



Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53

Yves Nzungue

► To cite this version:

Yves Nzungue. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00281577

HAL Id: tel-00281577

<https://theses.hal.science/tel-00281577>

Submitted on 23 May 2008

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Yves NZENGUE

**Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du
cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53**

Thèse soutenue le 15 avril 2008 devant le jury composé de :

Dr. Elisabeth MINTZ

Présidente

Prof. Laurence VIAN

Rapporteur

Prof. Alain BOTTA

Rapporteur

Prof. Alain FAVIER

Membre

Prof. Pascale GUIRAUD

Directeur de thèse

Dr. Walid RACHIDI

Co-Directeur de thèse invité

Remerciements

Au terme de cette recherche, je suis heureux de pouvoir remercier tous ceux et celles qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette aventure ou qui ont croisé ma route et grâce à qui j'ai pu avancer.

Je voudrais tout d'abord remercier mes directeurs, le Professeur Régine STEIMAN et le Docteur Pascale GUIRAUD de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail au sein de leur laboratoire Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xénobiotiques (ORSOX), pour la confiance et le soutien dont elles me gratifient depuis le début de cette thèse. Je tiens également à remercier le Professeur Alain FAVIER et le docteur Thierry DOUKI de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans leur laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (LAN) du CEA de Grenoble et à toutes leurs équipes, avec une mention spéciale au Professeur Alain FAVIER et au Docteur Walid RACHIDI qui ont accepté de co-diriger ma fin de thèse. A toutes et à tous, je veux exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'accueillant dans vos laboratoires respectifs. Je voudrais également souligner leurs disponibilités et leurs patiences dans les situations "de dernières minutes" auxquelles je les ai parfois confronté.

Je voudrais également remercier les Professeurs Alain BOTTA et Laurence VIAN ainsi que le Docteur Elisabeth MINZT pour leur contribution en tant que rapporteurs et membres du comité de thèse.

Enfin merci à ma famille qui a toujours fait bien plus que me soutenir et m'encourager. A mon Père pour tout ce qu'il m'a enseigné, pour la valeur du travail bien fait que j'ai tenté de concrétiser dans cette thèse. A ma Mère qui est presque toujours parvenue à me faire croire que le bonheur de me voir réaliser mes désirs l'emportait sur la peine de l'éloignement.

Merci aux personnes qui m'ont suivi ou que j'ai rencontré dans ce voyage et qui ont contribué à faire de cette aventure une expérience humaine enrichissante ; et qui, au mieux de leur talent, ont contribué à faire de cette thèse ce qu'elle est.

ABREVIATIONS

ABTS : 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulfonate(6)]

AFC : 7-amido-4-trifluoromethyl-coumarin

AIF : Apoptosis inducing Factor

APAF-1 : Apoptosis protein activating factor 1

Bax : BCl₂ associated X protein

BCA : Acide Bicinchoninique

BCl₂ : B cell lymphoma leukemia

BER : Réparation par excision de bases

BET : Bromure d'éthidium

BHT : 3,5-Di-tert-4butylhydroxytoluene

BSA : serum albumine bovine

BSO : L-Buthionine-SR sulfoximine

C6 : Cellules gliales de rat

CAPS : Acide 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonique

CAT : catalase

Cd : Cadmium

Cu : Cuivre

DETC : Diéthylthiocarbamate

DEVD-AFC : Acetyl-Asp-Lime-Valley-Asp-7-amido-4-trifluoromethyl-coumarine

DHR 123 : Dihydrorhodamine 123

DI, DL₂₅ et DL₅₀ : Concentrations de cadmium, de cuivre ou de zinc qui entraînent une mort cellulaire respective de 10%, 25% or 50%.

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DNPH : 2,4-dinitrophénylhydrazine

DTNB : 5-5' dithionitrobenzoic acid

DTPA : Diethylene triamine pentaacetic acid

DTT : Dithiothreitol

EBNA : Epstein-Barr nuclear Antigen

ECL : Enhanced Chemiluminescence

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EMSA : Electrophoretic mobility shift assay

ERCC1/ XPF : Excinuclease hétérodimérique intervenant dans la NER

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FCS : Serum de veau Fœtal

FIENA : Fluorometric immunosorbent enzyme assay

FpG : Formamidopyrimidine DNA glycosylase

GPx : Glutathion peroxydase

GRase : Glutathion reductase

GSH : Glutathion réduit

GSHt : Glutathion total

GSSG : Glutathion oxydé

HaCaT : Lignée kératinocytaire humaine

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonique

LEHD-pNA : N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-pNA (p-nitroanilide)

MDA: malondialdehyde

MOPS : 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

MPG : N-methylpurine-DNA glycosylase

MRE : Metal regulatory element

MTF-1 : Metal-responsive transcription factor 1

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MTs : Métallothionéines

NAC : N-acetyl-L-cysteine

NADPH : Nicotinamide dinucleotide phosphate

NBT : Nitroblue tetrazolium

NER : Réparation par excision de nucléotides

PBS : Phosphate-buffered saline

PCNA : Antigène nucléaire de prolifération

RE : Réticulum endoplasmique

RN : Rouge neutre

R-PMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

TBAR : Réactif d'acide thiobarbiturique

TBE : Tris borate EDTA

TBS-T : Tris-buffered saline contenant du tween 20

TCA : Trichloroacétique

TCR : Récepteur T

TdT : Terminal deoxynucleotidyl transferase

TE : Tris EDTA

TEP : 1,1,3,3-tetraethoxypropane

TFIIH : Transcription Factor II H

TNB ou RNB : Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque

WAF1 : Wild-type p53 activated fragment 1

XPB : Xeroderma pigmentosum B protein

XPC : Xeroderma pigmentosum C protein

XPB : Xeroderma pigmentosum D protein

Zn : Zinc

SOMMAIRE

INTRODUCTION	10
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	12
A-Balance antioxydante	13
I. Les espèces réactives de l'oxygène	13
II. Les systèmes de défenses antioxydantes	14
II-1. Les systèmes antioxydants enzymatiques	15
II-1.1. Les superoxydes dismutases (SODs)	16
II-1.2. La catalase	18
II-1.3. Les peroxydases séléno-dépendantes (figures 4 et 5)	19
II-2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	21
II-2.1. Le glutathion	21
II-2.2. Fonctions antioxydantes du glutathion.....	22
II-2.3. Métallothionéines (MTs).....	23
II-2.3.1. Fixation des métaux sur les MTs.....	24
II-2.3.2. Nomenclature et structure	25
II-2.3.3. Fonctions	27
II-2.3.4. Mécanisme de régulation de l'expression génique des MTs.....	28
II-2.3.5. Description de MTF-1	28
II-2.3.6. Description des MREs.....	30
II-2.3.7. Expression des MTs	31
II-2.3.8. Régulation de p53 et impact sur les métallothionéines	32
III. Stress oxydant et conséquences cellulaires	34
III-1. La peroxydation lipidique	34
III-1.1. Conséquence de la peroxydation lipidique sur la membrane plasmique	35
III-1.2. Formation des adduits de l'ADN induits par le MDA.....	36
III-1.3. Formation des adduits de l'ADN induits par le HNE et le ONE	37
III-1.4. La mutagénèse des dommages	38
III-2. Oxydation des protéines.....	38
III-3. Oxydation des glucides	40
III-4. Les altérations de l'ADN	40
III-4.1. Modification des bases pyrimidiques.....	41
III-4.2. Modification des bases puriques	43
III-4.3. Modification des sucres de l'ADN	45
IV. Implication du stress oxydant dans les pathologies	45

IV-1. Stress oxydant et maladie d'Alzheimer	45
IV-2. Stress oxydant et maladie de Parkinson.....	46
IV-3. Stress oxydant et cancer	46
B- Réparation de l'ADN et apoptose	47
I. Les systèmes de réparation de l'ADN	47
I-1. Réparation par excision de nucléotides (NER).	47
I-2.1. Découverte et historique	47
I-2.2. Mécanismes de la réparation par excision de nucléotides (NER)	48
I-2. La réparation par excision de base (BER)	51
I-1.1. Découverte et historique	51
I-1.2. Mécanismes de la réparation par excision de base	52
I-3. Les autres systèmes de réparation	54
I-4. Implication des systèmes de réparation dans la carcinogenèse	54
II. L'apoptose	56
II-1. Rôle physiologique de l'apoptose.	57
II-2. Apoptose et pathologies	58
II-3. Machinerie apoptotique	59
II-4. p53 normale et ses fonctions	61
II-5. p53 et réponse cellulaire aux dommages de l'ADN	62
C- Les métaux.....	64
I. Cadmium	64
I-1. Influx et efflux de cadmium.....	65
I-2. Mécanismes de toxicité du cadmium	66
I-2.1. Radicaux libres générés par le cadmium	66
I-2.2. Cadmium et signaux intracellulaires de calcium	68
I-2.3. Cadmium et inhibition de la réparation de l'ADN	69
I-3. Maladies induites par le cadmium.....	69
I-3.1. Cancer	69
I-3.2. Toxicité hépatique et rénale.....	71
I-3.3. Toxicité pulmonaire.....	71
I-3.4. Autres maladies	72
II. Cuivre	73
II-1. Influx et efflux de cuivre	73
II-2. Effets toxiques du cuivre et pathologies	74
II-2.1. Maladies héréditaires du métabolisme du cuivre	75
II-2.2. Maladies neurodégénératives et rôle du cuivre	75
III. Zinc	76
III-1. Influx et efflux de zinc	77

III-2. Effets toxiques du zinc	78
III-2.1. Radicaux libres induits par le zinc	78
III-2.2. Autres effets toxiques et pathologiques du zinc	79
IV. Remplacement du zinc par le cadmium et le cuivre	79
OBJECTIFS	82
Présentation des modèles cellulaires utilisés.....	84
<i>Publication I : Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium.....</i>	86
Présentation de l'article I	87
Conclusions de l'article I et perspectives	88
<i>Publication II : DNA damage and antioxidant response in C6 cell line exposed to cadmium.....</i>	89
Présentation de l'article II	90
Conclusions de l'article II et perspectives	119
<i>Etude du stress oxydant induit par le cuivre et le zinc dans les cellules HaCaT et C6 ..</i>	120
Présentation des études A et B	121
A. Stress oxydant induit par le cuivre dans les cellules HaCaT et C6	123
Peroxydation lipidique	128
B. Stress oxydant induit par le zinc dans les cellules HaCaT et C6.....	135
Conclusions des études A et B.....	146
Perspectives de ces premières études.....	147
Etudes complémentaires : évaluation des radicaux libres.....	148
<i>Publication III : Metallothioneins expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium, copper and zinc.....</i>	152
Présentation de l'article III.....	153
Conclusions de l'article III et perspectives.....	184
Etudes complémentaires.....	185
<i>Publication IV : Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines.....</i>	190
Présentation de l'article IV.....	191
Conclusions de l'article IV et perspectives	192
Etudes complémentaires : évaluation de l'apoptose induite par le cuivre et le zinc	193
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	196
Discussion.....	197
Conclusions	206
Perspectives.....	207
BIBLIOGRAPHIE	209

ANNEXES 246

<i>Liste des publications</i>	247
<i>Matériels et méthodes</i>	275
I-Culture cellulaire.....	275
1. Cellules HaCaT	275
2. Cellules C6	275
3. <i>Traitement des cellules aux métaux, au BSO et à la NAC</i>	276
II-Test MTT.....	276
III-Test des comètes.	277
IV-Mort cellulaire	279
1. <i>Fragmentation apoptotique de l'ADN</i>	279
2. <i>Activité de la caspase-3</i>	280
3. <i>Activité de la caspase-9</i>	280
4. <i>Activation de p53</i>	280
5. <i>Inhibition de p53</i>	281
V-Evaluation du MDA	281
VI-Western blot (McKeon and Lyman 1991; Mizzen et al. 1996)	282
1. <i>Mise en évidence de l'expression des métallothionéines</i>	283
2. <i>Expression de p53</i>	284
VII-Gène rapporteur	285
VIII-Immunofluorescence	286
IX-Taux de zinc intracellulaire (Coyle et al. 1994; Zalewski et al. 1993)	286
X-EMSA (electrophoretic mobility shift assay).....	287
1. <i>Extraction du contenu cytoplasmique et nucléaire</i>	287
2. <i>Biotinylation des MREs (metal regulatory elements)</i>	288
3. <i>Hybridation des sondes et efficacité de la biotinylation</i>	288
4. <i>Réaction EMSA</i>	289
XI-Enzymes de stress	291
1. <i>Extraction du contenu cellulaire</i>	291
2. <i>Glutathion peroxydase Sélénium-dépendante (GPx)</i>	291
3. <i>Glutathion réductase (GRase)</i>	292
4. <i>Superoxydes dismutases (SODs)</i>	292
5. <i>Catalase (CAT)</i>	294
XII-Dosage des groupements thiols ; (Bulaj et al. 1998; Ellman 1959)	294
XIII-Glutathion réduit et oxydé.....	295
XIV-Dosage du cadmium, du cuivre et du zinc	296
XV-Evaluation de la production des radicaux libres	297

INTRODUCTION

Les systèmes aérobie sont continuellement soumis à des pressions oxydatives qui conduisent parfois, lors d'un dérèglement de la balance antioxydante, à des dommages oxydatifs impliquant les lipides, les protéines et l'ADN. Ce sont principalement les radicaux libres issus de ces pressions oxydatives qui dégradent les composants cellulaires. Parmi les nombreuses substances à l'origine de la production excessive des espèces oxydantes, figurent les métaux.

Certains sont purement toxiques pour les êtres vivants (cadmium); d'autres, essentiels à l'organisme et à de nombreuses fonctions biologiques, génèrent tout de même des effets toxiques sur l'organisme, passé un certain seuil de concentration (cuivre et zinc). Dans les deux cas, l'accumulation de ces métaux à l'intérieur d'un organisme est susceptible de déclencher une réaction de défense.

Parmi ces métaux de transition se trouvent ceux qui possèdent des capacités d'interaction directe avec l'oxygène (cuivre) ; et ceux qui ont une action indirecte (cadmium et zinc).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un électron non apparié. Ces radicaux libres ont des conséquences biochimiques et cellulaires importantes. En générant des molécules biologiques anormales et en provoquant la surexpression de certains gènes, le stress oxydant potentialise l'apparition de maladies multifactorielles (diabète, Alzheimer, etc.) et est la cause principale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement (cancer, cataracte etc.).

Par ailleurs, les cellules ont développé des systèmes de défenses pour métaboliser les espèces oxydantes et ainsi limiter les dégâts qu'elles provoquent. Ces systèmes antioxydants protègent les constituants cellulaires des agressions radicalaires en interagissant directement avec ces radicaux ou indirectement en produisant des peptides comme les métallothionéines ou le glutathion. Les systèmes de réparation permettent d'éliminer les dommages produits.

Cependant la production massive d'espèces oxydantes et l'inhibition des activités des principales enzymes antioxydantes dans une cellule peuvent favoriser une mort cellulaire excessive ou une évolution tumorale. Les mécanismes biochimiques et moléculaires conduisant au stress oxydant induit par les métaux ; la chronologie d'exposition, l'adaptation des cellules face aux agressions par ces métaux sont mal connus dans certains types cellulaires comme les HaCaT ou discutés pour d'autres comme les C6 ; deux modèles cellulaires qui diffèrent par l'expression des métallothionéines et l'activité de p53.

Nous allons donc, dans un premier temps rappeler l'état des connaissances sur le

cadmium, le cuivre, le zinc, les systèmes de défense enzymatique et non enzymatique comme le glutathion et les métallothionéines ; puis, dans la partie expérimentale, nous allons nous intéresser aux mécanismes d'implication de ces trois métaux dans la genèse d'un stress oxydant, aux conséquences biochimiques et cellulaires ainsi qu'aux mécanismes d'adaptation vis-à-vis de ce stress oxydant. Ainsi, nous allons évaluer les variations des activités des principales enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, glutathion réductase, catalase, superoxyde dismutase à cuivre/zinc ou à manganèse) et la variation du taux de glutathion intracellulaire. Enfin nous allons mesurer l'expression des métallothionéines (MTs), l'activité de liaison du facteur de transcription des MTs appelé MTF-1 ainsi que la nature et le rôle de p53 dans la mort cellulaire induite par le cadmium, le cuivre et le zinc. L'ensemble des résultats nous permettra d'approfondir le rôle de métaux, peu étudiés malgré leur rôle potentiellement non négligeable, dans la genèse d'un stress oxydant.

Etude bibliographique

A-Balance antioxydante

La balance dépend de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'efficacité du système de défense antioxydant.

I. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il a été caractérisé en 1772-1774 par Lavoisier, un chimiste français. L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d'O₂. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{•-}) ou le radical hydroxyle (HO[•]) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂) (Garrel *et al.* 2007; Simonian and Coyle 1996). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H₂O₂ qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{•-}) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O₂^{•-}) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO[•]) ou surtout le radical hydroxyle (HO[•]), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du cuivre cuivreux ou du fer ferreux, le H₂O₂ peut se décomposer en HO⁻ et HO[•] selon la réaction de Fenton. Le radical HO[•] a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (figure 1).

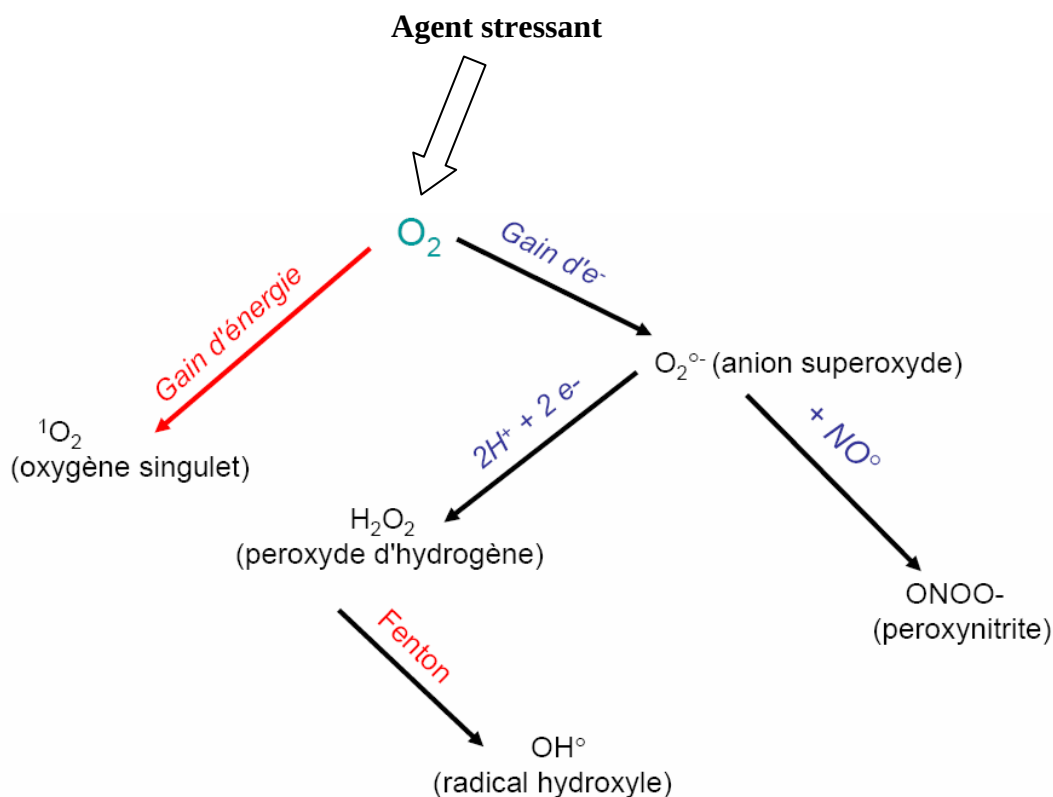


Figure 1 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Thèse de Salem Amara, 2007)

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines.

II. Les systèmes de défenses antioxydantes

Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO (Sies 1997a; Sies 1997b). Ces antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable. Une fois les taux des ERO fortement baissés,

les systèmes enzymatiques interviennent et permettent la réparation.

Il existe 3 types de défenses :

- Les enzymes qui existent à l'état endogène, défendent les cellules contre les radicaux libres. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases (SODs), la catalase (CAT), les peroxydases oxydases et réductases (GPx et GRase) et le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. Dans ce système, nous allons aborder les SODs, la CAT, les GPx et GRase en détail.
- Les protéines chélatrices du fer comme la transferrine et l'hémossidérrine ou du cuivre comme la céruloplasmine et l'albumine. Ce système bloque les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton.
- Les molécules antioxydantes ou piègeurs de radicaux libres comme la vitamine E connue pour son activité antiradicalaire très puissante. Elle intervient au niveau des membranes lipidiques. Comme autres molécules piègeur on peut citer la vitamine C, les caroténoïdes, l'acide urique, le glutathion et les thiols, les métallothionéines. Le glutathion et les métallothionéines vont être abordés en détail.

II-1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes existent à l'état endogène et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases, la catalase et plusieurs formes de peroxydases à glutathion (Garrel *et al.* 2007; Harris and Hochhauser 1992; Harris 1992; Jacob *et al.* 2006; Menon and Goswami 2007; Michiels *et al.* 1994; Schuckelt *et al.* 1991) (figure 2).

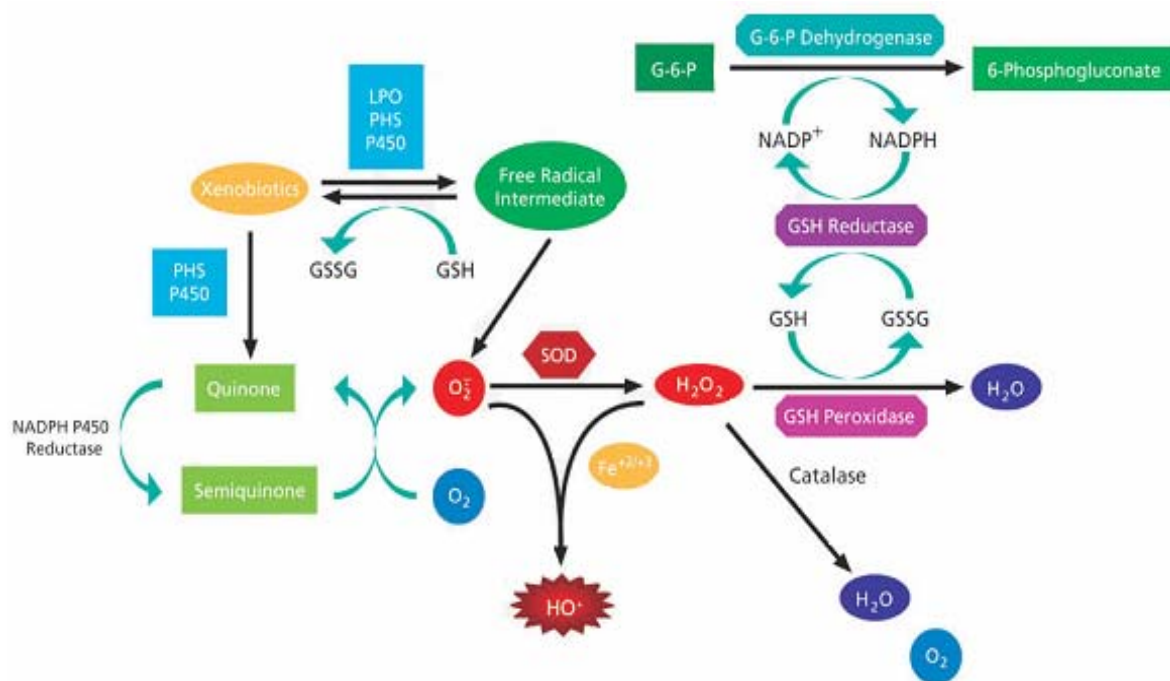


Figure 2 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Thèse d'Olivier Descamps, 2004).

II-1.1. Les superoxydes dismutases (SODs)

Ce sont des métalloenzymes retrouvées dans toutes les cellules animales ou végétales. Leur structure forme un puit hydrophobe au centre de la protéine, puit dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera un type précis. Il existe trois types de SOD (Chandel and Budinger 2007) chez l'homme notamment:

* une SOD cytoplasmique (Crapo *et al.* 1992) possédant une masse molaire apparente d'environ 32 kDa. Elle a été isolée pour la première fois en 1938 à partir du sang de bœuf, d'où sa première dénomination d'hématocupréine. La présence de cuivre et de zinc dans sa structure lui confère une couleur bleu-vert et elle fut considérée comme ayant un rôle dans le stockage de ces métaux. Ce n'est qu'en 1969 que McCord et Fridovich ont mis en évidence sa fonction enzymatique de dismuter les ions superoxydes d'où son nom de superoxyde dismutase. Cette enzyme est formée de deux sous unités contenant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc (Fridovich 1986a, b; Mates and Sanchez-Jimenez 1999; Mates *et al.* 1999). Les ions cuivre sont nécessaires à son activité catalytique alors que les ions zinc

stabilisent la molécule. Elle est sensible à l'inhibition par le cyanure et semble protéger le cytosol. La Cu/Zn-SOD possède aussi une activité superoxyde réductase et une activité superoxyde oxydase (Liochev and Fridovich 2000) (figure 3).

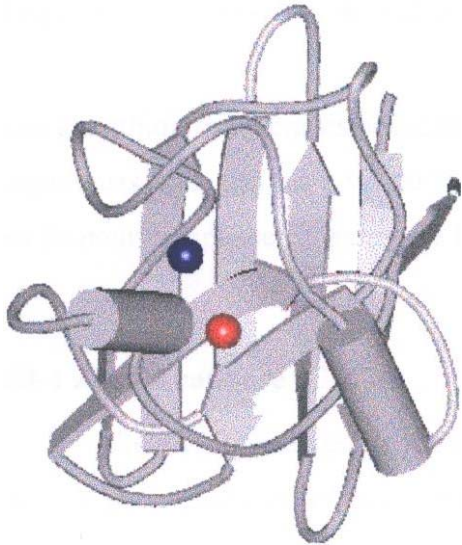


Figure 3 : Représentation schématique de la Cu/Zn SOD. C'est une sous unité de la Cu/Zn SOD contenant un atome de Cu (rouge) nécessaire pour l'activité enzymatique et un atome de Zn (bleu) nécessaire pour la conformation de l'enzyme (Thèse de Walid Rachidi, 2002).

* une SOD située au niveau mitochondrial. Elle est la première SOD à avoir été isolée d'*Escherichia coli*. La superoxyde dismutase humaine est de couleur rose en raison de la présence de manganèse au niveau du site actif de l'enzyme. Celle-ci présente un poids apparent de 80-96 kDa et comporte quatre sous unités contenant chacune un atome de manganèse (Mates and Sanchez-Jimenez 1999; Mates *et al.* 1999) et 196 acides aminés. Elle résiste assez bien à l'inhibition par le cyanure contrairement à la Cu/Zn-SOD. Elle correspond à la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) et c'est l'une des enzymes ayant une activité antioxydante et anti-tumorale la plus efficace (Behrend *et al.* 2003).

* une SOD extracellulaire ou Cu/Zn-SOD extracellulaire qui est immunologiquement différente de l'enzyme cytosolique, et qui est exclusivement synthétisée par certains types cellulaires dont les cellules endothéliales et les fibroblastes (Stralin and Marklund 1994). En collaboration avec la glutathion peroxydase, elle constitue la première ligne de défense contre les oxydants (Rahman *et al.* 2006). Décrite par Marklund en 1982, la SOD extracellulaire est une glycoprotéine tétramérique de masse molaire voisine de 135 kDa dont chaque sous unité de 30 kDa (240 acides aminés) comporte un atome de cuivre et un atome de zinc.

Les différentes SODs catalysent la même réaction avec une efficacité comparable (figure 4). Elles accélèrent la vitesse de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Desideri and Falconi 2003; Garrel *et al.* 2007; McCord and Fridovich 1969; Rahman *et al.* 2006; Weisiger and Fridovich 1973).

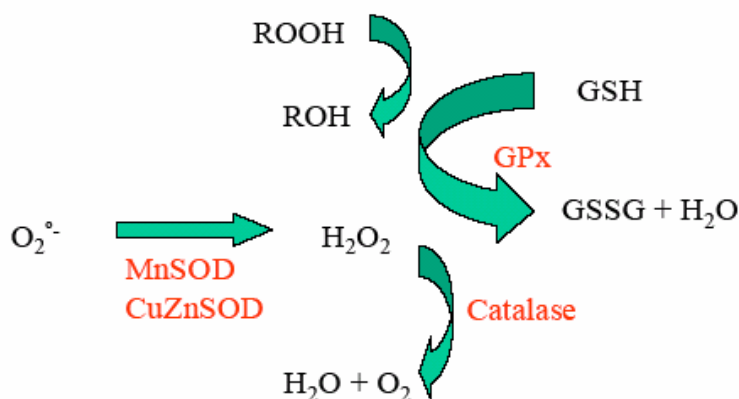


Figure 4 : réaction des enzymes avec les ERO (Thèse d'Olivier Descamps, 2004)

II-1.2. La catalase

Le peroxyde d'hydrogène produit par les SODs doit être rapidement métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase pour que la protection apportée par les SODs soit effective (Michiels *et al.* 1994; Rahman *et al.* 2006), sinon, l'accumulation de H_2O_2 peut être nocive. C'est le cas des patients atteints d'une trisomie 21, qui ont une activité 1,5 fois supérieur à la normale. En effet, la mutation du gène codant pour la Cu/Zn-SOD (gène situé sur le chromosome 21) provoque une accumulation du H_2O_2 , ce qui peut expliquer le vieillissement précoce chez les sujets trisomiques.

La mutation du gène de Cu/Zn SOD peut être à l'origine de la sclérose latérale amyotrophique (SLAF) qui est caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs (Rosen *et al.* 1993).

La catalase est une enzyme héminique présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes. Son nom a été donné par Loew en 1901 à cause de la capacité de cette protéine à décomposer le peroxyde d'hydrogène. La catalase humaine, possédant une taille d'environ 240 kDa (Fridovich 1986a, b), est formée de quatre sous-unités, chacune comportant un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} (Ko *et al.* 2000). Elle catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène (particulièrement dangereux

car il donne facilement naissance à HO° dans un milieu où existent des traces de fer) en eau et en oxygène (figure 4). La catalase et la GPx appartiennent au mécanisme de défense secondaire contre les ERO en catalysant la conversion du H_2O_2 en H_2O (Chance *et al.* 1979).

L'augmentation de tumeur peut être liée à la décroissance du taux de catalase (Mates and Sanchez-Jimenez 1999; Mates *et al.* 1999; Valko *et al.* 2006).

II-1.3. Les peroxydases séléno-dépendantes (figures 4 et 5)

La glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPx) possédant une masse molaire d'environ 85 kDa (Kinnula *et al.* 1995) est formée par quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium sous sa forme sélénocystéine qui constitue le site actif de l'enzyme. L'activité GPx fut découverte par Mills en 1957.

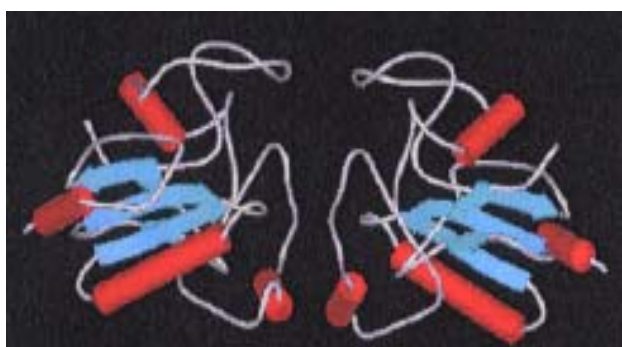
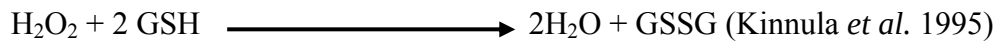


Figure 5 : Représentation tridimensionnel de la GPx (Thèse de d'Eric Jourdan, 2002)

Cette enzyme qui se localise dans la mitochondrie et dans le cytosol (Zachara 1992), décompose les hydroperoxydes organiques et peroxyde d'hydrogène. Elle réduit un grand nombre de ces peroxydes avec des vitesses comparables. L'enzyme possède une grande spécificité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène au cours des réactions de décomposition ; il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG) (figure 6). La GPx est donc en compétition avec la catalase pour le substrat H_2O_2 et est la source majeure de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant (Valko *et al.* 2007; Valko *et al.* 2006).



GPx



GRase



La dernière réaction traduit la réduction de GSSG par la glutathion réductase (Halliwell B 1989). Cette capacité à régénérer le glutathion réduit par la GRase joue un rôle pivot dans le mécanisme antioxydant du glutathion et prévient la déplétion des thiols cellulaires (Chance *et al.* 1979; Hayes and McLellan 1999; Heffner *et al.* 1989).

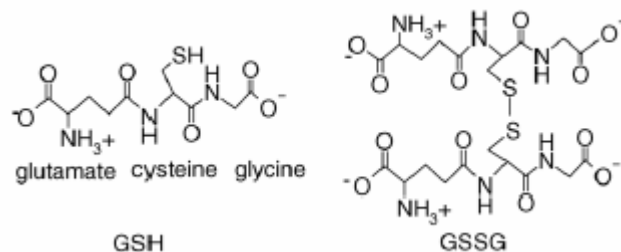


Figure 6 : Structures du glutathion réduit (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG) (Valko *et al.* 2005; Valko *et al.* 2006)

La GPx est présente en quantité variable selon les espèces et les tissus. Chez l'homme, il existe 4 différentes peroxydases séléno-dépendantes (Mates and Sanchez-Jimenez 1999; Mates *et al.* 1999). Son taux intracellulaire est étroitement dépendant de la concentration en sélénium. Elle réduit, en présence de glutathion réduit (GSH), H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH) (Maiorino *et al.* 1991; Oberley and Oberley 1997). L'efficacité de la GPx est liée à un flux constant de GSH et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate source de NADPH qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le glutathion réduit (GSH). Une autre GPx a été caractérisée en 1982 par Ursini *et al.* Il s'agit d'une phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PH-GPx) membranaire. Cette enzyme présente un certain nombre de différences avec la GPx : masse molaire plus faible (monomère de 20 kDa) ; elle est lipophile ; spécificité envers les hydroperoxydes lipidiques notamment les hydroperoxydes phospholipidiques et de cholestérol ; rôle unique contre la peroxydation lipidique (Thomas *et al.* 1990).

II-2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

L'organisme se protège par un ensemble de systèmes antioxydants. Certains composés antioxydants comme les vitamines E, C, l'ubiquinone ou les caroténoïdes apportés par les aliments agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. Des composés endogènes jouent le même rôle, dont le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes. D'autres composés antioxydants ont été identifiés, notamment les métallothionéines.

II-2.1. Le glutathion

Le glutathion, première ligne de défense antiradicalaire, existe en équilibre entre deux formes, l'une réduite (GSH) en abondance dans le milieu intracellulaire, et l'autre oxydée (GSSG) (figures 6 et 7). Le GSH ou γ -glutamyl-cystéinyl-glycine est le plus abondant thiol libre non protéique dans les cellules de mammifères. Sa concentration est comprise entre 0,5 et 10 mM, alors qu'elle oscille entre 0,5 et 10 μ M dans le plasma. La synthèse intracellulaire de cette molécule implique deux réactions enzymatiques ATP dépendantes. C'est la γ -glutamyl-cystéine synthétase (glutamate-cystéine ligase) qui régule la biosynthèse. Le GSH ainsi formé va avoir un effet inhibiteur sur cette enzyme.

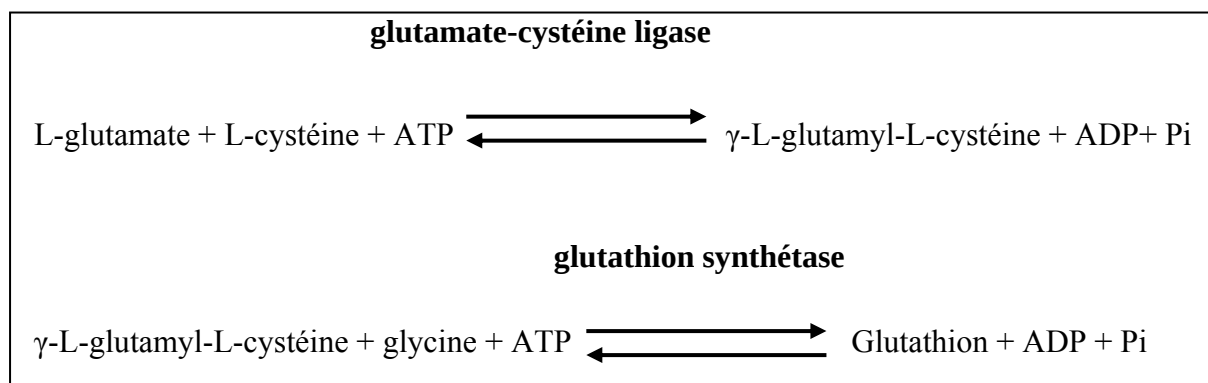


Figure 7 : Synthèse enzymatique du glutathion d'après (Dickinson and Forman 2002)

La liaison γ -glutamyl ainsi que la fonction thiol du GSH lui confèrent un grand nombre de fonctions : le transport des acides aminés, la synthèse de nucléotides de l'ADN par le biais de la ribonucléotide réductase, la synthèse des oestrogènes, des prostaglandines et des leucotriènes, la détoxification des métaux lourds et autres xénobiotiques par action directe ou indirecte. La forme réduite joue un rôle dans la détoxification en réagissant avec H_2O_2 ou ROOH.

De faibles concentrations de cadmium non cytotoxiques augmentent la concentration en GSH selon le type cellulaire (Pathak and Khandelwal 2006). De façon générale, l'augmentation de GSH permet à la cellule de mettre en place des mécanismes de défense alors qu'aux fortes concentrations du toxique, les systèmes anti-oxydants sont submergés et la synthèse diminue. Il a été prouvé que le cadmium pouvait induire la transcription des gènes de la γ -glutamylcystéine synthétase et des glutathion-S-transférases (GST- α et GST- π). La synthèse de GSH en présence de cadmium serait un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires (Hatcher *et al.* 1995; Shukla *et al.* 2000).

II-2.2. Fonctions antioxydantes du glutathion

Le glutathion (GSH) est impliqué dans de nombreux processus métaboliques, parmi lesquels le maintien des communications intercellulaires (Barhoumi *et al.* 1993) et la prévention de l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il piège les espèces réactives de l'oxygène car il réagit notamment avec le radical hydroxyle (Bump and Brown 1990). Il est intéressant de noter que le GSH peut chélater les ions Cu^+ et ainsi limiter leur participation à la génération de radicaux libres par la réaction de Fenton (Hanna and Mason 1992). Dans certaines conditions physiologiques, le GSH protège l'ADN contre 1O_2 (Lafleur *et al.* 1994). L'action concomitante de la superoxyde dismutase (SOD) peut être nécessaire pour éliminer l'anion superoxyde formé par la réaction entre l'anion thiolate, le radical thiyle et l'oxygène. Le GSH est aussi un substrat des glutathions peroxydases sélénodépendantes (GPx). Cette enzyme antioxydante utilise le GSH comme source principale d'hydrogène. La réaction nécessite deux molécules de GSH et produit une molécule de GSSG. Le GSSG formé est soit expulsé soit régénéré dans les conditions physiologiques par le système glutathion réductase/NADPH. Le ratio GSH/GSSG est hautement régulé par le système glutathion réductase. Cependant, si le niveau de stress excède la capacité de la cellule de réduire le GSSG, ou d'autres facteurs limitant la réaction de réduction de GSSG, GSSG

peut s'accumuler (Griffith 1999). Par conséquent, le rapport de GSH/GSSG est un indicateur dynamique du stress oxydant (Al-Mutairi *et al.* 2007).

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. Du fait de son abondance, le GSH est le thiol le plus important dans le contrôle du statut redox (Biswas *et al.* 2006). Dans les cellules non stressées, 99% du glutathion est présent sous sa forme réduite (GSH) ; sous cette forme, le GSH peut être redistribué dans le noyau. Dans les cellules, l'expression génique est influencée par la balance entre pro- et antioxydants (Arrigo 1999). Ainsi, le statut redox contrôle l'activation transcriptionnelle, la translocation nucléaire et la fixation à l'ADN de facteurs de transcription tels que NF-kB, AP-1 et p53 (Arrigo 1999; Biswas *et al.* 2006; Piette *et al.* 1997).

La réaction du H_2O_2 avec le GSH, semble être plutôt lente. Cette réaction passe par l'intermédiaire d'un acide sulfonique (GSOH). La réaction des thiols avec HO° est plus rapide. La chaîne fondamentale des réactions est complexe. Elle commence par la formation d'un radical sulfinyle, qui réagit avec du thiol pour former un acide sulfonique et un radical thiyle (GS°). Ce dernier réagit avec du thiol pour former l'anion radical du glutathion disulfure ($\text{GSSG}^\cdot$), qui va conduire au GSSG (Jacob *et al.* 2006).

II-2.3. Métallothionéines (MTs)

De nombreuses protéines possèdent dans leur structure propre ou fixent sur certains de leurs sites actifs des ions métalliques et sont donc rassemblées, par commodité de langage, sous le terme de métalloprotéines. A l'intérieur de ce groupe de protéines, une distinction est faite entre celles qui possèdent une activité enzymatique (les métalloenzymes) et celles qui n'en possèdent pas. A ces dernières appartiennent les métallothionéines (MTs), qui sont des dérivés métalliques d'une protéine riche en soufre, la thionéine.

Il a été démontré qu'à la suite d'une exposition à des doses sublétales de certains métaux tels que le cadmium, le zinc et le cuivre, il y avait induction de la synthèse de thionéine qui par liaison avec un métal forme la métallothionéine. Les liaisons soufre/métal chez ces protéines sont formées préférentiellement par la coordination tétraédrique d'un ion métallique par les groupements thiols de cystéines régulièrement espacées le long de la

structure primaire de la protéine. Les ions métalliques présents dans la structure de ces protéines représentent plus de 20% de la masse molaire totale. De plus les métallothionéines sont restées les seules protéines capables de fixer du cadmium à l'état natif. La relation étroite qui lie les métaux lourds, et en particulier le Cd, aux MTs a conduit à envisager leur utilisation en tant que biomarqueur d'exposition à ces métaux chez plusieurs espèces (Amiard 1997; Hamza-Chaffai *et al.* 1997; Viarengo *et al.* 1999) incluant l'humain (Ganguly *et al.* 1996; Lu *et al.* 2001) et les mammifères marins (Bourdineaud *et al.* 2006; Das *et al.* 2000).

II-2.3.1. Fixation des métaux sur les MTs

Les métallothionéines fixent le cuivre, le zinc et le cadmium. L'affinité mutuelle des soufres et des métaux de transition fait que la liaison de ces métaux à la MT est thermodynamiquement stable. La forme zinc-MT est la plus prédominante sous conditions physiologiques (Kagi 1991; Kang 2006) mais en présence de cuivre, de cadmium ou des ERO générés, le zinc peut être déplacé (Shaw *et al.* 1991a; Shaw *et al.* 1991b). La libération du zinc s'accompagne de la formation du complexe MT-ponts disulfures (ou thionine ; forme oxydée de la protéine) qui à son tour peut être réduit par le ratio GSH/GSSG pour restaurer la capacité de la protéine à lier le zinc. Ce cycle redox de la MT joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des métaux physiologiques, la détoxification des métaux toxiques et la protection contre le stress oxydant (Feng *et al.* 2006; Kang 2006; Maret 1995, 2000)(figure 8).

Les domaines α et β sont tous les deux impliqués dans la formation de ces ponts. Cependant le domaine α est le plus facilement oxydé (Feng *et al.* 2006).

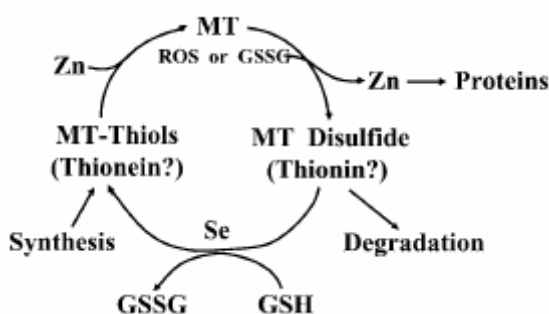


Figure 8 : Représentation schématique du cycle redox de MT (Kang 2006).

Le cadmium et le zinc se fixent selon le schéma suivant : 7 atomes de Cd ou de zinc par molécule de MT. Le complexe formé par chaque métal est tétravalent et stable, chaque atome métallique étant relié à quatre atomes de soufre. La fixation des différents atomes de cadmium ne se fait pas au hasard mais semble se faire de façon préférentielle sur le domaine α (domaine C-terminal). Ce n'est que lorsque ce domaine α est saturé que la fixation se fait sur le domaine β (Duncan *et al.* 2006; Ejnik *et al.* 2002)(figure 9). Cet ordre de fixation est dit coopératif et séquentiel.

Le cuivre se fixe différemment à la protéine. L'interaction entre le cuivre et les MTs est particulière car le cuivre à la différence des deux autres métaux, ne se fixe que sous sa forme de cuivre cuivreux (Cu^+) et jamais, dans les conditions physiologiques, sous la forme d'ion cuivrique (Cu^{2+}). D'autre part, la liaison entre la protéine et les atomes de cuivre ne se fait plus que par une liaison bivalente entre le cuivre et deux atomes de soufre, ce qui permet à 10 atomes de cuivre de se fixer sur la protéine. Nielson *et al.* (1985) ; Nielson et Winge (1983, 1984, 1985) ont été les premiers à proposer un mode de fixation du cuivre : à partir de l'apoprotéine, le cuivre commence par se fixer sur le domaine β avant de se fixer sur le domaine α . Le potentiel d'oxydoréduction du cuivre fait qu'en présence d'oxygène, la liaison entre le cuivre et la protéine s'oxyde et il y a libération du cuivre avec formation de ponts disulfures intracaténaux ou entre deux molécules de MT, ceci par suite de l'oxydation du cuivre Cu^+ en Cu^{2+} .

Les affinités relatives de chaque ion métallique lourd pour la MT diffère. En effet, la constante de stabilité pour le cuivre est 100 fois plus élevée que pour le cadmium et 1000 fois plus élevée que pour le zinc. De façon générale, on utilisera la représentation suivante : $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ (Dabrio *et al.* 2002; Klaassen and Lehman-McKeeman 1989).

II-2.3.2. Nomenclature et structure

Les MTs ne contenant qu'un seul métal possèdent des termes spécifiques tels que cadmium-métallothionéines ou zinc-métallothionéines. L'utilisation d'un indice permet de spécifier le contenu molaire en métal : Zn_7 -métallothionéine ou Cd_7 -métallothionéine. Les MTs peuvent comporter plusieurs métaux et dans ce cas on peut les nommer Cd,Zn -métallothionéine ou Cd,Zn -thionéine et même utiliser un indice pour exprimer la proportion de chaque métal : $\text{Cd}_{5,3},\text{Zn}_{1,7}$ -métallothionéine ou $\text{Cd}_{5,3},\text{Zn}_{1,7}$ -thionéine lorsque la protéine contient 5 ou 3 moles de cadmium et 1 ou 7 moles de zinc par mole de métallothionéine. Quand le contenu exact en métal n'est pas connu, on se limite au terme métallothionéine.

Chez les vertébrés, les tissus contiennent deux isoformes désignées par MT-I et MT-II, en raison de leur différence de temps d'élution par chromatographie d'échange d'ions. Entre ces deux isoformes, seul un acide aminé est différent.

La MT-III est présente dans le cerveau ainsi que dans certains organes du système reproducteur mâle tels que les testicules et l'épididyme (Dufresne and Cyr 1999; Masters *et al.* 1994; Moffatt and Seguin 1998) et diffère de la MT-I par deux insertions, une thréonine après le quatrième acide aminé, et six acides aminés à l'extrémité carboxyterminale (Palmiter *et al.* 1992). Cette MT-III, nommée GIF (neuronal growth inhibitory factor), est particulière. La GIF est une protéine non inductible (Palmiter *et al.* 1992), dont les fonctions physiologiques sont différentes des autres MTs. En effet, des expériences *in vivo* sur des souris surexprimant la GIF ont montré que ces animaux transgéniques mourraient en raison d'une atrophie pancréatique (Quaife *et al.* 1994). La MT-IV comporte un glutamate après la position quatre et n'est exprimée que dans les épithéliums squameux différenciés (Quaife *et al.* 1994).

Les MTs, chez les mammifères, sont formées d'une seule chaîne polypeptidique de 61 acides aminés comportant à son extrémité aminoterminal un résidu N-acétylméthionine et un résidu alanine à son extrémité carboxyterminale. Les cystéines sont disposées en motifs polypeptidiques hautement conservés au cours de l'évolution, soit Cys-Cys soit Cys-X-Cys. Ces motifs sont régulièrement distribués au long de la séquence polypeptidique de la protéine.

Des études d'échange d'ions entre Zn_7 -MT et une Cd_7 -MT ont montré une redistribution de ces métaux entre les deux types de MT pour former 2 MTs mixtes, cela étant dû à la fixation préférentielle du cadmium sur le domaine α et du zinc sur le domaine β . Cette réaction d'échange d'ions démontre que la liaison des métaux aux MTs est réversible et rapide.

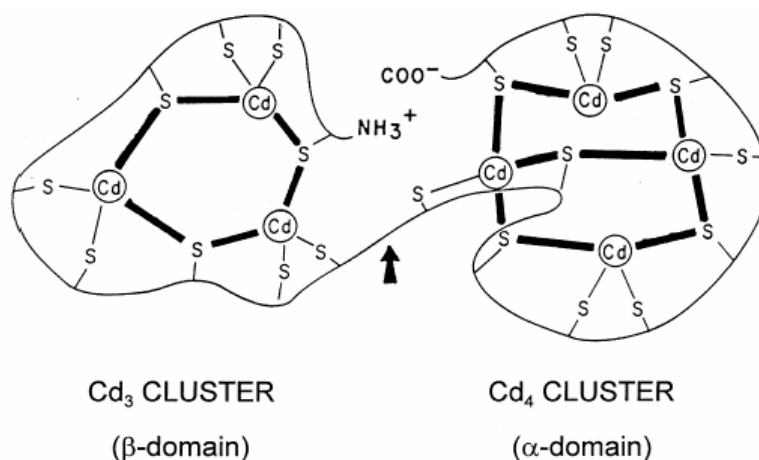


Figure 9 : Représentation schématique des clusters Cadmium des MTs indiquant les liaisons de coordination entre les différents atomes métalliques et les cystéines (Ejnik *et al.* 2003; Klaassen *et al.* 1999).

II-2.3.3. Fonctions

Le rôle précis des MTs dans les différents types cellulaires au sein desquels elles ont été identifiées est encore largement méconnu et sujet à controverse. Les MTs sont une famille de petites protéines (6 kDa) qui connaît un essor particulier ces dernières années en science de la vie pour leur rôle important contre les métaux lourds (Hamer 1986; Kagi and Schaffer 1988) tels que le cadmium dont la toxicité est réduite par sa séquestration. Une quantité significative de cadmium est associée aux MTs du cytosol (MT soluble); cela indique que la surexpression des MTs protège contre la toxicité de ce métal et ses interférences avec les fonctions cellulaires (Beattie *et al.* 2005).

D'une manière générale, les fonctions physiologiques des MTs sont en relation avec leur affinité pour les cations essentiels et tout particulièrement le cuivre, dont la toxicité est réduite par les MTs (Ogra *et al.* 2006), et le zinc; ainsi qu'avec leur caractère antioxydant. Les MTs apparaissent donc comme d'importants régulateurs de l'homéostasie des cations essentiels et du maintien du potentiel d'oxydo-réduction de la cellule (Cherian *et al.* 1993; Miles *et al.* 2000; Moffatt and Denizeau 1997; Ogra *et al.* 2006; Palmiter 1998; Suzuki *et al.* 1993) et peuvent aussi protéger les cellules contre les ERO notamment les radicaux hydroxyle et superoxyde (McAleer and Tuan 2001a, b). Leur activité de piègeur de HO° a été identifiée par (Thornalley and Vasak 1985).

L'activité piègeur de chaque résidu cystéine des MTs serait 38,5 fois 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). Ce qui montre qu'il existe un pool nucléaire de MT. 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).

II-2.3.4. Mécanisme de régulation de l'expression génique des MTs.

La régulation de l'expression des gènes de MT-I et MT-II a fait l'objet de nombreuses recherches résumées dans plusieurs publications d'importance (Andrews 1990, 2000; Ghoshal *et al.* 2000; Miles *et al.* 2000; Moilanen *et al.* 1999; Otsuka 2001; Samson and Gedamu 1998). L'expression de ces 2 isoformes est régulée par les métaux, les glucocorticoïdes, certaines hormones et plusieurs facteurs de stress, notamment inflammatoires, telles que certaines interleukines. La régulation de la synthèse se fait essentiellement au niveau de la transcription grâce au facteur de transcription (MTF-1 ; figures 10A et 10B) et à son site de fixation spécifique (MRE). Elle peut également se faire au niveau de p53 (Friedline *et al.* 1998; Jin *et al.* 2000) et du glutathion (Kang 2006). Certains processus de régulation post-transcriptionnels ont été mis en évidence (Sadhu and Gedamu 1989; Vasconcelos *et al.* 1996).

II-2.3.5. Description de MTF-1

Chez l'homme, les gènes codant pour les MTs sont situés sur le chromosome 16 et l'expression de ces gènes peut être régulée par les métaux via des facteurs de transcription spécifiques, les MTFs (facteurs de transcription des métaux). Des travaux de différentes équipes ont montré la liaison des MTFs tels que MTF-1 au MREs (Heuchel *et al.* 1994). MTF-1 (Metal Transcription Factor 1) est largement documenté (Otsuka 2001; Westin and Schaffner 1988), fait parti de la famille des doigts de zinc (Heuchel *et al.* 1994; Radtke *et al.* 1993; Westin and Schaffner 1988) et est le seul facteur de transcription conservé des insectes à l'homme (Lichtlen and Schaffner 2001; Lichtlen *et al.* 2001). Ce facteur apparaît comme le seul facteur de transcription indispensable pour l'expression basale et induite des MTs (Jiang *et al.* 2003; Palmiter 1994; Saydam *et al.* 2003)(figures 10A et 10B).

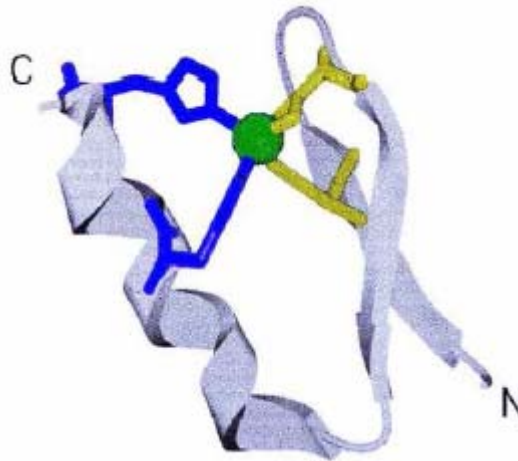


Figure 10A : Structure tridimensionnelle d'une portion de MTF-1 mettant en évidence le doigt de zinc composé de deux cystéines (en jaune) et deux histidines (en bleu) formant une coordination tétraédrique avec le Zn^{2+} (Giedroc et al. 2001)

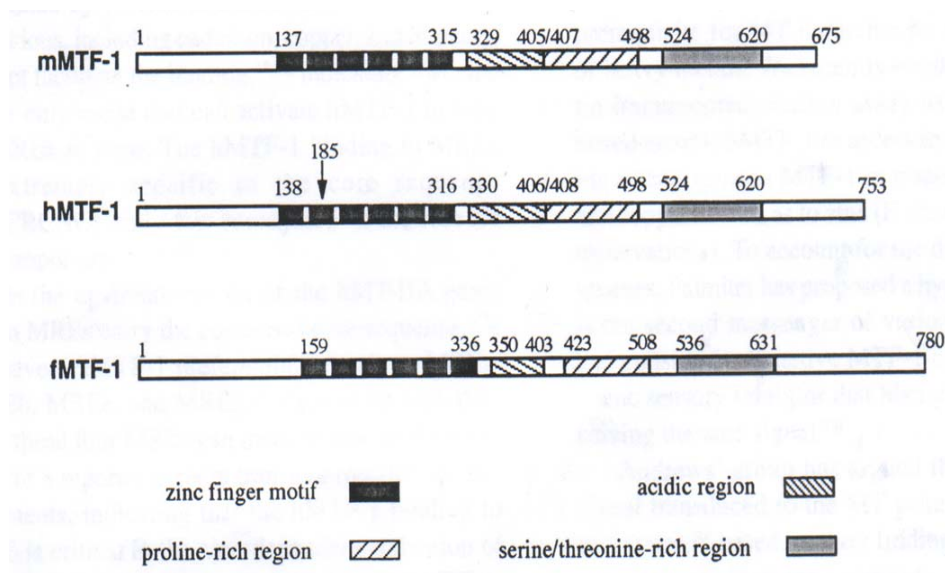


Figure 10B : Représentation schématique de hMTF-1, mMTF-1 et fMTF-1 (Otsuka 2001). Les régions doigts de zinc, acides, riches en prolines, et riches en sérine/thréonines sont indiquées par des boîtes et le nombre d'acides aminés. La position de l'histidine convertie en tyrosine conduit à la hMTF-1b (Otsuka et al. 2000)

Les six motifs doigts de zinc de MTF-1 (figure 10B) hautement conservés permettent la liaison à l'ADN et fonctionnent aussi comme senseur de zinc (Laity *et al.* 2000a; Laity *et al.* 2000b; Li *et al.* 2006). Le domaine N-terminale de MTF-1 (contenant six motifs doigts de zinc) est dépendant du zinc pour sa liaison effective à l'ADN (Chen *et al.* 1999; Koizumi *et al.* 2000; Otsuka *et al.* 2000; Radtke *et al.* 1993). Il semble que les motifs doigts de zinc 2 à 4 constituent le domaine principal de liaison à l'ADN (Bittel *et al.* 2000) ; cependant les motifs 5 et 6 permettent la stabilisation de la liaison MTF-1/ADN (Bittel *et al.* 2000; Daniels *et al.*

2002). Le motif doigts de zinc 1 constitue le seul domaine « senseur » de métaux, tel que le métal zinc en coopération avec la région transactivatrice (Bittel *et al.* 2000). La région C-terminale ou région transactivatrice de MTF-1 (région contenant les domaines acides, les domaines riches en prolines et les domaines riches en sérine/thréonine) serait continuellement exprimée indépendamment d'une induction métallique. Cette région peut cependant entraîner l'activation et la fixation métal-dépendante de la région N-terminale à l'ADN dans certaines conditions (Radtke *et al.* 1995). Cela indique que l'activité de MTF-1 résulte d'un jeu complexe et interne des différents domaines. De plus, une phosphorylation est nécessaire pour son activation et l'expression des gènes de MTs qui en résulte fait suite à une cascade de signaux de transduction régulés par des kinases (Larochelle *et al.* 2001).

II-2.3.6. Description des MREs

Les gènes codant pour les MTs se composent de trois parties dans lesquelles trois exons sont séparés par deux introns situés au niveau de régions hautement conservées. Les sites de régulation inductibles sont nombreux au niveau du promoteur des MTs. Parmi ces sites nous avons le site de réponse aux métaux (MREs), aux glucocorticoïdes (GREs), aux antioxydants (AREs), à l'interféron (IREs). Les MREs sont les seuls sites de régulation communs aux vertébrés et aux invertébrés, les autres sites sont spécifiques d'un gène ou d'une espèce. La séquence cible ou site de fixation de MTF-1 est connue sous le nom de MRE (metal-responsive element). Il existe plusieurs types de MRE et selon que MTF-1 se fixe sur un de ces types, la métallothionéine résultante est différente. Parmi les séquences MREs répertoriées, on a les MREa, MREe et les MREg (séquences dépendantes du zinc) sur lesquelles la MTF-1 humaine (hMTF1) se fixe préférentiellement (Culotta and Hamer 1989; Koizumi *et al.* 1999; Otsuka 2001; Stuart *et al.* 1985). Ces séquences (figure 11) sont les plus étudiées et sont situées en amont du gène codant pour la métallothionéine IIA humaine (hMT-IIA) (Otsuka 2001). La MT-IIA possède des capacités de chélation des métaux et peut également jouer un rôle dans la régulation de l'expression d'autres gènes antioxydants important en réponse au stress oxydant (Hawse *et al.* 2006).

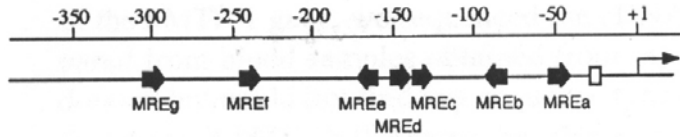


Figure 11 : MREs en amont du gène codant pour la métallothionéine IIA humaine (Culotta and Hamer 1989; Otsuka 2001; Stuart et al. 1985)

II-2.3.7. Expression des MTs

En absence de Zinc, MTF-1 est complexé à un inhibiteur nommé MTI (Metallothionein Transcription Inhibitor) (Maret 1994). La liaison du cadmium avec les molécules contenant du zinc provoque un déplacement de ce Zn, ce qui a pour effet d'augmenter les taux de Zn^{2+} libre. Le Zn^{2+} ainsi libéré va pouvoir se lier à MTF-1 et permettre la dissociation de MTI d'avec MTF-1. La liaison Zn - MTF-1 va induire la translocation de ce complexe dans le noyau (Saydam et al. 2003) où il va pouvoir se lier à sa séquence cible MRE (Metal Responsive Element) du promoteur des gènes de MTs et induire leur transcription (Saydam et al. 2002; Wimmer et al. 2005)(figures 12 et 13).

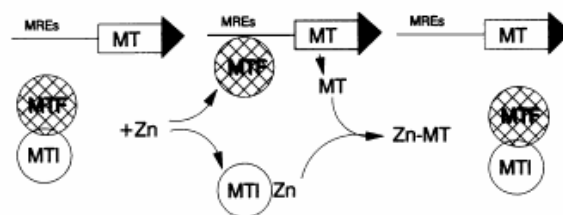


Figure 12 : Synthèse générale des MTs et régulation par MTI et zinc (Maret 1995).

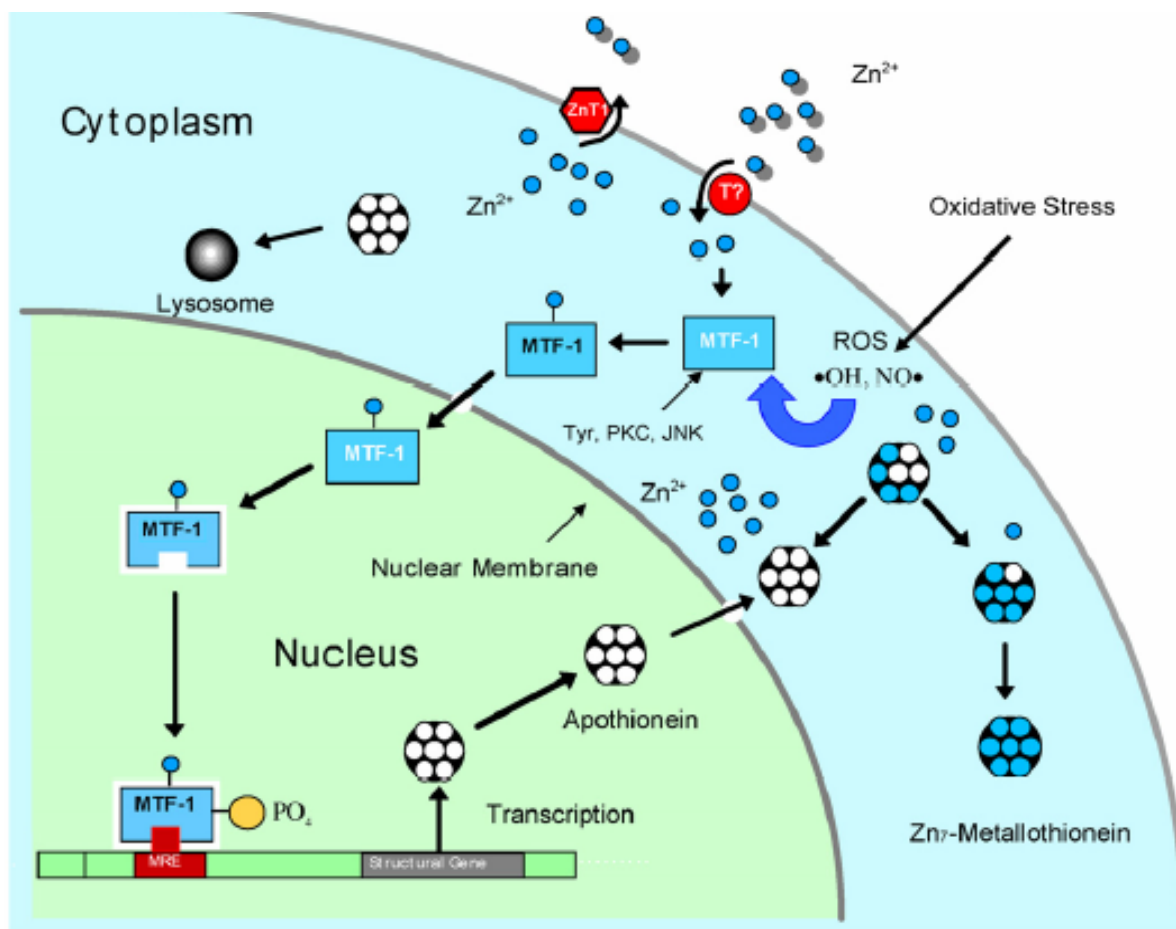


Figure 13 : Régulation de l'expression du gène de métallothionéine par le zinc et le stress oxydant (Stankovic et al. 2007; Valko et al. 2005).

II-2.3.8. Régulation de p53 et impact sur les métallothionéines

Récemment, une relation entre l'expression de la protéine p53 et celle des métallothionéines a été identifiée (Joseph *et al.* 2001). Ces deux types de protéines sont impliqués dans la résistance au stress oxydant induit par les métaux. En effet, il a été démontré que la liaison au zinc de la protéine p53 est nécessaire pour sa stabilité et sa liaison à l'ADN (Hainaut and Milner 1993a, b). D'autre part, les métallothionéines (MTs) sont impliquées non seulement dans le maintien de l'homéostasie du zinc mais aussi dans la protection des cellules contre les radicaux libres (Fan and Cherian 2002).

Les métallothionéines sont retrouvées dans le cytoplasme et dans le noyau cellulaire ; et ce sont les MTs du noyau qui jouent le rôle de donneur de zinc aux facteurs de transcription pour la synthèse de l'ADN, la régulation de l'expression des gènes et la protection de l'ADN contre les dommages et l'apoptose (Cherian and Apostolova 2000; Klaassen *et al.* 2003; Lazo

et al. 1998). La protéine p53 cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en réponse au stress (Schwartz 1998) et l'augmentation des métallothionéines dans le noyau se produit pendant cette phase G1 (G1/S). Chez l'organisme adulte, les MTs sont essentiellement cytoplasmiques et la translocation vers le noyau se fait sous certaines conditions telles la prolifération et la différenciation cellulaire (Cherian *et al.* 2003). Le zinc libéré par les métallothionéines nucléaires est également connu pour inhiber à la fois la caspase-3 (Perry *et al.* 1997) et les endonucléases Ca/Mg-dépendantes (Cohen and Duke 1984), qui jouent des rôles importants dans l'exécution de l'apoptose. Par ailleurs, Friedline *et al.* (1998) d'une part, Jin *et al.* (2000) d'autre part, ont montré que l'expression des MTs est fortement augmentée lorsque les protéines p53 sont mutées. Certains auteurs ont, en effet, suggéré que les MTs pourraient réguler l'activité de liaison de p53 à l'ADN par l'intermédiaire d'une réaction de transfert de zinc (Meplan *et al.* 2000). Les ions zinc sont essentiels pour le maintien de la conformation, de la stabilité, de l'affinité pour l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 (Meplan *et al.* 2000a, b; Rainwater *et al.* 1995). Toutefois, le transfert de zinc peut se produire entre les MTs et p53 inactif. En effet, l'apoMT (forme dépourvue de métaux), avec ses 20 groupements thiols peut arracher le zinc de p53 (Hainaut and Milner 1993b; Jacob *et al.* 1998). Ostrakhovitch *et al.* (2006), en utilisant les cellules épithéliales du cancer du sein, ont montré une interaction entre l'apoMT et p53 muté. Cette interaction se traduit par une augmentation des MTs dans les cellules à l'état basal.

L'augmentation des MTs pourrait également passer par une activation de son promoteur. En effet, l'absence ou la mutation de p53 pourrait conduire à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de TFII sur le promoteur des MTs ainsi qu'une retension de la protéine p27 qui est un régulateur positif des MTs (Motti *et al.* 2004; Ostrakhovitch *et al.* 2007; Shin *et al.* 2005; Singh *et al.* 2002). Ces mêmes auteurs ont observé, en utilisant des vecteurs de p53 dans des souris knock-out, une diminution de TFII et un relargage de p27 et une diminution de la teneur en MTs.

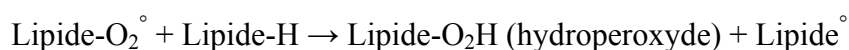
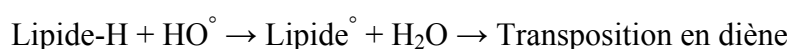
Ces observations montrent que les mécanismes impliqués dans l'augmentation du taux des MTs en absence de p53 sont toujours discutés.

III. Stress oxydant et conséquences cellulaires

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (Pincemail 2003). La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme (Sies 1991). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Curtin *et al.* 2002; Gutteridge 1992).

III-1. La peroxydation lipidique

Les ERO peuvent oxyder les lipides. Les métaux comme le cuivre et le fer ont été largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène par $\text{HO}^\bullet$ ou $\text{O}_2^\bullet$ à des esters d'acides gras insaturés isolés ou constituants des membranes lipidiques (Ercal *et al.* 2001; Tweeddale *et al.* 2007). Le radical carboné du constituant lipidique tend alors à se stabiliser par un réarrangement conduisant au diène conjugué. Celui-ci réagit avec l'oxygène moléculaire et forme un radical peroxy, lui-même susceptible d'arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras. Un nouveau radical lipidique est ainsi généré, maintenant la réaction en chaîne. Il se produit ainsi des hydroperoxydes de lipides.



Les hydroperoxydes lipidiques sont peu stables dans les conditions physiologiques et de nombreux composés (métaux de transition, leurs complexes et des molécules telles que les hémoprotéines...) catalysent leur décomposition (Esterbauer *et al.* 1991a; Esterbauer *et al.* 1991b; Marnett 1999a, b). Un des principaux produits de dégradation est le malondialdéhyde (MDA) (Figure 14) qui altère la fluidité et la fonction des membranes, dont la composition en acides gras insaturés module l'oxydabilité (Chen *et al.* 1994). Ce produit est détecté par

l'acide thiobarbiturique (formation de thiobarbituric acid reactants ou TBARS) (Bremner 1998).

On attribue par ailleurs aux peroxydes lipidiques un rôle toxique par réaction avec les thiols ou amines des protéines cellulaires et un rôle mutagène (Valenzuela 1991).

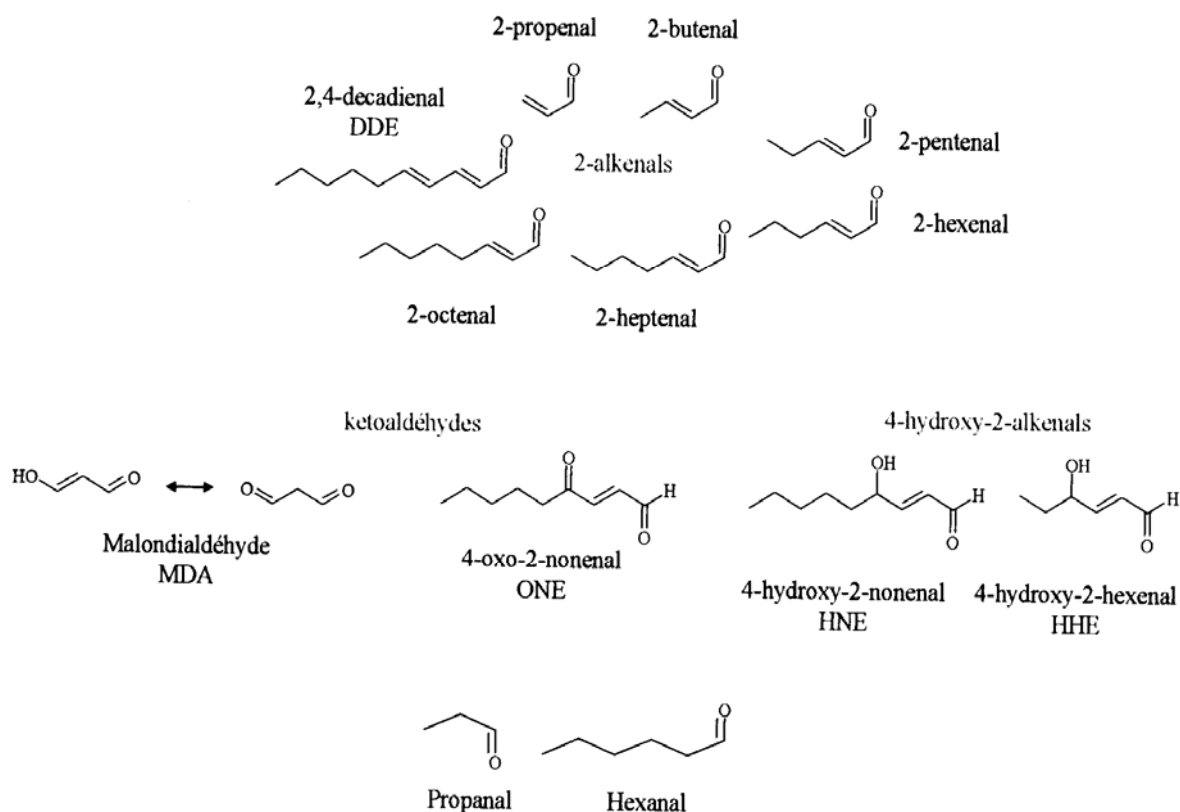


Figure 14 : Produits terminaux de la peroxydation lipidique (Thèse d'Olivier Faletti, 2006)

III-1.1. Conséquence de la peroxydation lipidique sur la membrane plasmique

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Comporti 1985; Pacifici *et al.* 1994; Sevanian and Hochstein 1985) ou d'autres éléments contenant des lipides (Al-Mutairi *et al.* 2007; Girotti 1998; Niki *et al.* 2005; Stark 2005). Il apparaît une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane (figure 15), une inactivation de récepteurs et d'enzymes membranaires. Ces perturbations fonctionnelles

peuvent aboutir à la mort des cellules (Bionnefont-Rousselot 1994; Emerit *et al.* 1986). Le cerveau est un organe cible de la peroxydation lipidique car il est très riche en acides gras polyinsaturés.

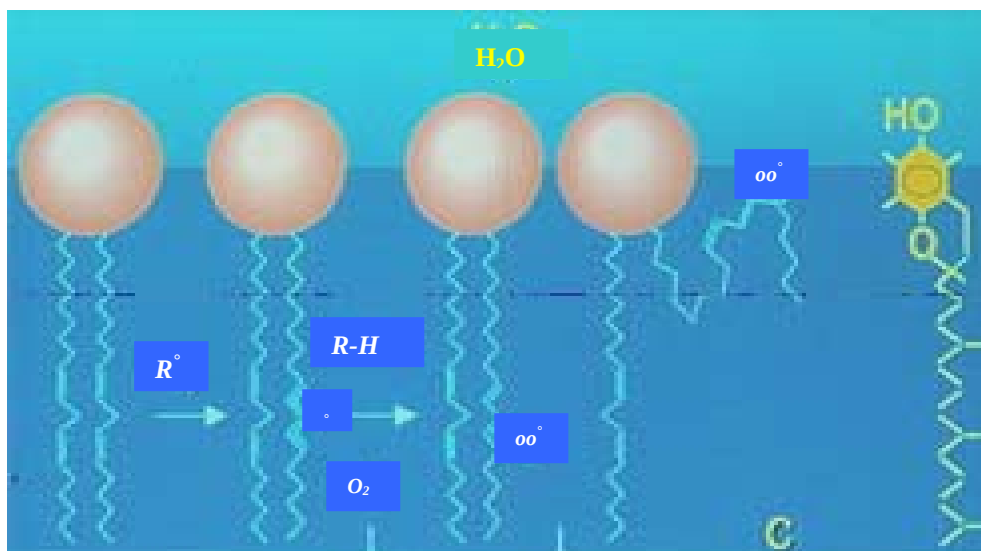


Figure 15 : destruction membranaire par attaque des ERO (Pincemail 2003)

III-1.2. Formation des adduits de l'ADN induits par le MDA

La production de MDA et sa réaction avec l'ADN pour former les adduits mutagènes fournissent un lien entre la peroxydation lipidique et les pathologies. Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Blair 2001; Marnett 2000, 2002).

Le MDA peut réagir avec les bases de l'ADN (figure 16) (Marnett LJ 1986; Nair V 1984; Seto H 1981; Stone *et al.* 1990a; Stone *et al.* 1990b). En effet, les atomes de carbone des deux liaisons carbonyle du MDA sont électrophiles ; ils peuvent réagir avec les atomes nucléophiles de la guanine, de l'adénine et de la cytosine (Basu and Marnett 1983, 1984; Blair 2001; Falletti *et al.* 2007; Seto H 1981). La réaction du MDA avec les atomes d'azote de la guanine (dG) permet la formation de plusieurs types d'adduits parmi lesquels on trouve l'adduit pyrimidopurinone, en abrégé M1G (ou PyP). Plusieurs études ont prouvé que les interactions de l'adénine ou de la cytosine (dA et dC) avec un des équivalents carbonyle du MDA forment des adduits oxopropenyles (M1A et M1C). Cependant, la production de l'adduit M1G est 5 fois supérieur aux quantités de M1A ou M1C (Marnett *et al.* 1986; Niedernhofer *et al.* 2003; Seto 1983).

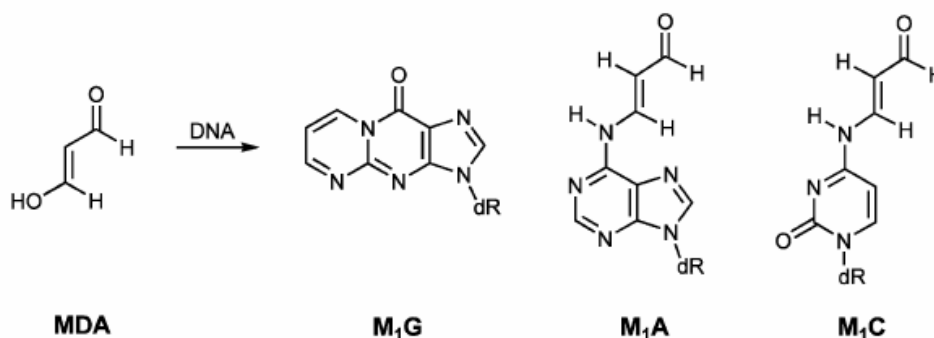


Figure 16 : Structure des adduits les plus abondants formés par la réaction de MDA avec l'ADN (Marnett *et al.* 1986)

III-1.3. Formation des adduits de l'ADN induits par le HNE et le ONE

Le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE ; figure 14), représente le second aldéhyde formé au cours de la peroxydation lipidique après le malondialdéhyde (Esterbauer *et al.* 1991b). Il a été découvert dans les années 60 parmi les différentes substances cytotoxiques trouvées dans les produits d'oxydation de l'ester méthylique du linoléate par Schauenstein (1967). Esterbauer *et al.* (1991b) ont développé une méthode de synthèse chimique et se sont intéressé à ses propriétés biochimiques. Les investigations sur cet aldéhyde se sont alors multipliées alors dans les années 70, tant en termes de formation que de réactivité et toxicité. Ces études ont permis de montrer que le HNE peut former plusieurs types d'adduits. Parmi ces adduits, la 1,N²-propano-2'-désoxyguanosine est l'adduit prépondérant de la réaction du HNE avec l'ADN isolé ou cellulaire (Douki *et al.* 2004). Cet adduit est susceptible d'induire des transversions GC vers TA (Feng *et al.* 2003; Kowalczyk *et al.* 2004).

Par ailleurs, le 4-oxo-nonéanal (ONE ; figure 14), un autre produit de la peroxydation lipidique, est capable de former des adduits avec la guanine (Lee *et al.* 2005; Rindgen *et al.* 1999), l'adénine (Lee and Blair 2000; Lee *et al.* 2000; Rindgen *et al.* 2000) et la cytosine (Pollack *et al.* 2003), ces adduits sont respectivement l'heptanone-ε-Gua, l'heptanone-ε-Ade et l'heptanone-ε-Cyt.

III-1.4. La mutagénèse des dommages

Qu'ils se forment à partir du MDA, du HNE, du ONE ou des autres aldéhydes, les adduits entraînent une modification de la structure chimique des bases. Ces dommages peuvent être importants et potentiellement mutagènes.

Les adduits du MDA avec la guanine, l'adénine et la cytosine peuvent engendrer soit des transversions GC vers TA, soit des transitions CG vers TA et AT vers GC (Benamira *et al.* 1995).

L'adduit majoritaire du HNE est susceptible d'induire aussi des transversions GC vers TA (Feng *et al.* 2003; Kowalczyk *et al.* 2004).

Les adduits ϵ -Ade et ϵ -Cyt du ONE sont les plus mutagènes (Palejwala *et al.* 1993; Pandya and Moriya 1996). Le premier conduit à des transitions AT vers GC ainsi qu'à des transversions AT vers TA et AT vers CG (Pandya and Moriya 1996). Le second induit des transitions CG vers AT et des transversions CG vers TA (Palejwala *et al.* 1993).

