.9 ± 5.82 ^{***}
Phosphore (mg/l)	215.62 ± 13.92	185.64 ± 11.31 ^{***}	195.05 ± 3.68 ^{***}	191.72 ± 2.65 ^{***}

Chaque valeur représente la moyenne ± SD de cinq rats par groupe, avec ^{***}P < 0.001 vs. témoin

Cet effet du Pb et du Cd est particulièrement marqué pour le magnésium, il reflète très certainement des phénomènes d'interactions au niveau des transporteurs et des différents sites d'action de ces minéraux. Cela implique aussi un très probable dysfonctionnement du contrôle homéostatique strict des concentrations en oligoéléments liés ou libres du cytosol et du noyau et pourrait être à l'origine d'une grande partie des mécanismes d'action toxique de ces métaux lourds.

Chapitre 2 : Etude de l'effet du cadmium sur le statut antioxydant et l'homéostasie des métaux essentiels des cellules Jurkat.

Présentation de l'article 2:

Le système immunitaire des vertébrés met en action deux lignes de défense. La première fait intervenir l'immunité innée, existant chez tous les organismes multicellulaires. C'est une réponse rapide non spécifique de l'antigène mais du pathogène. La deuxième, plus lente à se mettre en place, est une réponse adaptative, spécifique de l'antigène aboutissant au développement d'une réponse immunitaire plus efficace et plus rapide lors d'une nouvelle infection par le même pathogène. Les lymphocytes B et T sont les acteurs du système adaptatif. Les lymphocytes B, responsables de l'immunité humorale, produisent des immunoglobulines qui reconnaissent principalement des déterminants antigéniques conformationnels. Les lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaire, reconnaissent des déterminants antigéniques, sous forme de fragments peptidiques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chaque lymphocyte exprime à sa surface de nombreux récepteurs pour l'antigène, généralement tous identiques. La grande capacité de reconnaissance d'antigènes distincts par le système immunitaire adaptatif, repose donc sur l'existence d'un très grand nombre de lymphocytes différents.

Nous avons utilisé dans cette étude des cellules Jurkat (lymphocytes T) humaines afin d'examiner les effets du cadmium sur leur statut antioxydant et l'homéostasie des métaux essentiels.

Les résultats obtenus montrent que le cadmium altère l'homéostasie des métaux de transition biologiquement utiles (fer, zinc, cuivre) ; provoque probablement un relargage des métaux des protéines comportant des ions métalliques ; il altère les fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (composés antioxydants, oxydoréductases, protéines à centres fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs), il modifie le métabolisme du glutathion et il diminue l'activité de certaines enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase et glutathion peroxydase en particulier). De ce fait, le cadmium peut conduire à la production indirecte d'espèces réactives de l'oxygène et avoir par ce biais des conséquences toxiques (peroxydation des lipides, lésions de l'ADN, modification oxydatives des protéines, apoptose).

Article 2: Cadmium chloride induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion.

S. Nemmiche^{a,b,*}, D. Chabane-Sari^a, M. Kadri^b, Y. Nzengue^b, P. Guiraud^{b,c}

^aLaboratoire de *physio pharmacologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen cedex 13000, Algérie.* ^bLaboratoire *Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xénobiotiques (ORSOX), EA-3776, LRC CEA 8M, UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche, France.* ^cLaboratoire *de Biochimie et Génétique moléculaire (LBGM), EA 2526, Faculté des Sciences et Technologies, Université de La Réunion, 97715 St Denis Messag, La Réunion, France.*

Abstract:

Background: Cadmium (Cd) is a widespread environmental contaminant with mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects. The immunotoxicity of Cd is also well documented. Cd affects the cellular homeostasis and generates damage via complex mechanisms involving interactions with other metals, induction of oxidative stress and apoptotic or necrotic cell death, depending on the cell type and the concentration. **Aims:** The goal of the present study was to investigate the effect of exposure to CdCl₂ on the intracellular trace elements levels, the antioxidant enzyme activities and on DNA damage in the Jurkat T cell line. **Methods:** The human leukemia Jurkat T cells were exposed to 5, 25 and 50 µM of CdCl₂ for 24H. The intracellular cadmium and trace element levels were determined by ICP-MS and DNA primary damage in individual cells was detected using the single cell gel electrophoresis technique (comet assay). The redox homeostasis was evaluated by glutathione and thiol group levels. Malondialdehyde and carbonyl levels were used as markers for lipid and protein oxidation respectively. Antioxidant enzyme activities were also measured.

Results: Cd significantly ($P < 0.05$) reduced the viability of Jurkat T cells and induced a dose-dependent increase in DNA damage with statistically significant differences ($p < 0.001$) relative to controls; the superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were also significantly decreased. Lipid peroxidation and protein carbonyl levels were significantly increased while the total intracellular sulfhydryl groups were decreased showing clearly that an oxidative stress was generated by Cd. Surprisingly the treatment with Cd induced a significant increase in the intracellular levels of all the trace elements measured.

Conclusions: The results indicate that cellular pro-oxidative stress induced by Cd is most likely mediated by disruption of redox (mainly thiol) homeostasis associated to a mishandling

of redox-active transition metals and causes lipid and protein oxidation and oxidative DNA damage in Jurkat T cells.

Key words: Cadmium, Trace elements, DNA damage, Jurkat T cells, Oxidative stress, Antioxidant enzyme.

1. Introduction

Cadmium (Cd) is a widespread environmental and industrial pollutant which has been classified as a type I carcinogen by the International Agency for Cancer Research (IARC, 1993). This classification is based on data from multiple studies that have linked occupational exposure to Cd with pulmonary cancer in humans. Contaminated food and cigarette smoke are the major sources of Cd exposure for non-occupationally exposed individuals (Fatur et al., 2002; Satarug and Moore, 2004). Cd has an estimated half-life in human of 15 to 20 years which essentially makes it a cumulative toxin (Jin et al., 1998). The mechanisms of the carcinogenic activity of Cd are poorly understood. Several *in vitro* studies have shown that Cd induces DNA strand breaks, DNA-protein cross-links, oxidative DNA damage and chromosomal aberrations, mostly at high cytotoxic concentrations (Mouron et al., 2001; Güerci et al., 2000). Cd has also been shown to modulate the expression of pro-oncogenes (Waisberg et al., 2003), and to inhibit the function or expression of the DNA repair systems (Giaginis et al., 2006). The OGG1 glycosylase can be reversibly inactivated when cells are exposed to Cd (Bravard et al., 2006). Apoptosis is the most common mechanism involved in cell death induced by cadmium (Shih et al., 2004) although some exceptions have been reported (Nzengue et al., 2008a).

The perturbation of the homeostasis of trace elements could be the basis of many of the deleterious effects of Cd (Bridges and Zalups, 2005; Martelli et al., 2006). For instance Cd can replace Zinc in many proteins and enzymes (Kopera et al., 2004).

The main reactive oxygen species (ROS) responsible for oxidative DNA damage in cells appears to be hydroxyl radicals generated by the reaction of reactive transition metal ions, such as Fe^{2+} and Cu^+ with H_2O_2 (Henle and Linn, 1997). Other species may also contribute to DNA damage, including metal-peroxide complexes, singlet oxygen, and peroxy nitrite (Cadet et al., 2003; Frelon et al., 2003). The principal oxidative DNA damage products include 8-hydroxyadenine (8-OH-Ade), 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua; and its deoxynucleoside equivalent, 8-OH-dG), 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (thymine glycol) and ring-opened lesions: 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Cooke et al., 2006).

Cd is not redox active but contributes indirectly to oxidative stress by affecting the cellular thiol redox balance (Rollin-Genetet *et al.*, 2004, Nzungue *et al.*, 2008b). Direct binding of Cd to critical cellular components may be part of the mechanisms of its toxicity, and proteins with vicinal disulfides are expected to be particularly sensitive to inactivation by Cd (Chrestensen *et al.* 2000). It is known that Cd reacts with thiol groups (Daniels *et al.*, 1998), in particular with cellular glutathione. Cd has a high affinity for protein-sulfhydryl groups, competes with Zn (II) in proteins and binds to DNA bases with little sequence specificity causing single-strand DNA breaks (McMurray and Tainer, 2003). Several studies have shown that Cd indirectly generates ROS and consequently DNA, lipid and protein oxidation in various cell lines (Ikediobi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2003).

Apart from lung, Cd mainly targets liver and kidneys but also testis, heart and bone (Satarug *et al.*, 2003). A number of studies documented that Cd may also modulate many T cells functions (Colombo *et al.*, 2004; Pathak and Khandelwal, 2008), and affects both the cellular and humoral immune response (Krocova *et al.*, 2000; De La Fuente *et al.*, 2002).

Lymphocytes are the carriers of immunological specificity and, therefore, play an important role in the defense against environmental pathogens. T lymphocyte activation and proliferation is involved in many pathophysiological processes. The functional activation of T lymphocytes is strongly enhanced by ROS and/or by a shift in the intracellular glutathione redox state. ROS are highly reactive oxidizing agents, with one or more unpaired electrons. At the cellular level an extensive defense system against ROS has been evolved, antioxidants are the first line of defense against ROS. Enzymes such as catalase or superoxyde dismutase detoxify ROS, and low-molecular-weight scavengers such as glutathione alleviate the toxicity of ROS. Nevertheless, some ROS molecules escape from the defense systems and inevitably damage the biomolecules (Nohmi *et al.*, 2005).

In the current paper we investigate the adverse effects of exposure to cadmium chloride on the antioxidant enzyme activities, trace element homeostasis and the ability to cause DNA damage in the human Jurkat T cell line.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and chemical treatment

The human Jurkat T cell line (clone E6-1) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC number: TIB-152). Cells were maintained in complete culture medium consisting of RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Sigma), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-

glutamine at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Jurkat cells were exposed to 5, 25, and 50 µM of CdCl₂ for 24h.

2.2. MTT assay

Cytotoxicity induced by cadmium was assessed by MTT assay (Ehrich and Sharova, 2000). Tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide (MTT), is reduced by intracellular dehydrogenase of viable living cells that leads to formation of purple formazan crystals, insoluble in aqueous solutions. Following exposure to cadmium chloride, 100 µl of 0.5% MTT was added to the culture media and cell were incubated for an additional 2h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After this incubation, formed formazan was solubilized by adding dimethyl sulfoxide, and optical density was measured at 570 nm using UV-160A Shimadzu spectrophotometer.

2.3. Sample preparation

After the indicated treatments with cadmium, cells were collected. The pellets obtained after centrifugation (1400×g for 3 min at 4°C) were resuspended in isotonic Tris-HCl buffer (300 mOsm, pH 7.3,) centrifuged and rinsed twice with the Tris-HCl buffer. Then cells were lysed in hypotonic Tris-HCl buffer by five freeze-thaw cycles. For glutathione and thiol group determination, aliquots were taken from the whole homogenized lysate. The other determinations were performed on the supernatants obtained after centrifugation of the lysates. The extracts were stored at -80 °C, until analyses.

2.4. Intracellular cadmium and Trace element analysis

After 24 h incubation with Cd, the Jurkat cells were collected and washed three times in physiological NaCl (0.9%). Then the pellet was resuspended in deionized water (Congiu *et al.*, 2000) and the cells were lysed by five freeze/thaw (-196°C/37°C) cycles. The lysates were centrifuged to obtain the soluble fraction. The intracellular Cd and essential metal concentrations were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS) (Thermo-Electron X) and the detection limit was 72 nM Cd, 1 nmol Se, 52 nmol Zn, 110 nmol Cu, 34 nmol Fe, and 2 nmol Mn per liter.

2.5. Antioxidant enzyme activity assays

2.5.1. Catalase activity.

Catalase (CAT) activity was measured according to Beers and Sizer (1952). The rate of H₂O₂ decomposition by CAT was followed at 240 nm. One unit is defined as 1 µmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein.

2.5.2. Superoxide dismutase activity.

Superoxide dismutase (SOD) activities (total SOD, Cu/ZnSOD and MnSOD) were measured using the pyrogallol assay according to the method described by Marklund and Marklund (1974), based on the competition between pyrogallol oxidation by superoxide radicals and superoxide dismutation by SOD. The specific Cu/ZnSOD inhibition by potassium cyanide allowed the MnSOD determination in the same conditions. Assays were monitored by spectrophotometry at 420 nm. One unit of SOD activity is defined as the amount of the enzyme required to inhibit the rate of pyrogallol auto-oxidation by 50%. SOD activities were expressed as international units per mg of soluble cell proteins.

2.5.3. Glutathione peroxidase activity.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the method of Flohe and Gunzler (1984). The rate of glutathione oxidized by *tert*-butyl hydroperoxide was evaluated by the decrease of NADPH at 340 nm in the presence of EDTA, excess reduced glutathione and glutathione reductase. GPx activity was expressed in terms of μM NADPH oxidized per minute per milligram of soluble cell proteins.

2.5.4. Glutathione reductase activity

The glutathione reductase activity was determined by monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm using the method of Carlberg and Mannervik (1985). One unit of glutathione reductase activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 μmol of NADPH per minute. Results were given as international units per gram of soluble proteins.

2.6. Oxidative stress parameters

2.6.1. Glutathione level

The sum of the reduced and oxidized forms of glutathione were determined spectrophotometrically using the method described by Akerboom and Sies (1981), based on the kinetic assay in which catalytic amounts of GSH or GSSG and glutathione reductase bring about the continuous reduction rate of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma, France) into 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) by NADPH. Results were expressed as μmol per gram of total cell proteins.

2.6.2. Malondialdehyde (MDA) assay.

Lipid peroxidation (LPO) was evaluated by the thiobarbituric acid reacting substance (TBARS) and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content (Placer *et al.*, 1966). Sample aliquots were incubated with 10% trichloroacetic acid and 0.67%

thiobarbituric acid. The mixture was heated on a boiling water bath for 30 min, an equal volume of *n*-butanol was added, and the final mixture was centrifuged; the organic phase was collected for fluorescence measurements at 532 nm. Samples assayed for MDA contained 1 mM butylated hydroxytoluene (BHT) in order to prevent artefactual LPO during the boiling step. Results were expressed as μmol MDA per gram of soluble cell proteins.

2.6.3. Measurement of protein carbonyls

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Levine *et al.*, 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH and the absorbance was read in a spectrophotometer at 370 nm.

2.6.4. Measurement of thiol groups

Protein oxidation was evaluated by thiol groups (SH) determination using the method of Bulaj *et al.*, (1998) and Ellman (1959). In presence of SH groups, the disulphide bridge (SS) contained in the Ellman reagent or DTNB is reduced and gives aromatic sulfhydryl derivatives (TNB) strongly coloured in yellow and having an absorbance at 412–415 nm. SH levels were expressed as μmol per gram of total cell proteins.

2.6.5. Single cell gel electrophoresis (Comet assay)

The single cell gel electrophoresis assay (SCGE) or comet assay was used for the detection of single strand DNA breaks in individual Jurkat cells after exposure to cadmium chloride. The protocol used is based on the method described by Tice *et al.* (1990).

The cells of control and exposed cadmium were collected, pelleted, resuspended in PBS and mixed with low-melting-point agarose (1%, w/v), then transferred to the layer of agarose, covered with a cover slip and the slides placed on ice. The cover slips were then removed and the slides were immersed in a lysis buffer (2.5 M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % (w/v) sodium sarcosinate, pH 10; 1% Triton X-100 and 10% DMSO added just before use) in the dark at 4°C. Then the slides were placed in a horizontal electrophoresis unit containing freshly-prepared alkaline electrophoresis buffer (200 mM Na₂EDTA, 10M NaOH). The DNA was allowed to unwind for 40 min before electrophoresis was performed at 25 V, 300 mA for 30 min. After neutralization (0.4 M Tris- HCl, pH 7.5), the DNA was stained with 50 μL of 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ethidium bromide pipetted onto the slides. The slides were then placed in a humidified air-tight container to prevent drying of the gel, before the analysis. Comets were scored using a fluorescence microscope from Leitz (Germany) and the kinetic

imaging software (Komet 4, Kinetic Imaging Ltd, Liverpool). Fifty cells were scored per each of three replicate slides and results were expressed as tail DNA (percentage of DNA in tail).

2.7. DNA extraction from cells and HPLC-EC analysis

For DNA oxidation assay, cells were plated at a concentration of 20×10^6 per flask. Each cell culture flask was homogenized in 1.2 mL of a buffer (320 mM sucrose, 10 mM TRIS, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM desferroxamine mesylate, 1% triton, pH 7.5). After homogenization, the sample was centrifuged. The supernatant was discarded and the nuclear pellet was suspended in 600 μ l of an extraction buffer (10 mM TRIS, 5 mM EDTA, 0.15 mM desferroxamine mesylate). SDS (10% in water) was added. RNase A and RNase T1 were then added and the resulting suspension gently vortexed for 10 s. The sample was incubated for 15 min in a water bath set at 50 °C. Then, Qiagen proteinase (30 μ L) was added and the sample gently vortexed for 10 s prior to being incubated for 60 min at 37 °C. A NaI solution (1.2 mL) was added. The sample was vigorously vortexed for 30 s. Isopropanol (2 mL) was added and the samples gently shaken until complete homogeneity. After centrifugation, the DNA pellet was rinsed by 1 mL of 70% ethanol. The DNA pellet was then solubilized into 100 μ L of deionized water containing 0.1 mM desferroxamine mesylate. The DNA solution was incubated with 2 units of nuclease P1, the sample was held at 37 °C for 2 h. Then, 4 units of alkaline phosphatase were added together with a palk buffer. After incubation for 1 h at 37 °C, the samples were centrifuged and the aqueous layer collected and analysed by HPLC-EC. The retention time of 8-oxodGuo is 21.5 min. The amount of DNA analysed was determined from the area of the peak of 8-oxodGuo (retention time 15 min) after appropriate calibration (Weimann *et al.*, 2002).

2.8. Protein determination

Protein levels in total cell lysates and in soluble fractions were determined using the BCA™ kit (Pierce).

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. All data were analysed employing one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ were considered of statistical significance.

3. Results

$CdCl_2$ induced a dose-response cell death in Jurkat cells as determined following a 24 h exposure period with 5, 10, 20, 50, 75 and 100 μ M concentrations (Fig. 1). The mean lethal

dose (LD₅₀) for the 24 h exposure, defined as the concentration that reduces survival to 50% of the cells, and calculated from the log-linear portion of the curve, was 47 μ M.

The intracellular Cd levels determined in Jurkat T cells were significantly increased in Cd-exposed cells compared to control cells (Fig. 2). An increase was observed in the level of essential trace elements compared to untreated cells (Fig. 3). Manganese (Mn), copper (Cu), zinc (Zn) and selenium (Se) levels were already significantly increased for a treatment by 5 μ M CdCl₂. The increase in iron (Fe) level was only significant in cells exposed to 50 μ M CdCl₂. These trace elements are essential components of biological systems. Within cells, they mediate oxygen transport and metabolism, catalyse electron transfer reaction, are involved in signal transduction processes and establish functional structures of macromolecules. The activity of Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) was significantly inhibited (43%, $p < 0.001$) while the MnSOD activity was increased (Fig. 4A) after Cd exposure at 50 μ M, with a concurrent elevation tendency in the activity of catalase (CAT) (Fig. 4B). Intracellular specific activities of the enzymes involved in the GSH-redox balance and GSH transfer were measured. Fig. 4C illustrates the decrease in glutathione peroxidase (GPx) activity associated with exposure to Cd. Glutathione reductase remained unchanged (Fig. 5A).

We showed a decrease GSH level (Fig. 5B) when the cells were exposed to 25 and 50 μ M CdCl₂. GPx and GSH are important cellular antioxidants, being involved in protection against ROS/RNS-mediated damage to cell components. Thus, inhibition or depletion of such antioxidant defenses by Cd exposure could increase both lipid peroxidation and protein oxidation. As expected, significantly enhanced MDA (Fig. 6) and carbonyl levels (Fig. 7) were also observed.

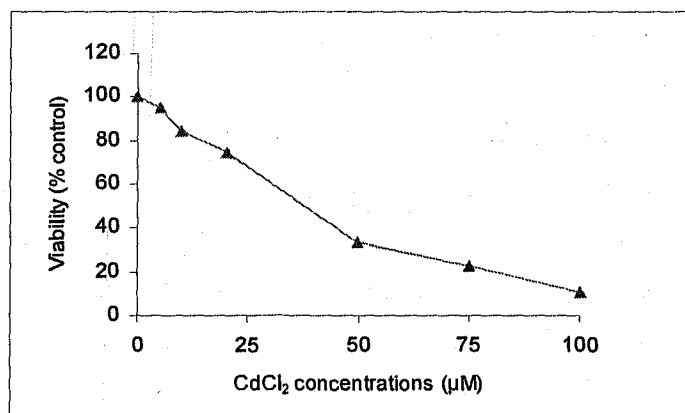


Fig. 1, Effect of exposure with different cadmium concentrations on viability of Jurkat cells.