III-2. *Oxydation des protéines*

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, entraînent des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases (Squier 2001). Ces modifications s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus et altèrent la fonction des organes (Davies and Slater 1987; Levine and Stadtman 2001). L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols (Davis *et al.* 2001). Ces altérations concernent particulièrement les enzymes antioxydantes qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH). L'intégrité des membranes cellulaires est également menacée par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (récepteurs ou enzymes) (Djavaheri-Mergny *et al.* 1993; Gruber *et al.* 2006; Jacob *et al.* 2006). Ces protéines, en perdant leurs propriétés biologiques, deviennent non seulement beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome, mais aussi très hydrophobes (figure 17).

Les carbonyles sont utilisés comme un marqueur de l'oxydation des protéines et de façon générale comme un marqueur du stress oxydant. On doit à Hensley et à son groupe

d'avoir mis au point et développé des techniques permettant cette mesure (Hensley and Floyd 2002). La plus utilisée est celle qui met en œuvre la réaction entre les produits carbonylés et la 2-4-dinitrophénylhydrazine conduisant à la formation de 2-4-dinitrophénylhydrazones. Celles-ci peuvent être mesurées par spectrophotométrie ou par immunochimie (Robinson *et al.* 1999).

En présence de peroxyde d'hydrogène, le cuivre et le fer peuvent libérer le radical HO° qui est le principal initiateur de l'oxydation de la chaîne polypeptidique. HO° entraîne le départ d'un atome d'hydrogène sur le carbone en alpha d'une liaison peptidique en donnant naissance à un radical centré sur le carbone. En l'absence d'oxygène, deux radicaux centrés sur le carbone peuvent réagir entre eux pour former des liaisons croisées intra ou inter-chaînes. En présence d'oxygène, une réaction d'addition a lieu entre celui-ci et le radical centré sur le carbone pour conduire à un radical peroxy. Il s'en suit une série de réactions complexes conduisant à la formation d'un radical alkoxy, étape préalable à la fragmentation de la chaîne polypeptidique (Stadtman 1993). Les fragments obtenus peuvent être mono- et dicarbonylés.

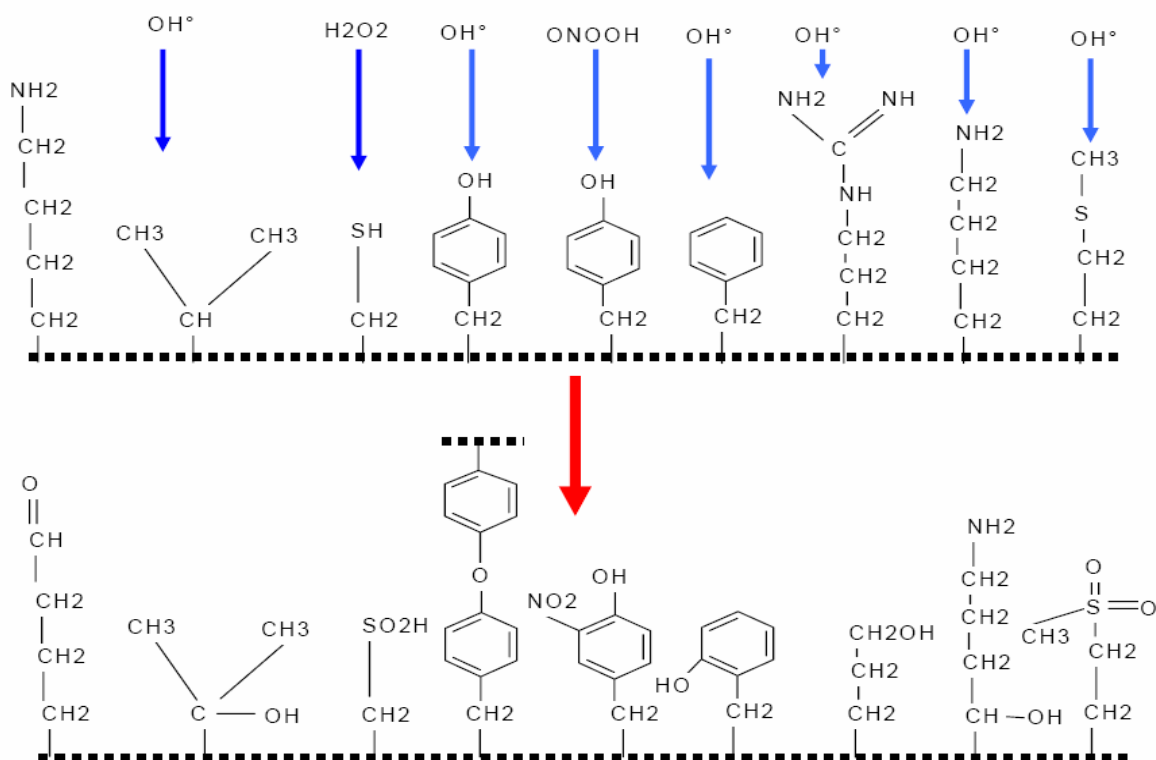


Figure 17 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier 2003).

La réaction des protéines avec les ERO peut également conduire à la formation de nouveaux radicaux organiques alcoxyle ou peroxyde (Davies *et al.* 1995; Furukawa *et al.* 2005; Luxford *et al.* 2002; Luxford *et al.* 1999; Termini 2000). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN. Deux types de dommages sont induits par cette dégradation : des pontages entre les protéines et les bases de l'ADN (Gebicki and Gebicki 1999; Luxford *et al.* 2002) mais aussi des dommages oxydatifs (Furukawa *et al.* 2005) comme la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OHdG). Ces études suggèrent que les radicaux alcoxyle dérivés des protéines sont à l'origine des pontages avec les bases de l'ADN alors que les radicaux peroxyde engendrent des dommages oxydatifs. Cet exemple de l'endommagement de l'ADN par les radicaux de protéines et des lipides illustre la notion d'effets génotoxiques indirects du stress oxydant. Ce n'est plus l'ADN la cible initiale, mais une autre biomolécule dont la dégradation conduit à des dommages de l'ADN.

III-3. Oxydation des glucides

L'oxydation du glucose peut s'effectuer dans des conditions physiologiques en présence des ions métalliques conduisant à la libération d'aldéhydes et du peroxyde d'hydrogène (Wolff *et al.* 1989). Cette oxydation entraîne la glycation des protéines par attachement de l'aldéhyde conduisant souvent à la coupure de la chaîne protéique (Hunt and Wolff 1991). La glycation des protéines favorise leur oxydabilité (réaction avec l'oxygène pour former des ERO).

III-4. Les altérations de l'ADN

La transmission des caractères héréditaires d'une génération à une autre repose sur l'acide désoxyribonucléique (ADN). Identifié dès la fin du 19^{ème} siècle par Miescher, Altmann et Kossel, l'ADN a été modélisé en 1953, par Watson et Crick. Il existe au sein de la cellule deux types d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ERO cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, le taux de bases oxydées serait 2 à 3

fois supérieur dans l'ADN mitochondriale par rapport à l'ADN nucléaire (Stevnsner *et al.* 2002). Selon la source des agressions, l'ADN est endommagé de différentes façons. On peut noter quatre classes principales de dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN (Hayakawa *et al.* 1991), les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques. La figure ci-dessous illustre ces différents dommages (figure 18).

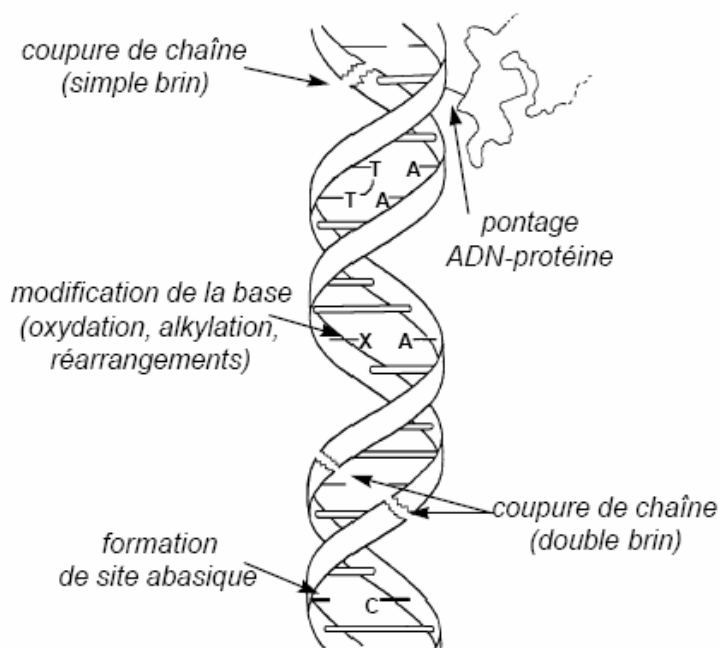


Figure 18 : Principales classes de dommages de l'ADN (Thèse de Sandrine Frelon, 2000)

III-4.1. Modification des bases pyrimidiques

Les modifications peuvent être dues à l'attaque des radicaux hydroxyles sur le cycle aromatique des pyrimidines (figure 19). Le radical $\text{HO}^\bullet$ est très électrophile et donc s'additionne préférentiellement en position 5 du cycle de la thymine et la cytosine. Il existe également une réaction minoritaire d'addition en position 6. Cette addition conduit à la formation des radicaux 5-hydroxy-6-yle ou 6-hydroxy-5-yle. Le radical $\text{HO}^\bullet$ peut également réagir avec le groupement méthyle de la thymine en arrachant un atome d'hydrogène, conduisant à la formation d'un radical allylique. Ces radicaux formés vont réagir avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes. Ceux-ci sont transformés en hydroperoxydes par dismutation s'ils le peuvent ou après une étape de réduction par un agent réducteur pouvant être le radical superoxyde (milieu aéré (O_2) + e^-), suivie d'une réaction de protonation ($\text{RO}_2^\bullet \rightarrow \text{RO}_2\text{H}$). Les hydroperoxydes, qui ont été isolés et caractérisés dans le cas de la thymidine (Cadet *et al.* 1997; Tremblay *et al.* 1999) et de la 2'-désoxycytidine, sont instables,

particulièrement en présence de métaux de transition. Leur décomposition conduit à la formation de divers produits stables dont les diols et les uréates.

Les réactions d'oxydation à un électron qui impliquent uniquement la formation du radical cation pyrimidique conduisent à des produits finaux stables qui sont identiques à ceux générés par l'action du radical hydroxyle. Les rendements relatifs de formation sont très différents car la formation du radical cation des bases ne correspond pas au mécanisme principal dans le cas d'une attaque par $\text{HO}^\bullet$.

Parallèlement, l'addition d'électrons a été observée et peut conduire, en l'absence d'oxygène, à la formation de radicaux 5,6-dihydropyrimid-5-yle. Ces radicaux peuvent être réduits ou oxydés pour donner respectivement les 5,6-dihydropyrimidines, et la base normale. Dans ces mêmes conditions anoxiques, les radicaux 5-hydroxy-6-hydropyrimid-6-yle et 6-hydroxy-5-hydropyrimid-5-yle sont les précurseurs des produits stables monohydroxylés (figure 19).

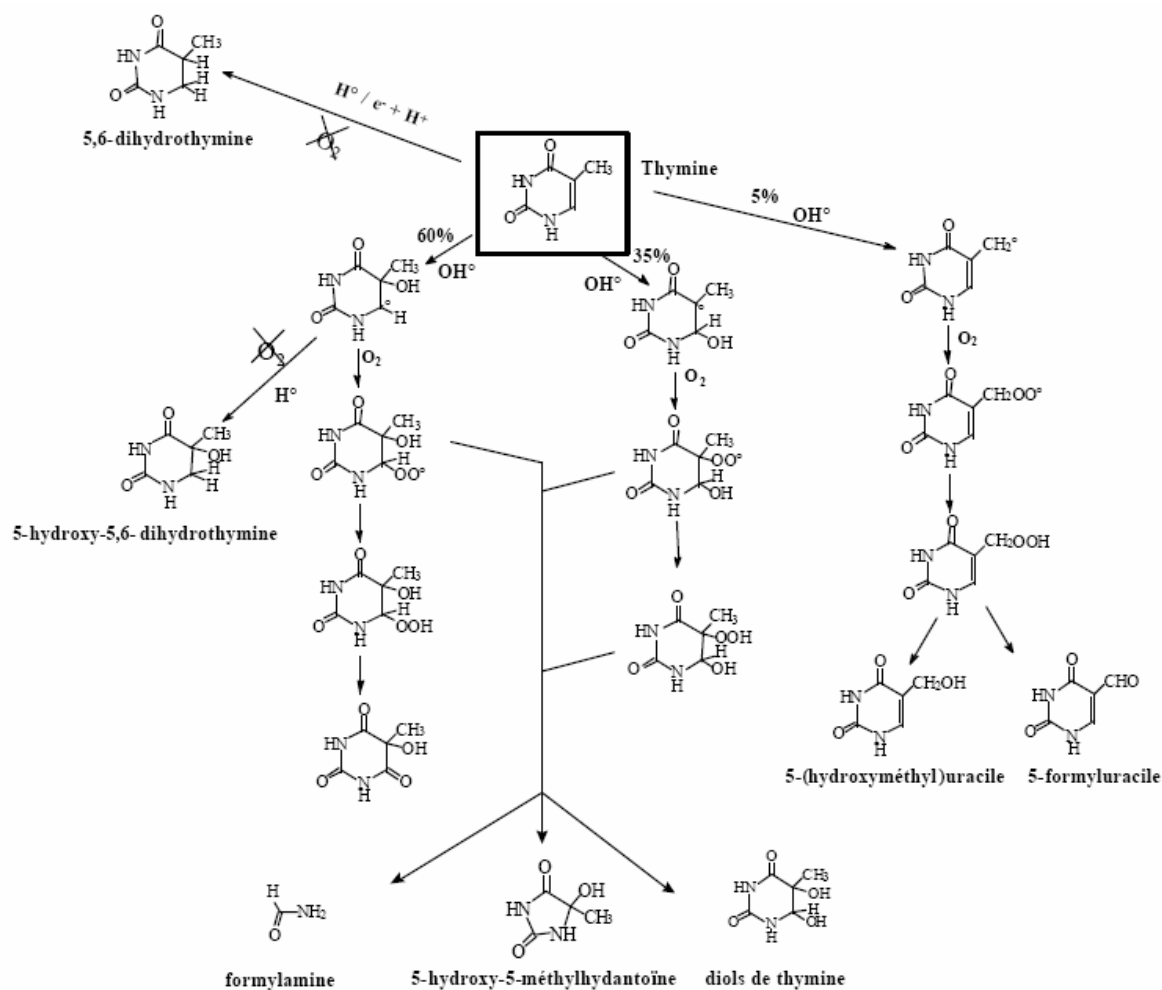


Figure 19 : Schéma de dégradation radicalaire de la thymine proposé par (Cadet et al. 1997)

III-4.2. Modification des bases puriques

Les bases puriques sont plus sensibles aux espèces réactives de l'oxygène, en particulier la guanine, base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas. Nous ne traiterons donc ici que le cas de la guanine. Le premier mécanisme conduisant à la formation de 8-OHdG à partir de la guanine implique l'arrachement d'un électron à la guanine et la formation d'un cation radical. Le radical ainsi formé peut s'hydrater pour générer un radical neutre intermédiaire ou peut perdre un proton pour donner naissance à un radical neutre oxydant. Le radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguan-7-yle produit par la réaction d'hydratation pourra être oxydé ou réduit pour conduire respectivement à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OHdG) et de la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) (Cadet *et al.* 2001). D'autre part, le radical oxydant formé par déprotonation du cation radical de la guanine est le précurseur de l'oxazolone (figure 20) (Cadet *et al.* 2001). Dans ce phénomène, l'importance du radical hydroxyle a été démontrée. En effet, l'addition du radical HO[•] en position 8 de la guanine conduit à la formation de la 8-OHdG et des FapyGua par l'intermédiaire du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguan-7-yle (Cadet *et al.* 2001).

En fin, l'autre mécanisme de formation est celui qui met en jeu l'oxygène singulet. L'oxygène singulet conduit spécifiquement à la formation de la 8-OHdG. A l'inverse du radical hydroxyle, qui peut interagir avec l'ensemble des bases, l'oxygène singulet réagit avec la guanine uniquement (Cadet *et al.* 2001). L'oxygène singulet réagit avec la guanine par addition [4 + 2] sur les positions 4 et 8 du cycle purique ce qui forme un endoperoxyde. Cet endoperoxyde conduit à la 8-hydroperoxy-7,8-dihydroguanine qui peut être réduit en 8-OHdG (Cadet *et al.* 2001; Shigenaga *et al.* 1989; Valko *et al.* 2006) (figure 20). La mesure de la 8-OHdG est aujourd'hui utilisée comme biomarqueur du stress oxydant sur l'ADN (Halliwell and Chirico 1993; Valko *et al.* 2006). De plus le développement de nouvelles techniques de dosages notamment par HPLC-MS/MS permet de mesurer spécifiquement les différents types de dommages après hydrolyse de l'ADN (Collins 2000).

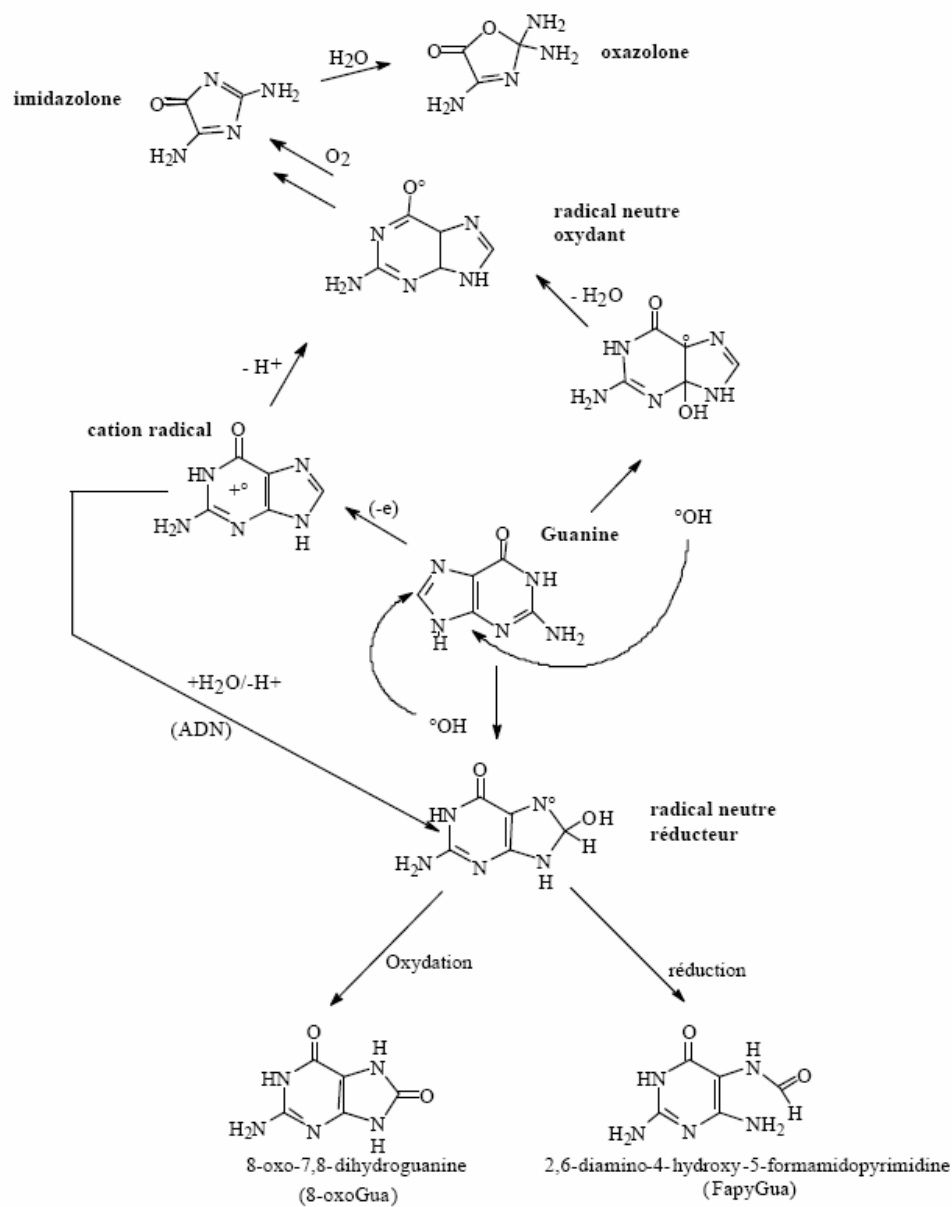


Figure 20 : Schéma d'oxydation de la guanine proposé par (Cadet *et al.* 1997)

Ces différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autres dans les phénomènes de cancérisation (Feng *et al.* 2003; Nair *et al.* 1999). En effet, la 8-OHdG est considérée comme une lésion pré-mutagénique car elle peut conduire, en l'absence de réparation, à une transversion GC $\rightarrow$ TA (Bohr *et al.* 2002).

III-4.3. Modification des sucres de l'ADN

Une catégorie majeure de dommages oxydatifs de l'ADN est représentée par les cassures simple brin qui résultent principalement de l'arrachement initial par le radical HO° d'un atome d'hydrogène sur le résidu 2-désoxyribose en positions C3, C4 ou C5 et à un degré moindre sur le carbone 2 (Angeloff *et al.* 2001; Breen and Murphy 1995; Von Sonntag 1987). L'arrachement d'un atome d'hydrogène en position 1 du 2-désoxyribose par HO° conduit à la formation de 2-désoxyribonolactone (Cadet *et al.* 1997; Chatgililoglu 2000; Koreta 2000; Roupioz 2002). Cette lésion que l'on peut considérer comme un site abasique oxydé est susceptible de former un lien covalent avec plusieurs enzymes de réparation de l'ADN (DeMott *et al.* 2002; Hashimoto *et al.* 2001; Xu 2003).

IV. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Le stress oxydant représente un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les rhumatismes, l'asthme, le SIDA, le cancer et les maladies neurodégénératives.

IV-1. Stress oxydant et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une forme de démence sénile qui se manifeste dès la soixantaine et qui, à l'âge de 85 ans, touche une personne sur cinq. La neurodégénérescence est causée par les dépôts de plaques amyloïdes dues à l'accumulation d'un peptide amyloïde bêta ($\text{A}\beta$). Ce peptide provient d'une protéine transmembranaire dite APP (amyloïde protein precursor), naturellement présente dans tous les types cellulaires notamment les neurones. (Subbarao *et al.* 1990) ont suggéré un rôle du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer suite à l'observation de l'augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines (Smith *et al.* 1995), l'altération de l'ADN mitochondrial (Mecocci *et al.* 1994) et l'augmentation de 50% de l'activité de la Cu/Zn SOD (Marklund *et al.* 1985) dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Les ERO peuvent également oxyder l'APP entraînant son dépôt et son agrégation.

IV-2. Stress oxydant et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson décrite initialement en 1881, est une maladie neurodégénérative caractérisée par la présence de symptômes et de lésions neuropathologiques spécifiques. Certaines études ont suggéré une implication du stress oxydant dans la maladie de Parkinson. Cette maladie neurodégénérative a une forte incidence dans la population âgée. Elle se déclare autour de 60 ans et dure, en moyenne, 13 ans (Hughes *et al.* 1993). Les dommages oxydatifs ont été observés après une analyse *post mortem* du cerveau des individus atteints de la maladie de Parkinson. Une diminution de la quantité du glutathion réduit (GSH) et de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale a également été rapportée (Di Monte *et al.* 1992; Schapira *et al.* 1989). Une diminution de GSH suggère l'induction d'un stress oxydant.

IV-3. Stress oxydant et cancer

De très nombreuses études démontrent la place prépondérante du stress oxydant dans l'initiation et le développement des cancers. L'existence d'un stress oxydant chez les malades peut être à la fois montré par l'effondrement des défenses antioxydantes et par l'augmentation des produits issus du stress oxydant. Des dérivés d'oxydation de l'ADN signant un stress oxydant sont retrouvés dans le sang et les tissus des malades cancéreux (Malins and Haimanot 1991). De nombreux aldéhydes (comme le malondialdéhyde) sont retrouvés en quantité importante dans le sang des enfants cancéreux (Yazdanpanah *et al.* 1997). L'augmentation de la peroxydation lipidique est même observée au stade précancéreux chez des femmes atteintes de dysplasie mammaire ou cervicale (Boyd and McGuire 1991). L'activité de l'enzyme Mn-SOD est augmentée dans la muqueuse des malades atteints d'adénocarcinome de l'estomac, sans doute en réaction à la présence excessive des ERO (Janssen *et al.* 2000).

B- Réparation de l'ADN et apoptose

L'élimination des lésions oxydatives de l'ADN est un processus important pour limiter leurs effets mutagènes et cytotoxiques (Cooke *et al.* 2003). Pour cela, de nombreux systèmes de réparation sont utilisés par la cellule (Croteau and Bohr 1997). Les bases oxydées ou modifiées sont éliminées essentiellement par deux mécanismes : la réparation par excision des bases (base excision repair, BER) et la réparation par excision de nucléotides (nucleotide excision repair, NER). Il existe cependant plusieurs autres systèmes de réponse cellulaire face à un ADN lésé. Les cellules peuvent arrêter leur progression dans le cycle cellulaire pour rétablir l'intégrité de l'ADN avant sa réplication (Eckardt-Schupp and Klaus 1999). Ou bien lorsque les lésions sont trop importantes, les cellules peuvent déclencher l'apoptose. De très nombreux gènes participent au contrôle de la réponse cellulaire au stress. C'est le cas des gènes de la protéine p53 ou p21 (Lakin and Jackson 1999).

I. Les systèmes de réparation de l'ADN

Les lésions de l'ADN peuvent conduire à l'apparition de mutations. Afin de lutter contre ces dommages et pour assurer la survie et le maintien de l'information génétique au niveau cellulaire, la cellule possède un arsenal enzymatique permettant de repérer, d'éliminer et de remplacer les portions d'ADN endommagées.

I-1. Réparation par excision de nucléotides (NER).

I-2.1. Découverte et historique

Les premières descriptions scientifiques sur la NER datent de 1964 (Boyce and Howard-Flanders 1964; Rasmussen and Painter 1964; Setlow and Carrier 1964). Quelques années plus tard, la découverte de l'implication de la NER dans la carcinogenèse fut possible grâce aux travaux de Cleaver menés sur les cellules de patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* (XP), une maladie génétique provoquant l'apparition précoce de cancers cutanés. Ces auteurs ont démontré que les cellules de patients XP étaient déficientes en

réparation par excision de nucléotides (Cleaver 1968). Des recherches menées permirent d'identifier les gènes responsables du XP, et de remonter jusqu'aux protéines impliquées dans la réparation par excision de nucléotides. Les protéines ainsi découvertes portent le nom XP suivi d'une lettre de l'alphabet correspondant au groupe de complémentation auquel elles appartiennent.

En 1986, Mellon et Hanawalt (Mellon *et al.* 1986) démontrèrent que la NER peut être divisée en deux voies : la réparation couplée à la transcription (TCR) et la réparation globale du génome (GGR). Ce sont les travaux de (Aboussekhra *et al.* 1995; Wood *et al.* 1988) qui ont permis de mesurer la réparation par excision de nucléotide et de reconstituer le mécanisme avec les protéines purifiées *in vitro*. Toutes ces études ont posé les bases génétiques et biochimiques de la NER.

I-2.2. Mécanismes de la réparation par excision de nucléotides (NER)

La NER est un système de réparation très versatile car elle permet d'éliminer une grande variété de lésions telles que : les lésions induites par les ultraviolets (UV), les pontages intra-brin, les gros adduits de l'ADN comme ceux des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Dip *et al.* 2004), les dommages induits par le stress oxydant ou d'autres sources. La versatilité de ce système de réparation est liée au mode de reconnaissance du dommage basé sur la déformation de l'ADN. La NER présente l'avantage de reconnaître un nombre important de dommages avec un faible nombre de protéines et est divisée en deux voies selon le processus de reconnaissance du dommage.

La reconnaissance de dommages lors de la TCR est un système puissant car il permet à la cellule de réparer en priorité les gènes transcrits et donc importants pour la vie cellulaire. Le blocage de l'ARN polymérase au niveau du site lésé permet de recruter le complexe d'incision de la NER. Actuellement la NER peut être décrite comme un processus de réparation comportant cinq étapes successives dans lesquelles 20 à 30 protéines sont impliquées (RPA, TFIIH, XPA, XPC, hHR23B, ...) (Batty and Wood 2000; d'Errico 2006; Dusinska *et al.* 2006) (figure 21) et l'absence de l'une d'entre elles (CSA ou CSB) est à l'origine de plusieurs maladies génétiques graves (par exemple *Xeroderma pigmentosum* et le syndrome de Cockayne).

La réparation globale du génome (GGR) répare aussi bien les zones non codantes que codantes, ainsi que les brins transcrits et non transcrits. La GGR est donc très importante pour les cellules qui se divisent et se différencient, car elles ont besoin de transmettre à leur

descendance un génome exempt de toute erreur. Pendant la GGR, plusieurs protéines sont impliquées dans la reconnaissance des dommages. Tout d'abord, les dommages de l'ADN (dimères de pyrimidine, les photoproduits, etc.) sont reconnus par le complexe protéique XPC/hHR23B qui se lie à l'ADN au niveau de la lésion ce qui initie le processus de réparation (Sugasawa *et al.* 1998) et recrute les protéines nécessaires pour réaliser les étapes suivantes. Les protéines XPA et RPA (Batty and Wood 2000)(figure 21) stabilisent le complexe d'incision.

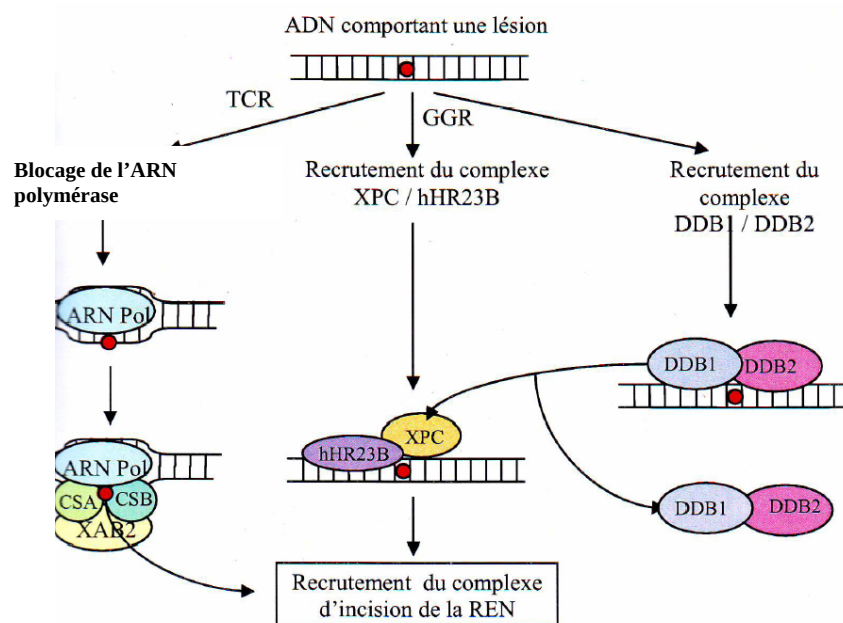


Figure 21 : Schéma représentant les différentes voies de reconnaissance du dommage au cours de la réparation par excision de nucléotides (Thèse d'Olivier Faletti, 2006)

Une fois que le dommage est reconnu, le complexe d'incision est formé pour éliminer la lésion. Le facteur TFIIH composé de deux hélicases XPB et XPD qui, en présence d'ATP, vont permettre de dérouler la double hélice de l'ADN. Ce qui permet le recrutement des protéines nécessaires à la réparation. Le complexe recrute ensuite la protéine XPA qui interagit avec l'endonucléase XPG. La protéine XPG se positionne en 3' de la lésion. XPC et hHR23B quittent le complexe de réparation. Le duplex ERCC1/XPF, qui tout comme XPG a une activité endonucléase, se positionne en 5' de la lésion. La double incision en 5' et 3' du dommage a ensuite lieu (Riedl *et al.* 2003) ; cette étape est dépendante de Mg^{2+} , cation nécessaire à l'activité de XPG. Le brin d'ADN contenant la lésion, d'une taille d'environ 30 nucléotides, est excisé. ERCC1 est une cible majeure du stress oxydant. Sa modification s'accompagne d'un dérèglement de la NER. Cette protéine est régulée par le glutathion. Cela suggère que le glutathion est impliqué dans la régulation de la NER (Langie *et al.* 2007).

Le complexe de resynthèse est composé de la polymérase répliquative ϵ ou δ , du facteur de prolifération cellulaire PCNA et du facteur de réplication RFC. Le facteur RFC permet de charger PCNA sur l'ADN et pour permettre à la polymérase de resynthétiser l'ADN excisé en prenant comme modèle le brin complémentaire. Pour finir, la ligase I ligature la double hélice d'ADN (figure 22).

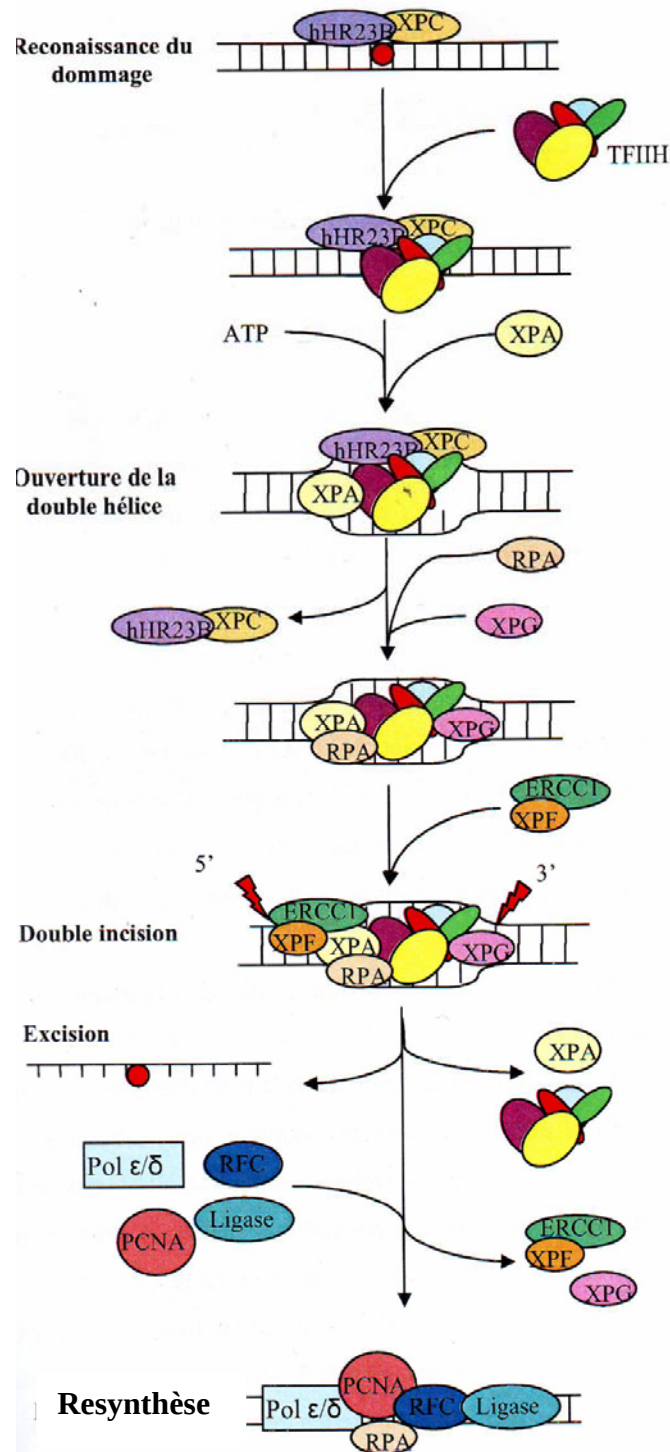


Figure 22 : Schéma présentant les différentes étapes lors de la réparation par excision de nucléotides (Thèse d'Olivier Faletti, 2006).

Notons que la NER est un processus qui est régulé. Cette régulation permet à la cellule d'ajuster l'activité de la réparation et ainsi la cellule peut s'adapter à son environnement. La régulation peut avoir lieu à différents niveaux : du senseur à l'effecteur en passant par les protéines de reconnaissance des dommages. Comme effecteur nous avons la protéine p53 aussi appelée gardienne du génome.

I-2. La réparation par excision de base (BER)

I-1.1. Découverte et historique

La réparation par excision de base est largement représentée chez les êtres vivants. Sa découverte est plus tardive. Cela est dû au fait qu'il n'existe pas de maladies génétiques liées à la BER ce qui n'a pas attiré l'attention des chercheurs. Par ailleurs, son observation *in vitro* a longtemps été masquée et/ou confondue avec les activités de dégradation de l'ADN de type nucléases (Friedberg 2006). La première découverte d'une activité enzymatique impliquée dans la BER remonte à 1972, date à laquelle est décrite chez *E.coli* une activité endonucléase spécifique des sites dépurinés. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette enzyme permet de réparer les sites dépurinés. Lindahl mettra en évidence en 1974 une activité glycosylase capable d'éliminer les uraciles de l'ADN (Lindahl 1974). En 1979, c'est Lindahl qui a posé les bases de la BER (Lindahl 1979), à savoir : une glycosylase coupe la base lésée formant ainsi un site abasique, puis une endonucléase coupe l'hélice d'ADN permettant la resynthèse de la partie lésée. Un grand nombre de glycosylases seront alors découvertes et étudiées, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Le mécanisme de la BER sera approfondi quand, en 1994, Bogenhagen démontre chez *Xenopus laevis* que deux voies de resynthèse du brin réparé existent. Une non dépendante de PCNA où la taille du brin synthétisé est de 1 à 2 nucléotides (voie de resynthèse courte), et l'autre dépendante de PCNA présentant une resynthèse de cinq à sept nucléotides (Matsumoto *et al.* 1994)(voie de resynthèse longue). Un an plus tard, Dogliotti et Abbondandolo mettront en évidence que ces deux voies de resynthèse existent aussi dans les cellules des mammifères (Frosina *et al.* 1996).

I-1.2. Mécanismes de la réparation par excision de base

La réparation par excision de base répare les petits dommages de l'ADN, à savoir les modifications de bases. Plusieurs facteurs peuvent modifier les bases : la désamination spontanée de la cytosine qui conduit à l'uracile ; les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent conduire à la formation de bases oxydées dont la plus étudiée est la 8-OHdG ; les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique qui peuvent induire des adduits de l'ADN, les agents chimiques qui peuvent alkyler les bases. Cette réparation est multi-enzymatique et la première étape du processus implique l'action d'une ADN glycosylase pour reconnaître la base modifiée et procéder à son excision. Après la fixation de l'enzyme sur la base lésée, elle coupe la liaison N-glycosidique qui relie la base au sucre et génère un site abasique. Ces sites abasiques (AP) créés sont potentiellement très dangereux car ils sont instables et empêchent la synthèse d'ADN par la plupart des polymérases ce qui les rend très cytotoxiques et mutagènes (Averbeck 2001). Ces sites sont pris en charge par d'autres enzymes au cours du processus de réparation. Compte tenu du nombre important des bases modifiées, la cellule possède plusieurs types d'ADN glycosylases, chacune plus ou moins spécifique d'une lésion.

Une fois que le site abasique est formé par l'ADN glycosylase, une incision dans le brin d'ADN a lieu afin de permettre la resynthèse de la base éliminée. L'incision fait intervenir deux types de mécanismes, à savoir une incision réalisée par une famille de protéines appelées AP-Endonucléases/Exonucléases ou une incision par le système ADN glycosylase AP lyase. Dans le cas d'une incision par AP-Endonucléases/Exonucléases, deux protéines ont été identifiées chez l'homme. Il s'agit de APEX1 et APEX2. Ces deux protéines ont la capacité de reconnaître les sites abasiques et d'hydrolyser la liaison phosphodiester qui se trouve en 5' provoquant ainsi l'ouverture de la double hélice ; elles présentent également une faible activité exonucléasique (Friedberg 2006). La région N-terminale de la protéine APEX1 permet aussi d'activer, par réduction, plusieurs facteurs de transcription (AP-1, NF-kB, p53 etc.) (Xanthoudakis *et al.* 1994). Cette activité réductrice de APEX1 est régulée par le statut redox cellulaire. Ainsi pendant un stress oxydant, APEX1 est rapidement oxydé et ne peut plus activer les facteurs de transcription.

La 8-OHdG est éliminée par l'ADN glycosylase humaine (hOGG1) (Radicella *et al.* 1997). L'activité de cette enzyme est inhibée par le cadmium par un mécanisme d'oxydation indirecte des résidus cystéines (Bravard *et al.* 2006). Cependant, si une réplication de 8-OHdG a lieu avant sa réparation beaucoup d'erreurs peuvent se produire car une adénine peut être faussement incorporée dans le brin fils en face de cette 8-OHdG. Dans ce cas une autre

ADN glycosylase, la glycosylase MYH peut se charger d'éliminer l'adénine. Les bases pyrimidines oxydées comme les diols de thymine et de cytosine sont éliminés par l'ADN glycosylase hNTH1 en utilisant l'enzyme XPG qui agit normalement au cours de la réparation par excision de nucléotides (Le Page *et al.* 2000).

La resynthèse de l'ADN passe par deux types de voies, la voie de resynthèse courte qui incorpore 1 à 2 nucléotides par l'intermédiaire de la polymérase β associée à XRCC1. La ligation fait intervenir le complexe ligase III/ XRCC1 qui ferme la double hélice d'ADN. La voie de resynthèse longue incorpore un nombre plus important de nucléotides (5 à 7 nucléotides). Cette étape est réalisée par les mêmes polymérases que celles utilisées dans la réparation par excision de nucléotides, à savoir les polymérases ϵ ou δ . La resynthèse est suivie d'une ligation qui fait intervenir le complexe ligase I/ XRCC1 (figure 23).

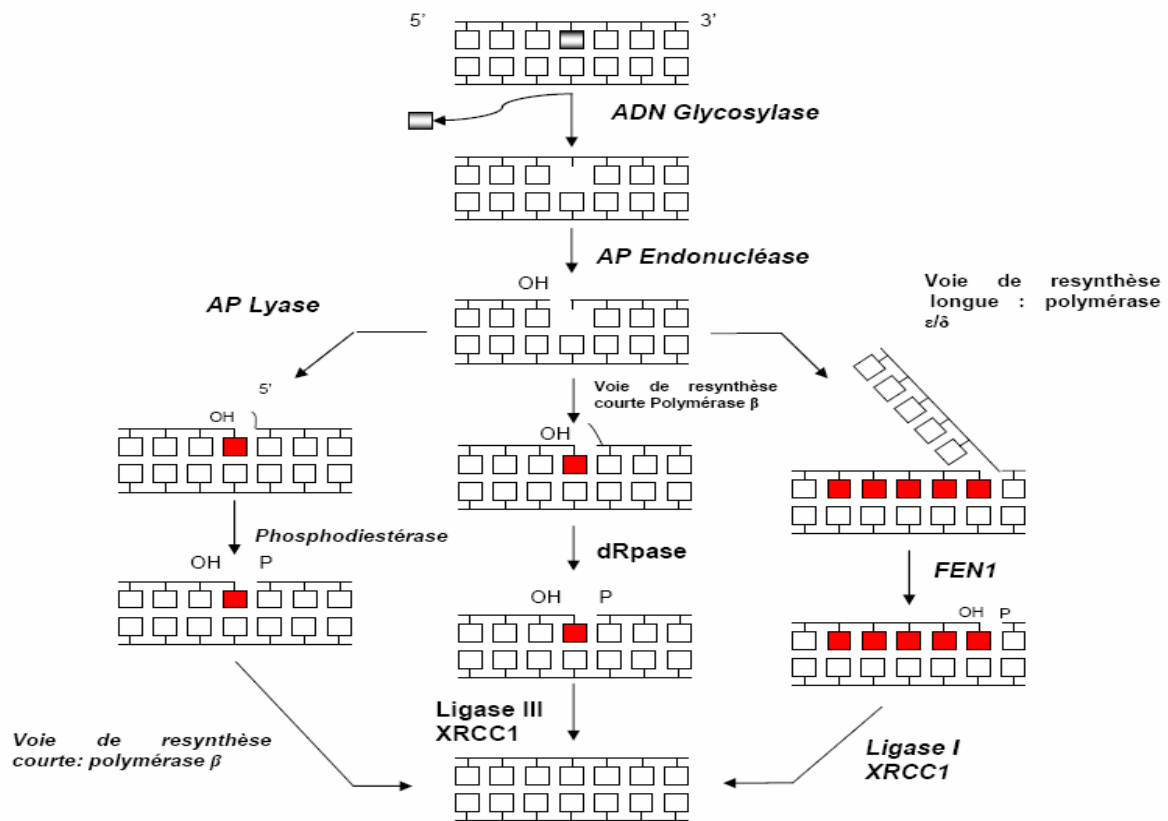


Figure 23 : Schéma représentant le déroulement séquentiel des différentes étapes de la réparation d'une base lésée (noire) par la BER, ainsi que les différentes voies de resynthèse possibles (Thèse d'Olivier Faletti, 2006).

I-3. Les autres systèmes de réparation

D'autres mécanismes de réparation existent et prennent en charge d'autres types de lésions. Il s'agit par exemple des systèmes de réparation des cassures de l'ADN issues des espèces réactives de l'oxygène, la réparation des mésappariements et des insertions / délétions, les alkyltransférases etc. Les cassures sont à l'origine d'instabilité génomique telles que les remaniements chromosomiques. La réparation des cassures de l'ADN double brin se compose de la réparation par suture non homologue qui permet de joindre deux extrémités d'ADN même si ces dernières n'ont pas ou très peu d'homologie de séquence (Jeggo 1998; Kanaar *et al.* 1998) ; et de la réparation par recombinaison homologue qui est un mécanisme beaucoup plus complexe que la suture non homologue. La recombinaison homologue utilise la complémentarité de portions de brin d'ADN de deux hélices adjacentes afin de les joindre. Ainsi aucune information génétique n'est théoriquement perdue ou modifiée.

On peut également avoir réparation des mésappariements et des insertions/délétions qui sont formées pendant la réplication. En effet, pendant la réplication, les polymérases peuvent introduire des erreurs en ne mettant pas le nucléotide correct en face de son complémentaire, ou en faisant des insertions/ délétions de nucléotides. La réparation des mésappariements et des insertions/ délétions fait intervenir plusieurs dimères de protéines qui ont chacun leurs spécificités. Par exemple, MutS_α, dimère formé par hMSH2 / hMSH6, reconnaît les mésappariement de bases ainsi que les insertions et délétions de 1 à 8 nucléotides. MutS_β, dimère formé par hMSH2 / hMSH3, reconnaît des boucles d'insertion/ délétion plus grandes, mais ne reconnaît que très faiblement celle d'un seul nucléotide (Hsieh 2001).

I-4. Implication des systèmes de réparation dans la carcinogenèse

Dans un organisme, il existe un équilibre entre le nombre de cellules qui se divisent et le nombre de cellules qui meurent. Cette régulation permet le maintien de l'organisation structurelle et fonctionnelle des organes et donc de conserver l'intégrité de l'organisme. La transformation cellulaire est un phénomène qui tend à détruire cet équilibre conduisant à l'immortalisation d'une cellule et à sa multiplication clonale par des divisions anarchiques. Cette formation fait intervenir l'activation des proto-oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la réparation de l'ADN et l'apoptose (Harvey Lodish

1997).

Le processus de cancérisation nécessite des mutations dans plusieurs gènes afin d'obtenir une cellule transformée. Il faut que la cellule échappe à l'apoptose (inactivation de p53), ne régule plus son cycle cellulaire, que les voies de prolifération soient activées. Toutes ces modifications d'activités enzymatiques nécessitent des mutations dans les gènes correspondants. La probabilité de muter un ou plusieurs de ces gènes en même temps est très faible, cependant ces multiples mutations sont bien présentes dans les cellules tumorales. Cela peut s'expliquer d'une part par le fait que l'apparition d'une mutation primaire dans un gène des systèmes de réparation ou dans celui d'une polymérase confère à la cellule un « phénotype mutateur » générant un grand nombre de mutations (Loeb 1994). Ce phénotype permet à la cellule d'acquérir toutes les mutations nécessaires à sa transformation. D'autre part, (Fearon and Vogelstein 1990) ont avancé une hypothèse basée sur une vision Darwinienne du processus de cancérisation. Selon cette théorie, des mutations aléatoires surviendraient dans le génome, parfois dans des gènes nécessaires au processus de cancérisation cellulaire. Des sélections clonales successives opéreraient alors sur ces gènes mutés en fonction de l'environnement, permettant ainsi l'émergence d'un clone tumoral. A la vue de ces deux hypothèses, où l'une donne à la réparation une place centrale et l'autre confère un rôle important à l'environnement cellulaire, on peut penser que ces deux mécanismes existent et peuvent en synergie contribuer à la transformation cellulaire (figure 24). Ainsi on comprend l'importance des systèmes de réparation à travers leur implication dans le processus de cancérisation cellulaire. En effet, ils jouent un rôle d'élément déclencheur dans le cas de dommages non réparés présents dans des proto-oncogènes ou dans des gènes suppresseurs de tumeurs, mais aussi d'accélérateur du processus de carcinogenèse s'ils viennent à devenir inactifs. L'aptitude qu'ont nos cellules à maintenir l'intégrité de leur génome est donc corrélée en partie à leur capacité à ne pas devenir cancéreuse.

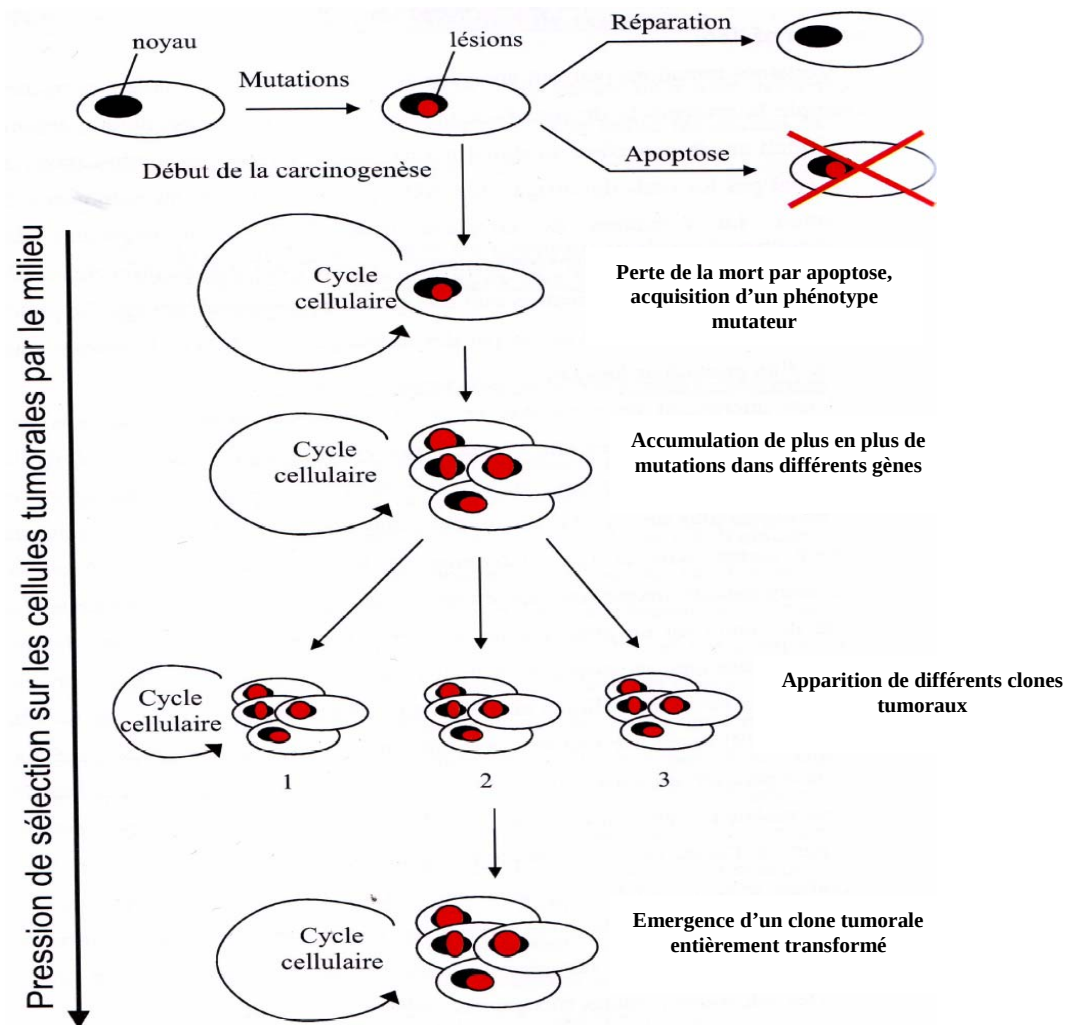


Figure 24 : Schéma des différentes étapes du processus de carcinogenèse (Thèse d'Olivier Faletti, 2006).

II. L'apoptose

L'apoptose représente une forme de mort cellulaire, programmée génétiquement, résultant de l'activation d'une machinerie interne à la cellule. Ce processus physiologique a été premièrement décrit par (Kerr *et al.* 1995). L'apoptose s'oppose à la mort nécrotique qui suppose une destruction d'origine exogène produisant une rupture membranaire, la dispersion du contenu cellulaire et correspondant à une mort cellulaire pathologique (Watjen and Beyersmann 2004; Watjen *et al.* 2002a; Watjen *et al.* 2002b). Hengartner (2000) a démontré que l'apoptose est un événement normal et stratégique avec un rôle crucial dans le processus d'embryogenèse et dans la protection contre la cancérisation.



Figure 25 : *Cellule en apoptose observée au microscope électronique*

La mort apoptotique est constituée d'un ensemble de processus de digestion internes affectant d'abord le cytoplasme puis le noyau. La membrane cellulaire reste intacte. La dégradation du cytosquelette fait perdre à la cellule sa polarité, la détache de ses voisines, l'arrondit et diminue son volume ; suivie de l'activation de protéases spécifiques (caspases), la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Earnshaw *et al.* 1999; Hengartner 2000; Nagata *et al.* 2000; Nagata 2000; Wang *et al.* 2001a; Wang *et al.* 2001b; Watjen *et al.* 2005). De nombreuses protubérances apparaissent à la surface (Kerr *et al.* 1995)(figure 25). L'intégrité membranaire et la rapidité de l'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation contrairement à ce qui peut se produire dans le phénomène de nécrose, où les différents compartiments cellulaires se rompant, déversent leur contenu enzymatique au sein même des tissus. Cette mort cellulaire programmée est induite par divers signaux notamment l'exposition aux métaux de transition.

II-1. Rôle physiologique de l'apoptose.

L'apoptose joue un rôle fondamental tout au long de la vie d'un organisme, du stade embryonnaire jusqu'à sa mort. Elle assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est à dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui constituent les tissus (Evan and Littlewood 1998). La mort cellulaire participe aux phénomènes de différenciation qui donnent naissance aux trois types de tissus cellulaires (mésoderme, endoderme et ectoderme) dont dériveront l'ensemble des cellules qui constituent le corps. Ce processus apoptotique permet la formation de cavités, sculpte la forme interne et externe de l'embryon, et élimine toutes les structures devenues inutiles, comme par exemple les tissus qui séparent les doigts, permettant ainsi leur individualisation (Meier *et al.* 2000). L'apoptose

joue un rôle essentiel dans la sculpture des métamorphoses successives de notre corps : chez la femme, par exemple, elle est impliquée dans l'involution des seins après le sevrage (Strange *et al.* 2001) ou dans la régression de l'endomètre utérin au cours des menstruations (Vinatier *et al.* 2001).

L'apoptose participe également à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes, le cerveau et le système immunitaire (Ekert and Vaux 1997; Goldrath and Bevan 1999).

II-2. Apoptose et pathologies

Les dérèglements des mécanismes contrôlant l'apoptose peuvent être responsables du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies. Ces dernières peuvent être caractérisées soit par un déficit d'apoptose (cancer, infections virales...) (Agnantis and Goussia 1999; Evan and Littlewood 1998; Neurath *et al.* 2001; Rich *et al.* 1999; Thompson 1995), soit par un excès d'apoptose (maladies neurodégénératives, infarctus du myocarde...) (Barinaga 1998; Hay and Kannourakis 2002; Muthumani *et al.* 2003; Selliah and Finkel 2001; Thompson 1995).

DEFICIT DE L'APOPTOSE	EXCES D'APOPTOSE
Cancers : - Cancer mammaire - Cancer de la prostate - Cancer Ovarien - Lymphome folliculaire - Leucémies - Mélanome - Syndrome lymphoprolifératif	Maladies neurodégénératives : - Alzheimer - Huntington - Parkinson - Sclérose latérale amyotrophine - Syndrome myélodysplasie
Divers : - Ostéoporose - etc.	Divers : - Infarctus du myocarde - Ischémies - Vieillissement. Etc.

Tableau 1 : Récapitulatif des effets biologiques du déficit et de l'excès d'apoptose

II-3. *Machinerie apoptotique*

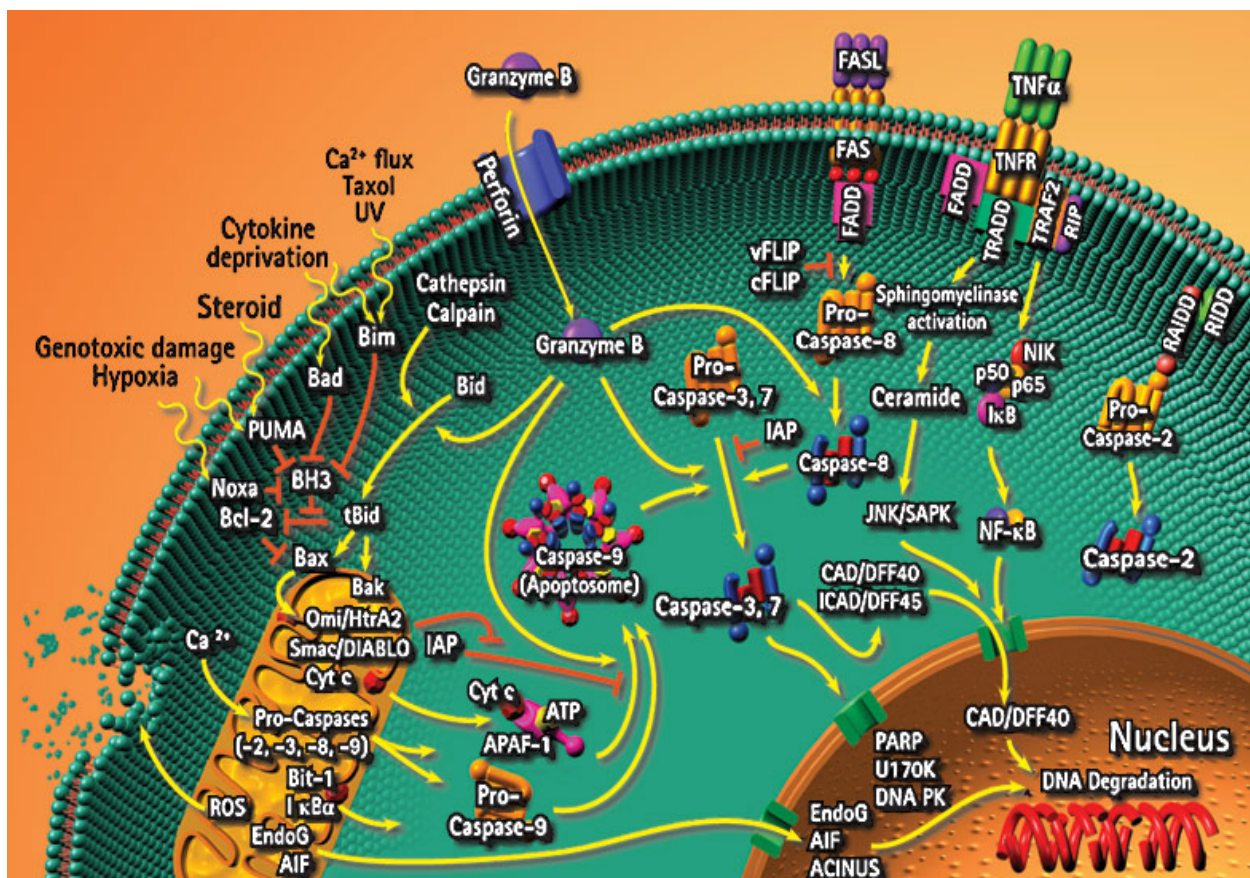
Il n'y a pas un mode uniforme de mort cellulaire programmé causé par les métaux de transition (Watjen *et al.* 2002b). Le processus apoptotique se caractérise par une cascade d'évènements biochimiques et moléculaires. Ces mécanismes constituent des programmes apoptotiques performants, présents dans la plupart des types cellulaires : ils peuvent être initiés par une variété de signaux intra- ou extra-cellulaires. L'activation de la voie de transduction du signal pro-apoptotique dépend du type cellulaire et d'éléments sub-cellulaires spécifiques de chaque stress. Cependant, les récepteurs membranaires activent la voie extrinsèque ou voie des récepteurs (Salvesen and Dixit 1997, 1999) et les mitochondries sont au centre de l'activation de la voie intrinsèque (Amarande-Mendes 1999; Gupta 2003; Kurz *et al.* 2007)(figure 26) mais des chevauchements existent entre ces différents types (Kurz *et al.* 2007; Lockshin and Zakeri 2004).

Dans le deuxième cas (voie intrinsèque ou mitochondriale), l'accroissement de perméabilité, l'altération du potentiel de la membrane interne de la mitochondrie, provoqué par des radicaux libres ou d'autres sources et qui ouvrent les canaux de la mitochondrie (Jimenez Del Rio and Velez-Pardo 2004; Lemasters *et al.* 1999), permet l'entrée d'eau dans le stroma mitochondrial entraînant le gonflement de la mitochondrie et une altération de la membrane externe suffisante pour libérer des produits de l'espace intermembranaire. La mitochondrie est clairement la cible majeur de la toxicité métallique (Al-Nasser 2000; Koizumi *et al.* 1994a; Koizumi *et al.* 1994b; Nieminen *et al.* 1990; Rauen *et al.* 2004a; Rauen *et al.* 2004b; Xiang and Shao 2003). Le cadmium par exemple induit une mort apoptotique. Cette apoptose dépendante du cadmium passe par le stress oxydant avec formation des radicaux libres qui vont entraîner un dysfonctionnement de la membrane mitochondriale (Lopez *et al.* 2006).

L'ouverture des canaux de la mitochondrie est régulée par des molécules de la famille Bcl-2 (Gross *et al.* 1999; Ravagnan *et al.* 2002). Cette famille est composée de molécules à effets anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Tsujimoto 2003; Tsujimoto and Shimizu 2000; Watjen *et al.* 2002b) et Bcl-xL (Ostrakhovitch and Cherian 2005a, b) et pro-apoptotiques tels que Bax et Bad (Borner 2003). La protéine Bcl-2 permettrait la séquestration de la pro-caspase-9 et donc l'inactivation de la caspase-9, ce qui pourrait inhiber l'activation des caspases (Susin *et al.* 1996; Tsujimoto 2003).

Parmi les produits libérés, on a deux produits apoptotiques dont le cytochrome C (transporteur d'électron soluble, faisant la navette entre les complexes membranaires

cytochrome C réductase et cytochrome oxydase) et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Ostrakhovitch and Cherian 2005a, b). Le cytochrome C se lie à une protéine cytoplasmique, l'APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor) ; le complexe formé peut activer une protéase, la caspase-9 qui peut à son tour activer la caspase-3, l'une des protéases effectrices majeures de l'apoptose ou d'autres mécanismes; responsables de la fragmentation de l'ADN et des changements morphologiques observés au niveau de la cellule (Janicke *et al.* 1998). Par contre, L'AIF migre dans le noyau de la cellule en apoptose où il induit une fragmentation de l'ADN (Susin *et al.* 1999a; Susin *et al.* 1999b). Il agirait par liaison directe avec l'ADN (Ye *et al.* 2002). En revanche, l'ordre de relargage de ces deux molécules (APAF-1 et AIF) varie en fonction du stimulus et du type cellulaire (Cande *et al.* 2002a; Cande *et al.* 2002b). La dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale est un événement précoce de l'apoptose (Vayssiere *et al.* 1994; Zamzami *et al.* 1996).



II-4. p53 normale et ses fonctions

La protéine p53 est impliquée dans l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, mais aussi la réparation de l'ADN. Elle est fortement impliquée dans la régulation de la NER au niveau transcriptionnel (induction des gènes codant pour les protéines de reconnaissance de la GGR comme XPC) ou par interaction avec XPB et XPD du complexe TFIIH. La protéine p53 correspond à une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés.

Cette protéine présente trois régions distinctes (figure 27):

- La région N-terminale qui correspond au domaine de transactivation. Cette région contient un domaine riche en proline (63-97 acides aminés) et requis pour l'apoptose p53-dépendante (Sakamuro *et al.* 1997).
- La région centrale qui représente le domaine de liaison spécifique à l'ADN. Ce domaine est situé entre les résidus 102 (ou 130) et 292 (ou 320).
- La région C-terminale qui est multifonctionnelle. Elle joue le rôle de régulateur négatif du domaine de liaison spécifique à l'ADN (Selivanova *et al.* 1997) et cette région est phosphorylée pour la différenciation cellulaire (Paramio *et al.* 2000).

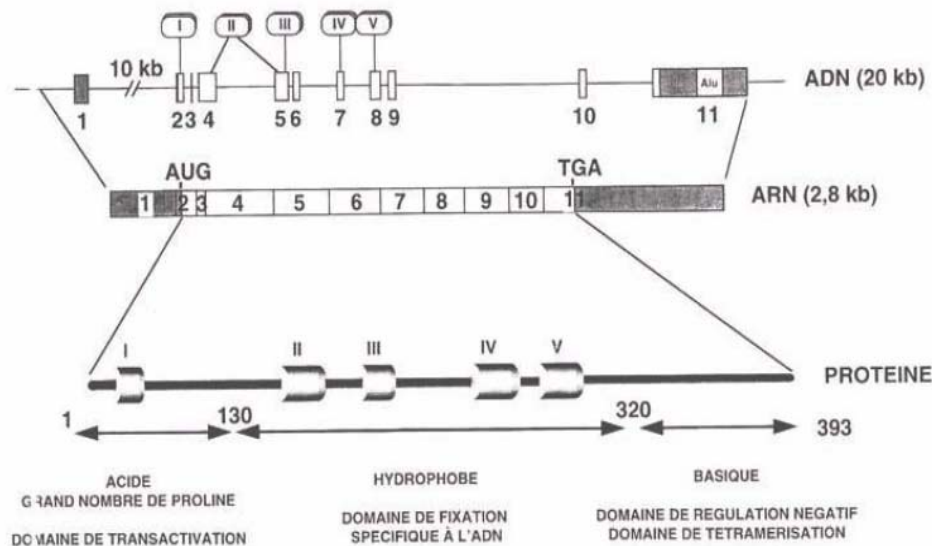


Figure 27 : Structure du gène et de la protéine p53 humaine. Le gène est localisé sur le bras court du chromosome 17, en position 17p13.1 et s'étend sur 20 kb. Ce gène est composé de 11 exons dont le premier, non codant se situe à une distance de 8 à 10 kb des exons 2 à 11. L'analyse de la partie codante de la séquence révèle la présence de cinq régions hautement conservées au cours de l'évolution (Portefaix *et al.*, CNRS UMR9921, Montpellier)

II-5. p53 et réponse cellulaire aux dommages de l'ADN

Quelque soit le mécanisme en cause, tel que le cadmium par exemple (Cao *et al.* 2007), les lésions de l'ADN sont capables d'induire une augmentation du taux de protéine p53 ainsi que son transport dans le noyau. Elle se fixe alors sur des séquences régulatrices de certains gènes déclenchant leur transcription. Les produits de ces gènes sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (p21, Bax, mdm2, ...) et dans l'apoptose (Fisher 1994). Le gène suppresseur de tumeur p53 apparaît ainsi comme l'élément clé du maintien de l'intégrité génomique (Oren 2003). Il a été montré que la liaison de p53 à l'ADN endommagé se fait sur sa partie C-terminale (Nelson and Kastan 1994).

En conditions physiologiques, la protéine est exprimée à très faible niveau, présente une demi-vie courte, et une activité transcriptionnelle faible. L'exposition des cellules aux métaux de transition induit l'accumulation de p53 ainsi que son activation. L'accumulation et l'activation de p53 par les métaux semblent être modulées par différentes modifications post-traductionnelles au niveau des domaines N- et C-terminal. En effet, en réponse aux radicaux libres générés par le cadmium, la protéine p53 est phosphorylée au niveau des sérines spécifiques comme la sérine 15 (Cao *et al.* 2007), ce qui permet son accumulation et son activation fonctionnelle (Bean and Stark 2001; Kapoor and Lozano 1998; Matsuoka and Igisu 2001).

Cette augmentation de la stabilité de la protéine permet ainsi sa translocation nucléaire et la transactivation de ses gènes cibles (Ko and Prives 1996; Levine 1997). En réponse aux dommages de l'ADN, l'activation de p53 joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité génomique car cette protéine peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, ce qui permet de réparer les dommages de l'ADN par excision de base et par excision de nucléotides, ou orienter les cellules trop endommagées vers l'apoptose (Cleaver *et al.* 2001; Ko and Prives 1996; Levine 1997; Offer *et al.* 1999; Starcevic *et al.* 2003). La protéine p53 est en effet capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ce qui permet la réparation des dommages de l'ADN. Cet arrêt du cycle cellulaire est principalement modulé par la transactivation de son gène cible le plus important, p21 (el-Deiry *et al.* 1993) mais également par le statut redox intracellulaire (Menon *et al.* 2005; Menon *et al.* 2003; Tu *et al.* 2005). La protéine p21 agit en inhibant l'activité des kinases dépendantes des cyclines (Cdk) qui sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (Boulaire *et al.* 2000). La protéine p21 peut, soit se lier à l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) (Waga *et al.* 1994) ce qui a pour effet de bloquer la réplication de l'ADN, soit induire l'apoptose lorsque la réparation

des dommages est impossible (Miyashita and Reed 1995)(figure 28).

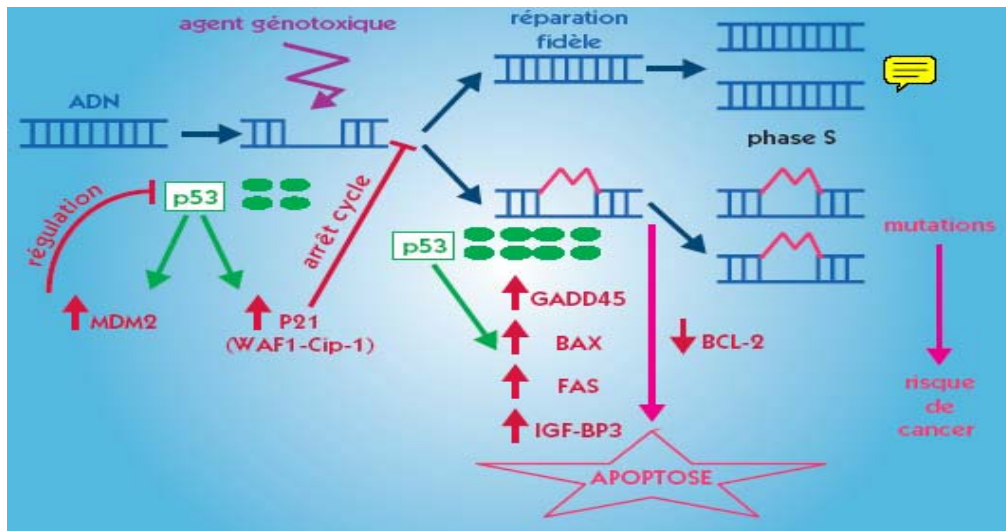


Figure 28 : les mécanismes de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose induits par la protéine p53(May 2000).

La régulation redox peut s'effectuer par l'inactivation de la protéine (Parks *et al.* 1997). L'oxydation simple d'un résidu situé dans le domaine de liaison à l'ADN peut conduire à une gêne stérique lors de l'interaction ADN/p53. De même le motif doigt de zinc de p53 participe aux interactions protéines-protéines ou protéines-ADN. Cette structure peut être compromise par la formation d'un pont disulfure ou grâce à une substitution du zinc par un autre métal tel que le cadmium ou le cuivre (Verhaegh *et al.* 1998) produisant un changement de conformation de la protéine préjudiciable à son activité. Ceci se traduit par une inhibition de l'activité de p53 (Meplan *et al.* 1999; Witkiewicz-Kucharczyk and Bal 2006).

C- Les métaux

Des études ont montré que les métaux sont capables d'induire plusieurs pathologies (Valko *et al.* 2005). Certains sont purement toxiques pour les êtres vivants (cadmium). D'autres sont essentiels à l'organisme et à l'entretien des fonctions biologiques, générant tout de même des effets toxiques passé un certain seuil de concentration (cuivre et zinc).

I. Cadmium

Le cadmium (Cd) était inconnu jusqu'au 19^{ème} siècle, quand ses caractéristiques physico-chimiques ont été mises en évidence et utilisées plus tard dans les batteries, pour protéger l'acier contre la corrosion ou encore comme stabilisant pour les plastiques et comme pigment dans les produits céramiques (Jarup 2002). Le Cd est un métal blanc argenté, brillant, il est malléable et ductile. Le Cd est un membre du groupe II des éléments du tableau périodique. Il ne participe à aucun processus vital et est toxique à de très faibles concentrations. Le Cd est un élément rare et réparti uniformément dans la croûte terrestre, où sa concentration moyenne est de 0,15 à 0,20 mg/kg (Fleischer 1974; Hiatt 1975). On le retrouve comme contaminant dans les sédiments, l'air, l'eau (Waisberg *et al.* 2003), dans l'agriculture et les rejets industriels, la fumée de cigarette (Fassett 1975; He *et al.* 2005; Jarup 2003; Trinchella *et al.* 2006). Le traitement des ordures ménagères reste le premier secteur responsable d'émissions de Cd. Le Cd est classifié comme un carcinogène de type I par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer et le programme national de toxicologie USA (IARC 1993; Oh *et al.* 2006; US NTP 2000; Who 1992). De plus, de nombreuses études ont démontré que ce métal peut induire de multiples cancers au niveau des reins, des poumons, des testicules ou de la prostate.

Les sources d'exposition au Cd chez l'homme sont l'alimentation (poissons, végétaux dont les légumes riches en fibres ; (Jarup 2002; Satarug and Moore 2004)) et le tabagisme. L'absorption intestinale de Cd chez l'homme est d'environ 30 µg/jour en fonction de l'âge, le sexe, ainsi que le régime alimentaire (Jarup 2002; Satarug and Moore 2004). L'efficacité de l'absorption du Cd est dépendante des conditions d'exposition : 5% du métal ingéré est absorbé par le tractus gastro-intestinal sous forme de sel, 90% du Cd inhalé est absorbé par voie pulmonaire (Jarup 2002).

Chimiquement, il ressemble beaucoup au zinc et peut le remplacer isomorphologiquement dans presque tous ses minerais (Cotton 1972; Lymburner 1974). Dans les différents tissus ou les cellules de l'organisme, le Cd se fixe sélectivement sur un certain nombre de molécules telles que les métallothionéines (MTs) qui assurent sa détoxification. De ce fait, le Cd entre en compétition avec les autres métaux (zinc, cuivre). L'exposition au Cd peut aussi stimuler la production de MTs, ce qui rend la demi-vie biologique du Cd très longue ; entre 10 et 30 ans (Goyer 1996; Stohs *et al.* 2000). Moins de 10% du Cd absorbé sont excrétés dans l'urine et les fèces, ce qui explique les différents dommages cellulaires suite à une exposition chronique (Jarup 2002). Les dommages relatifs à cette exposition sont des lésions hépatiques ou rénales, des dommages pulmonaires, un remodelage osseux pour des expositions extrêmes.

I-1. Influx et efflux de cadmium

N'ayant aucun rôle physiologique connu à ce jour, le Cd ne possède pas de voie d'entrée ou de sortie qui lui soit spécifique. Il agit donc en mimant les métaux physiologiques afin de traverser les membranes cellulaires. Parmi les protéines proposées se trouve le transporteur de métaux divalent de type I (DMT1) qui possède 4 isoformes (Hubert and Hentze 2002). DMT1 est une protéine de la membrane plasmique permettant l'import de fer. Ce transporteur a été identifié comme impliqué dans l'absorption du Cd intestinal (Barbier *et al.* 2004; Olivi *et al.* 2001; Tallkvist *et al.* 2001). Des études récentes ont montré que le Cd pouvait intégrer le milieu cellulaire grâce à un transporteur de zinc, le Zip8. La présence de ce transporteur dans la membrane plasmique des cellules vasculaires endothéliales de testicules de souris conduit à une augmentation de l'influx de Cd et une sensibilité exacerbée vis-à-vis du métal (Dalton *et al.* 2005; He *et al.* 2006). De plus, il semble que les canaux calciques permettent également l'entrée du Cd dans la cellule (Martelli *et al.* 2006).

Une littérature abondante décrit les protéines MRP (Multidrug Resistance Proteins) comme impliqué dans l'efflux de nombreux xénobiotiques. Il a été démontré que Mrp2 était le principal transporteur intervenant dans la sortie de cadmium biliaire conjugué au GSH (Ballatori *et al.* 2005; Dijkstra *et al.* 1996; Leslie *et al.* 2005; Paulusma *et al.* 1997).

I-2. Mécanismes de toxicité du cadmium

Le Cd est capable d'induire l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par des mécanismes indirects. Il est également décrit comme inhibiteur de la réparation de l'ADN (Waisberg *et al.* 2003). Ce métal peut avoir une toxicité importante par interférence avec des métaux essentiels comme le fer, le cuivre et le zinc. Les perturbations engendrées par le Cd aboutissent à plusieurs conséquences néfastes pour la cellule.

I-2.1. Radicaux libres générés par le cadmium

Les effets toxiques du Cd sont essentiellement indirects. Ce métal lourd non oxydo-réducteur en milieu biologique provoquerait la diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants (figure 29). Des expositions courtes au Cd semblent inhiber les enzymes de stress comme la SOD (Stohs and Bagchi 1995), la CAT et la GPx (Szuster-Ciesielska *et al.* 2000). Par contre des expositions prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes (Potts *et al.* 2001; Waisberg *et al.* 2003) et de l'expression de certaines protéines comme les métallothionéines, probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces molécules. L'autre possibilité expliquant l'augmentation des ERO en présence de cadmium correspond au déplacement des métaux constituant la structure des SODs (Filipic *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006). Ces altérations des molécules antioxydantes et de l'homéostasie des métaux physiologiques comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc (Aramini *et al.* 1995; Predki and Sarkar 1994) peuvent se traduire par une démétallation des protéines, une altération des fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs), une interférence dans la signalisation dépendante du calcium. L'impact du Cd sur toutes ces cibles peut entraîner l'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux hydroxyle, superoxyde, ou le peroxyde d'hydrogène (Fotakis *et al.* 2005; Galan *et al.* 2001; O'Brien and Salacinski 1998; Oh *et al.* 2006; Stohs *et al.* 2001; Waisberg *et al.* 2003) (figures 29 et 30). Les ERO vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines) (Ercal *et al.* 2001; Figueiredo-Pereira *et al.* 1998; Hansen *et al.* 2007; Hansen *et al.* 2006; Hengstler *et al.* 2003; Lopez *et al.* 2006; Youngs *et al.* 2000).

Gichner *et al.* (2004) ont démontré qu'aux faibles concentrations de Cd, les lésions induites sur l'ADN sont liées préférentiellement aux mécanismes indirects. Certains auteurs ont démontré que le Cd peut interférer avec la chaîne respiratoire de la mitochondrie et induire les ERO. En effet, il s'intercale entre la semi-ubiquinone et le cytochrome b du complexe III de la chaîne respiratoire. La semi-ubiquinone devient instable et transfère un électron à la molécule d'oxygène pour former l'anion superoxyde (Wang *et al.* 2004).

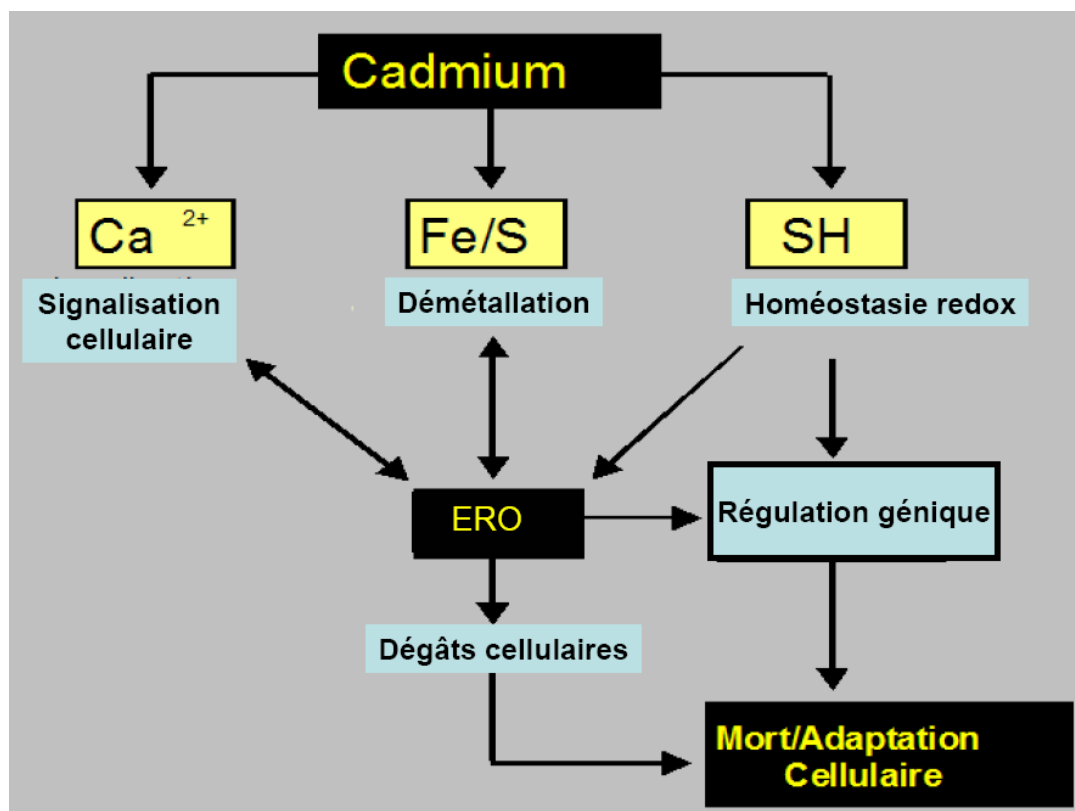


Figure 29 : L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO.