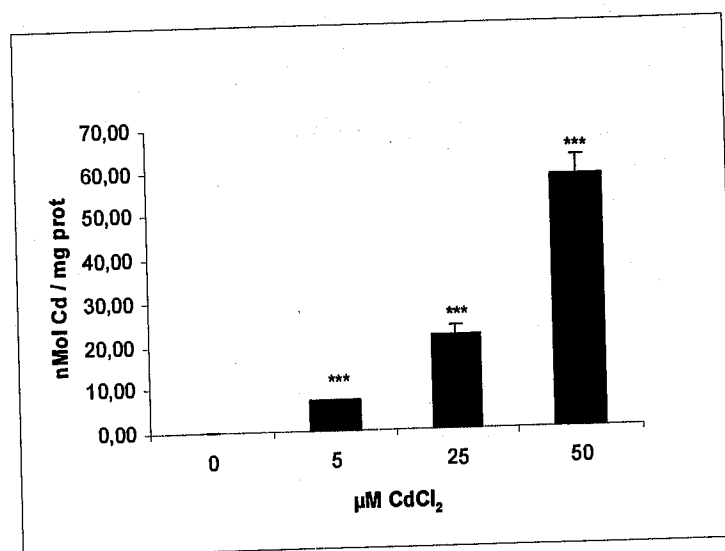
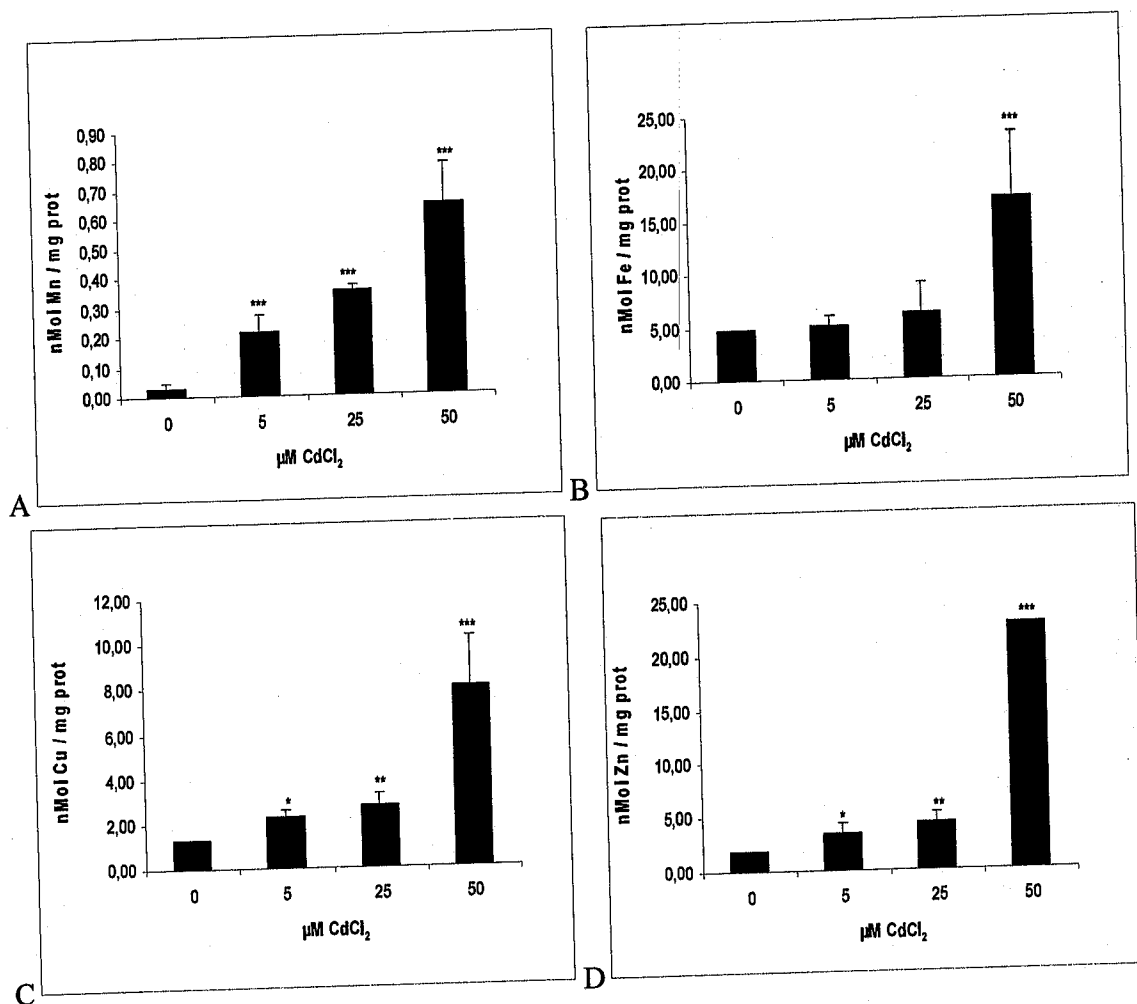


Fig. 2, Intracellular cadmium (Cd) levels in Jurkat T cells. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.



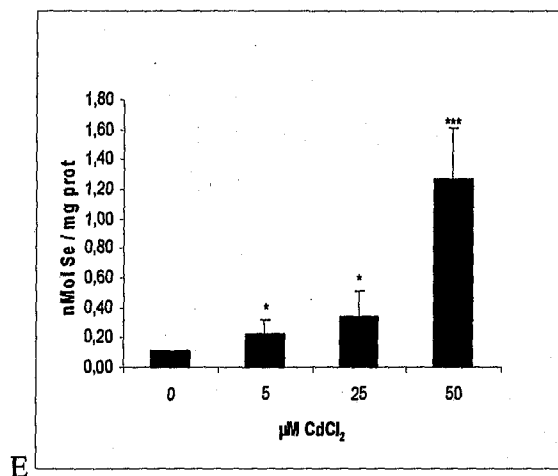
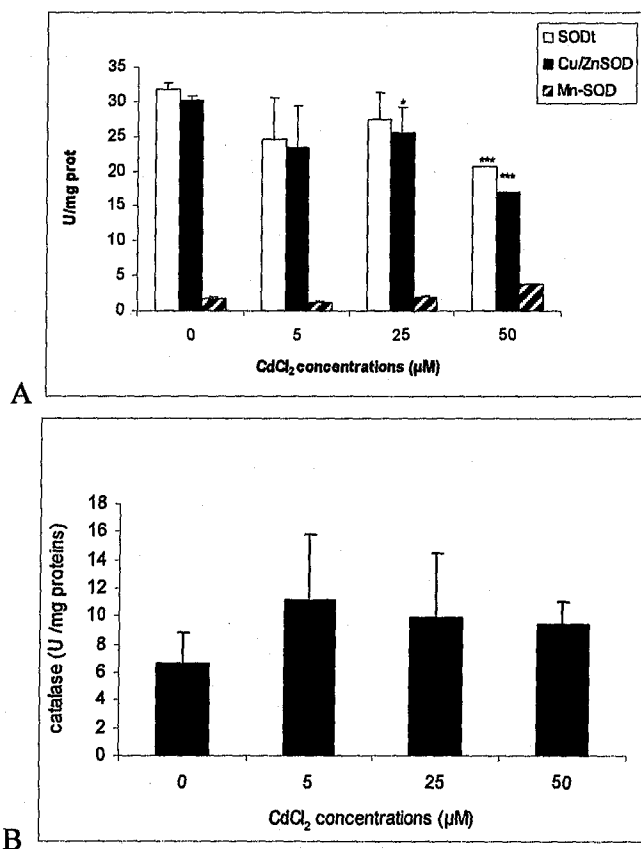


Fig. 3, Effect of cadmium on the level of essential trace elements: (A) Manganese (Mn), (B) Iron (Fe), (C) Copper (Cu), (D) Zinc (Zn), (E) Selenium (Se). Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.



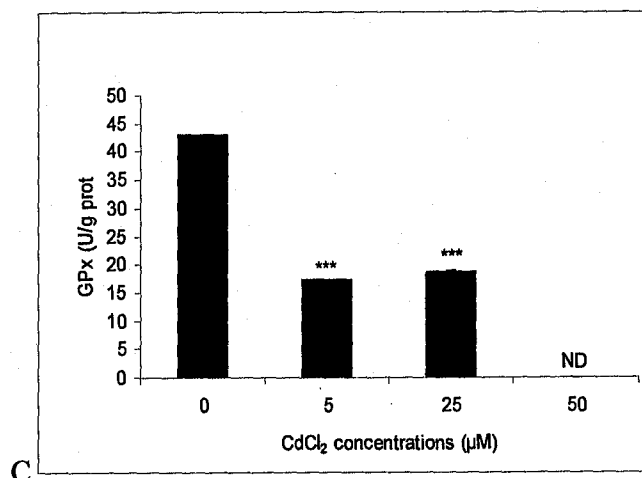


Fig. 4, Effect of cadmium on the activities of superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) (A), catalase (B), glutathione peroxidase (GPx) (C). Each value represents the mean \pm SD, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

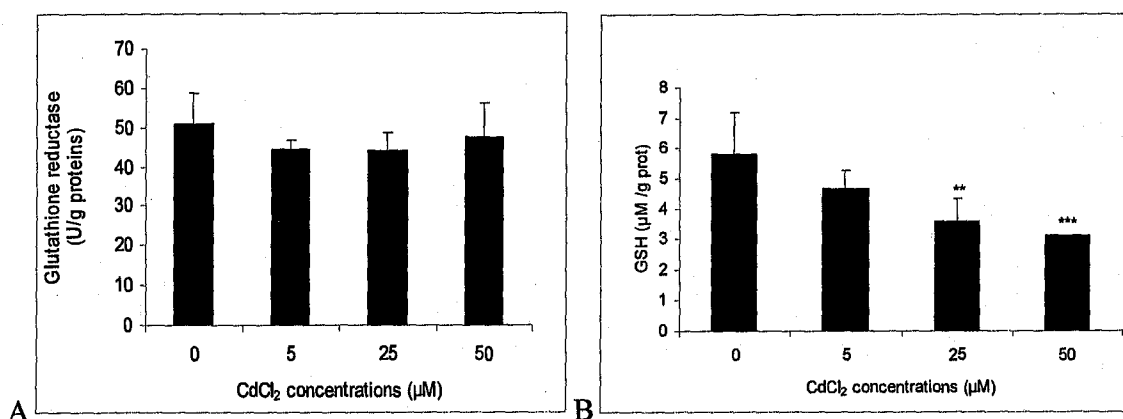


Fig. 5, Effect of cadmium on the activity of glutathione reductase (A) and the glutathione (GSH) level (B). Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

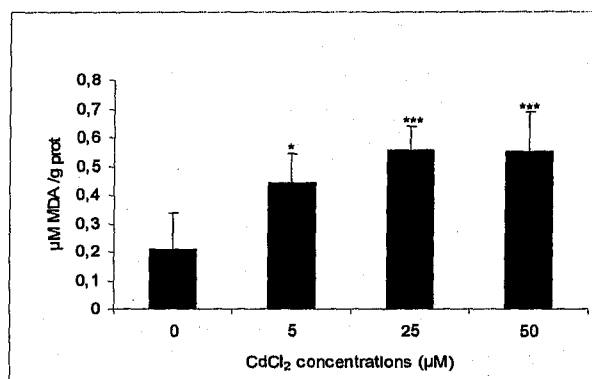


Fig. 6, Effect of cadmium on malondialdehyde (MDA) production in Jurkat cells. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

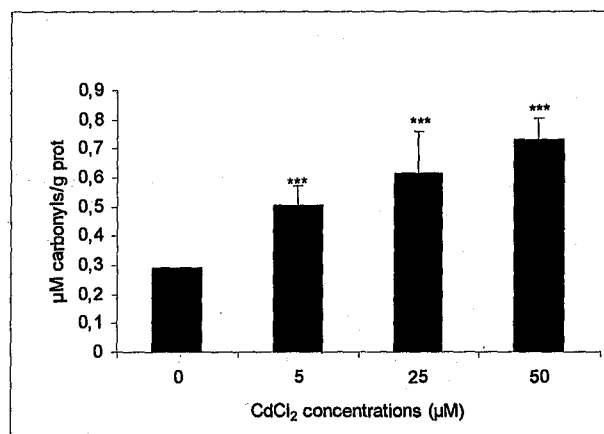


Fig. 7, Effect of cadmium on the carbonyl level in Jurkat cells. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

As shown in Fig. 8 Cd also caused a decrease in intracellular free sulfhydryl groups as a result of the oxidative stress generated by this metal. The reduction in intracellular free SH-groups is due to disulfide formation. The ability of CdCl₂ to cause DNA damage was assessed by the comet assay. As shown in Fig. 9 statistically significant DNA damage was observed when Jurkat T cells were treated with 5, 25, 30, 40 and 50 μ M CdCl₂. The Tail DNA reflected statistically significant differences between the control group and all the doses employed ($p < 0.001$).

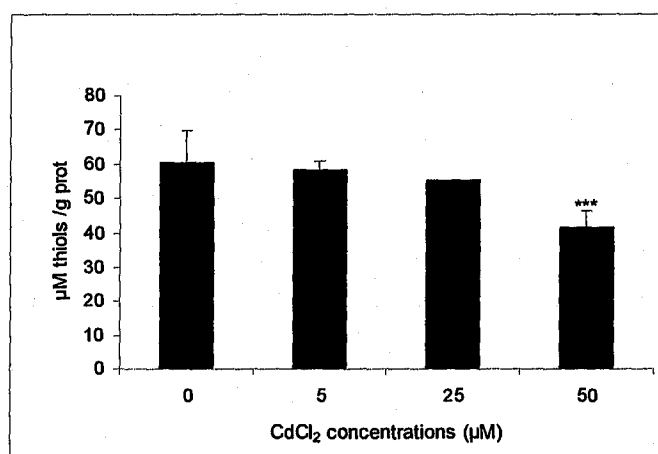


Fig. 8, Effect of cadmium on the thiols level in Jurkat cells. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

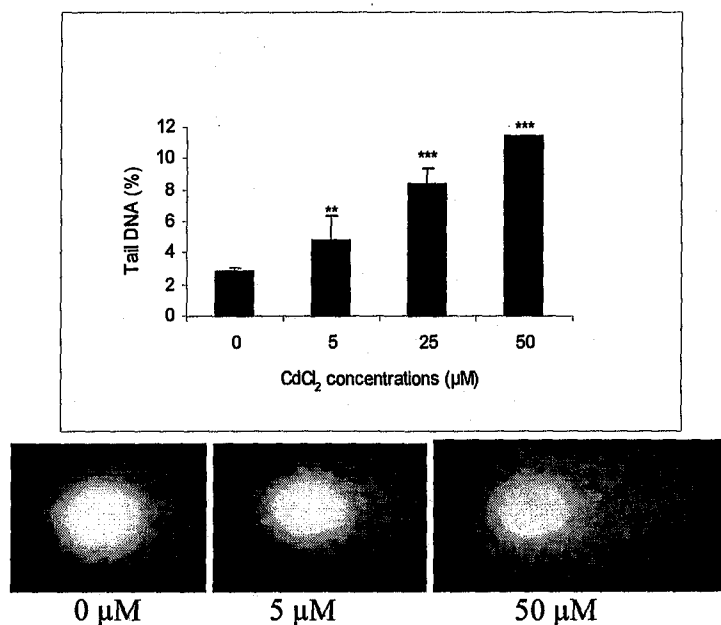


Fig. 9, Effect of cadmium on DNA in Jurkat cells as assessed with the comet assay, (cells were treated for 24h). Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

4. Discussion

Lipid peroxidation and protein oxidation are two important indicators of oxidative damage of macromolecules induced by ROS; the MDA and protein carbonyl levels were significantly increased with significant depressed levels in the activity of the antioxidant enzymes, SOD and GPx in the Jurkat T cells treated by Cd.

Several studies have suggested that Cd causes oxidative stress and induces oxidative damage by disturbing the antioxidant defense systems (Galan *et al.*, 2001; Waisberg *et al.*, 2003).

Antioxidant enzyme defence systems include SOD, catalase, GPx that may protect the system from deleterious effects of oxygen free radicals. The mechanism by which Cd decreases the activity of CuZn-SOD protein is not clear. However, the results of Huang *et al.* (2006) suggested that Cd decreases the content of Zn, and so changes the conformation of CuZn-SOD protein decreasing its enzyme activity, and causing oxidative stress-induced apoptosis in neural cells.

Cd may cause toxicity by disturbing the cellular homeostasis of essential metal ions, such as Cu and Zn. Cd has a similar ionic radius to that of calcium while its electronegativity is similar to that of Zn. These properties allow Cd to enter cells and therefore render it are potentially able to interfere with the physiological functions of both calcium and Zn (Suwalsky *et al.*, 2004). The present study indicated that Cd caused a significant increase in

Zn, Mn, Se and Cu content in Jurkat cells. For Fe, the increase was only significant when the cells were treated by the highest Cd concentration (50 μ M). The studies about Cd/Fe interactions give in general contradictory results in the literature (Tallkvist *et al.*, 2001; Fotakis and Timbrell, 2006).

Zn is an essential micronutrient that plays fundamental housekeeping roles in physiology, cellular metabolism and gene expression. It is required as a catalytic cofactor by more than 300 enzymes and it stabilizes the structure of thousands of protein domains (Devirgiliis *et al.*, 2007). Zn movement in the cell is tightly regulated, and free intracellular Zn is very limited (Outten and O'Halloran, 2001). However, normal cellular activity requires Zn mobilization and transfer from one location to another or from one Zn-binding site to another.

Our results showed that Cd provokes both an increase in intracellular Zn and Cu content and a decrease in Cu/Zn SOD activity. This suggests that Cd is able to modify strongly the intracellular homeostasis of these metals.

Se is also an essential trace element playing a role in a number of biological processes. Se is an essential component of several antioxidant enzymes such as GPx and thioredoxin reductase. It has also been shown that a pre-treatment with Se has a protective role from the toxic actions of Cd and other heavy metals in rats. However this effect is very dependent on the organ considered: Se does not protect heart and kidneys from Cd toxicity, while it has a significant effect on liver (Zikic *et al.*, 1998; Jihen *et al.*, 2008; Ognjanovic *et al.*, 2008). Our results showed that Cd induced both an increase in the intracellular level of Se and a decrease in GPx activity. This suggests that although the Se level is higher than in control cells, the Cd treated cells can not use Se for instance to re-establish a normal GPx activity.

Mn is an essential nutrient and is important for optimal cellular function particularly through its role in the mitochondrial MnSOD activity. Interactions between Cd and Mn are poorly documented in the literature. Results of *in vivo* experiments suggested that Cd exposure could decrease Mn transfer in the rat's duodenum (Gruden, 1987) and decreased MnSOD activity in rat's liver and kidney (Casalino *et al.*, 2002; Pillai and Gupta, 2005). The present study shows that Cd induced both an increase in the intracellular Mn content and in the MnSOD activity, suggesting that Cd does not interfere with the intracellular Mn metabolism.

Cd substitution of various metals at the binding sites of purified proteins has been described in many instances (Martelli *et al.*, 2006). A great number of biological processes are Fe, Zn, Mn, Se and Cu dependent, and an imbalance of their homeostasis has complex implications and can contribute to the onset of chronic pathologies. Substitution of native metals by Cd is

very often proposed as the leading molecular mechanism of Cd toxicity. Cd has also been supposed to cause the displacement of Fe and Cu from various intracellular sites (cytoplasmic and membrane proteins), thus increasing the concentrations of ionic copper and iron, which can then cause oxidative stress through Fenton reactions (Waisberg *et al.*, 2003). It has been shown that essential trace elements can also exhibit toxic properties and at high concentrations can induce an oxidative stress generation and can alter cellular function (Rossi *et al.*, 1996).

Cd treatment increased intracellular ROS levels in cultured cells, as indicated by the observed DNA strand breaks, the increase in the lipid peroxidation level and in carbonyl group level. Lipid peroxides can be formed by the attack of radicals, such as ROS and reactive nitrogen species (RNS), on polyunsaturated fatty acid residues of phospholipids. Previous research has indicated the involvement of reactive oxygen stress in CdCl₂-induced cellular damage. Oxidative stress refers to a state in which the production of ROS overwhelms the ability of antioxidant defence pathways to maintain redox equilibrium in the cell.