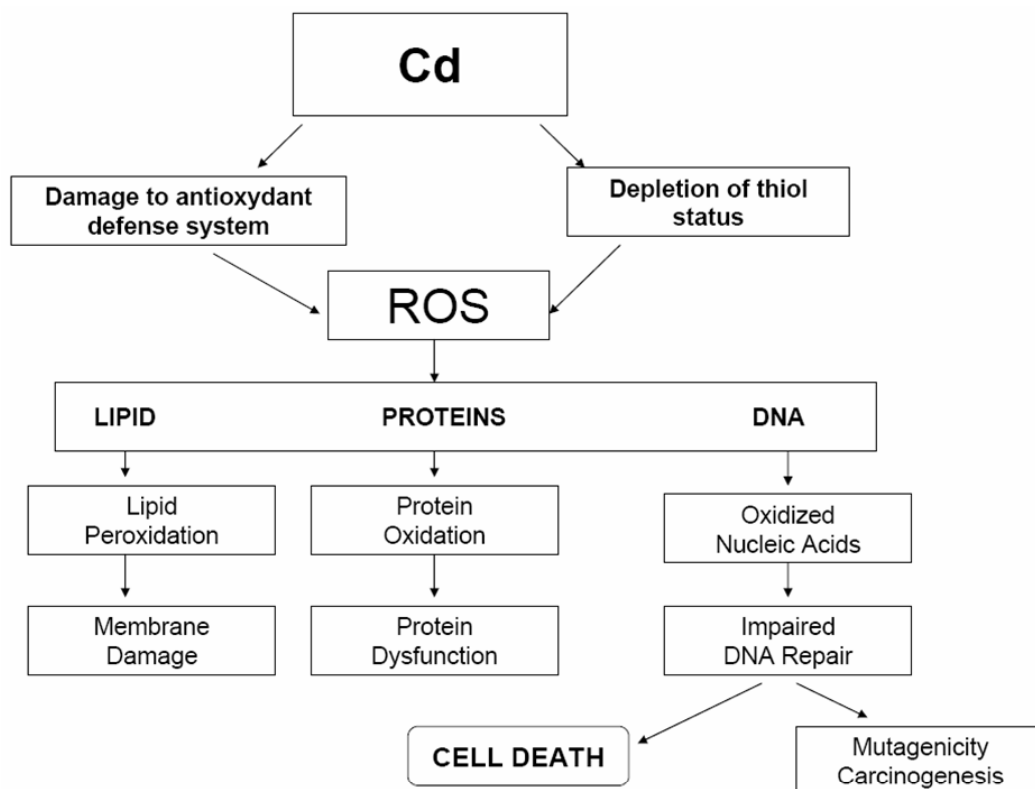


Figure 30 : Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd (Bonnefont-Rousselot 1994; Ercal et al. 2001)

I-2.2. Cadmium et signaux intracellulaires de calcium

Le cadmium peut altérer l'homéostasie du calcium qui est un système universel et un messager intracellulaire versatile (Berridge *et al.* 2000). Une intoxication au cadmium peut augmenter les taux de calcium via la protéine G couplée aux facteurs de liaisons de métaux (Faurkov and Bjerregaard 2002). L'activation de la phospholipase C et la production de l'IP3 (Phosphoinositide-binding protein) par hydrolyse de la phosphatidylinositol s'ensuivent (Faurkov and Bjerregaard 2002; Misra *et al.* 2002). Cette cascade de signalisation induite par le Cd, déclenche la libération du calcium de ses compartiments de stockage. Par conséquent, en dépit de son action inhibitrice sur de nombreux types de canaux calciques et les pompes (Kiss and Osipenko 1994), le cadmium peut induire une augmentation des concentrations cellulaires de calcium et ce dernier peut engendrer l'apoptose.

Un autre mécanisme par lequel le cadmium interfère avec l'homéostasie calcique est lié à sa capacité à moduler les récepteurs extracellulaires de calcium (Chang and Shoback 2004). Ainsi, le Cd peut profondément affecter les fonctions des cellules exprimant ce système de détection de calcium extracellulaire. Le cadmium peut également réguler les

signaux calciques en exerçant des effets opposés sur le contrôle interne de calcium, par la promotion de l'efflux de calcium du réticulum endoplasmique (Palade *et al.* 1989) ou en inhibant la réticulum sarcoplasmique calcium-ATPase (Beyersmann and Hechtenberg 1997).

I-2.3. Cadmium et inhibition de la réparation de l'ADN

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

L'exposition au Cd inhibe et modifie certaines protéines de la réparation par excision de base telle que la 8-oxoguanine DNA glycosylase de type I de l'homme (hOGG1). Cette enzyme permet la réparation de la 8-OHdG. Plusieurs études ont démontré que le Cd réprime les gènes hOGG1 (Bertin and Averbeck 2006; Potts *et al.* 2003). Le Cd peut également inhiber la synthèse de l'ADN (Cao *et al.* 2007). Toutes ces actions d'inhibition sont une contribution indirecte du Cd aux effets mutagènes et/ou à la carcinogénicité (Giaginis *et al.* 2006).

I-3. Maladies induites par le cadmium

I-3.1. Cancer

La lutte contre le cancer est l'axe de recherche biomédical le plus important des dernières années. Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la cancérogenèse Cd-induite. L'exposition au Cd a été associée aux cancers de poumons, de la prostate, du pancréas, du foie et des reins (Nawrot *et al.* 2006; Verougstraete *et al.* 2002; Waisberg *et al.*

2003). Il a été classé comme cancérigène de type I par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC). Les mécanismes de cancérisation sont principalement indirects. Plusieurs études ont montré que le Cd ne peut se lier à l'ADN que dans des expériences *in vitro*. *In vivo*, le Cd a une affinité beaucoup plus grande pour d'autres molécules comme les métallothionéines (Goering *et al.* 1993; Klaassen *et al.* 1999; Waalkes 2003). Les ERO générés par le Cd interviennent non seulement dans toutes les phases du développement d'un cancer mais aussi dans l'induction de certains proto-oncogènes : C-fos, C-jun, C-myc. D'autre part, l'exposition aux ERO favorise les dommages des bases de l'ADN dont la guanine oxydée en 8-OHdG (Bjelakovic *et al.* 2004a, b; Blumberg and Block 1994).

L'anion superoxyde et le système xanthine/xanthine oxydase qui le produit sont des promoteurs de la transformation néoplasique des cellules initiées. De nombreux polluants, incriminés dans la cancérogenèse, génèrent des ERO (Pryor 1992) ; y compris le Cd (Filipic *et al.* 2006) (figure 31).

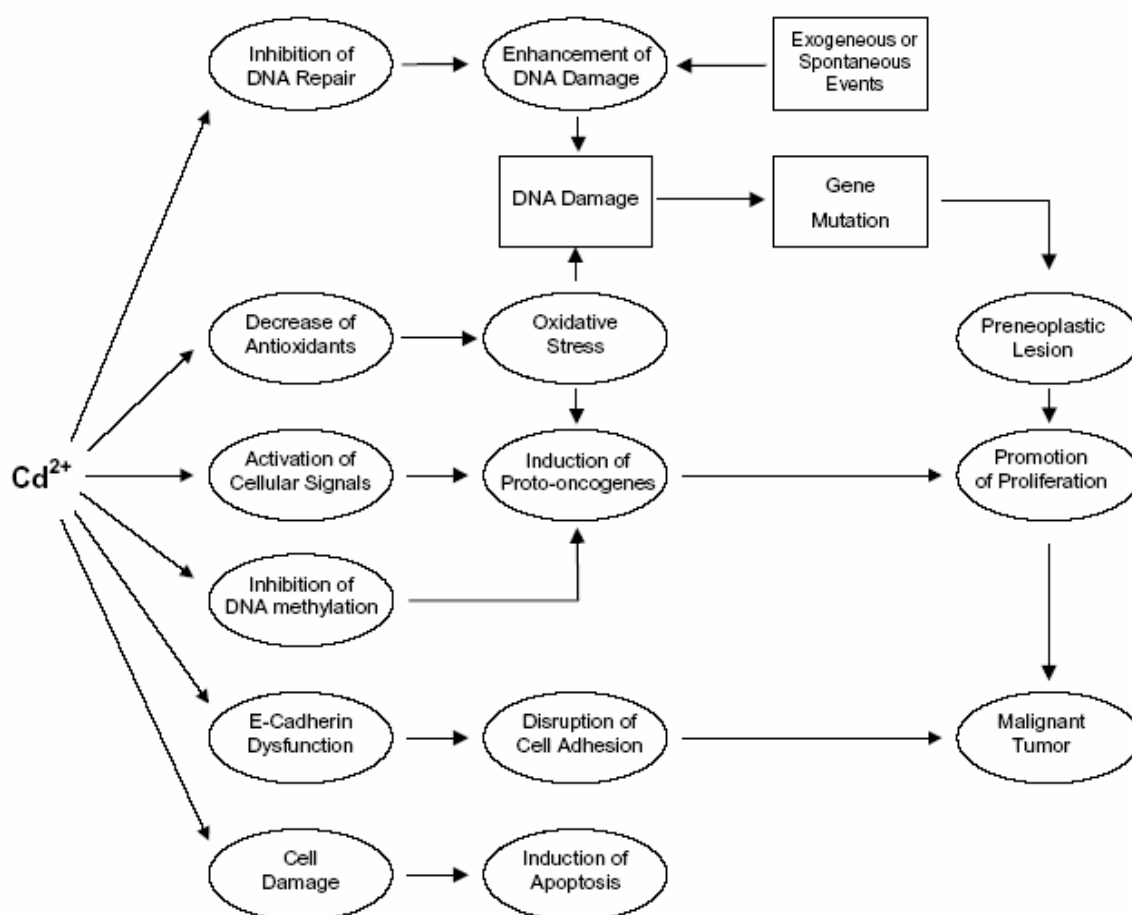


Figure 31 : Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium (Waisberg *et al.* 2003). Dans la première colonne, sont décrites les cibles biochimiques immédiats du Cd. La deuxième colonne présente les conséquences au niveau de la physiologie cellulaire : inhibition de la réparation 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.

Le Cd peut non seulement induire le stress oxydant mais aussi la production indirecte des lésions en interférant avec les systèmes de réparation de l'ADN pour amplifier le niveau des mutations dues à des agents génotoxiques (voir chapitre I-2.2. ci-dessus). Le Cd peut également favoriser la croissance de tumeurs par l'inhibition de la méthylation de l'ADN (Dainiak and Tan 1995).

I-3.2. Toxicité hépatique et rénale

Le cadmium est un des toxiques professionnels et environnementaux les plus dangereux. Chez des travailleurs exposés comme dans la région du comté de Kalmar en Suède, en Belgique ou dans le bassin du Jinzu au Japon, des effets néphrotoxiques élevés sont observés (Satarug and Moore 2004). Les lésions rénales se traduisent par une augmentation de la protéinurie tubulaire (excrétion de protéines de faible masse molaire) pouvant évoluer vers des dommages glomérulaires avec une forte diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire se caractérisant par une excrétion urinaire de protéines de grande masse molaire, une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés, de calcium et réduction de la capacité de concentration des reins. Le Cd inhibe aussi la réabsorption de calcium en bloquant un canal calcique situé dans le tubule distal, et cela conduit à une hypercalcinurie et à la formation d'un caillot (Barbier *et al.* 2004).

Le Cd absorbé via la voie gastro-intestinale ou pulmonaire peut aboutir au foie grâce à la circulation sanguine et complexé à diverses protéines comme l'albumine. Dans le foie, le Cd peut se conjuguer au glutathion (GSH) ou aux métallothionéines (MTs). Les complexes Cd-GSH et Cd-MTs formés arrivent ensuite au niveau des tubules proximaux où ils sont excrétés à hauteur de 50% et réabsorbés à hauteur de 50% par endocytose (Barbier *et al.* 2005). Les complexes réabsorbés sont dégradés par les lysosomes libérant du cadmium susceptible d'interagir d'autres composants cellulaires et de les endommager si le métal n'est pas repris en charge.

I-3.3. Toxicité pulmonaire

Le contenu en cadmium du tabac est élevé à cause des propriétés des plantes *Nicotiana* qui peuvent accumuler le Cd en se préservant de ses effets délétères. Le Cd présent dans le tabac varie entre 0,5 à 1 µg/cigarette. Environ 10% de l'oxyde de Cd inhalé se dépose dans les alvéoles pulmonaires ce qui conduit aux fibroses interstitielles, aux emphysèmes (Hart *et al.*

2001) et aux adénocarcinomes pulmonaires (Waalkes 2003). Les mécanismes provoquant ces pathologies ne sont pas entièrement compris mais la capacité du Cd à produire un stress oxydant semble importante dans le processus de cancérogenèse. 30 à 40% du Cd passe dans la circulation sanguine par un mécanisme non élucidé à ce jour mais qui pourrait utiliser le transporteur de métaux divalent de type I (DMT1). Les fumeurs ont une concentration sanguine de Cd de 4 à 5 fois plus élevée que les non-fumeurs et il s'accumule 2 à 3 fois plus de Cd dans les reins (Satarug and Moore 2004).

I-3.4. Autres maladies

Il existe d'autres types de maladies comme les maladies neurodégénératives qui sont devenues un enjeu majeur de la recherche biomédicale avec l'augmentation de la durée de vie ; ou les maladies cardio-vasculaires qui occupent la première place dans les causes de mortalité en occident. De très importantes recherches ont été et sont encore menées qui ont conduit à l'élaboration d'un schéma de l'altération du système cardio-vasculaire avec le stress oxydant. Le stress oxydant généré par le cadmium (Cd) pourrait être un facteur important dans plusieurs perturbations neurologiques comme les maladies d'Alzheimer et Parkinson (Watjen and Beyersmann 2004).

Par ailleurs, le syndrome d'Itaï-Itaï constitue la forme la plus sévère d'intoxication chronique par le Cd observée chez l'humain. Ce syndrome est endémique de la région du bassin de la rivière Jinzu dans la préfecture de Toyama (Japon) polluée par le cadmium provenant de mines de zinc, le cadmium étant rejeté dans la rivière comme sous-produit. Le syndrome d'Itaï-Itaï (littéralement syndrome « aïe-aïe ») se caractérise par une ostéomalacie et une ostéoporose associées à un dysfonctionnement des reins. Le contenu en Cd dans le squelette des individus affectés est beaucoup plus important que chez les individus non exposés (2,7 µg/g comparé à 0,3 µg/g pour les hommes et 1,8 µg/g comparé à 0,6 µg/g pour les femmes ; (Jarup 2002)). Au stade le plus avancé de la maladie, les os se brisent au moindre choc occasionnant de multiples fractures extrêmement douloureuses qui sont à l'origine du nom de la maladie. Les personnes souffrant de malnutrition ainsi que les femmes ménopausées y sont plus particulièrement sensibles (Kjellstrom 1986). L'exposition au Cd peut également être responsable d'anémie chez l'humain (Horiguchi *et al.* 1994) et chez les rongeurs (Hiratsuka *et al.* 1996; Sakata *et al.* 1988).

II. Cuivre

Le cuivre est largement distribué dans la nature et c'est un élément essentiel à la vie. Le corps humain adulte en contient 80 mg. Il intervient, à l'état physiologique, dans les défenses antioxydantes par l'intermédiaire des enzymes telles : la superoxyde dismutase à cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD) cytoplasmique (Bielski 1995; Halliwell and Gutteridge 1984). Il possède deux degrés d'oxydation +I et +II. La forme Cu^{2+} , est la plus stable et le pouvoir prooxydant du couple $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ est utilisé dans divers réactions d'oxydo-réduction par de nombreuses enzymes cupro-dépendantes (Linder *et al.* 1999). Dans le tableau 2 ci-dessous sont mentionnées les fonctions des principales enzymes dépendantes du cuivre.

Métalloenzymes	Fonctions
Superoxydes dismutase (Cu/Zn SOD)	Dismutation des anions superoxydes
Cytochrome C oxydase	Production d'énergie
Histaminase	Dégradation de l'histamine
Lysyl oxydase	Liaisons inter-fibrillaires d'élastane et de collagène
Dopamine β -hydroxylase	Production de catécholamines
Tyrosinase	Production de mélanine
Amine oxydase	Oxydation des amines primaires
Peptidylglycine monooxygénase	Bioactivation des hormones peptidiques
Céruloplasmine	Ferroxydase et transport du cuivre
Facteur V	Coagulation sanguine
Angiogénine	Angionénèse

Tableau 2 : Fonctions des principales cuproprotéines

II-1. Influx et efflux de cuivre

L'entrée du cuivre dans la cellule se fait essentiellement par des mécanismes qui dépendent des canaux membranaires. La réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par des réductases membranaires favorise cette entrée (figure 32). Chez l'homme, le gène hCTR1 code une protéine incorporant le cuivre (Zhou and Gitschier 1997). Une fois dans la cellule, le Cu^+ est distribué par les différentes protéines chaperones à Cu vers les différents compartiments cellulaires (Harrison *et al.* 2000). L'efflux du Cu en excès est facilité par des ATPases.

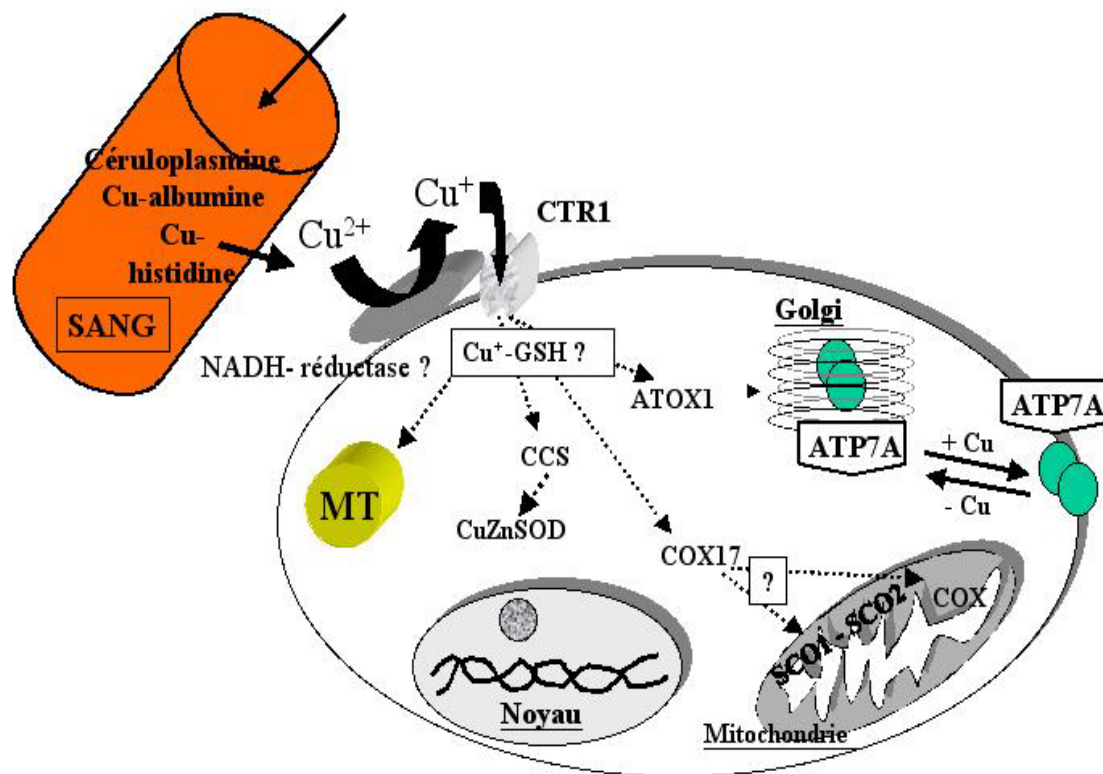


Figure 32 : Métabolisme du cuivre dans la cellule en général. ATOX1 : protéine antioxydante 1; ATP7A : protéine Menkes; CCS : chaperonne à cuivre de la superoxyde dismutase; COX : cytochrome c oxydase; COX17 : protéine d'assemblage de la cytochrome c oxydase; CTR1 : protéine de transport du cuivre; GSH : glutathion réduit; MT : métallothionéine; SCO1/SCO2 : protéines de synthèse de la cytochrome oxydase (Guiraud, Horn, Favier EMC, 2003).

II-2. Effets toxiques du cuivre et pathologies

Le cuivre peut s'accumuler et devenir toxique pour la cellule. Les mécanismes de toxicité sont à la fois liés au stress oxydant et aux interactions directes avec les composants cellulaires. En effet, le Cu^+ réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour générer le radical hydroxyle (HO°) (Aust *et al.* 1985; Krumschnabel *et al.* 2005; Stohs and Bagchi 1995), un radical très réactif et qui peut causer des dommages cellulaires.



Les effets toxiques du cuivre peuvent également résulter de l'affinité des ions Cu^{2+} pour l'ADN (Agarwal *et al.* 1989; Bremner 1998; Sagripanti *et al.* 1991). L'autre mécanisme de toxicité du cuivre en excès est la modification des structures en doigts de

zinc de certains facteurs de transcription qui ne peuvent plus se lier à l'ADN (Pascale Guiraud 2003; Pena *et al.* 1999).

II-2.1. Maladies héréditaires du métabolisme du cuivre

L'homéostasie du cuivre est primordiale et son dérèglement entraîne deux maladies génétiques. Il s'agit des maladies de Menkes (Kodama *et al.* 1999) et de Wilson (Ferenci 1999). La maladie de Wilson résulte de l'accumulation de cuivre au sein de plusieurs organes et tissus. Elle se présente sous différentes variétés cliniques, les plus communes étant des maladies du foie, une anémie et des troubles neuropsychiatriques. Cette accumulation de cuivre résulte d'un défaut de la protéine Cu-ATP7B (ou protéine Wilson) de type P. Le gène qui code cette protéine est situé sur l'autosome 13 chez l'homme (Klaassen *et al.* 1999). Cu-ATP7B transporte le cuivre de façon spécifique (Solioz and Vulpe 1996). Elle permet aussi l'incorporation du cuivre dans les cuproprotéines et le relargage du cuivre dans la bile. L'accumulation de Cu engendre des cirrhoses hépatiques ainsi qu'une neurodégénérescence (DiDonato and Sarkar 1997).

La maladie de Menkes est une maladie neurodégénérative. Le cuivre, ingéré oralement, s'accumule dans l'intestin et l'absorption par les autres organes et tissus (sang, foie, cerveau) est défectueuse. Le syndrome de Menkes est dû à une mutation du gène ATP7A, localisé sur le chromosome X (Klaassen *et al.* 1999) ; gène qui code pour une protéine Cu-ATP7A qui est aussi de type P. C'est une protéine membranaire qui représente le premier transporteur spécifique de Cu découvert chez les eucaryotes (Solioz and Vulpe 1996). La neurodégénérescence et l'hypothermie sont les principaux symptômes de cette maladie qui peut entraîner la mort au stade infantile (Linder and Hazegh-Azam 1996). Cependant, la cause de cette neurodégénérescence Cu-dépendante reste mystérieuse.

II-2.2. Maladies neurodégénératives et rôle du cuivre

La surproduction des espèces réactives de l'oxygène Cu-dépendante, joue un rôle important dans la mort neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer (Multhaup *et al.* 1998; Rotilio *et al.* 2000).

La sclérose latérale amyotrophique est une autre maladie neurodégénérative liée aux neurones moteurs. Un gène anormal a été identifié comme celui de la Cu/Zn-SOD (Rosen *et*

al. 1993). Par comparaison au gène normal, la forme mutée possède le même nombre d'ions Cu et garde l'activité dismutase, par contre, elle produit beaucoup plus de radicaux libres en présence de peroxyde d'hydrogène. Cela est probablement dû à une altération de la spécificité pour son substrat (Rotilio *et al.* 2000).

III. Zinc

Le zinc (Zn) est un métal physiologique qui intervient dans les grandes voies métaboliques, soit comme cofacteur, soit comme constituant de la structure d'enzymes telles que la phosphatase alcaline, la glutamate deshydrogénase ou la superoxyde dismutase (action anti-oxydante) etc. Il agit comme constituant structural d'un grand nombre de facteurs de transcription, ce qui explique son rôle pivot dans le contrôle de l'expression génique (Kindermann *et al.* 2005). Le nombre d'enzymes à zinc est impressionnant, Vallee et Auld (1990) ont identifié plus de 200 enzymes à Zn. Cependant, le Zn peut inhiber des enzymes comme la protéine tyrosine phosphatase et la caspase-3 (Chimienti *et al.* 2001). Le Zn intervient aussi dans la croissance et la prolifération cellulaire (Chesters 1989; Prasad 1996), dans la réponse immunitaire (Schroeder 1990), dans la reproduction (Chia 2000; Henkel 1999; Netter 1981), dans le métabolisme d'hormones (Favier 1992), dans la protection contre les radicaux libres (Chimienti 2001; Chvapil 1977; Cousins 1987; Favier 1995; Koukay 1987; Wilson 1988). L'homéostasie du Zn cellulaire repose sur un équilibre entre des systèmes d'import permettant son entrée dans la cellule, des systèmes de sortie vers l'extérieur, des systèmes de stockage et d'échange et notamment les métallothionéines (MTs) (figure 33). Les MTs contrôlent l'homéostasie du Zn et du Cu en stockant ou en échangeant ces oligoéléments avec d'autres protéines (Sève 2002).

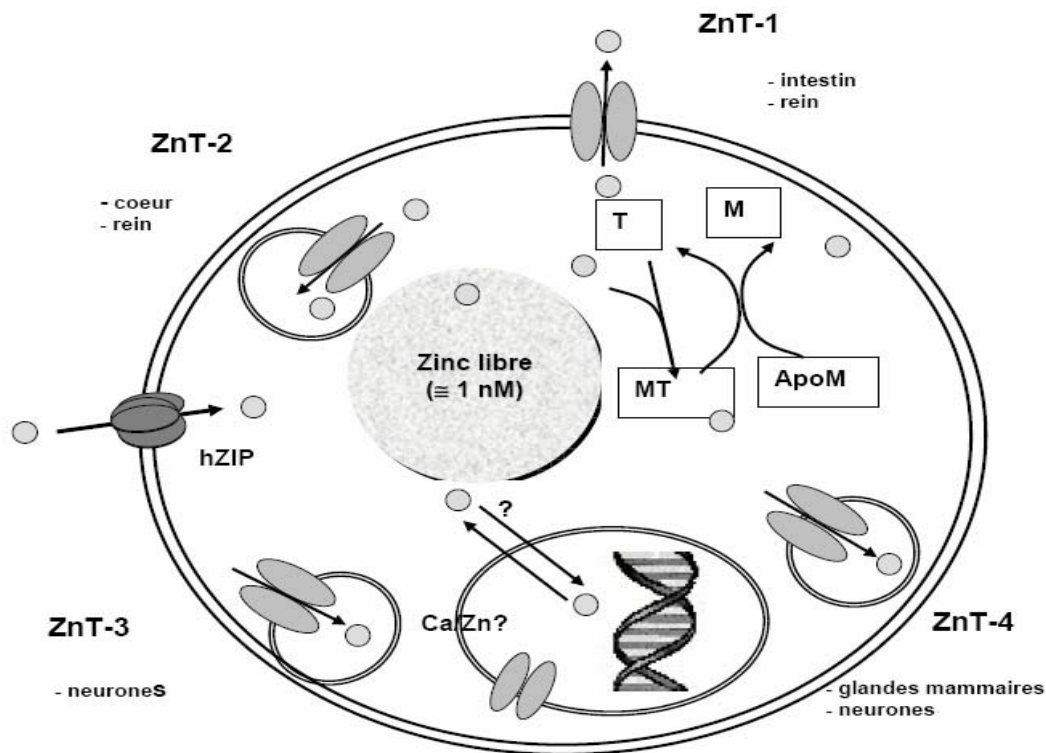


Figure 33 : Intégration des systèmes de contrôle du zinc cellulaire. Les différents canaux zinc, permettant l'entrée ou la sortie du zinc dans la cellule ou ses organites, sont représentés. Leur localisation dans l'organisme est indiquée sur le schéma. Les transporteurs de la famille ZIP sont impliqués dans l'entrée du zinc dans la cellule. Les canaux de la famille des ZnT-x assurent la sortie du zinc vers le milieu extracellulaire ou dans des vésicules intracytosoliques. Des canaux calcium/zinc de la membrane nucléaire interne participent au contrôle du zinc nucléaire. Le couple Thionéine/Métallothionéine permet l'apport de zinc aux métalloprotéines et participe activement au contrôle de l'homéostasie cellulaire du zinc, en étant présente dans le cytosol et le noyau. MT: Métallothionéines. T: Thionéines. Prot: apoprotéines. Prot-Zn: Métalloprotéines (Thèse de Fabrice Chimienti, 2001).

III-1. Influx et efflux de zinc

Les protéines de la superfamille ZIP (Zrt/Irt-like Proteins, SLC39) captent le Zn extracellulaire ou des organites internes pour l'envoyer vers le cytosol assurant ainsi l'approvisionnement de la cellule en ce métal (Cousins *et al.* 2006).

Concernant l'efflux, ce sont les membres de la famille ZnT (SLC30) qui expulsent le Zn pour éviter un excès de ce métal (figure 33). Ces transporteurs interviennent également dans le stockage du Zn.

III-2. Effets toxiques du zinc

A forte dose, le Zn possède un effet toxique. Ses mécanismes de toxicité restent mal connus.

III-2.1. Radicaux libres induits par le zinc

L'excès général ou localisé de zinc est responsable de son effet toxique. Le Zn peut ainsi passer d'un rôle antioxydant à un rôle prooxydant : à l'état libre, ce dernier serait à l'origine de la formation indirecte de radicaux libres. Ces hypothèses sont confirmées par certaines études notamment celle de (Sensi and Jeng 2004) réalisée sur les neurones. La séquestration du Zn en excès par la mitochondrie se traduirait par un dysfonctionnement de la mitochondrie caractérisé par un relargage prolongé des ERO (Sensi and Jeng 2004).

Dans les autres types cellulaires, le Zn a été identifié comme inducteur de la formation de H₂O₂ (May and Contoreggi 1982). Le Zn en excès semble également inhiber les glutathion réductase et peroxydase ; enzymes majeures et responsables des défenses antioxydantes (Mize and Langdon 1962; Mize *et al.* 1962; Splittgerber and Tappel 1979). Cette inhibition se fait essentiellement par interaction du Zn avec les groupements thiols localisés dans ou proche des sites actifs. Ces observations sont confortées par d'autres données qui ont suggéré que l'exposition des cellules de foie à 30 µM de Zn se traduisait par une inhibition des enzymes à glutathion (GSH). Cette inhibition a pour conséquence la diminution du GSH, l'augmentation du GSSG et un déséquilibre de la balance oxydative en faveur des radicaux libres (Meister and Anderson 1983; Parat *et al.* 1997). L'excès de Zn s'accompagne d'une diminution de GSH et d'un stress oxydant impliqué dans les maladies neurodégénératives (Bains and Shaw 1997; Chen and Liao 2003; Schulz *et al.* 2000). (Kim *et al.* 1999) ont également apporté la preuve que le Zn peut induire la mort des neurones via la production des ERO. Ces auteurs ont observés une augmentation de la peroxydation lipidique après incubation des cellules avec des concentrations de Zn ≥ 40 µM.

L'autre mécanisme de toxicité du Zn serait lié au déplacement du cuivre et du fer moléculaire. Le cuivre et le fer déplacés vont ensuite catalyser la production des espèces réactives de l'oxygène. Les études de (Walther *et al.* 1999) ont prouvées que 100 µM de Zn sont toxiques pour les cellules pulmonaires en culture. L'effet des doses toxiques s'accompagne en 2 h, d'une diminution de la synthèse protéique et du glutathion total de 20% et d'une augmentation du glutathion oxydé (Walther *et al.* 1999).

III-2.2. Autres effets toxiques et pathologiques du zinc

Le Zn peut également provoquer la diminution des fonctions immunes et une dépression respiratoire.

Une étude récente a démontré l'implication du Zn sur la production mitochondriale des ATP. En effet, le Zn inhibe l'aconitase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante, la succinate déshydrogénase et la cytochrome C oxydase (Lemire 2007). Ces différentes inhibitions se traduisent par un dysfonctionnement de la mitochondrie et par des pathologies liées à l'incapacité à produire de l'énergie.

Par ailleurs, l'administration de chlorure de zinc aux rats provoque une réduction significative de la fertilité, du poids corporel, de la taille du cerveau, du foie, des reins et des vésicules séminales (Khan *et al.* 2007).

IV. Remplacement du zinc par le cadmium et le cuivre

Les mécanismes de toxicité du Cd par interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels interviennent à plusieurs niveaux. Ce processus de toxicité est complexe du fait que le Cd utilise les voies physiologiques dédiées à plusieurs autres métaux indispensables à la cellule. Comme le Cd ne possède aucune voie d'influx qui lui soit propre, il peut utiliser celle du zinc. De plus sa longue demi-vie lui permet d'interférer avec de nombreuses protéines dépendantes de métaux essentiels. Cela est illustré notamment par l'interférence avec le zinc via les métallothionéines sur lesquelles le Cd se fixe ; ou via les facteurs de transcription à doigts de Zn (figure 34) comme TFIII-A (Hanas and Gunn 1996; Huang *et al.* 2004a; Huang *et al.* 2004b). Le concept d'interférence entre Zn et Cd via les protéines à Zn est également valable pour le calcium, le fer, le cuivre. Le Cd peut modifier les signaux calciques intracellulaires, apportant un changement du taux calcique avec des conséquences sur les voies de signalisation. Les altérations de l'activité des enzymes seraient dues au remplacement du zinc ou du cuivre par le cadmium (Pillai and Gupta 2005). Huang *et al.* (2006) ont démontré que le Cd induit une diminution de la teneur en Cu et en Zn de certaines enzymes. Il en résulte des changements de conformation et une inhibition de l'activité de l'enzyme (Cu/Zn-SOD par exemple). Ainsi, la dérégulation de l'homéostasie du fer ou du cuivre par le Cd peut conduire à la production des espèces réactives de l'oxygène. Par ailleurs, l'excès de cuivre peut conduire à la dérégulation de l'homéostasie du Zn moléculaire et vice-

versa. L'impact du Cd sur les concentrations internes de métaux entraîne une altération des activités cellulaires (Fotakis and Timbrell 2006; Martelli *et al.* 2006; Yang *et al.* 2000).

Les mécanismes de remplacement d'un métal par un autre ne sont pas totalement compris. Ce remplacement peut être réalisé dans un rapport stœchiométrique dans le cas du Cd et du Zn (voir valence dans le tableau 3), car ces deux métaux sont liés de façon identique aux métallothionéines (MTs). Ceci semble être une règle générale pour tous les cations divalents fixés sur les MTs avec le rapport 7 atomes de métal par métallothionéine. En effet, des échanges entre le Zn fixé aux MTs et d'autres protéines ou facteurs de transcription ont été démontrés (Cano-Gauci and Sarkar 1996; Maret 1994; Roesijadi 2000; Zeng *et al.* 1991a; Zeng *et al.* 1991b). Ces échanges sont fonction des différentes constantes de dissociation (K_d) des protéines impliquées. Or, le K_d va être modulé par le potentiel redox de la cellule, lui même influencé par le Zn libre, le pouvoir réducteur des MTs (Jacob *et al.* 1998; Maret 1994; Miles *et al.* 2000; Parks *et al.* 1997) mais aussi par le Cd.

Le cas du cuivre (Cu) est différent car il est fixé sur les MTs sous forme d'ion monovalent (tableau 3) et le ratio métal/protéine étant alors de 10 atomes de Cu par MT. La très forte affinité du Cu pour les MTs fait que le Zn est très facilement remplacé de ces protéines.

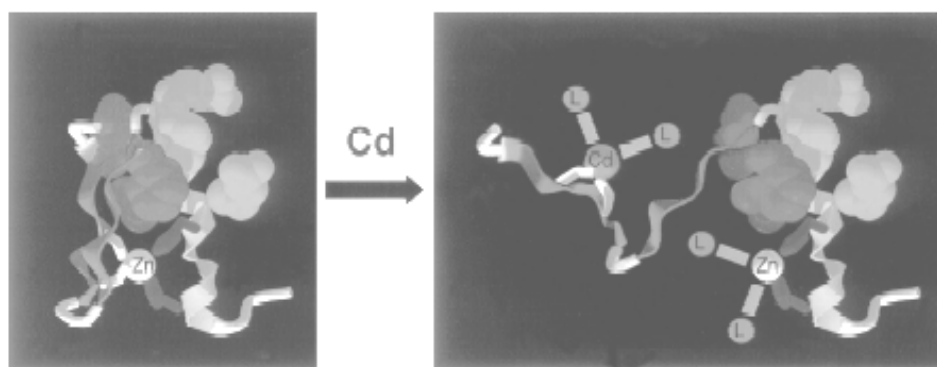


Figure 34 : modulation structurale possible du motif doigt de zinc par le cadmium (Cd). Le cadmium peut inhiber la liaison à l'ADN en altérant la structure doigt de zinc. Les effets du Cd seraient démontrés par la fluctuation des facteurs cellulaires (L) qui forment des complexes mixtes (Hamada *et al.* 1997).

Propriétés	Cd(Cl ₂)	Cu(Cl ₂)	Zn(Cl ₂)
Masse molaire (g/ mol)	183,3	136,27	134,45
Valence	Cd ²⁺	Cu ⁺ ; Cu ²⁺	Zn ²⁺
Solubilité	H ₂ O ; acétone ; ~ MeOH et EtOH	H ₂ O ; MeOH ; ~ EtOH	H ₂ O ; HCl ; alcool, glycérol
Potentiel redox	$\text{Cd}^{2+} \rightleftharpoons \text{Cd}$ -0,4	$\text{Cu}^{+} \rightleftharpoons \text{Cu}$; 0,521 $\text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons \text{Cu}^{+}$ 0,153	$\text{Zn}^{2+} \rightleftharpoons \text{Zn}$ -0,76
DJA (mg/ Kg PC; voix orale)	7.10 ⁻³	~ 0,14	~ 0,5-6
Dans l'air (mg/ m ³)	~ 1,8.10 ⁻⁶	~ 1	~ 1
Carcinogénicité (IARC)	Groupe I	Groupe III	Pas de données
DL50 (selon les espèces ; voix orale)	0,18 g/ Kg : rat 0,06 g/ Kg : souris	15-857 mg/ Kg : rat 1124 mg/ Kg : rat (voix cutanée)	1,1 g/ Kg : rat 1,26 g/ Kg : souris

Tableau 3 : Quelques propriétés physicochimiques et toxiques des trois métaux utilisés dans cette étude (ATSDR, 2007 ; Handbook of chemistry and physics, CRC Press)

Objectifs

La prise de conscience des conséquences potentielles de la pollution de l'environnement sur la santé humaine a relancé l'intérêt de la toxicologie environnementale envers les problèmes sanitaires liés aux métaux comme le cadmium, le cuivre et le zinc. L'intérêt grandissant pour l'étude de la toxicité de ces métaux est dû à leur utilisation industrielle et à leur capacité à provoquer des intoxications importantes qui peuvent par la suite aboutir à un certain nombre de pathologies. Ces pathologies sont le résultat d'un jeu complexe de mécanismes parmi lesquels on trouve le stress oxydant. Bien qu'il existe une littérature et des hypothèses abondantes sur ce sujet, les mécanismes entraînant un stress oxydant dû au cadmium, au cuivre et au zinc, la réponse et l'adaptation cellulaire vis-à-vis de la toxicité de ces trois métaux sont toujours discutés et peu étudiés dans certains organes comme la peau. Certaines études ont par exemple suggéré que le Cd pouvait potentialiser les effets cancérogènes des UV sur la peau (Jourdan et al, 2002 ; Yamada et al, 2004). Il semble d'une part que la toxicité du cadmium passe en partie par une altération de l'homéostasie de métaux biologiquement importants comme le cuivre et le zinc ; et d'autre part que ces trois métaux peuvent interagir avec les métallothionéines.

Ces recherches sont d'actualité puisqu'un programme national de recherche « toxicologie nucléaire et environnementale » a été mis sur pied pour comprendre l'impact du cadmium. Nous allons chercher dans ce travail à comprendre les effets toxiques du cadmium du cuivre et du zinc ainsi que la place des métallothionéines dans l'adaptation des cellules face aux agressions par ces métaux à travers les questions suivantes :

- Quel rôle le stress oxydant joue-t-il dans la toxicité de ces trois métaux ?
- Comment le cadmium, le cuivre et le zinc contribuent-ils à l'expression des métallothionéines ?
- Quel est le type de mort cellulaire induit par ces métaux ?

Pour une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques en cause, nos travaux ont été menés sur deux modèles cellulaires.

Présentation des modèles cellulaires utilisés.

Les différents travaux (publications, travaux de thèse) menés au sein du laboratoire ORSOX ont montré que le cadmium pourrait potentialiser la toxicité des UV sur la lignée HaCaT (Jourdan *et al.* 2002). Ceci pourrait être délétère en cas de contact direct du cadmium avec la peau. Par ailleurs, certains auteurs ont montré une cytotoxicité du cadmium, du cuivre et du zinc sur les kératinocytes humains (Bae *et al.* 2001; Kappus and Reinhold 1994) sans pour autant définir les mécanismes de cette toxicité. Les kératinocytes seraient donc une cible potentielle des métaux mais une cible qui reste aujourd'hui peu documentée. Les cellules HaCaT utilisées sont mutées au niveau du gène de p53 (Boukamp *et al.* 1988; Fusenig and Boukamp 1998) ; ce qui en fait un outil de choix dans l'étude de la mort cellulaire indépendante de p53. Les mutations ont des effets sélectifs sur les fonctions biologiques de p53. Elles compromettent la stabilité de p53 et sa capacité à activer ses gènes cibles : inhibition de la transactivation, de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, incapacité à induire l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN (Johnson *et al.* 2005; Lehman *et al.* 1993). Cette mutation de p53, par les UV, a conduit à l'immortalisation des cellules (Boukamp 1994). L'exposition aux UV engendre des transitions cytosine-thymine ($C \rightarrow T$; $CC \rightarrow TT$) caractéristiques de la formation de dimères UV-induite (Nakazawa 1993). Ces mutations ont été identifiées sur le codon 179 ($C \rightarrow T$), mais aussi sur les codons 281-282 ($CC \rightarrow TT$) (Lehman *et al.* 1993) (figure 35).

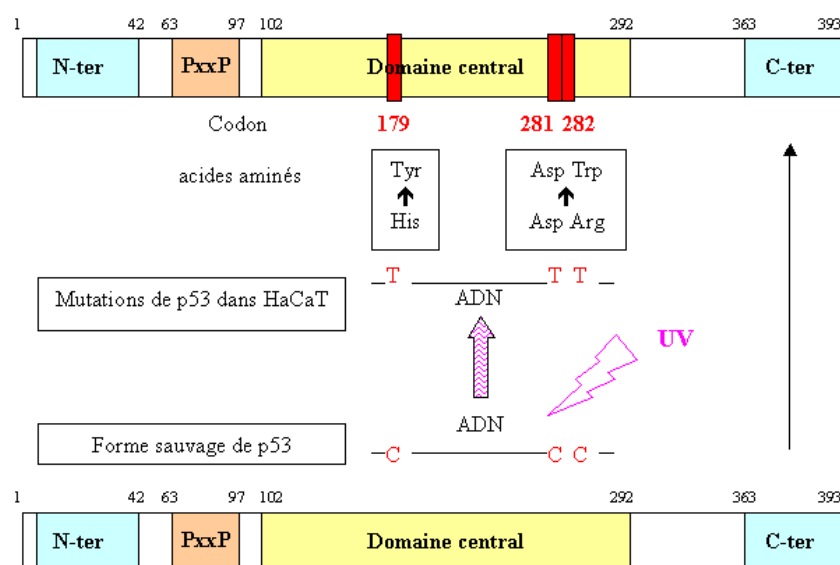


Figure 35 : Mutations du gène p53 par les UV et conduisant aux cellules HaCaT (Thèse de Pierre-Olivier Harmand, 2004).

Le cerveau peut être le siège d'un stress oxydant induit par les métaux à cause (i) de sa forte consommation d'oxygène par unité de masse de tissu, (ii) de sa faible teneur en enzymes antioxydantes et spécialement en catalase, ce qui facilite l'accumulation du peroxyde d'hydrogène et (iii) de la sécrétion des neurotransmetteurs auto-oxydables comme la dopamine et l'adrénaline. De plus, le cerveau est un organe qui concentre les métaux comme le calcium et le zinc (Treiber 2005) dont l'homéostasie peut être altérée par le cadmium. Les cellules C6 proviennent des tumeurs gliales de rat (glioblastome) induits par la N-nitrosomethylurée (Benda *et al.* 1968; Lightbody 1968) et possèdent un p53 normal. Certains auteurs ont suggéré que les astrocytes, dont sont issues les cellules C6, étaient plus résistantes au Cd que les cellules neuronales (Yang *et al.* 2007) mais les processus conduisant à cette résistance ne sont pas définis. Par ailleurs, les mécanismes de stress oxydant induit par le cadmium, le cuivre, le zinc et le rôle, dans ces mécanismes, du glutathion, de p53, des métallothionéines et des enzymes antioxydantes sont peu étudiés et toujours discutés.

Publication I : Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium

Présentation de l'article I

Nos premiers travaux ont été consacrés à l'étude de l'action prooxydante indirecte du cadmium (Cd) sur les cellules HaCaT (voir l'article en annexe). Le Cd est un métal lourd, non redox et qui n'a aucun effet biologique mais qui par contre est toxique pour tous les organismes vivants. Le Cd pourrait provoquer entre autres des lésions de l'ADN, l'oxydation indirecte des protéines et la peroxydation des lipides. Il semble aussi que la toxicité du Cd passe en partie par une altération de l'homéostasie de métaux biologiquement très importants comme le cuivre, le zinc, le calcium et le fer. Cependant, les mécanismes d'action toxiques dépendent du type cellulaire et sont très peu documentés dans les cellules HaCaT. Pour étudier ces mécanismes, nous avons voulu vérifier l'hypothèse que l'impact du Cd sur les HaCaT était le résultat de la balance entre l'inhibition des activités antioxydantes et l'induction de synthèse du glutathion.

Nous avons d'abord cherché à préciser les conditions de toxicité du cadmium. Les cellules ont été incubées pendant 24h et 48h avec des concentrations croissantes de Cd (3, 15, 50 et 100 μ M). Nos résultats montrent que des fortes doses de Cd sont nécessaires pour induire une cytotoxicité. Ainsi, la dose 100 μ M conduit respectivement à 30% et à 50% de mortalité après 24h et 48h d'incubation. L'oxydation des lipides, des protéines, et les dommages de l'ADN, respectivement évalués par l'acide thiobarbiturique, la mesure de la diminution des thiols protéiques et par le test des comètes, ont été observés pour des concentrations de Cd comprises entre 50 et 100 μ M. Les effets toxiques sont fortement corrélés aux taux de Cd incorporés dans les cellules HaCaT. Les activités de la glutathion peroxydase et de la catalase diminuent de façon significative tandis que l'activité de la glutathion réductase et le taux de glutathion augmentent avec les concentrations de Cd. Les activités des superoxydes dismutases n'ont subi aucun changement significatif après traitement des cellules par le Cd. Pour vérifier l'effet du glutathion nous avons empêché sa synthèse par un inhibiteur de la glutathion synthase, le BSO. En absence de glutathion, le Cd devient plus toxique, augmentant ainsi les lésions de l'ADN. Nos résultats suggèrent non seulement que le Cd produit des espèces réactives de l'oxygène mais aussi que le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des cellules HaCaT contre la cytotoxicité et les dommages de l'ADN induits par le Cd.

Conclusions de l'article I et perspectives

Nos études montrent non seulement que le Cd induit un stress oxydant temps et dose-dépendant mais aussi que les cellules HaCaT sont résistantes jusqu'à 50 μ M de Cd. Cette résistance des HaCaT est corrélée à l'augmentation du taux de GSH et de l'activité de GRase. Le GSH est une molécule possédant un fort pouvoir antioxydant. Il a un rôle protecteur direct vis-à-vis des ERO grâce à ses groupements thiols. Par ailleurs il est impliqué dans le transport, la distribution et le stockage intracellulaire des métaux. Il apparaît que l'impact du cadmium dans les cellules HaCaT est le résultat de la balance entre l'inhibition des activités des enzymes antioxydantes et l'induction de synthèse du glutathion. Cependant, les effets toxiques de nature oxydative induit par le Cd et les mécanismes de défense cellulaire sont-ils identiques quelque soit le modèle cellulaire ? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé les mêmes études en utilisant la lignée C6.

***Publication II : DNA damage and antioxidant
response in C6 cell line exposed to cadmium***

Présentation de l'article II

Le Cd s'accumule dans le cerveau et peut endommager les neurones et les cellules gliales par des mécanismes complexes impliquant des interactions avec d'autres métaux essentiels et le stress oxydant. Les cellules gliales sont censées être plus résistantes que les neurones vis-à-vis de nombreux agents délétères endogènes ou exogènes. Dans cette deuxième partie, nous avons utilisé les cellules gliales de rat (C6) comme modèle pour étudier les dommages oxydatifs induits par le Cd, déterminer si les effets produits sont comparables à ceux obtenus avec d'autres modèles cellulaires (en particulier les cellules HaCaT) et étudier le rôle du glutathion.

Nos résultats montrent que le Cd (4-20 μM) induit une cytotoxicité significative, une oxydation des lipides, des protéines et des dommages de l'ADN. Ces effets toxiques sont temps et dose-dépendants et sont le résultat d'une incorporation massive du métal dans les cellules. Les taux de glutathion réduit (GSH), les activités glutathion peroxydase (GPx) et catalase (CAT) diminuent considérablement. Nous avons observé que la suppression de glutathion cellulaire par la buthionine sulfoximine (BSO) entraîne une sensibilité plus importante des C6 vis-à-vis du métal. Ainsi la cytotoxicité et les dommages de l'ADN augmentent significativement. Nos résultats suggèrent que l'altération, par le Cd, du statut redox des principales enzymes antioxydantes est fortement impliquée dans les mécanismes de toxicité du métal. Le mécanisme majeur semble être la diminution des activités CAT et GPx conduisant à une surproduction de peroxyde d'hydrogène qui, en présence de cuivre (ou d'autres métaux Fenton comme le Fer), engendre le radical $\text{HO}^\bullet$. Le radical hydroxyle peut à son tour oxyder le GSH. Ainsi la CAT, la GPx et le GSH jouent un rôle clé dans la protection des cellules C6 contre la toxicité du Cd.

DNA damage and antioxidant response in C6 cell line exposed to cadmium.

Yves Nzungue^{1,3}, Régine Steiman¹, Catherine Garrel^{1,2}, Said Nemmiche¹ and Pascale Guiraud^{1,2,4} *

¹Laboratoire 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

²Département de Biologie Intégrée (DBI), Pavillon B, Hôpital de La Tronche, 38700 La Tronche, France

³INAC/ SCIB/ LAN : Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques. CEA-Grenoble. 17, rue des martyrs. 38054 Grenoble cedex 9. France

⁴Département des Sciences Médicales et Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (EA 2526). UFR des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, 15, avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag cedex 9, France.

*To whom correspondence should be addressed :

Département des Sciences Médicales et Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (LBGM, EA 2526). UFR des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, 15, avenue René Cassin, PB 7151, 97715 Saint Denis Messag cedex 9, France

Telephone: + 262 262 938 607

Fax: + 262 262 938 215

E-mail: pascale.guiraud@univ-reunion.fr

Abbreviations:

BCA: bicinchoninic acid

BHT: 3,5-di-tert-4butylhydroxytoluene

BSA: bovin serum albumin

BSO: L-buthionine-SR sulfoximine

CAT: catalase

Cd: cadmium

DMSO: dimethyl sulfoxide

DTNB: 5-5' dithionitrobenzoic acid

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FCS: fetal calf serum

FpG: formamidopyrimidine DNA glycosylase

GPx: glutathione peroxidase

GRase: glutathione reductase

GSH : reduced glutathione

GSht: total glutathione

GSSG: oxidized glutathione

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid

LD₂₀, LD₂₅ and LD₅₀: Lethal doses, concentrations of cadmium that lead respectively to approximately 10%, 25% and 50% cell death

MDA: malondialdehyde

MT: metallothionein

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAC: N-acetylcysteine

NADPH: nicotinamide dinucleotide phosphate

PBS: phosphate-buffered saline

ROS: reactive oxygen species

TBARs: thiobarbituric acid reactants

TEP: 1,1,3,3-tetraethoxypropane

TNB: 5-thio-2-nitrobenzoic acid

KCN: potassium cyanide

Abstract

Cadmium accumulates in brain and can damage both neurons and glial cells via complex mechanisms involving interactions with other metals and oxidative stress induction. Glial cells are supposed to be more resistant than neurons and to protect them against various injury of endogenous or exogenous origin. In this report we have used the glioma C6 cells to study the oxidative damage induced by cadmium to cellular macromolecules, its effect on the antioxidant systems and the role of glutathione in cell protection toward cadmium toxicity. Cadmium (4-20 μM) induced a global cytotoxic effect, the oxidation of lipids, proteins and significant DNA damage. These toxic effects were time and dose-dependent and correlated to the intracellular cadmium content. The glutathione level (GSH), the glutathione peroxidase (GPx) and the catalase (CAT) activities were decreased, while the lipid peroxidation and the DNA damage assessed by the comet assay increased after the treatment. We demonstrated that a depletion in glutathione using buthionine sulfoximine, rendered C6 cells more sensitive to cadmium since both the cytotoxic and genotoxic effects were significantly increased. Our results suggested that a perturbation in the intracellular redox status and in the antioxidant system was strongly involved in the toxic effects exhibited by cadmium. The major process seemed to be the decrease in CAT and GPx activities leading to an overproduction of $^{\circ}\text{OH}$ which in turn provoked a depletion in GSH. Thus CAT, GPx and GSH play a key role in the C6 cells defense to Cd toxicity.

Key words:

C6 glioma cells; Cadmium; Oxidative stress; Stress markers; DNA damage; Comet assay; Antioxidant enzymes; Glutathione

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a potentially toxic element for animals, plants and humans even at low concentration (Benavides, 2005; Latinwo et al., 2006). Today, the main uses for this metal are: nickel-Cd battery manufacture, pigments production, plastic stabilizers and agriculture (Barazani et al., 2004; Benavides, 2005; Irwin, 2003). The impact of the uptake of Cd by living cells has been shown to be drastic. Acute or chronic exposure influences many metabolic processes causing great damage in cells. Cd is recognized as a carcinogen inducing tumors in many human organs (Waalkes, 2000). Oxidative stress has been proposed as the most important mechanism of toxic action of Cd in many organs including brain and normally leading to cell death depending on metal dose and time-length of exposure. In fact, Cd is one of the exogenous sources shown to indirectly produce reactive oxygen species (ROS) in various cell lines (Benavides, 2005; Ikediobi et al., 2004; Koyu et al., 2006; Piqueras et al., 1999; Stohs et al., 2001; Thevenod and Friedmann, 1999; Watjen and Beyersmann, 2004; Yiin et al., 2000). GSH has been considered as the first line of defense against metal toxicity (Freedman et al., 1989; Singhal et al., 1987). It serves as a reducing agent in deoxyribonucleotide synthesis (Dalton et al., 1999; Sjoberg and Sahlin, 2002), and regulates gene expression (Eraso and Kaplan, 2002). GSH also helps to remove toxic peroxides formed in the normal course of growth and metabolism under aerobic conditions (Dalton et al., 1999; Duthie and Collins, 1997). Excessive production and accumulation of ROS disturbs the balance between the ROS and the antioxidant molecules in the cells and induces oxidative stress (Hanahan and Weinberg, 2000; Price and Joshi, 1983; Watanabe et al., 2003). It has been shown that Cd can induce oxidative stress by disrupting intracellular calcium homeostasis and by causing the accumulation of ROS (Lemarie et al., 2004; Shaikh et al., 1999; Shen et al., 2001; Shih et al., 2005).

Among the other mechanisms proposed for Cd-induced toxicity and carcinogenesis are the interaction with the regulation of proto-oncogenes (Ercal et al., 2001; Hanahan and Weinberg, 2000), the inhibition of DNA repair systems and interference with apoptosis pathways (Bravard et al., 2006; Shih et al., 2004).

The mechanisms leading to oxidative stress induced by Cd, the cell response and the role of glutathione and antioxidant enzymes in these mechanisms are still discussed and cell-type dependent. The aim of this *in vitro* study was to investigate the cytotoxic and genotoxic effect of Cd and the role of the antioxidant systems in rat glial C6 cell line as model.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The C6 (ATCC, France) cell line results from a rat glial tumour induced by N-methylnitrosourea (Benda et al., 1968; Lightbody, 1968). The cells were cultured at 37°C under a 5% CO₂ humidified atmosphere in D-MEM medium (Invitrogen, France) containing 10% FCS (Biotechnologie, France), penicillin (5000 U/ml) /streptomycin (50 mg/ml).

Cell treatment with cadmium, buthionine sulfoximine and N-acetylcysteine

Stock solutions of cadmium chloride (CdCl₂, 10 mM), buthionine sulfoximine (BSO, 10 mM) and N-acetylcysteine (NAC, 0.1 mM) were prepared in distilled water and sterilized by filtration. A sufficient quantity of these stock solutions was added to the culture medium to obtain the desired final concentrations. CdCl₂, BSO and NAC were from Sigma (France).

C6 cells were seeded in flasks 24h before treatments with Cd, BSO or NAC. The following day, the culture medium was replaced by fresh medium containing increasing concentrations of Cd (0-20 µM), BSO (5-200 µM) or NAC (1-10 µM) and the cells were incubated for 24h and 48h. Then cells were submitted to viability assay and comet assay, or harvested for oxidative stress markers or antioxidant enzymes determination. A control without any treatment was systematically included in each experiment.

For BSO and NAC experiments, these compounds were added either 24h before Cd stress. The working concentrations chosen corresponded to the one giving the maximum depletion in glutathione for BSO (80 µM) and the one giving the maximum increase in glutathione level for NAC (8 µM). Viability assays were run to make sure that these concentrations were not toxic (Kelly, 1998; Wispriyono et al., 1998).

Cell viability assay

After treatment with various Cd, BSO or NAC concentrations for 24h and 48h, the viability was determined colorimetrically using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, France) assay (Mosmann, 1983). Cells were washed with phosphate buffer saline (PBS, Invitrogen, France) and incubated at 37°C for 2h in fresh culture medium containing MTT (100 µl/ml of medium). Then the cells were washed with

PBS and lysed by dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, France). The colored formazan crystals formed after conversion of the tetrazolium salt MTT by mitochondrial dehydrogenases were solubilized and measured by spectrophotometry at 570 nm.

Comet assay

DNA damage induced by Cd was evaluated using the comet assay in individual cells. C6 cells were incubated with Cd (4, 5 and 20 μ M) for 24h and (4, 5 and 6 μ M) for 48h with or without a previous treatment with BSO or NAC. Then the cells were collected, resuspended in agarose low melt point (1.2%) and the suspensions were put on comet slides. All slides were immersed overnight in a cell lysis buffer in the dark at 4°C, in order to prevent non-specific DNA damage and repair processes from occurring. The slides were placed in a horizontal electrophoresis unit containing freshly prepared electrophoresis buffer (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH). The DNA was allowed to unwind for 40 min before electrophoresis was performed at 25 V, 300 mM for 30 min.

After neutralization (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) 50 μ l of 0.5 mg/ml ethidium bromide was pipetted on the slides to stain the DNA. The slides were placed in a humidified air-tight container to prevent drying of the gel, before analysis. Analysis was performed using a fluorescence microscope (Leitz, Germany) connected to a video camera (Kinetic Imaging, USA) for taking and analyzing (Komet IV software, Kinetic Imaging, USA) representative pictures of each slide. The quantification of DNA damage was performed using percentage of DNA in the comet tail. For each condition, the average of % tail DNA was determined using three different slides prepared as previously described, 50 cells were analyzed per slide (Didier et al., 2001).

Cellular cadmium determination

After a 24h incubation with Cd (4, 5 and 20 μ M), the C6 cells were trypsinized and washed 3 times in physiological NaCl (0.9%). Then the pellet was resuspended in deionized water (Congiu et al., 2000) and the cells were lysed by 5 freeze/thaw cycles. The lysates were centrifuged at 20°C for 10 min at 2665 g to obtain the soluble fraction. The intracellular Cd concentrations were determined by atomic absorption spectrometry (Perkin-Elmer 306, USA). Results were given as μ gram per gram of soluble cell protein.

Determination of stress markers and antioxidant enzymes

Preparation of the cellular extracts. After the different treatments C6 cells were trypsinized and harvested. The pellets obtained after centrifugation (2 min, 2665 x g, 4°C) were resuspended in isotonic Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.4, 300 mOsm) centrifuged for 2 min at 2665 x g at 4°C and rinsed twice with the Tris-HCl buffer. Then cells were lysed in hypotonic Tris-HCl buffer by 5 freeze-thaw cycles (liquid nitrogen-37°C). For glutathione and thiol groups determination, aliquots were taken from the whole homogenized lysate. The other determinations were performed on the supernatants obtained after centrifugation of the lysates at 4°C for 10 min at 2665 x g. The extracts were stored at - 80°C, until analyses.

Quantitative protein determination (BCATM Bicinchoninic acid, kit Pierce). Protein levels were determined using the BCATM Bicinchoninic acid kit (Pierce) in total and soluble cell lysates. The reading was done in 96-well microplates at 580 nm using a microplate reader (Bio-Tek, USA) provided with a software (KC Junior, Bio-Tek, USA) which calculate directly protein concentrations from the calibration curve.

Quantitative determination of glutathione level. Samples of whole lysates were deproteinized by adding an aqueous solution of metaphosphoric acid 6% (lysate-metaphosphoric acid (5:1, v/v)). The mixtures were centrifuged at 4°C for 10 min at 2665 x g. Total glutathione (GSht) was determined according to the method of Akerboom and Sies (Akerboom and Sies, 1981), which was slightly modified (Emonet et al., 1997) and based on the spectrophotometric evaluation of the reduction rate of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma, France) into 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). Values were determined by comparing the reduction rate against a standard curve of glutathione. Oxidized glutathione (GSSG) was determined under the same conditions after adjusting pH with ethanolamine and trapping the reduced glutathione (GSH) with 3-vinyl pyridine added to the sample. Glutathione levels (GSht, GSH and GSSG) were expressed as μ moles per gram of total cell proteins.

Quantitative determination of thiobarbituric acid reactants. Lipid peroxidation was evaluated by thiobarbituric acid reacting substance (TBARs) determination (Placer et al., 1966; Richard et al., 1992), using a 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) calibration curve, as previously described by Richard et al. (Richard et al., 1992). Samples were incubated with

trichloroacetic acid and thiobarbituric acid. The reagents used were those of the MDA kit (Sobiada). They included solution 1 (thiobarbituric acid), solution 2 (perchloric acid) and a calibration solution (TEP 20 mM in ethanol). The measurement was by fluorimetry (excitation wavelength 532 nm, emission wavelength 553 nm) (Perkin-Elmer, USA). The mixtures were heated on a boiling water bath for 30 min, an equal volume of n-butanol was added, and the final mixtures were centrifuged; the organic phases were collected for measurements. Samples contained 1 mM butylated hydroxytoluene (BHT) in order to prevent artefactual lipid peroxidation during the boiling step. Results were expressed as μmole per gram of soluble cell proteins.

Quantitative determination of thiol groups (Bulaj et al., 1998; Ellman, 1959).

Protein oxidation was evaluated by thiol groups (SH) determination. The colorimetric method used rests on the reducing properties of the SH groups. In presence of SH groups, the disulphide bridge (SS) contained in the Ellman reagent or DTNB is reduced and gives aromatic sulphhydryl derivatives strongly coloured. SH groups reduce DTNB in TNB coloured in yellow, having an absorbance at 412-415 nm. SH levels were given by projection on standard curve and expressed as μmole per gram of total cell proteins.

Glutathione peroxidase activity. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by a modified method of Flohe and Günzler (Flohe and Gunzler 1984). The rate of glutathione oxidized by tert-butyl hydroperoxide (30mM) was evaluated by the decreased of NADPH, H^+ (8.4 mM in Tris buffer) at 340 nm in the presence of EDTA (1 mM), excess reduced glutathione (150 mM in Tris buffer) and glutathione reductase (200 U/ml in Tris buffer). GPx activity was expressed as international units per gram of soluble cell proteins.

Glutathione reductase activity. Glutathione reductase (GRase) activity was measured by a method developed in our laboratory, derived from that described by Carlberg and Mannervik (Carlberg and Mannervik, 1985). The principle is the measurement at 340 nm of NADPH consumption catalyzed by GRase in the presence of GSSG. Results were given as international units per gram of soluble proteins.

Catalase activity. Catalase (CAT) activity was determined by the method described by Beers and Sizer (Beers, 1952). Activity was assayed by determining the rate of degradation of H_2O_2 at 240 nm in 10 mM of potassium phosphate buffer (pH 7). The reaction rate was

related to the amount of CAT present in the mixture. Results were expressed as international units per mg of soluble cell proteins.

Superoxide dismutase activity. Superoxide dismutase (SOD) activities (total SOD, MnSOD and Cu/ZnSOD) were determined using the pyrogallol assay following the procedure described by Marklund and Marklund (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 KCN allowed the MnSOD determination in the same conditions. Assays were monitored by spectrophotometry at 240 nm. SOD activities were expressed as international units per mg of soluble cell proteins.

Statistical analyses

Each experiment was repeated three times. All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD), and were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Cytotoxicity of cadmium

The results obtained with the MTT assay were expressed as a percentage (%) of survival, using the untreated cells as reference (Fig. 1). The results showed that the cellular viability decreased gradually and significantly for concentrations of Cd up to 20 μ M. Cd was considerably more toxic after 48h incubation than after 24h.

Thus the curve % of survival = F ([Cd]) made it possible to determine LD20: 4 μ M and LD25: 5 μ M which were the same for 24h and 48h incubation, and LD50: 20 μ M for 24h and 6 μ M for 48h incubation. These values were used for the continuation of the study.

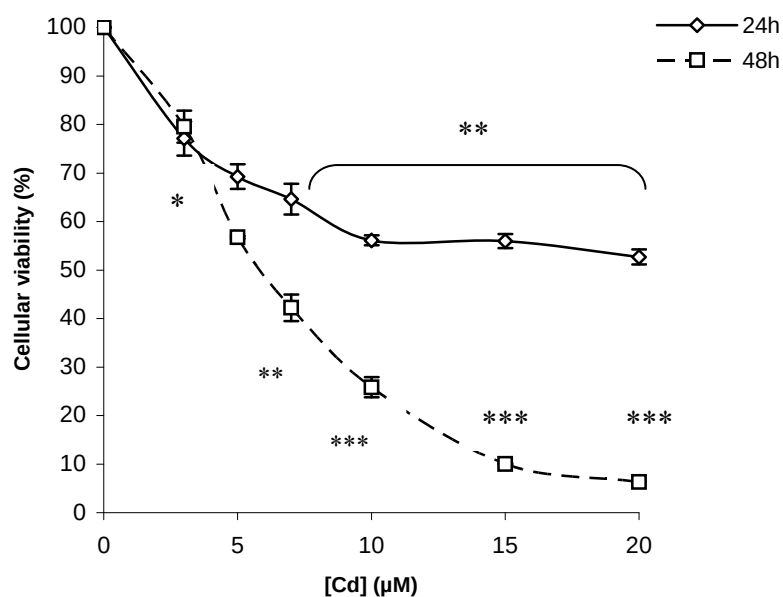


Figure 1 : Cytotoxicity of cadmium (Cd) to C6 cells. Cells were incubated with increased concentrations of Cd (0-20 μM) for 24h or 48h. Viability was assessed by MTT colorimetric assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ SD (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$).

Genotoxicity of cadmium

The results obtained using the comet assay showed that Cd induced DNA damage in C6 cells (Fig. 2). The percentage of tail DNA increased significantly ($P < 0.001$) between control cells (4.6%) and the cells treated with 20 μM Cd for 24h (LD₅₀, 17.8%) or the cells treated with 6 μM Cd for 48h (LD₅₀, 29%).

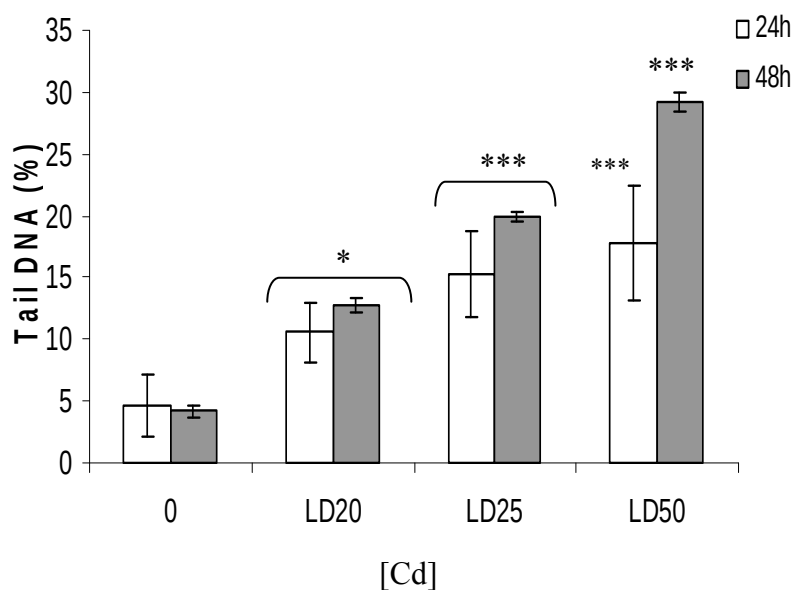


Figure 2 : DNA damage after C6 cells treatment with cadmium (Cd) at LD₂₀: 4 μM , LD₂₅ = 5 μM for 24h and 48h, LD₅₀ = 20 μM for 24h and LD₅₀ = 6 μM for 48h. The DNA damage was assessed by the comet assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ SD (*: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$).

Cellular cadmium determination

To determine if the sensitivity of C6 cell line to low concentrations of Cd was related to a high incorporation and accumulation in these cells, the intracellular content in Cd was measured after 24h of incubation with Cd (4, 5 and 20 μ M) (Fig. 3). The results showed an increase in intracellular Cd level even for the lowest concentration used. This indicated that the metal was able to enter and accumulate in the cells, however the highest intracellular level was obtained for the dose of Cd corresponding to LD25 and a no significant decrease was observed for the LD50. These results were not directly correlated to those obtained for cytotoxicity and genotoxicity.

The uptake and accumulation of Cd was accompanied by the displacement of physiologically important metals like copper and zinc (data not presented).

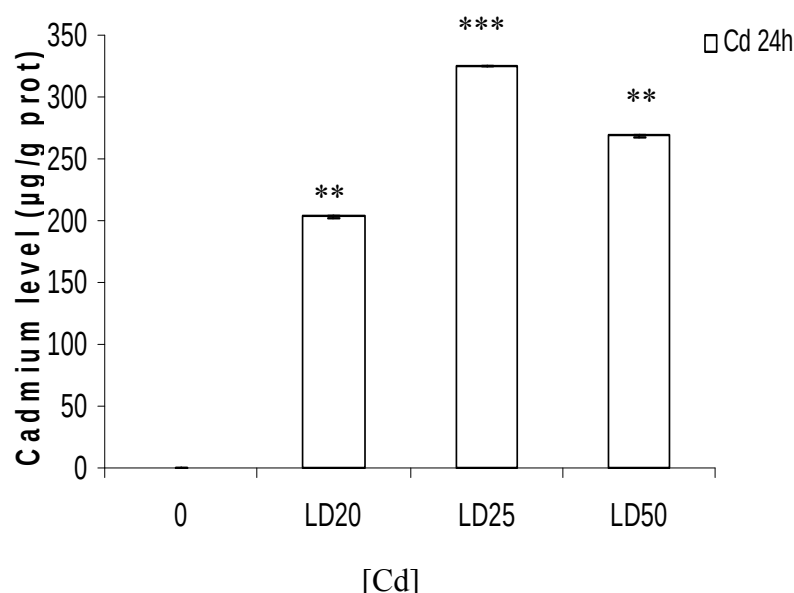


Figure 3 : Cadmium (Cd) levels in C6 cells after 24h incubation with 4, 5 and 20 μ M Cd. The intracellular concentrations of Cd were determined by Atomic Absorption Spectrophotometry (Perkin Elmer 306). Data were mean $\pm$ SD of three independent experiments (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Oxidative stress markers

In order to evaluate the oxidative changes in C6 cells after 24h or 48h incubation with various Cd concentrations, several oxidative stress markers were measured.

Glutathione (GSH), a ubiquitous sulfhydryl compound, has been implicated to function in cytoprotection against cadmium toxicity. Our results showed that the GSH level decreased significantly after cells treatment with Cd for 24h and 48h, respectively at the

LD50: 20 μM and 6 μM ($p < 0.01$; Fig. 4A). The decrease was already significant at the LD25 for 48h incubation with Cd. For these conditions, an increase in GSSG and GSht were also observed (data not shown). The GSSG levels increased regularly as a function of the Cd concentration both after 24h (0.110; 0.210; 0.300 $\mu\text{mol/g}$ protein) and 48h (0.115; 0.135; 0.290 $\mu\text{mol/g}$ protein) incubation with Cd, while the level in control was 0.075 $\mu\text{mol/g}$ protein.

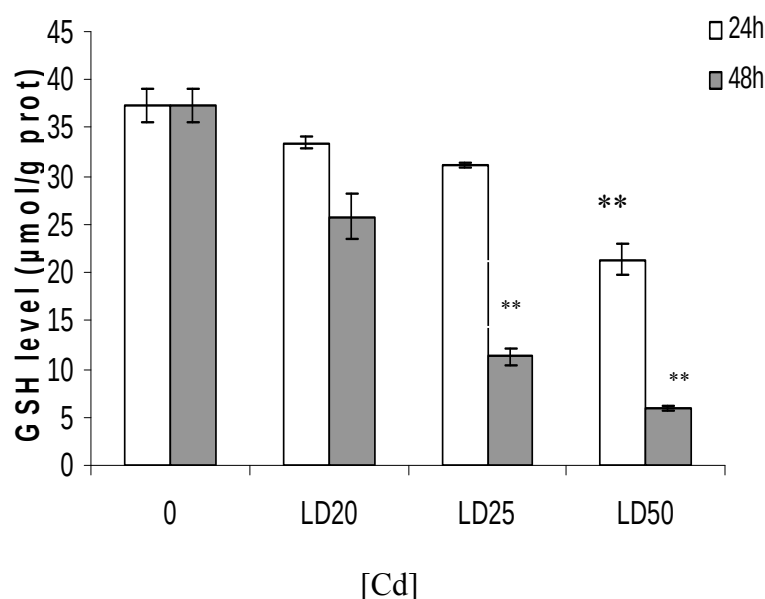


Figure 4A

The GSH/GSSG ratio decreased by 92%, from 500 for the untreated control cells to 40 at 20 μM Cd for 24h or 6 μM Cd for 48h incubation. These results showed an important effect of Cd on the glutathione homeostasis in C6 cells (Fig. 4B).

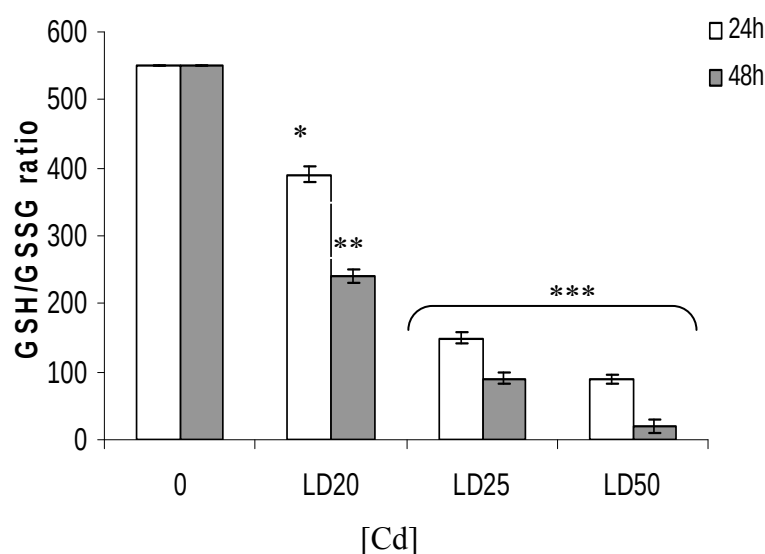


Figure 4B

The TBARs level increased significantly after 24h of cell treatment with Cd both at LD25 and LD50 (Fig. 4C). The maximum TBARs level was obtained when C6 cells were treated with 5 μ M Cd for 24h. These results indicated that Cd induced lipid peroxidation in C6 cells. No changes was observed after 48h of Cd-treatment probably due to duration of exposure.

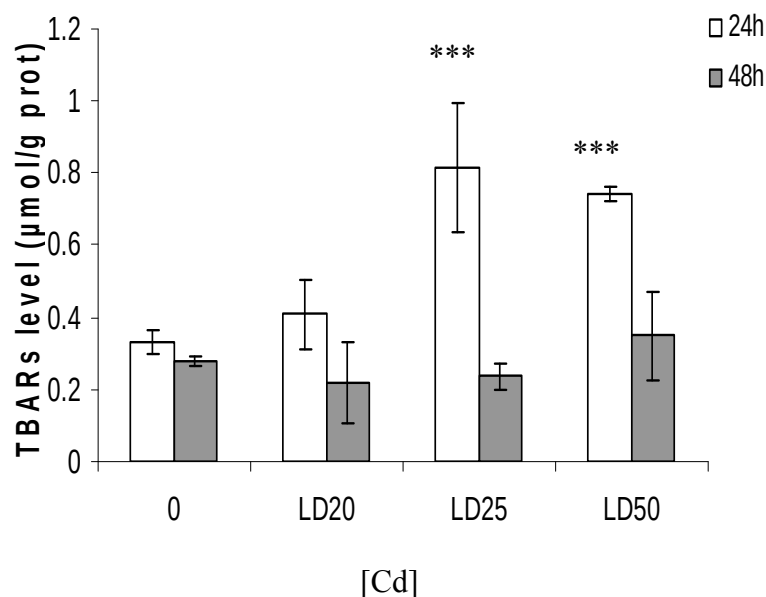


Figure 4C

A dose-dependent and significant reduction in protein SH group level was observed after 24h incubation with 20 μ M Cd (from 130 μ mol/g protein for untreated control to 100 μ mol/g protein for 20 μ M Cd). After 48h, the SH level decreased significantly already at the LD25 (by 62% from untreated control; Fig. 4D). These results showed that Cd was also able to induce a protein oxidation. The figure 4D showed also an increase of SH level after cell treatment with LD20 and LD25 for 24h. This observation is in favour of mobilisation of protein against Cd but protein SH group level is not sufficient to prevent Cd-induced toxicity.

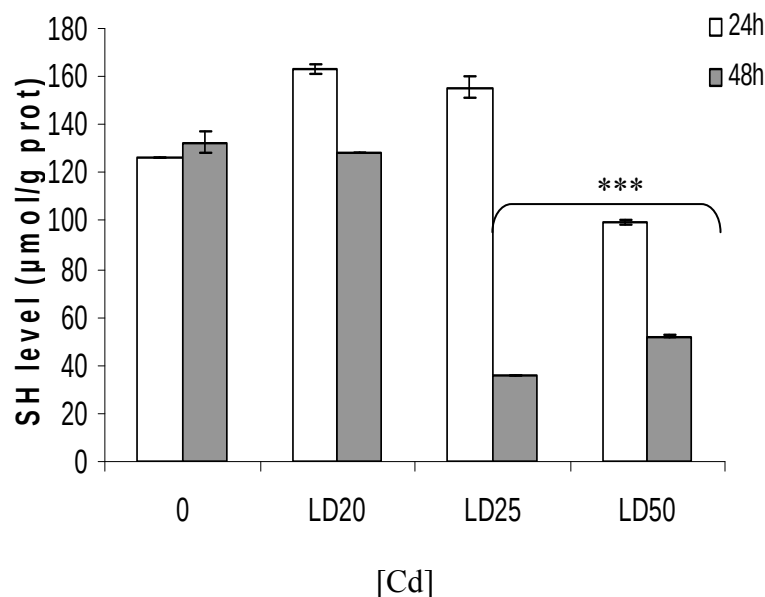


Figure 4D

Figure 4 : Effect of cadmium (Cd) on (A) GSH level, (B) GSH/GSSG ratio, (C) TBARs level and (D) thiol groups level. C6 cells were treated or not (control) with $LD_{20} = 4 \mu M$, $LD_{25} = 5 \mu M$ for 24h and 48h, $LD_{50} = 20 \mu M$ for 24h and $DL_{50} = 6 \mu M$ for 48h. GSH, GSSG, TBARs and thiol groups levels were determined after 24h and 48h. Data were the mean $\pm$ SD of three independent experiments (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Altogether these results (GSH/GSSG ratio, TBARs and SH group levels) showed that a treatment with Cd (4, 5, 20 μM for 24h and 4, 5, 6 μM for 48h) affected the intracellular redox status and generated an oxidative stress in C6 cells.