An important parameter accompanied by generation of oxidative stress is the decrease of the intracellular GSH concentration due to oxidation processes (conversion of GSH to GSSG).

Earlier reports indicated that depletion of glutathione and protein-bound sulfhydryl groups by Cd resulted in the enhanced production of ROS such as superoxide ions, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide in various cell lines (Zhong *et al.*, 1990; Stohs *et al.*, 2001). GSH plays a prominent role in the cellular defence against ROS (ROS scavenging) in addition to using its thiols to protect cysteine groups from oxidative damage.

Du *et al.* (2008) showed that in GSH-depleted cells (primary cortical neurons or 3T3 fibroblasts), Cu induced an increase in oxidative stress resulting in DNA damage and activation of p53-dependent cell death. Other observations provide additional support for a major role played by GSH in genomic protection against 4-hydroxynonenal as well as other chemicals. 4-Hydroxynonenal (HNE), one of the main breakdown products of lipid peroxides, has been shown to react with DNA yielding a 1, N²-propano adduct to 2'-deoxyguanosine. Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells (Falletti *et al.*, 2007). We observed that DNA damage in Jurkat cells is well correlated with the presence of oxidative stress and the depletion of GSH. Cd is known to exhibit high affinity for thiol groups including glutathione. ROS can inhibit detoxifying enzymes and disrupt DNA repair systems (Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Waisberg *et al.*, 2003; Mouron *et al.*, 2001). A number of important enzymes involving DNA have been

shown to require zinc for their activity, and Cd can substitute for zinc in the finger domains of certain DNA-binding proteins.

Oxidative damage to nucleic acids includes adducts of both base and sugar group modifications, single and double strand breaks in the DNA backbone, and cross-links between DNA and other molecules. About 20 major oxidative DNA adducts have been characterized. One of these species, 8-oxo-2'-deoxyguanosine (oxo8dG), an adduct for which specific cellular repair enzymes exist, has been shown to cause G-to-T transversions.

The origin of DNA scissions detected by the comet assay could be associated with the direct breakage of DNA phosphodiester backbone or as a consequence of the repair process (Mouron *et al.*, 2004).

The Comet assay measures DNA damage as the extent of single- and double-strand breaks, alkali-labile sites, cross-links, and incomplete excision repair sites. The mean tail length showed a dose-related increase and time-dependent decrease after treatment with CdCl₂ when compared to controls. Damage in the DNA of a lymphocyte will likely impair its function. Cd is known to modulate many T cell functions (Colombo *et al.*, 2004; Pathak and Khandelwal, 2008).

Results in the comet assay can be influenced by DNA repair processes in a complex way. First, DNA repair eliminates DNA lesions which results in decreased DNA migration. On the other hand, excision repairs itself leads to strand break formation which may cause DNA migration in the comet assay. If the repair process is inhibited, an increment in DNA migration might be expected in the comet assay because of the persistence of DNA lesions which lead to strand breakage by themselves and/or because of an accumulation of DNA strand breaks related to ongoing DNA repair (Mouron *et al.*, 2004).

Hartmann and Speit (1994) reported no increase in DNA breaks in human lymphocytes at concentrations of Cd below 500 µM after 2 h of exposure. Furthermore, no increase in DNA migration, as measured by the comet assay, was found in uncultured human lymphocytes, when exposed to 1 mM or 5 mM CdCl₂ for 3 h (Rozgaj *et al.*, 2002). In contrast, other studies in human cell lines showed an increase of DNA breakage at low micromolar concentrations of Cd (up to 50 µM) (Mikhailova *et al.*, 1997; Mouron *et al.*, 2001). Various exposure factors such as fetal calf serum concentrations, duration of treatment and the chemical form of Cd used have been reported to greatly influence Cd genotoxicity (Mouron *et al.*, 2001; Wang and Lee, 2001). Valverde *et al.*, (2001) studied the ability of Cd to interact directly with DNA by employing a variant of the comet assay. Negative results were obtained, indicating that CdCl₂

is unable to interact directly with DNA to produce DNA single strand breaks, suggesting that the induction of genotoxicity was produced by indirect interactions.

In conclusion our results showed that Cd is able to induce a perturbation in trace element homeostasis and oxidative damage to lipid, proteins and DNA in Jurkat T cells. Surprisingly it does not provoke an intracellular depletion in metals and other trace elements as expected, but an increase. Our hypothesis is that Cd could induce both an overexpression of some of the membrane transporters involved in trace element uptake and a displacement of some of the intracellular trace elements such as Cu, Se, Zn, and Fe from their usual binding sites. Metallothioneins are probably involved in this process. This could explain the lower activities in Cu/Zn SOD and in GPx. The decreased activity of these enzymes together with the increase in the intracellular levels of Cu, Zn, Se, and Fe can then generate an oxidative stress and lead to oxidative damage to the intracellular biological macromolecules. Mn could be an exception since Cd increases its uptake but does not prevent it to be used normally by the cell.

Acknowledgements

The authors are grateful to Josiane ARNAUD (DBI, Grenoble) for ICP-MS measurements.

References:

- Akerboom T.P., Sies H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol.Chem.* 195, 133–139.
- Beyersmann D., Hechtenberg S., 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 247–261.
- Bravard, A., Vacher, M., Gouget, B., Coutant, A., de Boisferon, F.H., Marsin, S., Chevillard, S., Radicella, J.P., 2006. Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7430-7436.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274-308.
- Bulaj, G., Kortemme, T., Goldenberg, D.P., 1998. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965–8972.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J. L., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* 531:5-23.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.
- Carol A. Chrestensen, David W. Starke, and John J. Mieyal, 2000. Acute Cadmium Exposure Inactivates Thioltransferase (Glutaredoxin), Inhibits Intracellular Reduction of Protein-glutathionyl-mixed Disulfides, and Initiates Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275(34): 26556–26565
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37-50.

Clayson DB, Mehta R, Iverson F. 1994. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens: Oxidative DNA damage-the effects of certain genotoxic and operationally non genotoxic carcinogens. *Mutat Res* 317:25-42.

Colombo M, Hamelin C, Kouassi E, Fournier M, and Bernier J., 2004. Differential effects of mercury, lead, and cadmium on IL-2 production by Jurkat T cells. *Clinical Immunology* 111:311-322

Congiu, L., Chicca, M., Pilastro, A., Turchetto, M., Tallandini, L., 2000. Effects of chronic dietary cadmium on hepatic glutathione levels and glutathione peroxidase activity in starlings (*Sturnus vulgaris*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 357-361.

Cooke Marcus S., Ryszard Olinski, Mark D. Evans, 2006. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta* 365:30-49

DE LA FUENTE H., PORTALES-PÉREZ D., BARANDA L., DÍAZ-BARRIGA F., SAAVEDRA-ALANÍS V., LAYSECA E. & GONZÁLEZ-AMARO R., 2002. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 129:69-77

Devirgiliis Chiara, Zalewski Peter D., Perozzi Giuditta, Chiara Murgia, 2007. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. *Mutation Research* 622:84-93

Daniels Michael J., Jennifer S. Turner-Cavet, Richard Selkirk, Hongzhe Sun, John A. Parkinson, Peter J. Sadler, and Nigel J. Robinson, 1998. Coordination of Zn21 (and Cd21) by Prokaryotic Metallothionein. *J. Biol. Chem.* 273(36): 22957-22961

Du Tai, Giuseppe D. Ciccosto, Greg A. Cranston, Gulcan Kocak, Colin L. Masters, Peter J. Crouch, Roberto Cappai, Anthony R., 2008. White Neurotoxicity from glutathione depletion is mediated by Cu-dependent p53 activation. *Free Radical Biology & Medicine* 44:44-55

Ehrlich M. and Sharova H. *Current protocols in toxicology*. New York: John Wiley & Sons; 2000.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.

Falletti Olivier, Cadet Jean, Favier Alain, Douki Thierry, 2007. Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells. *Free Radical Biology & Medicine* 42:1258-1269.

Fatur T., Tusek M., Falnog I., Scancar J., Laha T.T., Filipic M., 2002. DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology* 40:1069-1076

Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114-121.

Frelon S., Douki T., Favier A., Cadet J., 2003. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* 16:191-197;

Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol. Lett.* 164, 97-103.

Galan, A., Garcia-Bermejo, L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernandez, C., de Blas, E., Aller, P., 2001. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *Eur. J. Cell Biol.* 80, 312-320

Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 282-290.

Gruden, N., 1987. Cadmium-manganese interaction in the rat's duodenum. *Environ. Res.* 43, 19-23.

Güerci A., Seoane A., Dulout F., 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mutat. Res.* 469:35-40.

- Hartmann A., Speit G., 1994. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23, 299–305.
- Henle E. S., Linn S., 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272:19095–19098
- Huang Y-H, Shih Chwen-Ming, Huang Chang-Jen, Lin Chun-Mao, Chou Chih-Ming, Tsai Meng-Ling, Liu Tsang Pai, Chiu Jen-Fu, and Chen Chien-Tsu, 2006. Effects of Cadmium on Structure and Enzymatic Activity of Cu, Zn-SOD and Oxidative Status in Neural Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 98:577-589
- IARC, International Agency for Research on Cancer, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry, IARC Scientific Publications, Lyon, France, 1993, pp. 119–238.
- Ikediodi, C.O., Badisa, V.L., Ayuk-Takem, L.T., Latinwo, L.M., West, J., 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Mol. Med.* 14, 87-92.
- Jihen el, H., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K., 2008. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat : Histology and Cd accumulation. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3522-3527.
- Jin, T., Lu, J., Nordberg, M., 1998. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology* 19, 529-535.
- 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 DANN repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1452-1458.
- KROCOVA Z., MACELA A., KROCA M. and HERNYCHOVA L.. 2000. The Immunomodulatory Effect(s) of Lead and Cadmium on the Cells of Immune System In Vitro. *Toxicology in Vitro* 14:33-40
- Levine R.-L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G, Ahn B.-W., Shaltiel S., Stadtman E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Marklund S., Marklund G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem./FEBS* 47, 469–474.
- Martelli A., Rousselet E., Dycke C., Bouron A., Moulis J-M., 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88:1807–1814
- McMurray Cynthia and Tainer John A, 2003. Cancer, cadmium and genome integrity. *Nature Genetics* 34(3):239-242
- Mikhailova, M.V., LittleWeld, N.A., Hass, B.S., Poirier, L.A., Chou, M.W., 1997. Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Letters* 115, 141–148.
- Mouron, S.A., Golijow, C.D., Dulout, F.N., 2001. DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 498, 47–55.
- Nzengue, Y., Steiman, R., Guiraud, P., 2008a. Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines. *Free Radic. Res.* 42, 142-153.
- Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Lefèbvre, E., Guiraud, P., 2008b. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology* 243, 193-206.

- Ognjanovic, B.I., Markovic, S.D., Pavlovic, S.Z., Zikic, R.V., Stajn, A.S., Saicic, Z.S., 2008. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol. Res.* 57, 403-411.
- Pathak, N., Khandelwal, S., 2008. Impact of cadmium in T lymphocyte subsets and cytokine expression: differential regulation by oxidative stress and apoptosis. *Biometals* 21, 179-187.
- Pillai, A., Gupta, S., 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: effects of vitamin E and Mn²⁺. *Free Radic. Res.* 39, 707-712.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J., Moore, M.R., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.* 137, 65-83.
- Shih, C.M., Ko, W.C., Wu, J.S., Wei, Y.H., Wang, L.F., Chang, E.E., Lo, T.Y., Cheng, H.H., Chen, C.T., 2004. Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 91, 384-397.
- Silvana Andrea Mouron, Claudia Alejandra Grillo, Fernando Noel Dulout, Carlos Daniel Golijow. A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and *K-ras* gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells. *Mutation Research* 568 (2004) 221-231
- Suwalsky M., Villena F., Norris B., Cuevas F., Sotomayor C.P. 2004. Cadmium-induced changes in the membrane of human erythrocytes and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98:1061-1066
- Takehiko Nohmi, Su-Ryang Kim¹, Masami Yamada, 2005. Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutation Research* 591:60-73
- Outten CE, O'Halloran TV., 2001. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science* 292:2488-492
- Placer Z A, Cushman L L and Johnson B C, 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in biochemical systems *Anal. Biochem.* 16:359-64
- Rollin-Genetet F., Berthomieu C., Davinl A.-H. and Quéméneur E., 2004. Escherichia coli thioredoxin inhibition by cadmium Two mutually exclusive binding sites involving Cys32 and Asp26. *Eur. J. Biochem.* 271, 1299-1309
- Rozgaj R., Kasuba V., Fucic A., 2002. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 16, 187-192.
- Rossi, A., Poverini, R., Di Lullo, G., Modesti, A., Modica, A., Scarino, L.M., 1996. Heavy metal toxicity following apical and basolateral exposure in the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol. In Vitro* 10, 27-36.
- Satarug S., Moore M.R., 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* 112, 1099-1103.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20:77-88.
- Tallkvist, J., Bowlus, L.C., Lonnerdal, B., 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol. Lett.* 122, 171-177.
- Tice RR, Andrews PW, Singh NP., 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 53:291-301.
- Valverde M., Trejo C., Rojas E., 2001. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* 16:265-270.

- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology* 192:95–117.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M., 2004. Cadmium inhibits the electron transfert chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1434-1443.
- Wang, T.C., Lee, M.L., 2001. Effect of fetal calf serum on the cadmium clastogenicity. *Mutation Research* 498, 79–87.
- Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K., Suzuki, T., 2003. Cadmium-dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 134, 227-234.
- Weimann A, Belling D and Poulsen H E 2002 Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucl. Acids Res.* 30 E-7
- Zikic, R.V., Stajn, A.S., Ognjanovic, B.I., Saicic, Z.S., Kostic, M.M., Pavlovic, S.Z., Petrovic, V.M., 1998. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17, 259-264.
- Zhong ZJ, Troll W, Koenig KL, Frenkel K. 1990. Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res* 50:7564–7570.

4 Résultats complémentaires

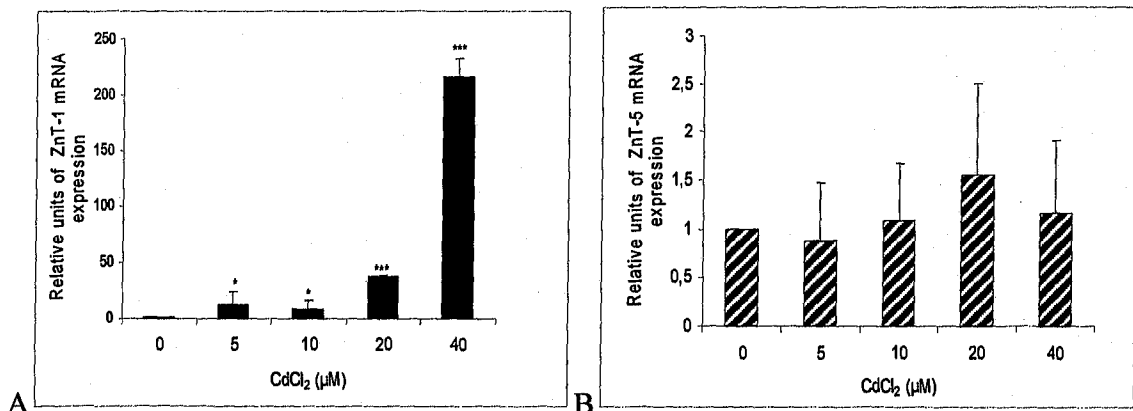
- *Voies d'Entrée du cadmium: Znt, Zip & DMT*

Le Cd ne possède aucune voie d'entrée spécifique, il agit par mimétisme avec des métaux physiologiques ou d'autres ions afin de traverser les membranes cellulaires et ce par divers mécanismes dépendant du type cellulaire et du tissu biologique.

Chez les mammifères, l'influx de zinc dans la cellule semble être assuré par des transporteurs de la famille ZIP, alors que l'efflux est assuré par les protéines ZnT (Liu et Cousins, 2004). Les transporteurs Zip et ZnT sont exprimés de façon localisée dans certains tissus, et à des taux variables. On a sélectionné certains transporteurs ZnT et Zip en fonction de leur distribution tissulaire et les résultats obtenus, après stress des cellules BJAB par le Cd à différentes concentrations, montrent une induction de l'expression très hautement significative du ZnT-1, de même pour les Zip 1 et 3 (Figures 10 A et C).

Le transporteur DMT-1 est également important car impliqué dans le transport du fer mais aussi de plusieurs autres métaux (Bressler et al., 2004). La figure 10D montre une induction également très significative de l'expression de ce transporteur en présence de Cd.

Ces données suggèrent que les voies d'entrée du Cd, pour les cellules lymphocytaires BJAB, pourraient être principalement Zip1, Zip3 et DMT-1. Ces résultats montrent également que bien que très surexprimé le transporteur ZnT-1 ne permet pas l'export des différents métaux accumulés par les cellules (Figure 10A).



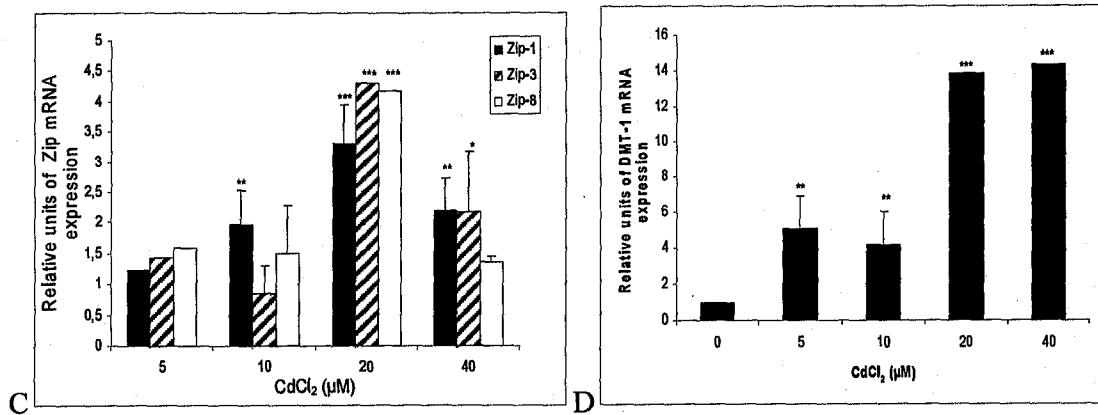


Fig. 10: Expression des transporteurs ZnT, Zip et DMT1 chez les cellules BJAB stressées par le cadmium. (A): ZnT-1; (B): ZnT-5; (C): Zip-1, Zip-3 et Zip-8; (D) DMT-1

Chapitre 4: Rôle du α -tocophérol vis-à-vis du stress oxydant induit par le cadmium

1. Présentation de l'article 4

La complexation du cadmium par les thiols cellulaires est le mécanisme majeur de protection chez les cellules eucaryotes. Cependant lorsque les capacités de complexation des thiols sont débordées, le cadmium va avoir des effets délétères importants, en particulier de nature oxydative, sur les cellules. Par ailleurs le cadmium complexé par les thiols cellulaires est difficile à éliminer pour la cellule et peut être relargué dans certaines circonstances. L'utilisation d'agents chélateurs d'origine exogène a été réalisée avec succès pour lutter contre des intoxications aux métaux. Plusieurs études ont évalué l'effet des antioxydants utilisés en conjonction avec des chélateurs de plomb (Tableau 10).

Tableau 10 : Combinaison des antioxydants avec des agents chélateurs du plomb

Antioxydants	Traitement	Tissu	Résultats	Référence
N acétyl cystéine	50 mg/kg injection intrapéritonéale, seule et avec DMSA 50 mg/kg	Sang, foie, rein, cerveau	Plus efficace que DMSA seul pour reverser la toxicité oxydative du plomb	Flora et al., 2004
Vitamine E	5 IU/kg injection intramusculaire, seule et avec DMSA 50 mg/kg	Sang, foie, rein, cerveau	Vitamine E + DMSA plus efficace pour réduire le GSSG et les TBARS que chaque produit seul	Flora et al., 2003
Vitamine C	25 mg/kg voie orale avec DMSA 50 mg/kg	Sang, foie, rein, cerveau	Efficace pour réduire le GSSG et les TBARS; plus efficace que vitamine E ou DMSA pour augmenter le GSH hépatique; pas d'effet chélateur additif	Flora et al., 2003
Acide alpha-lipoïque	25 mg/kg injection intrapéritonéale, seul et avec DMSA 20 mg/kg	Foie	Acide lipoïque + DMSA reversent les enzymes hépatiques et les dommages oxydatifs induits par le plomb; aucun n'est efficace administré seul	Sivaprasad et al., 2004
Acide alpha-lipoïque	25 mg/kg injection intrapéritonéale, seul et avec DMSA 20 mg/kg	Sang, foie, rein, cerveau	Acide lipoïque réduit l'inflammation rénale liée aux espèces réactives de l'oxygène (ERO); acide lipoïque + DMSA plus efficaces pour détruire les ERO que si utilisés seuls.	Sivaprasad et al., 2002

DMSA, Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid; GSSG, glutathion oxydé; GSH, glutathion réduit; TBARS, thiobarbituric acid reactants

De nombreux agents chélateurs ont été testés dans le cadre d'intoxications expérimentales aiguës et chroniques au Cadmium (Tandon *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2003; Luchese *et al.*, 2007). L'acide 2, 3 dimercaptosuccinique (DMSA) et certains de ces mono-esters et le 2, 3-dimercapto-1-propane sulfonate (DMPS) semblent augmenter l'excrétion, la mobilisation du Cd stocké dans le foie et le rein et diminuer la toxicité.