Antioxidant enzymes

The GPx activity was strongly and significantly reduced in C6 cells treated for 24h with 4, 5 and 20 μM of Cd (from 12 IU/g protein to 3 IU/g protein). After 48h incubation, Cd caused a more significant decrease in GPx activity than that observed at 24h (a 92% reduction from control was observed at LD20; Fig. 5A).

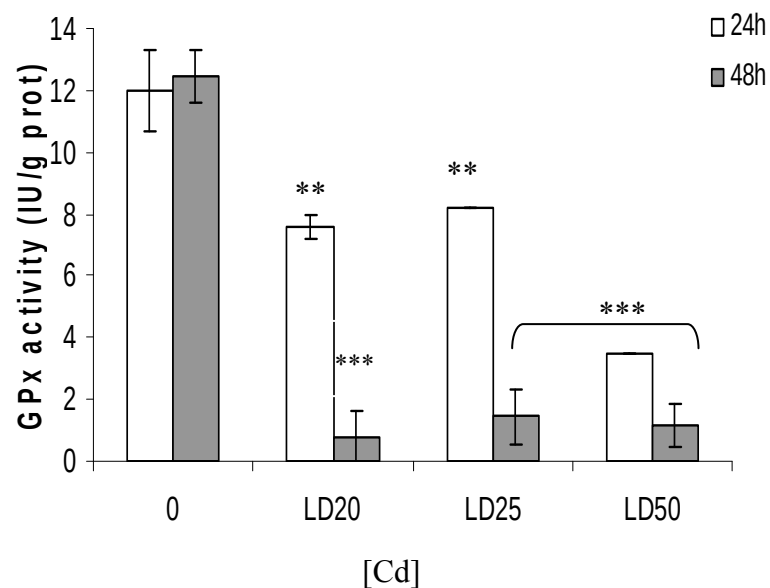


Figure 5A

The GRase activity increased significantly after 24h incubation with the different Cd concentrations (58% at 20 μ M Cd for 24h). Any significant change was observed in cells after incubation with Cd for 48h (Fig. 5B). These results were not in agreement with those obtained for the glutathione.

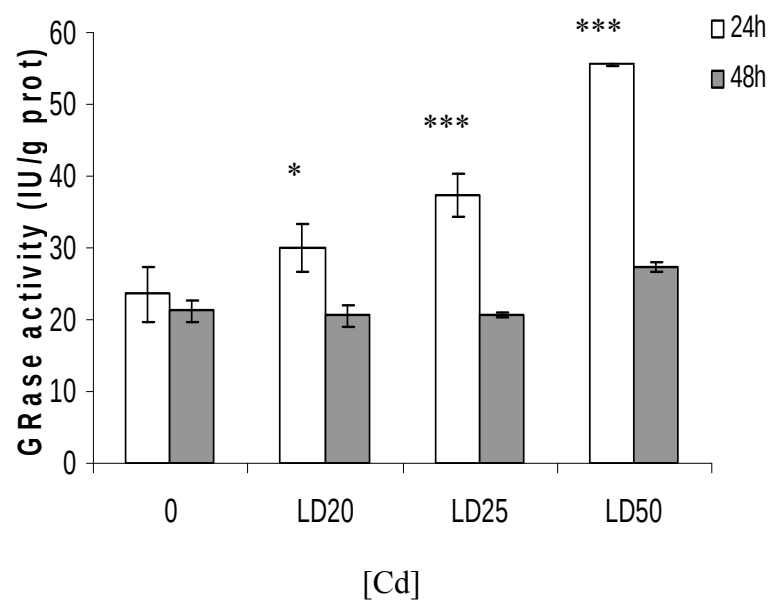


Figure 5B

A significant reduction in CAT activity was obtained after C6 cells treatment with Cd (60% from untreated control at LD20) for 24h (Fig. 5C). The decrease in CAT activity was significant after 24h and 48h incubation with all concentrations of Cd.

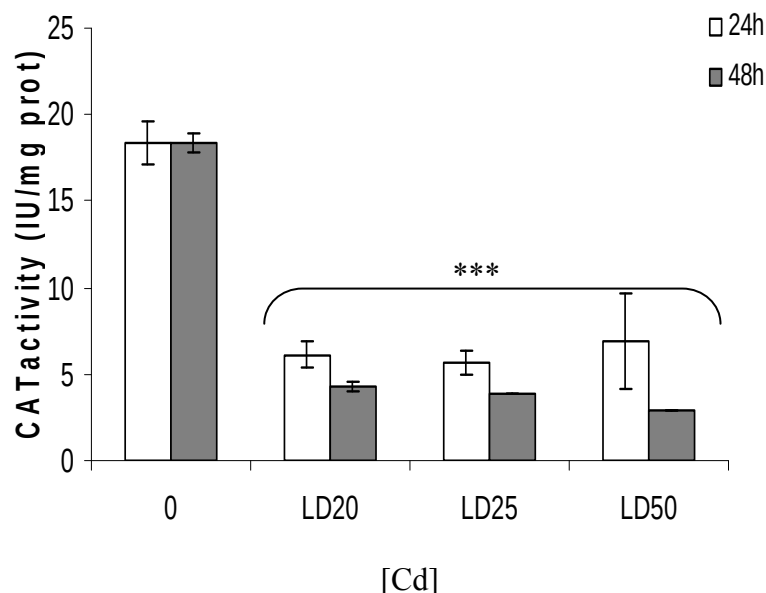


Figure 5C

Figure 5 : Effect of cadmium (Cd) on (A) GPx activity, (B) GRase activity and (C) CAT activity. C6 cells were treated or not (control) with $LD_{20} = 4 \mu\text{M}$, $LD_{25} = 5 \mu\text{M}$ for 24h and 48h, $LD_{50} = 20 \mu\text{M}$ for 24h and $LD_{50} = 6 \mu\text{M}$ for 48h. GPx, GRase and CAT activities were determined after 24h and 48h. Data were the mean $\pm$ SD of three independent experiments (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

The Cu/Zn SOD and the Mn SOD activities were not modified by the exposure of C6 cells to Cd in our experimental conditions (data not shown).

On the whole Cd altered significantly the intracellular GPx, GRase and CAT activities in C6 cells.

Influence of Glutathione on Cd cytotoxicity and genotoxicity to C6 cells

Depletion in GSht. The C6 cells were cultured for 24h and 48h in the presence of increasing doses of BSO (5-200 μM), a selective and powerful inhibitor of glutathione synthesis. The aim was to determine the lowest concentration leading to the maximum depletion in GSht. The MTT colourimetric test was used to assess the viability of the cells. BSO was not toxic for the C6 cells after 24h and 48h incubation (data not shown).

The GSht determination was done after 24h treatment with BSO. The intracellular concentration in GSht decreased significantly from 5 to 80 μM BSO. Then a plateau was

reached ($p < 0.001$; Fig. 6). The concentration of 80 μM BSO was chosen for the rest of the experiments.

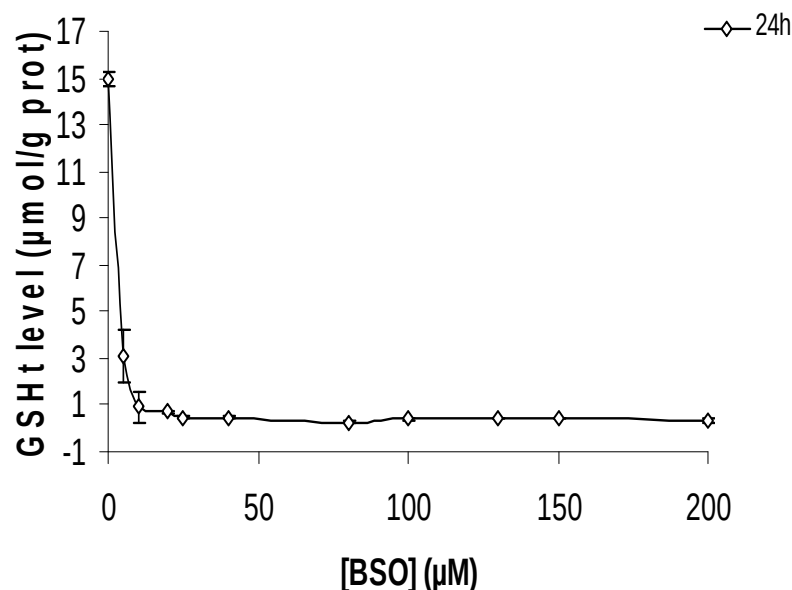


Figure 6 : Effects of buthionine sulfoximine (BSO) on the GSHt content in C6 cells. The cells were treated with BSO (5-200 μM) at increasing concentrations for 24h. The GSHt levels were determined as described in the “Materials and Methods” section. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ SD ($p < 0.001$).

The C6 cells were incubated with 80 μM of BSO for 24h and then with 4, 5 or 20 μM Cd for 24h. The viability was significantly decreased for 5 and 20 μM Cd, corresponding originally to LD25 and LD50 (Fig. 7A) respectively. Cd induced an important cellular mortality when glutathione was absent, so the intracellular level of GSHt seemed to modulate the sensitivity or resistance of C6 cells to Cd.

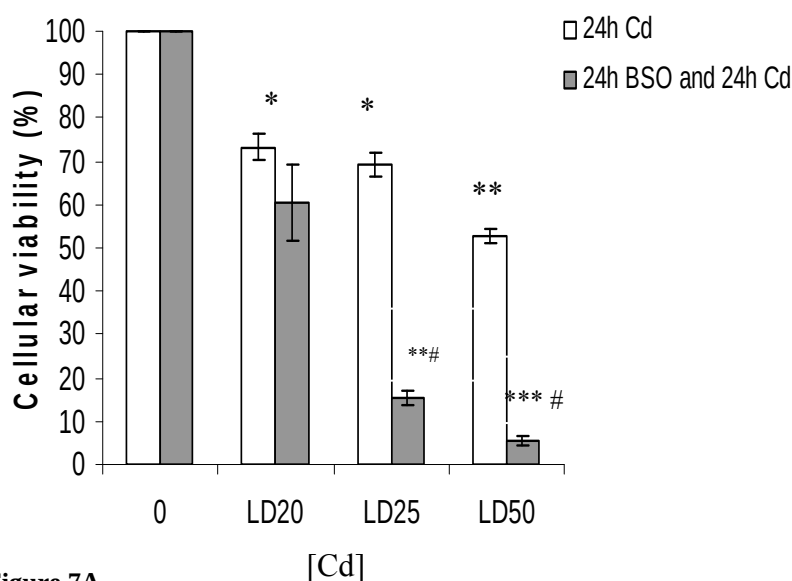


Figure 7A

The DNA damage were analyzed using the comet assay after incubating the cells first with 80 μ M BSO for 24h and then with Cd (4, 5 and 20 μ M) for 24h. The % tail DNA increased significantly compared to the control (from 5% for the control and BSO alone to 23.6% for BSO and 20 μ M Cd) (Fig. 7B). These results were in agreement with the cytotoxicity assay and showed that the GSht also seemed to take part in the protection against the genotoxicity of Cd to C6 cells.

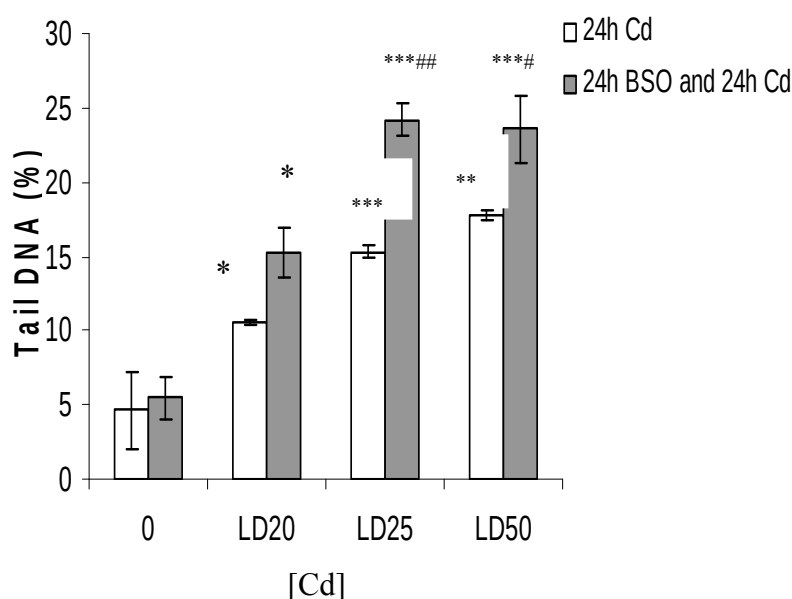


Figure 7B

Figure 7 : Effects of buthionine sulfoximine (BSO) on cadmium (Cd)-induced cytotoxicity and DNA damage in C6 cells. (A) Cells were incubated for 24h with BSO (80 μ M) then 24h with Cd (LD_{20} = 4 μ M, LD_{25} = 5 μ M and LD_{50} = 20 μ M). The MTT colorimetric assay was performed to evaluate the cytotoxicity. (B) Cells were incubated for 24h with BSO (80 μ M) then 24h with Cd (LD_{20} = 4 μ M, LD_{25} = 5 μ M and LD_{50} = 20 μ M). DNA damage were assessed by the comet assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ SD (*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. #: p < 0.05; ##: < 0.01; indicates a difference compared to the cells without BSO).

Supplementation in glutathione. C6 cells were cultured 24h and 48h in the presence of increasing doses of NAC, a selective precursor of glutathione synthesis. The aim was to determine the lowest concentration leading to the maximum increase in GSht. The MTT colorimetric test was used to assess the viability of the cells. NAC was not toxic for the C6 cells after 24h and 48h incubation (data not presented).

8 μ M NAC induced a slight increase in GSht (data not presented). This concentration was chosen for the rest of the experiments.

The C6 cells were incubated with 8 μ M NAC for 24h and then with 4, 5 and 20 μ M Cd for 24h. The treatment with NAC did not modify the viability of the cells for any of the Cd concentration used (Fig. 8A).

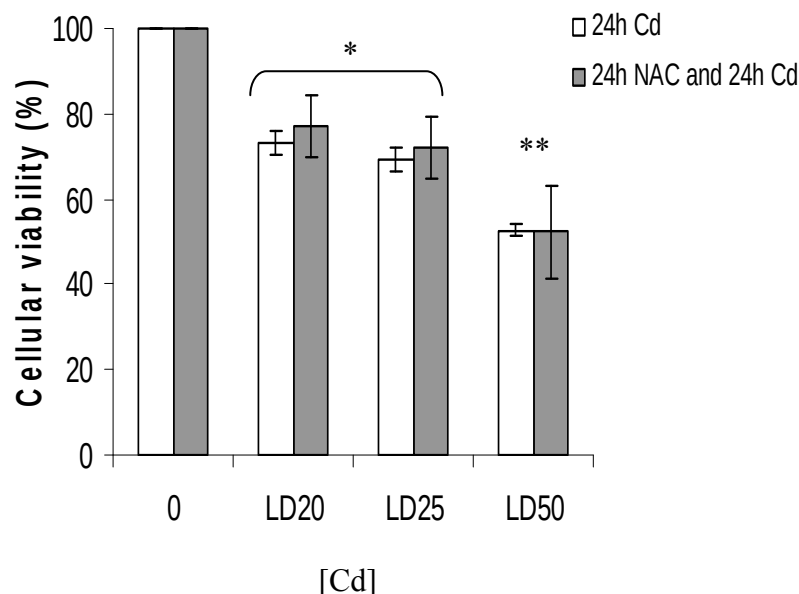


Figure 8A

The DNA damage were analyzed using the comet assay after incubating the cells first with 8 μ M of NAC for 24h and then with Cd (4, 5 and 20 μ M) for 24h. The % tail DNA in C6 cells pre-incubated with NAC and treated with Cd was significantly increased at the LD20 and was not significantly different from that obtained with Cd alone at the LD25 and the LD50 (Fig. 8B). Thus, NAC did not protect the C6 cells against Cd cytotoxicity or genotoxicity.

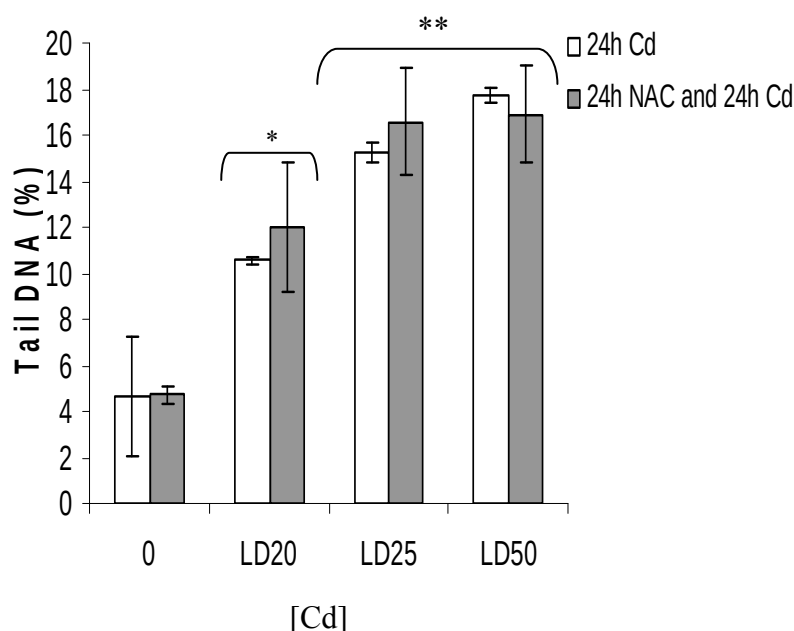


Figure 8B

Figure 8 : Effects of N-acetyl-L-cystein (NAC) on cadmium (Cd)-induced cytotoxicity and DNA damage in C6 cells. (A) Cells were incubated for 24h with NAC (8 μ M) then 24h with Cd (LD_{20} = 4 μ M, LD_{25} = 5 μ M and LD_{50} = 20 μ M). The MTT colorimetric assay was performed to evaluate cytotoxicity. (B) Cells were incubated for 24h with NAC (8 μ M) then 24h with Cd (LD_{20} = 4 μ M, LD_{25} = 5 μ M and LD_{50} = 20 μ M). DNA damage were

assessed by comet assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ SD (: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).*

DISCUSSION

In the present work, the viability assays performed on C6 cells submitted to a stress with Cd showed that these cells were sensitive to Cd toxicity. 50% mortality was obtained at 20 μ M for 24 h and 6 μ M for 48 h incubation with Cd. Several studies indicate that Cd is cytotoxic at lower concentrations in many cell types (Kim et al., 2003; Oh et al., 2006) and LD50 value can reach 0.7 μ M (Watjen et al., 2002a; Watjen et al., 2002b). However, it is known now that the sensitivity or the resistance, as well as the detailed toxic mechanisms and death pathways can vary considerably as a function of the cell type. Concerning more precisely the central nervous system (CNS), (Yang et al., 2007) using primary cultures of CNS cells from rats exposed for 24 h to Cd showed that the microglial cells were the most sensitive to Cd (LD50: 0.5-1.0 μ M), followed by neurons (LD50: 1-5 μ M) while the astrocytes were the most resistant. The LD50 they obtained for astrocytes was 20 μ M for 24 h exposure and fell to 5 μ M after 3 days exposure. Our results showed that the astrocyte-derived C6 glioma cells have kept the same sensitivity to Cd as primary astrocytes.

The cellular Cd determination showed that C6 cells can incorporate and accumulate Cd in high amounts for the concentrations 4, 5 μ M and 20 μ M. Some preliminary experiments in our laboratory on HaCaT cells showed that in these cells, the intracellular Cd level remained very low when the cells were treated with 15-50 μ M Cd and that was correlated to the resistance of the HaCaT cells to Cd cytotoxicity. The C6 cells capacities to incorporate and accumulate Cd at low concentrations (4 μ M Cd) can explain their sensitivity to this metal. The comet assay allowed to point out that Cd induced DNA damage, starting from 24 h incubation at low concentrations. These genotoxic effects were in agreement with some data from the literature (Cao et al., 2007; Fotakis et al., 2005; Risso-de Faverney et al., 2001).

ROS are known to play different roles in living organisms and in cells according to their level. A low and regulated production is necessary for the regulation of several fundamental processes, while an increased level is harmful (Valko et al., 2004). At physiological levels ROS are involved in normal processes such as cell division and differentiation. Indeed, the hydroxyl radical HO° resulting from H_2O_2 decomposition plays a significant physiological role in the growth and cellular maturation (Zs-Nagy, 1992), but it is also the most dangerous species among the ROS when overproduced. In pathology, the free

radical species are involved in many processes like the carcinogenesis or neurodegeneration (McCord, 2000; Schulz et al., 2000). In excess these radicals can damage DNA, they can also oxidize proteins and lipids (Halliwell, 1989; Sies, 1991).

To determine if Cd generated an oxidative stress in C6 cells and what was the antioxidant responses to Cd in these cells, several oxidative stress markers and antioxidant enzymes were studied after a treatment with Cd. Our results confirmed that Cd induced an oxidative stress. In fact, we showed that the TBARs level was increased and the protein SH groups were decreased indicating respectively lipid and protein oxidation. The induction of lipid peroxidation by Cd has been reported in many studies on various cellular types in particular by Figueiredo-Pereira et al. (Figueiredo-Pereira et al., 1998). In addition the increase in GSSG level and the decrease in GSH/GSSG ratio were also in favour of the modification of the intracellular redox status and of an increased generation of ROS as this has also been described in literature (Hultberg et al., 1999, 2001; Jones, 2002).

The balance between ROS and free radical generation, and the antioxidant system is the key for maintaining a physiological intracellular redox status. The main components of the cellular antioxidant systems are: GSH and the enzymes CAT, SODs, GPx and GRase (McCord, 2000).

Our results showed that Cd provoked a strong decrease in GSH level. The GRase activity, which is regenerating GSH from GSSG, was increased but not enough to reestablish the GSH level. The peroxidases namely CAT and GPx activities were strongly and significantly decreased by Cd, while the SODs (Cu/Zn SOD, and MnSOD) activities remained unchanged. That was not in favour of a strong mitochondrial dysfunction and ROS overproduction by mitochondria since the MnSOD is normally induced by oxidative stress and its activity would have been increased (Azevedo-Martins et al., 2003; Sompol et al., 2006). These results showed that Cd was able to break down the pro-oxidant/anti-oxidant balance and generate an oxidative stress. All together our results allow to hypothesize that Cd is able to interact either directly with GPx and CAT, decreasing their activity and their efficiency in detoxifying H_2O_2 , or as shown by (Kirlin et al., 1999) and (Choi et al., 2007) in other models, Cd probably affects the transcription of these enzymes in C6 cells. The resulting decrease in CAT and GPx activities, together with a normal SOD activity leads to an over-production of H_2O_2 , and consequently to an over-production of $^{\circ}OH$. The interaction of Cd with metals like iron and copper, displacing them from their normal storage compartment and rendering them available for the Fenton reaction, probably also contributes to amplify and accelerate this generation of $^{\circ}OH$ from H_2O_2 .

Then the increase in $^{\circ}\text{OH}$ or others free radicals in the cells can be responsible for the oxidative damage to the macromolecules and also the direct oxidation of GSH into GSSG (Jacob et al., 2006), provoking a depletion in GSH. It has been shown by (Tweeddale et al., 2007) that proteins and thiol compounds such as GSH protect lipid membranes from oxidation by $^{\circ}\text{OH}$ and thiyl radicals. This report together with our observations concerning the early occurrence of an effect on thiol groups and on GSH, and a delayed increase in TBARs level after incubation with Cd could also confirm the involvement of free radicals.

In order to confirm the role played by GSH in the C6 cells sensitivity to Cd-induced cytotoxicity and genotoxicity, we used BSO and NAC as modulators of the intracellular level of GSHt. The depletion of the C6 cells in GSHt using BSO rendered them more sensitive to Cd since both the mortality and the genotoxicity were increased significantly. These results confirmed that GSH takes part in the C6 cells protection to Cd toxicity. In addition to its role in $^{\circ}\text{OH}$ detoxification, GSH could also interact directly with Cd resulting in GSH depletion. It has been shown that the intracellular GSH can chelate Cd and contribute to protect the cell against this metal together with the MT (Gallego, 1996a; Gallego, 1996b; Kang and Enger, 1987; Ochi et al., 1988).

N-acetylcysteine is known for its role as a precursor for GSH synthesis and as an antioxidant agent being able to scavenge the ROS (Kelly, 1998; Wispriyono et al., 1998). A NAC treatment prior incubation with Cd, did not protect the C6 cells to Cd-induced cytotoxicity and genotoxicity. This could be explained by the fact that the GSH level brought by NAC was not sufficient to decrease Cd toxicity.

In conclusion, we have demonstrated in this work that C6 cells can be used as a model of astrocytes for studying the toxicity of metals such Cd. Cd generates both cytotoxic and genotoxic effects in these cells. The major process seems to be the decrease in CAT and GPx activities leading to an overproduction of H_2O_2 , and consequently to overproduction of $^{\circ}\text{OH}$ which in turn provokes a depletion in GSH. CAT, GPx and GSH play a key role in the C6 cells defense to Cd toxicity, probably together with MT.

Acknowledgments:

We thank Malika Kadri-Dakir, Sandra Grange and Angèle Krawiec for their technical assistance.

References

- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology* 77, 373-382.
- Azevedo-Martins, A.K., Lortz, S., Lenzen, S., Curi, R., Eizirik, D.L., Tiedge, M., 2003. Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 52, 93-101.
- Barazani, O., Dudai, N., Khadka, U.R., Golan-Goldhirsh, A., 2004. Cadmium accumulation in *Allium schoenoprasum* L. grown in an aqueous medium. *Chemosphere* 57, 1213-1218.
- Beers, B.S., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry* 195, 133-139.
- Benavides, M.G., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17, 21-34.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science (New York, N.Y)* 161, 370-371.
- 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. *Molecular and cellular biology* 26, 7430-7436.
- Bulaj, G., Kortemme, T., Goldenberg, D.P., 1998. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965-8972.
- Cao, F., Zhou, T., Simpson, D., Zhou, Y., Boyer, J., Chen, B., Jin, T., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W., 2007. p53-Dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. *Toxicology and applied pharmacology* 218, 174-185.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in enzymology* 113, 484-490.
- Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145, 595-600.
- 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*). *Archives of environmental contamination and toxicology* 38, 357-361.

- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A., 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 67-101.
- Didier, C., Pouget, J.P., Cadet, J., Favier, A., Beani, J.C., Richard, M.J., 2001. Modulation of exogenous and endogenous levels of thioredoxin in human skin fibroblasts prevents DNA damaging effect of ultraviolet A radiation. *Free radical biology & medicine* 30, 537-546.
- Duthie, S.J., Collins, A.R., 1997. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free radical biology & medicine* 22, 717-724.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* 82, 70-77.
- Emonet, N., Leccia, M.T., Favier, A., Beani, J.C., Richard, M.J., 1997. Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA radiation. *Journal of photochemistry and photobiology* 40, 84-90.
- Eraso, J.M., Kaplan, S., 2002. Redox flow as an instrument of gene regulation. *Methods in enzymology* 348, 216-229.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* 1, 529-539.
- Figueiredo-Pereira, M.E., Yakushin, S., Cohen, G., 1998. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 12703-12709.
- Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105, 114-121.
- Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D., Timbrell, J.A., 2005. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro* 19, 481-489.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *The Journal of biological chemistry* 264, 5598-5605.
- Gallego, S.B.d., Tomaro, M., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* 121, 151-159.
- Halliwell, B.G., 1989. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, p86-123.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Hultberg, B., Andersson, A., Isaksson, A., 1999. Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 283, 21-32.
- Hultberg, B., Andersson, A., Isaksson, A., 2001. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology* 156, 93-100.
- 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. *International journal of molecular medicine* 14, 87-92.
- Irwin, R.V.M., Stevend, L., Seese, MD., Basham, W., 2003. Environmental contaminants encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the federal government as electronic document.
- Jacob, C., Knight, I., Winyard, P.G., 2006. Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biological chemistry* 387, 1385-1397.
- Jones, D.P., 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods in enzymology* 348, 93-112.
- Kang, Y.J., Enger, M.D., 1987. Effect of cellular glutathione depletion on cadmium-induced cytotoxicity in human lung carcinoma cells. *Cell biology and toxicology* 3, 347-360.
- Kelly, G.S., 1998. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 3, 114-127.
- Kim, S.C., Cho, M.K., Kim, S.G., 2003. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. *Toxicology letters* 144, 325-336.
- Kirlin, W.G., Cai, J., Thompson, S.A., Diaz, D., Kavanagh, T.J., Jones, D.P., 1999. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free radical biology & medicine* 27, 1208-1218.
- Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D.S., Kocak, A., 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Molecular and cellular biochemistry* 284, 81-85.
- Latinwo, L.M., Badisa, V.L., Ikediobi, C.O., Odewumi, C.O., Lambert, A.T., Badisa, R.B., 2006. Effect of cadmium-induced oxidative stress on antioxidative enzymes in mitochondria and cytoplasm of CRL-1439 rat liver cells. *International journal of molecular medicine* 18, 477-481.
- Lemarie, A., Lagadic-Gossman, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O., Vernhet, L., 2004. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in

- signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free radical biology & medicine* 36, 1517-1531.
- Lightbody, J.e.a., 1968. Establishment of differentiated clonal strains of glial brain cells in culture. *Fed. Proc.* 27.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry / FEBS* 47, 469-474.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 108, 652-659.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
- Ochi, T., Otsuka, F., Takahashi, K., Ohsawa, M., 1988. Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. *Chemico-biological interactions* 65, 1-14.
- Oh, S.H., Choi, J.E., Lim, S.C., 2006. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology* 220, 1-12.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martinez-Solano, J.R., Hellin, E., 1999. Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. *Free radical research* 31 Suppl, S33-38.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C., 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry* 16, 359-364.
- Price, D.J., Joshi, J.G., 1983. Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions. *The Journal of biological chemistry* 258, 10873-10880.
- Richard, M.J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., Favier, A., 1992. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clinical chemistry* 38, 704-709.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 53, 65-76.
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J., 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 4904-4911.
- Shaikh, Z.A., Vu, T.T., Zaman, K., 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic

- cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and applied pharmacology* 154, 256-263.
- Shen, H.M., Dong, S.Y., Ong, C.N., 2001. Critical role of calcium overloading in cadmium-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 171, 12-19.
- 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. *Journal of cellular biochemistry* 91, 384-397.
- Shih, Y.L., Lin, C.J., Hsu, S.W., Wang, S.H., Chen, W.L., Lee, M.T., Wei, Y.H., Shih, C.M., 2005. Cadmium toxicity toward caspase-independent apoptosis through the mitochondria-calcium pathway in mtDNA-depleted cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1042, 497-505.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine* 91, 31S-38S.
- Singhal, R.K., Anderson, M.E., Meister, A., 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *Faseb J* 1, 220-223.
- Sjoberg, B.M., Sahlin, M., 2002. Thiols in redox mechanism of ribonucleotide reductase. *Methods in enzymology* 348, 1-21.
- Sompol, P., Xu, Y., Ittarat, W., Daosukho, C., St Clair, D., 2006. NF-kappaB-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci* 29, 279-288.
- Stohs, S.J., 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.
- Thevenod, F., Friedmann, J.M., 1999. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *Faseb J* 13, 1751-1761.
- Tweeddale, H.J., Kondo, M., Gebicki, J.M., 2007. Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Archives of biochemistry and biophysics* 459, 151-158.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry* 266, 37-56.
- Waalkes, M.P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of inorganic biochemistry* 79, 241-244.
- 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.
- Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65-78.
- Watjen, W., Cox, M., Biagioli, M., Beyersmann, D., 2002a. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals* 15, 15-25.
- Watjen, W., Haase, H., Biagioli, M., Beyersmann, D., 2002b. Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environmental health perspectives* 110 Suppl 5, 865-867.
- Wispriyono, B., Matsuoka, M., Igisu, H., Matsuno, K. (1998) Protection from cadmium cytotoxicity by N-acetylcysteine in LLC-PK1 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 287, 344-351.
- Yang, C.S., Tzou, B.C., Liu, Y.P., Tsai, M.J., Shyue, S.K., Tzeng, S.F., 2007. Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. *Journal of cellular biochemistry*.
- Yiin, S.J., Chern, C.L., Sheu, J.Y., Lin, T.H., 2000. Cadmium-induced liver, heart, and spleen lipid peroxidation in rats and protection by selenium. *Biological trace element research* 78, 219-230.
- Zs-Nagy, I., 1992. A proposal for reconsideration of the role of oxygen free radicals in cell differentiation and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 673, 142-148.

Conclusions de l'article II et perspectives

Nos études montrent non seulement que le Cd induit un stress oxydant temps et dose-dépendant mais aussi que les mécanismes aboutissant à ce stress oxydant dépendent du type cellulaire. Contrairement aux HaCaT, seule l'activité GRase augmente chez les C6. Tous les autres paramètres du stress oxydant diminuent considérablement. Ce qui justifie la forte sensibilité de ces cellules vis-à-vis de 20 μ M de Cd. Nos résultats sont également en faveur d'un rôle important joué par le GSH contre la toxicité du Cd. En effet, la modulation du glutathion par le BSO s'accompagne d'une toxicité plus importante tandis que l'utilisation de la NAC réduit cette toxicité du métal. Les effets du Cd sur le GSH sont différents dans les deux lignées cellulaires. Ce métal induit à la fois une synthèse de GSH dans les cellules HaCaT par des mécanismes à élucider et une réduction du taux intracellulaire de GSH dans les cellules C6. Ce résultat inverse est difficile à interpréter.

Cependant, il existe des effets toxiques communs de ce métal sur les enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases et la CAT. Ces observations suggèrent une augmentation des ERO dans les deux lignées cellulaires. Les effets toxiques sont corrélés au taux de Cd incorporé. L'entrée du Cd peut à la fois provoquer l'inhibition des activités antioxydantes et l'altération de l'homéostasie des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc. Cette altération peut conduire à la production supplémentaire d'espèces réactives de l'oxygène.

*Etude du stress oxydant induit par le cuivre et
le zinc dans les cellules HaCaT et C6*

Présentation des études A et B

Le cuivre peut catalyser la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) via la réaction de Fenton (Aust *et al.* 1985; Krumschnabel *et al.* 2005; Stohs and Bagchi 1995). Des études récentes ont suggéré que le Cu pouvait diminuer le taux de glutathion intracellulaire (Hultberg *et al.* 2007). Les effets toxiques du cuivre peuvent également résulter de l'affinité des ions Cu^{2+} pour des composants cellulaires comme l'ADN (Agarwal *et al.* 1989; Bremner 1998; Sagripanti *et al.* 1991). Par ailleurs, il existe des maladies génétiques liées au métabolisme du cuivre ; les plus étudiées étant les maladies de Menkes (Kodama *et al.* 1999) et de Wilson (Ferenci 1999). L'autre mécanisme de toxicité du Cu en excès est dû au fait qu'il remplace d'autres cofacteurs. Le zinc (Zn) est remplacé par le Cu dans les structures en doigts de zinc de certains facteurs de transcription et ces protéines modifiées ne peuvent plus se lier sur leur séquence cible au niveau de l'ADN perturbant ainsi l'expression de certains gènes (Guiraud *et al.* 2003; Pena *et al.* 1999).

Comme le Cu, le Zn est un métal physiologique qui intervient dans les grandes voies métaboliques, soit comme cofacteur, soit comme constituant de la structure de l'enzyme. En effet, Il agit comme constituant structural d'un grand nombre de facteurs de transcription, ce qui explique son rôle pivot dans le contrôle de l'expression génique (Kindermann *et al.* 2005). Le nombre d'enzymes à zinc est impressionnant, Vallee (1990) en a identifié plus de 200. Cependant, le Zn peut inhiber des enzymes comme la protéine tyrosine phosphatase et la caspase-3 (Chimienti 2001), ou l'endonucléase dépendant du calcium et du magnésium (Beletsky 1989). D'autres études ont suggéré une production indirecte des ERO par le Zn. Cette production induite des ERO est liée à l'inhibition de la glutathion peroxydase, à la diminution du taux intracellulaire de GSH et à l'oxydation du glutathion (Bishop *et al.* 2007; Kim *et al.* 2003; Meister and Anderson 1983; Mize and Langdon 1962; Parat *et al.* 1997; Ryu *et al.* 2002; Splittgerber and Tappel 1979). Sensi and Jeng (2004) ont démontré que le Zn en excès est potentiellement neurotoxique. Les effets neurotoxiques impliquent plusieurs voies de signalisation, incluant la génération mitochondriale et extra-mitochondriale des ERO et la perturbation de l'activité des enzymes métaboliques liées à l'activation de l'apoptose et/ou la nécrose. En effet, la séquestration du Zn en excès par la mitochondrie se traduirait par son dysfonctionnement ; dysfonctionnement caractérisé par un relargage prolongé des ERO (Sensi and Jeng 2004). Les radicaux libres ainsi générés ont un impact sur les composants cellulaires.

L'homéostasie de ces deux métaux peut être altérée par l'entrée du Cd. Ils peuvent être déplacés de leurs sites physiologiques par compétition avec le Cd. Cette altération peut être une source supplémentaire de radicaux libres. C'est pourquoi il est intéressant de comprendre si le cuivre et le zinc induisent un stress oxydant dans nos modèles cellulaires.

A. Stress oxydant induit par le cuivre dans les cellules HaCaT et C6

RESULTATS

Cytotoxicité du cuivre

Les deux lignées cellulaires, C6 (figure 36A) et HaCaT (figure 36B), ont été incubées avec des concentrations croissantes en CuCl_2 pendant 24h et 48h. La cytotoxicité est déterminée par le test MTT. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage (%) de survie cellulaire.

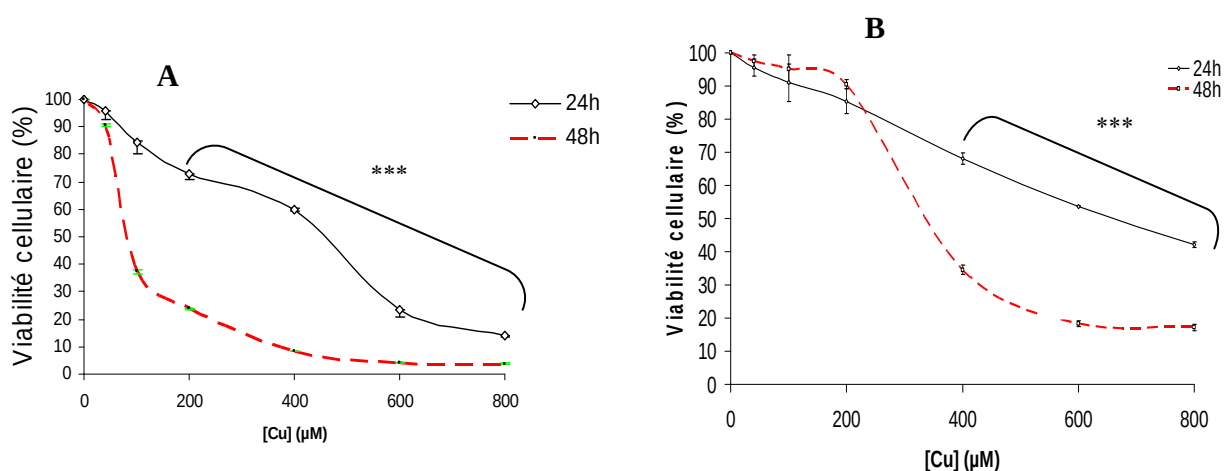


Figure 36 : Viabilité cellulaire mesurée par le test MTT 24h et 48h après incubation (A) des C6 et (B) des HaCaT avec des concentrations croissantes de cuivre (*** : $p < 0,001$)

Les figures 36A et 36B indiquent que le cuivre est toxique dans les deux lignées cellulaires. Les valeurs DI, DL_{25} et DL_{50} déterminées à partir des courbes sont regroupées dans les tableaux 3 (cellules C6) et 4 (cellules HaCaT). Ces 3 valeurs définissant la toxicité du Cu, du Zn et du Cd (articles 1 et 2) ont été respectivement utilisées. Ces résultats indiquent également que les cellules HaCaT sont plus résistantes aux métaux que les cellules C6.

	24h			48h		
	DI	DL ₂₅	DL ₅₀	DI	DL ₂₅	DL ₅₀
C_{CdCl2} (μM)	4	5	20	4	5	6
C_{CuCl2} (μM)	40	250	475	40	105	170
C_{ZnCl2} (μM)	100	140	200	100	145	200

Tableau 4 : Valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ des différents métaux dans les cellules C6. Les valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ correspondent respectivement à 10%, 25% et 50% de mort cellulaire

	24h			48h		
	DI	DL ₂₅	DL ₅₀	DI	DL ₂₅	DL ₅₀
C_{CdCl2} (μM)	15	50	100	15	50	100
C_{CuCl2} (μM)	200	390	725	200	250	375
C_{ZnCl2} (μM)	100	210	325	100	210	325

Tableau 5 : Valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ des différents métaux dans les cellules HaCaT. Les valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ correspondent respectivement à 10%, 25% et 50% de mort cellulaire

Génotoxicité du cuivre

Pour évaluer les dommages de l'ADN causés par une exposition au cuivre, nous avons utilisé la méthode des comètes qui permet de détecter les cassures de l'ADN directement dans la cellule isolée. Les cellules sont mises en culture avec les différentes concentrations de cuivre (DI, DL₂₅, DL₅₀ ; page 124) ; puis étalées sur des lames et après électrophorèse, les résultats sont analysés par un logiciel statistique qui nous donne le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète ; paramètre qui va évaluer les lésions de l'ADN (figures 37A et 37B).

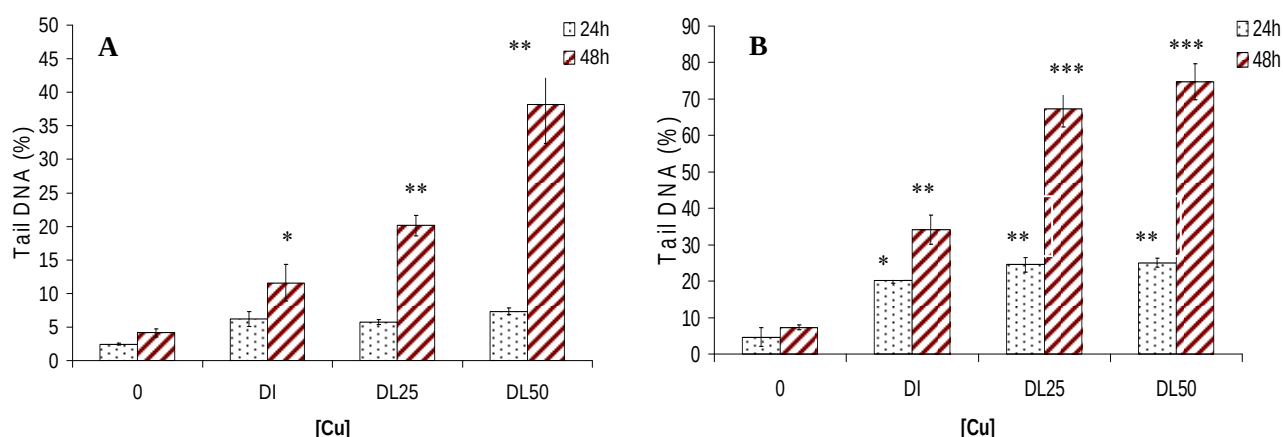


Figure 37 : Dommage de l'ADN déterminé par le test des comètes. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec des concentrations DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124) respectives de cuivre (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$)

D'après les résultats, le pourcentage d'ADN dans la queue augmente en fonction des concentrations et du temps d'incubation avec le Cu (de 2 à 40% en 48h à la DL₅₀). Ces pourcentages atteignent 70% dans le cas des cellules C6. Les doses utilisées ont donc un effet potentiellement génotoxique dans les cellules HaCaT et C6 (figures 37A et 37B). Ces résultats confirment que les cellules C6 sont plus sensibles aux métaux que les cellules HaCaT.

Effet du cadmium sur la teneur intracellulaire en cuivre

Après incubation des cellules HaCaT avec 0, 15, 50, 100 μM Cd et des cellules C6 avec 0, 4, 5, 20 μM Cd pendant 24h, le contenu cellulaire en cuivre (Cu) a été déterminé par spectrométrie d'absorption atomique. Cela permet de vérifier que le Cd est capable de d'altérer l'homéostasie du Cu.

A		B	
[Cd] (μM)	Taux de Cu (μg/ g prot)	[Cd] (μM)	Taux de Cu (μg/ g prot)
0	32,52 ± 0,02	0	40,68 ± 0,54
15	73,2 ± 1,06	4	105,87 ± 1,92 **
50	36,99 ± 3,65	5	79,83 ± 1,41 *
100	54,06 ± 3,95 *	20	120,86 ± 0,95 ***

Tableau 6 : Taux de cuivre intracellulaire. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont respectivement traitées par le cadmium pendant 24h et les taux de cuivre sont mesurés en spectroscopie d'absorption atomique (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$).

Les résultats montrent un taux de Cu élevé parallèlement à l'augmentation du Cd cellulaire. En effet le taux basal de Cu est estimé à 33 μg/g de protéine soluble. Quand la concentration de Cd cellulaire augmente, le taux de Cu passe à 54 μg/g de protéine. Ce qui représente un gain de Cu de 21 μg/g de protéine (tableaux 6A et 6B). Par ailleurs, ces tableaux montrent un taux de Cu environ 2 fois moins important dans les cellules HaCaT à 100 μM de Cd par rapport aux C6 traitées à 20 μM de Cd. Ces observations pourraient expliquer la sensibilité plus importante de ces C6 au Cu. L'augmentation de la teneur en Cu après incubation des cellules avec le Cd semble indiquer que le Cd peut favoriser l'entrée de Cu extracellulaire.

Impact du cuivre sur le taux intracellulaire de glutathion

Les cellules ont été incubées pendant 24h et 48h avec du cuivre (Cu) et les taux intracellulaires de glutathion (GSH) sont mesurés. Les résultats montrent une décroissance du taux de GSH (figures 38A et 38C). Cette baisse de GSH induite par le Cu s'accompagne d'une augmentation du taux de glutathion oxydé et d'une diminution du ratio GSH/GSSG (figures 38B et 38D). Ceci suggère une production d'ERO. Cependant, après 24h d'incubation des cellules HaCaT avec le Cu à la DI, on observe une augmentation du taux de GSH (figure

38A). Ce résultat est en faveur d'une induction de synthèse du GSH dans les cellules HaCaT incubées avec une faible concentration de Cu (inférieure ou égale à 200 μ M). Contrairement à 24h, l'incubation des cellules HaCaT pendant 48h avec la DL₂₅ ne conduit pas à une oxydation du GSH (figure 38A). Ce résultat peut s'expliquer par une adaptation des cellules au Cu. Le taux de GSH devient rapidement insuffisant lorsque les doses de Cu atteignent la DL₅₀.

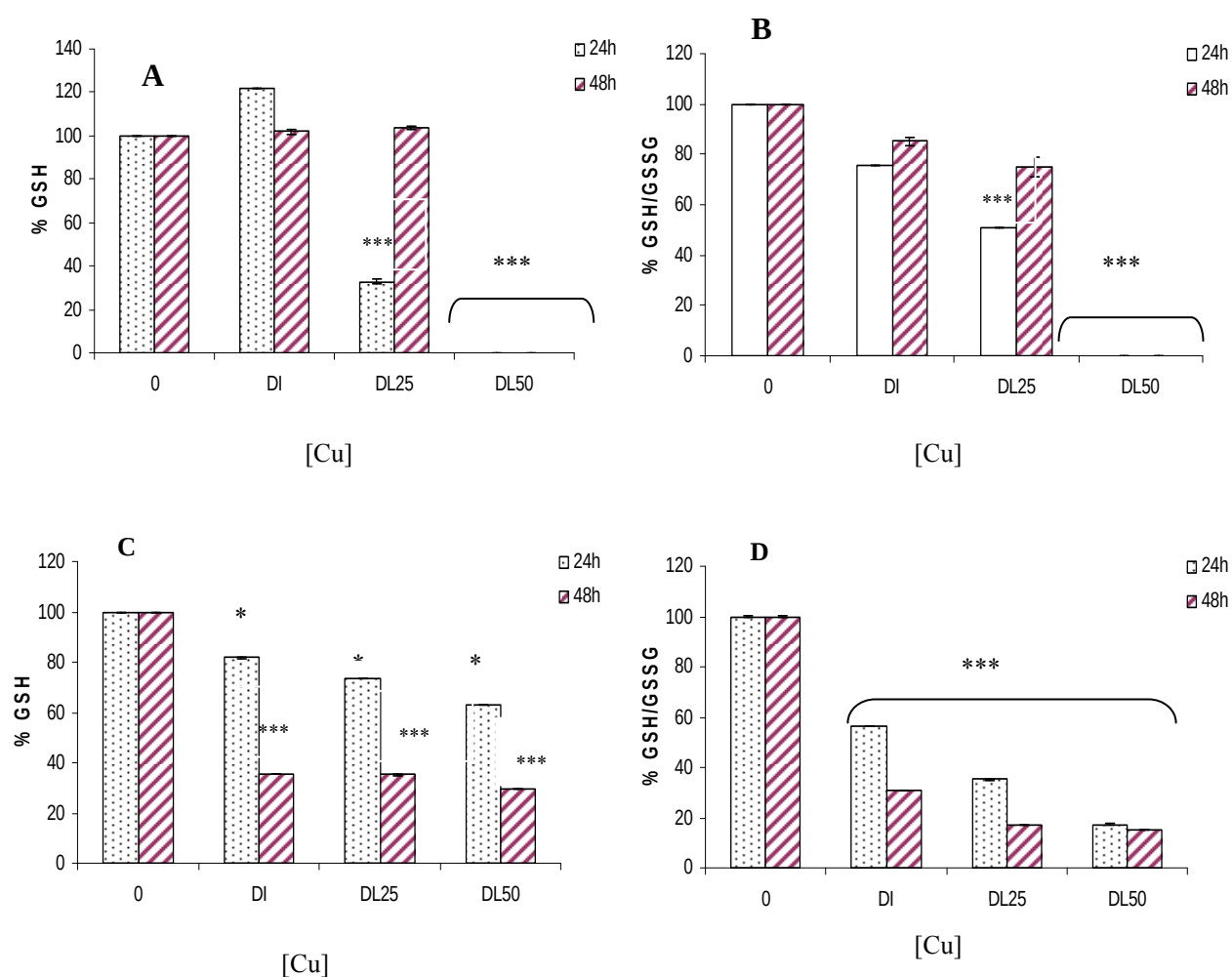


Figure 38 : Taux de glutathion intracellulaire. (A) taux de GSH et (B) de GSH/GSSG dans les cellules HaCaT. (C) taux de GSH et (D) ratio GSH/GSSG dans les cellules C6. Les cellules HaCaT et C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec le Cu aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). Les taux de GSH et du rapport GSH/ GSSG sont normalisés sur les témoins et exprimés en pourcentage (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$)

Peroxydation lipidique

Pour montrer les changements oxydatifs dans les cellules HaCaT et C6 après induction par différentes concentrations de cuivre (DI, DL₂₅ et DL₅₀, tableaux 4 et 5 page 124), plusieurs marqueurs de stress oxydant ont été évalués notamment le malondihaldéhyde (MDA) qui est un marqueur de la peroxydation lipidique (figures 39A et 39B).

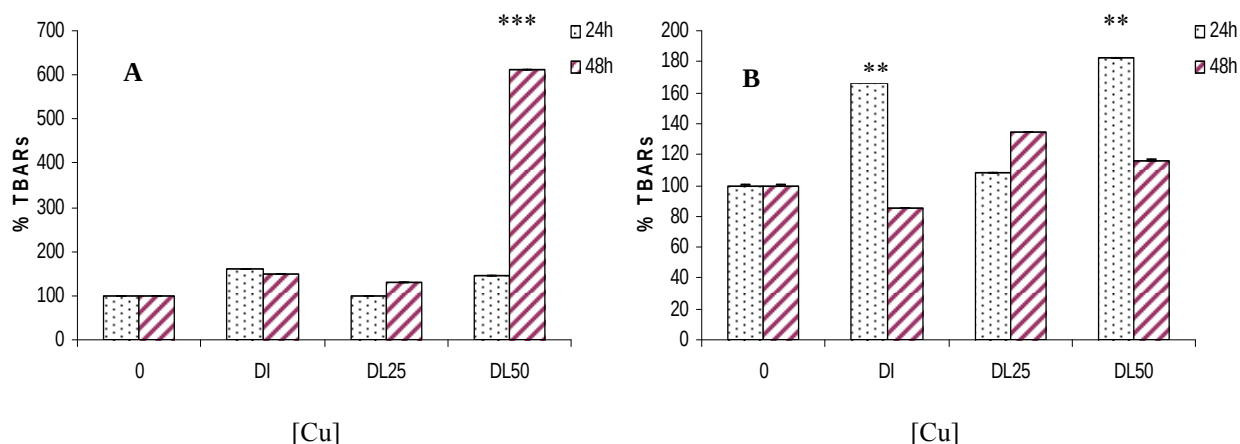


Figure 39 : Peroxydation lipidique. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec le Cu aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). Le taux de MDA, caractérisé par la formation d'adduits à l'acide thiobabaturique (TBARs) est normalisé sur les témoins et exprimé en pourcentage (** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Les résultats montrent, dans le cas des cellules HaCaT, que le taux de TBARs semble augmenter significativement 48h après incubation avec le Cu à la DL₅₀ (figure 39A). Cependant, les taux de TBARs dans les HaCaT augmentent de façon non significative à toutes les autres concentrations de Cu (200 μ M, DL₂₅ = 390 μ M pour 24h et DL₂₅ = 250 μ M pour 48h ; tableau 5 page 124) après 24h et 48h d'incubation (figure 39A). On observe également que le Cu, dans les cellules C6, entraîne une peroxydation lipidique de l'ordre de 50% par rapport au témoin (figure 39B) après 24h de traitement. Par contre le taux de TBARs à 48h est moins important et non significatif (figure 39B).

De façon générale, ces résultats sont en faveur d'une peroxydation lipidique induite par le cuivre. Cette peroxydation survient au bout de 24h dans les cellules C6 tandis qu'il faut 48h d'incubation des HaCaT avec ce métal pour observer un effet significatif.

Evaluation des thiols

Après traitement des cellules par le cuivre (Cu), les taux de thiols intracellulaires sont mesurés et normalisés sur les témoins (figures 40A et 40B).

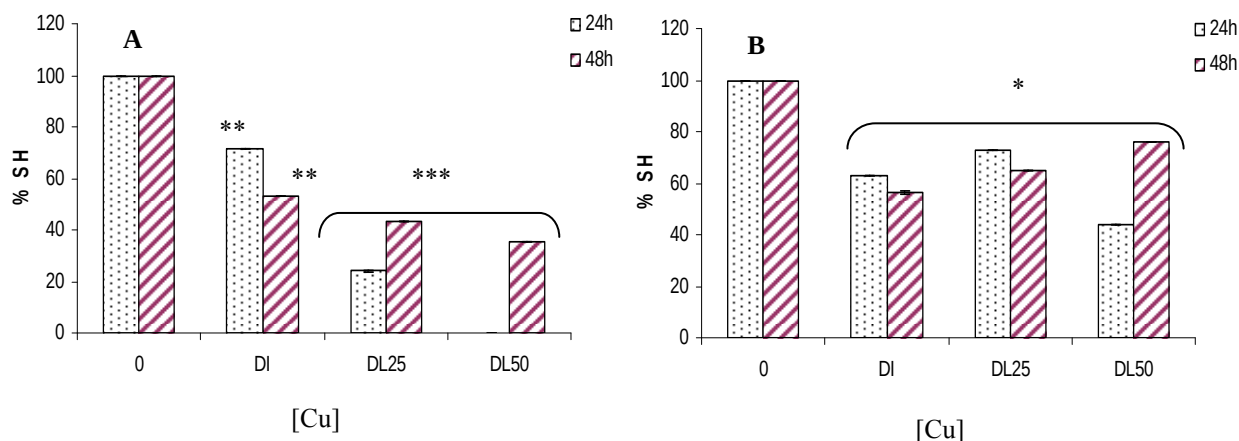


Figure 40 : Taux intracellulaire de thiols protéiques. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec le Cu aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). Le taux de SH est normalisé sur les témoins et exprimé en pourcentage (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Les résultats indiquent une diminution significative temps et dose-dépendante du taux des thiols dans les deux lignées cellulaires après 24h et 48h d'incubation avec le Cu. Les figures 40A et 40B montrent qu'aux fortes concentrations [(cellules HaCaT : DL₂₅ = 390 μ M 24h ; DL₂₅ = 250 μ M 48h ; DL₅₀ = 725 μ M 24h ; DL₅₀ = 375 μ M 48h) ; (cellules C6 : DL₂₅ = 250 μ M 24h ; DL₂₅ = 105 μ M 48h ; DL₅₀ = 475 μ M 24h et DL₅₀ = 170 μ M 48h) ; tableaux 4 et 5 page 124], le Cu (cellules HaCaT) entraîne une diminution de thiols de l'ordre de 90% par rapport au témoin ; tandis que dans les cellules C6, ce métal entraîne une baisse de l'ordre de 45%. Les figures 40A et 40B apportent une preuve de l'oxydation des protéines induite par le Cu. Cependant, la comparaison des résultats de GSH, de TBARs et de SH, dans les cellules C6, n'apporte pas une information cohérente. En effet, la DL₅₀ à 48h n'induit pas une peroxidation lipidique et provoque une oxydation moins importante des protéines. Ceci semble indiquer une baisse du stress oxydant dans les cellules C6 alors que la diminution du ratio GSH/GSSG est en faveur d'une augmentation du stress oxydant à 48h. Ce résultat contradictoire est inexplicable.

Enzymes antioxydantes

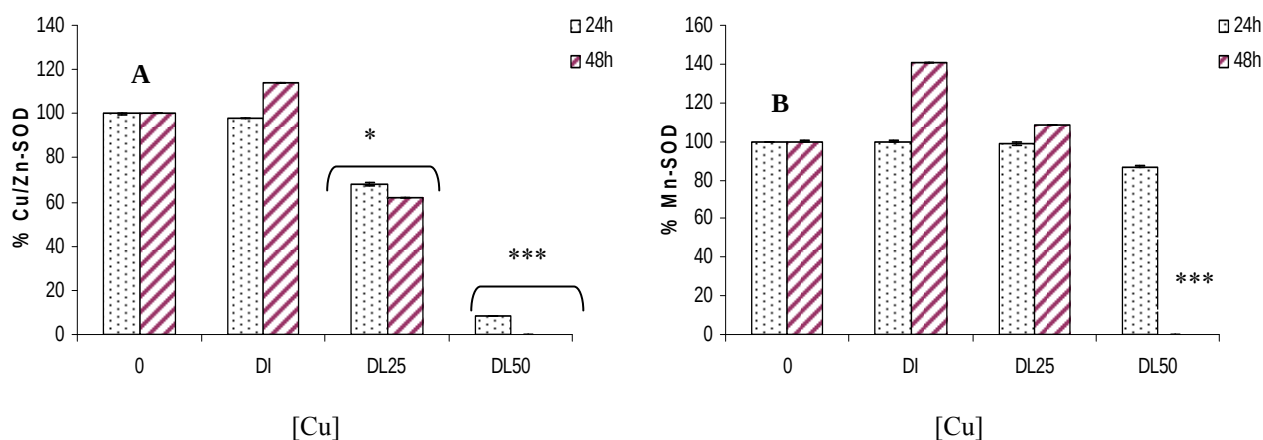
Les cellules possèdent tout un arsenal d'enzymes qui permettent de lutter contre le stress oxydant. Cependant l'activité de ces enzymes peut être affectée par certains métaux au

delà de certaines concentrations. Ainsi il apparaît nécessaire de mesurer les activités intracellulaires de ces enzymes pour évaluer l'impact du Cu comme agent inducteur de stress oxydant.

Superoxydes dismutases (SODs)

Parmi les systèmes enzymatiques de défense cellulaire contre le stress oxydant, les SODs constituent la première étape. Ces enzymes sont capables de prendre en charge l'anion superoxyde et de le métaboliser en peroxyde d'hydrogène. Pour mesurer leurs activités, les cellules sont incubées pendant 24h et 48h avec le Cu aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5). Les mesures des activités SODs totales et mitochondriales (Mn-SOD) permettent de déduire les taux de SODs cytoplasmiques (Cu/Zn-SOD) et les résultats des mesures sont normalisés sur les témoins et exprimés en pourcentage.

Le Cu diminue les activités des SODs cytoplasmiques (Cu/Zn-SOD) après traitement des cellules HaCaT aux doses DL₂₅ (390 µM 24h ; 250 µM 48h) et DL₅₀ (725 µM 24h ; 375 µM 48h) ; tandis que l'altération des activités SODs mitochondriales (Mn-SOD) n'apparaît qu'à la DL₅₀ (375 µM) après 48h d'incubation (figures 41A et 41B). Par ailleurs, les activités des Cu/Zn-SODs ne diminuent qu'après incubation des cellules C6 avec DL₅₀ (170 µM Cu) pendant 48h. Par contre les activités Mn-SODs baissent à toutes les concentrations et passent de 100% (témoins) à 50% environ à la DL₅₀ (475 µM Cu 24h ; 170 µM Cu 48h ; figures 41C et 41D). Ainsi le Cu agit à la fois sur les SODs cytoplasmiques et mitochondriales dans le cas des cellules HaCaT alors qu'il n'affecte que le taux des SODs mitochondriales dans les cellules C6. Ces résultats sont en faveur de la surproduction de l'anion superoxyde induite par le Cu.



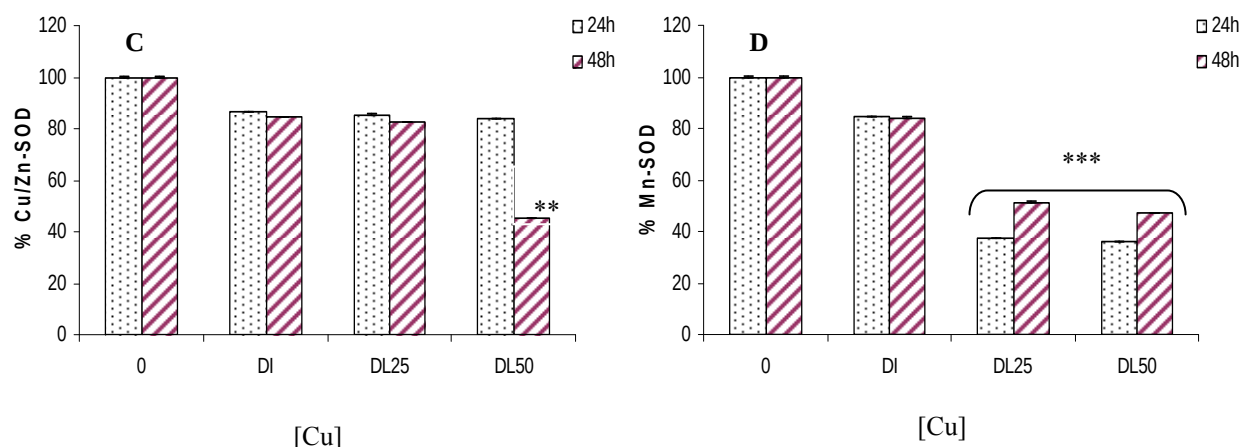


Figure 41 : Evaluation de l'activité des Cu/Zn-SOD et Mn-SOD intracellulaire. (A) activité de Cu/Zn-SOD et (B) activité de Mn-SOD dans les cellules HaCaT. (C) activité Cu/Zn-SOD et (D) activité Mn-SOD dans les cellules C6. Les cellules sont incubées pendant 24h et 48h aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ de cuivre (tableaux 4 et 5 ; page 124). Les activités des SODs sont normalisées sur les témoins et exprimées en pourcentage (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Evaluation de la catalase

La catalase (CAT) représente la deuxième étape du système de défense enzymatique. Elle prend en charge le peroxyde d'hydrogène précédemment produit par les SODs et le métabolise en eau.

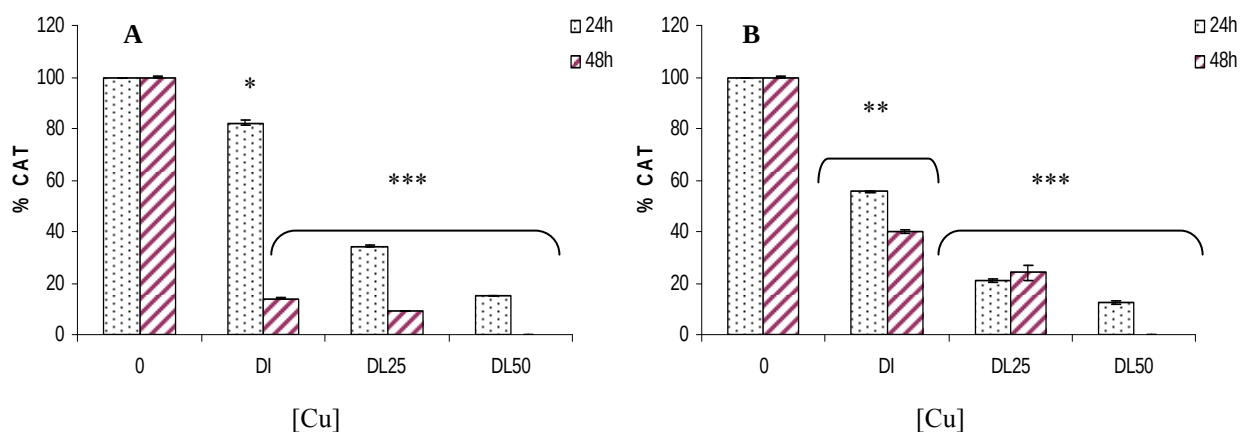


Figure 42 : Evaluation de l'activité de la catalase. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont respectivement incubées pendant 24h et 48h aux valeurs respectives DI, DL₂₅ et DL₅₀ de cuivre (tableaux 4 et 5 ; page 124). Les activités de la catalase sont normalisées sur les témoins et exprimées en pourcentage (** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$)

Qu'il s'agisse des cellules HaCaT ou C6, l'activité CAT diminue significativement avec l'augmentation des concentrations de Cu [(cellules HaCaT : $DL_{25} = 390 \mu M$ 24h ; $DL_{25} = 250 \mu M$ 48h ; $DL_{50} = 725 \mu M$ 24h ; $DL_{50} = 375 \mu M$ 48h) ; (cellules C6 : $DL_{25} = 250 \mu M$ 24h ; $DL_{25} = 105 \mu M$ 48h ; $DL_{50} = 475 \mu M$ 24h et $DL_{50} = 170 \mu M$ 48h) ; tableaux 4 et 5 page 124)]. La plus forte baisse est trouvée pour le Cu à la DL_{50} (0% d'activité par rapport au témoin en 48h d'incubation ; figures 42A et 42B). Ces résultats montrent que le Cu altère les activités des CAT ; ce qui suggère une augmentation du peroxyde d'hydrogène dans les cellules HaCaT et C6.

Evaluation de la glutathion peroxydase (GPx)

Comme la CAT, la glutathion peroxydase est capable de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau.

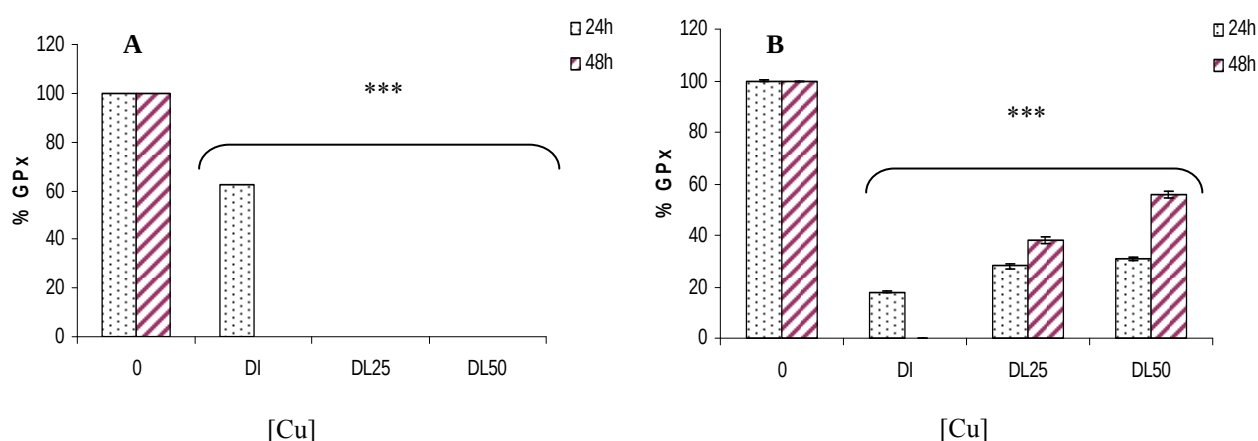


Figure 43 : Evaluation de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx). (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont respectivement incubées pendant 24h et 48h aux valeurs respectives DI, DL_{25} et DL_{50} de cuivre (tableaux 4 et 5 ; page 124). L'activité de la GPx est normalisée et exprimée en pourcentage (***) : $p < 0,001$.

On observe une diminution significative et dose-dépendante de l'activité GPx dans les deux lignées cellulaires traitées par le Cu (figures 43A et 43B). La figure 43A montre que l'activité GPx est égale à zéro lorsque les cellules HaCaT sont incubées avec le Cu à la valeur DI (200 μM) pendant 48h et aux valeurs supérieures à la DL_{25} ($DL_{25} = 390 \mu M$; $DL_{50} = 725 \mu M$) pour une incubation de 24h. Ces mesures sont en accord avec celles obtenues lors de l'étude de la catalase et confirment que le taux de H_2O_2 augmente très certainement vu que les activités CAT et de GPx baissent et s'annulent à certaines concentrations. Par ailleurs, la GPx est connue pour oxyder le glutathion or les résultats présentés dans les figures 43A et 43B

montrent une inhibition des activités GPx. Cela suggère que l'augmentation du GSSG observée dans les figures 38A, 38B, 38C et 38D provient d'un mécanisme autre que l'utilisation de la GPx. L'augmentation du GSSG serait liée à l'oxydation directe du GSH par les espèces oxydantes. Le radical $^{\circ}\text{OH}$ est un candidat possible. En effet, la diminution des activités GPx et CAT provoque une augmentation de H_2O_2 . Ce H_2O_2 en présence de Cu peut rentrer dans le cycle d'Haber-Weiss et produire le radical $^{\circ}\text{OH}$.

Evaluation de la glutathion réductase (GRase)

La GRase est l'enzyme qui permet de régénérer le glutathion réduit en utilisant GSSG comme substrat. La détermination de son activité permettra de vérifier si le glutathion réduit est produit pendant le stress oxydant induit par le Cu.

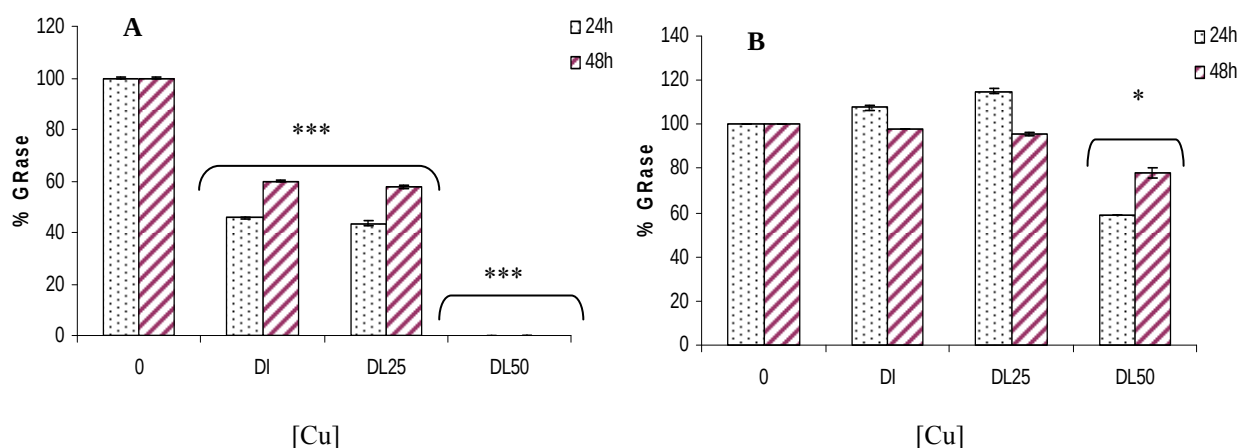


Figure 44 : Evaluation de l'activité de la glutathion réductase (GRase). (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h aux valeurs respectives DI, DL₂₅ et DL₅₀ de cuivre (tableaux 4 et 5 ; page 124). L'activité de la GRase est normalisée sur les témoins et exprimée en pourcentage (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

On observe une diminution de l'activité de la GRase dans toutes les conditions d'expérience lorsque les cellules HaCaT sont traitées au Cu (figure 44A). Dans le cas des C6, l'activité de GRase ne diminue qu'à la DL₅₀ (475 μM Cu 24h et 170 μM Cu 48h ; figure 44B). La diminution des activités GRase explique en partie la baisse de glutathion observée précédemment dans les figures 38A et 38C. Ainsi le Cu est capable non seulement d'oxyder le GSH en GSSG par une réaction directe, mais aussi de diminuer les activités GRase (figures 44A et 44B) ce qui empêche de resynthétiser le GSH.

Déplétion en glutathion et impact du cuivre

Dans la cellule, la synthèse du glutathion (GSH) nécessite différentes enzymes parmi lesquelles on trouve la γ glutamyl cysteine synthétase et la glutathion synthétase. La glutathion synthétase peut être inhibée par le BSO. Il est nécessaire de vérifier la toxicité du BSO. Les résultats préalables indiquent que le BSO n'est pas toxique en 24h dans les deux lignées cellulaires mais toxique pour les cellules HaCaT après 48h d'incubation. On observe également que les cellules C6 ne sont pas sensibles au BSO même après 48h d'incubation. Pour être dans les mêmes conditions de travail que les HaCaT et mener les expériences plus simplement, nous avons choisi le temps 24h pour la suite de l'étude. Par ailleurs, le maximum de déplétion est obtenu pour des cellules incubées avec 80 μ M de BSO pendant 24h (articles 1 et 2).

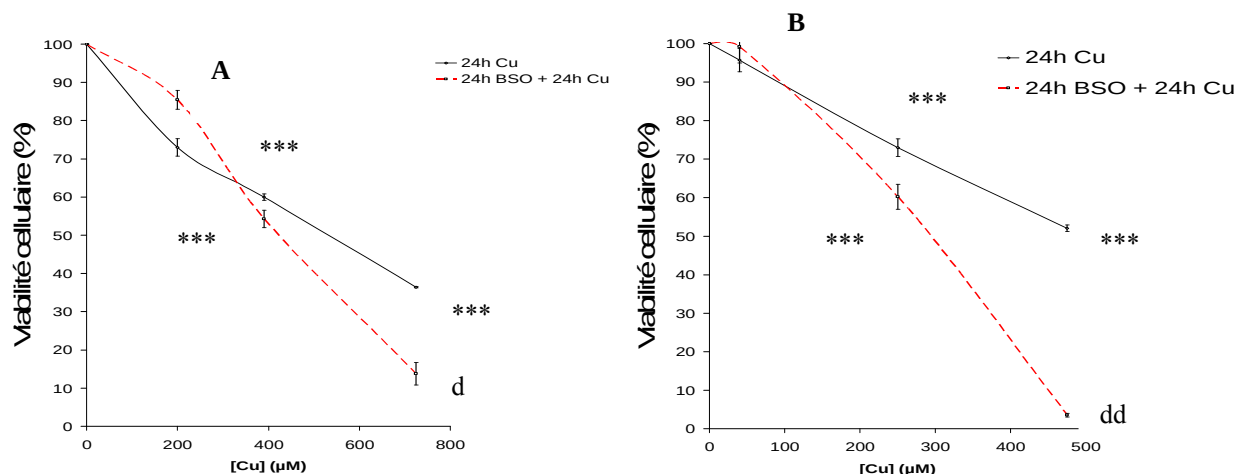


Figure 45 : Viabilité cellulaire. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 ont été incubées avec 80 μ M de BSO pendant 24h (articles 1 et 2) et soumises à un stress au cuivre aux valeurs DI , DL_{25} et DL_{50} (tableaux 4 et 5 ; page 124) pendant une période supplémentaire de 24h. Le test MTT est réalisé avant et après traitement des cellules par le BSO (*** : $p < 0,001$; d : $p < 0,05$; dd : $p < 0,01$ par comparaison avec les cellules non traitées par le BSO).

Les cellules sont incubées pendant 24h avec le BSO (80 μ M) puis avec le Cu pendant une période supplémentaire de 24h. D'après les résultats, le Cu provoque une toxicité plus grande dans les cellules C6 lorsqu'elles sont déplétées en GSH (figure 45B). La viabilité cellulaire reste relativement proche de celle obtenue avant ajout du BSO dans le cas des HaCaT incubées avec le Cu aux valeurs inférieures à la DL_{50} (figure 45A). Cependant, on observe une diminution significative de la DL_{50} (375 μ M de Cu) en absence de GSH ($p < 0,01$). Donc le GSH participe à la protection des cellules HaCaT et C6 contre la toxicité du Cu.

B. Stress oxydant induit par le zinc dans les cellules HaCaT et C6.

RESULTATS

Cytotoxicité du zinc

La cytotoxicité est déterminée par le test MTT. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage (%) de survie cellulaire.

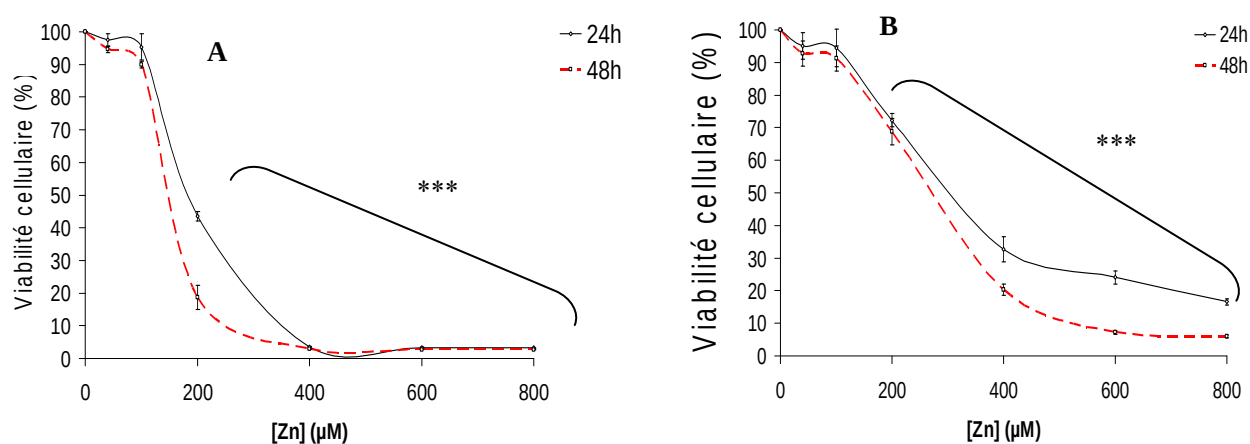


Figure 46 : Viabilité cellulaire mesurée par le test MTT 24h et 48h après incubation (A) des C6 et (B) des HaCaT avec des concentrations croissantes de zinc (*** : $p < 0,05$)

Les figures 46A et 46B montrent que le zinc est cytotoxique dans les deux lignées cellulaires. Les valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ [(cellules HaCaT : DI = 100 μM Zn 24h et 48h ; DL₂₅ = 210 μM Zn 24h et 48h ; DL₅₀ = 325 μM Zn 24h et 48h) ; (cellules C6 : DI = 100 μM Zn 24h et 48h ; DL₂₅ = 140 μM 24h et 48h ; DL₅₀ = 200 μM Zn 24h et 48h)]obtenues à partir des courbes sont dans les tableaux 4 (cellules C6) et 5 (cellules HaCaT) de l'étude A page 124.

A partir des résultats précédents (figures 46A, 46B ; tableaux 4 et 5 de l'étude A page 124) on définit 3 valeurs dont la DL₅₀ qui correspond à la dose du métal qui cause 50% de mortalité. Cette concentration est le paramètre le plus utilisé pour évaluer la toxicité d'une substance. Les résultats montrent que le Cd est plus toxique que le zinc qui lui même est plus toxique que le cuivre (tableaux 4 et 5). Dans tous les cas, les cellules C6 sont 5 fois plus sensibles au cadmium, 2 fois plus sensibles au cuivre et au zinc que les cellules HaCaT dans les mêmes conditions expérimentales.

Génotoxicité du zinc

Les cellules sont mises en culture avec les différentes concentrations de Zn (DI, DL₂₅, DL₅₀ ; page 124) puis les dommages de l'ADN sont analysés par le test des comètes.