En pratique, à ce jour, aucun agent chélateur ne peut encore être proposé pour traiter l'intoxication humaine par le cadmium (Lauwerys, 2007).

La présente étude investigate la possibilité d'utiliser l' α -tocopherol comme moyen de protection contre le cadmium, par l'étude de son impact sur les marqueurs du stress oxydant. Quatre lots de jeunes rats Wistar ont été constitués : un lot témoin, un lot traité par le cadmium (injection intraveineuse), un lot traité par l' α -tocopherol (injection intrapéritonéale), et le quatrième groupe est traité par une dose combinée Cd + α -tocopherol. La durée d'expérimentation est de dix jours. Le niveau de peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs des protéines ont été quantifiés par le dosage des malondialdéhydes (MDA) et des carbonyles, respectivement. Les résultats obtenus ont révélé un effet significatif du cadmium sur les paramètres hématologiques (nombre des globules rouges, concentration de l'hémoglobine et taux d'hématocrite), et sur le niveau du glutathion (GSH), des MDA et des carbonyles. Tous ces effets ont été inversés par l' α -tocopherol.

2. Rappels bibliographiques

2.1. La thérapie par chélation pour la détoxification des métaux

L'objectif de la thérapie par chélation est de mettre le métal sous une forme sans affinité pour le tissu-cible ou sous une forme hydrosoluble facilement éliminable par voie rénale.

Diverses intoxications humaines aux métaux ont été traitées efficacement par l'administration d'un agent chélateur (Figure 40) néanmoins, la sélectivité du chélateur pour le métal est importante en raison du risque de déplétion en métaux essentiels.

Toutefois, les réactions de complexation dans le corps humain sont influencées par une multitude de facteurs, y compris des métaux et ligands, la dynamique de la circulation, la compartimentalisation, et le métabolisme de l'agent chélateur. En conséquence, *in vivo* les réactions de chélation diffèrent largement de ce qui était attendu de nos connaissances chimiques sur le métal et l'agent chélateur.

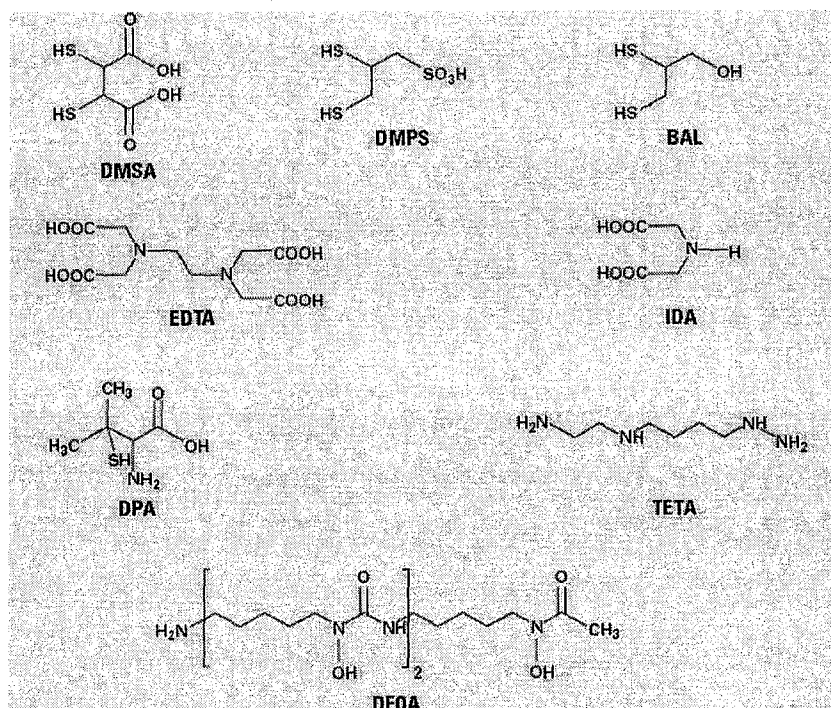


Figure 40: Structure chimique de quelques agents chélateurs des métaux (Andersen and Aaseth, 2002). (DMSA, Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid; DMPS, dimercaptopropionic Sulfonate; BAL, dimercaprol; EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid; IDA, iminodiacetic acid; DPA, D-penicillamine; TETA, triethylenetetramine); DFOA, desferrioxamine)

2.2. La vitamine E

2.2.1 La structure moléculaire de la vitamine E

La vitamine E est le nom générique pour un groupe de huit composés dérivés des plantes, ce sont des substances liposolubles (tocols) dont quatre tocophérols et quatre tocotriénols (Figure 41). La structure moléculaire de la vitamine E est composée d'un anneau chromanol avec une chaîne latérale située à la position C-2. Les tocophérols ont une chaîne latérale phytyl saturée et les tocotriénols ont une chaîne latérale isoprénoïde non saturée. Le nombre et la position des groupes méthyles situés autour de l'anneau chromanol varie entre les différents tocophérols et tocotriénols, et compte pour la désignation des formes comme forme alpha, beta, gamma ou delta.

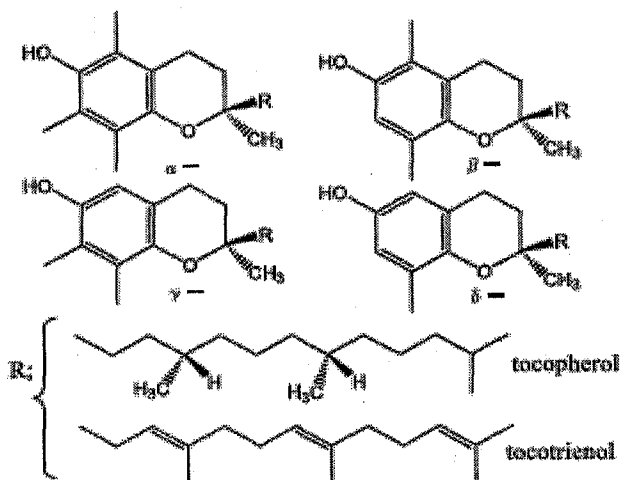


Figure 41 : Structure chimique de la vitamine E (Yoshida *et al.*, 2007)

2.2.2 Mode d'action de la vitamine E

Le mode d'action de la vitamine E est illustré par la Figure 42.

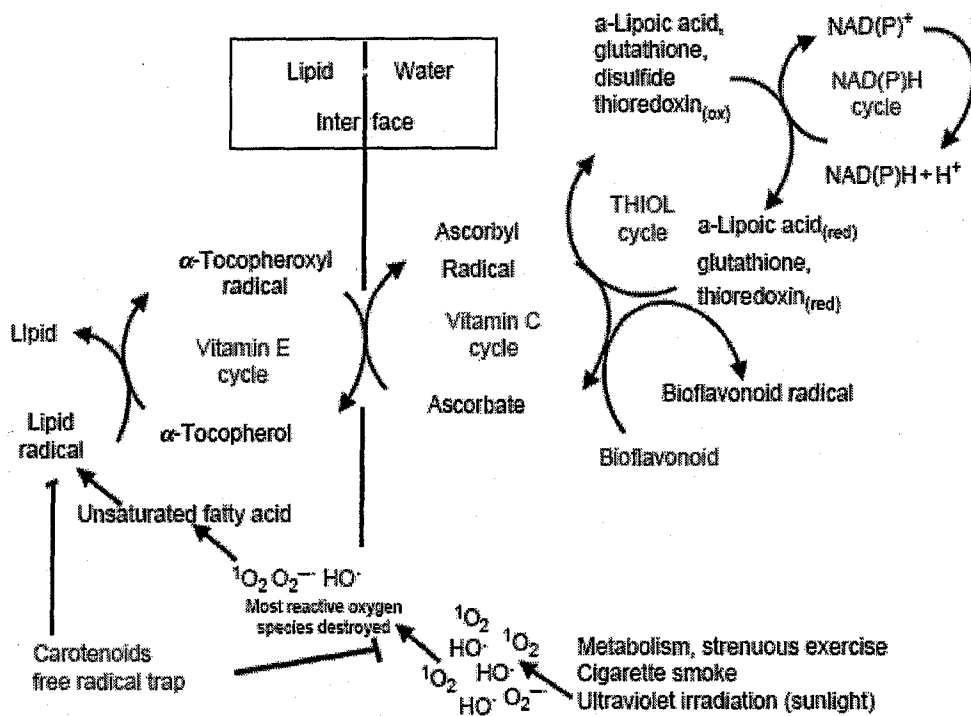


Figure 42: Niveau d'action antioxydant de la vitamine E (Obermuller-Jevic and Packer, 2004)

Article 4: Role of α -tocopherol in cadmium - induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain.

Saïd Nemmiche^{1,2}, Daoudi Chabane-Sari¹, Pascale Guiraud²

¹Laboratoire de physio pharmacologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen cedex 13000, Algérie. ²Laboratoire ORSOX, UJF, Faculté de Pharmacie, Domaine de la Merci, La Tronche 38700, France.

Abstract

Cadmium (Cd) a highly toxic metal is considered to be a multitarget toxicant, and it accumulates principally in the liver and kidney after absorption. *In vivo* studies of mouse and rat liver have shown that apoptosis plays a primary role in Cd-induced hepatotoxicity. However, the detailed mechanisms by which toxic metals such as Cd produce their effects are still largely unknown. The present study aimed at investigating the consequences of exposure to Cd, α -tocopherol and their combination on stress biochemical parameters (lipoperoxidation and protein carbonyls levels). Male albino Wistar rats (1 month old) were treated intravenously with cadmium (2 mg CdCl₂/kg body weight/day), and α -tocopherol (100 mg/kg body weight/day), or with α -tocopherol + Cd (100 mg Vit E/kg body weight, 2 mg CdCl₂/kg). The lipoperoxidation was measured by the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) method and oxidatively generated damage to proteins by determining carbonyl (DNPH) levels. Among the hematological parameters measured the haematocrit value and haemoglobin concentration were significantly decreased in the blood of Cd-treated rats. A significant increase was observed in the level of MDA (malondialdehyde) and protein carbonyls in the cadmium exposed group compared to control group ($p < 0.001$), and these values were decreased after administration of α -tocopherol (group 4). The activity of lactate dehydrogenase in rat liver and brain showed a significant increase as compared to that found in the control group and significant decrease of catalase and superoxide dismutase activities.

In the liver of the Cd-treated group the contents of reduced glutathione were decreased. Our results suggest that cadmium induces an oxidation of cellular lipids and proteins and that administration of α -tocopherol can reduce Cd-induced oxidative stress and improve the glutathione level together with other biochemical parameters.

Keywords: α -Tocopherol, Cadmium, Oxidative stress, Liver, Brain, Rats

1. Introduction

Cadmium (Cd) is a widespread environmental and industrial pollutant which has been classified as a type I carcinogen by the International Agency for Cancer Research [1]. Cd has

also been implicated in the development of cancers, including cancers of the lung, prostate, kidney, liver and hemopoietic system.

It is also known to cause sterility [2], renal dysfunction [3], hepatic toxicity [4], and pancreatic activity changes [5]. Genotoxicity and apoptotic effects of Cd have been also reported in a number of cell types [6, 7]. Several reports are dealing with the influence of Cd in synaptic neurotransmission in the brain of rats (*in vivo* microdialysis in rat amygdala) [8], rat brain neurotransmitter levels [9], and brain antioxidant status [10]. Cd increased brain acetylcholinesterase activity and decreased brain total antioxidant status of adult male rats [11].

However, the mechanism by which Cd-induced cytotoxicity or carcinogenesis occur remains fairly unclear. Cadmium itself is unable to generate free radicals directly, since it has only one oxidation state, however, indirect generation of various radicals involving the superoxide radical, hydroxyl radical and nitric oxide has been reported [12]. Some experiments also confirmed the generation of (non-radical) hydrogen peroxide which itself in turn may be a significant source of radicals via Fenton chemistry [13] and Haber-Weiss reaction [14].

Cadmium affects cell proliferation, differentiation, apoptosis and other cellular activities, interferes with antioxidant defence mechanisms and inhibition of oxidative DNA repair systems and stimulates the production of reactive oxygen species which may act as signalling molecules in the induction of gene expression and apoptosis [15, 16, and 17]. The specific antioxidant response of tissues appears to be dependent not only on the nature of the reactive oxygen species (ROS), but also on the type of tissue and on the oxidative agent involved [18]; also it must be pointed out that the regulatory events and their dysregulation depend on the magnitude and duration of the changes in ROS or reactive nitrogen species (RNS) concentration [19].

Antioxidant and other cell redox state modulating enzyme systems act as the first-line defense against ROS in all cellular compartments and also extracellularly. The most important of these enzymes include superoxide dismutases, glutathione peroxidases, catalase and peroxiredoxins [14].

Vitamin E is a fat-soluble vitamin that exists in eight different forms. α -Tocopherol is the most active form of vitamin E in humans and is a powerful biological antioxidant which is considered to be the major membrane bound antioxidant employed by the cell [20]. Its main antioxidant function is protection against lipid peroxidation (LPO) [21]. Glutathione (GSH) is a multifunctional intracellular non-enzymatic antioxidant [22]. GSH is the major compound in the intracellular redox status regulation and it is an important substrate and cofactor in many drug metabolism reactions. These reactions are primarily enzymatic and include conjugation of

electrophiles as catalyzed by the GSH S-transferases (GSTs) and function in a reductive manner in reactions including those catalyzed by GSH peroxidase and thioltransferases [23].

Although several chelating agents and antagonists are established to reduce the Cd toxicity, some of them are burdened with undesirable side effects [24]. Several authors have shown that antioxidants should be one of the important components of an effective treatment of cadmium poisoning [25, 26]. In this work we examined the ability of CdCl₂, α -tocopherol and their mixture to modify the levels of oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

All experiments were performed with male Wistar rats (Iffa Credo, France), weighing 90.25 ± 17.61 g at the beginning of the experiment. After 1 week of adaptation in a room with controlled temperature (24 ± 2 °C) and lighting (12h light/12h dark), the rats were divided into four groups consisting each of 05 animals. Control rats (group 1) received intravenous injection of sterilized saline physiological solution. Groups 2 and 3 were treated with 2mg cadmium chloride/kg body weight/day and 100mg α -tocopherol / kg body weight/day, respectively.

In group 4, animals were treated with a combined dose of 2 mg cadmium chloride / kg body weight/day and α -tocopherol administered i.p, at a dose of 100 mg kg⁻¹ body weight. The intravenous LD₅₀ (lethal dose, 50% kill) value of cadmium chloride has been reported to be 5.5 mg/kg [27, 28].

Control and treated groups were sacrificed by decapitation under ether inhalation anaesthesia at the end of the experimentation period of 10 days, one day after the last treatment. They were treated, manipulated and killed according to the Principles of laboratory animal care.

2.2. Sample Preparation

Blood was collected into evacuated tubes containing EDTA solution as anticoagulant. After centrifugation (1600 x g) for 10 min, the supernatant plasma was carefully removed to avoid contamination with platelets, and the sample was, as rapidly as possible, frozen and stored at -20 °C until analysis.

The red blood cell (RBC) count and haematocrit (Ht) value were determined by standard haematological techniques. The haemoglobin (Hb) concentration was determined by the cyanomethemoglobin method.

The liver and brain were quickly removed, rinsed in ice cold saline buffer (20mM Tris-HCl, 0.14M NaCl buffer, pH 7.4), weighed, and finely minced in the same solution and homogenized (10% w/v) in a Potter Elvehjem homogenizer. The homogenate tissue and plasma were used for immediate lipid peroxidation assay and homogenate aliquots were stored for further biochemical determination.

2.3 Antioxidant enzymes assay

Determination of catalase (CAT) activity

The catalase activity was determined according to the method of Aebi [29]. The rate of H₂O₂ decomposition was followed by monitoring absorption at 240 nm in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 mM H₂O₂. One unit of catalase activity is defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μmol of hydrogen peroxide in 1 min. The activity was calculated using the extinction coefficient for H₂O₂ ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Determination of superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of SOD was determined in tissue homogenates of liver and brain according to the method described by Spitz and Oberley [30]. The rate of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction to blue formazan by the superoxide anion generated by the xanthine oxidase reaction is monitored spectrophotometrically at 560 nm. One unit of SOD activity is defined as the amount of the enzyme that will inhibit NBT reduction by 50%.

2.4. Lactate dehydrogenase (LDH) and serum transaminases (AST and ALT) activities assay

The activity of LDH was determined using a commercially available kit from Biocon® (Germany). Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymes activities were used as biochemical markers for the early acute hepatic damage and determined by the enzymatic methods according to manufacturer instructions (ChronoLab, Switzerland).

2.5. Protein measurement

Determination of the protein content was based on the Bradford method [31] with BSA as a standard.

2.6. Glutathione (GSH) content

Total GSH contents were determined spectrophotometrically using the method described by Akerboom and Sies [32]. Protocol for total GSH was as follows: in 1 ml final volume sample 730 μl potassium phosphate buffer, 0.1M (pH 7.0) containing 1 mM EDTA, 50 μl of 4 mg/ml NADPH in 0.5% NaHCO₃ and 20 μl of 1.5 mg/ml 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma) in 0.5% NaHCO₃ were added. The reaction was started by adding 6 units of GSH

reductase. The absorbance was measured for 1 min at 412 nm at 25°C, expressing GSH as nmol per mg of total protein.

2.7. Measurement of malondialdehyde (MDA)

Lipid peroxidation was estimated by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, according to the method of Ohkawa *et al.* [33] and Yagi *et al.* [34, 35]. Briefly, an aliquot of 200 μL of serum or tissue homogenates (10% w/v) was mixed thoroughly with aqueous solution of thiobarbituric acid and heated at 95 for 30 min in a water bath. The suspension was then cooled to room temperature, centrifuged at 4 000 r/min for 10 min, and the pink colored supernatant was taken for spectrophotometry measurement at 532 nm for MDA assay. MDA concentration was calculated by the absorbance coefficient of MDA-TBA complex (absorbance coefficient. = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Results are expressed as nanomoles MDA per mg Hb and nanomoles MDA per gram wet weight of tissue.

2.8. Measurement of protein carbonyls

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) [36]. Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH and the absorbance was read in a spectrophotometer (Helios alpha, France) at 370 nm.

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. All data were analysed employing one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. Values of $P < 0.05$ were considered of statistical significance.

3. Results

Cadmium causes a significant reduction in RBC count, content of Hb and the rate of Ht in cadmium exposed group (p values: RBCs, $p < 0.001$; Hb, $p < 0.001$ and Ht, $p < 0.001$) (Figs. 1, 2 and 3). The mean MDA values obtained in the samples of control, Cd-only, and Cd + vitamin E animals are given in table 1.

The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in rat liver and brain was significantly inhibited after Cd exposure with concurrent elevation in the activities of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) (table 2).

A significant increase was observed in the level of plasma MDA in the cadmium exposed group compared to control group ($p < 0.001$), and this value was decreased by the administration of α -tocopherol (group 4).

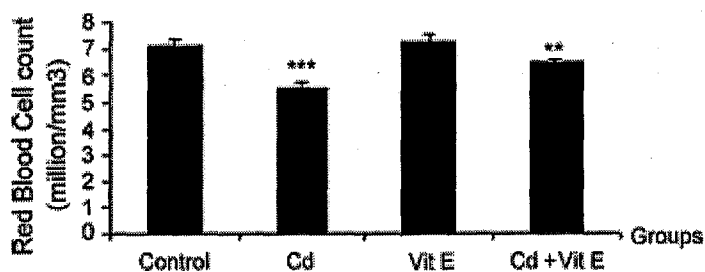


Fig. 1. Effects of cadmium, α -tocopherol and their combination on the red blood cell count in the Wistar rats. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

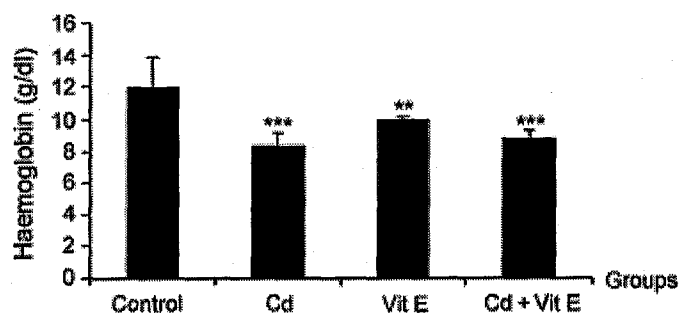


Fig. 2. Effects of cadmium, α -tocopherol and their combination on the content of haemoglobin in the Wistar rats. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

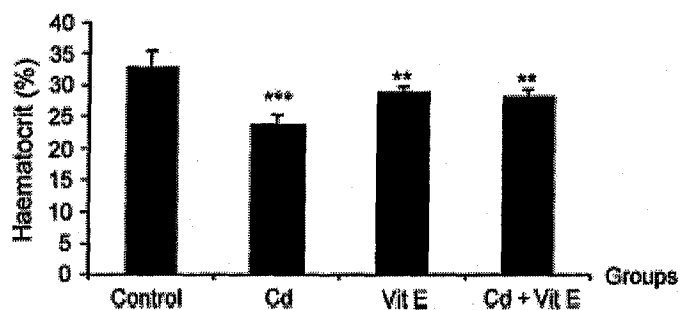


Fig. 3. Effects of cadmium, α -tocopherol and their combination on the rate of haematocrit in the Wistar rats. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

Table 1

Effects of cadmium and α -tocopherol, and their combination, on malondialdehyde (MDA) concentration in the plasma, and brain and liver of the Wistar rats

	Groups			
	Control	Cd	Vit E	Cd+Vit E
Plasma (nM MDA/mg Hb)	0.043 \pm 0.011	0.124 \pm 0.024***	0.043 \pm 0.002	0.067 \pm 0.004
Brain (nM MDA/g tissue)	15.98 \pm 0.40	32.16 \pm 3.65***	14.28 \pm 0.90	27.14 \pm 1.99***
Liver (nM MDA/g tissue)	22 \pm 1.96	33.05 \pm 3.10***	18.59 \pm 1.73	27.20 \pm 1.46**

Each value represents the mean \pm S.D. of five rats per group, with ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. control group.

Table 2

Effects of cadmium and α -tocopherol, and their combination, on antioxidant enzymes activities (SOD and CAT) in brain and liver and serum enzymes (ALT and AST) of liver function in the Wistar rats

Groups	Serum		Liver		Brain	
	ALT (U/l)	AST (U/l)	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)
Control	51 \pm 6.88	40.74 \pm 1.07	329.5 \pm 29.92	96.08 \pm 4.49	5.8 \pm 0.51	3.30 \pm 0.25
Cd	87.8 \pm 4.51***	62.86 \pm 2.68***	218.76 \pm 22.24***	50 \pm 8.38***	3.64 \pm 0.50***	2.39 \pm 0.28***
Vit E	41.9 \pm 1.93**	33.74 \pm 1.21***	321.68 \pm 20.10	94.60 \pm 4.57	5.44 \pm 0.29	3.00 \pm 0.2
Cd+Vit E	59.16 \pm 3.97*	51.98 \pm 2.72***	284.66 \pm 16.32*	84.52 \pm 1.84*	4.96 \pm 0.07*	2.90 \pm 0.07*

Each value represents the mean \pm S.D. of five rats per group, with * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. control group.

In this study, MDA was used as a marker of oxidative stress-induced liver and brain impairment in cadmium exposed rats. Current findings showed that MDA levels and LDH activities (Figs. 4 & 5) were increased in cadmium exposed group compared to control group. The difference between the two groups was statistically significant (p values: MDA, p < 0.001 and LDH, p < 0.001). Co-administration of α -tocopherol with Cd controlled Cd-induced lipid peroxidation and significantly modulated the level of MDA in both brain and liver tissue. Indeed, the MDA concentration, in the presence of α -tocopherol, was reduced from 0.124 to 0.067 nmol mg⁻¹ Hb in blood, 32.16 to 27.14 nmol g⁻¹ tissue in the brain and 33.05 to 27.20 nmol g⁻¹ tissue in the liver. Regression analysis revealed that the changes in liver LDH activity were an independent effect of Cd and α -tocopherol, but their combination was highly correlated ($r=0.9761$, $P<0.004$). The effect of Cd administration on the activity of LDH in rat liver and brain showed a significant increase in the activity of this enzyme as compared to the control group.

Contents of GSH were decreased in the liver of Cd-treated group (Fig. 6). Liver and brain GSH content was changed significantly, and administration of the α -tocopherol improved the GSH level. LPO and protein oxidation are two important indicators of oxidative damage of macromolecules induced by ROS, the MDA (table 1) and protein carbonyl levels (Fig. 7) were significantly increased in Cd-treated group in present study. Co-treatment with α -tocopherol was very effective in the prevention of oxidative damage induced by Cd which resulted in significantly lower MDA concentration.

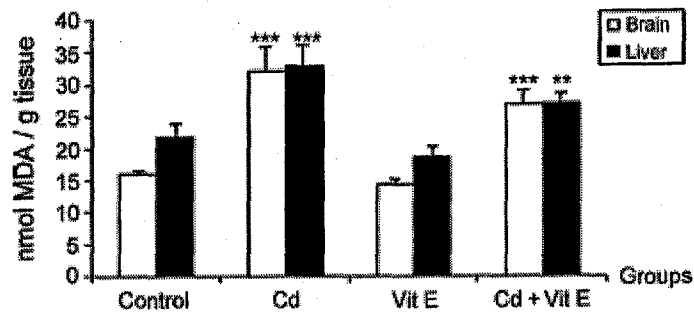


Fig. 4. Effects of cadmium, α -tocopherol and their mixture on the MDA level in the brain and the liver of the Wistar rats. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats per group, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

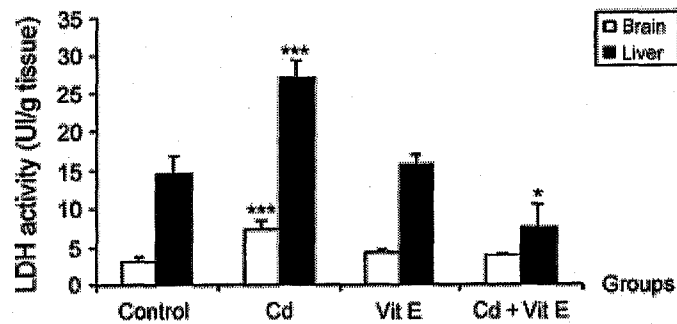


Fig. 5. Effects of cadmium, α -tocopherol and their combination on the activity of lactate dehydrogenase in rat brain and liver. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats per group, with * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

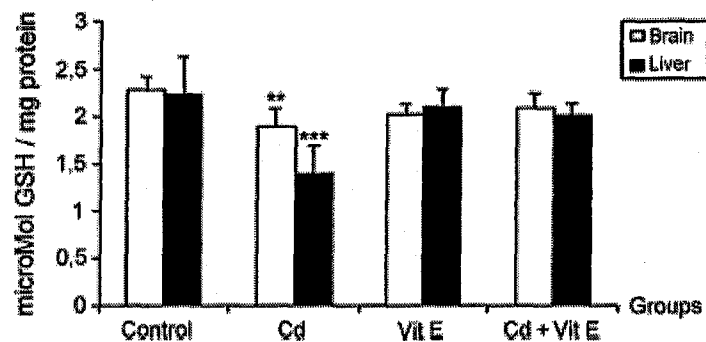


Fig. 6. Effects of cadmium, α -tocopherol and their combination on the GSH level in the brain and the liver of the Wistar rats. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats per group, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

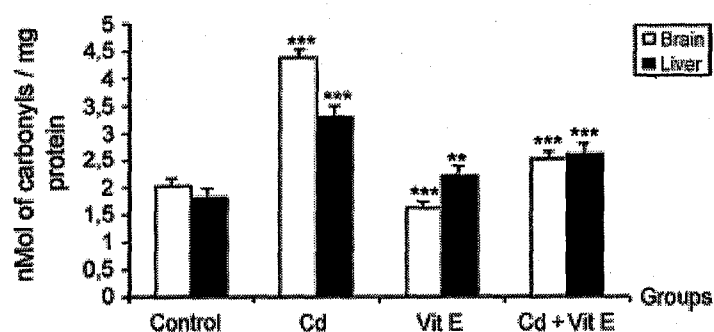


Fig. 7. Effects of cadmium, α -tocopherol and their combination on the carbonyl level in the brain and the liver of the Wistar rats. Each value represents the mean \pm S.D. of five rats per group, with ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

4. Discussion

Current study has shown that exposure to cadmium had significant effects on rats blood, liver and brain. The decrease in haematological parameters (RBCs, Ht and Hb) is in agreement with Karamakar *et al.* [37] who have shown that cadmium chloride caused changes in the blood indices of rats. The significant reduction in RBCs indicated the fact that Cd adversely affected the erythropoiesis in time-dependent fashion; the reduction in Hb content may be due to increased rate of destruction or reduction in the rate of erythrocytes formation [26]. The adverse effect of cadmium influences the Hb synthesis mechanism and alters the membrane skeleton. Recently, Luchese *et al.* [38] demonstrated that Cd^{+2} inhibits δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAD), who catalyses the asymmetric condensation of two molecules of δ -aminolevulinic acid to porphobilinogen in the initial steps of heme biosynthesis. α -tocopherol decreased the toxic effects of Cd on the haematological values and had a protective role in anemia induced by Cd.

In this study the intravenous administration of cadmium chloride (2 mg/kg b.w/day) resulted in a pronounced increase of lipid peroxidation in the liver of rat accompanied by a depletion of hepatic GSH. The results are in accordance with El-Maraghy *et al.* [39] and Eybl *et al.* [40] suggesting that cadmium toxicity can cause oxidative stress by an interaction with $-\text{SH}$ groups of major intracellular defender glutathione and that lipid peroxidation is an early and sensitive consequence of acute Cd exposure. Increase in lipid peroxidation in tissues has been implicated in cadmium induced organ damage and dysfunction [41].

Also, our results showed significant decrease in the activity of antioxidant enzymes, SOD and catalase, in Cd-exposed rats and levels of the antioxidant molecule GSH were strongly correlated with Cd intoxication. Liver injury induced by Cd is well shown by the significant elevation of the liver markers, serum ALT and AST after intravenous administration of CdCl_2 to rats. These

results are in agreement with El-Maraghy *et al.* [39] who found similar increase in serum ALT after CdCl₂ administration to rats.

The decrease of the activity of hepatic SOD and CAT corresponds to the data of Casalino *et al.* [25]. The activity of SOD, CAT and glutathione peroxidase (GPx) was found to be significantly decreased 5h after CdCl₂ injection (100µmol/Kg body weight of Wistar rats) [42].

Several studies have suggested that Cd causes oxidative stress and induces oxidative damage by disturbing the antioxidant defense systems [12, 15]. Cadmium may cause toxicity by disturbing the cellular homeostasis of essential metal ions, such as copper and zinc. Cadmium (1.5 mg/kg for 5 days) decreased liver and brain endogenous Zn levels in male rats [43].

However, α -tocopherol treatment provides significant protection against cadmium toxicity in rats. Recently, El-Demerdash *et al.* [26] showed the beneficial influences of vitamin E, β -carotene alone and/or in combination of reducing the harmful effects of CdCl₂.

Casalino *et al.* [44] showed that vitamin E administration to rats prior to their intoxication with cadmium caused a significant decline in the liver peroxides formed within 24h. Increases in LDH activity in both tissues indicate cellular damage. Shaikh *et al.* [45] observed increased LDH activity after Cd treatment in serum and urine, indicating hepatic and renal toxicity. In experimental rats, subcutaneous administration of Cd (3 mg/kg bw/day) for 3 weeks induced renal damage, which was evident from significantly increased levels of serum urea and creatinine with significant decrease in creatinine clearance [24].

The mechanism of Cd-induced LPO is still not fully understood. Available data indicate that the mechanism is multidirectional and may involve a decrease in the level of glutathione and the total pool of sulphhydryl groups and changes in the activities of antioxidant enzymes. These can induce a prooxidant state in biological systems and lead to peroxidation of polyunsaturated fatty acids [41, 46, and 25]. Breakdown products of lipid peroxides may react with DNA aminobases and proteins [17].

Cadmium has a strong affinity for thiol groups including glutathione [47]. Furthermore, Cd depletes GSH and protein-bound sulphhydryl groups, resulting in enhanced production of reactive oxygen species such as superoxide, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide thus causing damage consistent with oxidative stress [48]. Prolonged exposure to low concentrations of cadmium can increase glutathione levels [49, 50], whereas high cadmium concentrations lead to glutathione depletion *in vitro*. The glutathione is considered to be the major thiol-disulphide redox buffer of the cell [51] and the first line of defence against oxidative damage. The capacity of glutathione to regenerate the most important antioxidants is linked to the redox state of the

glutathione disulphide–glutathione couple (GSSG/2GSH) [52]. Last experimental data provide strong evidence for two major branches of cellular anti-cadmium defense, one via metal-responsive transcription factor 1 (MTF1) and its target genes, notably metallothioneins, the other via glutathione [53].

According to the present data, the concentration of GSH significantly decreased and the protein carbonyl level increased in the Cd-exposed group compared to the control group. Similarly, some authors have shown that chronic exposure to Cd decreases the level of GSH in the liver and the brain of rats [43, 54]. In vivo, administration of Cd to mice decreased levels of hepatic GSH [55]. Pretreatment of these animals with buthionine sulfoximine, an irreversible inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase, sensitized them to the toxic effects of Cd, suggesting that GSH provides a first line of defense against Cd toxicity. This decrease in GSH along with increased LPO is believed to be responsible for tissue injury due to Cd exposure [56]. The protective role of cellular GSH has been described for cadmium toxicity using cultured Chinese Hamster V79 cells [57], rat hepatoma cells (HTC) and primary cultures of rat hepatocytes [58] as well as isolated perfused rat liver preparations [59].

The primary sites of Cd bioaccumulation in mammals are the liver and kidneys [60]. The liver, in particular, constitutes the target organ of both chronic and acute exposure to Cd [61]. In vivo studies of mouse and rat liver have shown that apoptosis plays a primary role in Cd-induced hepatotoxicity [62, 63]. Similar in vitro examinations have also demonstrated that Cd-induced cytotoxicity is associated with apoptotic cell death in several cell lines including the liver [18, 64, 65 and 66], and the antioxidant enzymes, such as GSH, catalase and glutathione peroxidase, can affect inhibition of Fas induced apoptosis in different cell types [67, 68].

Abe et al. [69] demonstrated that the heat shock protein 32 (Hsp32) and metallothionein (MT) genes were highly induced in the liver and kidney of mice injected with CdCl₂, and the Hsp32 mRNA level was augmented in MT- Knock-out Mice. On the contrary, in the testis and lung which were target organs for cadmium carcinogenesis, there was little increase in Hsp32 mRNA after induction by CdCl₂. These results suggest that the metabolically critical organs are highly protected by MT and the HSPs against cadmium. It is possible that organs of weak stress response to cadmium such as the testis and lung may be vulnerable target sites for cadmium toxicity and carcinogenesis.

Acute Cd-induced hepatotoxicity involves two pathways: one for the initial injury produced by direct effects of cadmium and the other for the subsequent injury produced by inflammation. Primary injury appears to be caused by the binding of Cd²⁺ to sulfhydryl groups on critical

molecules in mitochondria [70]. Thiol group inactivation causes oxidative stress, mitochondrial permeability transition and mitochondrial dysfunction. Although cadmium may directly affect hepatocytes, there are compelling reasons to believe that hepatocellular injury is produced *in vivo* as the result of ischemia caused by damage to endothelial cells [70]. Secondary injury from acute cadmium exposure is assumed to originate from the activation of Kupffer cells and a cascade of events involving several types of liver cells and a large number of inflammatory and cytotoxic mediators [71]. Dorta *et al.* [72] have studied mitochondrial function in rat liver and proposed a sequence of events accounting for Cd induced mitochondrial impairment: firstly, an apparent interaction of Cd^{+2} with specific protein thiols in the mitochondrial membrane stimulates the cation's uptake via the Ca^{+2} uniporter, followed by the onset of mitochondrial permeability transition (MPT), both effects dissipating the transmembrane electrical potential ($\Delta\Psi$) and causing uncoupling, followed by an early depression of mitochondrial ATP levels, secondly, the respiratory chain undergoes inhibition, generating ROS which together with iron mobilized by the cation, cause late, gradual mitochondrial membrane LPO.

Although the liver and the kidney are considered the major target organs for Cd [73], recent reports indicate that chronic exposure to low doses of the metal can cause neurobehavioral disturbances both in humans and in animals, even in the absence of hepatic or renal damage [74, 75].

Our results showed that Cd caused a significant decrease in the activities of enzymes SOD and catalase, with concurrent decline in GSH content in rat brain, while enhancing the level of LPO. The results are in accordance with Zaidi and Banu [54]. The brain is highly vulnerable to lipid peroxidation (LPO) because of its high rate of oxygen utilization, an abundant supply of polyunsaturated fatty acids, a deficient antioxidant defense and a high content of transition metals like copper and iron in several regions [76]. In our study, α -tocopherol can counteract the decrease in antioxidant enzymes activities (SOD and CAT) and the increase in oxidative stress that are induced by Cd.

Chronic treatment of mice with cadmium causes LPO and GSH depletion in the brain [77], and, in HT4, a hippocampal cell line, and in rat primary mesencephalic cultures, cadmium was found to disrupt intracellular sulfhydryl homeostasis by a mechanism involving oxidative stress and protein ubiquitination [78]. Cadmium-induced astroglial death was found to be associated with GSH depletion [79]. Glutathione is involved in the disposal of peroxides by brain cells and in the protection against reactive oxygen species [80].

Though Cd cannot directly induce ROS through a Fenton-like reaction, an increasing body of evidence indicates that it can induce oxidative stress and enhance LPO by depletion of GSH and alterations in activities of antioxidant enzymes [81, 17]. The data of Kim *et al.* [7] suggested that the JNK/c-Jun signaling cascade plays a crucial role in Cd-induced neuronal cell apoptosis and provides a molecular linkage between oxidative stress and neuronal apoptosis. Recently, Crouzin *et al.* [82] have reported that a transient treatment of hippocampal neurons with α -tocopherol induced a long-lasting protection against oxidative damage mediated by Fe^{2+} ions.

Our results demonstrate that the administration of α -tocopherol with a significant load induces a reduction of the effect of cadmium in the liver and brain of Wistar rats.

References

- [1] IARC, International agency for research on cancer. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IARC Scientific Publications, Lyon, France, 1993, pp. 119–238.
- [2] Bench G., Corzett M.H., Martinelli R., Balhorn R., Cadmium concentrations in the testes, sperm, and spermatids of mice subjected to long-term cadmium chloride exposure. *Cytometry* 35(1999) 30–36.
- [3] Cai Y., Aoshima K., Katoh T., Teranishi H., Kasuya M., Renal tubular dysfunction in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Toyama, Japan—an eleven-year follow-up study. *J. Epidemiol.* 11(2001) 180–189.
- [4] Horiguchi H., Harada A., Oguma E., Sato M., Homma Y., Kayama F., Fukushima M., Matsushima K., Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163 (2000) 231–239.
- [5] Shimada H., Funakoshi T., Waalkes M.P., Acute, nontoxic cadmium exposure inhibits pancreatic protease activities in the mouse. *Toxicol. Sci.* 53 (2000) 474–480.
- [6] Fahmy M.A., Aly F.A., In vivo and in vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. *J. Appl. Toxicol.* 20 (2000) 231–238.
- [7] Kim S.D., Moon C.K., Eun S.Y., Ryu P.D., Jo S.A., Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328 (2005) 326–334.
- [8] A. Minami, A. Takeda, D. Nishibaba, S. Takefuta, N. Oku, Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Research* 894 (2001) 336–339
- [9] Andersson H., Petersson-Grawe K., Lindqvist E., Luthman J., Oskarsson A., Olson L., Low level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 19 (1997) 105–115.
- [10] Carageorgiou H., Tzotzes V., Pantos C., Mourouzis C., Zarros A., Tsakiris S., 2004. *In vivo* and *in vitro* Effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase (Na^+ , K^+)-ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities: protection by L-cysteine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94 (2004) 112–118.
- [11] H. Carageorgiou, V. Tzotzes, A. Sideris, A. Zarros and S. Tsakiris, Cadmium Effects on Brain Acetylcholinesterase Activity and Antioxidant Status of Adult Rats: Modulation by Zinc, Calcium and L-Cysteine Co-Administration. *Basic & Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97(2005) 320–324.