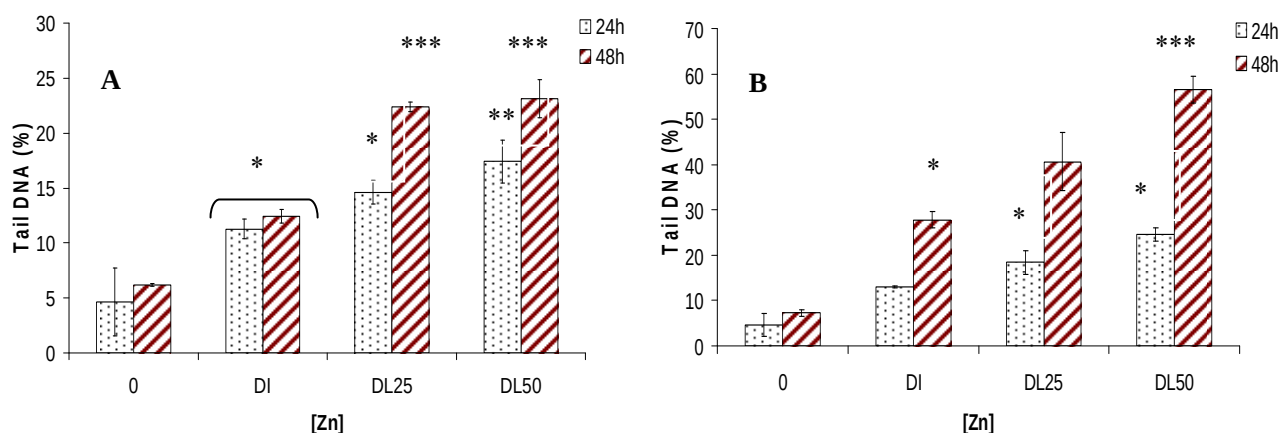


Figure 47 : Dommages de l'ADN déterminés par le test des comètes. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec des concentrations DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124) respectives de zinc (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$)

Le pourcentage d'ADN dans les queues des comètes augmente en fonction des concentrations et du temps d'incubation avec le zinc (de 2 à 25% en 48h d'incubation avec le Zn). Ces pourcentages atteignent 70% dans le cas des cellules C6 traitées au zinc. Les doses utilisées induisent donc des dommages significatifs de l'ADN dans les cellules HaCaT et C6 (figures 47A et 47B).

Effet du cadmium sur la teneur intracellulaire en zinc

Comme le cuivre, le zinc est un métal physiologique dont l'homéostasie peut être altérée par le cadmium (Cd). Le taux intracellulaire de zinc a donc été mesuré après traitement des cellules par le Cd.

A		B	
[Cd] (μM)	Taux de Zn (μg/ g prot)	[Cd] (μM)	Taux de Zn (μg/ g prot)
0	83,28 ± 0,031	0	4,07 ± 0,012
15	79,85 ± 5,22	4	53,12 ± 3,2 ***
50	79,73 ± 4,67	5	36,73 ± 4,43 ***
100	204,69 ± 1,83 ***	20	59,36 ± 2,84 ***

Tableau 7 : Taux de zinc intracellulaire après traitement des cellules par le Cd. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont respectivement traitées par le cadmium pendant 24h et les taux de zinc sont mesurés en spectroscopie d'absorption atomique (*** : $p < 0,001$)

Les taux de Zn intracellulaires augmentent avec les doses de Cd (cellules HaCaT : 0 ; 15 ; 50 et 100 μM Cd ; cellules C6 : 0 ; 4 ; 5 et 20 μM Cd). Pour les cellules HaCaT, le taux de Zn est estimé à 84 μg/g de protéine soluble avant incubation des cellules avec le Cd. Quand la concentration de Cd augmente dans le milieu de culture, le taux de Zn intracellulaire atteint jusqu'à 204 μg/g de protéine. Ce qui correspond à un excès de Zn d'environ 120 μg/g de protéine (tableau 7A). Cet excès de Zn est 3,5 fois plus important dans les cellules HaCaT par comparaison aux C6 (tableaux 7A et 7B). Ces résultats sont en faveur d'une entrée de Zn du milieu de culture vers le milieu intracellulaire et une altération de l'homéostasie du Zn induite par le cadmium.

Impact du zinc sur le taux intracellulaire de glutathion

Nous avons exposé les cellules HaCaT et C6 au zinc (Zn). Après 24h et 48h d'incubation, les résultats montrent une diminution significative des taux de GSH dans les deux lignées cellulaires (70% de baisse en 48h d'incubation des HaCaT et 60% en 48h d'incubation des C6 avec le Zn). Cette baisse du taux de GSH induite par le Zn s'accompagne d'une diminution du ratio GSH/GSSG dans les deux lignées cellulaires (figures 48A, 48B, 48C et 48D). Cependant, les taux de GSH sont proches des témoins après 24h d'incubation des C6 avec le Zn. En revanche le ratio GSH/GSSG diminue à la DL₅₀ (200 μM Zn 24h et

48h). Tous ces résultats sont globalement en faveur d'un stress oxydant induit par le Zn. Par ailleurs, la figure 48A montre une réponse biphasique des cellules HaCaT. Le Zn induit une oxydation significative du GSH à la DL₂₅ (210 μ M Zn) après 24h d'incubation. Cependant, la DL₅₀ (325 μ M Zn) ne provoque pas une diminution très importante du taux de GSH. Ce résultat semble indiquer une légère adaptation des cellules HaCaT à la DL₅₀ (200 μ M) après 24h d'incubation.

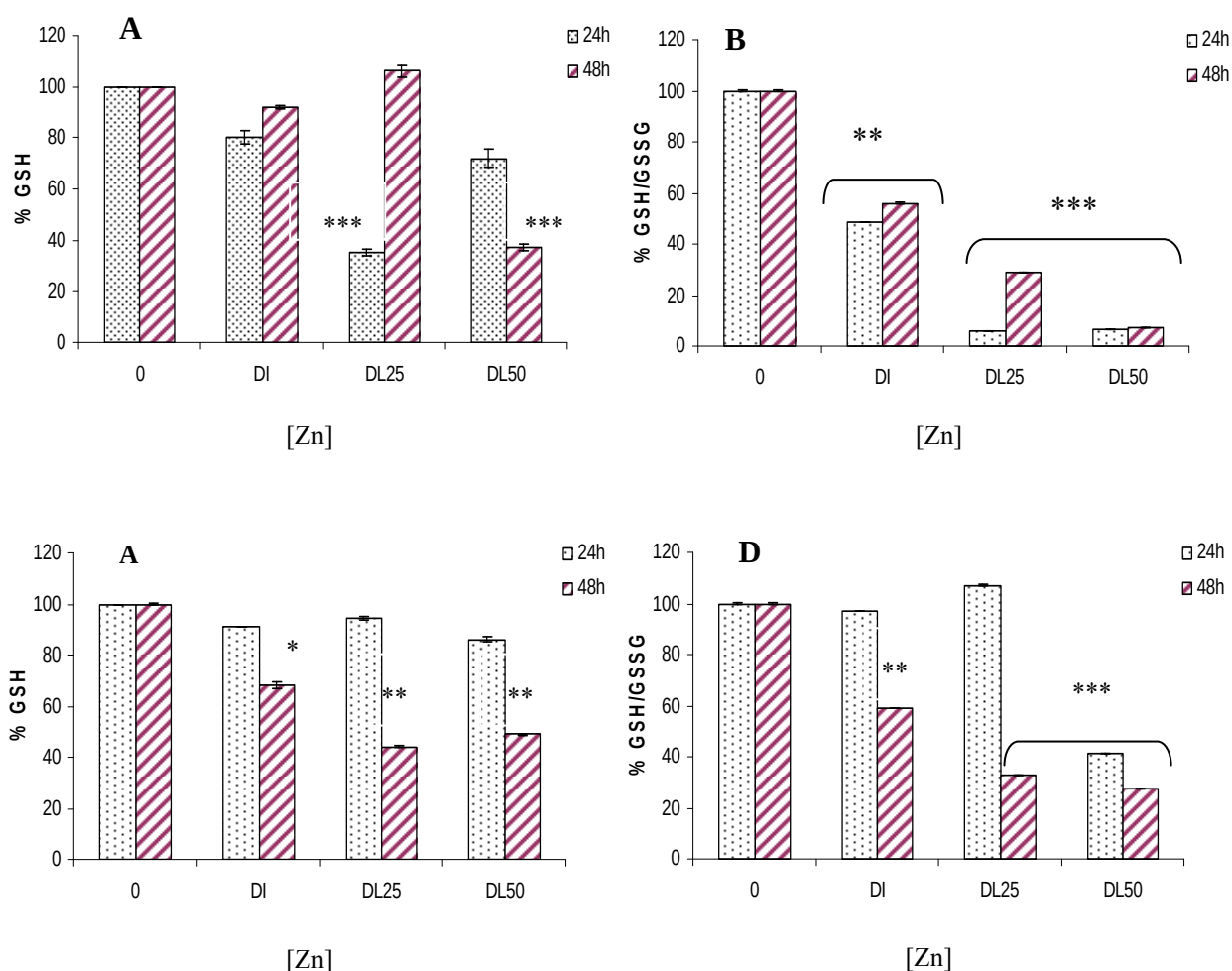


Figure 48 : Taux de glutathion intracellulaire. (A) taux de GSH et (B) de GSH/GSSG dans les cellules HaCaT. (C) taux de GSH et (D) ratio GSH/GSSG dans les cellules C6. Les cellules HaCaT et C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec le Zn aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). Les taux de GSH et du rapport GSH/ GSSG sont normalisés sur les témoins et exprimés en pourcentage (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Peroxydation lipidique

La formation de malondihaldéhyde (MDA) a été évaluée après incubation des cellules HaCaT et C6 avec le zinc (figures 49A et 49B).

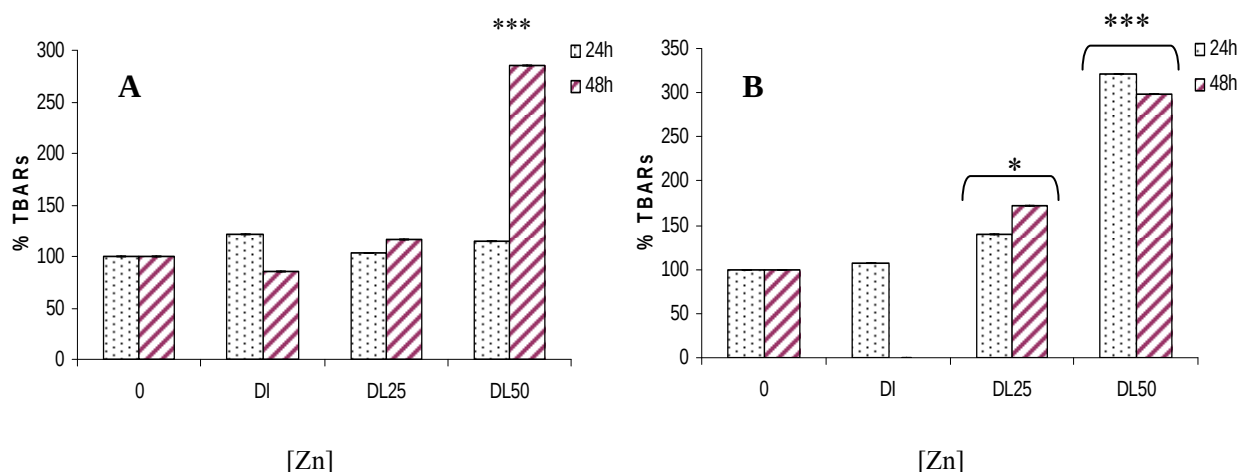


Figure 49 : Peroxydation lipidique. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec le zinc aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). Le taux de MDA, caractérisé par la formation d'adduits à l'acide thiobabaturique (TBARS) est normalisé sur les témoins et exprimé en pourcentage (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$).

Les résultats montrent, dans le cas des cellules HaCaT, que le taux de TBARS semble augmenter significativement 48h après incubation avec le Zn à la valeur DL₅₀ (325 μ M ; figure 49A). Par ailleurs à la DL₂₅ (210 μ M Zn), les taux de TBARS et de GSH ne vont pas dans le même sens. A cette concentration, le Zn induit une diminution du ratio GSH/GSSG et donc un stress oxydant (figure 48B) alors que le taux des TBARS semble indiquer qu'il n'y a pas de stress oxydant (figure 49A). Cette observation souligne une fois de plus la difficulté qui existe dans l'interprétation des paramètres du stress oxydant.

Dans les cellules C6, le Zn entraîne une peroxydation lipidique de l'ordre de 50% en 24h et de l'ordre de 250% en 48h par rapport au témoin (figure 49B). Le Zn est capable d'induire une oxydation des lipides au bout de 24h dans les cellules C6 tandis qu'il faut 48h d'incubation des HaCaT avec ce métal pour observer une oxydation significative des lipides.

Evaluation des thiols

Les taux des thiols intracellulaires sont mesurés et normalisés sur les témoins 24h et 48h après incubation des HaCaT et C6 au Zn (figures 50A et 50B).

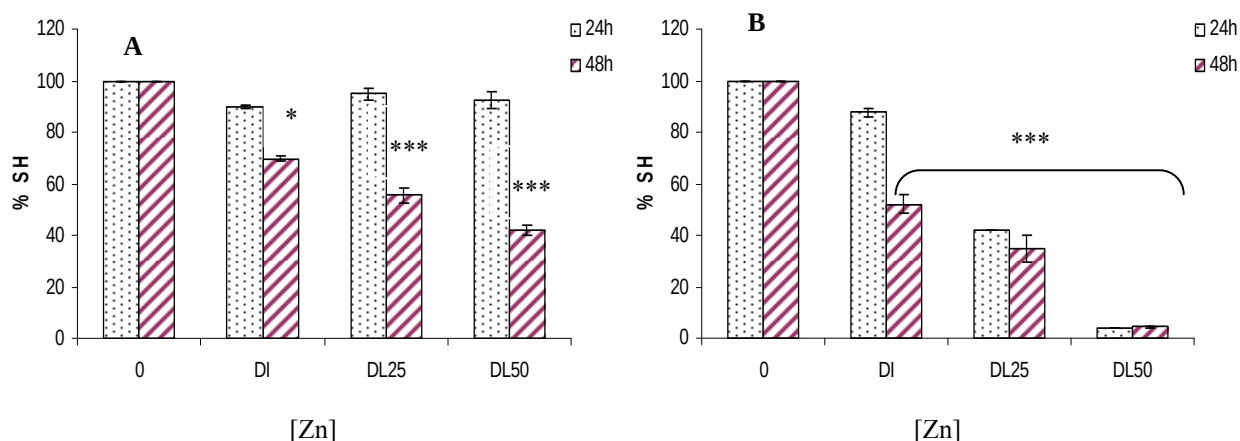


Figure 50 : Taux intracellulaire de thiols protéiques. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h avec le zinc aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). Le taux de SH est normalisé sur les témoins et exprimé en pourcentage (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$)

Les résultats montrent une diminution temps et dose-dépendante du taux des thiols dans les deux lignées cellulaires après 48h d'incubation avec le Zn ($p < 0,05$). Dans le cas d'un traitement des cellules HaCaT par le Zn, il faut attendre 48h pour observer une diminution des thiols mais cette baisse est 12 fois moins importante que celle induite par ce métal dans les cellules C6 à la DL₅₀ (200 μ M Zn). Les figures 50A et 50B suggèrent que le Zn induit une oxydation des protéines dans les deux lignées cellulaires.

Enzymes antioxydantes

Nous avons également évalué l'impact du Zn sur les enzymes antioxydantes.

Evaluation des SODs après stress au zinc

Pour mesurer les activités de ces enzymes, les cellules sont incubées pendant 24h ou 48h avec le Zn. Les mesures des SODs totales et mitochondriales (Mn-SOD) permettent de déterminer les activités des SODs cytoplasmiques (Cu/Zn-SOD) et les résultats des mesures sont normalisés sur les témoins.

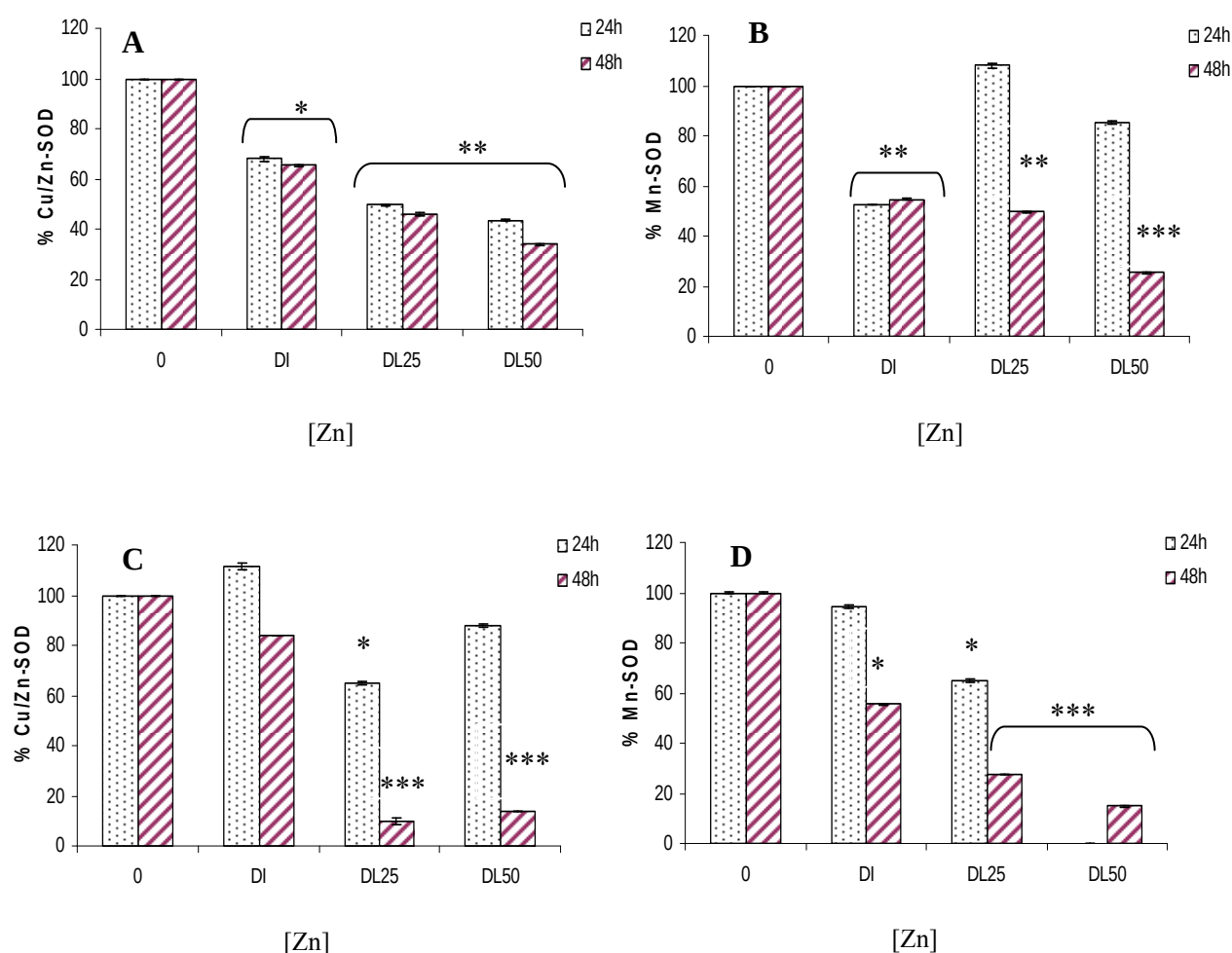


Figure 51 : Evaluation de l'activité des Cu/Zn-SOD et Mn-SOD intracellulaire. (A) activité de Cu/Zn-SOD et (B) activité de Mn-SOD dans les cellules HaCaT. (C) activité Cu/Zn-SOD et (D) activité Mn-SOD dans les cellules C6. Les cellules sont incubées pendant 24h et 48h aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ de zinc (tableaux 4 et 5 ; page 124). Les activités des SODs sont normalisées sur les témoins et exprimées en pourcentage (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Les figures 51A, 51B, 51C et 51D montrent, de façon générale, que le Zn affecte à la fois les SODs cytoplasmiques et mitochondriales quelque soit la lignée cellulaire utilisée sauf pour la Mn-SOD dont les activités restent stables après 24h d'incubation des cellules HaCaT avec le Zn aux valeurs DL₂₅ (210 μ M) et DL₅₀ (325 μ M ; figure 51B). Les résultats montrent également que la dose DI (100 μ M) de Zn provoque une inhibition significative des activités Mn-SOD après 24h d'incubation des cellules HaCaT. De même, la dose DL₂₅ (140 μ M) de Zn induit une altération des activités Cu/Zn-SOD après 24h d'incubation des cellules C6 puis les activités de cet enzyme redeviennent normales à la DL₅₀ (200 μ M Zn ; figure 51C). Ce résultat est difficilement explicable. En effet, une augmentation ou une diminution de l'activité de ces enzymes peut être la cause ou la conséquence d'un stress oxydant. Dans tous

les cas, nos résultats sont en faveur d'une modification des activités SODs et donc d'une présence d'espèces réactives de l'oxygène.

Evaluation de la catalase

L'activité des catalases (CAT) a également été mesurée après traitement des cellules par le Zn.

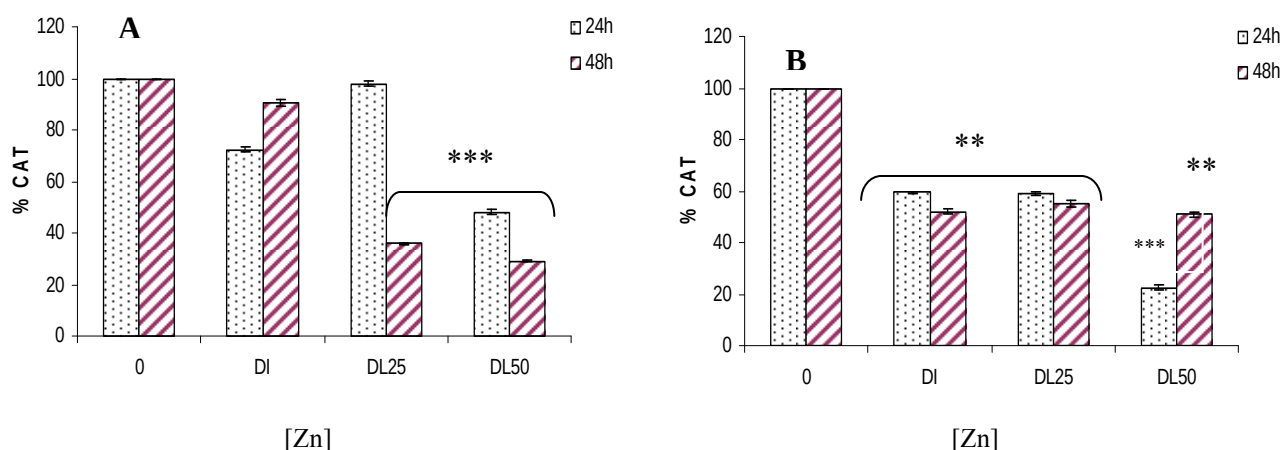


Figure 52 : Evaluation de l'activité de la catalase. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont respectivement incubées pendant 24h et 48h aux valeurs respectives DI, DL₂₅ et DL₅₀ de zinc (tableaux 4 et 5 ; page 124). Les activités de la catalase sont normalisées sur les témoins et exprimées en pourcentage (** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$)

Dans les cellules HaCaT, le Zn ne diminue les activités CAT qu'aux doses DL₅₀ (325 μ M) après 24h d'incubation ; puis DL₂₅ (210 μ M) et DL₅₀ (325 μ M) après 48h de traitement (une baisse de l'ordre de 60%) (figure 52A). Contrairement aux cellules HaCaT, le Zn provoque une diminution significativement des activités CAT dans les C6. La plus forte baisse correspond à 80% par rapport au témoin après 24h d'incubation des cellules C6 avec la DL₅₀ (200 μ M Zn ; figure 52B). Ces résultats suggèrent que le Zn induit indirectement une augmentation de H₂O₂. La figure 52B montre également que l'activité CAT remonte dans les cellules C6 48h après traitement à la DL₅₀ pour essayer de limiter la production de H₂O₂.

Evaluation de la glutathion peroxydase (GPx)

Les activités GPx ont été évaluées dans les deux lignées cellulaires. Les résultats sont normalisés sur les témoins.

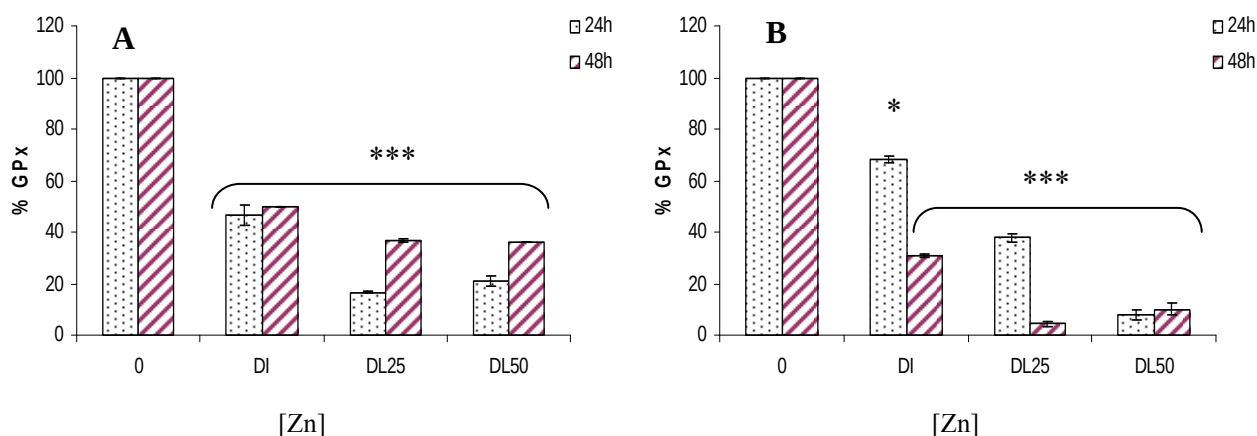


Figure 53 : Evaluation de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx). (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont respectivement incubées pendant 24h et 48h aux valeurs respectives DI, DL₂₅ et DL₅₀ de zinc (tableaux 4 et 5 ; page 124). L'activité de la GPx est normalisée et exprimée en pourcentage (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$).

Les figures 53A et 53B indiquent une diminution significative et dose-dépendante des activités GPx dans les deux lignées cellulaires traitées par le Zn. Cette diminution est plus importante dans les cellules C6 à la DL₅₀ (200 µM Zn ; de 100% à 5% d'activité GPx) par comparaison aux cellules HaCaT (25% d'activité GPx). Ces résultats suggèrent une augmentation induite de H₂O₂ dans les deux lignées et montrent que l'augmentation des taux de GSSG observée dans les figures 48B et 48D ; et donc la diminution des ratios GSH/GSSG provient d'un mécanisme ne faisant pas intervenir la GPx. Le Zn n'est pas un métal redox mais son excès peut engendrer un déplacement du Cu. Ce Cu peut être à l'origine de la formation du radical °OH. Le radical hydroxyle peut ensuite oxyder le GSH en GSSG. Par ailleurs, l'anion superoxyde issu de l'inhibition des SODs peut aussi expliquer l'apparition des dommages oxydatifs induits par le Zn.

Evaluation de la glutathion réductase (GRase)

Enfin, les activités GRase ont été mesurées pour déterminer si le GSH est régénéré au cours du stress oxydant induit par le Zn.

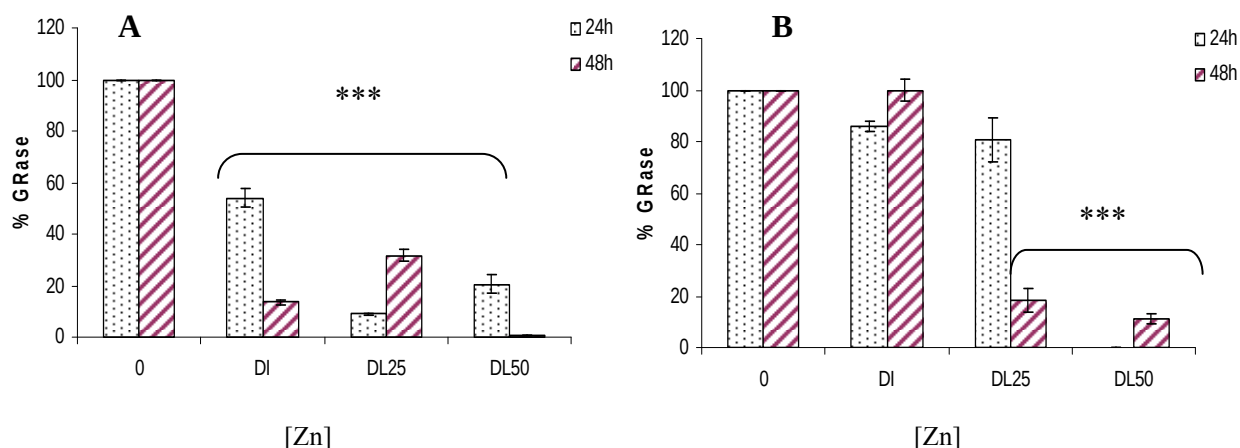


Figure 54 : Evaluation de l'activité de la glutathion réductase (GRase). (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 sont incubées pendant 24h et 48h aux valeurs respectives DI, DL₂₅ et DL₅₀ de zinc (tableaux 4 et 5 ; page 124). L'activité de la GRase est normalisée sur les témoins et exprimée en pourcentage (*** : $p < 0,001$).

On observe une diminution de l'activité de la GRase dans toutes les conditions d'expérience sauf lorsque les cellules C6 sont traitées par le Zn pendant 24h aux concentrations inférieures à la DL₂₅ (140 μ M Zn). Dans ce dernier cas, on constate que les activités GRase sont proches des valeurs des témoins (100% ; figures 54B). Cette observation est corrélée à l'augmentation des taux de glutathion oxydé (GSSG) qui est le substrat de la GRase. En effet, le GSSG produit n'est plus réduit en GSH par la GRase dont l'activité baisse. Comme observé avec le Cu, le Zn est capable de diminuer les activités de GRase (ce qui empêche de rétablir le pool de GSH) et de GPx.

Déplétion en glutathion et impact du zinc

La déplétion en GSH a été réalisée par le BSO. Les résultats de la toxicité de BSO et sa capacité à dépler les cellules en GSH sont présentés dans les publications précédentes (articles 1, 2 et *Etude A*). La déplétion maximale est obtenue avec 80 μ M de BSO.

Les cellules sont incubées pendant 24h avec le BSO (80 μ M) puis avec le Zn pendant une période supplémentaire de 24h. D'après les résultats, la viabilité cellulaire diminue significativement en absence de GSH (figures 55A et 55B). Ceci indique que le GSH atténue la toxicité du Zn.

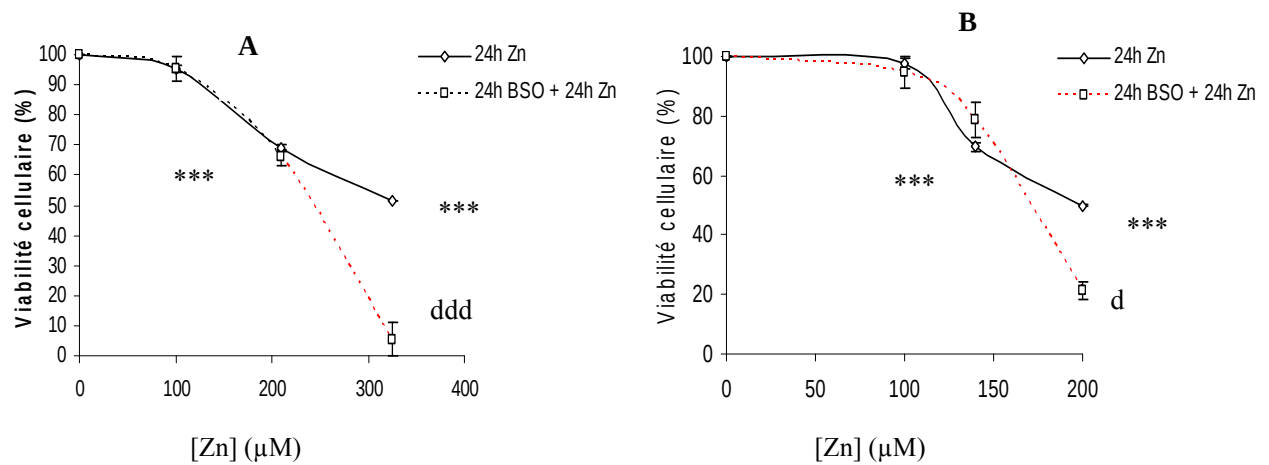


Figure 55 : Viabilité cellulaire. (A) les cellules HaCaT et (B) les cellules C6 ont été incubées avec 80 µM de BSO pendant 24h (articles 1 et 2) et soumises à un stress au zinc aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124) pendant une période supplémentaire de 24h. Le test MTT est réalisé avant et après traitement des cellules par le BSO (*** : $p < 0,001$; d < 0,05 et ddd < 0,001 par comparaison aux cellules non traitées par le BSO).

Conclusions des études A et B

Le cuivre et le zinc sont deux métaux importants dans la lutte contre le stress oxydant (Bielski 1995; Halliwell and Gutteridge 1984). En effet, ce sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes comme la SOD. Cependant, ces deux métaux peuvent être pro-oxydants à certaines doses. Les résultats présentés dans les deux études A et B montrent que le cuivre et le zinc ont des effets toxiques importants en accord avec plusieurs données de la littérature (Kim *et al.* 1999; Krumschnabel *et al.* 2005).

L'excès de Cu ou de Zn a un effet sur l'ADN. En effet, le test des comètes a permis d'observer des lésions de l'ADN dans les cellules incubées avec ces deux métaux. Les résultats suggèrent que le cuivre induit plus de dommages que le zinc et que les cellules C6 sont plus sensibles aux deux métaux que les cellules HaCaT.

Concernant les marqueurs du stress oxydant, les résultats sont en faveur d'une production des espèces oxydantes même si les facteurs de stress répondent très différemment et parfois de façon incohérente à certaines doses de métaux. Nos résultats montrent que le Cu et le Zn induisent une peroxydation lipidique, une oxydation des protéines, une diminution rapide et dose-dépendante du GSH et du rapport GSH/GSSG. En parallèle, le Cu provoque une diminution de l'activité des SODs dans les cellules HaCaT mais n'induit la diminution que de celle de la Mn-SOD dans les C6. Par contre le Zn entraîne une baisse des activités SODs totales dans les deux lignées. Les taux de CAT, de GPx et de GRase baissent également de façon significative. Ces résultats indiquent que la GPx n'est pas impliquée dans l'augmentation du GSSG. La baisse du taux de GSH peut être expliquée par plusieurs hypothèses notamment une chélation directe du Cu et du Zn par le GSH. Les complexes GSH/Cu et GSH/Zn peuvent être détruits ou former d'autres types de dérivés. Le radical $^{\circ}\text{OH}$ généré par ces deux métaux peut également engendrer une oxydation du GSH comme cela a été décrit par Tweeddale *et al.* (2007). Nos résultats ont montré que le Zn est capable de diminuer les activités de GRase. Ainsi ils sont en accord avec l'effet inhibiteur du Zn sur la GRase décrit par Bishop *et al.* (2007).

Le Cu et le Zn, qui sont physiologiquement importants pour l'organisme, peuvent initier des dommages oxydatifs. Ces deux métaux, déplacés par exemple par le cadmium ou d'origine extracellulaire, peuvent entraîner l'oxydation des protéines, des lipides, de l'ADN et ainsi contribuer à plusieurs types de pathologies (maladies neurodégénératives, cancers, etc.).

Perspectives de ces premières études

L'ensemble des résultats de cette première partie de la thèse montre que le stress oxydant joue un rôle important dans les effets toxiques induits par le cadmium, le cuivre et le zinc. Les mécanismes aboutissant à ce stress oxydant diffèrent en fonction du métal et du type cellulaire. Le stress oxydant généré résulte probablement dans tous les cas d'interactions plus ou moins complexes entre ces 3 métaux au niveau intracellulaire. Ceci est fortement suggéré par l'observation que le Cd entraîne une augmentation de l'absorption de Cu et Zn, parallèlement à son action sur les systèmes antioxydants.

Cette étude révèle également que les cellules C6 sont plus sensibles aux métaux étudiés que les cellules HaCaT. En particulier la résistance des HaCaT vis-à-vis du cadmium est très marquée. Cette résistance peut s'expliquer par l'augmentation du taux intracellulaire de GSH dont l'activité antioxydante est essentiellement liée à ses groupements thiols. Par ailleurs le GSH est aussi supposé avoir un rôle important dans la prise en charge des métaux juste après leur transport à travers la membrane et leur arrivée au niveau intracellulaire. Il existe d'autres molécules possédant des groupements thiols, en particulier les métallothionéines qui ont un rôle antioxydant mais aussi un rôle clé reconnu dans l'homéostasie des métaux. L'expression des métallothionéines est étudiée dans l'article 3.

Etudes complémentaires : évaluation des radicaux libres.

Le cadmium, le cuivre et le zinc sont capables d'induire l'altération des activités de nombreuses enzymes antioxydantes et d'augmenter le taux de radicaux libres intracellulaires. Plusieurs sondes fluorescentes permettant une détection *in situ* des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules vivantes sont disponibles dans le commerce. Elles permettent des études qualitatives en microscopie à fluorescence. Parmi ces sondes fluorescentes, la dihydrorhodamine 123 (DHR 123) est classiquement utilisée comme marqueur mitochondrial mettant en évidence la production de H_2O_2 sans être toutefois très spécifique car elle peut réagir avec d'autres ERO cellulaires. Cette sonde franchit librement la membrane cellulaire et est transformée par réaction avec les ERO en composé fluorescent retenu par la cellule.

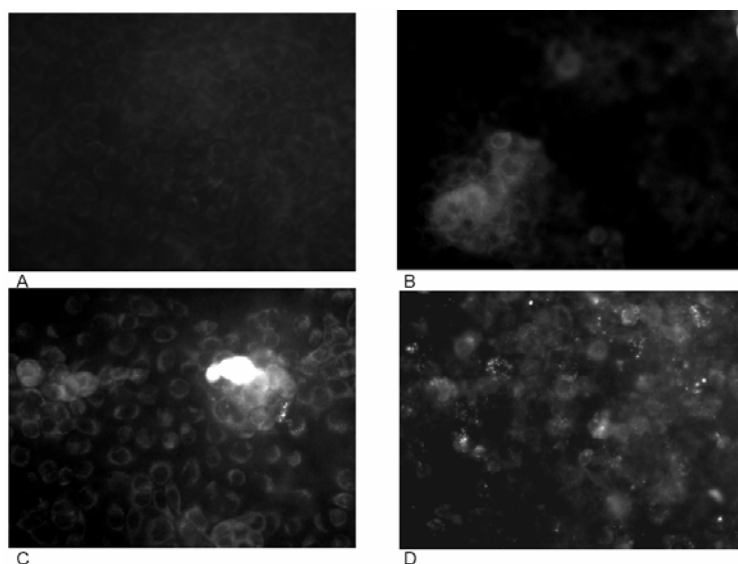


Figure 56 : Détection qualitative des ERO dans les cellules HaCaT par fluorescence. Les cellules HaCaT sont incubées avec le cadmium aux valeurs DI, DL_{25} et DL_{50} (tableau 5 ; page 124) pendant 24h puis par la DHR 123. Les cellules sont analysées au microscope Zeiss muni d'une caméra (32X). (A) témoin ; (B) DI ; (C) DL_{25} et (D) DL_{50}

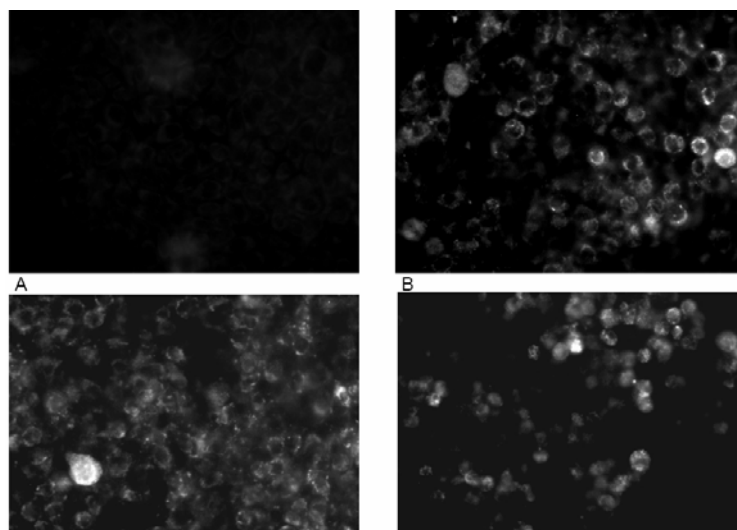


Figure 57 : Détection qualitative des ERO dans les cellules C6 par fluorescence. Les cellules C6 sont incubées avec le cadmium aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableau 4 ; page 124) pendant 24h puis par la DHR 123. Les échantillons sont analysés au microscope Zeiss muni d'une caméra (32X). (A) témoin ; (B) DI ; (C) DL₂₅ et (D) DL₅₀

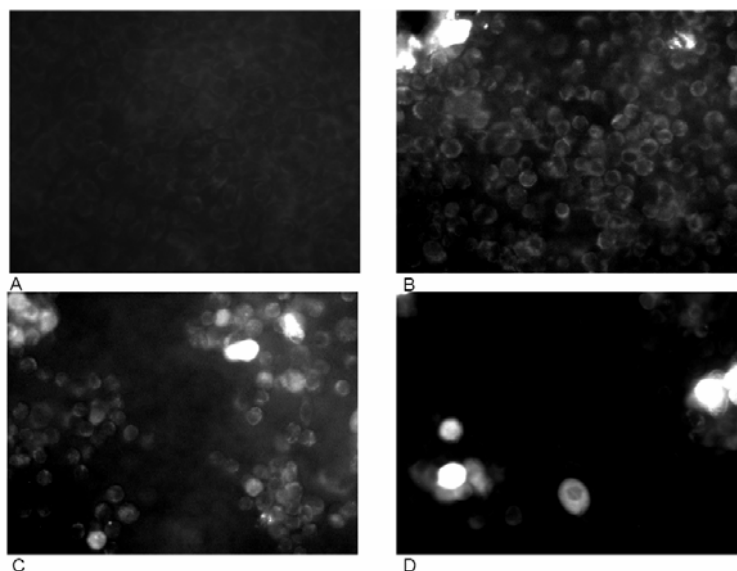


Figure 58 : Détection qualitative des ERO dans les cellules HaCaT par fluorescence. Les cellules HaCaT sont incubées avec le cuivre aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableau 5 ; page 124) pendant 24h puis par la DHR 123. Les échantillons sont analysés au microscope Zeiss muni d'une caméra (32X). (A) témoin ; (B) DI ; (C) DL₂₅ et (D) DL₅₀

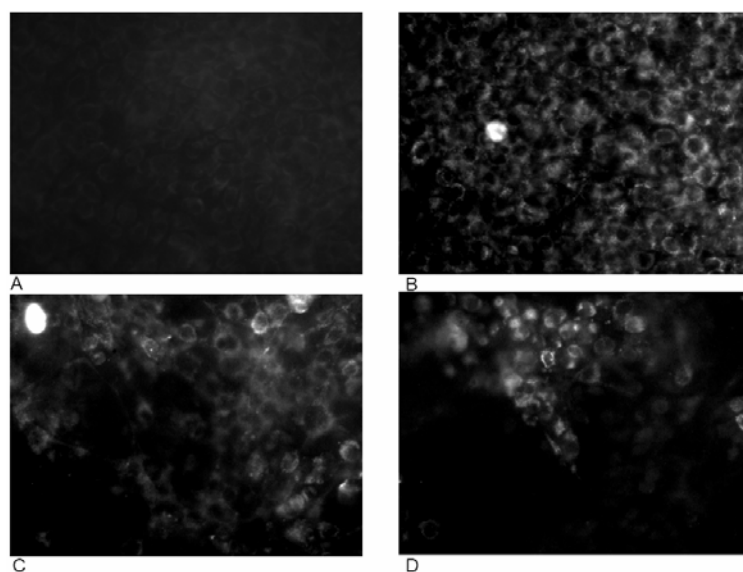


Figure 59 : Détection qualitative des ERO dans les cellules C6 par fluorescence. Les cellules C6 sont incubées avec le cuivre aux valeurs DI, DL_{25} et DL_{50} (tableau 4 ; page 124) pendant 24h puis par la DHR 123. Les échantillons sont analysés au microscope Zeiss muni d'une caméra (32X). (A) témoin ; (B) DI ; (C) DL_{25} et (D) DL_{50}

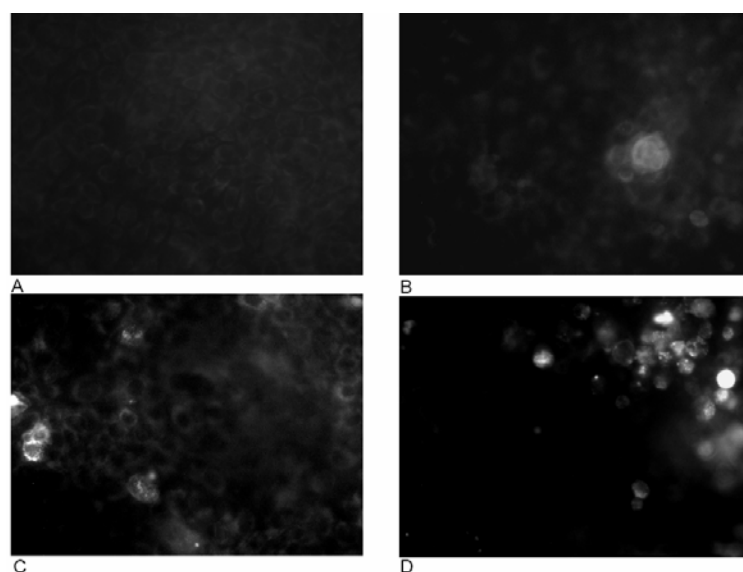


Figure 60 : Détection qualitative des ERO dans les cellules HaCaT par fluorescence. Les cellules HaCaT sont incubées avec le zinc aux valeurs DI, DL_{25} et DL_{50} (tableau 5 ; page 124) pendant 24h puis par la DHR 123. Les cellules sont analysées au microscope Zeiss muni d'une caméra (32X). (A) témoin ; (B) DI ; (C) DL_{25} et (D) DL_{50}

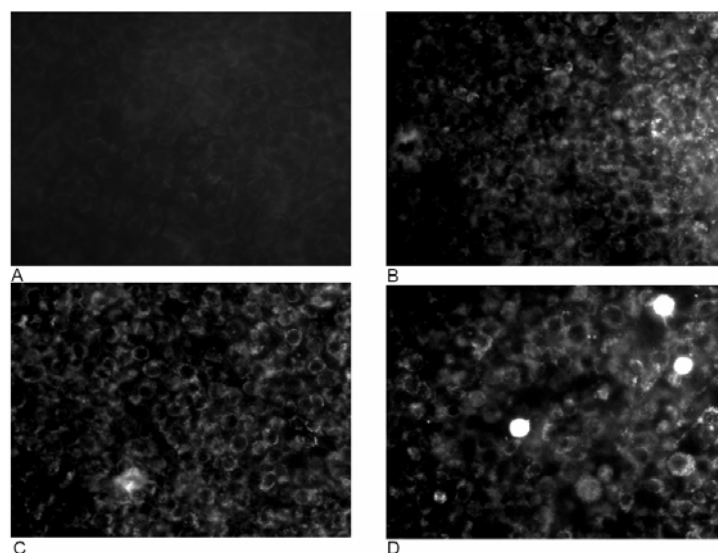


Figure 61 : Détection qualitative des ERO dans les cellules C6 par fluorescence. Les cellules C6 sont incubées avec le zinc aux valeurs DL_1 , DL_{25} et DL_{50} (tableau 4 ; page 124) pendant 24h puis par la DHR 123. Les cellules sont analysées au microscope Zeiss muni d'une caméra (32X). (A) témoin ; (B) DL_1 ; (C) DL_{25} et (D) DL_{50}

La détection est effectuée en microscopie à fluorescence. Les figures 56, 57, 58, 59, 60 et 61 montrent que le traitement des cellules HaCaT et C6 aux métaux pendant 24h entraîne une augmentation dose-dépendante de l'intensité de fluorescence ; indiquant l'oxydation de la DHR 123 par les ERO. Nos résultats suggèrent qu'il y a induction des ERO par les 3 métaux utilisés et supportent l'idée que le stress oxydant est impliqué dans la toxicité induite par ces 3 métaux dans les deux lignées cellulaires (figures 56, 57, 58, 59, 60 et 61). Ces résultats montrent également qu'il y a plus de radicaux libres générés par ces 3 métaux dans les C6 par comparaison aux cellules HaCaT. Dans les HaCaT, le Cu semble produire plus d'ERO que le Cd et le Zn alors que dans les cellules C6, la situation est inversée. Le Cd induit plus d'ERO que le Cu et le Zn. Dans tous les cas, le Zn génère le stress oxydant le plus faible.

***Publication III : Metallothioneins expression
in HaCaT and C6 cell lines exposed to
cadmium, copper and zinc***

Présentation de l'article III

Nous avons précédemment étudié le rôle du glutathion (GSH) dans la toxicité du cadmium (Cd), du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) en utilisant les cellules HaCaT et C6 comme modèle. Cette deuxième partie de nos travaux est consacrée à l'étude de l'expression des MTs dans les cellules HaCaT exposées non seulement au Cd mais aussi au Cu et au Zn dont les taux intracellulaires augmentent avec l'incorporation du Cd et dont la capacité à induire un stress oxydant a été, au préalable, évaluée. Cette expression des MTs dans les HaCaT est comparée à celle des MTs dans les C6 qui sont plus sensibles au Cd, au Cu et au Zn. Il s'agit également de déterminer la part des métallothionéines (MTs) dans la protection des cellules contre le stress oxydant induit par ces 3 métaux et plus particulièrement la résistance des cellules HaCaT au Cd.

Les métallothionéines (MTs) sont riches en cystéine et capables de lier les métaux. Les MTs jouent un rôle dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le Cu et le Zn, la détoxification de métaux lourds tels que le Cd et la protection contre le stress oxydant.

Nous avons montré que le Cd induit une expression des MTs plus importante que celle induite par le Zn qui à son tour est meilleur inducteur que le Cu. Les métaux induisent un taux de MTs 2 fois plus important dans les cellules C6 que dans les cellules HaCaT. Cependant, les cellules HaCaT expriment des MTs à l'état basal ce qui peut expliquer la résistance de ces cellules aux concentrations inférieures ou égales à 50 μM de Cd. La technique western blot révèle que les cellules C6, traitées avec 20 μM de Cd ou 475 μM de Cu pendant 24h, n'expriment plus de MTs ; ce qui explique en partie la sensibilité de ces cellules au Cd et au Cu. Nos résultats montrent également une augmentation du taux intracellulaire de zinc, une translocation nucléaire du facteur de transcription des MTs de type 1 (MTF-1) et une induction de la synthèse de MTs via la formation du complexe ADN/MTF-1. La translocation nucléaire du facteur MTF-1 induite par le Cd est plus faible que celle induite par le Cu et le Zn. Malgré cette faible translocation de MTF-1, on observe une meilleure synthèse de MTs qu'avec le Zn et le Cu ($\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cu}$). Une fois synthétisées, les MTs ont une localisation périnucléaire. Ces MTs peuvent ensuite intégrer le compartiment nucléaire après une incubation des cellules avec les métaux. Ces résultats suggèrent une interaction entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) induites par les métaux et les MTs. Ainsi l'entrée des MTs dans le noyau permet de protéger l'ADN contre les effets de ces ERO. La translocation des MTs dans les cellules HaCaT est plus importante.

Metallothionein expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium, copper and zinc.

Yves Nzengue^{1,2}, Emmanuel Lefebvre^{1,2}, Régine Steiman² and Pascale Guiraud^{2,3*}

¹INAC/ SCIB/ LAN : Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques. CEA-Grenoble. 17, rue des martyrs. 38054 Grenoble cedex 9. France

²Laboratoire Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xenobiotiques (ORSOX, EA 3776, LRC CEA 8M). UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche, France

³Département des Sciences Médicales et Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (LBGM, EA 2526). UFR des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, 15, avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag cedex 9, France

*To whom correspondence should be addressed.

Département des Sciences Médicales et Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (LBGM, EA 2526). UFR des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, 15, avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag cedex 9, France

Telephone : + 262 262 938 607

Fax : + 262 262 938 215

E-mail: pascale.guiraud@univ-reunion.fr

Abbreviations:

BCA: Bicinchoninic acid

BSA: Bovine serum albumin

CAPS: 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid

Cd: Cadmium

Cu: Copper

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimethylsulphoxide

DTT: Dithiothreitol

EBNA: Epstein-Barr nuclear antigen

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EMSA: Electrophoretic mobility shift assay

FCS: Fetal calf serum

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

MRE: Metal regulatory element

MTF-1: Metal-responsive transcription factor 1

MT: Metallothionein

PBS: Phosphate-buffered saline

R-PMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

TBS-T: Tris-buffered saline containing tween 20

TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase

Zn: Zinc

Abstract

Metallothioneins (MTs) are low-molecular-weight, cysteine-rich, metal-binding proteins. MTs play a role in the homeostasis of essential metals such as zinc (Zn) and copper (Cu), detoxification of toxic metals such as cadmium (Cd), and protection against oxidative stress. In this study, we examined the expression of MTs in HaCaT and C6 cells as a strategy to enhance protection against Cd, Cu or Zn toxicity. Cd induced higher MT expression than zinc, which was a better inducer than copper. In addition, C6 cells allowed a higher MT level than HaCaT cells, whereas MTs were expressed in HaCaT untreated control and conferred an acquired tolerance to 50 μ M Cd. The Western blot assay showed that C6 cells treated with 20 μ M Cd or 475 μ M Cu for 24 h did not express any MTs. The MTs were initially expressed in the cytoplasmic or periplasmic compartment and then were translocated in nuclei after 24 h of HaCaT or C6 cell treatment, respectively, by Cd, Cu and Zn. These results suggest an interaction between metals or their derivative compounds and MTs or DNA. In addition, the cell treatment to metals was followed by an increase in the intracellular zinc level and by a translocation of metal-responsive transcription factor 1 (MTF-1) from the cytoplasm toward the nuclei for an induction of MT synthesis. The MTF-1 level translocated and induced by Cd was lower than with Cu and Zn, although it involved a better synthesis of MTs than Zn and Cu (Cd > Zn > Cu). The translocation studies also suggest that MTF-1 is strongly induced in C6 cells by metals but the MT translocation in HaCaT nuclei is greater than in C6. This last observation can explain HaCaT resistance to Cd concentrations up to 50 μ M.

Key words: cadmium, copper, zinc, EMSA, MRE, MTF-1, Western blot, reporter gene, metallothioneins.

INTRODUCTION

Metallothionein (MT), a low-molecular-mass and inducible protein, is induced in cells by metals, chemicals, and oxidative stress. MT has several isoforms and has many functions, such as detoxification of heavy metals such as cadmium (Urani et al, 2006), storage of essential metals, and scavenging of free radicals (Andrews, 2000; Hidalgo et al, 2001; Fatur et al, 2002; Nordberg, 1998; Penkowa, 2006; Urani, 2005 et 2006; West et al, 2004). MT coordinates not only cadmium (Cd) and zinc (Zn), but also copper (Cu). In fact, MT was shown to be induced under Cu-deficient conditions to maintain the activities of intracellular cuproenzymes such as Cu, zinc-superoxide dismutase (Ogra et al, 2006; Tokuda et al, 2007).

Accumulation of Zn^{2+} in tissue was correlated with MT synthesis (Davis and Cousins, 2000), suggesting that this protein is involved in Zn^{2+} homeostasis by controlling cellular Zn^{2+} uptake, distribution and excretion (Klaassen et al, 1999). In addition to manifesting high affinity for MT, Cd^{2+} and Zn^{2+} are potent enhancers of MT synthesis (Harford and Sarkar, 1991). The cell treatment with Cd, Cu, Zn or other oxidative stress sources can increase the intracellular labile zinc level, involving metal-responsive transcription factor 1 (MTF-1) activation, its nuclear translocation, its binding with DNA and transcription of metallothionein genes by MTF-1. The six zinc-finger motifs, highly preserved by MTF-1, allow binding to DNA and also function like a zinc sensor (Li et al, 2006). The N-terminal domain of MTF-1 (containing six zinc-finger motifs) depends on zinc for its effective binding with DNA (Chen et al, 1999; Radtke et al, 1993; Otsuka et al, 2000; Koizumi et al, 2000). It seems that zinc-finger motifs 2–4 comprise the principal domain of binding to DNA (Bittel et al, 2000); however, motifs 5 and 6 stabilize the MTF-1/ADN complex (Bittel et al, 2000; Daniels et al, 2002).

Zinc-finger motif 1 is the only sensor domain of metals in cooperation with the transactivating area (Bittel et al, 2000).

The C-terminal area or transactivating area of MTF-1 (area containing the acid domain, the proline-rich domain and the domain rich in serine/threonine) would be continuously expressed independently of a metal induction. This area can, however, involve activation and metal-dependent fixation on the N-terminal area with DNA under certain conditions (Radtke et al, 1995), which indicates that the MTF-1 activity results from a complex activity within the various domains. Moreover, one phosphorylation is necessary for its activation and the form of MT genes that results from it follows a cascade of signals of transduction controlled by kinases (Laroche et al, 2001).

However, the cellular and molecular effects of Cd, Cu or Zn exposure are not understood and have not been studied in certain cell lines such as HaCaT from skin or are discussed in certain others cells lines such as C6 cell lines. The skin is a potential target since Cd can contaminate different ecosystems such as rivers and lakes as well as the atmosphere. It has been shown that UV radiation can increase the toxicity of Cd in skin cells (Jourdan et al., 2002; Yamada et al., 2004) and free Cd is the source of the toxicity, but the displacement of Cu and Zn from MT could also take part in some of the toxic effects observed. The increase in Cu and Zn levels can induce DNA damage and protein and lipid oxidation. The present work was designed to analyze the pattern of metallothionein expression during metal exposure in HaCaT cells, a cellular line presenting resistance to low levels of Cd (Nzengue et al.'s studies accepted for publication in Toxicology press, october 8th 2007), and to compare with MT expression in rat glial C6 cells, which are more sensitive to the same low concentrations of Cd. Glial cells are assumed to be more resistant than neurons and to protect them against various endogenous or exogenous injuries from sources such as Cd. In this study, we suggest that this HaCaT and C6 cell resistance to metal toxicity is related to MT expression. In this expression, MTF-1 plays an important role. MTF-1 is a metalloreulatory protein that serves as an intracellular zinc sensor to activate MT gene expression. It is unclear how MTF-1 senses the toxic metals. Therefore, we examined the effects of Cd, Cu or Zn treatment on MT localization, the intracellular zinc level and the DNA binding activity of MTF-1.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The spontaneously immortalized human keratinocyte HaCaT cell line was from the DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). The cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in RPMI 1640 medium (Invitrogen, France) containing 10% FCS (Biotechnologie, France), penicillin (5000 U/ml)/streptomycin (50 mg/l), and 2 mM L-glutamine (Invitrogen, France).

The C6 cells (ATCC, France) are a cell line from a rat glial tumor induced by N-methylnitrosourea (Benda et al, 1968; Lightbody, 1968). The cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in D-MEM medium (Invitrogen) containing 10% FCS (Biotechnologie, France) and penicillin (5000 U/ml)/streptomycin (50 mg/ml).

Cell treatment with cadmium, copper and zinc

Stock solutions of cadmium chloride (CdCl_2 , 10 mM), copper chloride (CuCl_2 , 10 mM) and zinc chloride (ZnCl_2 , 10 mM) were prepared in distilled water and sterilized by filtration. A sufficient quantity of these stock solutions was added to the culture medium to obtain the desired final concentrations: 4, 5 and 20 μM Cd; 40, 250 and 475 μM Cu or 100, 140, 200 μM Zn for C6 cells; 15, 50 and 100 μM Cd; 200, 390 and 725 μM Cu or 100, 210 and 325 μM Zn for HaCaT cells. CdCl_2 , CuCl_2 and ZnCl_2 were from Sigma (France). These different concentrations of metals were determined in our first studies (data not presented) and are sublethal or lethal doses of metals that lead to 10%, 25% and 50% cell death, respectively.

Cells were seeded in different materials (lab-teck slides, dishes) for 24 h of incubation with each metal concentration. Then cells were harvested for each experiment. A control with no treatment was systematically included in each experiment.

Reporter gene assay

Metallothionein promoter activity was evaluated using a luciferase assay with a metallothionein I promoter luciferase. The plasmid was kindly provided by Dr. W. Schaffner (Switzerland). Cell-transient transfections were carried out in 35 mm Petri dishes using the Lipofectamine (Invitrogen) method according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection with plasmid and after a further 24 h of incubation with Cd, Cu and Zn cells were harvested, lysed with lysis buffer (Promega, France) and assayed for luciferase activity, using a slightly modified protocol previously described by Eisenstark et al. (1987). The luciferase activities were measured on luminometer LB 9507 (Berthold, USA) by mixing 20 μl of each sample with 100 μl of the lucigenin reconstituted kit (Promega, France). Data were expressed in relative luciferin unity (RLU) per gram of protein measured using the Pierce kit.

Western blot assay

Preparation of the cellular extracts: The cells were washed twice in PBS and 1 ml of Cytobuster (commercial detergent providing protein insulation without a second treatment. Novagen, France) was added for 5 min. The cells were harvested and centrifuged at 14,000 rpm, 4°C for 5 min. The supernatant was removed for the protein measurement using the Pierce kit and for metallothionein detection with the Western blot assay.

Quantitative protein determination (BCATM Bicinchoninic acid, Pierce kit). Protein levels were determined using the BCATM Bicinchoninic acid kit (Pierce) in total and soluble cell lysates. The 96-well microplates were read at 580 nm using a microplate reader (Bio-Tek, USA) provided with a software (KC Junior, Bio-Tek, USA) that directly calculates protein concentrations from the calibration curve.

Electrophoresis. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) was carried out according to the Laemmli protocol (1970) using 15% gels in a Bio-Rad mini-gel device (France). In this protocol modified by Mckeon and Lyman (1991) and reformulated by Mizzen et al. (1996), the samples (20 µg total protein) were denatured in 20 µl sample buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; 1% (w/v) SDS; 0.005% (w/v) bromophenol blue; 100 mM DTT). The samples were heated for 5 min before loading, followed by a migration at 200 V at room temperature (Mizzen et al, 1996).

Transfer on membranes and glutaraldehyde treatment: Two transfer buffers were used: (A) After electrophoresis, the gel was incubated in traditional transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl (pH 8.5) 20% (v/v) methanol (Towbin et al, 1979)] at room temperature for 20 min and (B) in CAPS buffer (10 mM 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid (pH 10.8)) in 10% methanol (LeGendre and Matsudaira, 1989) with or without the addition of 2 mM CaCl₂ to each buffer. The calcium chloride removes the SDS fixed to proteins, thus supporting their maximum fixing on membrane (Mckeon and Lyman, 1991). Then the proteins were transferred at 40 V at 4°C on nitrocellulose membrane (PROTAN, France) for 1 h using the Bio-Rad transblotting device (France). Next, the membranes were incubated for 1 h in glutaraldehyde (2.5% final), which can increase the retention of low-weight proteins by a factor of 1.5–12 compared to the untreated membrane (Mckeon and Lyman, 1991; Mizzen et al, 1996), then washed three times for 5 min in phosphate buffer (8.1 mM Na₂HPO₄; 1.2 mM KH₂PO₄; 2.7 mM KCl, pH 7.4). With the third washing, we added 50 mM monoethanolamine to prevent the residual glutaraldehyde reaction (Mizzen et al, 1996).

Immunodetection: The membranes were blocked in 10% milk in Tris-buffered saline (TBS: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 154 mM NaCl) and 0.1% (v/v) Tween-20 at room temperature for 2 h. Membranes were incubated overnight in primary antibody (Dako, E9 clone; France) diluted to 1/1000 in 10% milk-TBS-Tween at room temperature before washing in TBS-Tween and incubation for 4 h in secondary antibody combined with horseradish peroxidase (goat anti-

mouse IgG (Bio-Rad, France) diluted to 1/1000 in TBS-Tween. After three washings in TBS-Tween, blots were developed by ECL (Enhanced chemiluminescence; Amersham, France), then membranes were exposed on a photographic film (HyperfilmTMECLTM; Amersham).

Metallothionein localization after cell treatment

Cells were incubated with Cd, Cu or Zn for 24 h in lab-teck (Nunc, France), then washed with PBS, fixed with cold methanol (−20°C) for 10 min at room temperature and permeabilized with triton X-100 (0.2%) in PBS. The HaCaT or C6 cells were incubated in primary antibody anti-metallothionein (Dako; Clone E9, France) at 37°C for 1 h; followed by two washings with PBS-Tween (0.1%) and incubated with mouse secondary antibody F (ab)' 2 anti-IgG (Alexa fluorine 488; Molecular Probes, France).

Analysis was performed using a fluorescence microscope (Zeiss, Germany) connected to a video camera (Kinetic Imaging, USA) for taking representative pictures of each sample.

Determination of intracellular zinc level

The distribution of intracellular zinc was visualized using a specific fluorogenic probe of labile zinc: zinquin-ethyl-ester or 2-Methyl-8 [(4-methylphenyl) sulfonylamino-] 6 (ethyloxycarbonylmethyloxy) quinoline (Coyle et al, 1994; Zalewski et al, 1993; Zalewski et al, 2006) after Cd and Cu treatment. The cells were incubated at 37°C with 25 µM of zinquin-ethyl-ester in PBS. The ester group of zinquin was hydrolyzed by the alive cells, ensuring its intracellular retention; followed by free Zn²⁺ or slightly binding (labile) detection by fluorescence. The cells were washed twice with PBS for 30 min after incubation and analyzed using a fluorescence microscope (Zeiss, Germany) connected to a video camera (Kinetic Imaging, USA) to take representative pictures of each sample (λ_{exc} : 365 nm; λ_{em} : 420 nm).

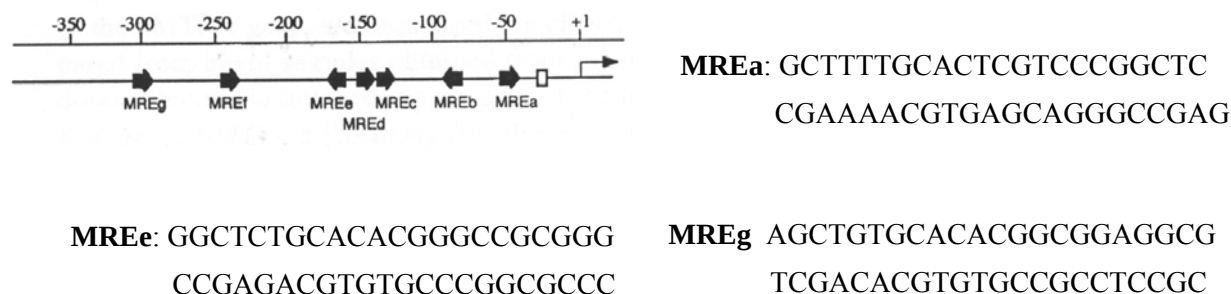
DNA binding activity of MTF-1 by electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

In response to oxidative stress induced by Cd, Cu or Zn, MTF-1 was activated by zinc and fixed on the MRE upstream sequence of metallothionein genes, thus enhancing their transcriptions. The EMSA technique is based on the principle that complex DNA/MTF-1 migrated less quickly (in nondenaturing condition) than the DNA or the proteins alone.

It was enough to separate different cellular extracts [cytoplasmic (in 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N' - 2-ethanesulfonic acid) - KOH; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; pH 7.9; 0.5 mM DTT and NP-40 hypotonic buffer) and nuclear (in 10 mM HEPES-KOH; 50

mM KCl; 300 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 10% (v/v) glycerol; pH 7.9; 0.5 mM DTT; complete (proteases inhibitor) hypotonic buffer)] after cell incubation with metals for 24 h, to mix these different cellular extracts with marked DNA probes and to make them migrate in gel.

The DNA probes correspond to MRE sequences located upstream of human metallothionein IIA genes (hMT-IIA; Otsuka, 2001). The strand had been biotinylated according to the supplier's instructions (Sigma-Proligo, France) for nonradioactive detection. The MT-IIA has metal chelation capacities and can also play an important role in the regulation of other antioxidant gene expression in response to oxidative stress (Hawse et al, 2006). The three probes (MREa, MREe and MREg) used in our study are noted below.



MREs in upstream of human metallothionein IIA gene (Otsuka, 2001; Stuart et al, 1985; Culotta et al, 1989; Sigma-Proligo, France)

After biotinylation, double-strand DNA was reformed and diluted in STE buffer [Tris-HCl (10 mM, pH 8.8) + NaCl (50 mM) + EDTA (1 mM)] before the migration in gel. Since the specific binding conditions between the MTF-1 and the DNA sequences chosen were not known, we first used a minimum of reactional compounds [binding buffer + poly (dI.dC) (50 mg/μl) + biotinylated DNA + proteinic extract (cytoplasmic and nuclear; 4 μg)]. Then the EMSA reaction was optimized by adding other compounds such as KCl (Winston et al, 1999; Triplett, 1992), glycerol, MgCl₂ (Winston et al, 1999; Szczelkun and Connolly, 1995) and a detergent (Hodgson and Enrietto, 1995; Zhang et al, 1992) to determine their effects on the shift.

It was also shown that the BSA can induce or optimize the DNA-protein binding (Zhang et al, 1992; Kozmik et al, 1990; Bannister and Kouzarides, 1992). The experimental procedure necessary for EMSA reaction was provided by Pierce (EMSA kit; Promega, France). As with Western blot assay, detection was done using an antibody-HRP (horse radish peroxidase) and membranes [in nylon (0.45 μm in diameter), positively charged] placed in a

cassette and exposed to hypersensitive film (HyperfilmTMECLTM; Amersham).

RESULTS

Induction of metallothionein expression by cadmium, copper and zinc

We studied the dose–response curve of MT induction in HaCaT and C6 cells under Cd, Cu and Zn treatment for 24 h. Figure 1A and 1B shows that MTs were expressed in control and HaCaT incubated with metals (Fig. 1B). The pattern in HaCaT cells after copper treatment was different from that obtained with cadmium and zinc treatment. Band (14 kDa) intensities were low (Fig. 1A). Contrary to C6 cells, MT was not expressed in untreated control; in addition, there was no band in C6 cells treated with 20 μ M Cd and 475 μ M Cu. These two metals seemed to be involved in saturation of metallothioneins at 20 μ M Cd and 475 μ M Cu and with these concentrations, Cd and Cu became more toxic (Fig. 1B) and MT synthesis was probably stopped. The HaCaT resistance to low concentrations of cadmium was dependent on highly expressed metallothioneins in this cells.

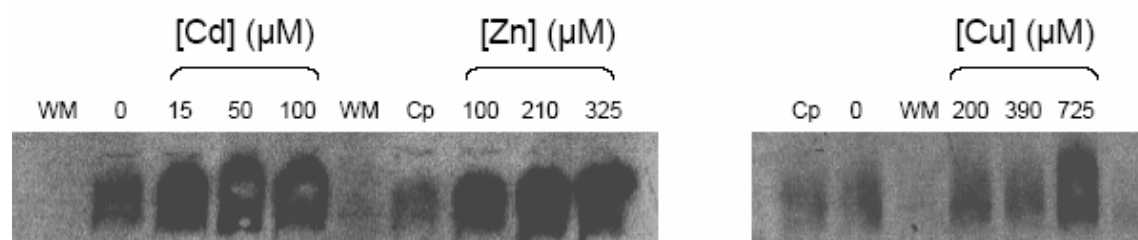


Figure 1A

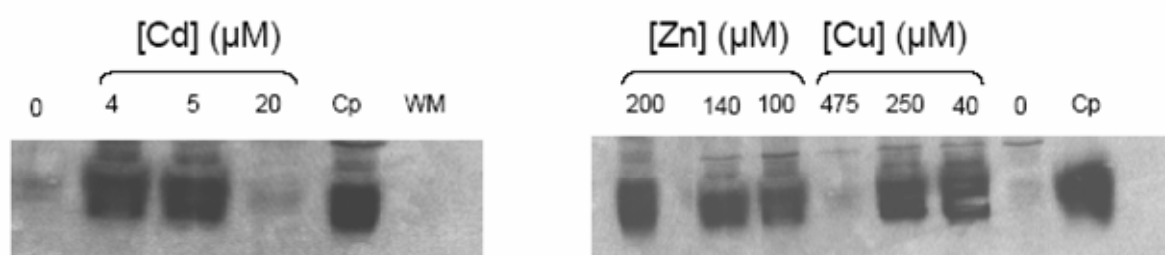


Figure 1B

Figure 1: Metallothionein expression after 24 h of metal treatment on (A) HaCaT cells and (B) C6 cells. After cell incubation with Cd, Cu and Zn, the cells were collected and lysed with Cytobuster (Novagen, France) as described in Material and Methods. The cellular extracts were analyzed using Western blot. WM = molecular weight. Cp = positive control (commercial metallothionein).

For quantitative determination of MT expression, we used the reporter gene assay. We carried out the transfection with 0.5 µg of plasmid for HaCaT cells and 2 µg for C6 cells. With these plasmid quantities, the luciferase activity was more important. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for another 24 h with Cd, Cu and Zn. Figures 2, 3 and 4 showed that there was a high level of induction of MT expression by all metals. This induction was dose- and cell-type-dependent. Indeed, we observed a significant increase ($p < 0.05$) in luciferase activity (from 0 to 2.5×10^{10} RLU)/g of protein) with the increase in Cd concentrations in HaCaT cells, by a factor of 1000 compared to the control with plasmid and without Cd (Figs. 2 and 3A). Figures 3A and 4A also showed that there was more metallothionein expression induced by Cd in C6 cells (Fig. 4A) compared to HaCaT (Fig. 3A), an increase by a factor 2 with 20 µM Cd, whereas 100 µM Cd was needed to obtain half as much MT expression in HaCaT. However, the expression of metallothioneins remained almost the same in C6 treated with Cd between 4 and 20 µM, reflection a likely saturation in metallothionein expression at 4 µM. This expression decreased with 20 µM (Fig. 4A). The decrease was greater when C6 cells were treated with Cu (Fig. 4C) where the maximum MT expression showed 4×10^6 RLU/g of protein. In all cases, Cd remained the best MT expression enhancer, followed by zinc and copper in the two cells lines and in our experimental conditions (Fig. 3A, 3B and 3C for HaCaT cells; Fig. 4A, 4B and 4C for C6 cells).

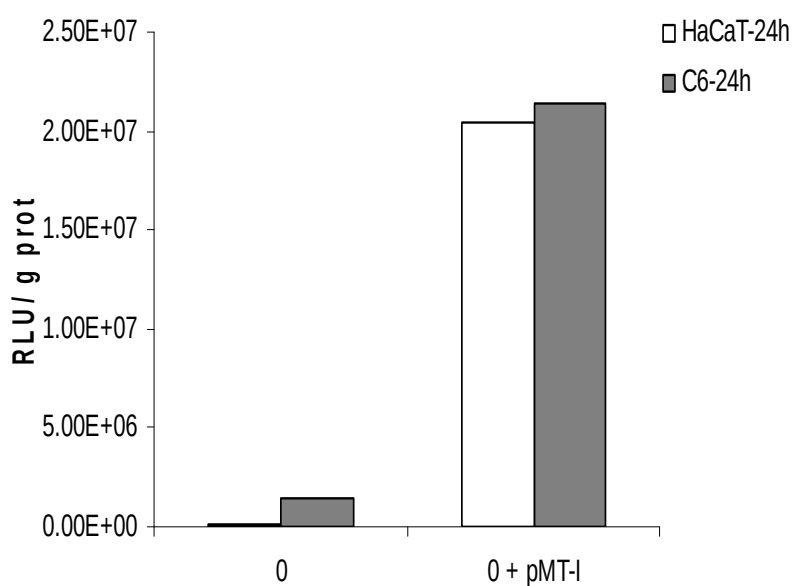


Figure 2: Comparison between HaCaT and C6 controls treated with plasmid. HaCaT and C6 cells were incubated with culture medium only or with plasmid (pMT-I; 0.5 µg for HaCaT cells and 2 µg for C6 cells) for 24 h. Data were expressed as relative luciferin unity (RLU)/g of proteins (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

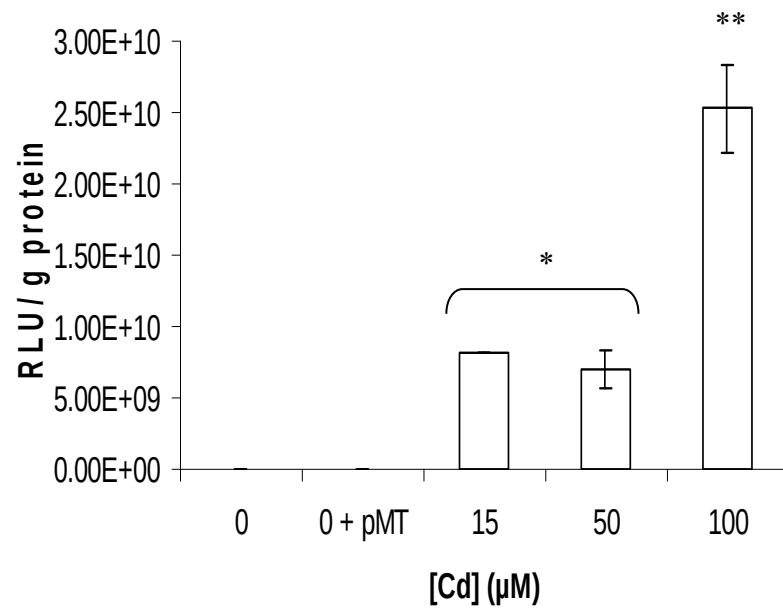


Figure 3A

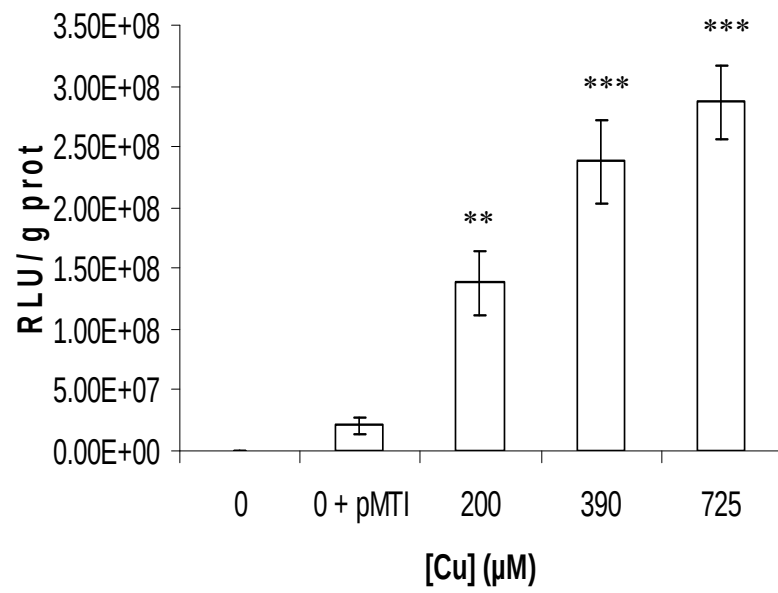


Figure 3B

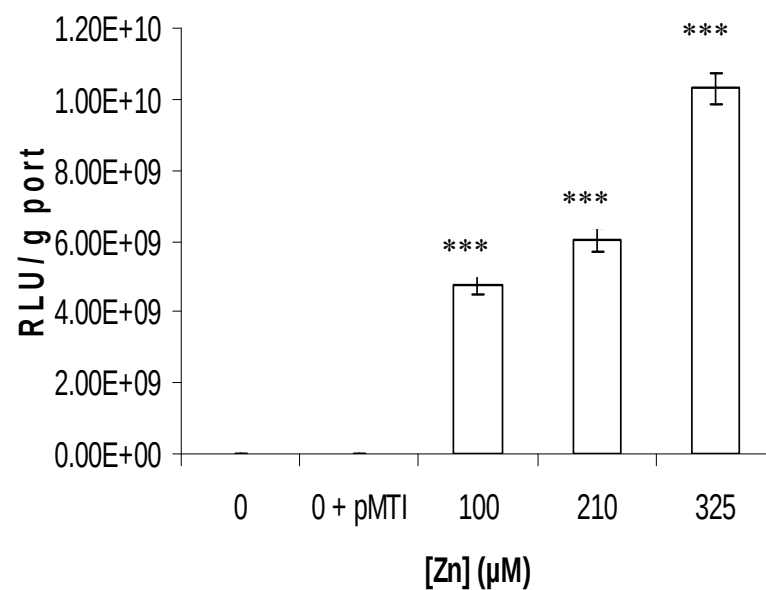


Figure 3C

Figure 3: Quantitative determination of metallothionein levels using a reporter gene assay. HaCaT cells were first incubated with 0.5 μg of plasmid for 24 h before treatment with (A) cadmium, (B) copper and (C) zinc for another 24 h. Data are expressed as relative luciferin unity (RLU)/g of proteins (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

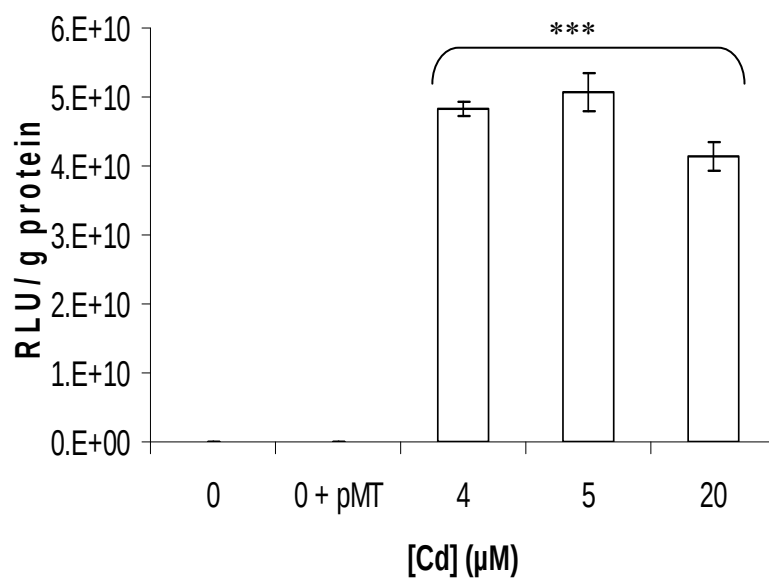


Figure 4A

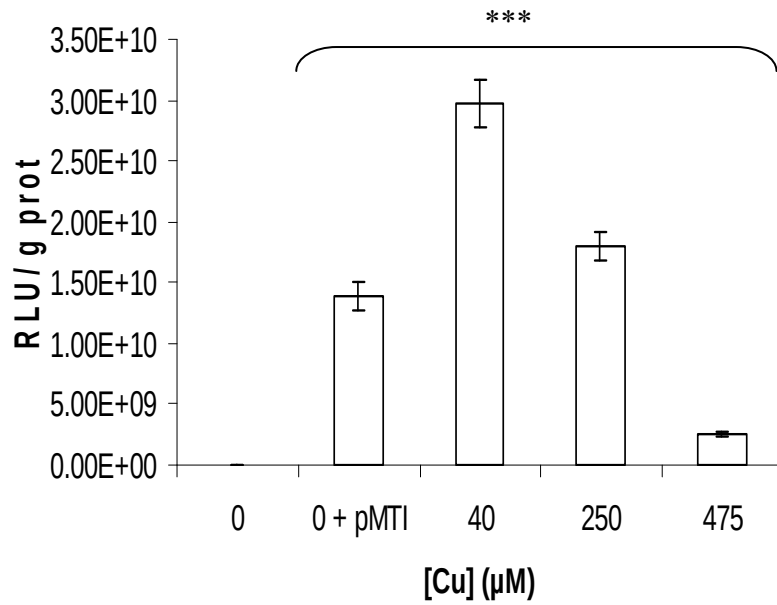


Figure 4B

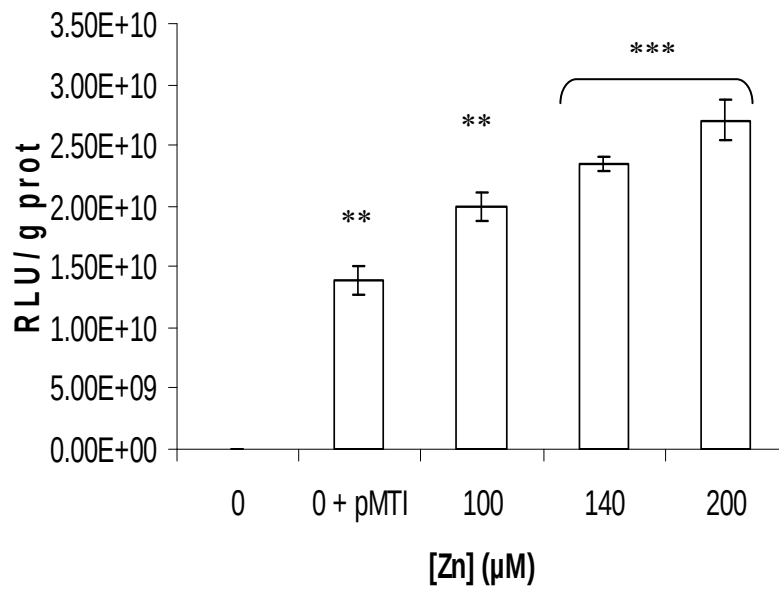


Figure 4C

Figure 4: Quantitative determination of metallothionein levels using reporter gene assay. C6 cells were first incubated with 0.5 μg of plasmid for 24 h before treatment with (A) cadmium, (B) copper and (C) zinc for another 24 h. Data are expressed as relative luciferin unity (RLU)/g of proteins (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Metallothionein localization

The marking of MTs before and after treatment by different concentrations of Cd, Cu and Zn showed an increase in the fluorescence intensity in HaCaT or C6 cells lines. These intensities were dose-dependent (Fig. 5A₁, 5A₂, 5B₁, 5B₂, 5C₁ and 5C₂). It was also noted that the fluorescence intensities were higher in the HaCaT cell line compared to C6 cells after metal treatment for 24 h, which, in addition, did not express MTs in untreated control (C6 cells). These results were in agreement with those obtained with Western blot (semi-quantitative method). Figure 5A₁–5C₂ shows that within each cellular line, the intensities of fluorescence were not identical between the three metals.