- [12] Galan A., L. Garcia-Bermejo, A. Troyano, N.E. Vilaboa, C. Fernandez, E. de Blas, P. Aller. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays. *Eur. J. Cell. Biol.* 80(2001) 312-320.
- [13] Watanabe M., K. Henmi, K. Ogawa, T. Suzuki, Cadmium dependent generation of reactive oxygen species and mitochondrial DNA breaks in photosynthetic and non-photosynthetic strains of *Euglena gracilis*, *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 134 (2003) 227-234.
- [14] P. Karihtala and Y. Soini. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115 (2007) 81-103
- [15] M. Waisberg, P. Joseph, B. Hale, D. Beyersmann, Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192 (2003) 95-117.
- [16] Filipic M., Fatur T., M. Vudrag, Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 25 (2006) 1-11
- [17] Bertin G. and D. Averbeck, Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88 (2006) 1549-1559.
- [18] Hart, B. A., Lee, C. H., Shukla, G. S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J. D., Chiu, J-F. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* 133 (1999) 43-58
- [19] W. Dröge, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82 (2002) 47-95
- [20] Burton G.W., K.U. Ingold, Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant, *Ann. NY Acad. Sci.* 570 (1989) 7-22.
- [21] W.A. Pryor, Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Bio.Med.* 28 (2000) 141-164
- [22] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interact* 160 (2006) 1-40.
- [23] Lawrence H. Lash, Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol. Appl. Pharm.* 204 (2005) 329-342
- [24] L. Pari, P. Murugavel, S.L. Sitasawad, K. Sandeep Kumar. Cytoprotective and antioxidant role of diallyl tetrasulfide on cadmium induced renal injury: An in vivo and in vitro study. *Life Sciences* 80 (2007) 650-658
- [25] Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., C. Landriscina, Molecular inhibitory mechanism of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179 (2002) 37-50.
- [26] EL-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH, Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food. Chem. Toxicol.* 42 (2004) 1563-1571.
- [27] Dote E., Dote T., H. Shimizu, Y. Shimbo, M. Fujihara and K. Kono, Acute lethal toxicity, hyperkalemia associated with renal injury and hepatic damage after intravenous administration of cadmium nitrate in rats. *J Occup Health* 49 (2007) 17-24
- [28] Kotsonis FN, Klaassen CD. Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1977; 41(3):667-80.
- [29] Aebi H., Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105 (1984) 121-126.

- [30] Spitz D. R. and Oberley L.W., Measurement of MnSOD and CuZnSOD activity in mammalian tissue homogenates. *Current Protocols in Toxicology* (2001) 7.5.1-7.5.11
- [31] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [32] Akerboom, T.P.M., Sies, H., Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method. Enzymol.* 77 (1981) 373-382.
- [33] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 (1979) 351-358
- [34] Yagi K., A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 1976; 15(2):212-216.
- [35] Yagi K., Assay for blood plasma or serum . *Methods in Enzymol.* 105 (1984) 328-331.
- [36] R-L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A-G Lenz, B-W. Ahn, S. Shaltiel, and Earl R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method. Enzymol.* 186 (1990) 464-478.
- [37] Karmakar R., Bhattacharya R., Chatterjee M. Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *BioMetals* 2000; 13(3):231-9.
- [38] Luchese C., Gilson Zeni, Joao B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira, Francielli W. Santos, Cadmium inhibits δ -aminolevulinatase from rat lung *in vitro*: Interaction with chelating and antioxidant agents. *Chem. Biol. Interact* 165 (2007) 127-137.
- [39] El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., Hamdy, M.A., Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15 (2001) 207-214.
- [40] Eybl, V., Kotyzov'a, D., Bludovsk'a, M., The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol. Lett.* 151 (2004) 79-85.
- [41] Stohs, S.J. and Bagchi, D., Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio. Med.* 18 (1995) 321-336.
- [42] Jorge O. Ossola, Maria L. Tomaro. Heme oxygenase induction by cadmium chloride: evidence for oxidative stress involvement. *Toxicology* 104 (1995) 141-147
- [43] S.K. Tandon, S. Singh, S. Prasad, K. Khandekar, V.K. Dwivedi, M. Chatterjee, N. Mathur, Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol Lett* 145 (2003) 211-217
- [44] Casalino E., Cesare Sblano, Giovanna Calzaretto, Clemente Landriscina. Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione S-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver. *Toxicology* 217 (2006) 240-245
- [45] Zahir A. Shaikh, Khalequz Zaman, Weifeng Tang and Thanhtram Vu. Treatment of chronic cadmium nephrotoxicity by N-acetyl cysteine. *Toxicol. Lett.* 104 (1999) 137-142
- [46] Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J. Cadmium induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague Dawley rats. *Biological Trace Element Research* 53 (1996) 143-147.
- [47] Fotakis G. and John A., Timbrell. Modulation of cadmium chloride toxicity by sulphur amino acids in hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* 2006; 20(5):641-8.

- [48] Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoum, E., Bagchi, M., Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19 (2000) 201–213.
- [49] Beyersmann, D. and Hechtenberg, S., Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharm* 144 (1997) 247–261.
- [50] Tully, B.D., Collins, J.B., Overstreet, J.D., Smith, S.C., Dinse, E.G., Mumtaz, M.M., Chapin, E.R., Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharm* 168 (2000) 79–90.
- [51] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 577–586.
- [52] Jones D.P., J.L. Carlson, V.C. Mody, J.Y. Cai, M.J. Lynn, P. Sternberg, Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Bio. Med.* 28 (2000) 625–635.
- [53] Wimmer U., Ying Wang, Oleg Georgiev and Walter Schaffner. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res.* 2005; 3(18):5715-5727
- [54] Zaidi S.M.K.R and Banu N., Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin.Chim.Act.* 340 (2004) 229-233.
- [55] Singhal RK, Anderson ME, Meister A. Glutathione, a first line of defense against Cd toxicity. *FASEB J.* 1(1987) 220–223.
- [56] J. Xu, Daisuke Maki, Susan R. Stapleton Mediation of Cadmium-Induced Oxidative Damage and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Expression Through Glutathione Depletion. *J Biochem Mol Toxicol* 17 (2003) 67–75
- [57] Ochi, T., Otsuka, F., Takahashi, K., Ohsawa, M., Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese Hamster cells. *Chem. Biol. Interact.* 65 (1988) 1–14.
- [58] Steinebach, O.M., Wolterbeek, H.T., Role of cytosolic copper metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology* 92 (1994) 75–90.
- [59] Strubelt, O., Kremer, J., Tilse, A., Keogh, J., Pentz, R., Younes, M., Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. *J. Toxicol. Environ. Health* 47 (1996) 267–283.
- [60] S. Pillet, Andrew A. Rooney, J-M. Bouquegneau, D. G. Cyr, M. Fournier, Sex-specific effects of neonatal exposures to low levels of cadmium through maternal milk on development and immune functions of juvenile and adult rats. *Toxicology* 209 (2005) 289–301
- [61] S.H. Oh, S. C. Lim, A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212 (2006) 212 – 223
- [62] Habeebu SSM, Liu J, Klaassen CD. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49(1998) 203–209
- [63] Tzirogiannis, K.N., Panoutsopoulos, G.I., Demonakou, M.D., Hereti, R.I., Alexandropoulou, K.N., Basayannis, A.C., Mykoniatis, M.G., Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. *Arch. Toxicol.* 77 (2003) 694–701.
- [64] Li, M., Kondo, T., Zhao, Q.L., Li, F.J., Tanabe, K., Arai, Y., Zhou, Z.C., Kasuya, M., Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39702– 39709.

- [65] Oh, S.H., Lee, B.H., Lim, S.C., Cadmium induces apoptotic cell death in WI38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2 independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1845–1855.
- [66] Kondoh, M., Araragi, S., Sato, K., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Sato, M., Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology* 170 (2002) 111–117.
- [67] Gouaze, V., Andrieu-Abadie, N., Cuvillier, O., Malagarie-Cazenave, S., Frisach, M.F., Mirault, M.E., Levade, T., Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42867–42874
- [68] Devadas, S., Hinshaw, J.A., Zaritskaya, L., Williams, M.S., Fas stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Free Radical Biol. Med.* 35 (2003) 648–661
- [69] T. Abe, O. Yamamoto, S. Gotoh, Y. Yan, N. Todaka, and K. Higashi, Cadmium-Induced mRNA Expression of Hsp32 Is Augmented in Metallothionein-I and -II Knock-out Mice. *Arch Biochem Biophys* 382(2000) 81-8
- [70] Koyu A., A. Gokcimen, F. Ozguner, D. Senal Bayram and A. Kocak. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem* 284 (2006) 81–85
- [71] Rikans LE and Yamano T, Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(2): 110–117
- [72] Daniel J. Dorta, Samara Leite, Katia C. DeMarco, Ieda M.R. Prado, Tiago Rodrigues, Fabio E. Mingatto, Sergio A. Uyemura, Antonio C. Santos, Carlos Curti, A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J. Inorg. Biochem* 97 (2003) 251–257
- [73] Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett* 137 (2003) 65–83.
- [74] Viaene MK, Masschelein R, Leenders J et al. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occup Environ Med* 57 (2000) 19–27.
- [75] Leret ML, Millan JA, Antonio MT. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology* 186 (2003) 125–130.
- [76] Calabrese V., Bates T.E., Stella A.M.G., NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.* 25 (2000) 1315–1341.
- [77] Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Lett* 89 (1996) 65–69.
- [78] Rockwell P, Martinez J, Papa L, Gomes E. Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cell Signal* 16 (2004) 343–353.
- [79] Im J-Y., Sang-Gi Paik, and Pyung-Lim Han, Cadmium-Induced Astroglial Death Proceeds Via Glutathione Depletion. *J Neurosci Res* 83 (2006) 301–308
- [80] R. Dringen, Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62 (2000) 649±671
- [81] Wang, Y., Fang, J., Lenonard, S.S., Murali Krishna Rao, K., Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Bio. Med.* 36 (2004) 1434–1443.
- [82] Crouzin N, de Jesus Ferreira M. C., Cohen-Solal C., Recasens, M.; Vignes, M.; Guiramand, J. α -Tocopherol-mediated long-lasting protection against oxidative damage involves an attenuation of calcium entry through TRP-like channels in cultured hippocampal neurons, *Free Radic. Biol. Med.* (2007), doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.032

Discussion générale

Discussion générale :

Nos études sur les métaux lourds (Pb et Cd) se veulent une contribution à élucider les mécanismes de toxicité. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à examiner l'effet du plomb et du cadmium sur le statut antioxydant chez des rats Wistar, et d'examiner si l'exposition à plus d'un métal lourd pourrait causer un effet additif, synergique ou antagoniste. Les résultats obtenus indiquent que l'exposition des rats Wistar au plomb ou au cadmium a des conséquences importantes sur les paramètres hématologiques et modifie considérablement les différents paramètres du stress oxydant dans les tissus. La co-exposition au plomb et au cadmium ne montre, par contre, pas d'effet additif ou synergique.

In Vitro, les résultats obtenus sur les deux lignées cellulaires, BJAB et Jurkat, montrent que le stress cadmium altère l'homéostasie des métaux de transition biologiquement utiles (fer, zinc, cuivre); il altère les fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines à centres fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs) et il modifie le métabolisme du glutathion. De fait, le cadmium peut conduire à la production d'espèces actives de l'oxygène et avoir par ce biais des conséquences toxiques (peroxydation des lipides, apoptose, lésions de l'ADN, modification oxydatives des protéines).

L'hypothèse mécanistique pouvant expliquer la production d'espèces réactives de l'oxygène par ces métaux lourds est l'induction du stress oxydatif, ce qui réduit le système de défense antioxydant des cellules par l'intermédiaire de déplétion du glutathion, inhibition de sulfhydryl-dépendante des enzymes, interférer avec certains métaux essentiels nécessaires pour l'activité des enzymes antioxydants et d'accroître la sensibilité de cellules à l'attaque oxydatif par l'altération de l'intégrité de la membrane.

Le stress oxydatif induit la formation de dommages oxydatifs de l'ADN dont le plus fréquent est l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine. Parallèlement à l'augmentation de la peroxydation des lipides, l'activité de la plupart des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) est expérimentalement inhibée par l'exposition aux métaux lourds. Une fraction de l'action prooxydante du plomb s'exerce également très certainement par l'intermédiaire de l'accumulation de l'acide aminolévulinique (ALA).

Cette activité pro-oxydante d'ALA a été mise en évidence au niveau des lipides (peroxydation de liposomes riches en cardiolipides), des protéines (oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine), de l'ADN (coupure simple-brin dans l'ADN plasmidique)

et des mitochondries (Hermes-Lima *et al.*, 1991, 1992; Onuki *et al.*, 1994; Oteiza et Bechara, 1993).

L'étude des mécanismes de défense, en l'occurrence les métallothionéines (MTs) et l'hème oxygénase, révèle une très forte induction, par le cadmium, de l'expression de ces protéines. La régulation de la synthèse des MTs se fait essentiellement au niveau de la transcription grâce au facteur de transcription MTF-1. Ce dernier est corrélé positivement avec l'induction de HO-1 et l'expression des ZnT-1. La surproduction de DMT-1 a augmenté fortement la concentration de cadmium intracellulaire.

Une quantité significative de cadmium est associée aux MTs; cela indique que la surexpression des MTs protège contre la toxicité de ce métal et ses interférences avec les fonctions cellulaires. Ainsi, les mécanismes de détoxification sont principalement axés sur deux voies : le glutathion et les métallothionéines à lesquels s'ajoute l'induction de l'hème oxygénase. L'activité piègeur de chaque résidu cystéine des MTs serait plus efficace que le résidu cystéine du GSH dans la protection de l'ADN vis-à-vis de l'attaque par le radical HO° (Abel and de Ruiter 1989). C'est dire que les MTs sont un des antioxydants les plus importants du noyau, ce dernier étant dépourvu d'enzymes antioxydantes de type catalase et SOD. La fonction de piègeur des ERO des MTs ne se limite pas au radical hydroxyle. Certains dommages de l'ADN induits par d'autres types d'ERO (peroxyde d'hydrogène, radical superoxyde etc.) sont aussi inhibées par les MTs (Rossman *et al.* 1992). La complexité et la diversité aussi bien dans les rôles que dans les processus biologiques font de ces petites protéines, les MTs, une famille régulatrice des échanges métalliques. De part leur grande affinité pour les métaux. Elles sont désormais considérées comme des biomarqueurs reflétant les concentrations en métal auxquels sont exposés les organismes.

En revanche, du fait de l'abondance du GSH, ce dernier est, cependant, considéré comme agent réducteur le plus important dans le contrôle du statut redox.

L'homéostasie redox, qui est régulée par des molécules riches en thiols, les métaux et les autres antioxydants, contrôle de nombreuses fonctions biologiques telles que l'activation enzymatique, la synthèse de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, l'activation transcriptionnelle. Ainsi, le ratio GSH/GSSG, contrôle l'activation et la translocation nucléaire du Nrf2, et détermine l'efficacité de la liaison Nrf2 avec ARE (*Antioxidant Response Element*). L'induction de la transcription HO-1 résulte de cette activation redox.

L'expression de l'hème oxygénase était proportionnelle aux doses administrées du cadmium mais au delà de 12h d'exposition, l'expression de la protéine semble être stable. Une augmentation de la fragmentation de l'ADN et de l'activité caspase-3 ont été observées,

et nos résultats indiquent que l'expression HO-1 est modulée par l'état redox des thiols, par la tyrosine kinase et PI3-kinase. L'effet inhibiteur de calphostin C suggère la possibilité que l'induction de l'expression HO-1 par le cadmium pourrait être via la voie PKC avec la participation des voies ERK ½ et JNK.

Par la suite, on a investigué la possibilité d'utiliser l' α -tocopherol comme moyen de protection contre le cadmium, par l'étude de son impact sur les marqueurs du stress oxydant. Les résultats obtenus ont révélé un effet significatif du cadmium sur les paramètres hématologiques (nombre des globules rouges, concentration de l'hémoglobine et taux d'hématocrite), et sur le niveau du glutathion (GSH), la concentration des MDA et des carbonyles. Tous ces effets ont été inversés par l' α -tocopherol.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La prise de conscience des conséquences de la pollution environnementale sur la santé humaine ces dernières années, a relancé l'intérêt de la toxicologie environnementale. Actuellement, les études concernant les risques professionnels et l'évaluation de l'impact des pollutions sur l'état de santé des populations humaines demeurent qualitativement et quantitativement les plus importantes. Il est apparu qu'à long terme la santé des populations humaines dépendaient dans une large mesure de la qualité de leur environnement.

La toxicité au plomb et au cadmium est un problème de santé publique persistant. Disséminés dans l'environnement par les activités humaines, le Pb et le Cd sont deux métaux lourds toxiques qui s'accumulent principalement, après absorption, dans le foie et les reins. Les principales sources d'exposition à ces métaux sont les aliments et le tabac.

Le but général du travail présenté a été d'essayer de progresser dans la compréhension des mécanismes par lesquels le Pb et le Cd induisent des effets délétères et de ceux qui peuvent préserver les cellules animales de cette toxicité.

Nous avons montré que le plomb et le cadmium provoque le stress oxydatif en générant la production d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui réduit le système de défense antioxydant des cellules par l'intermédiaire de déplétion du glutathion, inhibition de sulfhydryl-dépendante des enzymes, interférer avec certains métaux essentiels nécessaires pour l'activité des enzymes antioxydants et d'accroître la sensibilité de cellules à l'attaque oxydatif par l'altération de l'intégrité de la membrane.

Chez les cellules lymphocytaires humaines, le Cd induit un stress oxydant temps et dose dépendant. Il altère l'homéostasie des métaux de transition biologiquement utiles (fer, zinc, cuivre); il altère les fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines à centres fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs) et il modifie le métabolisme du glutathion. De fait, le cadmium peut conduire à la production d'espèces actives de l'oxygène et avoir par ce biais des conséquences toxiques (peroxydation des lipides, apoptose, lésions de l'ADN, modification oxydatives des protéines). Quelque soit l'organisme, il est probable que les processus de toxicité mis en jeu soient similaires.

Les mécanismes étroits inter- relationnels entre les métallothionéines, l'hème oxygénase et l'environnement redox restent à établir.

Mieux comprendre les mécanismes en combinant les approches moléculaires et intégratives pourrait un jour permettre de proposer des molécules thérapeutiques et

préventives pour les personnes exposées. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de toxicité, permettrait une anticipation des effets délétères lors d'une intoxication, ainsi que la mise en place de systèmes curatifs.

Références Bibliographiques

A

- Abel J., and de Ruiter N., (1989). Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicology letters* 47, 191-6.
- Adachi T., Pimentel D. R., Heibeck T., Hou X., Lee Y. J., Jiang B., Ido Y., Cohen R. A., (2004). S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 279:29857-29862
- Aebi H., (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Akerboom T.P.M, Sies H., (1981). Assay of glutathione, glutathionedisulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-382.
- Alkondon M, Costa AC, Radhakrishnan V, Aronstam RS, Albuquerque EX., (1990). Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS Lett.* 261: 124-130
- Altmann L., Sveinsson K., Wiegand H., (1991). Long-term potentiation in rat hippocampal slices is impaired following acute lead perfusion. *Neurosci Lett.* 128: 109-112.
- Andersen Ole and Aaseth Jan (2002). Molecular Mechanisms of *in Vivo* Metal Chelation: Implications for Clinical Treatment of Metal Intoxications. *Environ Health Perspect* 110 suppl 5):887-890.
- Andrews G.K., (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59, 95-104.
- Arrigo André-Patrick (2005). Chaperons moléculaires et repliement des protéines. *Médecine/Sciences* 21 : 619-25
- Arrigo AP., (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 27:936-944.
- ATSDR, (1999). Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- ATSDR, (2007). Toxicological Profile for Lead, US Department of Health and Human, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Washington DC, 582 p
- Audesirk G., (1993). Electrophysiology of lead intoxication: effects on voltage-sensitive ion channels. *Neurotoxicology*, 14: 137-147
- Awad el Karim M.A., Hamed A.S., Elhaimi Y.A., Osman Y. and el Karim M.A., (1986). Effects of exposure to lead among lead-acid battery factory workers in Sudan. *Arch Environ Health*, 41, 4, 261-265.

B

- Baghurst P.A., McMichael A.J., Tong S., Wigg N.R., Vimpani G.V. and Robertson E.F., (1995). Exposure to environmental lead and visual-motor integration at age 7 years: the Port Pirie Cohort Study. *Epidemiology*, 6, 2, 104-109.
- Ballatori N., Hammond C.L., Cunningham J.B., Krance S.M. and Marchan R., (2005). Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC

and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 238-255.

Bannon D.I., Abounader R., Lees P.S. and Bressler J.P., (2003). Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C44-50.

Barouki R., Yannick M., Garlatti M., Radicaux libres, facteurs transcriptionnels et régulation des gènes. In : Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot D., éd Tec & doc, Lavoisier 2005, 549p.

Beattie J.H., Owen H.L., Wallace S.M., Arthur J.R., Kwun I.S., Hawksworth G.M. and Wallace H.M., (2005). Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. *Toxicol Lett* 157, 69-78.

Beaudoux J. L. et Marie-Paule Vasson. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In : Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot D., éd Tec & doc, Lavoisier 2005, 549p.

Beer S. M., Taylor E. R., Brown S. E., Dahm C. C., Costa N. J., Runswick M. J., Murphy M. P., (2004). Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* 279:47939-47951

Bejar R., Yasuda R., Krugers H., Hood K., Mayford M., (2002). Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J. Neurosci.* 22:5719-5726.

Bellinger D., Leviton A., Allred E. and Rabinowitz M., (1994). Pre- and postnatal lead exposure and behavior problems in school-aged children. *Environ Res*, 66(1):12-30.

Bellinger D., Leviton A., Waternaux C., Needleman H. and Rabinowitz M., (1987). Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med*, 316, 17, 1037-1043.

Berglund M., Akesson A., Bjellerup P., Vahter M., (2000). Metal-bone interactions. *Toxicol Lett.* 112-113:219-25.

Bernard A.M., Roels H., Cardenas A. and Lauwerys R., (1990). Assessment of urinary protein 1 and transferrin as early markers of cadmium nephrotoxicity. *Br J Ind Med*, 47(8):559-565.

Bertin G., Averbeck D., (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88:1549-1559

Betta A., (1983). Applicazione sul campo del test di frequenza critica di fusione in esposita piombo seguiti in cieco. *Med Lav*, 74, 1, 73-74.

Bettaiya R., Yallapragada PR, Hall E., Rajanna S. (1996). In vitro effect of lead on Ca 2+ ATPase in synaptic plasma membranes and microsomes of rat cerebral cortex and cerebellum. *Ecotoxicol Environ Safety*, 33: 157-162

Biswas S., Asiya Seema Chida, Irfan Rahman (2006). Redox modifications of protein-thiols: Emerging roles in cell signalling. *Biochemical Pharmacology* 71:551-564

Bloom David A. and Jaiswal Anil K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not

Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element-mediated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278(45):44675-44682.

Bonnefont-Rousselot, D., Thérond P., Delattre J. Radicaux libres et antioxydants. In Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences Flammarion Paris, 2003, pp.59-81

Borges C. R., Geddes T., Watson J. T., Kuhn D. M. (2002). Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation: potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 277:48295-48302

Bravard A., Monique Vacher, Barbara Gouget, Alexandre Coutant, Florence Hillairet de Boisferon, Ste'phanie Marsin, Sylvie Chevillard, and J. Pablo Radicella. (2006). Redox Regulation of Human OGG1 Activity in Response to Cellular Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.*, 26(20):7430-7436

Bressler J., Kim K.A., Chakraborti T., Goldstein G., (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 24:595-600.

Bressler J.P., Olivi L., Cheong J.H., Kim Y. and Bannona D., (2004). Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann NY Acad Sci*, 1012, 142-152.

Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.

Brugere-Picoux J., Silim A., (1991). Le laboratoire d'histologie en pathologie aviaire. Polycopie ENV d'Alfort, 57p.

Bulaj G., Kortemme T., Goldenberg D.P., (1998). Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965-8972.

Busselberg D, Michael D, Platt B., (1994). Pb²⁺ reduces voltage and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-activated calcium channel currents. *Cell Mol Neurobiol*, 14: 711-722

C

Cabiscol E., Levine R. L., (1996). The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4170-4174

Cammarota M., Bernabeu R., Levi De Stein M., Izquierdo I., Medina J.H., (1998). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Eur. J. Neurosci.* 10:2669-2676.

Campara P., D-Andrea F., Micciolo R., Savonitto C., Tansella M. and Zimmermann-Tansella C., (1984). Psychological performance of workers with blood-lead concentration below the current threshold limit value. *Int Arch Occup Environ Health*, 53, 3, 233-246.

Cappiello M., Amodeo P., Mendez B. L., Scaloni A., Vilardo P. G., Cecconi I., Dal Monte M., Banditelli S., Talamo F., Micheli V. Giblin F. J., Corso A. D., Mura U. (2001). Modulation of aldose reductase activity through S-thiolation by physiological thiols. *Chem. Biol. Interact.* 130-132:597-608

Cardenas A., Roels H., Bernard A.M., Barbon R., Buchet J.P., Lauwerys R.R., Rosello J., Ramis I., Mutti A. and Franchini I. (1993). Markers of early renal changes induced by

industrial pollutants. II. Application to workers exposed to lead. *Br J Ind Med*, **50**, 1, 28-36.

Carlberg I., Mannervik B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**, 484-490.

Chandler L.J., G. Sutton, N.R. Dorairaj, D. Norwood, (2001). N-methyl-d aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J. Biol. Chem.* **276**:2627-2636.

Chen H.H., Ma T., Hume A.S., Ho I.K., (1998). Developmental lead exposure alters the distribution of protein kinase C activity in the rat hippocampus. *Biomed. Environ. Sci.* **11**:61-69.

Chia K.S., Ong C.N., Ong H.Y. and Endo G. (1989). Renal tubular function of workers exposed to low levels of cadmium. *Br J Ind Med*, **46**, 165-170.

Chia S.E., Chia K.S., Chia H.P. *et al.*, (1996). Three-year follow-up of serial nerve conduction among lead-exposed workers. *Scand J Work Environ Health*, **22**, 5, 374-380.

Chuang S.M., Wang I.C., Yang J.L., (2000). Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium, *Carcinogenesis* **21**:1423-1432.

Clavreul N., Adachi T., Pimental D. R., Ido Y., Schöneich C., Cohen R. A. (2006). S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells. *FASEB J.* **20**:518-520

Colbran R.J., (2004). Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, *Biochem. J.* **378**:1-16.

Cooper W.C. (1988). Deaths from chronic renal disease in U.S. battery and lead production workers. *Environ Health Perspect*, **78**, 61-63.

Cordova F.M., Rodrigues A.L., Giacomelli M.B., Oliveira C.S., Posser T., Dunkley P.R. (2004). Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.* **998**:65-72.

Cotgreave IA, Gerdes RG. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* **242**:1-9.

Cousins R.J., Liuzzi J.P. and Lichten L.A. (2006) Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*, **281**, 24085-24089.

Cross J. V., Templeton D. J. (2004). Oxidative stress inhibits MEKK1 by site specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem. J.* **381**:675-683

Cuadrado Ana, Lafarga Vanesa, Cheung Peter CF, Dolado Ignacio, Llanos Susana, Cohen Philip and Nebreda Angel R (2007). A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *The EMBO Journal*, **1-12**

Culling C. F. A., Allison R. T. and Barr W. T., (1988). Cellular pathology technique 4^{ème} ed., Butterworths & Co. LTD, 642p.

D

- Dalle-Donne Isabella, Ranieri Rossi, Daniela Giustarini, Roberto Colombo, Aldo Milzani. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology & Medicine* 43:883-898
- David J., (2001). Les proteines de stress. *INRA Prod. Anim.*, 14, 29-40.
- Davies J.M. (1984) - Long-term mortality study of chromate pigment workers who suffered lead-poisoning. *Br J Ind Med*, 41, 170-178.
- Davis J.M., Otto D.A., Weil D.E. and Grant L.D., (1990). The comparative developmental neurotoxicity of lead in humans and animals. *Neurotoxicol Teratol*, 12, 3, 215-229.
- De Kort W.L., Verschoor M.A., Wibowo A.A. and van Hemmen J.J., (1987). Occupational exposure to lead and blood pressure: a study in 105 workers. *Am J Ind Med*, 11, 2, 145-156.
- Deeley Roger G., Cole Susan P.C., (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters* 580:1103-1111
- DeMichele S.J., (1984). Nutrition of lead. *Comp Biochem Physiol A*, 78, 3, 401-408.
- Dickinson DA, Levonen AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM, Forman HJ., (2004). Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med* 37:1152-1159.
- Dietrich K.N., Krafft K.M., Bornschein R.L., Hammond P.B., Berger O., Succop P.A. and Bier M, (1987). Low-level fetal lead exposure effect on neurobehavioral development in early infancy. *Pediatrics* 80, 5, 721-730.
- Dietrich K.N., Succop P.A., Berger O.G., Hammond P.B. and Bornschein R.L., (1991). Lead exposure and the cognitive development of urban preschool children : the Cincinnati Lead Study cohort at age 4 years. *Neurotoxicol Teratol*, 13, 2:203-211.
- Dröge Wulf., (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82:47-95
- Dudek B. and Merez D., (1997). Impairment of psychological functions in children environmentally exposed to lead. *Int J Occup Med Environ Health*, 10, 1:37-46.

E

- Eaton P., Wright N., Hearse D. J., Shattock M. J., (2002). Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34:1549-1560
- Echtay K.S., Esteves T.C., Pakay J.L., Jekabsons M.B., Lambert A.J., Portero-Otín M., Pamplona R., Vidal-Puig A.J., Wang S., Roebuck S.J., Brand M.D., (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22:4103-4110.
- Echtay Karim S., (2007). Mitochondrial uncoupling proteins - What is their physiological role? *Free Radical Biology & Medicine* 43:1351-1371
- Ehlers M.D., (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Neurosci.* 6:231-242

Ehrich M. and Sharova H., (2000). *Current protocols in toxicology*. New York: John Wiley & Sons

Ellman G.L., (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.

England K., Cotter T. G., (2005). Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep.* 10:237–245

Evans M D., Miral Dizdaroglu, Marcus S. Cooke, (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 567 :1–61.

F

Favier A., (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 55(1):9-16.

Favier A., (2003). The oxidative stress: concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *L'actualité chimique* 108-115

Fergusson D.M., Horwood L.J. and Linskey M.T., (1993). Early dentine lead levels and subsequent cognitive and behavioural development. *J Child Psychol Psychiatr.* 30:215-227.

Ferrer I., Blanco R., Carmona M., Puig B., (2001). Phosphorylated mitogenactivated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/ calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies, *J. Neural Transm.* 108:1397–1415.

Filipic M. and Hei K., (2004). Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation Research* 546:81–91

Filomeni G, Rotilio G and Ciriolo MR., (2005). Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death and Differentiation* 12:1555–1563

Finkel T., (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476:52–54;

Flohe, L., Gunzler, W.A., (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114-121.

Flora SJ, Pande M, Kannan GM, Mehta A., (2004). Lead induced oxidative stress and its recovery following co-administration of melatonin or N-acetylcysteine during chelation with succimer in male rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*; 50:OL543-OL551.

Flora SJ, Pande M, Mehta A., (2003). Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Interact* 145:267-280.

Fratelli M., Demol H., Puype M., Casagrande S., Eberini I., Salmona M., Bonetto V., Mengozzi M., Duffieux F., Miclet E., Bachi A., Vandekerckhove J., Gianazza E., Ghezzi P., (2002). Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3505–3510

Friberg L., Norberg C.F. and Vouk V.B., (1986). *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam, Elsevier Publ, 2nd Ed.

Friguls B., Petegnief V., Justicia C., Pallas M., Planas A.M., (2002). Activation of ERK and Akt signaling in focal cerebral ischemia: modulation by TGF-alpha and involvement of NMDA receptor. *Neurobiol. Dis.* 11:443-456.

Fujino Go, Noguchi Takuya, Takeda Kohsuke, Ichijo Hidenori (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signalling. *Seminars in Cancer Biology* 16:427-435

Fulton M., Raab G. and Thomson G., (1987). Influence of blood lead on the ability and attainment of children in Edinburgh. *Lancet* 1, 1221-1226

G

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

Gedik, C.M. and Collins, A. (2005). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.* 19:82-84.

Gennart J.P., Bernard A. and Lauwerys R. (1992). Assessment of thyroid, testes, kidney and autonomic nervous system function in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 64, 1, 49-57.

Gerhardsson L., Chettle D.R., Englyst V., Nordberg G.F., Nyhlin H., Scott M.C., Todd A.C. and Vesterberg O., (1992). Kidney effects in long term exposed lead smelter workers. *Br J Ind Med* 49(3):186-192.

Ghezzi P., Romines B., Fratelli M., Eberini I., Gianazza E., Casagrande S., Laragione T., Mengozzi M., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A., (2002). Protein glutathionylation: coupling and uncoupling of glutathione to protein thiol groups in lymphocytes under oxidative stress and HIV infection. *Mol. Immunol.* 38:773-780

Giaginis C., Elisavet Gatzidou, Stamatios Theocharis, (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 213:282-290

Giovannini M.G., Blitzer R.D., Wong T., Asoma K., Tsokas P., Morrison J.H., Iyengar R., Landau E.M., (2001). Mitogen-activated protein kinase regulates early phosphorylation and delayed expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 21:7053-7062.

Goyer R.A. (1985) - Renal changes associated with lead exposure Dietary and environmental lead: human health effects. Amsterdam, Elsevier Science.

Griffith OW. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27:922-935.

H

Haenninen H., Mantere P. and Hernberg S. (1979) - Subjective symptoms in low-level exposure to lead. *Neurotoxicology*, 1, 333-347.

Haguenoer J.M. and Furon D. (1982) - Toxicologie et hygiène industrielles. Les dérivés minéraux, 2e partie. Paris, Technique et documentation, Tome II.

- Han D., Canali R., Garcia J., Aguilera R., Gallaher T. K., Cadenas E., (2005). Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxyxynitrite: modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry* 44:11986–11996
- Hansen J.M., Young-Mi Go, Dean P. Jones, (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46:215-34
- Hardingham G.E., Bading H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* 26:81– 89.
- Hardingham N., Glazewski S., Pakhotin P., Mizuno K., Chapman P.F., Giese K.P., Fox K., (2003). Neocortical long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity require alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II autophosphorylation. *J. Neurosci.* 23 4428–4436.
- He L., Girijashanker K., Dalton T.P., Reed J., Li H., Soleimani M. and Nebert D.W., (2006). ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol Pharmacol* 70, 171-180.
- Hense H.W., Filipiak B. and Keil U. (1993) - The association of blood lead and blood pressure in population surveys. *Epidemiology*, 4, 2, 173-179.
- Hermes-Lima M, Castilho RF, Valle VGR, Bechara EJH, Vercesi AE. (1992). Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by δ -aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 1, 180: 201-206
- Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJH. (1991). Damage to rat liver mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. *Biochim Biophys Acta* 1056: 57-63
- Himeno S., Yanagiya T., Enomoto S., Kondo Y. and Imura N. (2002) Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J Exp Med* 196, 43-50.
- Hogstedt C., Hane M. and Agrell A. (1983) - Neuropsychological test results and symptoms among workers with well-defined long-term exposure to lead. *Br J Ind Med* 40(1):99-105.
- Holmgren A., C. Johansson, C. Berndt, M.E. Loon, C. Hudemann and C.H. Lillig (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions* 33(6):1375-1377
- Hoppe G., Chai Y. C., Crabb J.W., Sears J., (2004). Protein S-glutathionylation in retinal pigment epithelium converts heat shock protein 70 to an active chaperone. *Exp. Eye Res.* 78:1085–1092
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A., (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268:19675-19680.
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC and Epstein CJ (2001). Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med* 31:1101-1110.
- Hubert, N. and Hentze, M.W., (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 12345-12350.

Hudmon A., Schulman H., (2002). Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 71:473– 510.

Humphries K. M., Juliano C., Taylor S. S., (2002). Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 277:43505–43511

Hung J.J., Cheng T.J., Lai Y.K. and Chang M.D., (1998). Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem* 273:31924-31931.

Hunter T., (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* 50: 823–829

Huynh-Delerme C., Huet H., Noel L., Frigieri A. and Kolf-Clauw M., (2005). Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. *Toxicology In Vitro* 19, 439-447.

I

IARC (1993) - Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, vol. 58, pp. 119-237.58

INERIS (2005) - Cadmium et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Institut National de Recherche et de Sécurité. *INERIS-DRC-01-25590-00DF249.doc*

Irfan Rahman, Saibal K Biswas, Aruna Kode (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology* 533:222–239

Iryo Y., Matsuoka M., Wispriyono B., Sugiura T. and Igisu H., (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1875-1882.

Ishihara K., Alkondon M., Montes JG, Albuquerque EX (1995). Ontogenetically related properties of NMDA receptors in rat hippocampal neurons and the age specific sensitivity of developing neurons to lead. *J Pharmacol Exp Ther* 273:1459-1470

Ito Y., Niiya Y., Otani M., Sarai S. and Shima S. (1987) - Effect of food intake on blood lead concentration in workers occupationally exposed to lead. *Toxicol Lett* 37(2):105-114.

J

Jacob Claus, Knight Iona and Winyard Paul G. (2006). Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol. Chem.* 387:1385–1397

Jakubowski M., Razniewska G., Halatek T. and Trzcinka-Ochocka M. (1992) – Integrated index of occupational exposure to cadmium as a predictor of kidney dysfunction. *Iarc Scientific Publications*, 118, 319-324.

Jarup L., (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant*, 17 Suppl 2, 35-39.

Jiang H., Daniels P. J., and Andrews G. K. (2003). Putative zinc-sensing zinc fingers of metal-response element-binding transcription factor-1 stabilize a metal-dependent chromatin complex on the endogenous metallothionein-I promoter. *The Journal of biological chemistry* 278, 30394-402.

K

Kalluri H.S., Ticku M.K., (2003). Regulation of ERK phosphorylation by ethanol in foetal cortical neurons. *Neurochem. Res.* 28:765-769.

Kang Y. J., (2006). Metallothionein redox cycle and function. *Experimental biology and medicine* 231, 1459-1467.

Karey K. P., and Sirbasku D. A., (1989). Glutaraldehyde fixation increases retention of low molecular weight proteins (growth factors) transferred to nylon membranes for western blot analysis. *Analytical biochemistry* 178, 255-9.

Kim J. and Sharma R.P., (2004). Calcium-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages. *Toxicol Sci*, 81, 518-527.

Kim S.D., Moon C.K., Eun S.Y., Ryu P.D. and Jo S.A., (2005). Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 326-334.

Klatt P. and Lamas S., (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267:4928-4944

Klatt P., Pineda-Molina E., De Lacoba M. G., Padilla C. A., Martinez-Galesteo E., Barcena J. A., Lamas S., (1999). Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.* 13:1481-1490

Koizumi S., Suzuki K., Ogra Y., Yamada H. and Otsuka F., (1999). Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur J Biochem*, 259, 635-642.

Kwak Mi-Kyoung, Wakabayashi Nobunao, Kensler Thomas W., (2004). Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutation Research* 555:133-148

L

Langmade S.J., Ravindra R., Daniels P.J. and Andrews G.K., (2000). The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 275:34803-34809.

Lansdown R., Yule W., Urbanowicz M.A. and Hunter J., (1986). The relationship between blood-lead concentrations, intelligence, attainment and behaviour in a school population: the second London study. *Int Arch Occup Environ Health*, 57, 3, 225-235.

Lauwerys De Robert R., (2007). Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, Elsevier Masson, 1252 pages

Lauwerys R.R. (1998) - Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Paris, Masson, 4nd Ed.

Lauwerys, (1990) - Cadmium. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Paris, Masson, pp. 136-149

Lee Jeong-Sang, Surh Young-Joon (2005). Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters* 224:171-184

Lee JI, Kang J, Stipanuk MH., (2006). Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *Biochem J* 393:181-190.

LeGendre N. M., (1989). Purification of proteins and peptides by SDS-PAGE. In: Matsudaira PT (Ed). A practical Guide to Protein and Peptide Purification for *Microsequencing*. Academic Press, San Diego. pp. 49-69.

Leonard A.S., Lim I.A., Hemsworth D.E., Horne M.C., Hell J.W., (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* 96: 3239- 3244.

Leslie E.M., Deeley R.G. and Cole S.P., (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 216-237.