A fluorescent signal was much greater for Zn in the two cell lines than for Cd, which in turn induced a greater intensity than Cu. These fluorescent signals also showed that with the low metal concentrations, MTs were localized around nuclei (perinuclear localization); then we observed a displacement of signals into the nuclei when the metal concentrations increased. Thus the results suggested a translocation of MTs from the cytoplasm to the nuclei, evidence that the metals or free radicals generated entered the nuclear compartment for DNA breaks.

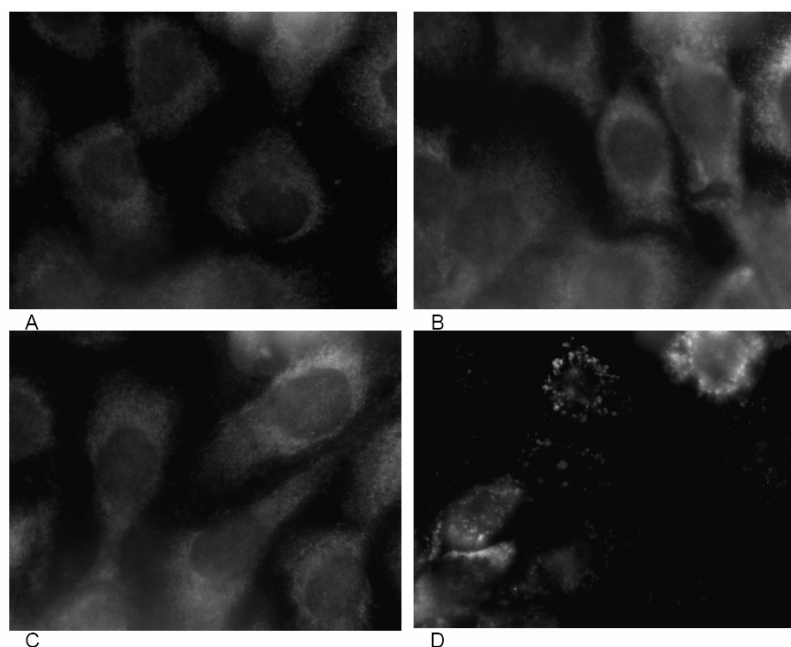


Figure 5A₁

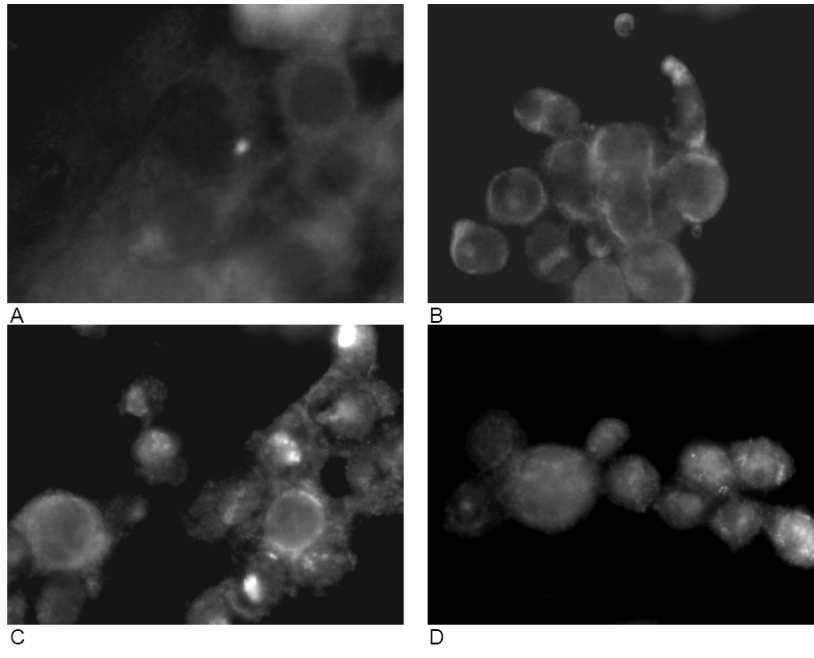


Figure 5A₂

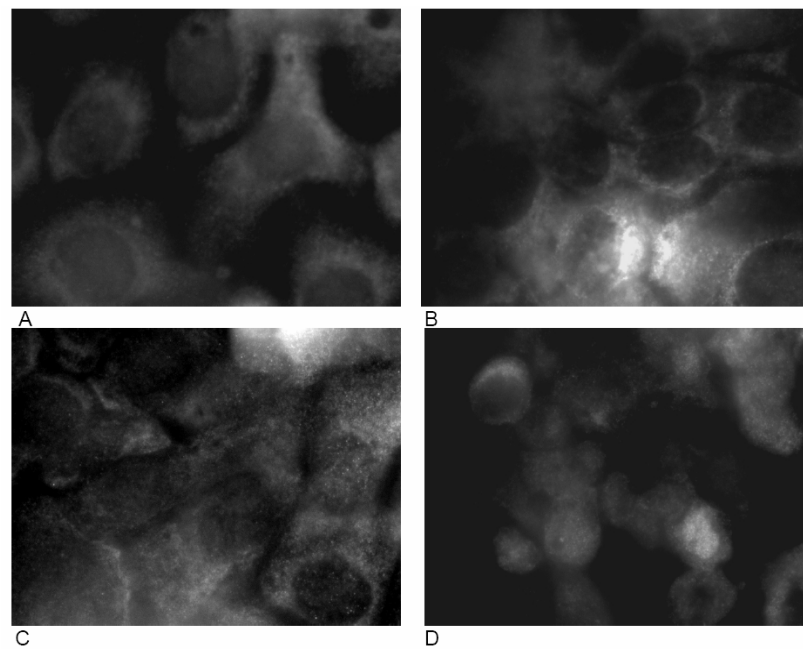


Figure 5B₁

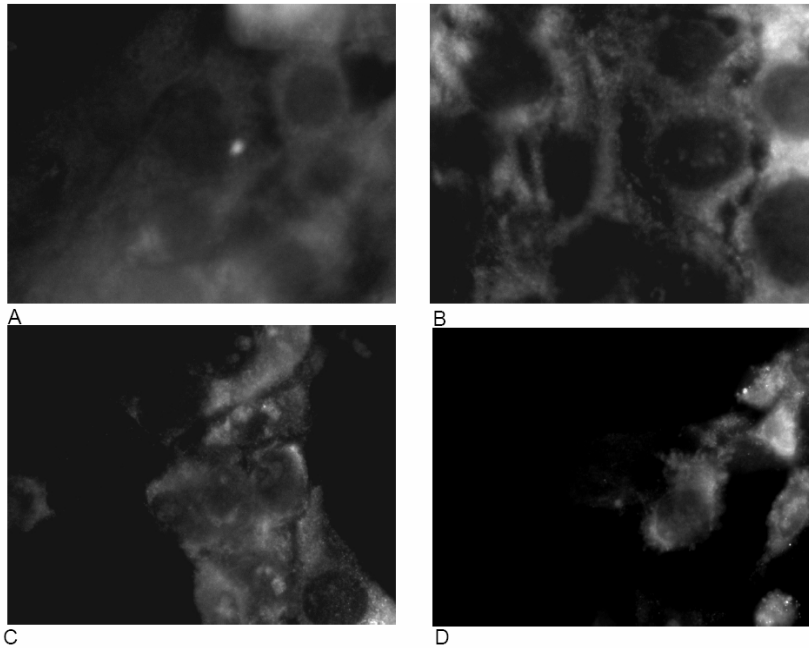


Figure 5B₂

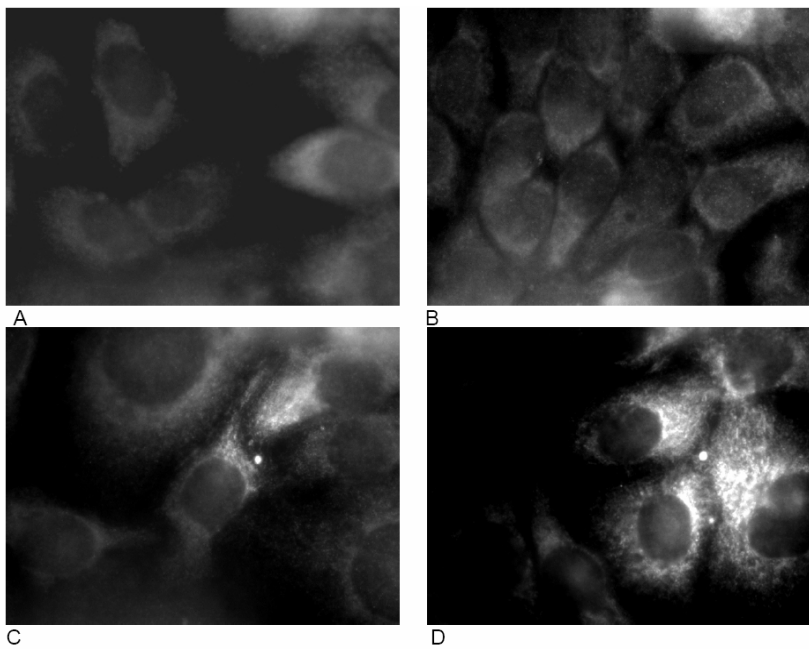


Figure 5C₁

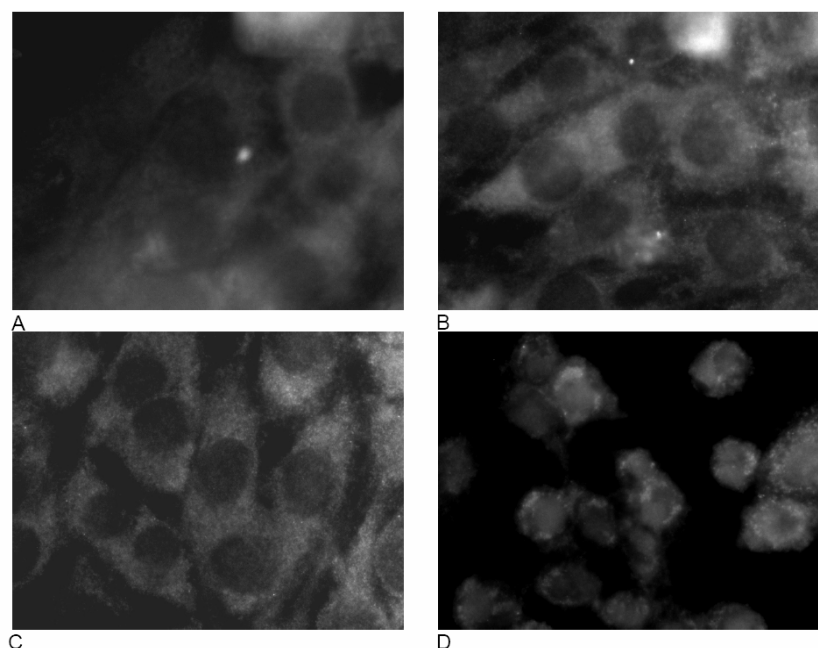


Figure 5C₂

Figure 5: Metallothionein localization in HaCaT and C6 cells after 24-h treatment with (5A₁ and 5A₂) cadmium (Cd), (5B₁ and 5B₂) copper (Cu) and (5C₁ and 5C₂) zinc (Zn). (A) Untreated HaCaT or C6 control; (B) HaCaT and C6 cells incubated with metal concentrations leading to 10% cell death; (C) HaCaT and C6 incubated respectively with each metal dose leading 25% cells death; (D) HaCaT and C6 incubated with each metal concentration leading to 50% cell death. The analysis was made with fluorescent Zeiss microscope and pictures were taken at $\times 100$ in immersion.

Mechanisms of metallothionein synthesis

Displacement of zinc by cadmium (Cd) and copper (Cu)

The zinc level was evaluated by the fluorescent probe zinquin which is a zinc-specific fluorescent dye. Figure 6A₁–6B₂ shows epifluorescence images of HaCaT and C6 cells treated for 24 h with increasing Cu or Cd concentrations. With all the subtoxic Cu and Cd concentrations applied, fluorescence was localized in cytoplasm. The intensity of fluorescence increased with the concentration of metal applied (Fig. 6A₁, 6A₂, 6B₁ and 6B₂). With the high Cu or Cd concentrations, we observed a distribution in both the cytoplasm and the cellular nuclei (Fig. 6A₁, 6A₂, 6B₁ and 6B₂). This increase in the intracellular zinc level can be explained by a displacement of molecular zinc by Cd and Cu. Released zinc will undergo a translocation toward nuclei complexed with MTF-1 for the synthesis of metallothioneins.

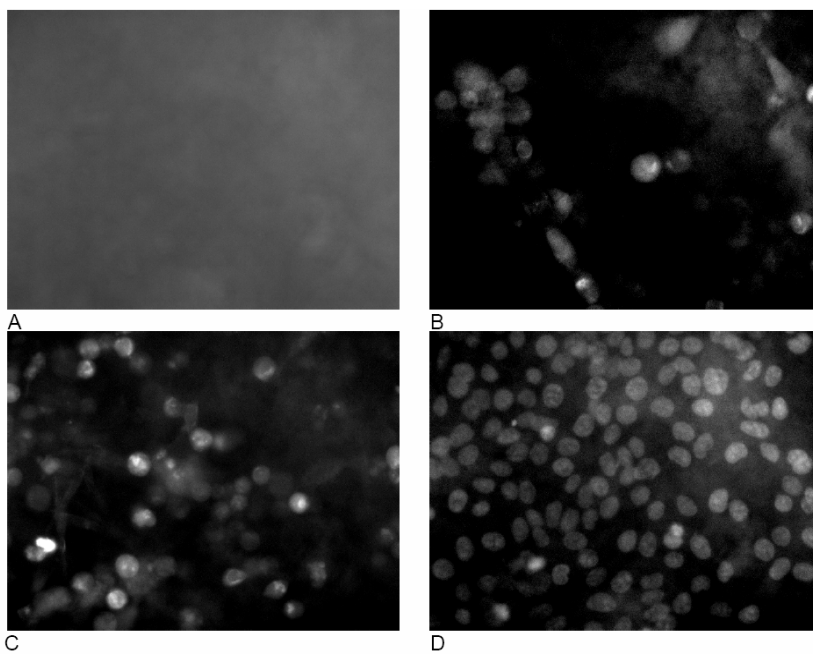


Figure 6A₁

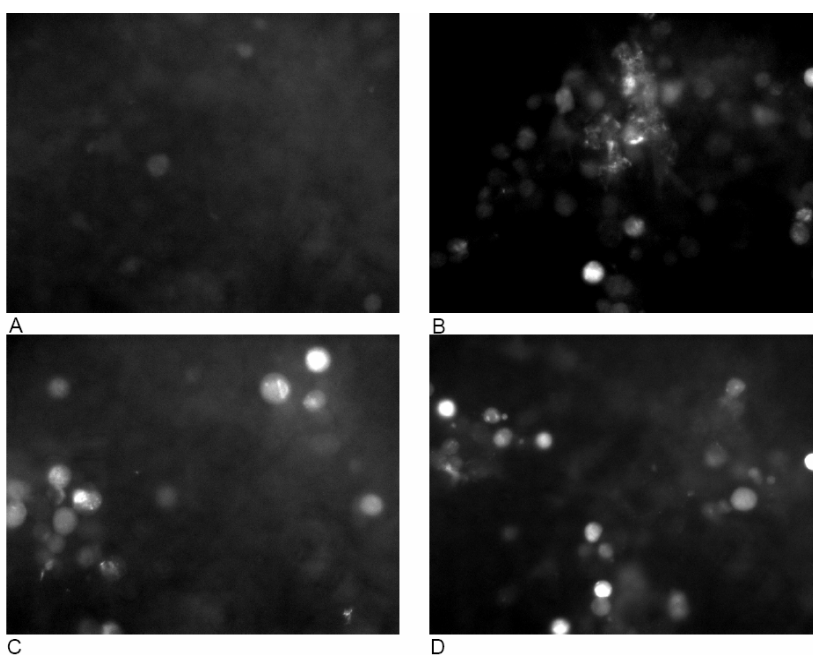


Figure 6A₂

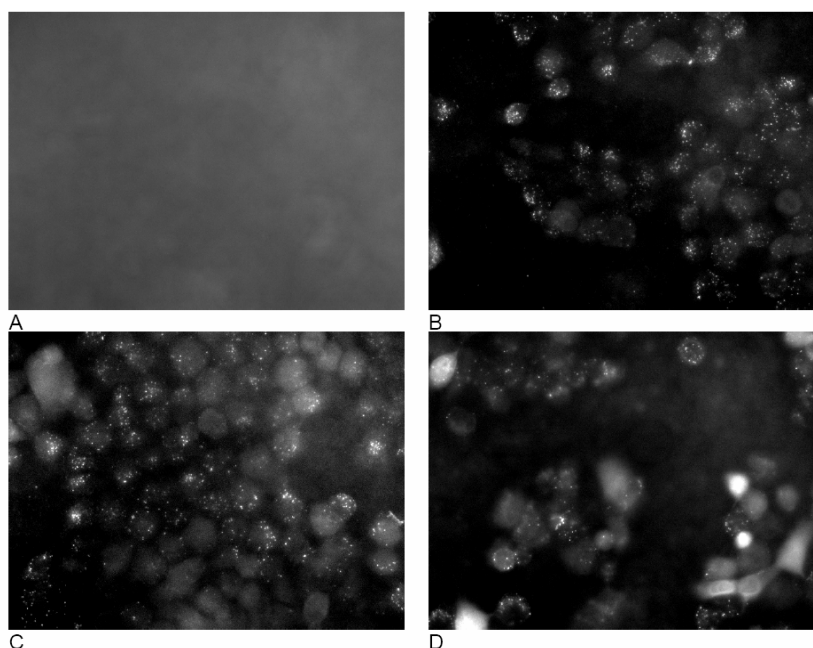


Figure 6B₁

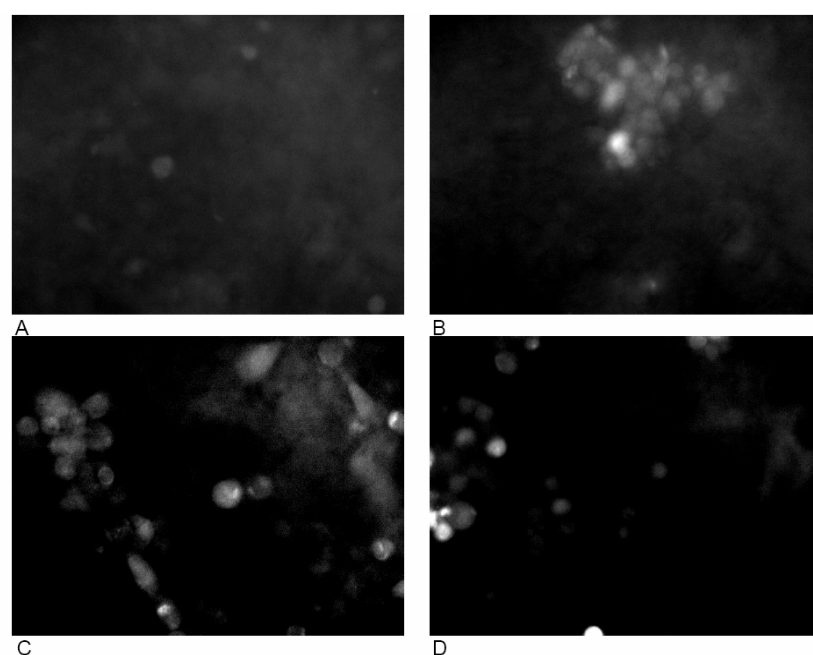


Figure 6B₂

Figure 6: Determination of intracellular zinc in HaCaT and C6 cells treated with (6A₁ and 6A₂) cadmium (Cd) and (6B₁ and 6B₂) copper (Cu) for 24 h, then with Zinquin probe (25 μ M for 30 min at 37°C). (A) Untreated HaCaT or C6 control; (B) HaCaT and C6 incubated with each metal concentration leading 10% cell death; (C) HaCaT and C6 cells incubated with each metal concentration leading to 25% cell death; (D) HaCaT and C6 incubated with each metal concentration leading to 50% cell death. The analysis was made with a fluorescent Zeiss microscope and pictures were taken at $\times 32$.

DNA/MTF-1 complex detection

The technique is based on the principle that complex DNA/MTF-1 migrated less quickly (in nondenaturing condition) than the DNA or the proteins alone. In response to oxidative stress induced by Cd, Cu or Zn, MTF-1 was activated by zinc and fixed on the MRE upstream sequence of metallothionein genes, thus enhancing their transcriptions. We first determined the percentages of biotinylation, which account for 50% for MREe and MREg, 35% for MREa. We also made a few modifications to optimize the EMSA technique and the results obtained used only MREa, which gave a better response for MTF-1 binding activity. This probe was then mixed with the cytoplasmic and nuclear extracts before migration in native gel.

We observed a shift (complex DNA/MTF-1) for the cytoplasmic extract and another for the nuclear extract (smaller band), which showed a low extent of MTF-1 translocation from cytoplasm to the C6 nuclei and HaCaT cell lines when they were incubated with Cd for 24 h (Fig. 7A and 7B). The difference in the band sizes observed on gel between the EBNA (positive control) and MTF-1 came from the protein sizes. Indeed, MTF-1 molecular weight is approximately 40 kDa, whereas test of EBNA is 28 kDa. It was therefore normal that the complex resulting from MTF-1 was higher in gel compared to the EBNA complex (Fig. 7A and 7B).

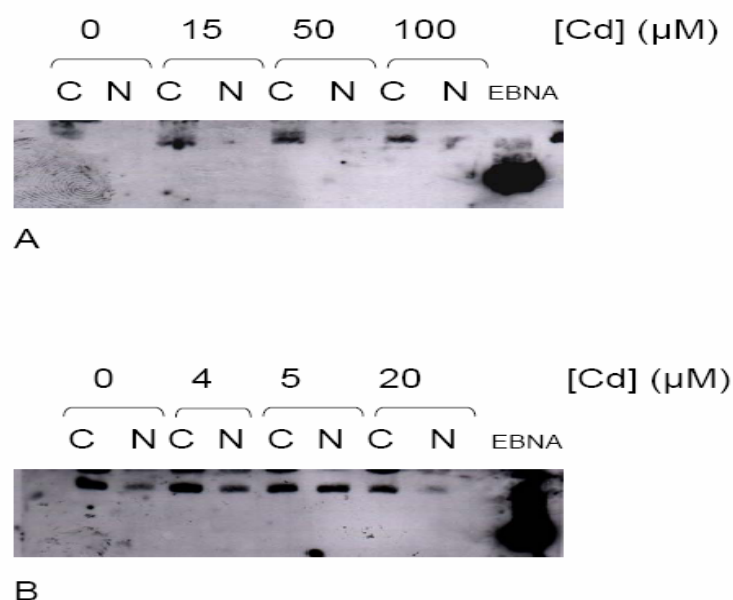


Figure 7: Complex DNA/MTF-1 detection after cell incubation with cadmium (Cd) for 24 h. (A) HaCaT cells treated with Cd (0, 15, 50 and 100 μM); (B) C6 treated with Cd (0, 4, 5 and 20 μM). Cytoplasmic and nuclear extracts were analyzed by EMSA assay using a labeled MREa. Binding reactions were subjected to native gels. The specific complexes are indicated by bands.

The results also show that the translocation toward the nuclei of MTF-1 was greater when the two cellular lines were treated with Cu or Zn for 24 h than with Cd (Fig. 8A, 8B, 9A and 9B). In the case of Zn, the bands seemed much more intense than with Cu (Figs. 8A, 8B, 9A and 9B).

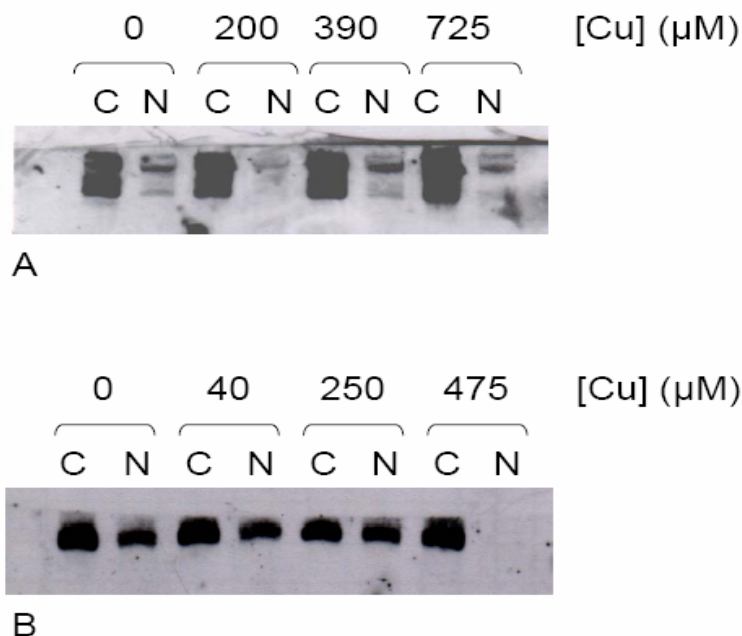


Figure 8: Complex DNA/MTF-1 detection after cell incubation with copper (Cu) for 24 h. (A) HaCaT cells treated with Cu (0, 200, 390 and 725 μM); (B) C6 treated with Cu (0, 40, 250 and 475 μM). Cytoplasmic and nuclear extracts were analyzed by EMSA assay using a labeled MREa. Binding reactions were subjected to native gels. The specific complexes are indicated by bands.

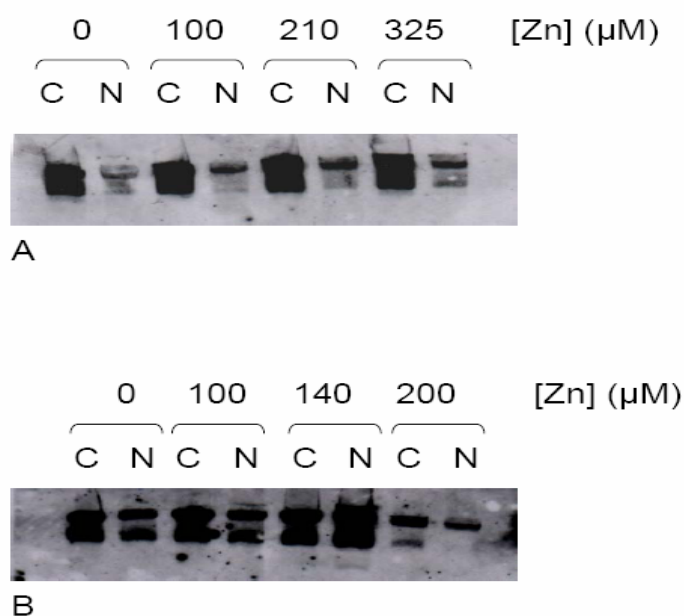


Figure 9: Complex DNA/MTF-1 detection after cell incubation with zinc (Zn) for 24 h. (A) HaCaT cells treated with Zn (0, 100, 210 and 325 μM); (B) C6 treated with Zn (0, 100, 140 and 200 μM). Cytoplasmic and nuclear extracts were analyzed by EMSA assay using a labeled MREa. Binding reactions were subjected to native gels. The specific complexes are indicated by bands.

DISCUSSION

MTs are an abundant, ubiquitous family of the low-molecular-weight metal (Cd, Zn and Cu) binding proteins. The metallothioneins take part in intracellular protection against Cd, Cu, Zn or ROS toxicity. Their free radical scavenging activities was first identified by Thornalley (1985). Thus, Cd (Stohs et al, 1995), Cu and Zn may not act only by inhibiting antioxidant enzyme activities and decreasing in the intracellular glutathione levels (data not presented), but these metals can enhance metallothionein synthesis. In the present work, the metallothionein expression assays performed on HaCaT and C6 cells submitted to a stress with Cd, Cu and Zn showed that HaCaT cells were relatively resistant to low Cd concentrations as the result of high levels of metallothionein expression, in agreement with the Thornalley (1985) and Stohs et al. (1995) studies. In C6 cells, no MTs bands were observed with 20 μ M Cd and 475 μ M Cu. Which explains the high sensitivity of C6 cells at these concentrations or the sensitivity of other organs (Tokuda et al, 2007).

Our results also demonstrate that Cd, Cu and Zn induced the expression of MT and these proteins led to a significant increase in biosorption of Cd, Cu and Zn (Kao et al, 2006). It was significant to note that we first used the traditional Western blot methods to highlight the MTs. These methods did not allow us to determine the level of MTs in our samples, justifying the use of CaCl_2 and glutaraldehyde in the CAPS buffer (Mizzen et al, 1996). These modifications made by Van Eldik and Wolchok (1984) and then McKeon and Lyman (1991) were initially intended to detect calmodulin by immunodetection. This technique, adapted by Mizzen and co-workers (1996) to MTs, enabled us to visualize these proteins in our cellular extractions and confirmed the sensitivity of this method to 10 ng in MT (data not presented). The resistance of HaCaT cells to Cd concentrations over 50 μ M was dependent on intracellular metallothionein levels, which were localized in cytoplasm before nuclear translocation after incubation with metals. This MT translocation in HaCaT was greater than C6 cell translocation. MT overexpression was correlated with a decrease in cell sensitivity to the toxic effects of metals (Huot et al, 1991; Wu and Welsh, 1996) by chelating metals or scavenging free radicals (Andrews, 2000; Hidalgo et al, 2001; Fatur et al, 2002; Nordberg, 1998; Penkowa, 2006; Urani, 2005 et 2007; West et al, 2004).

Indeed, MT gene expression is differentially controlled in response to heavy metals and reactive oxygen species (Bae et al, 2001). Our results show that the metallothioneins were expressed in the untreated HaCaT cell (immortalized by mutation of p53 by Fusenig et al, 1998), which suggested that the MT expression was substantially increased when p53 was

mutated (Hamada et al, 1997; Friedline et al, 1998; Jin et al, 2000). Indeed, in other cellular lines such as C6 cells, MT expression was not observable in the basal state; explaining the sensitivity of C6 cells, which have a wild type p53. This relation between the absence of p53 and the increase in the metallothionein level in cells is discussed.

Concerning the synthesis of MTs, the mechanisms are unclear in C6 and HaCaT cells but involves the increase in the intracellular zinc level and MTF-1 translocation into nuclei, as described by Stankovic et al. (2007) in other cell types. The results showed that Cd involved a weak translocation of MTF-1 from the cytoplasm to the nuclei. These observations were confirmed by data from the literature. Many authors showed that the activation of MTF-1, induced by Cd or Cu, was an indirect process and translocation of MTF-1 to nuclei was low (Wang et al, 2004; Koizumi et al, 1992). However, this low level of MTF-1 translocation induced by Cd or Cu is sufficient for high expression of metallothionein genes (Smirnova et al, 2000). MTF-1 binding to DNA is known to be stimulated not only by zinc, but is also largely influenced by the cellular redox state. The redox state would be the regulator of MTF-1 activity (Koizumi et al, 2000). The analysis of the MTF-1 mutant recombination suggests that the zinc-finger is important for its binding to DNA. This binding with DNA is zinc-dependent (Dalton et al, 1997; Koizumi et al, 2000) but independent of the interactions with Cd or other transition metals (Koizumi et al, 1999; Westin et al, 1988; Dalton et al, 1997; Chen et al, 1999; Koizumi et al, 1992; Bittel et al, 1998; Heuchel et al, 1994; Müller et al, 1995).

These observations were in agreement with our results. Indeed, the analysis of the cytoplasmic and nuclear extracts showed that the MTF-1 was cytoplasmic and did not band to DNA in untreated cells. After 24 h of cell incubation with metals, MTF-1 was detected in the nuclear extract, which suggests a nuclear translocation of MTF-1 and an effective binding to DNA. In contrast to the HaCaT cells, MT is not constitutively expressed, but is highly induced in C6 cells by Cd, Cu and Zn. This is suggested by the greater MTF-1 translocation in C6 nuclei than in HaCaT cells where the MTF-1 translocation is low.

The MTF-1 translocation in nuclei is usually correlated with an increase in the intracellular labile or free Zn level (Smirnova et al, 2000), which shows that Zn was the direct regulator of MTF-1 (Koizumi et al, 1999). The fluorescent probe zinquin (Coyle et al, 1994; Haase and Beyersmann, 1999; Zalewski et al, 1993; Zalewski et al, 2006) is a zinc-specific fluorescent dye and the results obtained in this study show an increase in intracellular zinc after cell treatment with Cd or Cu. This increase in zinc was related to MTF-1 translocation into nuclei, in agreement with data from the literature.

MT expression can be regulated not only by MTF-1 and zinc or by p53 proteins, but also by a complex network of the redox metabolites such as intracellular glutathione (Krezel and Maret, 2007; Kang, 2006). Thus Lichtlen and colleagues (2001) showed that the loss of MTF-1 was accompanied by a substantial increase in glutathione, probably to compensate the low MT expression and against oxidative stress.

In conclusion, we have demonstrated in this study that HaCaT and C6 cells can be used as models for studying MT expression induced by metals, one via an increase in the Zn level, MTF-1 and its target genes (MREs). MT plays a key role in the HaCaT and C6 cell defense to metals toxicities and essentially protects the DNA from oxidative damage when it translocated in the nuclei. HaCaT cells are more resistant to Cd than C6 cells where 20 μ M decrease the MT level.

Acknowledgments:

We thank Doctor Schaffner for pMT-I plasmid and Philippe Schaeffer for their technical assistance.

Bibliography

- Andrews, G.K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology* **59**: 95-104.
- Bae, D.S., Gennings, C. Carter, W.H. Jr., Yang, R.S., Campain, J.A. 2001. Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicol Sci.* **63**: 132-42
- Bannister, A.J. Kouzarides, T. 1992. Basic peptides enhance protein/DNA interaction in vitro. *Nucleic Acids Res.* Jul 11; **20**: 3523.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science (New York, N.Y.)*. **161**: 370-371.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L-A., Gedamu, L., Andrews, G.K. 1998. The DNA Binding Activity of Metal Response Element-binding Transcription Factor-1 Is Activated in Vivo and in Vitro by Zinc, but Not by Other Transition Metals. *J. of biol. Chem.* **273**: 7127-7133.
- Bittel, D.C., Smirnova, I.V., Andrews, G.K. 2000. Functionnal heterogeneity in the zinc fingers of metalloregulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. *J. Biol. Chem.* **275**: 37194-37201.
- Chen, X., Chu, M., Giedroc, D.P. 1999. MRE-binding transcription factor-1: weak zinc-binding domain 5 and 6 modulate the structure, affinity specificity of the metal-response

element complex. *Biochemistry*. **38**: 12915-12925.

Coyle, P., Zalewski, P.D., Philcox, J.C., Forbes, I.J., Ward, A.D., Lincoln, S.F., Mahadevan, I., Rofe, A.M. 1994. Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem J*. **303**:781-6.

Culotta, V.C., Hamer, D.H. 1989. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol. Cell. Biol*. **9**: 1376-1380.

Dalton, T.D., Bittel, D., and Andrews, G.K. 1997. *Mol. Cell. Biol*. **17**: 2781–2789

Dalton, T.P., Li, Q., Bittel, D., Liang, L., and Andrews, G. K. 1996. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 26233-26241.

Daniels, P.J., Bittel, D., Smirnova, I.V., Winge, D.R., Andrews, G.K. 2002. Mammalian metal response element-binding transcription factor-1 functions as a zinc sensor in yeast, but not as a sensor of cadmium or oxidative stress. *Nucleic Acids Res. Jul*. **30**:3130-40.

Davis, S.R., Cousins, R.J. 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr*. **130**: 1085-1088.

Eisenstark, A., and Perrot, G. 1987. Catalase has only a minor role in protection against near-ultraviolet radiation damage in bacteria. *Mol Gen Genet*. **207** : 68-72.

Fatur, T., Tusek, M., Falnoga, I., Scancar, J., Lah, 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.

Friedline, J.A., Garrett, S.H., Somji, S., Todd, J.H., Sens, D.A. 1998. Differential expression of the MT-1E gene in estrogen-receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. *The American journal of pathology* **152**: 23-27.

Fusenig, N.E., Boukamp, P. 1998. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog*. **23**: 144-58.

Haase, H., and Beyersmann, D. 1999. Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. *BioMetals* **12**: 247-254.

Hamada, T., Tanimoto, A., Sasaguri, Y. (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* **2** : 359-367.

Hawse, J.R., Padgaonkar, V.A., Leverenz, V.R., Pelliccia, S.E., Kantorow, M., Giblin, F.J. 2006. The role of metallothionein IIa in defending lens epithelial cells against cadmium and TBHP induced oxidative stress. *Mol Vis*. **12**: 342-9.

Harford, C., and Sarkar, B. 1991. Induction of metallothionein by simultaneous administration of cadmium(II) and Zn(II). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **177**: 224-228.

Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., Schaffner, W. 1994. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* Jun. **13**: 2870-5.

Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P., Vasak, M. 2001. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* **55**: 133-145.

Hodgson, J., Enrietto, P.J. 1995. Constitutive and inducible kappa B binding activities in the cytosol of v-Rel-transformed lymphoid cells. *J Virol.* **69**: 1971-9.

Huot, J., Roy, G., Lambert, H., Chretien, P., Landry, J. 1991. Increased survival after treatments with anticancer agents of chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res.* **51**: 5245-5252

Jin, R., Bay, B.H., Chow, V.T., Tan, P.H., Lin, V.C. 2000. Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer. *British journal of cancer* **83**: 319-323.

Kao, W.C., Chiu, Y.P., Chang, C.C., Chang, J.S. 2006. Localization effect on the metal biosorption capability of recombinant mammalian and fish metallothioneins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* **22**: 1256-64.

Kang, Y.J. 2006. Metallothionein redox cycle and function. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) **231**:1459-1467.

Klaassen, C., Lehman-McKeeman, L. 1999. Separation and quantification of isometallothioneins by high-performance liquid chromatography-atomic absorption spectrometry. *Methods Enzymol.* **205**: 190-198.

Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Gong, P., Otsuka, F. 2000. Roles on zinc fingers and other regions of the transcription factor human MTF-1 in zinc-regulated DNA binding. *J. Of Physiol.* **185**: 464-472.

Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Yamada, H., 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.

Koizumi, S., Yamada, H., Suzuki, K., Otsuka, F. 1992. Zinc-specific activation of HeLa cell nuclear protein which interacts with a metal responsive element of the human metallothionein-IIA gene. *Eur. J. Biochem.* **210**: 555-560.

Kozmik, Z., Urbanek, P., Paces, V. 1990. Albumin improves formation and detection of some specific protein-DNA complexes in the mobility shift assay. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2198.

Krezel, A., and Maret, W. 2007. Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *Biochem J.* **402**: 551-8.

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Larochelle, O., Stewart, G., Moffatt, P., Tremblay, V., Segin, C. 2001. Characterization of mouse metal-regulatory-element-binding proteins, metal protein-1 and metal regulatory

transcription factor-1. *Biochem. J.* **353**: 591-601.

LeGendre, N., Matsudaira, P. 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.

Li, Y., Kimura, T., Laity, J.H., Andrews, G.K. 2006. The zinc-sensing mechanism of mouse MTF-1 involves linker peptides between the zinc fingers. *Mol Cell Biol.* **26**: 5580-7.

Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R., Schaffner, W. 2001. Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Research.* **29**: 1514-1523.

Lightbody, J. 1968. Establishment of differentiated clonal strains of glial brain cells in culture. *Fed. Proc.* **27**

McKeon, T.A., Lyman, M.L. 1991. Calcium ion improves electrophoretic transfer of calmodulin and other small proteins. *Anal. Biochem.* **193**: 125-130.

Mizzen, C.A., Cartel, N.J., Yu, W.H., Fraser, P.E., 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. *J Biochem Biophys Methods.* **32**: 77-83.

Müller, H.P., Brungnera, E., Georgiev, O., Badzong, M., Müller, K.H., Schaffner, W. 1995. Analysis of the heavy metal-responsive transcription factor MTF-1 from human and mouse. *Somat. Cell Mol. Genet.* **21**: 289-297.

Nordberg, M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta.* **46**: 243-254.

Ogra, Y., Aoyama, M., Suzuki, K.T. 2006. Protective role of metallothionein against copper depletion. *Arch. Of Biochem. Biophys.* **451**: 112-118.

Otsuka, F. 2001. Molecular mechanism of the metallothionein gene expression mediated Metal-Responsive Transcription Factor 1. *J. Of Health Science.* **47**: 513-519.

Otsuka, F., Okugaito, I., Ohsawa, M., Iwamatsu, A., Suzuki, K., Koizumi, S. 2000. Novel responses of ZRF, a variant of human MTF-1, to *in vivo* treatment with heavy metals. *Biochim. Biophys. Acta.* **1492**: 330-340.

Penkowa, M. 2006. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J.* **273**: 1857-1870.

Radtke, F., Georgiev, O., Muller, H-P., Brugnera, E., Schaffner, W. 1995. Functional domains of the heavy metal-responsive transcription regulator MTF-1. *Nucleic Acids Res.* **23**: 2277-2286.

Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z., Schaffner, W. 1993. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* **12**: 1355-62.

Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H., Andrews, G.K. 2000. Zinc and Cadmium Can Promote Rapid Nuclear Translocation of Metal Response Element-binding Transcription Factor-1. *J. of Biol. Chem.* **275**: 9377-9384.

Stankovic, R.K., Chung, R.S., Penkowa, M. 2007. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**: 484-489.

Stohs, S.J., Bagghi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 321-336.

Stuart, G.W., Searle, P.F., Palmiter, R.D. 1985. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promotor by assaying synthetic sequences. *Nature (London)*. **317**: 828-831.

Szczelkun, M.D., Jones, H., Connolly, B.A. 1995. Probing the protein-DNA interface of the EcoRV modification methyltransferase bound to its recognition sequence, GATATC. *Biochemistry*. **34**:10734-43.

Thornalley, P.J., Vasak, M. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta*. **827**: 36-44.

Tokuda, E., Ono, S-I., Ishige, K., Naganuma, A., Ito, Y., Suzuki, T. 2007. Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis. *Toxicology*. 229: 33-41.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 4350-4354.

Triplett, B. 1992. Salt-dependent formation of DNA-protein complexes *in vitro*, as viewed by the gel mobility shift assay. *Biotechniques*. 13: 354-5.

Urani, C., Melchiorretto, P., Carnevali C., Crosta, G.F. 2005. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 exposed to cadmium. *Toxicology in vitro*. **19**: 887-892.

Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., Morazzoni, F., Gribaldo, L. 2007. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicology in vitro*

Van Eldik, L.J., Wolchok, S.R. 1984. Conditions for reproducible detection of calmodulin and S100 β in immunoblots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**: 752-759.

Wang, Y., Lorenzi, I., Georgiev, O., Schaffner, W. 2004. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. High zinc concentration. *Biol. Chem.* **385**: 623-632.

West, A.K., Chuah, M.I., Vickers, J.C., Chung, R.S. 2004. Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain. *Rev. Neurosci.* **15**: 157-166.

Westin, G., and Schaffner, W. 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J.* **7**: 3763-70.

Winston, R.L., Millar, D.P., Gottesfeld, J.M., Kent, S.B. 1999. Characterization of the DNA binding properties of the bHLH domain of Deadpan to single and tandem sites. *Biochemistry.* **38**: 5138-46.

Wu, W., Welsh, M.J. 1996. Expression of the 25-Kda heat shock protein (Hsp27) correlates with resistance to the roxicity of cadmium chloride, mercuric chloride, cis-platinum(II)-diammine dichloride, or sodium arsenite in mouse embryonic stem cells transfected with sense or antisens Hsp27 cDNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**: 330-339.

Zalewski, P., Truong-Tran, A., Lincoln, S., Ward, D., Shankar, A., Coyle, P., Jayaram, L., Copley, A., Grosser, D., Murgia, C., Lang, C., Ruffin, R. 2006. Use of zinc fluorophore to measure labile pools of zinc in body fluids and cell-conditioned media. *Biotechniques.* **40**: 509-20

Zalewski, P.D., Forbes, I.J., Betts, W.H. 1993. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem J.* **296**: 403-8.

Zhang, X.Y., Asiedu, C.K., Supakar, P.C., Ehrlich, M. 1992. Increasing the activity of affinity-purified DNA-binding proteins by adding high concentrations of nonspecific proteins. *Anal Biochem.* **201**: 366-74.

Conclusions de l'article III et perspectives

Nous avons mis en évidence l'accumulation nucléaire des MTs dont l'expression a été induite par un traitement métallique. Cette accumulation nucléaire est en faveur d'un effet génoprotecteur temps et dose-dépendant des MTs. L'induction des MTs doit être considérée comme un mécanisme d'adaptation cellulaire important contre la toxicité du Cd, du Cu et du Zn. Ainsi l'absence de toxicité observée pour les concentrations de Cd inférieures ou égales à 50 μ M est corrélée à l'augmentation de GSH et à la forte expression des MTs dans les HaCaT. Ces résultats confirment également le fait que l'impact du Cd est le résultat de la balance entre l'inhibition des activités antioxydantes (articles 1, 2, *études A et B*) et l'induction de synthèse de GSH et des MTs (articles 1 et 4). Cependant, la forte différence dans l'expression induite des MTs observée entre les deux lignées cellulaires peut s'expliquer par les niveaux de régulation de ces MTs. En effet, ces protéines peuvent non seulement être régulées pour leur synthèse par les taux intracellulaires de zinc ou le déplacement du zinc intracellulaire par d'autres métaux, par le taux intracellulaire de GSH qui permet de réduire des MTs oxydées par les ERO, mais aussi par la protéine suppresseur de tumeur, p53. Dans ce dernier cas, il existe une relation discutée entre la protéine p53 et l'expression des MTs. La mutation de p53 provoquerait une forte expression des MTs ce qui pourrait expliquer la présence des MTs dans les cellules HaCaT non traitées par le Cd sachant que ces cellules possèdent un gène p53 muté. Il apparaît donc intéressant de poursuivre notre recherche sur le rôle de p53 dans la résistance des HaCaT au Cd en faisant le lien entre p53 et l'expression des MTs ; puis entre p53 et le type de mort cellulaire induit par ce métal.

Etudes complémentaires

1. Gène rapporteur

Pour quantifier l'efficacité de transfection en mesurant l'activité luciférase avant le stress aux métaux, nous avons déterminé les conditions de transfection transitoire des cellules avec différents composés lipidiques comme agents de transfection (Transfast ; Promega, France. Lipofectamine ; Invitrogen, France) et avec le plasmide pGL3 commercial (plasmide contrôle ; Promega, France).

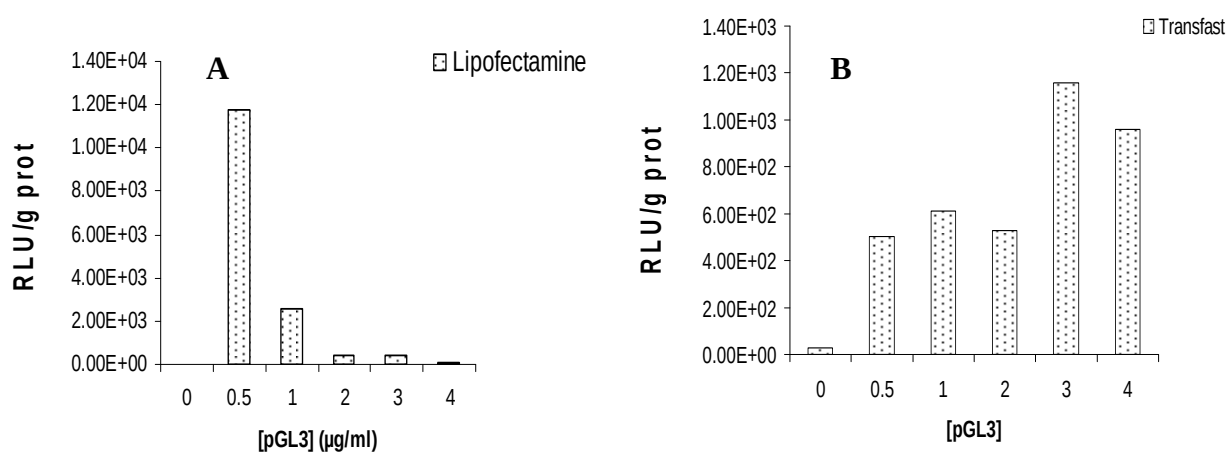


Figure 62: Efficacité de transfection sur cellules HaCaT. (A) cellules HaCaT cultivées avec la lipofectamine et (B) cellules HaCaT incubées avec le Transfast. L'ADN (0 à 4 µg) est mélangé avec le composé lipidique selon les directives du fabricant en absence de sérum dans le milieu de culture. L'efficacité de transfection est déterminée 24h après la transfection par mesure de l'activité luciférase. Les résultats sont exprimés sous forme d'unité relative de lucigénine (RLU)/g de protéine.

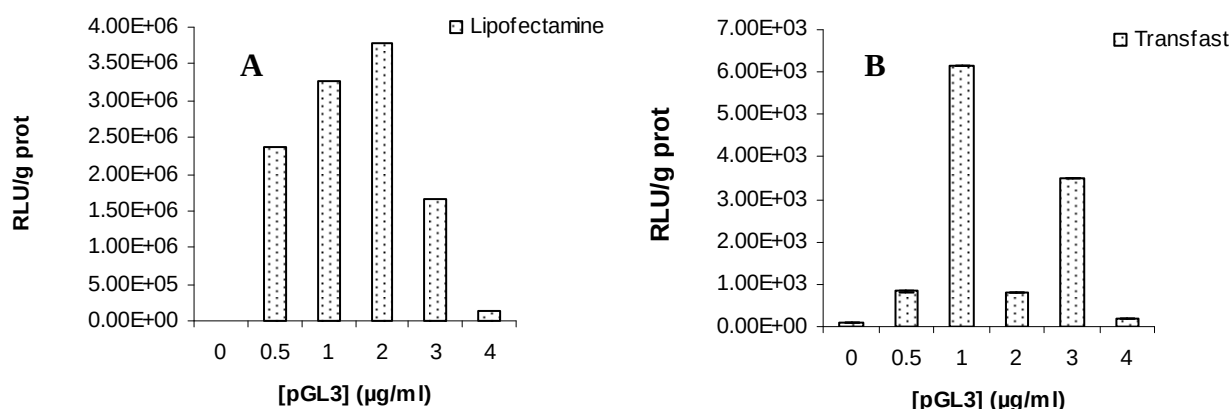


Figure 63 : Efficacité de transfection sur cellules C6. (A) cellules C6 cultivées avec la Lipofectamine. (B) cellules C6 incubées avec le Transfast. L'ADN (0 à 4 µg) est mélangé avec le composé lipidique selon les directives du fabricant en absence de sérum dans le milieu de culture. L'efficacité de transfection est déterminée 24h après la transfection par mesure de l'activité luciférase. Les résultats sont exprimés sous forme d'unité relative de lucigénine (RLU)/g de protéine.

Les résultats montrent que les cellules HaCaT et C6 sont facilement transfectées avec les deux composés lipidiques (figures 62 et 63). Cependant, la lipofectamine présente une efficacité de transfection plus élevée que le transfast dans les deux lignées cellulaires. Pour la suite de l'étude, nous avons réalisé la transfection avec 0,5 µg d'ADN pour les cellules HaCaT et 2 µg d'ADN pour les cellules C6. A ces quantités d'ADN, l'activité luciférase est la plus importante (figures 62 et 63). La transfection est réalisée en absence de sérum et par la Lipofectamine.

2. EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

2-1. Efficacité de la biotinylation des sondes d'ADN (MREs : *metal regulatory elements*)

La technique EMSA nécessite un marquage de l'ADN. Le marquage peut être radioactif (utilisation du ^{32}P) mais nous avons opté pour un marquage par biotinylation (non radioactif). La biotinylation se fait sur l'extrémité 3'-OH de l'ADN. La biotine est incorporée par la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transférase) sur l'ADN simple brin. Les doubles brins d'ADN biotinylé reconstitués sont analysés en Dot blot (Bio-Rad, USA) pour vérifier l'efficacité de la biotinylation (méthodologie fournie par Sigma, France). A partir des résultats, nous avons déterminé empiriquement les pourcentages de biotinylation (comparaison des tailles des spots des MREs avec celles du standard) car le laboratoire ne possède pas de densitomètre. Différentes dilutions sont réalisées pour réduire la taille des spots afin de limiter les risques de saturation et de bruits de fond (figures 64A et 64B). Pour la première expérience, seule la MREe a été biotinylée sur les deux brins. L'ADN a été biotinylé à 50% (figure 64A). L'expérience a ensuite été refaite en augmentant les quantités de sonde et cette fois toutes les MREs sont bien biotinylées, avec une efficacité d'environ 35% pour MREa et 50% pour MREg (figure 64B). Ces pourcentages sont suffisants pour une détection du complexe ADN/MTF-1.

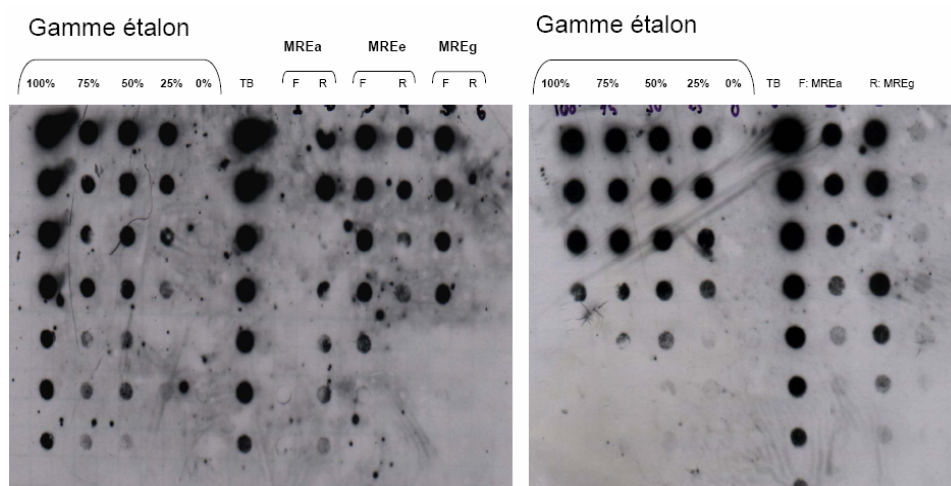


Figure 64 : Efficacité de biotinylation des sites de fixation du facteur de transcription des métallothionéines (MREs). F = premier brin de l'ADN et R = brin complémentaire. L'efficacité de biotinylation est déterminée par la technique Dot Blot décrite dans les matériels et méthodes.

2-2. Optimisation de la technique EMSA

Les contrôles positifs (EBNA) sont en accord avec les résultats présentés par le kit (Promega, France). Cependant les extraits protéiques (nucléaires et cytoplasmiques) en présence des MREs n'ont donné aucune bande (« shift » ; figure 65). Il semble que cette réponse négative résulte du milieu réactionnel qui ne comporte qu'un minimum de réactifs comme indiqué dans la partie matériel et méthode. Nous avons donc ajouté au milieu réactionnel, les différents éléments optionnels suivant : glycérol (2,5%), $MgCl_2$ (5 mM), EDTA (10 mM), DTT (10 mM) et KCl. Après ces changements, on observe un shift pour l'extrait cytoplasmique et nucléaire (bande plus petite) pour les MREa, MREe et MREg (figure 66). Ce qui indique une faible translocation de MTF-1 du cytoplasme vers le noyau des cellules C6 incubées avec 20 μM de cadmium. La différence des tailles des bandes observées sur le gel entre l'EBNA et MTF-1 viennent des tailles des protéines elles mêmes. En effet, MTF-1 fait environ 40 kDa tandis l'EBNA fait 28 kDa. Il est donc normal que le complexe résultant de MTF-1 soit plus haut dans le gel par rapport à celui de l'EBNA (figure 66).

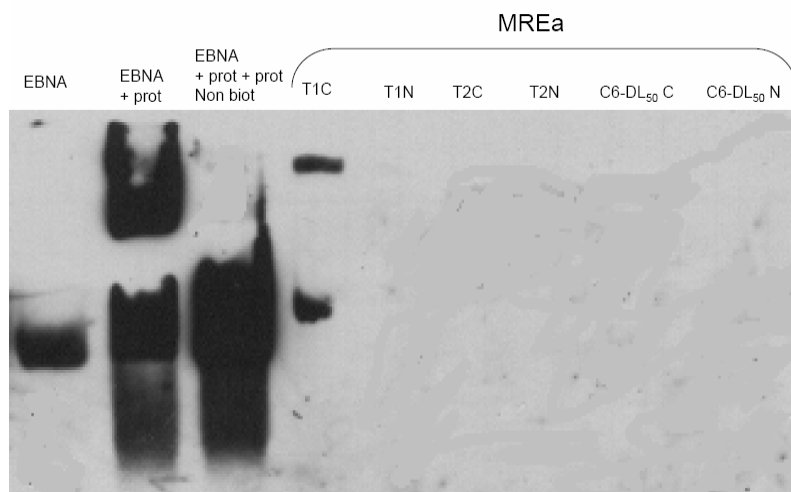


Figure 65 : Réaction EMSA. La réaction est réalisée sur les extraits protéiques des cellules HaCaT et C6 puis sur les cellules C6 incubées avec 20 μ M de cadmium pendant 24h. Un contrôle positif (EBNA) est également déposé dans le gel seul, avec les extraits protéiques (EBNA + prot) ou avec un excès de sondes non biotinylées (EBNA + prot + prot Non biot). T1C = extrait cytoplasmique des témoins HaCaT ; T1N = extrait nucléaire des témoins HaCaT ; T2C = extrait cytoplasmique des témoins C6 ; T2N = extrait nucléaire des témoins C6 ; C6-DL₅₀C = extrait cytoplasmique des cellules C6 incubées avec 20 μ M de cadmium (DL₅₀) et C6-DL₅₀N = extrait nucléaire des cellules C6 incubées avec 20 μ M de cadmium (DL₅₀)

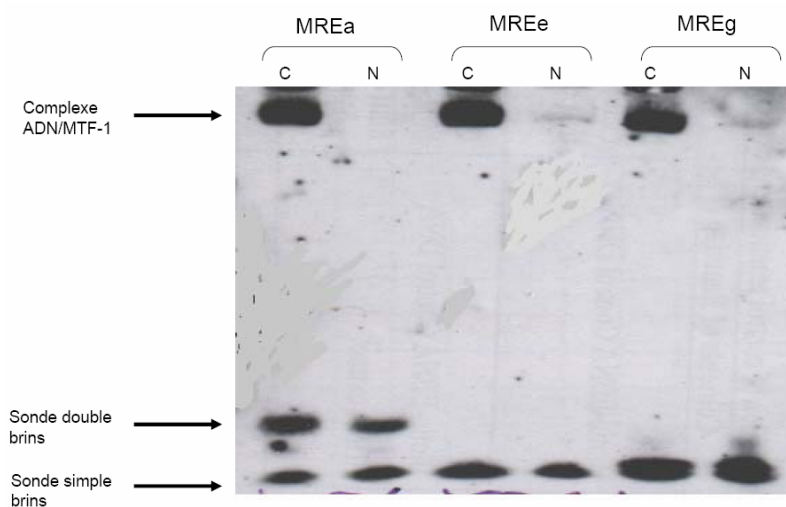


Figure 66 : Optimisation de la réaction EMSA. La réaction est réalisée sur les extraits protéiques des cellules C6 incubées avec 20 μ M de cadmium pendant 24h et présence des sondes MREa, MREe et MREg. C = extrait cytoplasmique et N = extrait nucléaire.

Par ailleurs, la séquence MREa en présence de l'extrait cytoplasmique (figure 66) présente 3 bandes après réaction (un complexe ; deux restes dont un mono et un double brin de sonde d'ADN). Les MREe et MREg ne présentent que 2 bandes (le shift et un reste en mono brin). La bande la plus basse du gel correspond à un reste de sonde mono brin ; la bande intermédiaire correspond au reste de sonde double brin et la bande la plus haute du gel représente le complexe ADN/MTF-1. Ceci étant, les résultats indiquent que seul la MREa a

reformé un double brin d'ADN. Ainsi l'hybridation n'est pas totale et les sondes monobrans restant dans le milieu réactionnel sont capables de complexer MTF-1. En effet, les figures 66 et 67 montrent que les séquences MREe et MREg sont restées simples brins après hybridation mais participent à la formation du complexe ADN/MTF-1.

Pour avoir une explication à ce phénomène, nous avons déposé la sonde MREa non seulement en monobrans mais aussi en doubles brins dans le gel ; afin de comparer les distances de migration entre sondes mono et doubles brins (figure 67). Puis nous avons fait migrer les sondes sans extraits protéiques. Les profils sont identiques à ceux obtenus en présence d'extrait protéique. Ce résultat suggère que MTF-1 a la capacité de se lier sur un mono et un double brin *in vitro* (figures 66 et 67). La figure 67 montre aussi que la sonde MREa est incapable de réaliser un shift en absence de MTF-1. La liaison MTF-1/MRE semble donc spécifique mais capable de s'établir indifféremment entre un ADN simple et double brin *in vitro*.

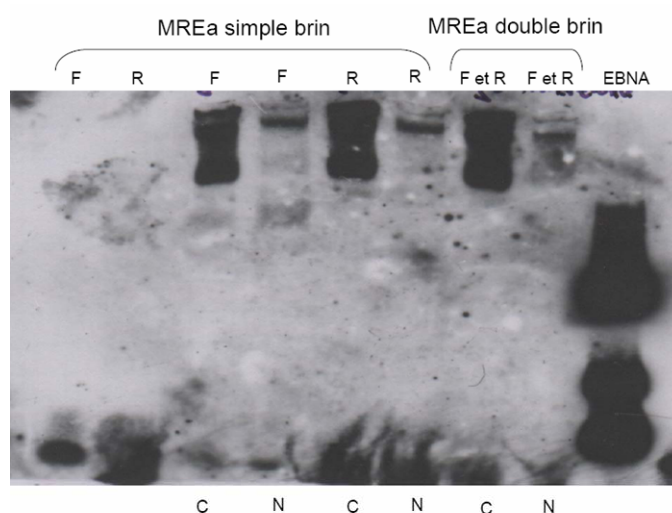


Figure 67 : Réaction EMSA. La réaction est réalisée sur les extraits protéiques des cellules C6 incubées avec 20 μ M de cadmium pendant 24h et en présence des sondes MREa simple et double brin. C = extrait cytoplasmique et N = extrait nucléaire. F = premier brin de MREa et R = brin complémentaire. EBNA = contrôle positif

Nous avons également vérifié l'hybridation des sondes. Nous avons changé les conditions d'hybridation. En effet, certaines séquences ne résistent pas à la température (1 min à 94°C, condition précédente). Ainsi nous avons mélangé à volume égal (v/v) les différents mono brins de chaque MRE. Puis les solutions sont incubées à température ambiante pendant 1h (kit Pierce). Les résultats EMSA obtenus ne changent pas. Le profil est le même que dans la figure 66. Pour être relativement proche des conditions *in vivo*, nous avons choisi de poursuivre le travail avec la sonde MREa qui s'hybride conformément aux instructions du fournisseur du kit.

Publication IV : Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines

Présentation de l'article IV

La protéine p53 est un composant majeur de la réponse cellulaire au stress oxydant en induisant l'arrêt du cycle cellulaire pour réparer les dommages de l'ADN, ou en orientant les cellules vers l'apoptose. L'inactivation des fonctions de p53 est un élément clé du processus carcinogénique puisque pour environ 50% de l'ensemble des cancers humains, cette protéine est mutée. Cependant, la mutation de p53 pourrait provoquer une forte expression des MTs et ainsi expliquer la présence des MTs dans les cellules HaCaT non traitées. Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié le rôle de p53 dans la résistance des cellules HaCaT et la sensibilité des cellules C6 au Cd en faisant le lien entre p53 et l'expression des MTs ; puis entre p53 et le type de mort cellulaire induit par ce métal. Le Cd peut à la fois induire une mort cellulaire par apoptose et par nécrose. Le rapport entre les deux types de mort cellulaire dépend de la dose et du type de cellules.

Aux doses létales, les caractéristiques de l'apoptose ont été observées 24 h après le traitement des cellules C6 : fragmentation apoptotique de l'ADN et activation de la caspase-9 tandis que les activités de la caspase-3 ne changent pas. Contrairement aux C6, le Cd n'induit ni la fragmentation apoptotique de l'ADN ni l'activation des caspases-3 et -9 dans les cellules HaCaT. Les résultats ont également montré que l'inhibition de p53 conduit à une résistance des cellules C6 à 20 μ M Cd, à une diminution de l'apoptose et à une augmentation de l'expression des MTs. Par ailleurs, la restauration de p53 provoque une sensibilité accrue des cellules HaCaT vis-à-vis du Cd, mais cette restauration n'apporte aucun changement significatif sur l'expression des MTs. Nos résultats suggèrent non seulement que le Cd induit l'apoptose dans les cellules C6 et une mort non apoptotique dans les cellules HaCaT mais aussi que la relation entre p53 et l'expression des MTs dépend du type cellulaire (voir article en annexe).

Conclusions de l'article IV et perspectives

Le Cd est un toxique environnemental. Le type de mort cellulaire induit par le Cd est particulièrement intéressant à étudier vu la toxicité cellulaire et les pathologies induites par ce métal. Les métallothionéines (MTs) sont constitutivement exprimées dans les cellules HaCaT et leurs expressions ne sont que faiblement et non significativement modifiées par le Cd en absence ou en présence de p53. Ce résultat indique que p53 n'influence pas l'expression des MTs dans les cellules HaCaT. Contrairement aux cellules HaCaT, les cellules C6 montrent une mort apoptotique Cd-induite et passant par l'activation de la caspase-9, mais pas par la caspase-3. La toxicité Cd-induite est moins importante dans ces cellules quand p53 est inhibée et cette survie cellulaire se traduit par une forte diminution de l'apoptose. Par conséquent la protéine p53 joue un rôle dans l'apoptose induite par le Cd dans les cellules C6.

Les MTs ne sont pas constitutivement exprimées dans les cellules C6, mais fortement induites par le Cd. Lorsque les cellules sont incubées avec 20 μ M de Cd après inhibition de p53, l'expression des MTs et la survie cellulaire augmentent. Ceci confirme non seulement une mort apoptotique p53-dépendante dans les C6 mais aussi une relation entre p53 et l'expression des MTs dépendant du type cellulaire. Ces résultats montrent également que la forte expression constitutive des MTs dans les HaCaT est en partie responsable de la résistance de ces cellules à la toxicité du Cd et que la mort des HaCaT est une mort non apoptotique.

Les MTs et le glutathion (GSH) étant deux molécules riches en thiols, l'expression de l'une peut être influencée par l'autre. Ainsi, il serait intéressant d'étudier non seulement les mécanismes de synthèse du GSH induite par le Cd dans les cellules HaCaT mais aussi le rôle de ce GSH dans l'expression des MTs. Il serait tout autant intéressant d'étudier les mécanismes de protection de l'ADN liés à ces deux molécules (GSH et MTs) antioxydantes.

Etudes complémentaires : évaluation de l'apoptose induite par le cuivre et le zinc

1. Fragmentation apoptotique de l'ADN induite par le cuivre et le zinc

L'apoptose a tout d'abord été évaluée en étudiant la fragmentation de l'ADN qui est un évènement se produisant lors de la dernière étape de l'apoptose avant que les cellules ne se divisent en plusieurs corps apoptotiques ensuite phagocytés par les cellules environnantes. Le test ELISA a été réalisé sur la totalité des cellules (flottantes et adhérentes) traitées ou non par le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) pendant 24h (figures 68 et 69).

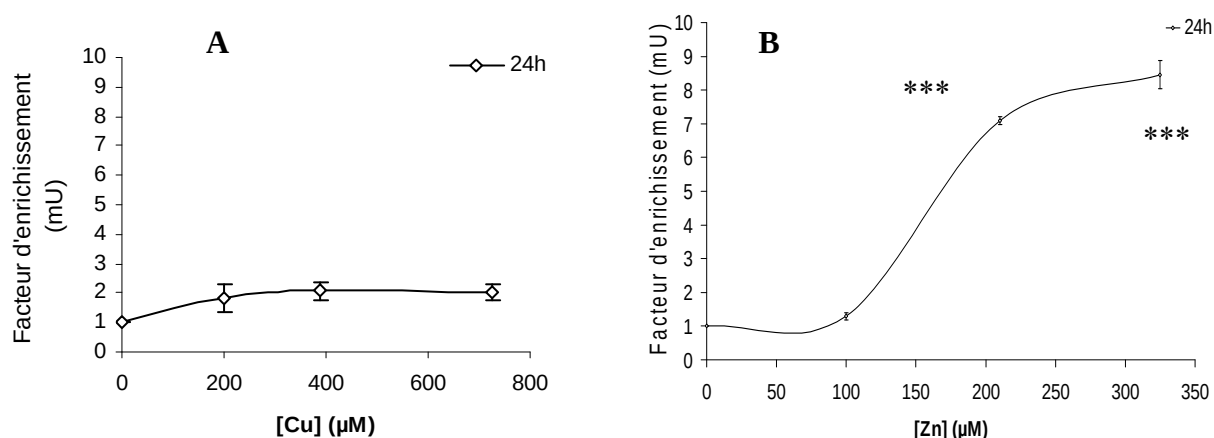


Figure 68 : Fragmentation apoptotique de l'ADN. Les cellules HaCaT sont respectivement incubées pendant 24h avec le cuivre (A) et le zinc (B) aux valeurs DI, DL_{25} et DL_{50} (tableaux 4 et 5 ; page 124). Le taux de mono et d'oligo nucléotides déversé dans le cytoplasme est exprimé sous forme de facteur d'enrichissement (AU ; *** : $p < 0,001$).

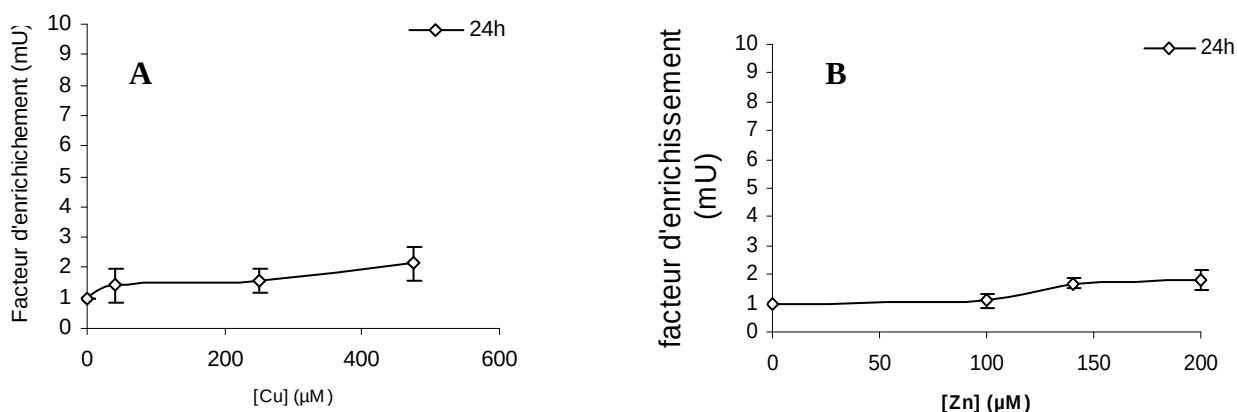


Figure 69 : Fragmentation apoptotique de l'ADN. Les cellules C6 sont respectivement incubées pendant 24h avec le cuivre (A) et le zinc (B) aux valeurs DI , DL_{25} et DL_{50} (tableaux 4 et 5 ; page 124). Le taux de mono et d'oligonucléotides déversé dans le cytoplasme est exprimé sous forme de facteur d'enrichissement (AU).

Les figures 68 et 69 montrent que seul le Zn induit une fragmentation apoptotique de l'ADN dans les cellules HaCaT. Le facteur d'enrichissement en mono- et oligonucléotides déchargés dans le cytoplasme atteint 9 AU (unité arbitraire d'apoptose) à la DL_{50} (325 μM de Zn). Ainsi, il n'y a pas d'apoptose pour toutes les autres conditions (figures 68 et 69). L'induction de l'apoptose par le Zn dans les cellules HaCaT est un résultat paradoxal que nous n'avons pas pu expliquer (figure 68B). Ainsi, il serait intéressant de poursuivre ce travail par une mesure de la prolifération cellulaire et des endonucléases spécifiques de l'apoptose.

2. Activation de la caspase-3

L'activation de la caspase-3 est l'aboutissement d'un processus en cascade et cette caspase induit alors de manière irréversible la mort cellulaire par apoptose. Comme avec le Cd, nous avons étudié cette molécule pour préciser les mécanismes d'action du Zn comme inducteur d'apoptose ainsi que l'action du Cu sur cette caspase.

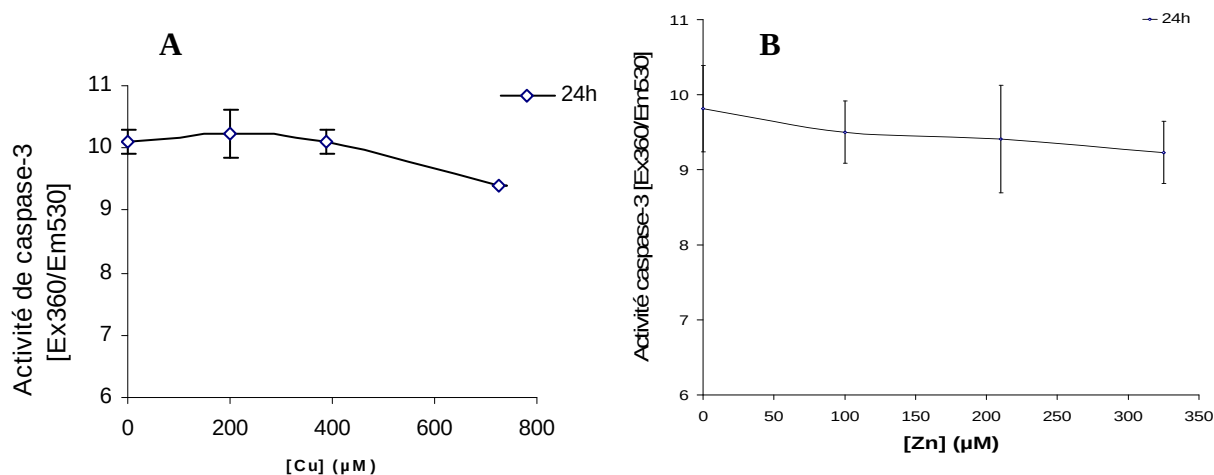


Figure 70 : Activité de la caspase-3. Les cellules HaCaT sont respectivement incubées pendant 24h avec le cuivre (A) et le zinc (B) aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). L'activité de caspase 3 est mesurée par le kit FIENA (Roche, France) et exprimé sous forme de rapport de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation (Ex : 360 nm) par rapport à la longueur d'onde d'émission (Em : 530 nm) : Ex_{360}/Em_{530}

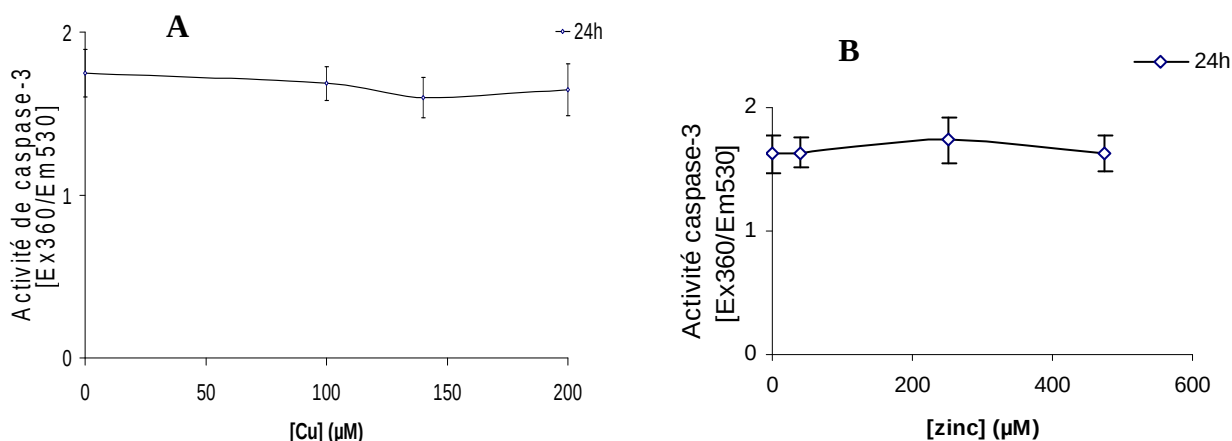


Figure 71 : Activité de la caspase-3. Les cellules C6 sont respectivement incubées pendant 24h avec le cuivre (A) et le zinc (B) aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀ (tableaux 4 et 5 ; page 124). L'activité de caspase 3 est mesurée par le kit FIENA (Roche, France) et exprimé sous forme de rapport de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation (Ex : 360 nm) par rapport à la longueur d'onde d'émission (Em : 530 nm) : Ex_{360}/Em_{530}

Après 24h d'incubation des cellules avec le Cu ou le Zn, l'activité de la caspase-3 ne présente aucune différence entre les témoins et les cellules traitées (figures 70 et 71). En effet, le niveau de fluorescence basal ne varie pas lorsque les cellules sont traitées. Nos résultats montrent que l'apoptose induite par le Zn ne passe pas par l'activation de la caspase-3 et cette apoptose ne dépend pas de p53 (figure 79A) sachant que les cellules HaCaT ont un p53 muté. Le mécanisme d'induction d'apoptose par le Zn dans les cellules HaCaT reste indéterminé.