Leslie E.M., Liu J., Klaassen C.D. and Waalkes M.P., (2006). Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel Ca_v1G in cadmium uptake. *Mol Pharmacol* 69, 629-639.

Levine R.-L., D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.-G. Lenz, B.-W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186:464-478.

Li Huang-Yuan, Wu Si-Ying, Shi Nian (2007). Transcription factor Nrf2 activation by deltamethrin in PC12 cells: Involvement of ROS. *Toxicology Letters* 171:87-98

Lichtlen P., and Schaffner W. (2001). The "metal transcription factor" MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med Wkly* 131, 647-52.

Lindgren K.N., Masten V.L., Ford D.P. and Bleecker M.L. (1996) - Relation of cumulative exposure to inorganic lead and neuropsychological test performance. *Occup Environ Med* 53, 7, 472-477.

Linnane Anthony W., Kios Michael, Vitetta Luis (2007). Coenzyme Q10 – Its role as a prooxidant in the formation of superoxide anion/hydrogen peroxide and the regulation of the metabolome. *Mitochondrion* 7S, S51-S61.

Long G.J., Rosen J.F., Schanne F.A., (1994). Lead activation of protein kinase C from rat brain. Determination of free calcium, lead, and zinc by 19F NMR. *J. Biol. Chem.* 269 834- 837.

Lonze B.E., Ginty D.D., (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605- 623.

Liuzzi Juan P. and Cousins Robert J., (2004). Mammalian Zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* 24:151-72

Lu H., Guizzetti M., Costa L.G., (2002). Inorganic lead activates the mitogen-activated protein kinase kinase-mitogen-activated protein kinase-p90(RSK) signaling pathway in human astrocytoma cells via a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:818-823.

Luchese C., G. Zeni, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, F.W. Santos, (2007). Cadmium inhibits δ -aminolevulinatase dehydratase from rat lung *in vitro*: interaction with chelating and antioxidant agents. *Chem. Biol. Interact.* 165 127-137.

Lushchak V. I., (2007). Free Radical Oxidation of Proteins and Its Relationship with Functional State of Organisms. *Biochemistry (Moscow)* 72(8): 809-827.

Lyn Patrick (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern Med Rev* 11(2):114-127)

M

MAHER P., (2006). Redox Control of Neural Function: Background, Mechanisms, and Significance. *Antioxidants & Redox Signaing* 8 (11 & 12), 1941-1970

Malinow R., Madison D.V., Tsien R.W., (1988). Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* 335:820- 824.

Mallis R. J., Hamann M. J., Zhao W., Zhang T., Hendrich S., Thomas J. A., (2002). Irreversible thiol oxidation in carbonic anhydrase III: protection by S-glutathiolation and detection in aging rats. *Biol. Chem.* 383:649-662

Mantere P., Hanninen H. and Hernberg S. (1982) - Subclinical neurotoxic lead effects: two-year follow-up studies with psychological test methods. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 4, 6, 725-727.

Marklund S. and Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47, 469-74.

Markovac J., Goldstein G.W., (1988). Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 334:71- 73.

Martin P., Farih M., Poggi M.C., Boulukos K.E. and Pognonec P. (2006) Manganese is highly effective in protecting cells from cadmium intoxication. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 294-299.

McKeon T.A., Lyman M.L. (1991). Calcium ion improves electrophoretic transfer of calmodulin and other small proteins. *Anal. Biochem.* 193: 125-130.

McMichael A.J., Baghurst P.A., Wigg N.R., Vimpani G.V., Robertson E.F. and Roberts R.J. (1988) - Port Pirie Cohort Study: environmental exposure to lead and children's abilities at the age of four years. *N Engl J Med*, 319, 8, 468-475.

Mizzen C. A., Cartel N. J., Yu W. H., Fraser P. E., and McLachlan D. R. (1996). Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention. *Journal of biochemical and biophysical methods* 32, 77-83.

Moellering D., McAndrew J., Patel RP., Cornwell T., Lincoln T., Cao X., Messina JL., Forman HJ., Jo H., Darley-Usmar VM. (1998). Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys* 358:74-82.

Mohr S., Hallak H., de Boitte A., Lapetina E. G., Brune B. (1999). Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 274:9427-9430

Montminy M.R., Bilezikjian L.M., (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328:175-178.

Moriarty-Craige SE, Jones DP., (2004). Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* 24:481-509.

Motohashi H and Yamamoto M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10(11):549-57

Mousseau M., Faure H., Hininger I., Bayet-Robert M. and Favier A. (2005). Leucocyte 8 oxo 7, 8 dihydrodeoxyguanosine and comet assay in epuribicin patients. *Free Radic Research* 39: 837-43

Murakami K., Feng G., Chen S.G., (1993). Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264:757-761

Murray K.D., Isackson P.J., Jones E.G., (2003). N-methyl-d-aspartate receptor dependent transcriptional regulation of two calcium/calmodulin- dependent protein kinase type II isoforms in rodent cerebral cortex. *Neuroscience* 122:407-420.

N

Needleman H.L., Gunnoe C., Leviton A., Reed R., Peresie H., Maher C. and Barrett P. (1979) - Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med*, 300, 13, 689-695.

Needleman H.L., Schell A., Bellinger D., Leviton A. and Allred E.N. (1990) - The long term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. *N Engl J Med*, 322, 2, 83-88.

Newton A.C., (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270 28495-28498.

Nielsen A.E., Bohr A. and Penkowa M. (2006). The balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneines. *Biomarker Insights* 2:99-111.

Nihei M.K., Guilarte T.R., (1999). NMDAR-2A subunit protein expression is reduced in the hippocampus of rats exposed to Pb²⁺ during development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6642-49.

Nogueira C.W., Soares F.A., Nascimento P.C., Muller D., Rocha J.B.T. (2003). 2, 3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of d-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology* 184:85-95

Nulton-Persson A. C., Starke D. W., Mielay J. J., Szweda L. I. (2003). Reversible inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status. *Biochemistry* 42:4235-4242

O

Obermuller-Jevic Ute C. and Lester Packer, (2004). Vitamin E In : Encyclopedia of Biological Chemistry, Volume 4, pages 384-388.

Ohana E., Sekler I., Kaisman T., Kahn N., Cove J., Silverman W.F., Amsterdam A. and Hershfinkel M. (2006) Silencing of ZnT-1 expression enhances heavy metal influx and toxicity. *J Mol Med* 84, 753-763.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95:351-358.

Olivi L., Sisk J., Bressler J., (2003). The involvement of lipid activators of protein kinase C in the induction of ZIF268 in PC12 cells exposed to lead, *Neurochem. Res.* 28:65- 71.

Onuki J. Medeiros MHG, Bechara EJH, Di Mascio P. (1994). o-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322DNA in the presence of Fe 2+ ions. *Biochim Biophys Acta*, 1225: 259-263

Oteiza P., Bechara EJH., (1993). γ -Aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. *Arch Biochem Biophys*, 305: 282-287

Owen H. R, Elser M., Cheung E., Gersbach M., Kraus Lee W., Hottiger M. O. (2007). MYBBP1a is a novel repressor of NF-Kb. *J. Mol. Biol.* 366:725-736

P

Palmiter R.D. and Findley S.D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J* 14:639-649.

Pan S., Berk B. C. (2007). Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-(alpha)-induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway. *Circ. Res.* 100:213-219

Papa S., F. Zazzeroni, Can G. Pham, C. Bubici, G. Franzoso, (2004). Linking JNK signalling to NF- κ B: a key to survival. *J. Cell Sci.* 117:5197-5208

Parkinson D.K., Hodgson M.J., Bromet E.J., Dew M.A. and Connell M.M. (1987) - Occupational lead exposure and blood pressure. *Br J Ind Med*, 44, 11, 744-748.

Pasternak G., Becker C.E., Lash A., Bowler R., Estrin W.J. and Law D. (1989) - Cross-sectional neurotoxicology study of lead-exposed cohort. *J Toxicol Clin Toxicol*, 27, 1-2, 37-51.

Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 333:19-39.

Paul S., Nairn A.C., Wang P., Lombroso P.J., (2003). NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signalling. *Nat. Neurosci.* 6 34-42.

Paulusma C.C., Kool M., Bosma P.J., Scheffer G.L., ter Borg F., Scheper R.J., Tytgat G.N., Borst P., Baas F. and Oude Elferink R.P. (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25, 1539-1542.

Pineda-Molina E., Klatt P., Vazquez J., Marina A., Garcia de Lacoba M., Perez-Sala D., Lamas S. (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40:14134-14142

Pollock C.A. and Ibels L.S. (1986) - Lead intoxication in paint removal workers on the Sydney harbour bridge. *Med J Aust*, **145**, 11-12, 635-639.

Potter Belinda M., Feng Linda S., Parasuram Priya, Matskevich Viktor A., Wilson Jed A., Andrews Glen K., and Laity John H. (2005). The Six Zinc Fingers of Metal-responsive Element Binding Transcription Factor-1 Form Stable and Quasi-ordered Structures with Relatively Small Differences in Zinc Affinities. *J. Biol. Chem.* **280**(31):28529-28540

Pounds JG., Long GJ., Rosen JF. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect* **91**: 17-32

Pulido MD, Parrish AR (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.* **533**(1-2):227-41

Q

Qanungo S., Starke D. W., Pai H. V., Mielal J. J., Nieminen A. L. (2007). Glutathione supplementation potentiates hypoxic apoptosis by S-glutathionylation of p65-NFkappa B. *J. Biol. Chem.* **282**:18427-18436

R

Ramesh G.T., S.K. Manna, B.B. Aggarwal, A.L. Jadhav, (2001). Lead exposure activates nuclear factor kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase and caspases in the rat brain, *Toxicol. Lett.* **123**:195-207.

Reddy S., Jones A. D., Cross C. E., Wong P. S., van der Vliet A. (2000). Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *Biochem. J.* **347**:821-827

Reinholz M.M., Bertics P.J., Miletic V., (1999). Chronic exposure to lead acetate affects the development of protein kinase C activity and the distribution of the PKCgamma isozyme in the rat hippocampus. *Neurotoxicology* **20**:609- 617.

Reth Michael (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocytes activation. *Nature Immunology* **3**(12): 1129-1134

Reynaert N. L., van der Vliet A., Guala A. S., McGovern T., Hristova M., Pantano C., Heintz N. H., Heim J., Ho Y. S., Matthews D. E., Wouters E. F., Janssen-Heininger Y. M. (2006). Dynamic redox control of NFkappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:13086-13091

Roels H.A., Lauwerys R.R., Bernard A.M., Buchet J.P., Vos A. and Oversteyns M. (1991). Assessment of the filtration reserve capacity of the kidney in workers exposed to cadmium. *Br J Ind Med* **48**, 6, 365-374

Rossmann T. G., Roy N. K., and Lin W. C. (1992). Is cadmium genotoxic? *IARC scientific publications*, 367-75.

Roux P.P. and Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-344.

S

- Sandhir R., K.D. Gill, (1994) Lead perturbs calmodulin dependent cyclic AMP metabolism in rat central nervous system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33:729– 742.
- Schafer FQ, Buettner GR. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30:1191-1212.
- Schwartz J. (1988) - The relationship between blood lead and blood pressure in the NHANES II survey. *Environ Health Perspect* 78, 15-22.
- Sciarillo W.G., Alexander G. and Farrell K.P. (1992) - Lead exposure and child behavior. *Am J Public Health* 82, 10, 1356-1360.
- Seelig GF, Simonsen RP, Meister A. (1984) Reversible dissociation of gamma-glutamyl cysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem* 259:9345-9347.
- Selevan S.G., Landrigan P.J., Stern F.B. and Jones J.H. (1985) - Mortality of lead smelter workers. *Am J Epidemiol*, 122, 4, 673-683.
- Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S and Marklund SL (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281, 6904-6909.
- Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. (1994) Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* 269:26512-26517.
- Shukla R., Dietrich K.N., Bornschein R.L., Berger O. and Hammond P.B. (1991) - Lead exposure and growth in the early preschool child: a follow-up report from the Cincinnati Lead Study. *Pediatrics*, 88, 5, 886-892.
- Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. (2002). Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. *Arch Toxicol.* 76:437-441.
- Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. (2004). Combined efficacies of lipoic acid and 2,3- dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem.* 15:18-23.
- Stuart, G. W., Searle, P. F., and Palmiter, R. D. (1985). Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* 317, 828-31.
- Souza V., Bucio L. and Gutierrez-Ruiz M.C. (1997) Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 120, 215-220.
- Srisook K., Kim Chaekyun, and Young-Nam Cha (2005). Molecular Mechanisms Involved in Enhancing HO-1 Expression: De-Repression by Heme and Activation by Nrf2, The "One-Two" Punch. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1674–1687
- Staessen J., Yeoman W.B., Fletcher A.E., Markowe H.L., Marmot M.G., Rose G., Semmence A., Shipley M.J. and Bulpitt C.J. (1990) - Blood lead concentration, renal function, and blood pressure in London civil servants. *Br J Ind Med*, 47, 7, 442-447.
- Staessen J.A., Roels H. and Fagard R. (1996) - Lead exposure and conventional and ambulatory blood pressure: a prospective population study. PheeCad Investigators. *J Am Med Assoc*, 275, 20, 1563-1570.

Stankovic Roger K., Roger S. Chungb, Milena Penkowa (2007). Metallothioneins I and II: Neuroprotective significance during CNS pathology. *Int J Biochem Cell Biol* 39(3):484-9

Stokes L., Letz R., Gerr F., Kolczak M., McNeill F.E., Chettle D.R. and Kaye W.E. (1998) - Neurotoxicity in young adults 20 years after childhood exposure to lead: the Bunker Hill experience. *Occup Environ Med*, 55, 8, 507-516.

Stollery B.T., Broadbent D.E., Banks H.A. and Lee W.R. (1991) - Short term prospective study of cognitive functioning in lead workers. *Br J Ind Med*, 48, 11, 739-749.

T

Tallkvist J., Bowlus C.L. and Lonnerdal B. (2001) DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol Lett* 122, 171-177.

Tandon S.K., Singh S., Prasad S., Khandekar K., Dwivedi V.K., Chatterjee M., Mathur N., (2003). Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol. Lett.* 145 211-217.

Taylor E. R., Hurrell F., Shannon R. J., Lin T. S., Hirst J., Murphy M. P. (2003). Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J. Biol. Chem.* 278:19603-19610

Taylor S.S., Yang J., Wu J., Haste N.M., Radzio-Andzelm E., Anand G., (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1697 259- 269.

Thérond P., Bonnefont-Rousselot D., Systèmes antioxydants endogènes. In : Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot D., éd Tec & doc, Lavoisier 2005, 549p.

Thomson G.O., Raab G.M., Hepburn W.S., Hunter R., Fulton M. and Laxen D.P. (1989) - Blood-lead levels and children's behaviour-results from the Edinburgh Lead Study. *J Child Psychol Psychiatry*, 30, 4, 515-528.

Thun M.J., Osorio A.M., Schober S., Hannon W.H., Lewis B. and Halperin W. (1989) - Nephropathy in cadmium workers: assessment of risk from airborne occupational exposure to cadmium. *Br J Ind Med*, 46, 10, 689-697.

Tice RR, Andrews PW, Singh NP. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 53:291-301.

Tomsig J.L., Suszkiw J.B., (1995) Multisite interactions between Pb²⁺ and protein kinase C and its role in norepinephrine release from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 64:2667- 2673.

Tong S., Baghurst P.A., Sawyer M.G., Burns J. and McMichael A.J., (1998). Declining blood lead levels and changes in cognitive function during childhood: the Port Pirie Cohort Study. *J. Am Med Assoc*, 280, 22, 1915-1919.

Toscano Christopher D., Guilarte Toma's R. (2005). Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Research Reviews* 49 (2005) 529 - 554

Toscano C.D, O'Callaghan J.P., Guilarte T.R., (2005). Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II activity and expression are altered in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats, *Brain Res.* 1044(1):51-8

Toscano C.D., Hashemzadeh-Gargari H., McGlothan J.L., Guilarte T.R., (2002). Developmental Pb²⁺-exposure alters NMDAR subtypes and reduces CREB phosphorylation in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 139:217– 226.

Toscano C.D., McGlothan J.L., Guilarte T.R., (2003). Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorylation and binding activity in the developing rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 145:219–228.

Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4.

U

Ujihara H. Albuquerque EX. (1992). Ontogeny of N-méthyl-D-aspartate-induced current in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 859-867 76

Usai C., Barberis A., Moccagatta L. and Marchetti C. (1999) Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *J Neurochem* 72, 2154-2161.

V

Valentine R.A., Jackson K.A., Christie G.R., Mathers J.C., Taylor P.M. and Ford D. (2007). ZnT5 Variant B Is a Bidirectional Zinc Transporter and Mediates Zinc Uptake in Human Intestinal Caco-2 Cells. *J Biol Chem* 282, 14389-14393.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1):1-4

Valko Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin , Milan Mazura, Joshua Telsler. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44–84

Vazquez Adrinel and Sandra Pena de Ortiz. (2004). Lead (Pb²⁺) impairs long-term memory and blocks learning-induced increases in hippocampal protein kinase C activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200:27– 39

Verougstraete V., Bernard A. - Cadmium, Toxicologie - Pathologie Professionnelle, 16-002-B-30, 5 p., *Encycl. Med. Chir.* (Paris, France), Paris, 2001.

Verschoor M., Wibowo A., Herber R., van Hemmen J. and Zielhuis R. (1987) - Influence of occupational low-level lead exposure on renal parameters. *Am J Ind Med*, 12, 4, 341-351.

W

Wagener Frank A. D. T. G., Hans-Dieter V., Dean W., Nader G. Abraham, Miguel P. Soares, Gosse J. Adema, Carl G. Figdor (2003). Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System in Inflammation. *Pharmacol Rev* 55:551–571

Waisberg M., Pius Joseph, Beverley Hale, Detmar Beyersmann (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192:95–117

Wasserman G., Graziano J.H., Factor Litvak P., Popovac D., Morina N., Musabegovic A., Vrenezi N., Capuni Paracka S., Lekic V. and Preteni Redjepi E. (1992) - Independent effects of lead exposure and iron deficiency anemia on developmental outcome at age 2 years. *J Pediatr* 121, 5 Pt 1, 695-703.

Weiss S.T., Munoz A., Stein A., Sparrow D. and Speizer F.E. (1986) - The relationship of blood lead to blood pressure in a longitudinal study of working men. *Am J Epidemiol* 123, 5, 800-808.

Weiss S.T., Munoz A., Stein A., Sparrow D. and Speizer F.E. (1988) - The relationship of blood lead to systolic blood pressure in a longitudinal study of policemen. *Environ Health Perspect* 78, 53-56.

Winneke G., Hrdina K.G. and Brockhaus A. (1982) - Neuropsychological studies in children with elevated tooth-lead concentrations. I. Pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 51, 2, 169-183.

Winneke G., Kramer U., Brockhaus A., Ewers U., Kujanek G., Lechner H. and Janke W. (1983) - Neuropsychological studies in children with elevated tooth-lead concentrations. II. Extended study. *Int Arch Occup Environ Health* 51, 3, 231-252.

Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci.* 30(8):453-61.

Wu T.N., Yang K.C., Wang C.M., Lai J.S., Ko K.N., Chang P.Y. and Liou S.H. (1996) - Lead poisoning caused by contaminated Cordyceps, a Chinese herbal medicine : two case reports. *Sci Total Environ*, 182, 1-3, 193-195.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND, (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* 134:489-492.

X

Xu Shang-Zhi and B. Rajanna. (2006). Glutamic acid reverses Pb²⁺-induced reductions of NMDA receptor subunits in vitro. *NeuroToxicology* 27:169-175

Y

Yanagiya, T., Imura, N., Enomoto, S., Kondo, Y. and Himeno, S. (2000) Suppression of a high affinity transport system for manganese in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 1080-1086.

Yoshida Yasukazu, Saito Yoshiro, Leslie Sargent Jones, and Yasushi Shigeri (2007). Chemical Reactivities and Physical Effects in Comparison between Tocopherols and Tocotrienols: Physiological Significance and Prospects as Antioxidants. *J. Bioscience and Bioengineering* 104(6): 439-445.

Z

Zalups Rudolfs K. and Ahmad Sarfaraz (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186:163-188

Ziegler E.E., Edwards B.B., Jensen R.L., Mahaffey K.R. and Fomon S.J. (1978) - Absorption and retention of lead by infants. *Pediatr Res* 12, 1, 29-34

Zimmermann Tansella C., Campara P., D_Andrea F., Savonitto C. and Tansella M. (1983)
- Psychological and physical complaints of subjects with low exposure to lead. *Hum
Toxicol* 2(4):615-623.