*Discussion, conclusions
et perspectives*

Discussion

Nous nous sommes intéressés à l'action du cadmium, du cuivre et du zinc sur deux lignées cellulaires, la lignée HaCaT et la lignée C6. La lignée cellulaire HaCaT correspond à des cellules immortalisées dérivées de kératinocytes (Boukamp *et al.* 1995; Boukamp 1994; Fusenig and Boukamp 1998). La lignée cellulaire C6 est une lignée immortalisée provenant de cellules gliales de rat (Benda *et al.* 1968; Lightbody 1968).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de ces 3 métaux sur la croissance cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé la technique MTT. La technique du MTT est couramment utilisée pour effectuer des tests de prolifération cellulaire. Les résultats obtenus pour les deux lignées dans les conditions testées démontrent un effet toxique et permettent de déterminer une dose létale 50 (DL₅₀). Il est à noter que la technique MTT ne permet pas toujours de déterminer le nombre réel de cellules viables (Es-Saady *et al.* 1996). Ainsi, nos résultats indiquent que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) sont cytotoxiques à certaines doses. Ces effets cytotoxiques sont fonction du temps d'exposition et des doses administrées. Les courbes démontrent que ces métaux sont plus toxiques en 48h. Dans tous les cas, le Cd reste le métal le plus toxique.

Pour élucider les mécanismes de létalité cellulaire provoqués par les métaux dans les lignées HaCaT et C6 nous avons analysé, par le test des comètes, les dommages de l'ADN. Le test des comètes est fréquemment utilisé pour évaluer la capacité d'agents aussi bien physiques que chimiques à provoquer des dommages de l'ADN (Lazarova *et al.* 2006; Singh *et al.* 1988). L'avantage de cette technique par rapport aux autres techniques de détection des dommages de l'ADN c'est qu'elle montre les dommages dans des cellules individuelles. Grâce à cette technique sensible, simple et rapide, nous avons pu détecter des cassures induites par les trois métaux. Nous observons, pour les cellules HaCaT traitées au cuivre et au zinc, une accumulation progressive et significative des lésions de l'ADN tandis que la viabilité cellulaire décroît. Cependant, une résistance apparaît lorsque ces cellules sont incubées avec le cadmium à faibles doses. Ces résultats sont en accord avec l'étude de la viabilité cellulaire mais à l'opposé d'un certains nombres d'études de la littérature qui suggèrent une formation de lésions importantes sur l'ADN provoquée par le cadmium à faible dose et dans d'autres modèles cellulaires (Badisa *et al.* 2007). Nos résultats indiquent aussi que la lignée C6 est plus sensible (50% de mort à 20 µM Cd) que la lignée HaCaT (DL₅₀ = 100 µM Cd). Ces observations démontrent que le cadmium agit différemment sur les deux

lignées étudiées et que la génotoxicité du Cd dépend du type cellulaire. Le Cd semble favoriser la formation de la 8-OHdG car celle-ci augmente significativement après traitement des cellules HaCaT. Cette observation est en accord avec les données de la littérature (Blasiak *et al.* 2004; Filipic and Hei 2004; Fotakis and Timbrell 2006; Lazarova *et al.* 2006; Martelli *et al.* 2006; Potts *et al.* 2001; Wozniak and Blasiak 2003; Yang *et al.* 2000). Le test des comètes nous a également montré que le Cu et le Zn endommagent l'ADN. Le Cu semble plus génotoxique que le Zn.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les mécanismes de stress oxydant induits par le Cd, le Cu et le Zn. Contrairement au cuivre, le cadmium et le zinc ne sont pas deux métaux redox mais peuvent toutefois induire le stress oxydant par des mécanismes indirectes. Le facteur le plus important à noter est la modification de la balance entre les radicaux libres générés et les systèmes anti-oxydants cellulaires. De nombreux systèmes constitutifs et/ou inductibles sont utilisés pour défendre les cellules contre le stress oxydant. Parmi ces systèmes on rencontre non seulement les enzymes de stress comme les catalases (CAT), les glutathion peroxydases et réductases (GPx ; GRase), les superoxydes dismutases cytoplasmiques ou mitochondriales (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD), mais aussi des systèmes non enzymatiques comme le glutathion (GSH) et les métallothionéines (MTs) qui jouent un rôle clé dans la détoxification des radicaux libres (Hengstler *et al.* 2001; Im *et al.* 2006) et des métaux. Nos résultats montrent que le Cd, le Cu et le Zn sont capables d'altérer l'équilibre pro-oxydant/anti-oxydant en augmentant le taux de radicaux libres. Cette augmentation passe par l'altération des systèmes antioxydants. Les métaux agissent en changeant les taux de glutathion réduit (GSH) et glutathion oxydé (GSSG) et en provoquant la décroissance des activités des enzymes antioxydantes telles que la CAT, les SODs, la GPx. Yang *et al.* (2007) ont démontré une diminution du ratio GSH/GSSG dans les cellules C6 exposées au Cd. Ce qui suggère que le statut redox des C6 est fortement compromis par ce métal et qu'il y a génération d'un stress oxydant. En effet, le ratio GSH/GSSG est un indicateur dynamique du stress oxydant (Hultberg *et al.* 1999, 2001; Jones 2002), nos résultats avec le Cd vont également dans ce sens. Le Cu et le Zn sont également capables de baisser le rapport GSH/GSSG comme le montre nos résultats (*études A et B*).

Le Cd est connu pour induire la production des radicaux hydroxyles (O'Brien and Salacinski 1998), les anions surperoxydes et les peroxydes d'hydrogènes (Galan *et al.* 2001; Stohs *et al.* 2001; Waisberg *et al.* 2003). Le Cd peut également induire la peroxydation lipidique (El-Maraghy *et al.* 2001) et l'oxydation des protéines tout comme le cuivre

(Hamada *et al.* 2005) et le zinc. Nos résultats corroborent toutes ces observations et vont dans le sens d'une induction des ERO par ces métaux. Le Cd et le Zn n'étant pas des métaux « Fenton » comme le Cu, ils produisent des ERO par des mécanismes indirects. Le Cd agit sur les antioxydants (Waisberg *et al.* 2003) comme le glutathion en jouant sur l'homéostasie de la GPx ou de la GRase, les SODs, les catalases (del Carmen *et al.* 2002; El-Maraghy *et al.* 2001; Ochi *et al.* 1988; Tatrai *et al.* 2001), en inhibant la synthèse du GSH ou au contraire en induisant la synthèse de ce GSH selon le type cellulaire (Hatcher *et al.* 1995; Nzengue *et al.* 2008). L'impact du Cd sur toutes ces molécules antioxydantes entraîne une augmentation des ERO qui à leur tour induisent l'oxydation de l'ADN et des proto-oncogènes (Carmody and Cotter 2001; Sahin and Gumuslu 2007; Waisberg *et al.* 2003).

Il semble que les ions Zn^{2+} et Cd^{2+} peuvent interagir avec les groupements thiols de protéines avec une forte affinité, engendrer une altération de la structure de ces protéines et entraîner la formation des radicaux thiyles (Christie 1984; Figueiredo-Pereira *et al.* 1998; Vallee and Ulmer 1972) et alcoxyles capables d'induire des adduits de l'ADN. Le Cd, le Cu et le Zn contribuent ainsi à la rupture de l'homéostasie des groupements thiols protéiques dans les cellules HaCaT et C6. Ces observations suggèrent que les protéines sont oxydées dans nos modèles cellulaires.

A l'état basal, il n'y a pas de Cd dans la cellule. Cependant quand la concentration de Cd dans le milieu de culture augmente, on observe une augmentation du Cd, du Cu et du Zn intracellulaire. Par ailleurs, il est très probable que le Cd induit un déplacement de Cu et de Zn dans la cellule. Le Zn possède un rôle catalytique et structural dans de nombreuses enzymes. C'est un élément essentiel de la structure à doigt de zinc de certaines protéines (en particulier des facteurs de transcription), indispensable pour les interactions entre ces protéines et l'ADN ou d'autres protéines (Berg and Shi 1996; Mackay and Crossley 1998; Seve *et al.* 2002). Ainsi le déplacement de ce zinc induit par le Cd peut avoir des conséquences néfastes. Nos résultats ont également montré que le Cu et le Zn, déplacés par le Cd, favorisent une augmentation du GSSG, une diminution de GSH cellulaire et par conséquent une diminution du ratio GSH/GSSG. Ces deux métaux altèrent également les activités des principales enzymes antioxydantes (SODs, CAT, GPx et GRase) ; ce qui suggère un fort taux de radicaux libres intracellulaire entraînant une oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature (Alexandrova *et al.* 2007; Bishop *et al.* 2007; Frederickson *et al.* 1988; Hultberg *et al.* 2007; Kim *et al.* 2003; Koh *et al.* 1996; Li *et al.* 2002; Lloyd and Phillips 1999; Ryu *et al.* 2002; Suh *et al.* 2000) et indiquent que le Cu et le Zn induisent le stress oxydant dans les cellules HaCaT et C6.

Par ailleurs en tenant compte de l'impact des trois métaux sur toutes ces molécules antioxydantes (diminution du taux de GSH selon les cas, inhibition des activités enzymatiques), il apparaît que le peroxyde d'hydrogène est induit indirectement par les trois métaux. Ce H_2O_2 peut ensuite engendrer le radical hydroxyle en présence de Cu et ou de fer. Le radical hydroxyle ainsi produit peut s'attaquer aux sucres de l'ADN pour générer des cassures simples ou doubles brins. En effet, le radical $HO^\bullet$ peut arracher un atome d'hydrogène sur le résidu 2-désoxyribose en positions C3, C4 ou C5 et à un degré moindre sur le carbone 2 (Angeloff *et al.* 2001; Breen and Murphy 1995; Von Sonntag 1987). L'arrachement d'un atome d'hydrogène en position 1 du 2-désoxyribose par $HO^\bullet$ conduit à la formation de la 2-désoxyribonolactone (Cadet *et al.* 1997; Chatgililoglu 2000; Koreta 2000; Roupioz 2002). Ces différentes oxydations peuvent ensuite conduire aux cassures simples brins de l'ADN. $HO^\bullet$ peut également conduire à la formation de la 8-OHdG et initier l'oxydation des protéines et la peroxydation lipidique par l'arrachement d'un atome d'hydrogène aux esters d'acides gras insaturés isolés ou constituant les membranes plasmiques (Ercal *et al.* 2001; Tweeddale *et al.* 2007). Il s'ensuit une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane, une inactivation de récepteurs et d'enzymes membranaires. Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules (Bionnefont-Rousselot 1994; Emerit *et al.* 1986). La diminution de la viabilité cellulaire peut être à la fois liée aux dommages de l'ADN et à la peroxydation lipidique induite par le Cd, le Cu et le Zn comme le montrent nos résultats. En effet, une augmentation du taux de MDA a été observée dans les deux lignées cellulaires après incubation avec les trois métaux.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'influence du glutathion total (GSHt) et des métallothionéines (MTs), deux molécules du système antioxydant non enzymatique, sur la toxicité des trois métaux. Le Cd s'est révélé à la fois non cytotoxique et non génotoxique pour les cellules HaCaT aux concentrations inférieures ou égales à 50 μM alors qu'on a 50% de mort à 20 μM de Cd pour les cellules C6. Il apparaissait nécessaire de comprendre le rôle joué dans cette résistance par les molécules antioxydantes telles que le glutathion (Jorg *et al.* 2000) et les MTs d'autant plus que les résultats précédents ont montré que le Cd augmente le taux de glutathion dans ces cellules. Nous avons utilisé le BSO et la NAC qui modulent le taux de glutathion intracellulaire. Les résultats montrent une diminution de la viabilité cellulaire lorsque BSO, un inhibiteur de GSHt, est appliqué. Ainsi le GSHt participe à la résistance des cellules HaCaT et atténue la toxicité du Cd, du Cu et du Zn lorsque leurs concentrations augmentent. En présence du Cd, du Cu ou du Zn, le GSHt peut chélater ces métaux et atténuer

leurs effets (Gallego 1996; Kang and Enger 1987; Ochi *et al.* 1988). Le GSht se retrouve ainsi dans son état oxydé (GSSG). Les résultats du test des comètes réalisé en absence de GSht montrent une augmentation des dommages de l'ADN. Cela suppose d'une part que le GSht interagit directement avec le Cd ou avec les radicaux libres générés par ce métal et susceptibles de léser l'ADN ; et d'autre part que l'excès de Cd, réduit la synthèse de GSH ; rendant les cellules HaCaT sensibles et les cellules C6 encore plus sensibles avec des DL₅₀ plus basses. Le GSht est la première ligne de défense contre la toxicité métallique (Freedman *et al.* 1989; Singhal *et al.* 1987) et un protecteur de l'ADN.

D'autre part la N-acétylcysteine (NAC) a un effet toxique sur les HaCaT à 48h, contrairement à 24h, et on atteint la DL₅₀ avec des concentrations en NAC $\leq 1 \mu\text{M}$. Contrairement aux HaCaT, les cellules C6 sont moins sensibles à la toxicité de la NAC. Ainsi la viabilité cellulaire est importante et autour de 90%. Les résultats démontrent que la NAC utilisée en 24h permet de rétablir la viabilité cellulaire aux fortes concentrations en Cd ; ceci est en accord avec l'étude de Prozialeck et Lamar (1995) qui ont démontré que l'augmentation du GSht intracellulaire protège les cellules de la toxicité de certaines substances comme le Cd. Cet effet protecteur est dépendant de la dose en NAC, mais pas de la période de préincubation (Wispiyono *et al.* 1998). Ces observations confirment également l'étude réalisée avec le BSO et sont en accord avec les résultats de Yang *et al.* (2007).

Concernant les métallothionéines (MTs), leurs expressions jouent un rôle important contre le stress oxydant (Palmiter 1998; Tapia *et al.* 2004). Les études qualitatives (western blot) et quantitatives (gène rapporteur) ont apporté la preuve d'une induction de l'expression de ces MTs par le Cd, le Cu et le Zn. L'induction des MTs par ces métaux passe par une augmentation du taux intracellulaire de zinc libre ou labile et d'une activation du facteur de transcription des MTs (MTF-1). Nos résultats montrent une faible translocation de MTF-1 du cytoplasme vers le noyau. Cependant, cette faible translocation de MTF-1 est suffisante pour induire une forte expression des métallothionéines (Smirnova *et al.* 2000). La liaison de MTF-1 à l'ADN est connue pour être stimulée non seulement par le zinc mais aussi largement influencée par les conditions redox (Alscher *et al.* 2007; Koizumi *et al.* 2000; Krezel *et al.* 2007; Krezel and Maret 2007; Stankovic *et al.* 2007; Suntres and Lui 2006).

Beaucoup d'études ont analysé des mutants recombinant MTF-1 et ont suggéré que le motif doigt de zinc de MTF-1 est important pour sa liaison à l'ADN (Bittel *et al.* 1998; Chen *et al.* 1999; Dalton *et al.* 1997; Koizumi *et al.* 2000; Koizumi *et al.* 1992). Ces observations sont en accord avec nos résultats. En effet, l'analyse des extraits cytoplasmiques et nucléaires

a démontré que les MTF-1 sont cytoplasmiques et ne sont pas activés pour la liaison à l'ADN dans les cellules non traitées. Après incubation des cellules avec les métaux, MTF-1 est détecté dans l'extrait nucléaire ; ceci suggère une translocation nucléaire de MTF-1 pour lier l'ADN. C'est l'augmentation de Zn intracellulaire, suite à un stress métallique, qui induit le transfert de MTF-1 dans le noyau (Smirnova *et al.* 2000) ; cela suggère que le Zn est le régulateur direct de MTF-1 (Koizumi *et al.* 1999; Krezel *et al.* 2007; Krezel and Maret 2007) dans nos modèles cellulaires. La synthèse des MTs, via MTF-1 et le taux intracellulaire de Zn, est corrélée au stress métallique. Ainsi, la résistance des cellules HaCaT au Cd peut s'expliquer non seulement par les taux de GSH mais les MTs induites en parallèle sont également requises dans ce processus de résistance en accord avec les données de la littérature (Bae *et al.* 2001; Hatcher *et al.* 1995; Huot *et al.* 1991; Li *et al.* 1994; Susanto *et al.* 1998; Wu *et al.* 1996).

Nos résultats ont également montré une forte différence dans l'expression des MTs. Cette différence est probablement liée aux mécanismes de régulation. En effet, il existe un jeu complexe de régulation des MTs. Elle peut se faire par les mécanismes de synthèse mais aussi par les taux de GSH cellulaire ou par la protéine p53. Les études de Lichtlen et Schaffner (2001) puis de Lichtlen *et al.* (2001) ont en effet démontré que la perte de MTF-1 s'accompagne d'une forte augmentation du taux de GSH probablement pour compenser la faible expression des MTs et lutter contre le stress oxydant. De façon analogue, lorsque les cellules HaCaT et C6 sont traitées par le Cu et le Zn aux doses inférieures à la DL₅₀, une augmentation de synthèse des MTs corrélée à la diminution du taux de GSH est observée. Cependant, aux valeurs DL₅₀ en Cu et en Cd, on observe une diminution à la fois du taux des MTs et du taux de GSH dans les cellules C6. A l'inverse, le taux des MTs augmente à même temps que le taux de GSH dans les cellules HaCaT. Ce qui explique la forte résistance de ces cellules jusqu'à 50 µM de Cd. Ainsi la relation entre GSH et les MTs est fonction des doses utilisées et du type cellulaire. Les métaux et les radicaux libres générés sont susceptibles d'oxyder les MTs. Ces MTs oxydées vont être ensuite réduites par le GSH (Jacob *et al.* 2002; Kang 2006). Cependant, la diminution du taux de GSH induite par le Cd et le Cu dans les cellules C6 peut, en partie, expliquer l'absence de MTs aux valeurs DL₅₀. De plus, nos résultats montrent qu'à la DL₅₀, le Cd et le Cu n'induisent plus la formation du complexe MTF-1/ADN. Ces résultats suggèrent non seulement une diminution de la synthèse et de la régulation des MTs mais aussi une dégradation des MTs oxydées en accord avec les observations de Kang (2006) ; expliquant ainsi la forte sensibilité des cellules C6 au Cd.

L'expression des MTs peut également être régulée par la protéine p53. Certains auteurs ont démontré que l'expression des MTs est fortement augmentée quand p53 est mutée (Friedline *et al.* 1998; Hamada *et al.* 1997; Jin *et al.* 2000). C'est essentiellement le zinc qui établit la relation entre l'expression des MTs et la protéine p53. En effet, la forme apoMT (forme sans métaux) possède une affinité importante pour le zinc de la protéine p53. Ainsi, lorsque p53 est mutée, son zinc deviendrait totalement disponible à l'apoMT pour générer la forme MT dont la quantité augmente. Ostrakhovitch *et al.* (2006) ont, par exemple, montré une interaction entre l'apoMT et p53 muté. Ces observations confirment nos résultats obtenus avec les cellules HaCaT possédant un p53 muté. Dans ces cellules, une expression des MTs à l'état basal est observée. Il est également possible que la mutation de p53 se traduise par un gain de fonctions de certains facteurs qui vont par la suite promouvoir l'expression des promoteurs des MTs. C'est le cas de TFII dont l'activité transcriptionnelle sur le promoteur des MTs augmente fortement ou de la rétention de p27, un régulateur positif des MTs, en absence de p53 (Motti *et al.* 2004; Ostrakhovitch *et al.* 2007; Shin *et al.* 2005; Singh *et al.* 2002). Contrairement aux cellules HaCaT, les cellules C6 n'expriment pas les MTs constitutivement. Cependant, lorsque p53 est inhibé, 20 μ M de Cd induisent une forte expression des MTs. Par ailleurs, la réactivation de p53 n'a pas entraîné une diminution des taux de MTs dans les cellules HaCaT incubées ou non avec le Cd. Ceci suggère que le temps d'incubation des cellules avec l'activateur ou l'inhibiteur n'est peut pas suffisant pour diminuer ou augmenter l'expression des MTs. Ces différentes observations illustrent le fait que la relation entre p53 et les MTs n'est pas évidente contrairement à ce qui est affirmé dans la littérature et cette relation dépend du type cellulaire.

L'ensemble de tous ces résultats indique que les impacts du Cd, du Cu et du Zn sur nos modèles cellulaires sont le résultat de la balance entre l'inhibition des activités antioxydantes et l'induction de transcription des gènes de glutathion et des métallothionéines.

Dans un quatrième temps, nous avons analysé les protéines p53 et p21, protéines régulant l'apoptose. Il est établi que la protéine suppresseur de tumeur p53 inhibe la croissance cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Bargonetti and Manfredi 2002; Levine 1997). Dans les cellules, les métaux peuvent induire l'expression de la protéine p53. Quand p53 est activée, cette protéine entraîne la synthèse de la protéine p21, un inhibiteur du cycle cellulaire (el-Deiry *et al.* 1993; Kim 1997). La protéine p21 appartient à la famille Cip/Kip qui contrôle le point de transition G1/S dans le cycle cellulaire, en inhibant l'activité des complexes cycline D/CDK (Levine 1997). Nos résultats indiquent que les

cellules HaCaT prétraitées par un activateur de p53 puis par 100 μ M de Cd deviennent plus sensibles. A l'inverse, le prétraitement des cellules C6 par un inhibiteur de p53 se traduit par une augmentation de la viabilité cellulaire. Ceci suggère que la mutation de p53 participe à la résistance des HaCaT au Cd. L'induction de la mort apoptotique par p53 se fait à la fois *via* la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale. Yin *et al.* (2003) ont montré que pendant l'apoptose, p53 active la transcription de PAC1 en se liant à son site palindromique. La transcription de PAC1 est induite en réponse au stress oxydant et la conséquence est l'apoptose p53-dépendente. L'activation de PAC1 semble être la condition nécessaire et suffisante pour l'apoptose passant par la voie de p53. La protéine p21 activée par p53 peut également induire l'apoptose. Mais, son intervention exacte est aujourd'hui controversée. Le rôle de p21 varie en fonction du type cellulaire et des stimuli apoptotiques en amont. Certains auteurs lui attribuent des propriétés pro-apoptotiques (Kang *et al.* 1999; Lincet *et al.* 2000; Lu *et al.* 1998) alors que d'autres décrivent p21 comme un inhibiteur de l'apoptose. p21 provoque l'arrêt du cycle cellulaire, suivi d'une activation de la caspase-3 ; cette dernière clive p21 (Zhang *et al.* 1999) et déclenche l'apoptose.

Nous avons terminé ce travail par l'analyse des voies apoptotiques activées par le Cd, le Cu et le Zn dans chacune des deux lignées. Existe-t-il une voie propre à chaque lignée ou les métaux ont-ils un effet unique quelle que soit la lignée cellulaire? Une apoptose normale est nécessaire au fonctionnement physiologique. En effet, elle joue un rôle important dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans le système immunitaire, dans la réparation des tissus mais aussi dans la régression des tumeurs (Raff *et al.* 1993). Nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux voies apoptotiques dépendantes des caspases, protéases spécifiques de l'apoptose, caractérisées par la voie de transduction extrinsèque qui fait intervenir la caspase-8 et la voie de transduction intrinsèque qui fait intervenir la caspase-9 (Hengartner 2000) : ces deux voies convergent en aval, vers l'activation commune de la caspase exécutrice majeure spécifique de l'apoptose, la caspase-3 (Green and Kroemer 1998). Des interconnexions existent entre les deux voies d'apoptose (Kurz *et al.* 2007). Le rapport entre les deux types de mort dépend de la dose et du type cellulaire. L'effet pro-apoptotique du Cd passe par diverses voies de signalisation dépendant ou non des caspases (Coonse *et al.* 2007; Lemarie *et al.* 2004). Dans les deux lignées cellulaires, nous avons montré que les 3 métaux ne provoquent pas de variation de l'activité de la caspase-3 après 24h de traitement. Pour les cellules HaCaT, l'activité de la caspase-9 ne varie pas. En revanche, dans les cellules C6, le Cd provoque une augmentation de l'activité de

la caspase-9. Ces résultats suggèrent que la voie interne est impliquée dans l'apoptose induite par le Cd et la caspase-9 n'induit pas l'activation de la caspase-3 dans nos conditions de travail. Ainsi un autre mécanisme semble intervenir ; mécanisme qui entraîne une fragmentation apoptotique de l'ADN.

La première perturbation cellulaire détectable au cours du processus apoptotique est une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (Beyersmann and Haase 2001). Ce dernier s'accompagne du relargage de molécules confinées dans l'espace intermembranaire mitochondrial, comme APAF-1, la pro-caspase-9, mais aussi l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et le cytochrome c. Dans le cas des cellules C6, le cytochrome c peut se lier à APAF-1 dans le cytosol et permettre l'activation de la caspase-9 et la libération de l'AIF. L'AIF, une fois libérée, migre dans le noyau de la cellule en apoptose où elle induit une fragmentation de l'ADN (Susin *et al.* 1999a; Susin *et al.* 1999b). AIF agirait par liaison directe avec l'ADN (Ye *et al.* 2002). Il existe deux sortes de fragmentation apoptotique de l'ADN, celle de haute masse molaire et celle de petite masse molaire :

- Les fragments d'ADN de haute masse molaire sont de l'ordre de 50 Kpb à 300 Kpb (Oberhammer *et al.* 1993).
- Les fragments d'ADN de petites masses molaires sont obtenus par clivage internucléosomal et sont de l'ordre de 150 à 200 pb (Kaufmann *et al.* 2000; Wyllie 1980) ; et ce sont ces fragments qui sont mesurés dans le test que nous avons choisi.

L'analyse de la fragmentation de l'ADN montre que seul le zinc induit une apoptose dans les cellules HaCaT par un mécanisme à déterminer et qui ne passe pas par p53. Par contre, dans les cellules C6, seul le Cd entraîne une apoptose. La mortalité non seulement des cellules HaCaT, observée après incubation avec le Cd et le Cu, mais aussi des cellules C6 après incubation avec le Cu et le Zn, viendrait d'un autre mécanisme tel que la nécrose.

Concernant les cellules C6, les résultats ne sont pas suffisants pour dire, de façon formelle, que c'est uniquement la voie mitochondriale qui est impliquée dans l'apoptose induite par le Cd. En effet, le mécanisme peut passer par la caspase-12. Le RE séquestre la caspase-12 qui est localisée spécifiquement sur la face cytosolique du RE (Nakagawa and Yuan 2000; Nakagawa 2002b). Cette caspase n'intervient pas dans les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques (Oyadomari *et al.* 2002), mais elle est activée lorsque les cellules sont traitées avec des agents capables d'induire un stress du RE comme la tunicamycine

(Welihinda *et al.* 1999) ou le Cd qui par ailleurs est connu pour altérer l'homéostasie des métaux essentiels comme le calcium (Kusakabe *et al.* 2007). Une augmentation de calcium cytosolique activerait la caspase-12 (Yoneda *et al.* 2001). Cette dernière pourrait activer la caspase-9 sans passer par la mitochondrie (Morishima *et al.* 2002) ni par l'activation de la caspase-3.

Conclusions

Nous souhaitons développer le travail de thèse en essayant de progresser dans la compréhension des mécanismes délétères liés au stress oxydant induit par 3 métaux (cadmium, cuivre et zinc) et de ceux permettant la préservation des cellules vis-à-vis de cette toxicité. Pour cela, nous avons consacré une place particulière à l'étude du statut redox et antioxydant dans un modèle cellulaire HaCaT (kératinocytes mutés pour p53). Ce modèle de cellules de la peau n'est généralement étudié que pour sa sensibilité aux UV mais la peau peut pourtant être en contact direct avec des polluants environnementaux comme le cadmium. Les résultats apportés par cette étude sont comparés à ceux obtenus sur les cellules C6 possédant une protéine p53 normale.

L'étude de la balance antioxydante que nous avons choisi d'évaluer, afin de déterminer de façon la plus complète possible l'implication réelle d'un stress oxydant induit par les métaux, a été très importante. En effet, elle a comporté non seulement l'étude des systèmes enzymatiques mais aussi de l'induction de la synthèse de molécules comme le glutathion et les métallothionéines qui sont les « gardiens » du statut redox de la cellule. Certains de ces paramètres comme le glutathion (GSH) ont été modulés par la NAC ou le BSO de façon à déterminer leurs rôles. Le GSH et les métallothionéines (MTs) ont montré un effet antioxydant dans les cellules jusqu'à un certain seuil. Les métaux utilisés présentent un effet globalement pro-oxydant. En effet, tous nos résultats montrent que le cadmium, le cuivre et le zinc affectent le statut redox des cellules comme révélé par une augmentation de glutathion oxydé (GSSG), du taux de MDA, des lésions de l'ADN et une diminution non seulement du taux des thiols protéiques (SH), mais aussi des activités GPx, CAT, GRase et certaines SODs. Il apparaît que les effets délétères de ces 3 métaux sont les résultats de la balance entre l'inhibition des activités antioxydantes et l'induction de synthèse des MTs. La synthèse des MTs induite par les métaux résulte d'un jeu complexe de régulation impliquant la protéine p53 selon le type cellulaire, mais aussi des facteurs de transcription comme MTF-1, et les taux intracellulaires de GSH et de zinc, etc. Ainsi la sensibilité des cellules C6 aux

métaux peut s'expliquer par la diminution à la fois du taux de GSH et de MTs.

Perspectives

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance des cellules vis-à-vis du Cd et des voies sensibles à ce toxique, permettrait une anticipation des effets délétères lors d'une intoxication, ainsi que la mise en place de systèmes curatifs. Il a été possible, pendant cette thèse, d'apporter des éléments intéressants dans la compréhension des mécanismes de résistance des cellules HaCaT. Il est apparu que cette résistance est liée non seulement à l'augmentation du taux intracellulaire de GSH et des MTs mais aussi à la forte quantité de MTs présente à l'état basal dans ces cellules. En parallèle, nos résultats ont montré une forte diminution de GSH et des MTs à certaines doses de métaux dans les cellules C6. Cette baisse s'est accompagnée d'une forte sensibilité de ces cellules aux métaux. Cependant, l'augmentation du taux de GSH dans les cellules HaCaT fait appel à un mécanisme qu'il faut déterminer. En effet, nous avons constaté une diminution des activités de la glutathion réductase ; enzyme nécessaire au maintien du taux de GSH réduit. Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes impliqués dans cette synthèse de GSH induite par le Cd. On pourrait par exemple réaliser des PCR de la γ -glutamate-cystéine synthase après incubation des cellules avec le Cd.

Par ailleurs, la grande différence d'expression des MTs observée dans les deux types cellulaires peut s'expliquer par les systèmes de régulation. Certaines données de la littérature suggèrent que la mutation de p53 provoquerait une forte expression de ces MTs. Cependant cette relation n'est pas évidente et surtout elle dépend du type cellulaire. En effet, la restauration de p53 dans ces cellules HaCaT n'a pas induit une diminution de synthèse des MTs. Par contre l'inhibition de p53 a entraînée une augmentation du taux des MTs et une meilleure résistance des cellules C6 au Cd. La perspective serait donc non seulement de mieux comprendre les échanges entre les protéines soufrées et le zinc mais aussi de déterminer les autres facteurs pouvant être activés après mutation de p53 et susceptibles d'induire l'expression des MTs. La régulation de l'expression des MTs peut également faire appel aux taux de GSH intracellulaire. Les travaux de Kang (2006), sur d'autres types cellulaires, ont suggéré que les MTs oxydées par le stress oxydant pouvaient reprendre un état réduit grâce à un niveau élevé de GSH. Ainsi la diminution du taux de GSH observée dans les cellules C6 pourrait expliquer la baisse du taux de MTs. Des études ultérieures pourraient donc s'orienter vers cette régulation de l'expression des MTs en mettant l'accent non

seulement sur le rôle du glutathion mais aussi en estimant la protection de l'ADN par le GSH et les MTs dans des conditions de stress oxydant *in vivo*.

Par ailleurs, notre travail montre que la synthèse des MTs peut être induite par le Cd, le Cu et le Zn, par un mécanisme impliquant le zinc. Il serait par exemple intéressant d'étudier de façon plus approfondie le rôle du zinc qui, à certaines concentrations, intervient dans la réparation de l'ADN, dans l'expression des MTs et dans la lutte contre le stress oxydant.

Nos résultats attirent l'attention sur les dommages de l'ADN induits par le cadmium, le cuivre et le zinc. Ces lésions peuvent, si elles ne sont pas réparées, progresser vers des pathologies. Il serait donc utile d'évaluer non seulement le type de dommages produits par les trois métaux mais aussi l'impact de ces métaux, en particulier le Cd, sur les systèmes de réparation de l'ADN. De même l'étude du type de mort cellulaire engendrée par le Cd, le Cu et le Zn devrait être approfondie. En effet, nous avons par exemple observé une mort non apoptotique des cellules HaCaT en présence de Cd. L'étude des mécanismes impliqués dans cette mort pourrait apporter des informations intéressantes et pouvant aboutir à une synthèse de molécules permettant une action ciblée pour déclencher la mort cellulaire et court-circuiter les effets délétères de ce métal.

En fin, nos travaux ont apportés des résultats intéressants sur deux lignées cellulaires d'origine différente. Ces résultats peuvent être confirmés en utilisant un seul modèle cellulaire dans lequel l'expression des MTs, de p53 et des enzymes antioxydantes sera modulée. Les MTs, p53 et les enzymes antioxydantes peuvent être surexprimées par des vecteurs ou sous-exprimées par des siRNA.

Bibliographie

A

- Abel, J., and de Ruiter, N. (1989). Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicology letters* **47**, 191-6.
- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-68.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology* **105**, 121-6.
- Agarwal, K., Sharma, A., and Talukder, G. (1989). Effects of copper on mammalian cell components. *Chemico-biological interactions* **69**, 1-16.
- Agnantis, N. J., and Goussia, A. C. (1999). [Apoptosis and cancer]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* **183**, 277-86; discussion 286-7.
- Akerboom, T. P., and Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology* **77**, 373-82.
- Al-Mutairi, D. A., Craik, J. D., Batinic-Haberle, I., and Benov, L. T. (2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research* **41**, 89-96.
- Al-Nasser, I. A. (2000). Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *Journal of toxicology* **38**, 407-13.
- Alexandrova, A., Kebis, A., Misl'anova, C., and Kukan, M. (2007). Copper impairs biliary epithelial cells and induces protein oxidation and oxidative DNA damage in the isolated perfused rat liver. *Exp Toxicol Pathol* **58**, 255-61.
- Alscher, D. M., Biegger, D., Kuhlmann, U., and Fritz, P. (2007). Induction of metallothionein in mesothelial cells by zinc. *Artificial organs* **31**, 488-91.
- Amara, S. (2007). Effets d'une exposition sub-chronique au champ magnétique statistique sur le métabolisme du zinc et la toxicité du cadmium chez le rat: Rôle du stress oxydant. Thèse effectuée au laboratoire de physiologie intégrée. Université du 7 novembre à carthage
- Amarande-Mendes, G. G., DR (1999). The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1053-1061.
- Amiard, J. C., RP. (1997). Les métallothionéines. in Biomarqueurs en écotoxicologie. (L. Lagadic, T. Caquet, J-C. Amiard et F. Ramade, Eds.), Masson, Paris, pp. 53-66.
- Andrews, G. K. (1990). Regulation of metallothionein gene expression. *Progress in food & nutrition science* **14**, 193-258.
- Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical pharmacology* **59**, 95-104.
- Angeloff, A., Dubey, I., Pratviel, G., Bernadou, J., and Meunier, B. (2001). Characterization of a 5'-aldehyde terminus resulting from the oxidative attack at C5' of a 2-deoxyribose on DNA. *Chemical research in toxicology* **14**, 1413-20.
- Aramini, J. M., Hiraoki, T., Ke, Y., Nitta, K., and Vogel, H. J. (1995). Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. *Journal of biochemistry* **117**, 623-8.
- Arrigo, A. P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free radical biology & medicine* **27**, 936-44.
- Asmuss, M., Mullenders, L. H., Eker, A., and Hartwig, A. (2000). Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* **21**, 2097-104.
- Aust, S. D., Morehouse, L. A., and Thomas, C. E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of free radicals in biology & medicine* **1**, 3-25.

Averbeck, D. (2001). Mécanismes de réparation de l'ADN. In *Eurotext, J.L. (ed), Rayonnement ultraviolet et peau. Aubin, F.*

B

- Badisa, V. L., Latinwo, L. M., Odewumi, C. O., Ikediobi, C. O., Badisa, R. B., Ayuk-Takem, L. T., Nwoga, J., and West, J. (2007). Mechanism of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. *Environmental toxicology* **22**, 144-51.
- Bae, D. S., Gennings, C., Carter, W. H., Jr., Yang, R. S., and Campain, J. A. (2001). Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicology Science* **63**, 132-42.
- Bains, J. S., and Shaw, C. A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain research* **25**, 335-58.
- Baker, M. A., Cerniglia, G. J., and Zaman, A. (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical biochemistry* **190**, 360-5.
- 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. *Toxicology and applied pharmacology* **204**, 238-55.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1992). Basic peptides enhance protein/DNA interaction in vitro. *Nucleic acids research* **20**, 3523.
- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., and Poujeol, P. (2005). Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron* **99**, p105-10.
- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P., and Cougnon, M. (2004). Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *American journal of physiology* **287**, F1067-75.
- Bargonetti, J., and Manfredi, J. J. (2002). Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current opinion in oncology* **14**, 86-91.
- Barhoumi, R., Bowen, J. A., Stein, L. S., Echols, J., and Burghardt, R. C. (1993). Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication. *Cytometry* **14**, 747-56.
- Barinaga, M. (1998). Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science (New York, N.Y)* **281**, 1303-4.
- Basu, A. K., and Marnett, L. J. (1983). Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* **4**, 331-3.
- Basu, A. K., and Marnett, L. J. (1984). Molecular requirements for the mutagenicity of malondialdehyde and related acroleins. *Cancer research* **44**, 2848-54.
- Batty, D. P., and Wood, R. D. (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* **241**, 193-204.
- Bean, L. J., and Stark, G. R. (2001). Phosphorylation of serines 15 and 37 is necessary for efficient accumulation of p53 following irradiation with UV. *Oncogene* **20**, 1076-84.
- 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. *Toxicology letters* **157**, 69-78.
- Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R. M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society transactions* **31**, 1441-4.

- Beletsky, I. M., J. Nikonova, L.V. Skalka, M. Umansky, S.R. (1989). On the role of Ca, Mg-dependent nuclease in the postirradiation degradation of chromatin in lymphoid tissues. *Gen. Physiol. Biophys.* **8**, 381-398.
- Benamira, M., Johnson, K., Chaudhary, A., Bruner, K., Tibbetts, C., and Marnett, L. J. (1995). Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* **16**, 93-9.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., and Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science (New York, N.Y)* **161**, 370-1.
- Berg, J. M., and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science (New York, N.Y)* **271**, 1081-5.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews* **1**, 11-21.
- Bertin, G., and Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**, 1549-59.
- Beyersmann, D., and Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* **14**, 331-41.
- Beyersmann, D., and Hechtenberg, S. (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and applied pharmacology* **144**, 247-61.
- Bielski, B. C., DE. (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution; in: *Active Oxygen in Chemistry: Foote, C.S., Valentine, J.S, Greenberg, A. and Liebman, J.F. Eds.*, pp. 66-104.
- Bishop, G. M., Dringen, R., and Robinson, S. R. (2007). Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free radical biology & medicine* **42**, 1222-30.
- Biswas, S., Chida, A. S., and Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochemical pharmacology* **71**, 551-64.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S. L., Gedamu, L., and Andrews, G. K. (1998). The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7127-33.
- Bittel, D. C., Smirnova, I. V., and Andrews, G. K. (2000). Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloreulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry* **275**, 37194-201.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., and Gluud, C. (2004a). Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, CD004183.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., and Gluud, C. (2004b). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **364**, 1219-28.
- Blair, I. A. (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Experimental gerontology* **36**, 1473-81.
- Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Rykala, J., Kolacinska, A., Morawiec, Z., Drzewoski, J., and Zadrozny, M. (2004). Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutation research* **554**, 139-48.
- Blumberg, J., and Block, G. (1994). The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study in Finland. *Nutrition reviews* **52**, 242-5.

- Bohr, V. A., Stevnsner, T., and de Souza-Pinto, N. C. (2002). Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* **286**, 127-34.
- Bonnefont-Rousselot, D. (1994). Irradiation des membranes cellulaires. *J. Chim. Phys* **91**, 968-983.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology* **39**, 615-47.
- Boukamp, P., Peter, W., Pascheberg, U., Altmeier, S., Fasching, C., Stanbridge, E. J., and Fusenig, N. E. (1995). Step-wise progression in human skin carcinogenesis in vitro involves mutational inactivation of p53, rasH oncogene activation and additional chromosome loss. *Oncogene* **11**, 961-9.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-71.
- Boukamp, P. B., D. Hülsen, A. Tomakidi, P. Fusenig, NE. (1994). In vitro transformation and tumor progression: A multistep model for skin carcinogenesis. In: Leigh I, Lane B, Watt F (eds), *The keratinocyte Handbook*. Cambridge University Press, New York, 485-499.
- Boulaire, J., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2000). The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathologie-biologie* **48**, 190-202.
- Bourdineaud, J. P., Baudrimont, M., Gonzalez, P., and Moreau, J. L. (2006). Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie* **88**, 1787-92.
- Boyce, R. P., and Howard-Flanders, P. (1964). Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in E. Coli K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**, 293-300.
- Boyd, N. F., and McGuire, V. (1991). The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free radical biology & medicine* **10**, 185-90.
- Bravard, A., Vacher, M., Gouget, B., Coutant, A., de Boisferon, F. H., Marsin, S., Chevillard, S., and Radicella, J. P. (2006). Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. *Molecular and cellular biology* **26**, 7430-6.
- Breen, A. P., and Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine* **18**, 1033-77.
- Bremner, I. (1998). Manifestations of copper excess. *The American journal of clinical nutrition* **67**, 1069S-1073S.
- Brugidou, J., Legrand, C., Mery, J., and Rabie, A. (1995). The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochemical and biophysical research communications* **214**, 685-93.
- Buchko, G. W., Hess, N. J., and Kennedy, M. A. (2000). Cadmium mutagenicity and human nucleotide excision repair protein XPA: CD, EXAFS and (1)H/(15)N-NMR spectroscopic studies on the zinc(II)- and cadmium(II)-associated minimal DNA-binding domain (M98-F219). *Carcinogenesis* **21**, 1051-7.
- Bulaj, G., Kortemme, T., and Goldenberg, D. P. (1998). Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* **37**, 8965-72.
- Bump, E. A., and Brown, J. M. (1990). Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmacology & therapeutics* **47**, 117-36.

C

- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **131**, 1-87.
- Cadet, J., Douki, T., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., and Sauvaigo, S. (2001). Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Current problems in dermatology* **29**, 62-73.
- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P., and Kroemer, G. (2002a). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of cell science* **115**, 4727-34.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002b). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-22.
- Cano-Gauci, D. F., and Sarkar, B. (1996). Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS letters* **386**, 1-4.
- Cao, F., Zhou, T., Simpson, D., Zhou, Y., Boyer, J., Chen, B., Jin, T., Cordeiro-Stone, M., and Kaufmann, W. (2007). p53-Dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. *Toxicology and applied pharmacology* **218**, 174-85.
- Carlberg, I., and Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in enzymology* **113**, 484-90.
- Carmody, R. J., and Cotter, T. G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* **6**, 77-90.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**, 527-605.
- Chandel, N. S., and Budinger, G. R. (2007). The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free radical biology & medicine* **42**, 165-74.
- Chang, W., and Shoback, D. (2004). Extracellular Ca²⁺-sensing receptors--an overview. *Cell calcium* **35**, 183-96.
- Chatgililoglu, C. F., C. Bazzanini, R. Guerra, M. Choi, SY. Emanuel, CJ. Horner, JH. Newcomb M (2000). Models of DNA C1' radicals. Structural, spectral, and chemical properties of the thymineylmethyl radical and the 2'deoxyuridin-1'-yl radical. *J Am Chem Soc* **122**, 9525-9533.
- Chen, C. J., and Liao, S. L. (2003). Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation. *Journal of neurochemistry* **85**, 443-53.
- Chen, S. H., Pan, S., Okita, K., and Takemoto, T. (1994). Role of oxygen-derived free radicals in the mechanism of cysteamine-induced duodenal ulcer in rats. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* **93**, 11-4.
- Chen, X., Chu, M., and Giedroc, D. P. (1999). MRE-Binding transcription factor-1: weak zinc-binding finger domains 5 and 6 modulate the structure, affinity, and specificity of the metal-response element complex. *Biochemistry* **38**, 12915-25.
- Chenais, B., Andriollo, M., Guiraud, P., Belhoussine, R., and Jeannesson, P. (2000). Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free radical biology & medicine* **28**, 18-27.
- Cherian, M. G., and Apostolova, M. D. (2000). Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **46**, 347-56.
- Cherian, M. G., Huang, P. C., Klaassen, C. D., Liu, Y. P., Longfellow, D. G., and Waalkes, M. P. (1993). National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein

- in carcinogenesis. *Cancer research* **53**, 922-5.
- Cherian, M. G., Jayasurya, A., and Bay, B. H. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation research* **533**, 201-9.
- Chesters, J. P., L. Vint, H. (1989). Specificity and timing of the Zn²⁺ requirement for DNA Synthesis by 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* **184**, 499-508.
- Chia, S. O., CN. Chua, LH. HO, LM. Tay, SK. (2000). Comparison of zinc concentration in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J. Androl.* **21**, 53-7.
- Chimienti, F. (2002). Régulation du zinc cellulaire: conséquences sur la mort programmée. Thèse effectuée au laboratoire de biologie du stress oxydant (LBSO)-LRC7 n°8M CEA Grenoble.
- Chimienti, F., Seve, M., Richard, S., Mathieu, J., and Favier, A. (2001). Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical pharmacology* **62**, 51-62.
- Chimienti, F., Sève, M., Richard, S. Mathieu, J. Favier, A. (2001). Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relation-ship between zinc depletion, activation of caspases and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 51-62.
- Christie, N. T. C., M. (1984). *Biol Trace Elm Res* **6**, 139-158.
- Chvapil, M. S., L. Zukoski, C. (1977). Inhibition of some functions of polymorphonuclear leukocytes by in vitro zinc. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 135-146.
- Cleaver, J. E. (1968). Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**, 652-6.
- Cleaver, J. E., Karplus, K., Kashani-Sabet, M., and Limoli, C. L. (2001). Nucleotide excision repair "a legacy of creativity". *Mutation research* **485**, 23-36.
- Cohen, J. J., and Duke, R. C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* **132**, 38-42.
- Collins, A. R. (2000). Alcohol and DNA damage. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **136**, 258-9.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogen.* **14**, 1733-1735.
- Comporti, M. (1985). Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **53**, 599-623.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* **17**, 1195-214.
- Coonse, K. G., Coonts, A. J., Morrison, E. V., and Heggland, S. J. (2007). Cadmium induces apoptosis in the human osteoblast-like cell line Saos-2. *Journal of toxicology and environmental health* **70**, 575-81.
- Cotton, F. W., G. (1972). Zinc, cadmium and mercury. *Advanced inorganic chemistry. 3e édition. Interscience Publishers.*, 503.
- Cousins, R. C., DE. (1987). Regulation of liver zinc metabolism and metallothionein by CAMP, glucagon and glucocorticoids and suppression of free radicals by zinc. *Experimentia.* **52**, 545-553.
- Cousins, R. J., Liuzzi, J. P., and Lichten, L. A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of biological chemistry* **281**, 24085-9.
- Coyle, P., Zalewski, P. D., Philcox, J. C., Forbes, I. J., Ward, A. D., Lincoln, S. F., Mahadevan, I., and Rofo, A. M. (1994). Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *The Biochemical journal* **303 (Pt 3)**, 781-6.
- Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., and Chang, L. Y. (1992). Copper,zinc

superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10405-9.

- Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **272**, 25409-12.
- Culotta, V. C., and Hamer, D. H. (1989). Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Molecular and cellular biology* **9**, 1376-80.
- Curtin, J. F., Donovan, M., and Cotter, T. G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods* **265**, 49-72.

D

- d'Errico, F. (2006). Status of radiation detection with superheated emulsions. *Radiation protection dosimetry* **120**, 475-9.
- Dabrio, M., Rodriguez, A. R., Bordin, G., Bebianno, M. J., De Ley, M., Sestakova, I., Vasak, M., and Nordberg, M. (2002). Recent developments in quantification methods for metallothionein. *Journal of inorganic biochemistry* **88**, 123-34.
- Dainiak, N., and Tan, B. J. (1995). Utility of biological membranes as indicators for radiation exposure: alterations in membrane structure and function over time. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **13 Suppl 1**, 142-52.
- Dalton, T. P., Bittel, D., and Andrews, G. K. (1997). Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain. *Molecular and cellular biology* **17**, 2781-9.
- Dalton, T. P., He, L., Wang, B., Miller, M. L., Jin, L., Stringer, K. F., Chang, X., Baxter, C. S., and Nebert, D. W. (2005). Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3401-6.
- Daniels, P. J., Bittel, D., Smirnova, I. V., Winge, D. R., and Andrews, G. K. (2002). Mammalian metal response element-binding transcription factor-1 functions as a zinc sensor in yeast, but not as a sensor of cadmium or oxidative stress. *Nucleic acids research* **30**, 3130-40.
- Das, K., Debacker, V., and Bouquegneau, J. M. (2000). Metallothioneins in marine mammals. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **46**, 283-94.
- Davies, M. J., Fu, S., and Dean, R. T. (1995). Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *The Biochemical journal* **305 (Pt 2)**, 643-9.
- Davies, M. J., and Slater, T. F. (1987). Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy. *The Biochemical journal* **245**, 167-73.
- Davis, W., Jr., Ronai, Z., and Tew, K. D. (2001). Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **296**, 1-6.
- del Carmen, E. M., Souza, V., Bucio, L., Hernandez, E., Damian-Matsumura, P., Zaga, V., and Gutierrez-Ruiz, M. C. (2002). Cadmium induces alpha(1)collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* **170**, 63-73.
- DeMott, M. S., Beyret, E., Wong, D., Bales, B. C., Hwang, J. T., Greenberg, M. M., and Demple, B. (2002). Covalent trapping of human DNA polymerase beta by the oxidative DNA lesion 2-deoxyribonolactone. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7637-40.
- Descamps, O. (2004). Stress oxydant et vieillissement: aspects mitochondriaux et stratégies

- nutritionnelles anti-cancer et anti-vieillessement chez la souris OHI. Thèse effectuée au laboratoire NVMC
- Desideri, A., and Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society transactions* **31**, 1322-5.
- Di Monte, D. A., Chan, P., and Sandy, M. S. (1992). Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Annals of neurology* **32 Suppl**, S111-5.
- Dickinson, D. A., and Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology* **64**, 1019-26.
- DiDonato, M., and Sarkar, B. (1997). Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1360**, 3-16.
- Dijkstra, M., Havinga, R., Vonk, R. J., and Kuipers, F. (1996). Bile secretion of cadmium, silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems. *Life sciences* **59**, 1237-46.
- Dip, R., Camenisch, U., and Naegeli, H. (2004). Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA repair* **3**, 1409-23.
- Djavaheri-Mergny, M., Maziere, J. C., Santus, R., Mora, L., Maziere, C., Auclair, M., and Dubertret, L. (1993). Exposure to long wavelength ultraviolet radiation decreases processing of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts. *Photochemistry and photobiology* **57**, 302-5.
- Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A., and Cadet, J. (2004). Predominance of the 1,N2-propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free radical biology & medicine* **37**, 62-70.
- Dufresne, J., and Cyr, D. G. (1999). Effects of short-term methylmercury exposure on metallothionein mRNA levels in the testis and epididymis of the rat. *Journal of andrology* **20**, 769-78.
- Duncan, K. E., Ngu, T. T., Chan, J., Salgado, M. T., Merrifield, M. E., and Stillman, M. J. (2006). Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)* **231**, 1488-99.
- Dusinska, M.C., 1996. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern. Lab. Anim.* **24**, 405-411.
- Dusinska, M., Dzapinkova, Z., Wsolova, L., Harrington, V., and Collins, A. R. (2006). Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. *Mutagenesis* **21**, 205-11.

E

- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* **68**, 383-424.
- Eckardt-Schupp, F., and Klaus, C. (1999). Radiation inducible DNA repair processes in eukaryotes. *Biochimie* **81**, 161-71.
- Ejnik, J., Robinson, J., Zhu, J., Forsterling, H., Shaw, C. F., and Petering, D. H. (2002). Folding pathway of apo-metallothionein induced by Zn²⁺, Cd²⁺ and Co²⁺. *Journal of inorganic biochemistry* **88**, 144-52.
- Ejnik, J. W., Munoz, A., DeRose, E., Shaw, C. F., 3rd, and Petering, D. H. (2003). Structural consequences of metallothionein dimerization: solution structure of the isolated Cd₄-alpha-domain and comparison with the holoprotein dimer. *Biochemistry* **42**, 8403-10.

- Ekert, P. G., and Vaux, D. L. (1997). Apoptosis and the immune system. *British medical bulletin* **53**, 591-603.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25.
- El-Maraghy, S. A., Gad, M. Z., Fahim, A. T., and Hamdy, M. A. (2001). Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **15**, 207-14.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* **82**, 70-7.
- Emerit, J., Fechner, J., Galli, A., Clavel, J. P., and Congy, F. (1986). [Free radicals derived from oxygen and lipid peroxidation. Role in cellular biology and physiopathology]. *Presse Med* **15**, 751-4.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry* **1**, 529-39.
- Es-Saady, D., Simon, A., Jayat-Vignoles, C., Chulia, A. J., and Delage, C. (1996). MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer research* **16**, 481-6.
- Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., and Rabl, H. (1991a). Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Annals of medicine* **23**, 573-81.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991b). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* **11**, 81-128.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y)* **281**, 1317-22.

F

- Falletti, O. (2007). Les adduits des produits de la peroxydation lipidique sur les bases de l'ADN comme biomarqueurs du stress oxydant. Thèse effectuée au laboratoire des lésions des Acides Nucléiques (LAN). CEA de Grenoble.
- Falletti, O., Cadet, J., Favier, A., and Douki, T. (2007). Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells. *Free radical biology & medicine* **42**, 1258-69.
- Fan, L. Z., and Cherian, M. G. (2002). Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *British journal of cancer* **87**, 1019-26.
- Fassett, D. W. (1975). Cadmium: biological effects and occurrence in the environment. *Annual review of pharmacology* **15**, 425-35.
- Fauriskov, B., and Bjerregaard, H. F. (2002). Evidence for cadmium mobilization of intracellular calcium through a divalent cation receptor in renal distal epithelial A6 cells. *Pflugers Arch* **445**, 40-50.
- Favier, A. (1992). Hormonal effects of zinc on growth in children. *Biol. Trace Elem. Res.* **32**, 383-398.
- Favier, A. (1995). Zinc-ligand interactions and oxygen free radicals formation in Handbook on metal-ligand interactions in biological fluids. In: Berthon G ed. *Bioinorganic chemistry*. New York: Marcel Dekker., 876-887.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'actualité Chimique*, 108-115.

- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67.
- Feng, W., Benz, F. W., Cai, J., Pierce, W. M., and Kang, Y. J. (2006). Metallothionein disulfides are present in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart and increase under conditions of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **281**, 681-7.
- Feng, Z., Hu, W., Amin, S., and Tang, M. S. (2003). Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry* **42**, 7848-54.
- Ferenci, P. (1999). Wilson's disease. *Italian journal of gastroenterology and hepatology* **31**, 416-25.
- Figueiredo-Pereira, M. E., Yakushin, S., and Cohen, G. (1998). Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* **273**, 12703-9.
- Filipic, M., Fatur, T., and Vudrag, M. (2006). Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & experimental toxicology* **25**, 67-77.
- Filipic, M., and Hei, T. K. (2004). Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation research* **546**, 81-91.
- Fisher, D. E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* **78**, 539-42.
- Fleischer, M. C. (1974). Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances. *Environ. Health Perspect.* **7**, 253-323.
- Flohe, L., and Gunzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* **105**, 114-21.
- Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D., and Timbrell, J. A. (2005). Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro* **19**, 481-9.
- Fotakis, G., and Timbrell, J. A. (2006). Modulation of cadmium chloride toxicity by sulphur amino acids in hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* **20**, 641-8.
- Frederickson, C. J., Hernandez, M. D., Goik, S. A., Morton, J. D., and McGinty, J. F. (1988). Loss of zinc staining from hippocampal mossy fibers during kainic acid induced seizures: a histofluorescence study. *Brain research* **446**, 383-6.
- Freedman, J. H., Ciriolo, M. R., and Peisach, J. (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *The Journal of biological chemistry* **264**, 5598-605.
- Fridovich, I. (1986a). Biological effects of the superoxide radical. *Archives of biochemistry and biophysics* **247**, 1-11.
- Fridovich, I. (1986b). Superoxide dismutases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **58**, 61-97.
- Friedberg, E. W., G. Siede, W. Wood, R. Schultz, R. Ellenberger, T. (2006). DNA repair and mutagenesis *second edition*.
- Friedline, J. A., Garrett, S. H., Somji, S., Todd, J. H., and Sens, D. A. (1998). Differential expression of the MT-1E gene in estrogen-receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. *The American journal of pathology* **152**, 23-7.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A., and Dogliotti, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **271**, 9573-8.
- Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M. J., and Kawanishi, S. (2005). Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone. *The Biochemical journal* **388**, 813-8.
- Fusenig, N. E., and Boukamp, P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular carcinogenesis* **23**, 144-58.

G

- Galan, A., Troyano, A., Vilaboa, N. E., Fernandez, C., de Blas, E., and Aller, P. (2001). Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochimica et biophysica acta* **1538**, 38-46.
- Gallego, S. B. d., MP. Tomaro, M (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* **121**, 151-159.
- Ganguly, S., Taioli, E., Baranski, B., Cohen, B., Toniolo, P., and Garte, S. J. (1996). Human metallothionein gene expression determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as a biomarker of cadmium exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**, 297-301.
- Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., and Al-Gubory, K. H. (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free radical research* **41**, 251-9.
- Gebicki, S., and Gebicki, J. M. (1999). Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides. *The Biochemical journal* **338 (Pt 3)**, 629-36.
- Ghoshal, K., Majumder, S., Li, Z., Dong, X., and Jacob, S. T. (2000). Suppression of metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter-specific DNA methylation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 539-47.
- Giaginis, C., Gatzidou, E., and Theocharis, S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* **213**, 282-90.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., and Demnerova, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation research* **559**, 49-57.
- Giedroc, D. P., Chen, X., and Apuy, J. L. (2001). Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* **3**, 577-96.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research* **39**, 1529-42.
- Goering, P. L., Fisher, B. R., and Kish, C. L. (1993). Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* **122**, 139-48.
- Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* **402**, 255-62.
- Goth, L. (1991a). Serum catalase: reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clinical chemistry* **37**, 2043-7.
- Goth, L. (1991b). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **196**, 143-51.
- Goyer, R. (1996). Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology* (Curtis D. Klaassen, Ed), McGraw-Hill, pp. 691-736.
- Green, D., and Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in cell biology* **8**, 267-71.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free radical biology & medicine* **27**, 922-35.
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* **13**, 1899-911.
- Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., and Craik, D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences* **31**,

455-64.

- Guiraud, P., Horn, A.F.N. (2003). Metabolism of copper. *Encycl Méd Chir*, 10-359.
- Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *International journal of oncology* **22**, 15-20.
- Gutteridge, J. (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm* **19**, 598-620.

H

- Hainaut, P., and Milner, J. (1993a). Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer research* **53**, 4469-73.
- Hainaut, P., and Milner, J. (1993b). A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer research* **53**, 1739-42.
- Halliwell, B. (1989a). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta neurologica Scandinavica* **126**, 23-33.
- Halliwell, B. (1989b). Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? *Free radical biology & medicine* **7**, 645-51.
- Halliwell, B., and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition* **57**, 715S-724S; discussion 724S-725S.
- Halliwell B, G. J. (1989). Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* **219**, 1-14.
- Hamada, T., Tanimoto, A., and Sasaguri, Y. (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* **2**, 359-67.
- Hamada, Y., Nakashima, E., Naruse, K., Nakae, M., Naiki, M., Fujisawa, H., Oiso, Y., Hotta, N., and Nakamura, J. (2005). A copper chelating agent suppresses carbonyl stress in diabetic rat lenses. *Journal of diabetes and its complications* **19**, 328-34.
- Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annual review of biochemistry* **55**, 913-51.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard-Triquet, C., and El Abed, A. (1997). Metallothionein-like protein: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. *Archives of environmental contamination and toxicology* **33**, 53-62.
- Hanas, J. S., and Gunn, C. G. (1996). Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic acids research* **24**, 924-30.
- Hanna, P. M., and Mason, R. P. (1992). Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Archives of biochemistry and biophysics* **295**, 205-13.
- Hansen, B. H., Romma, S., Garmo, O. A., Pedersen, S. A., Olsvik, P. A., and Andersen, R. A. (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* **67**, 2241-9.
- Hansen, J. M., Zhang, H., and Jones, D. P. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free radical biology & medicine* **40**, 138-45.
- Harris, A. L., and Hochhauser, D. (1992). Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* **31**, 205-13.
- Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J* **6**, 2675-83.

- Harrison, M. D., Jones, C. E., Solioz, M., and Dameron, C. T. (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends in biochemical sciences* **25**, 29-32.
- Hart, B. A., Potts, R. J., and Watkin, R. D. (2001). Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicology* **160**, 65-70.
- Hartwig, A. (2001). Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants & redox signaling* **3**, 625-34.
- Harvey Lodish, A. M., P. Kaiser, CA. Krieger, M. Matthew, P. Scott, S. Zipursky, L. Darnell, J. (1997). *Biologie moléculaire de la cellule*.
- Hashimoto, M., Greenberg, M. M., Kow, Y. W., Hwang, J. T., and Cunningham, R. P. (2001). The 2-deoxyribonolactone lesion produced in DNA by neocarzinostatin and other damaging agents forms cross-links with the base-excision repair enzyme endonuclease III. *J Am Chem Soc* **123**, 3161-2.
- Hatcher, E. L., Chen, Y., and Kang, Y. J. (1995). Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free radical biology & medicine* **19**, 805-12.
- Hawse, J. R., Padgaonkar, V. A., Leverenz, V. R., Pelliccia, S. E., Kantorow, M., and Giblin, F. J. (2006). The role of metallothionein IIa in defending lens epithelial cells against cadmium and TBHP induced oxidative stress. *Molecular vision* **12**, 342-9.
- Hay, S., and Kannourakis, G. (2002). A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *The Journal of general virology* **83**, 1547-64.
- Hayakawa, M., Ogawa, T., Sugiyama, S., Tanaka, M., and Ozawa, T. (1991). Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine. *Biochemical and biophysical research communications* **176**, 87-93.
- Hayes, J. D., and McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research* **31**, 273-300.
- 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. *Molecular pharmacology* **70**, 171-80.
- He, Z. L., Yang, X. E., and Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* **19**, 125-40.
- Heffner, J. E., Cook, J. A., and Halushka, P. V. (1989). Human platelets modulate edema formation in isolated rabbit lungs. *The Journal of clinical investigation* **84**, 757-64.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6.
- Hengstler, J. G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H. G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B., and Oesch, F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* **24**, 63-73.
- Hengstler, J. G., Pilch, H., Schmidt, M., Dahlenburg, H., Sagemuller, J., Schiffer, I., Oesch, F., Knapstein, P. G., Kaina, B., and Tanner, B. (2001). Metallothionein expression in ovarian cancer in relation to histopathological parameters and molecular markers of prognosis. *International journal of cancer* **95**, 121-7.
- Henkel, R. B., J. Weber, R. Huther, F. Miska, W. (1999). Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to mobility. *Fertil. Steril.* **71**, 1138-1143.
- Hensley, K., and Floyd, R. A. (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Archives of biochemistry and biophysics* **397**, 377-83.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., and Schaffner, W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein

- gene expression. *The EMBO journal* **13**, 2870-5.
- Hiatt, V. H., JE. (1975). The environmental impact of cadmium: an overview. *Int. J. Environ.* **7**, 277-285.
- Hiratsuka, H., Katsuta, O., Toyota, N., Tsuchitani, M., Umemura, T., and Marumo, F. (1996). Chronic cadmium exposure-induced renal anemia in ovariectomized rats. *Toxicology and applied pharmacology* **137**, 228-36.
- Hodgson, J., and Enrietto, P. J. (1995). Constitutive and inducible kappa B binding activities in the cytosol of v-Rel-transformed lymphoid cells. *Journal of virology* **69**, 1971-9.
- Horiguchi, H., Teranishi, H., Niiya, K., Aoshima, K., Katoh, T., Sakuragawa, N., and Kasuya, M. (1994). Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Archives of toxicology* **68**, 632-6.
- Hsieh, P. (2001). Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation research* **486**, 71-87.
- Huang, M., Krepiy, D., Hu, W., and Petering, D. H. (2004a). Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes. *Journal of inorganic biochemistry* **98**, 775-85.
- Huang, M., Shaw, I. C., and Petering, D. H. (2004b). Interprotein metal exchange between transcription factor IIIa and apo-metallothionein. *Journal of inorganic biochemistry* **98**, 639-48.
- Huang, Y. H., Shih, C. M., Huang, C. J., Lin, C. M., Chou, C. M., Tsai, M. L., Liu, T. P., Chiu, J. F., and Chen, C. T. (2006). Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of cellular biochemistry* **98**, 577-89.
- Hubert, N., and Hentze, M. W. (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12345-50.
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Blankson, S., and Lees, A. J. (1993). A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Archives of neurology* **50**, 140-8.
- Hultberg, B., Andersson, A., and Isaksson, A. (1999). Thiol and redox reactive agents exert different effects on glutathione metabolism in HeLa cell cultures. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **283**, 21-32.
- Hultberg, B., Andersson, A., and Isaksson, A. (2001). Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology* **156**, 93-100.
- Hultberg, M., Isaksson, A., Andersson, A., and Hultberg, B. (2007). Traces of copper ions deplete glutathione in human hepatoma cell cultures with low cysteine content. *Chemico-biological interactions* **167**, 56-62.
- Hunt, J. V., and Wolff, S. P. (1991). Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free radical research communications* **12-13 Pt 1**, 115-23.
- Huot, J., Roy, G., Lambert, H., Chretien, P., and Landry, J. (1991). Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer research* **51**, 5245-52.

I

- IARC, I. a. f. r. o. c. (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans*. IARC Scientific Publications, Lyon. **58**, 119-237.

Im, J. Y., Paik, S. G., and Han, P. L. (2006). Cadmium-induced astroglial death proceeds via glutathione depletion. *Journal of neuroscience research* **83**, 301-8.

J

- Jacob, C., Knight, I., and Winyard, P. G. (2006). Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem* **387**, 1385-97.
- Jacob, C., Maret, W., and Vallee, B. L. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3489-94.
- Jacob, S. T., Majumder, S., and Ghoshal, K. (2002). Suppression of metallothionein-I/II expression and its probable molecular mechanisms. *Environmental health perspectives* **110 Suppl 5**, 827-30.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **273**, 9357-60.
- Janssen, A. M., Bosman, C. B., van Duijn, W., Oostendorp-van de Ruit, M. M., Kubben, F. J., Griffioen, G., Lamers, C. B., van Krieken, J. H., van de Velde, C. J., and Verspaget, H. W. (2000). Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 3183-92.
- Jarup, L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 2**, 35-9.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* **68**, 167-82.
- Jeggo, P. A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation research* **150**, S80-91.
- 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.
- Jimenez Del Rio, M., and Velez-Pardo, C. (2004). Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Archives of medical research* **35**, 185-93.
- Jin, R., Bay, B. H., Chow, V. T., Tan, P. H., and Lin, V. C. (2000). Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer. *British journal of cancer* **83**, 319-23.
- Johnson, T. M., Hammond, E. M., Giaccia, A., and Attardi, L. D. (2005). The p53QS transactivation-deficient mutant shows stress-specific apoptotic activity and induces embryonic lethality. *Nature genetics* **37**, 145-52.
- Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods in enzymology* **348**, 93-112.
- Jorg, B., Erhard, H., and Rutten, A. (2000). [A hemorrhagic acral form of dyskeratosis follicularis Darier]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **51**, 857-61.
- Joseph, P., Muchnok, T. K., Klishis, M. L., Roberts, J. R., Antonini, J. M., Whong, W. Z., and Ong, T. (2001). Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol Sci* **61**, 295-303.
- Jourdan, E. (2002). Mécanismes de protection cellulaire endogène et exogène suite à l'irradiation ultraviolette. Thèse effectuée au laboratoire de biologie du stress oxydant

(LBSO)-LRC7 n°8M CEA Grenoble.
 Jourdan, E., Emonet-Piccardi, N., Didier, C., Beani, J. C., Favier, A., and Richard, M. J. (2002). Effects of cadmium and zinc on solar-simulated light-irradiated cells: potential role of zinc-metallothionein in zinc-induced genoprotection. *Archives of biochemistry and biophysics* **405**, 170-7.

K

- Kagi, J. H. (1991). Overview of metallothionein. *Methods in enzymology* **205**, 613-26.
- Kagi, J. H., and Schaffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**, 8509-15.
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H., and van Gent, D. C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in cell biology* **8**, 483-9.
- Kang, K. H., Kim, W. H., and Choi, K. H. (1999). p21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Experimental cell research* **253**, 403-12.
- Kang, Y. J. (2006). Metallothionein redox cycle and function. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)* **231**, 1459-67.
- Kang, Y. J., and Enger, M. D. (1987). Effect of cellular glutathione depletion on cadmium-induced cytotoxicity in human lung carcinoma cells. *Cell biology and toxicology* **3**, 347-60.
- Kapoor, M., and Lozano, G. (1998). Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2834-7.
- Kappus, H., and Reinhold, C. (1994). Heavy metal-induced cytotoxicity to cultured human epidermal keratinocytes and effects of antioxidants. *Toxicology letters* **71**, 105-9.
- 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.
- Kaufmann, S. H., Mesner, P. W., Jr., Samejima, K., Tone, S., and Earnshaw, W. C. (2000). Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods in enzymology* **322**, 3-15.
- Kelly, G. S. (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* **3**, 114-27.
- Kerr, J. F., Gobe, G. C., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods in cell biology* **46**, 1-27.
- Khan, A. T., Graham, T. C., Ogden, L., Ali, S., Salwa, Thompson, S. J., Shireen, K. F., and Mahboob, M. (2007). A two-generational reproductive toxicity study of zinc in rats. *Journal of environmental science and health. Part A* **42**, 403-15.
- Kim, D., Joe, C. O., and Han, P. L. (2003). Extracellular and intracellular glutathione protects astrocytes from Zn²⁺-induced cell death. *Neuroreport* **14**, 187-90.
- Kim, E. Y., Koh, J. Y., Kim, Y. H., Sohn, S., Joe, E., and Gwag, B. J. (1999a). Zn²⁺ entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *The European journal of neuroscience* **11**, 327-34.
- Kim, T. K. (1997). In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochemical and biophysical research communications* **234**, 300-2.
- Kim, Y. H., Kim, E. Y., Gwag, B. J., Sohn, S., and Koh, J. Y. (1999b). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* **89**, 175-82.
- Kindermann, B., Doring, F., Budczies, J., and Daniel, H. (2005). Zinc-sensitive genes as potential new target genes of the metal transcription factor-1 (MTF-1). *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **83**, 221-9.
- Kinnula, V. L., Pietarinen, P., Aalto, K., Virtanen, I., and Raivio, K. O. (1995). Mitochondrial

- superoxide dismutase induction does not protect epithelial cells during oxidant exposure in vitro. *The American journal of physiology* **268**, L71-7.
- Kiss, T., and Osipenko, O. N. (1994). Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacological reviews* **46**, 245-67.
- Kjellstrom, T. (1986). Renal effects. In Cadmium and Health. A toxicological and Epidemiological appraisal. General Aspects. Effects and Response. (L. Friberg, C. G. Elinder, T. Kjellstrom et G. Nordberg, Eds.) Boca Raton, Florida, pp. 21-109.
- Klaassen, C. D., and Lehman-McKeeman, L. D. (1989). Regulation of the isoforms of metallothionein. *Biological trace element research* **21**, 119-29.
- Klaassen, C. D., Liu, J., and Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* **39**, 267-94.
- Klaassen, C. H., Jeunink, M. A., Prinsen, C. F., Ruers, T. J., Tan, A. C., Strobbe, L. J., and Thunnissen, F. B. (2003). Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clinical chemistry* **49**, 1185-7.
- Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes & development* **10**, 1054-72.
- Ko, T. P., Safo, M. K., Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Wang, C., Wu, S. H., and Abraham, D. J. (2000). Structure of human erythrocyte catalase. *Acta crystallographica* **56**, 241-5.
- Kodama, H., Murata, Y., and Kobayashi, M. (1999). Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants. *Pediatr Int* **41**, 423-9.
- Koh, J. Y., Suh, S. W., Gwag, B. J., He, Y. Y., Hsu, C. Y., and Choi, D. W. (1996). The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science (New York, N.Y)* **272**, 1013-6.
- Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Gong, P., and Otsuka, F. (2000). Roles of zinc fingers and other regions of the transcription factor human MTF-1 in zinc-regulated DNA binding. *Journal of cellular physiology* **185**, 464-72.
- 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. *European journal of biochemistry / FEBS* **259**, 635-42.
- Koizumi, S., Yamada, H., Suzuki, K., and Otsuka, F. (1992). Zinc-specific activation of a HeLa cell nuclear protein which interacts with a metal responsive element of the human metallothionein-IIA gene. *European journal of biochemistry / FEBS* **210**, 555-60.
- Koizumi, T., Yokota, T., Shirakura, H., Tatsumoto, H., and Suzuki, K. T. (1994a). Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity. *Toxicology* **92**, 115-25.
- Koizumi, T., Yokota, T., and Suzuki, K. T. (1994b). Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. Cd-induced acidification causes alkalinization accompanied by membrane damage. *Biological trace element research* **42**, 31-41.
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V., and Gudkov, A. V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science (New York, N.Y)* **285**, 1733-7.
- Kondratov, R. V., Komarov, P. G., Becker, Y., Ewenson, A., and Gudkov, A. V. (2001). Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14078-83.
- Kopera, E., Schwerdtle, T., Hartwig, A., and Bal, W. (2004). Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chemical research in toxicology* **17**, 1452-8.
- Koreta, M. R., Y. Defrancq, E. Bourdat, AG. Garcia, J. Coulombeau, C. Lhomme, J. (2000).

- The 7-nitroindole nucleoside as a photochemical precursor of 2'-deoxyribonolactone: access to DNA fragments containing this oxidative abasic lesion. *Chemistry* **6**, 4163-4169.
- Koukay, N. F., A. (1987). Zinc et radicaux libres (étude in vitro). In: *Le zinc en médecine et biologie*. Paris, *Techniques et Documentation*, 64-68.
- Kowalczyk, P., Ciesla, J. M., KomisarSKI, M., Kusmierek, J. T., and Tudek, B. (2004). Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutation research* **550**, 33-48.
- Kozmik, Z., Urbanek, P., and Paces, V. (1990). Albumin improves formation and detection of some specific protein-DNA complexes in the mobility shift assay. *Nucleic acids research* **18**, 2198.
- Krezel, A., Hao, Q., and Maret, W. (2007). The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Arch Biochem Biophys*.
- Krezel, A., and Maret, W. (2007). Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *The Biochemical journal* **402**, 551-8.
- Krumschnabel, G., Manzl, C., Berger, C., and Hofer, B. (2005). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* **209**, 62-73.
- Kurz, T., Terman, A., and Brunk, U. T. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Kusakabe, T., Nakajima, K., Suzuki, K., Nakazato, K., Takada, H., Satoh, T., Oikawa, M., Kobayashi, K., Koyama, H., Arakawa, K., and Nagamine, T. (2007). The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals*.

L

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafleur, M. V., Hoorweg, J. J., Joenje, H., Westmijze, E. J., and Retel, J. (1994). The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free radical research* **21**, 9-17.
- Laity, J. H., Chung, J., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2000a). Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry* **39**, 5341-8.
- Laity, J. H., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2000b). DNA-induced alpha-helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys(2)-His(2) zinc fingers. *Journal of molecular biology* **295**, 719-27.
- Lakin, N. D., and Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **18**, 7644-55.
- Langie, S. A., Knaapen, A. M., Houben, J. M., van Kempen, F. C., de Hoon, J. P., Gottschalk, R. W., Godschalk, R. W., and van Schooten, F. J. (2007). The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicology letters* **168**, 302-9.
- Larochelle, O., Stewart, G., Moffatt, P., Tremblay, V., and Seguin, C. (2001). Characterization of the mouse metal-regulatory-element-binding proteins, metal element protein-1 and metal regulatory transcription factor-1. *The Biochemical journal* **353**, 591-601.
- Lazarova, M., Labaj, J., Eckl, P., and Slamenova, D. (2006). Comparative evaluation of DNA damage by genotoxicants in primary rat cells applying the comet assay. *Toxicology letters* **164**, 54-62.

- Lazo, J. S., Kuo, S. M., Woo, E. S., and Pitt, B. R. (1998). The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chemico-biological interactions* **111-112**, 255-62.
- Le Page, F., Kwok, E. E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S. A., Sarasin, A., and Cooper, P. K. (2000). Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* **101**, 159-71.
- Lee, S. H., Arora, J. A., Oe, T., and Blair, I. A. (2005). 4-Hydroperoxy-2-nonenal-induced formation of 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine adducts. *Chemical research in toxicology* **18**, 780-6.
- Lee, S. H., and Blair, I. A. (2000). Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology* **13**, 698-702.
- Lee, S. H., Rindgen, D., Bible, R. H., Jr., Hajdu, E., and Blair, I. A. (2000). Characterization of 2'-deoxyadenosine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology* **13**, 565-74.
- Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J. P., Therond, P., and Torreilles, J. (1998). [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]. *Annales de biologie clinique* **56**, 305-19.
- LeGendre, N. M., P. (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.*
- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusenig, N., Rogan, E. M., and et al. (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* **14**, 833-9.
- Lemarie, A., Lagadic-Gossmann, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O., and Vernhet, L. (2004). Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free radical biology & medicine* **36**, 1517-31.
- Lemasters, J. J., Qian, T., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Cascio, W. E., Trost, L. C., Nishimura, Y., Nieminen, A. L., and Herman, B. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **31**, 305-19.
- Lemire, J. M., R. Appanna, V.D. (2007). Zinc toxicity alters mitochondrial metabolism and leads to decrease ATP production in hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.*
- 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. *Toxicology and applied pharmacology* **204**, 216-37.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-31.
- Levine, R. L., and Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology* **36**, 1495-502.
- Li, W., Kagan, H. M., and Chou, I. N. (1994). Alterations in cytoskeletal organization and homeostasis of cellular thiols in cadmium-resistant cells. *Toxicology and applied pharmacology* **126**, 114-23.
- Li, X., Chen, H., and Epstein, P. N. (2006). Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice: reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **55**, 1592-604.
- Li, Y., Seacat, A., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Yager, J. D., and Trush, M. A. (2002). Copper redox-dependent activation of 2-tert-butyl(1,4)hydroquinone: formation of reactive oxygen species and induction of oxidative DNA damage in isolated DNA and cultured rat hepatocytes. *Mutation research* **518**, 123-33.

- Lichtlen, P., and Schaffner, W. (2001). The "metal transcription factor" MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med Wkly* **131**, 647-52.
- Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R., and Schaffner, W. (2001). Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic acids research* **29**, 1514-23.
- Lightbody, J. e. a. (1968). Establishment of differentiated clonal strains of glial brain cells in culture. *Fed. Proc.* **27**.
- Lincet, H., Poulain, L., Remy, J. S., Deslandes, E., Duigou, F., Gauduchon, P., and Staedel, C. (2000). The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer letters* **161**, 17-26.
- Lindahl, T. (1974). An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 3649-53.
- Lindahl, T. (1979). DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **22**, 135-92.
- Linder, M. C., and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American journal of clinical nutrition* **63**, 797S-811S.
- Linder, M. C., Lomeli, N. A., Donley, S., Mehrbod, F., Cerveza, P., Cotton, S., and Wotten, L. (1999). Copper transport in mammals. *Advances in experimental medicine and biology* **448**, 1-16.
- Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2000). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *The Journal of biological chemistry* **275**, 38482-5.
- Lloyd, D. R., and Phillips, D. H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation research* **424**, 23-36.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 2405-19.
- Loeb, L. A. (1994). Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer research* **54**, 5059-63.
- Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M. J., Canadas, S., and Gonzalez, M. P. (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free radical biology & medicine* **40**, 940-51.
- Lu, J., Jin, T., Nordberg, G., and Nordberg, M. (2001). Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers. *Cell stress & chaperones* **6**, 97-104.
- Lu, Y., Yamagishi, N., Yagi, T., and Takebe, H. (1998). Mutated p21(WAF1/CIP1/SDI1) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* **16**, 705-12.
- Luxford, C., Dean, R. T., and Davies, M. J. (2002). Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins. *Biogerontology* **3**, 95-102.
- Luxford, C., Morin, B., Dean, R. T., and Davies, M. J. (1999). Histone H1- and other protein- and amino acid-hydroperoxides can give rise to free radicals which oxidize DNA. *The Biochemical journal* **344 Pt 1**, 125-34.
- Lymburner, D. (1974). Environmental contaminants inventory. *The production, use and distribution of cadmium in Canada, Centre canadien des eaux intérieures, Direction des eaux intérieures, Ottawa. Report Series.*, 39.

M

- Mackay, J. P., and Crossley, M. (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends in biochemical sciences* **23**, 1-4.
- Maiorino, M., Chu, F. F., Ursini, F., Davies, K. J., Doroshow, J. H., and Esworthy, R. S. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *The Journal of biological chemistry* **266**, 7728-32.
- Malins, D. C., and Haimanot, R. (1991). Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer research* **51**, 5430-2.
- Maral, J., Puget, K., and Michelson, A. M. (1977). Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochemical and biophysical research communications* **77**, 1525-35.
- Maret, W. (1994). Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 237-41.
- Maret, W. (1995). Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochemistry international* **27**, 111-7.
- Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *The Journal of nutrition* **130**, 1455S-8S.
- Marklund, S., and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry / FEBS* **47**, 469-74.
- Marklund, S. L., Adolfsson, R., Gottfries, C. G., and Winblad, B. (1985). Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of Alzheimer type. *Journal of the neurological sciences* **67**, 319-25.
- Marnett, L. J. (1999a). Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC scientific publications*, 17-27.
- Marnett, L. J. (1999b). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* **424**, 83-95.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-70.
- Marnett, L. J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* **181-182**, 219-22.
- Marnett LJ, B. A., O'Hara SM, Weller PE, Rahman AFMM and Oliver JP (1986). Reaction of malondialdehyde with guanine nucleosides: formation of adducts containing oxadiazabicyclononene residues in the base-pairing region. *J Am Chem Soc* **108**, 1348-1350.
- Marnett, L. J., Basu, A. K., and O'Hara, S. M. (1986). The role of cyclic nucleic acid adducts in the mutational specificity of malondialdehyde and beta-substituted acroleins in *Salmonella*. *IARC scientific publications*, 175-83.
- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., and Moulis, J. M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* **88**, 1807-14.
- Masters, B. A., Quaife, C. J., Erickson, J. C., Kelly, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. (1994). Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* **14**, 5844-57.
- Mates, J. M., and Sanchez-Jimenez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* **4**, D339-45.
- Mates, J. M., Segura, J. M., Perez-Gomez, C., Rosado, R., Olalla, L., Blanca, M., and Sanchez-Jimenez, F. M. (1999). Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood cells, molecules & diseases*

- 25, 103-9.
- Matsumoto, Y., Kim, K., and Bogenhagen, D. F. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Molecular and cellular biology* **14**, 6187-97.
- Matsuoka, M., and Igisu, H. (2001). Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **282**, 1120-5.
- May, E. C., H. (2000). Réponses Précoces et Processus de Réparation-Le Suicide Cellulaire. *CLEFS CEA. Printemps* **43**.
- May, J. M., and Contoreggi, C. S. (1982). The mechanism of the insulin-like effects of ionic zinc. *The Journal of biological chemistry* **257**, 4362-8.
- McAler, M. F., and Tuan, R. S. (2001a). Metallothionein overexpression in human trophoblastic cells protects against cadmium-induced apoptosis. *In vitro & molecular toxicology* **14**, 25-42.
- McAler, M. F., and Tuan, R. S. (2001b). Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. *In vitro & molecular toxicology* **14**, 219-31.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* **244**, 6049-55.
- McKeon, T. A., and Lyman, M. L. (1991). Calcium ion improves electrophoretic transfer of calmodulin and other small proteins. *Analytical biochemistry* **193**, 125-30.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., and Beal, M. F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* **36**, 747-51.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
- Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry* **52**, 711-60.
- Mellon, I., Bohr, V. A., Smith, C. A., and Hanawalt, P. C. (1986). Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8878-82.
- Menon, S. G., Coleman, M. C., Walsh, S. A., Spitz, D. R., and Goswami, P. C. (2005). Differential susceptibility of nonmalignant human breast epithelial cells and breast cancer cells to thiol antioxidant-induced G(1)-delay. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 711-8.
- Menon, S. G., and Goswami, P. C. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* **26**, 1101-9.
- Menon, S. G., Sarsour, E. H., Spitz, D. R., Higashikubo, R., Sturm, M., Zhang, H., and Goswami, P. C. (2003). Redox regulation of the G1 to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer research* **63**, 2109-17.
- Meplan, C., Mann, K., and Hainaut, P. (1999). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31663-70.
- Meplan, C., Richard, M. J., and Hainaut, P. (2000a). Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene* **19**, 5227-36.
- Meplan, C., Richard, M. J., and Hainaut, P. (2000b). Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochemical pharmacology* **59**, 25-33.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **17**, 235-48.
- Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H., and Rodilla, V. (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **35**, 35-70.

- Misra, U. K., Gawdi, G., Akabani, G., and Pizzo, S. V. (2002). Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cellular signalling* **14**, 327-40.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-9.
- Mize, C. E., and Langdon, R. G. (1962). Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *The Journal of biological chemistry* **237**, 1589-95.
- Mize, C. E., Thompson, T. E., and Langdon, R. G. (1962). Hepatic glutathione reductase. II. Physical properties and mechanism of action. *The Journal of biological chemistry* **237**, 1596-600.
- 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.
- Moffatt, P., and Denizeau, F. (1997). Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug metabolism reviews* **29**, 261-307.
- Moffatt, P., and Seguin, C. (1998). Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA and cell biology* **17**, 501-10.
- Moilanen, L. H., Fukushima, T., and Freedman, J. H. (1999). Regulation of metallothionein gene transcription. Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* **274**, 29655-65.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of biological chemistry* **277**, 34287-94.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63.
- Motti, ML., De Marco, C., Califano, D., Fusco, A., Viglietto, G. (2004). Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* **3**, 1074-1080
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Bill, E., Pipkorn, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1998). Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site-specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry* **37**, 7224-30.
- Muthumani, K., Choo, A. Y., Hwang, D. S., Chattergoon, M. A., Dayes, N. N., Zhang, D., Lee, M. D., Duvvuri, U., and Weiner, D. B. (2003). Mechanism of HIV-1 viral protein R-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* **304**, 583-92.
- Nagata, M., Hiroe, M., Ishiyama, S., Nishikawa, T., Sakomura, Y., Kasanuki, H., Toyosaki, T., and Marumo, F. (2000). Apoptotic cell death in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a comparative study with idiopathic sustained ventricular tachycardia. *Japanese heart journal* **41**, 733-41.

N

- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research* **256**, 12-8.
- Nair, J., Barbin, A., Velic, I., and Bartsch, H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutation research* **424**, 59-69.
- Nair V, T. G., Offman RJ (1984). Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde. *J Am Chem Soc* **106**, 3370-3371.

- Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology* **150**, 887-94.
- Nakagawa, T. Y., J. (2002b). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- Nakazawa, H. E. D., PL. Nakazawa, K. Martel, N. Armstrong, BK. Yamasaki, H. (1993). UV and skin cancer: Specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl acad Sci USA* **93**, 360-364.
- Nawrot, T., Plusquin, M., Hogervorst, J., Roels, H. A., Celis, H., Thijs, L., Vangronsveld, J., Van Hecke, E., and Staessen, J. A. (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *The lancet oncology* **7**, 119-26.
- Nelson, W. G., and Kastan, M. B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and cellular biology* **14**, 1815-23.
- Netter, A. H., R. Nahoul, K. (1981). Effect of zinc administration on plasma testosterone, dihydrotestosterone, and sperm count. *Arch. Androl.* **7**, 69-73.
- Neurath, M. F., Finotto, S., Fuss, I., Boirivant, M., Galle, P. R., and Strober, W. (2001). Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends in immunology* **22**, 21-6.
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., and Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* **278**, 31426-33.
- Nielson, K. B., Atkin, C. L., and Winge, D. R. (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *The Journal of biological chemistry* **260**, 5342-50.
- Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1983). Order of metal binding in metallothionein. *The Journal of biological chemistry* **258**, 13063-9.
- Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1984). Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein. *The Journal of biological chemistry* **259**, 4941-6.
- Nielson, K. B., and Winge, D. R. (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *The Journal of biological chemistry* **260**, 8698-701.
- Nieminen, A. L., Gores, G. J., Dawson, T. L., Herman, B., and Lemasters, J. J. (1990). Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **265**, 2399-408.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., and Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications* **338**, 668-76.
- Nzengue, Y. Steiman, R. Garrel, C. Lefèbvre, E. Guiraud, P. (2008). Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicolgy* **243**, 193-206.

O

- O'Brien, P., and Salacinski, H. J. (1998). Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Archives of toxicology* **72**, 690-700.
- Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R., and Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO journal* **12**, 3679-84.
- Oberley, T. D., and Oberley, L. W. (1997). Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histology and histopathology* **12**, 525-35.

- Ochi, T., Otsuka, F., Takahashi, K., and Ohsawa, M. (1988). Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. *Chemico-biological interactions* **65**, 1-14.
- Offer, H., Wolkowicz, R., Matas, D., Blumenstein, S., Livneh, Z., and Rotter, V. (1999). Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS letters* **450**, 197-204.
- Ogra, Y., Aoyama, M., and Suzuki, K. T. (2006). Protective role of metallothionein against copper depletion. *Archives of biochemistry and biophysics* **451**, 112-8.
- Oh, S. H., Choi, J. E., and Lim, S. C. (2006). Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology* **220**, 1-12.
- Olivi, L., Sisk, J., and Bressler, J. (2001). Involvement of DMT1 in uptake of Cd in MDCK cells: role of protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C793-800.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell death and differentiation* **10**, 431-42.
- Ostling, O., and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **123**, 291-8.
- Ostrakhovitch, E. A., and Cherian, M. G. (2005a). Inhibition of extracellular signal regulated kinase (ERK) leads to apoptosis inducing factor (AIF) mediated apoptosis in epithelial breast cancer cells: the lack of effect of ERK in p53 mediated copper induced apoptosis. *Journal of cellular biochemistry* **95**, 1120-34.
- Ostrakhovitch, E. A., Olsson, P. E., Hofsten, J. V., Cherian, M. G. (2007). p53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells. *Journal of cellular Biochemistry* **102**, 1571-1583.
- Ostrakhovitch, E. A., and Cherian, M. G. (2005b). Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis* **10**, 111-21.
- Ostrakhovitch, E. A., Olsson, P. E., Jiang, S., and Cherian, M. G. (2006). Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS letters* **580**, 1235-8.
- Otsuka, F. (2001). Molecular Mechanism of the Metallothionein Gene Expression Mediated by Metal-Responsive Transcription Factor 1. *Journal of Health Science* **47**, 513-519.
- Otsuka, F., Okugaito, I., Ohsawa, M., Iwamatsu, A., Suzuki, K., and Koizumi, S. (2000). Novel responses of ZRF, a variant of human MTF-1, to in vivo treatment with heavy metals. *Biochimica et biophysica acta* **1492**, 330-40.
- Oyadomari, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* **7**, 335-45.

P

- Pacifici, E. H., McLeod, L. L., and Sevanian, A. (1994). Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free radical biology & medicine* **17**, 297-309.
- Palade, P., Dettbarn, C., Alderson, B., and Volpe, P. (1989). Pharmacologic differentiation between inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release and Ca²⁺- or caffeine-induced Ca²⁺ release from intracellular membrane systems. *Molecular pharmacology* **36**, 673-80.
- Palejwala, V. A., Rzepka, R. W., Simha, D., and Humayun, M. Z. (1993). Quantitative multiplex sequence analysis of mutational hot spots. Frequency and specificity of mutations induced by a site-specific ethenocytosine in M13 viral DNA. *Biochemistry* **32**, 4105-11.

- Palmiter, R. D. (1994). Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1219-23.
- Palmiter, R. D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8428-30.
- Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E., and Durnam, D. M. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6333-7.
- Pandya, G. A., and Moriya, M. (1996). 1,N6-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. *Biochemistry* **35**, 11487-92.
- Paramio, J. M., Segrelles, C., Lain, S., Gomez-Casero, E., Lane, D. P., Lane, E. B., and Jorcano, J. L. (2000). p53 is phosphorylated at the carboxyl terminus and promotes the differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Molecular carcinogenesis* **29**, 251-62.
- Parat, M. O., Richard, M. J., Beani, J. C., and Favier, A. (1997). Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biological trace element research* **60**, 187-204.
- Parks, D., Bolinger, R., and Mann, K. (1997). Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic acids research* **25**, 1289-95.
- Pathak, N., and Khandelwal, S. (2006). Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress. *Toxicology letters* **165**, 121-32.
- 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 (Baltimore, Md)* **25**, 1539-42.
- Pena, M. M., Lee, J., and Thiele, D. J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of nutrition* **129**, 1251-60.
- Perry, D. K., Smyth, M. J., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Duriez, P., Poirier, G. G., and Hannun, Y. A. (1997). Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **272**, 18530-3.
- Piette, J., Piret, B., Bonizzi, G., Schoonbroodt, S., Merville, M. P., Legrand-Poels, S., and Bours, V. (1997). Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biological chemistry* **378**, 1237-45.
- Pillai, A., and 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 radical research* **39**, 707-12.
- Pincemail, J. (2003). Directeur Scientifique PROBIOX SA. Université de Liège, Tour de Pathologie 2ème étage Sart Tilman. 4000 Liège, Belgique. E-mail: j.Pincemail@ulg.ac.be et j.pincemail@probiox.com
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., and Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry* **16**, 359-64.
- Pollack, M., Oe, T., Lee, S. H., Silva Elipse, M. V., Arison, B. H., and Blair, I. A. (2003). Characterization of 2'-deoxycytidine adducts derived from 4-oxo-2-nonenal, a novel lipid peroxidation product. *Chemical research in toxicology* **16**, 893-900.
- Potts, R. J., Bespalov, I. A., Wallace, S. S., Melamede, R. J., and Hart, B. A. (2001). Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology* **161**, 25-38.
- Potts, R. J., Watkin, R. D., and Hart, B. A. (2003). Cadmium exposure down-regulates 8-

oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* **184**, 189-202.

- Pouget, J.P., Douki, T., Richard, M.J., Cadet, J., 2000. DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 541-549.
- Prasad, A. B., FW. Endre, L. Handschu, W. Kukuruga, M. Kamar, G. (1996). Zinc deficiency affects cell cycle and deoxythymidine kinase gene expression in HUT-78 cells. *J. Clin. Med.* **128**, 51-60.
- Predki, P. F., and Sarkar, B. (1994). Metal replacement in "zinc finger" and its effect on DNA binding. *Environmental health perspectives* **102 Suppl 3**, 195-8.
- Prozialeck, W. C., and Lamar, P. C. (1995). Effects of glutathione depletion on the cytotoxic actions of cadmium in LLC-PK1 cells. *Toxicology and applied pharmacology* **134**, 285-95.
- Pryor, W. A. (1992). Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free radical biology & medicine* **13**, 659-76.

Q

- Quaife, C. J., Findley, S. D., Erickson, J. C., Froelick, G. J., Kelly, E. J., Zambrowicz, B. P., and Palmiter, R. D. (1994). Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **33**, 7250-9.

R

- Rachidi, W. (2002). Rôle de la protéine du prion dans le métabolisme du cuivre et le stress oxydant. Thèse effectuée au laboratoire de biologie du stress oxydant (LBSO)-LRC7 n°8 CEA Grenoble.
- Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S., and Boiteux, S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8010-5.
- Radtke, F., Georgiev, O., Muller, H. P., Brugnera, E., and Schaffner, W. (1995). Functional domains of the heavy metal-responsive transcription regulator MTF-1. *Nucleic acids research* **23**, 2277-86.
- Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z., and Schaffner, W. (1993). Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *The EMBO journal* **12**, 1355-62.
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science (New York, N.Y)* **262**, 695-700.
- Rahman, I., Biswas, S. K., and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European journal of pharmacology* **533**, 222-39.
- Rainwater, R., Parks, D., Anderson, M. E., Tegtmeier, P., and Mann, K. (1995). Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Molecular and cellular biology* **15**, 3892-903.
- Rasmussen, R. E., and Painter, R. B. (1964). Evidence for Repair of Ultra-Violet Damaged Deoxyribonucleic Acid in Cultured Mammalian Cells. *Nature* **203**, 1360-2.
- Rauen, U., Li, T., Sustmann, R., and De Groot, H. (2004a). Protection against iron- and hydrogen peroxide-dependent cell injuries by a novel synthetic iron catalase mimic and its precursor, the iron-free ligand. *Free radical biology & medicine* **37**, 1369-83.

- Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R., and de Groot, H. (2004b). Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *Journal of hepatology* **40**, 607-15.
- Ravagnan, L., Roumier, T., and Kroemer, G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology* **192**, 131-7.
- Rich, T., Stephens, R., and Trowsdale, J. (1999). MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochemical Society transactions* **27**, 781-5.
- Richard, M. J., Guiraud, P., Meo, J., and Favier, A. (1992). High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of chromatography* **577**, 9-18.
- Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *The EMBO journal* **22**, 5293-303.
- Rindgen, D., Lee, S. H., Nakajima, M., and Blair, I. A. (2000). Formation of a substituted 1,N(6)-etheno-2'-deoxyadenosine adduct by lipid hydroperoxide-mediated generation of 4-oxo-2-nonenal. *Chemical research in toxicology* **13**, 846-52.
- Rindgen, D., Nakajima, M., Wehrli, S., Xu, K., and Blair, I. A. (1999). Covalent modifications to 2'-deoxyguanosine by 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology* **12**, 1195-204.
- Robinson, C. E., Keshavarzian, A., Pasco, D. S., Frommel, T. O., Winship, D. H., and Holmes, E. W. (1999). Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Analytical biochemistry* **266**, 48-57.
- Roesijadi, G. (2000). Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **46**, 393-405.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
- Rossman, T. G., Roy, N. K., and Lin, W. C. (1992). Is cadmium genotoxic? *IARC scientific publications*, 367-75.
- Rotilio, G., Carri, M. T., Rossi, L., and Ciriolo, M. R. (2000). Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB life* **50**, 309-14.
- Roupioz, Y. L., J. Koreta, M. (2002). Chemistry of the 2-deoxyribonolactone lesion in oligonucleotides: cleavage kinetics and products analysis. *J Am Chem Soc* **124**, 9129-9135.
- Ryu, R., Shin, Y., Choi, J. W., Min, W., Ryu, H., Choi, C. R., and Ko, H. (2002). Depletion of intracellular glutathione mediates zinc-induced cell death in rat primary astrocytes. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung* **143**, 257-63.

S

- Sadhu, C., and Gedamu, L. (1989). Metal-specific posttranscriptional control of human metallothionein genes. *Molecular and cellular biology* **9**, 5738-41.
- Sagripanti, J. L., Goering, P. L., and Lamanna, A. (1991). Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicology and applied pharmacology* **110**, 477-85.
- Sahin, E., and Gumuslu, S. (2007). Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **34**, 425-31.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., and Prendergast, G. C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15**, 887-98.

- Sakata, S., Iwami, K., Enoki, Y., Kohzuki, H., Shimizu, S., Matsuda, M., and Moriyama, T. (1988). Effects of cadmium on in vitro and in vivo erythropoiesis: erythroid progenitor cells (CFU-E), iron, and erythropoietin in cadmium-induced iron deficiency anemia. *Experimental hematology* **16**, 581-7.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-6.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10964-7.
- Samson, S. L., and Gedamu, L. (1998). Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **59**, 257-88.
- Sandrine, F. (2001). Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN. Thèse effectuée au laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (LAN). CEA Grenoble.
- Satarug, S., and Moore, M. R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental health perspectives* **112**, 1099-103.
- Saydam, N., Adams, T. K., Steiner, F., Schaffner, W., and Freedman, J. H. (2002). Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *The Journal of biological chemistry* **277**, 20438-45.
- Saydam, N., Steiner, F., Georgiev, O., and Schaffner, W. (2003). Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 31879-83.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J. B., and Marsden, C. D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* **1**, 1269.
- Schauenstein, E. (1967). Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. *Journal of lipid research* **8**, 417-28.
- Schroeder, J. C., RJ. (1990). Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hépatocyte monolyer cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 3137-3141.
- Schuckelt, R., Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M., Roveri, A., Reumkens, J., Strassburger, W., Ursini, F., Wolf, B., and Flohe, L. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free radical research communications* **14**, 343-61.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., and Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 4904-11.
- Schwartz, S. M. (1998). Cell death and the caspase cascade. *Circulation* **97**, 227-9.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Kiseleva, E., Strom, M., Bakalkin, G., Grafstrom, R. C., and Wiman, K. G. (1996). The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region. *Nucleic acids research* **24**, 3560-7.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Strom, M., Groner, B., Grafstrom, R. C., and Wiman, K. G. (1997). Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nature medicine* **3**, 632-8.
- Selivanova, G., Ryabchenko, L., Jansson, E., Iotsova, V., and Wiman, K. G. (1999). Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Molecular and cellular biology* **19**, 3395-402.
- Selliah, N., and Finkel, T. H. (2001). Biochemical mechanisms of HIV induced T cell apoptosis. *Cell death and differentiation* **8**, 127-36.
- Sensi, S. L., and Jeng, J. M. (2004). Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role

- of Zn(2+) in ischemic neuronal injury. *Current molecular medicine* **4**, 87-111.
- Setlow, R. B., and Carrier, W. L. (1964). The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: an Error-Correcting Mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**, 226-31.
- Seto H, A. K., Okuda T, Hashimoto T, Takesue T, Ikemura T (1981). Structure of a new modified nucleoside formed by guanosine-malonaldehyde reaction. *Chem Lett*, 707-708.
- Seto, H. O., T. Takesue, T. Ikemura, T. (1983). *Bull. Soc. Jpn.* **56**, 1799-1802.
- Sevanian, A., and Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual review of nutrition* **5**, 365-90.
- Seve, M., Chimienti, F., and Favier, A. (2002). [Role of intracellular zinc in programmed cell death]. *Pathologie-biologie* **50**, 212-21.
- Sève, M. F., A. (2002). Métabolisme du zinc. *Encycl. Méd. Chir. (Editions Scientifiques et Médicales) Elsevier SAS, Paris. Endocrinologie-Nutrition.*, 10-359-D-10.
- Shaw, C. F., 3rd, Savas, M. M., and Petering, D. H. (1991a). Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein. *Methods in enzymology* **205**, 401-14.
- Shaw, C. F., III, Petering, D. H., Laib, J. E., Savas, M. M., and Melnick, K. (1991b). In vitro preparation and characterization of aurothioneins. *Methods in enzymology* **205**, 469-75.
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J., and Ames, B. N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9697-701.
- Shukla, G. S., Shukla, A., Potts, R. J., Osier, M., Hart, B. A., and Chiu, J. F. (2000). Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induces the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase alpha and pi isoforms: potential role of activator protein-1. *Cell biology and toxicology* **16**, 347-62.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine* **91**, 31S-38S.
- Sies, H. (1997a). Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. *London, UK: Academic Press*.
- Sies, H. (1997b). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* **82**, 291-5.
- Shin, I., Rotty, J., Wu, F. Y., Arteaga, C. L. (2005). Phosphorylation of p27kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear re-entry. *J. Biol. Chem* **280**, 6055-6063.
- Simonian, N. A., and Coyle, J. T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology* **36**, 83-106.
- Singh, B., Reddy, P. G., Goberdhan, A., Walsh, C., Dao, S., Ngai, I., Chou, T. C., Charoenrat, P., Levine, A. J., Rao, P. H., Stoffel, A. (2002). p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev* **16**, 984-993.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* **175**, 184-91.
- Singhal, R. K., Anderson, M. E., and Meister, A. (1987). Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *Faseb J* **1**, 220-3.
- Slater, T. F. (1963). Studies on a Succinate-Neotetrazolium Reductase System of Rat Liver. II. Points of Coupling with the Respiratory Chain. *Biochimica et biophysica acta* **77**, 365-82.
- Smirnova, I. V., Bittel, D. C., Ravindra, R., Jiang, H., and Andrews, G. K. (2000). Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry* **275**, 9377-84.
- Smith, M. A., Rudnicka-Nawrot, M., Richey, P. L., Praprotnik, D., Mulvihill, P., Miller, C.

- A., Sayre, L. M., and Perry, G. (1995). Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **64**, 2660-6.
- Sobreira, C., Davidson, M., King, M. P., and Miranda, A. F. (1996). Dihydrorhodamine 123 identifies impaired mitochondrial respiratory chain function in cultured cells harboring mitochondrial DNA mutations. *J Histochem Cytochem* **44**, 571-9.
- Solioz, M., and Vulpe, C. (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends in biochemical sciences* **21**, 237-41.
- Splittgerber, A. G., and Tappel, A. L. (1979). Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. *Archives of biochemistry and biophysics* **197**, 534-42.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology* **36**, 1539-50.
- Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual review of biochemistry* **62**, 797-821.
- Stankovic, R. K., Chung, R. S., and Penkowa, M. (2007). Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 484-9.
- Starcevic, S. L., Diotte, N. M., Zukowski, K. L., Cameron, M. J., and Novak, R. F. (2003). Oxidative DNA damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease (PBD). *Toxicol Sci* **75**, 74-81.
- Stark, G. (2005). Functional consequences of oxidative membrane damage. *The Journal of membrane biology* **205**, 1-16.
- Stevnsner, T., Thorslund, T., de Souza-Pinto, N. C., and Bohr, V. A. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Experimental gerontology* **37**, 1189-96.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine* **18**, 321-36.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M. (2000). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **19**, 201-13.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **20**, 77-88.
- Stone, K., Ksebati, M. B., and Marnett, L. J. (1990a). Investigation of the adducts formed by reaction of malondialdehyde with adenosine. *Chemical research in toxicology* **3**, 33-8.
- Stone, K., Uzieblo, A., and Marnett, L. J. (1990b). Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides. *Chemical research in toxicology* **3**, 467-72.
- Stralin, P., and Marklund, S. L. (1994). Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *The Biochemical journal* **298 (Pt 2)**, 347-52.
- Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L., and Dang, M. (2001). Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microscopy research and technique* **52**, 171-81.
- 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.
- Subbarao, K. V., Richardson, J. S., and Ang, L. C. (1990). Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *Journal of neurochemistry* **55**, 342-5.
- Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Molecular cell* **2**, 223-32.
- Suh, S. W., Chen, J. W., Motamedi, M., Bell, B., Listiak, K., Pons, N. F., Danscher, G., and Frederickson, C. J. (2000). Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal

- injury after traumatic brain injury. *Brain research* **852**, 268-73.
- Suntres, Z. E., and Lui, E. M. (2006). Antioxidant effect of zinc and zinc-metallothionein in the acute cytotoxicity of hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumour cells. *Chemico-biological interactions* **162**, 11-23.
- Susanto, I., Wright, S. E., Lawson, R. S., Williams, C. E., and Deneke, S. M. (1998). Metallothionein, glutathione, and cystine transport in pulmonary artery endothelial cells and NIH/3T3 cells. *The American journal of physiology* **274**, L296-300.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *The Journal of experimental medicine* **189**, 381-94.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The Journal of experimental medicine* **184**, 1331-41.
- Suzuki, T., Yamanaka, H., Nakajima, K., Kanatani, K., Suzuki, K., Kimura, M., Nakazawa, Y., and Otaki, N. (1993). Induction of metallothionein by CdCl₂ administration in rat prostate. *The Prostate* **22**, 163-70.
- Szczelkun, M. D., and Connolly, B. A. (1995). Sequence-specific binding of DNA by the EcoRV restriction and modification enzymes with nucleic acid and cofactor analogues. *Biochemistry* **34**, 10724-33.
- Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Snieszko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J., and Kandefer-Szerszen, M. (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* **145**, 159-71.

T

- Tallkvist, J., Bowlus, C. L., and Lonnerdal, B. (2001). DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology letters* **122**, 171-7.
- Tapia, L., Gonzalez-Aguero, M., Cisternas, M. F., Suazo, M., Cambiazo, V., Uauy, R., and Gonzalez, M. (2004). Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *The Biochemical journal* **378**, 617-24.
- Tatrai, E., Kovacikova, Z., Hudak, A., Adamis, Z., and Ungvary, G. (2001). Comparative in vitro toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes. *J Appl Toxicol* **21**, 479-83.
- Termini, J. (2000). Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutation research* **450**, 107-24.
- Thomas, J. P., Maiorino, M., Ursini, F., and Girotti, A. W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *The Journal of biological chemistry* **265**, 454-61.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, N.Y)* **267**, 1456-62.
- Thornalley, P. J., and Vasak, M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et biophysica acta* **827**, 36-44.

- 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.
- Treiber, C. (2005). Metals on the Brain. *Sci. Aging Knowel. Environ* **36**, pe 27.
- Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J., and Wagner, J. R. (1999). 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *The Journal of biological chemistry* **274**, 20833-8.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M. G., Parisi, E., and Scudiero, R. (2006). Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **144**, 272-8.
- Triplett, B. A. (1992). An alternative staining procedure for detecting proteins in an agarose gel. *BioTechniques* **13**, 352-4.
- Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of cellular physiology* **195**, 158-67.
- Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS letters* **466**, 6-10.
- Tu, B. P., Kudlicki, A., Rowicka, M., and McKnight, S. L. (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science (New York, N.Y)* **310**, 1152-8.
- Tweeddale, H. J., Kondo, M., and Gebicki, J. M. (2007). Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Archives of biochemistry and biophysics* **459**, 151-8.

U

- US NTP (2000). *Ninth report on carcinogens. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, USA.*

V

- Valenzuela, A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life sciences* **48**, 301-9.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44-84.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* **12**, 1161-208.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* **160**, 1-40.
- Vallee, B. A., DS. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**, 5647-5659.
- Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**, 5647-59.
- Vallee, B. L., and Ulmer, D. D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual review of biochemistry* **41**, 91-128.
- Vasconcelos, M. H., Tam, S. C., Beattie, J. H., and Hesketh, J. E. (1996). Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms. *The Biochemical journal* **315 (Pt 2)**, 665-71.
- Vayssiere, J. L., Petit, P. X., Risler, Y., and Mignotte, B. (1994). Commitment to apoptosis is

- associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11752-6.
- Verhaegh, G. W., Parat, M. O., Richard, M. J., and Hainaut, P. (1998). Modulation of p53 protein conformation and DNA-binding activity by intracellular chelation of zinc. *Molecular carcinogenesis* **21**, 205-14.
- Verougstraete, V., Lison, D., and Hotz, P. (2002). A systematic review of cytogenetic studies conducted in human populations exposed to cadmium compounds. *Mutation research* **511**, 15-43.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., and Blasco, J. (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *The American journal of physiology* **277**, R1612-9.
- Vinatier, D., Orazi, G., Cosson, M., and Dufour, P. (2001). Theories of endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **96**, 21-34.
- Von Sonntag, C. (1987). *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor Francis, London.
- Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation research* **533**, 107-20.

W

- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**, 95-117.
- Walther, U. I., Muckter, H., Fichtl, B., and Forth, W. (1999). Influence of glutathione on zinc-mediated cellular toxicity. *Biological trace element research* **67**, 97-107.
- Wang, A. Y., Bobryshev, Y. V., Cherian, S. M., Liang, H., Tran, D., Inder, S. J., Lord, R. S., Ashwell, K. W., and Farnsworth, A. E. (2001a). Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts. *Cardiovascular surgery (London, England)* **9**, 319-28.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., and Rao, K. M. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* **36**, 1434-43.
- Wang, Z., Jiang, C., Ganther, H., and Lu, J. (2001b). Antimitogenic and proapoptotic activities of methylseleninic acid in vascular endothelial cells and associated effects on PI3K-AKT, ERK, JNK and p38 MAPK signaling. *Cancer research* **61**, 7171-8.
- Watjen, W., and Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* **17**, 65-78.
- Watjen, W., Cox, M., Biagioli, M., and Beyersmann, D. (2002a). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals* **15**, 15-25.
- Watjen, W., Haase, H., Biagioli, M., and Beyersmann, D. (2002b). Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environmental health perspectives* **110 Suppl 5**, 865-7.
- Watjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Tran-Thi, Q. H., Proksch, P., and Kahl, R. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of nutrition* **135**, 525-31.
- Weisiger, R. A., and Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of biological chemistry* **248**, 4793-6.
- Welihinda, A. A., Tirasophon, W., and Kaufman, R. J. (1999). The cellular response to

- protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene expression* **7**, 293-300.
- Westin, G., and Schaffner, W. (1988). A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *The EMBO journal* **7**, 3763-70.
- Who (1992). Cadmium. *Environmental Health Criteria. World Health Organization, Geneva*.
- Wilson, R. (1988). Zinc and iron in free radical pathology and cellular control. In: *Zinc in human biology*. Berlin: Springer-Verlag., 147-172.
- Wimmer, U., Wang, Y., Georgiev, O., and Schaffner, W. (2005). Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic acids research* **33**, 5715-27.
- Winston, R. L., Millar, D. P., Gottesfeld, J. M., and Kent, S. B. (1999). Characterization of the DNA binding properties of the bHLH domain of Deadpan to single and tandem sites. *Biochemistry* **38**, 5138-46.
- Wispriyono, B., Matsuoka, M., Igisu, H., and Matsuno, K. (1998). Protection from cadmium cytotoxicity by N-acetylcysteine in LLC-PK1 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **287**, 344-51.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A., and Bal, W. (2006). Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicology letters* **162**, 29-42.
- Wolff, S. P., Bascal, Z. A., and Hunt, J. V. (1989). "Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory. *Progress in clinical and biological research* **304**, 259-75.
- Wood, R. D., Robins, P., and Lindahl, T. (1988). Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell* **53**, 97-106.
- Wozniak, K., and Blasiak, J. (2003). In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutation research* **535**, 127-39.
- Wu, Y., Taylor, B. M., and Sun, F. F. (1996). Alterations in reactive oxygen, pH, and calcium in astrocytoma cells during lethal injury. *The American journal of physiology* **270**, C115-24.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-6.

X

- Xanthoudakis, S., Miao, G. G., and Curran, T. (1994). The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 23-7.
- Xiang, L. X., and Shao, J. Z. (2003). Role of intracellular Ca²⁺, reactive oxygen species, mitochondria transmembrane potential, and antioxidant enzymes in heavy metal-induced apoptosis in fish cells. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **71**, 114-22.
- Xu, Y.-j. D., MS. Hwang, JT. Greenberg, MM. Demple, B. (2003). Action of human apurinic endonuclease (Ape 1) on C1'-oxidized deoxyribose damage in DNA. *DNA repair* **3**, 175-185.

Y

- Yang, C. S., Tzou, B. C., Liu, Y. P., Tsai, M. J., Shyue, S. K., and Tzeng, S. F. (2007a). Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. *Journal of cellular biochemistry*.
- Yang, M. S., Lai, K. P., Cheng, K. Y., and Wong, C. K. (2000). Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after

- administration of a single sublethal dose of CdCl₂. *Toxicology* **154**, 103-11.
- Yang, M. S., Yu, L. C., and Pat, S. W. (2007b). Manipulation of energy and redox states in the C6 glioma cells by buthionine sulfoxamine and N-acetylcysteine and the effect on cell survival to cadmium toxicity. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **53**, 56-61.
- Yazdanpanah, M., Luo, X., Lau, R., Greenberg, M., Fisher, L. J., and Lehotay, D. C. (1997). Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer. *Free radical biology & medicine* **23**, 870-8.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., and Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature structural biology* **9**, 680-4.
- Yin, Y., Liu, Y. X., Jin, Y. J., Hall, E. J., and Barrett, J. C. (2003). PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature* **422**, 527-31.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13935-40.
- Youngs, H. L., Sundaramoorthy, M., and Gold, M. H. (2000). Effects of cadmium on manganese peroxidase competitive inhibition of MnII oxidation and thermal stabilization of the enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 1761-9.
- Zachara, B. A. (1992). Mammalian selenoproteins. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease* **6**, 137-51.

Z

- Zalewski, P. D., Forbes, I. J., and Betts, W. H. (1993). Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *The Biochemical journal* **296 (Pt 2)**, 403-8.
- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **183**, 1533-44.
- Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W., and Kagi, J. H. (1991a). Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS letters* **279**, 310-2.
- Zeng, J., Vallee, B. L., and Kagi, J. H. (1991b). Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9984-8.
- Zhang, X. Y., Asiedu, C. K., Supakar, P. C., and Ehrlich, M. (1992). Increasing the activity of affinity-purified DNA-binding proteins by adding high concentrations of nonspecific proteins. *Analytical biochemistry* **201**, 366-74.
- Zhang, Y., Fujita, N., and Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* **18**, 1131-8.
- Zhou, B., and Gitschier, J. (1997). hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7481-6.

Annexes

Liste des publications

Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Lefèbvre, E., Guiraud, P., 2008. **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.

Nzengue, Y., Steiman, R., Guiraud, P., 2008. **Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines.** *Free Radical Research*. 1-12

Publications soumises

Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Nemiche, S., Guiraud, P. **DNA damage and antioxidant response in C6 cells line exposed to cadmium.** *Toxicology in vitro*

Nzengue, Y., Lefèbvre, E., Steiman, R., Guiraud, P. **Metallothioneins expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium, copper and zinc.** *Biochemistry and Cell Biology*

Posters

NZENGUE Y., STEIMAN R., GARREL C., KADRI-DAKIR M. et GUIRAUD P. Etude des effets toxiques et du stress oxydant induit par le zinc et le cuivre sur deux lignées cellulaires. 4^{èmes} Journées Scientifiques de l'Institut des Métaux en Biologie de Grenoble, Autrans, 21-22 mars 2005.

NZENGUE Y., STEIMAN R., GARREL C., KADRI-DAKIR M. et GUIRAUD P. Implication du glutathion dans la toxicité induite par le cadmium chez les cellules HaCaT. 5^{èmes} Journées Scientifiques de l'Institut des Métaux en Biologie de Grenoble, Autrans, 20-21 avril 2006.

Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium

Yves Nzengue^a, Régine Steiman^a, Catherine Garrel^{a,b},
Emmanuel Lefèbvre^a, Pascale Guiraud^{a,b,*}

^a *Laboratoire 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*

^b *Département de Biologie Intégrée (DBI), Pavillon B, Hôpital de La Tronche, 38700 La Tronche, France*

Received 13 August 2007; received in revised form 4 October 2007; accepted 8 October 2007

Available online 16 October 2007

Abstract

Cadmium affects the cellular homeostasis and generates damage via complex mechanisms involving interactions with other metals and oxidative stress induction. In this work we used a human keratinocyte cell line (HaCaT) as a model to study the oxidative damage induced by cadmium to cellular macromolecules, its effect on the antioxidant systems and the role of glutathione in cell protection toward cadmium toxicity. The cells were incubated for 24 and 48 h with cadmium (3, 15, 50 and 100 μ M). High doses of cadmium were required to induce a cytotoxicity: 100 μ M lead to 30% mortality after 24 h and 50% after 48 h. The oxidation of lipids and proteins and the DNA damage, respectively, assessed by thiobarbituric acid reactants determination, thiol group measurement and comet assay, were observed for 50–100 μ M cadmium. The cytotoxic effects were strongly correlated to the cellular cadmium content. The glutathione peroxidase and the catalase activities were decreased, while the glutathione reductase activity and the glutathione concentration were increased after cadmium treatment. The superoxide dismutases activities were unchanged. A depletion in glutathione prior to cadmium exposure increased the cytotoxic effects and provoked DNA damage. Our results suggested that the hydroxyl radical could be the major compound involved in the oxidative stress generated by cadmium and that glutathione could play a major role in the protection of HaCaT cells from cytotoxicity but mostly from DNA damage induced by cadmium.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cadmium; Oxidative stress; HaCaT cells; DNA damage; Comet assay; Antioxidant enzymes; Glutathione

Abbreviations: BCA, bicinchoninic acid; BHT, 3,5-di-*tert*-4butylhydroxytoluene; BSA, bovine serum albumin; BSO, L-buthionine-SR sulfoximine; CAT, catalase; Cd, cadmium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTNB, 5-5' dithionitrobenzoic acid; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; FpG, formamidopyrimidine DNA glycosylase; GPx, glutathione peroxidase; GRase, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSht, total glutathione; GSSG, oxidized glutathione; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid; LD₁₀; LD₁₅; LD₃₀ and LD₅₀, lethal doses, concentrations of cadmium that lead, respectively, to approximately 10%, 15%, 30% or 50% cell death; MDA, malondialdehyde; MT, metallothionein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC, *N*-acetylcysteine; NADPH, nicotinamide dinucleotide phosphate; 8-OHdG, 8-oxo desoxiguanosine; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, reactive oxygen species; TBARs, thiobarbituric acid reactants; TEP, 1,1,3,3-tetraethoxypropane; TNB, 5-thio-2-nitrobenzoic acid.

* Corresponding author at: Laboratoire Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xénobiotiques (ORSOX), UFR de Pharmacie, Bâtiment Jean Roget 4e, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche, France. Tel.: +33 4 76 63 75 15; fax: +33 4 76 63 75 14.

E-mail address: pascale.guiraud@ujf-grenoble.fr (P. Guiraud).

1. Introduction

Cadmium (Cd) does not take part in any vital process. It is only known for its toxic effects on living organisms. It has been reported in the literature that Cd induces the synthesis of the metal binding proteins metallothioneins (MT) and that MT can protect cells against Cd toxicity (Klaassen and Liu, 1997). MT have a high binding-affinity for Cd and thus at high doses it will enter in competition with other metals like copper and zinc also bound by MT. Cd can be released from MT under certain conditions and free Cd is at the origin of the toxicity, but the displacement of copper and zinc from MT could also take part in some of the toxic effects observed. The itai-itai disease constitutes the most severe form of chronic intoxication by Cd observed in human. This syndrome has been mostly observed in the endemic area of the basin of the Jinzu river (Toyama, Japan) where Cd is intensively produced since 1945. The syndrome of itai-itai is characterized by an osteomalacia, an osteoporosis and multiple fractures associated with a dysfunction of the kidneys. The people suffering from malnutrition as well as the menopausal women are more particularly sensitive (Kjellstrom, 1986). The exposure to Cd can also be responsible for anaemia in human (Horiguchi et al., 1994) and in the rodents (Hiratsuka et al., 1996; Sakata et al., 1988). Moreover, there is increasing evidence from epidemiological and experimental studies that even low exposure to Cd poses a significant risk for human health. The International Agency for Research on Cancer (IARC) and the US National Toxicology Program (US NTP) have classified Cd as a category I human carcinogen (IARC, 1993; US NTP, 2000).

The mechanisms responsible for Cd toxicity are cell-type dependent. It seems that many toxic effects of Cd are indirect. This metal could cause intracellular reduction in the level of the main antioxidant compounds. Indeed, Cd inactivates enzymes and other antioxidants molecules by interaction with the thiol groups contained in these molecules (glutathione or proteins) or it can provoke homeostasis alteration of physiological metals such as copper, zinc and iron (Filipic et al., 2006; Huang et al., 2006). The inactivation of cellular antioxidant molecules can result in an increase in reactive oxygen species (ROS) such as the hydroxyl radical, the superoxide anion or the hydrogen peroxide (Fotakis et al., 2005; Galan et al., 2001; O'Brien and Salacinski, 1998; Oh et al., 2006; Stohs et al., 2001; Waisberg et al., 2003). The ROS will generate damage to lipids (lipid peroxidation) (Tweeddale et al., 2007), proteins and DNA (Ercal et al., 2001; Figueiredo-Pereira et al., 1998). Direct interactions between Cd and DNA have been excluded

(Valverde et al., 2001). Gichner et al. (2004) showed that with low Cd concentrations, the lesions induced on DNA are related preferentially to indirect mechanisms.

Among the other mechanisms proposed for Cd toxicity and carcinogenesis are interaction with the regulation of proto-oncogenes (Waisberg et al., 2003), the inhibition of DNA repair systems (Hartwig and Schwerdtle, 2002) and the induction of apoptosis (Shih et al., 2004).

In this work, our hypothesis was that the impact of Cd on the cells could result from a balance between inhibition of some antioxidant activities and induction of transcription of genes for other antioxidant factors. For instance, studies in the plant *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze or in the A549 cells demonstrated that Cd induced an increase in the transcripts levels of two enzymes involved in glutathione synthesis: the gamma-glutamylcysteine synthetase and the glutathione synthetase. The authors related that to the resistance of the plant and the cells to high level Cd exposure (Mohanpuria et al., 2007; Hatcher et al., 1995).

Biochemical and molecular mechanisms leading to oxidative stress induced by Cd, cell response and adaptation to Cd toxicity, and the role in these phenomena of glutathione and antioxidant enzymes are still poorly known in human epidermal cell lines. The skin constitutes one potential target since Cd can contaminate different ecosystems among which rivers and lake, but also the atmosphere. It has been shown that the UV radiations can increase the toxicity of Cd in skin cells (Jourdan et al., 2002; Yamada et al., 2004). Our work was completed with the aim of better understanding the effect of Cd on the cellular antioxidant systems in skin cells using the human keratinocyte HaCaT cell line as a model.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The spontaneously immortalized human keratinocyte HaCaT cell line was from the DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; Fusenig and Boukamp, 1998). The cells were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ humidified atmosphere in RPMI 1640 medium (Invitrogen, France) containing 10% FCS (Biotechnologie, France), penicillin (5000 U/ml)/streptomycin (50 µg/ml), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, France).

2.2. Cell treatment with cadmium, buthionine sulfoximine and N-acetylcysteine

Stock solutions of cadmium chloride (CdCl₂, 10 mM), buthionine sulfoximine (BSO, 10 mM) and N-acetylcysteine

(NAC, 0.1 mM) were prepared in distilled water and sterilized by filtration. A sufficient quantity of these stock solutions was added to the culture medium to obtain the desired final concentrations. CdCl₂, BSO and NAC were from Sigma (France).

HaCaT cells were seeded in flasks 24 h before treatments with Cd, BSO or NAC. The following day, the culture medium was replaced by fresh medium containing increasing concentrations of Cd (3, 15, 50 and 100 µM), BSO (5–200 µM) or NAC (1–10 µM) and the cells were incubated for 24 and 48 h. Then cells were submitted to viability assay and comet assay, or harvested for oxidative stress markers or antioxidant enzymes determination. A control without any treatment was systematically included in each experiment.

For BSO and NAC experiments, these compounds were added either 24 h before Cd or simultaneously with Cd. The working concentrations chosen corresponded to the one giving the maximum depletion in glutathione for BSO (80 µM) and the one giving the maximum increase in glutathione level for NAC (6 µM). Viability assays were run to make sure that these concentrations were not toxic (Kelly, 1998; Wispriyono et al., 1998).

2.3. Cell viability assay

After treatment with various Cd, BSO or NAC concentrations for 24 h or 48 h, the viability of the HaCaT cells was determined colorimetrically using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, France) assay (Mosmann, 1983). Cells were washed with phosphate buffer saline (PBS, Invitrogen, France) and incubated at 37 °C for 2 h in fresh culture medium containing MTT (100 µl/ml of medium). Then the cells were washed with PBS and lysed by dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, France). The colored formazan crystals formed after conversion of the tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenases were solubilized and measured by spectrophotometry at 570 nm.

2.4. Comet assay

(Alapetite et al., 1996; Emonet-Piccardi et al., 1998)

DNA damage induced by Cd was evaluated using the comet assay in individual cells. HaCaT cells were incubated with Cd (15, 50 and 100 µM) for 24 and 48 h with or without a previous treatment with BSO or NAC. To prepare the comet slides, the cells were suspended in low melt point agarose. Then, the slides were immersed overnight in a cell lysis buffer in the dark at 4 °C, in order to prevent non-specific DNA damage and the repair processes from occurring. For the formamidopyrimidine DNA glycosylase (FpG, Sigma, France) experiments: after the lysis stage, the slides were washed three times in endonuclease buffer (40 mM HEPES; 0.1 M KCl; 0.5 mM EDTA, pH 8). Then 100 µl of FpG dilution (1/50 in endonuclease buffer) was deposited on the slides and the slides were incubated at 37 °C for 30–45 min. The controls contained endonuclease buffer only (Collins et al., 1993; Dusinska, 1996; Lazarova et al., 2006; Pouget et al., 2000).

Next, the slides were placed in a horizontal electrophoresis unit containing freshly prepared electrophoresis buffer (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH). The DNA was allowed to unwind for 40 min before electrophoresis was performed at 25 V, 300 mM for 30 min. After neutralization (0.4 M Tris–HCl, pH 7.4) 50 µl of 0.5 mg/ml ethidium bromide was pipetted on the slides to stain the DNA. Analysis was performed using a fluorescence microscope (Leitz, Germany) connected to a video camera (Kinetic Imaging, USA) for taking and analyzing (Komet IV software, Kinetic Imaging, USA) representative pictures of each slide. The quantification of DNA damage was performed using percentage of DNA in the comet tail. For each condition, the average of % tail DNA was determined using three different slides prepared as previously described, 50 cells were analyzed per slide (Didier et al., 2001).

2.5. Cellular cadmium determination

After a 24 h incubation with Cd (15, 50 and 100 µM), the HaCaT cells were trypsinized 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 cycles. The lysates were centrifuged at 20 °C for 10 min at 2665 × g to obtain the soluble fraction. The cellular Cd concentrations were determined by atomic absorption spectrometry (Perkin-Elmer 306, USA). Results were given as microgram per gram of soluble cell protein.

2.6. Determination of stress markers and antioxidant enzymes

2.6.1. Preparation of the cellular extracts

After the different treatments HaCaT cells were trypsinized and harvested. The pellets obtained after centrifugation (2 min, 2665 × g, 4 °C) were resuspended in isotonic Tris–HCl buffer (20 mM, pH 7.4, 300 mOsm) centrifuged for 2 min at 2665 × g at 4 °C 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 groups determination, aliquots were taken from the whole homogenized lysate. The other determinations were performed on the supernatants obtained after centrifugation of the lysates at 4 °C for 10 min at 2665 × g. The extracts were stored at –80 °C, until analyses.

2.6.2. Quantitative protein determination

Protein levels in total cell lysates and in soluble fractions were determined using the BCATM Bincinchoninic acid kit (Pierce).

2.6.3. Quantitative determination of glutathione levels (Akerboom and Sies, 1981; Baker et al., 1990)

Samples of whole lysates were deproteinized by adding an aqueous solution of 6% metaphosphoric acid. The mixtures were centrifuged at 4 °C for 10 min at 2665 × g. Total glutathione (GSht) was determined according to the method of Akerboom and Sies (1981), which was slightly modified

(Emonet et al., 1997) and based on the spectrophotometric evaluation of the reduction rate of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma, France) into 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). Values were determined by comparing the reduction rate against a standard curve of glutathione. Oxidized glutathione (GSSG) was determined under the same conditions after adjusting pH with ethanolamine and trapping the reduced glutathione (GSH) with 3-vinyl pyridine added to the sample. Glutathione levels (GSHt, GSH and GSSG) were expressed as micromoles per gram of total cell proteins.

2.6.4. Quantitative determination of thiobarbituric acid reactants

Lipid peroxidation was evaluated by thiobarbituric acid reacting substance (TBARs) determination (Placer et al., 1966; Richard et al., 1992), using a 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) calibration curve. The measurement was by fluorimetry (excitation: 532 nm, emission: 553 nm; fluorimeter Perkin-Elmer, USA) and the TBARs levels were expressed as micromole per gram of soluble cell proteins.

2.6.5. Quantitative determination of thiol groups (Bulajetal., 1998; Ellman, 1959)

Protein oxidation was evaluated by thiol groups (SH) determination. The colorimetric method used rests on the reducing properties of the SH groups. 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 given by projection on standard curve and expressed as micro mole per gram of total cell proteins.

2.6.6. Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by a modified method of Flohe and Gunzler (1984). The rate of glutathione oxidized by *tert*-butyl hydroperoxide (30 mM) was evaluated by the decrease of NADPH, H⁺ (8.4 mM in Tris buffer) at 340 nm in the presence of EDTA (1 mM), excess reduced glutathione (0.15 M in Tris buffer) and glutathione reductase (200 U/ml in Tris buffer). GPx activity was expressed as international units per gram of soluble cell proteins.

2.6.7. Glutathione reductase activity

Glutathione reductase (GRase) activity was measured by a method developed in our laboratory, derived from that described by Carlberg and Mannervik (1985). The principle is the measurement at 340 nm of NADPH consumption catalyzed by GRase in the presence of GSSG. Results were given as international units per gram of soluble proteins.

2.6.8. Catalase activity

Catalase (CAT) activity was determined by the method described by Beers and Sizer (1952). Activity was assayed by determining the rate of degradation of H₂O₂ at 240 nm in 10 mM of potassium phosphate buffer (pH 7). The reaction

rate was related to the amount of CAT present in the mixture. Results were expressed as international units per mg of soluble cell proteins.

2.6.9. Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activities (total SOD, MnSOD and Cu/ZnSOD) were determined using the pyrogallol assay following the procedure 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 240 nm. SOD activities were expressed as international units per mg of soluble cell proteins.

2.7. Statistical analyses

Each experiment was repeated three times. All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, and were analyzed by analysis of variance with ANOVA test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cytotoxicity of cadmium

The results obtained were expressed as a percentage (%) of survival, using the untreated cells as reference (Fig. 1). The results showed that cellular viability remained stable for concentrations of Cd up to 50 μ M. The curve showed a marked reduction ($p < 0.01$) in cellular viability with 100 μ M of Cd.

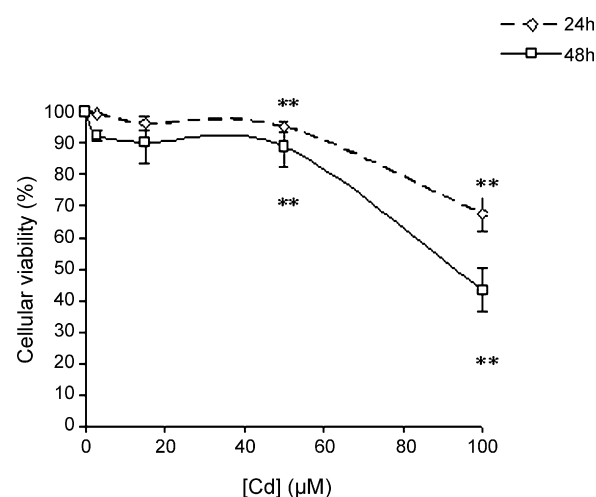


Fig. 1. Cytotoxicity of cadmium (Cd) to HaCaT cells. Cells were incubated with 5, 15, 50 and 100 μ M Cd for 24 and 48 h. Viability was assessed by the MTT colorimetric assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. (** $p < 0.01$).

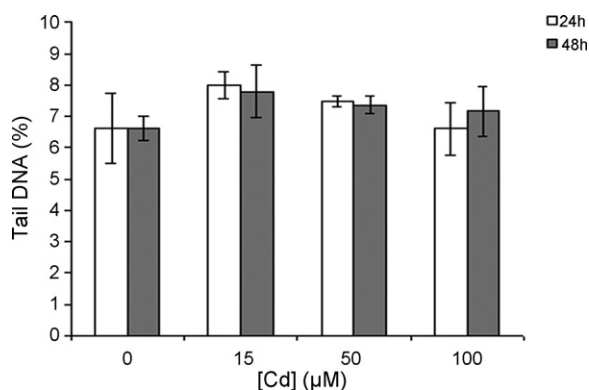


Fig. 2. DNA damage after HaCaT cells treatment with 15, 50 and 100 μM cadmium (Cd) for 24 and 48 h. The DNA damage was assessed by the comet assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. ($p > 0.05$).

The curve % of survival = $F(C_{\text{cadmium}})$ made it possible to determine approximately LD_{10} : 15 μM , LD_{15} : 50 μM , LD_{30} : 100 μM for 24 h incubation and LD_{50} : 100 μM for 48 h incubation (concentrations which cause death of 10%, 15% and 30 or 50% of the cells). These three concentrations were used for the continuation of the study.

3.2. DNA damage induced by cadmium

The results obtained (Figs. 2 and 3) showed that Cd induces DNA damage in HaCaT cells. An increasing tendency in the percentage of tail DNA was observed between control cells and the cells treated with Cd (15

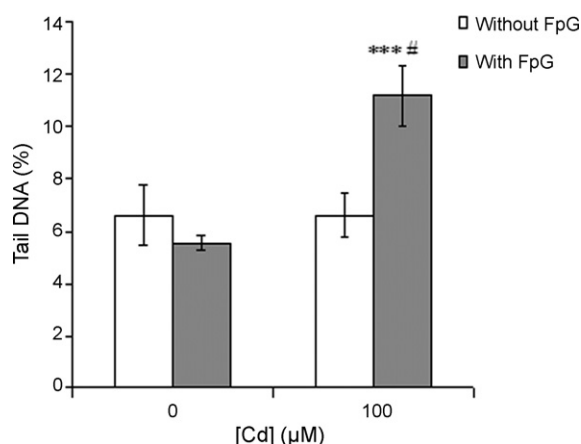


Fig. 3. Effect of FpG after HaCaT cells treatment for 24 h with 100 μM cadmium (Cd). The comet assay was carried out after 24 h of incubation with Cd and FpG treatment. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. (***) $p < 0.001$; # $p < 0.05$, indicates a difference compared to the cells treated with Cd).

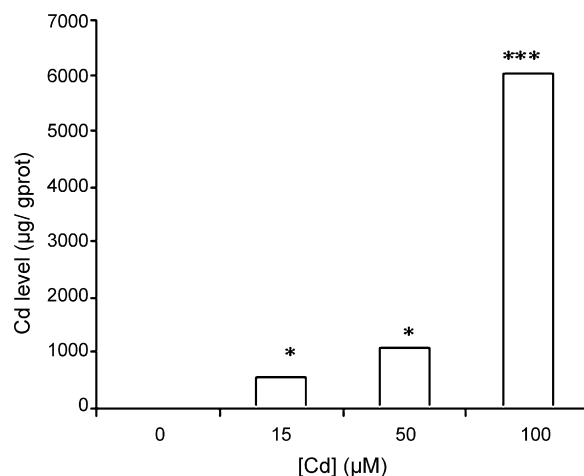


Fig. 4. Cadmium (Cd) levels in HaCaT cells after 24 h incubation with 15, 50, 100 μM Cd. The cellular concentrations of Cd were determined by atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer 306). Data were mean $\pm$ S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

and 50 μM), but this was not significant ($p > 0.05$; Fig. 2). The FpG is known for its role in the 8-oxo desoxyguanosine (8-OHdG) elimination from DNA. If 8-OHdG is present, the action of this enzyme results in an increase of the DNA damage observed with the comet assay (Lazarova et al., 2006). The HaCaT cells were treated with 100 μM Cd for 24 h and the cells were collected and treated with FpG before being submitted to the comet assay. The DNA damage increased significantly by 40% when FpG was applied compared to control cells only submitted to Cd (Fig. 3).

3.3. Cellular cadmium

The cellular contents in Cd were measured after 24 h of incubation with Cd (15, 50 and 100 μM) (Fig. 4). The results showed an increase in cellular Cd. The cellular concentration remained low up to 50 μM , but was dramatically increased for the treatment with 100 μM Cd.

3.4. Oxidative stress markers

In order to evaluate the oxidative changes in HaCaT cells after 24 or 48 h incubation with various Cd concentrations, several oxidative stress markers were measured.

Glutathione (GSH), a ubiquitous sulfhydryl compound, has been implicated to function in cytoprotection against cadmium toxicity. Our results showed that the total glutathione (GSHt) level was significantly

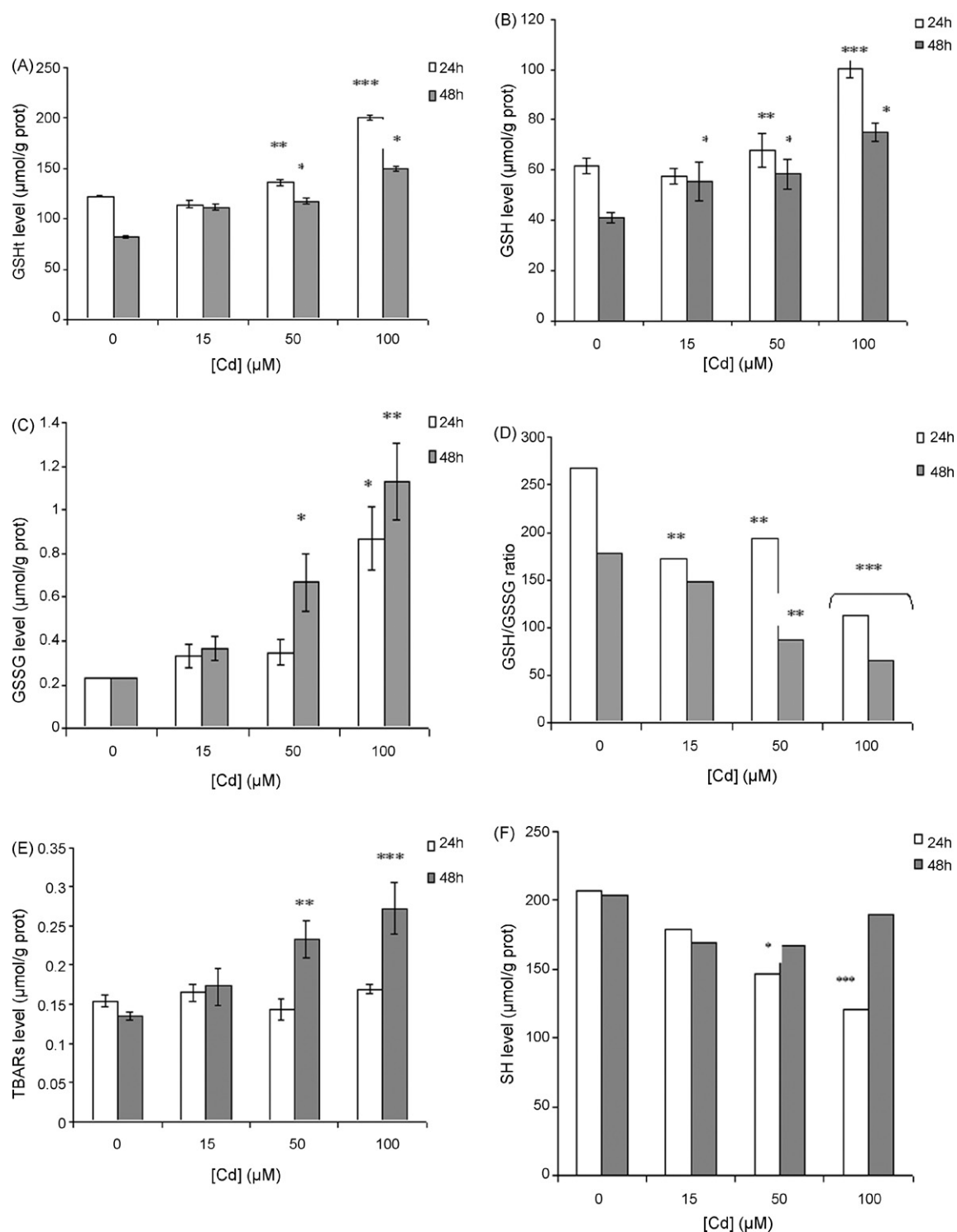


Fig. 5. Effect of cadmium (Cd) on (A) GSht level, (B) GSH level, (C) GSSG level, (D) GSH/GSSG ratio, (E) TBARs level and (F) thiol groups level. HaCaT cells were treated or not (control) with 15, 50, 100 μM Cd; and GSht, GSH, GSSG, TBARs and thiol groups levels were determined after 24 and 48 h. Data were mean $\pm$ S.D. of three independent experiments (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

increased after cell treatment with 50 and 100 μM both after 24 and 48 h (Fig. 5A). The determination of the reduced glutathione (GSH) and the oxidized glutathione (GSSG) levels showed that they were both significantly increased after cell treatment with 50 and 100 μM of Cd (Fig. 5B and C). Thus, the increase in GSht appeared to be the result of the increase of both GSSG and GSH levels (Fig. 5A–C). These results strongly suggested that Cd could induce the transcription of the genes involved in GSH biosynthesis in some cell types and comforted the results obtained by Hatcher et al. (1995) in A459 cells.

The GSH/GSSG ratio decreased significantly both after 24 and 48 h of incubation with Cd (Fig. 5D). These results were in favour of the induction of an oxidative stress by Cd in HaCaT cells.

The TBARs level increased significantly only after 48 h of cell treatment by 50 and 100 μM Cd (Fig. 5E). This result indicated that Cd induced lipid peroxidation in HaCaT cells.

A dose-dependent and significant reduction in protein SH group level was observed after 24 h incubation with Cd (30% from control at 100 μM Cd; Fig. 5F). After 48 h, the SH level decrease was not significant. These results showed that Cd was also able to induce a protein oxidation.

Altogether these results (GSH/GSSG ratio, TBARs and SH group levels) showed that Cd (15, 50, 100 μM) affected the cellular redox status and generated an oxidative stress in HaCaT cells. These effects were more marked for 50 and 100 μM of Cd and the impact on glutathione and SH group was more obvious after 24 h while the increase in TBARs occurred after 48 h.

3.5. Antioxidant enzymes

The GPx activity was gradually and very significantly reduced in HaCaT cells treated for 24 and 48 h with 15, 50 and 100 μM of Cd. The decrease in GPx activity was slightly more significant after 48 h than after 24 h incubation with Cd (Fig. 6A).

The GRase activity was only significantly increased for 100 μM Cd after 24 h incubation, while the increase after 48 h was slight but significant with all the Cd concentrations tested (Fig. 6B). This result was in agreement with the increase in GSH observed on Fig. 5B.

Thus, the increase in GSSG observed was seemingly not linked to GPx and GRase activities.

A significant reduction in CAT activity was obtained after HaCaT cells treatment with 50 and 100 μM Cd for 24 h (Fig. 6C), while Cd did not affect significantly CAT activity after 48 h incubation.

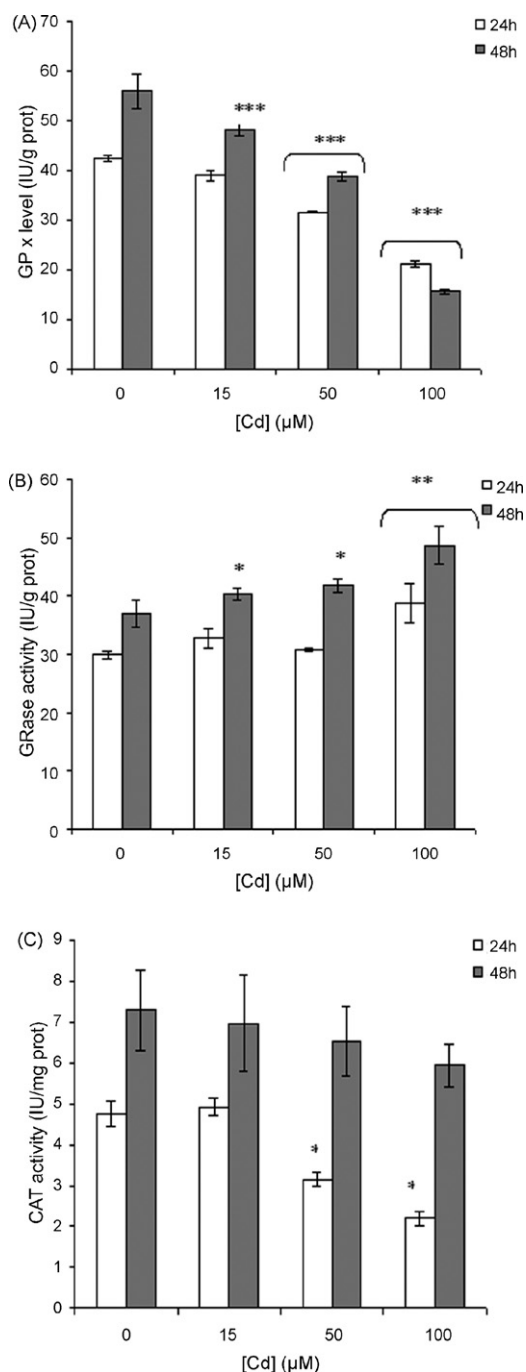


Fig. 6. Effect of cadmium (Cd) on (A) GPx activity, (B) GRase activity and (C) CAT activity. HaCaT cells were treated or not (control) with 15, 50, 100 μM ; and GPx, GRase and CAT activities were determined after 24 and 48 h. Data were mean $\pm$ S.D. of three independent experiments (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

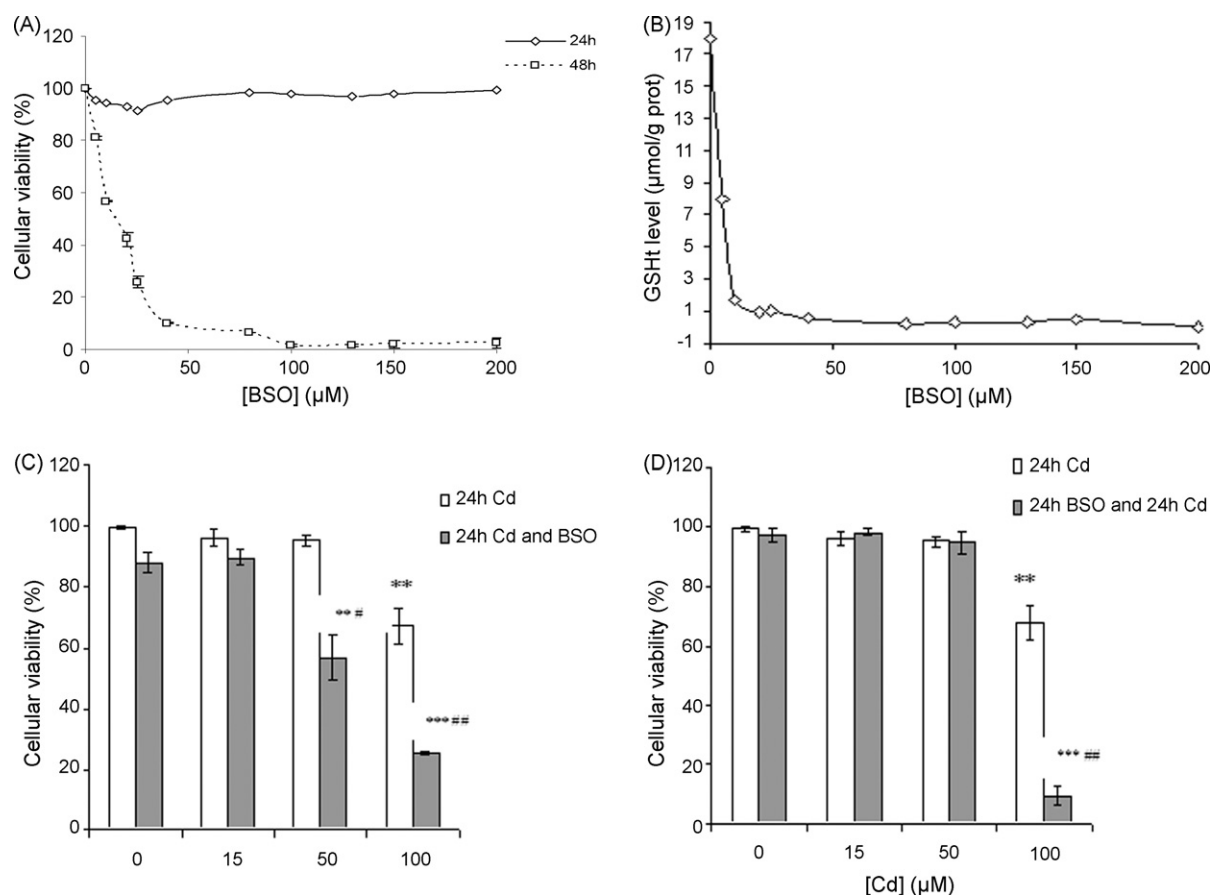


Fig. 7. Effect of buthionine sulfoximine (BSO) on cadmium (Cd)-induced cytotoxicity in HaCaT cells. (A) Cytotoxicity of BSO to HaCaT cells ($p < 0.05$). (B) Determination of GSht content in HaCaT cells after BSO treatment for 24 h ($p < 0.05$). (C) BSO (80 μM) and Cd (15, 50 and 100 μM) were added at the same time and cells were incubated for 24 h; or (D) cells were first incubated with BSO (80 μM) for 24 h followed by Cd treatment (15, 50 and 100 μM Cd) for another 24 h period. The MTT colorimetric assay was performed to evaluate the cytotoxicity. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$, indicates a difference compared to the cells treated with Cd).

No changes were observed concerning the Cu/Zn SOD and the Mn SOD activities in our experimental conditions (data not shown).

On the whole Cd affected intracellular GPx, GRase and CAT activities but not the SOD activities.

3.6. Influence of glutathione on Cd-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells

3.6.1. Depletion in GSht

The HaCaT cells were cultivated 24 and 48 h in the presence of increasing doses of BSO, a selective and powerful inhibitor of glutathione synthesis, in the culture medium. The aim was to determine the lowest concentration leading to the maximum depletion in GSht. The MTT colorimetric test was used to assess the viability of the cells. BSO was not toxic for the HaCaT

cells after 24 h but was cytotoxic after 48 h incubation (Fig. 7A).

The GSht determination was done after 24 h treatment with BSO. The intracellular concentration in GSht decreased significantly from 5 to 80 μM BSO. Then a plateau was reached ($p < 0.001$; Fig. 7B). The concentration of 80 μM in BSO was chosen for the rest of the experiments.

The HaCaT cells were incubated with 80 μM of BSO and 15, 50 and 100 μM Cd simultaneously for 24 h. The viability of the cells was significantly decreased for 50 and 100 μM Cd (Fig. 7C). In a second series of experiments, the cells were stressed with Cd 24 h after incubation with 80 μM BSO. This time the viability was only significantly decreased for 100 μM Cd (Fig. 7D). These results were in favour of a contribution of GSht to the resistance of HaCaT cells to Cd toxicity.

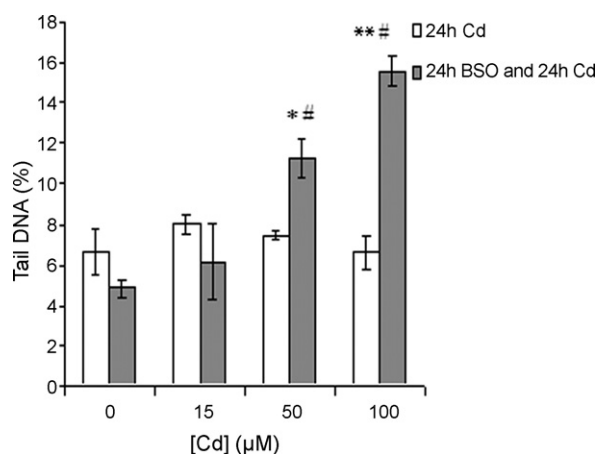


Fig. 8. Effect of BSO and cadmium (Cd) coincubation on HaCaT DNA. Cells were incubated for 24 h with BSO (80 μ M) then 24 h with Cd (15, 50 and 100 μ M). DNA damage was assessed by the comet assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. (* p < 0.05; ** p < 0.01; # p < 0.05, indicates a difference compared to the cells treated with Cd).

The DNA damage was analyzed using the comet assay after incubating the cells first with 80 μ M BSO for 24 h and then with Cd (15, 50 and 100 μ M) for 24 h. The % tail DNA increased significantly compared to the control (from 6% for the control and BSO alone to 16% for BSO and 100 μ M Cd) (Fig. 8). This result was in agreement with the cytotoxicity assay which showed that the high Cd concentrations induced an important cellular mortality when glutathione was absent (Fig. 7D). GSHt seemed to take part in the protection against the DNA damage induced by Cd in HaCaT cells.

3.6.2. Supplementation in glutathione

HaCaT cells were cultivated 24 and 48 h in the presence of increasing doses of NAC, a selective inducer of glutathione synthesis, in the culture medium. The aim was to determine the lowest concentration leading to the maximum increase in GSHt. The MTT colorimetric test was used to assess the viability of the cells. NAC was less toxic (82% of cellular viability from untreated control) for the HaCaT cells after 24 h but was significantly cytotoxic after 48 h incubation (Fig. 9A).

The NAC treatment did not increase significantly the GSHt level compared to control (data not shown). However, with 6 μ M NAC, a slight tendency to increase GSHt was noticed. This concentration was chosen for the rest of the experiments.

The HaCaT cells were incubated with 6 μ M NAC and 15, 50 and 100 μ M Cd simultaneously for 24 h. The viability of the cells was surprisingly significantly decreased for all Cd concentrations (Fig. 9B). In a second series of

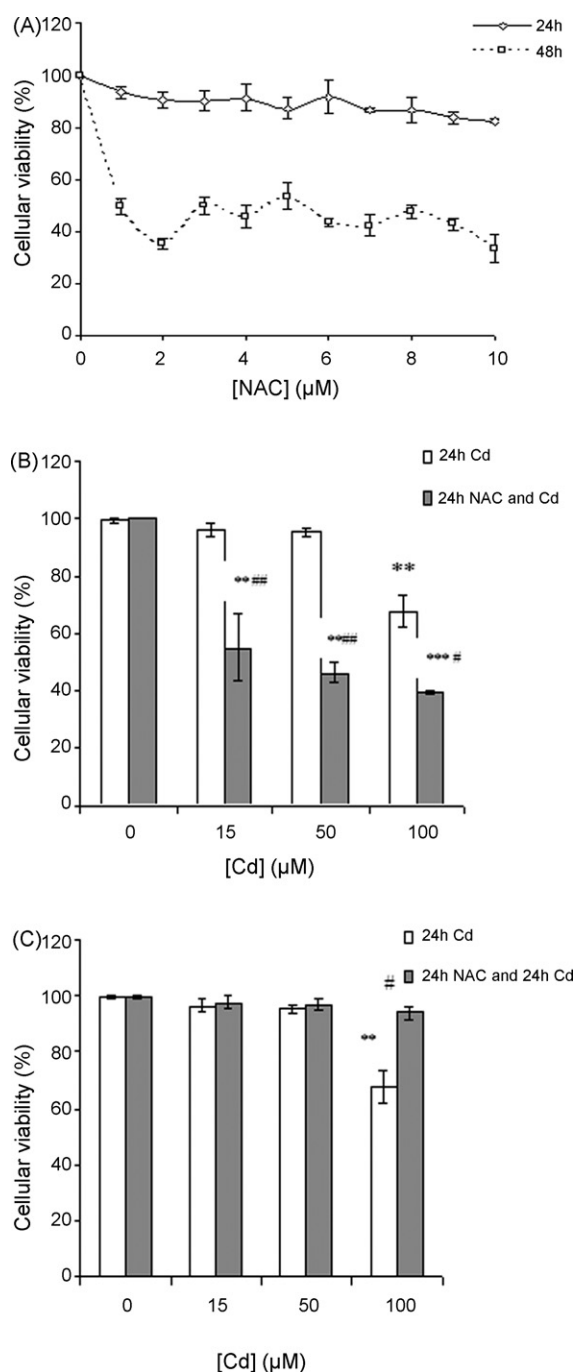


Fig. 9. Effect of *N*-acetylcysteine (NAC) on cadmium (Cd)-induced cytotoxicity in HaCaT cells. (A) Cytotoxicity of NAC to HaCaT cells (p < 0.05 for 48 h NAC), (B) NAC (6 μ M) and Cd (15, 50 and 100 μ M) were added at the same time and cells were incubated for 24 h or (C) cells were first incubated with NAC (6 μ M) for 24 h followed by Cd treatment (15, 50 and 100 μ M) for another 24 h period. The colorimetric MTT assay was performed to evaluate the cytotoxicity. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; # p < 0.05 and ## p < 0.01, indicate a difference compared to the cells treated with Cd).

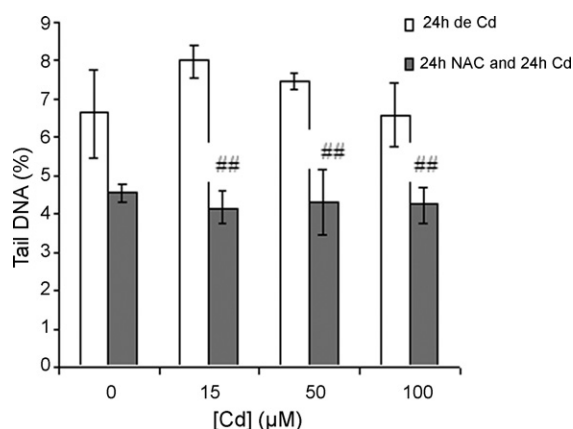


Fig. 10. Effect of NAC and cadmium (Cd) coinubation on HaCaT DNA. Cells were incubated for 24 h with NAC (6 µM) then 24 h with Cd (15, 50 and 100 µM). DNA damage was assessed by the comet assay. Each experiment was repeated three times and data were expressed as mean $\pm$ S.D. ($p > 0.05$; ## $p < 0.01$, indicates a difference compared to the cells treated with Cd).

experiments, the cells were stressed with Cd 24 h after incubation with 6 µM NAC. This time the viability of the cells was not affected for 15 and 50 µM Cd, and the viability was significantly increased for 100 µM Cd ($p < 0.05$; Fig. 9C). These observations confirmed the fact that glutathione takes part in resistance to Cd in HaCaT cells.

The DNA damage was analyzed using the comet assay after incubating the cells first with 6 µM of NAC for 24 h and then with Cd (15, 50 and 100 µM) for 24 h. The % tail DNA remained at the level of the NAC control (without Cd) for all the Cd concentrations and were significantly lower than those obtained with the different concentrations of Cd alone (Fig. 10).

4. Discussion

In the present work the viability assays performed on HaCaT cells submitted to a stress with Cd showed that these cells were relatively resistant to Cd. Only few differences were observed between 24 and 48 h incubation except for 100 µM Cd where the mortality was 30% after 24 h and 50% after 48 h incubation. Indeed the literature data concerning different other cell types usually indicate lower values for Cd cytotoxicity (Kim et al., 2003; Oh et al., 2006). Watjen and Beyersmann (2004) found a LD₅₀ of 0.68 µM in C6 rat glioma cells after 24 h incubation with Cd. The results of the cellular Cd determination were in agreement with the cytotoxicity data and showed that the cellular Cd concentration remained very low when the cells were treated with doses up to 50 µM Cd compared to that obtained after a treatment

with 100 µM Cd. This resistance of HaCaT cells to Cd uptake can easily explain their tolerance for high doses of Cd.

Concerning the DNA damage, the comet assay did not allow to point out any significant damage induced by Cd even for the highest concentration of 100 µM, although the cellular Cd concentration was very high. Cd seemed not genotoxic for HaCaT cells with the selected concentrations and under our experimental conditions. Others studies suggested that Cd induces genotoxicity but these data were obtained with other cell lines (Cao et al., 2007; Fotakis et al., 2005; Risso-de Faverney et al., 2001).

Recent works showed an increase in tail DNA or other comet parameters when FpG was applied. That indicated the capacity of Cd to induce the 8-OHdG (Blasiak et al., 2004; Lazarova et al., 2006; Wozniak and Blasiak, 2003). Our results confirmed these observations. The 8-OHdG is a common and mutagenic form of the oxidation of guanine in DNA. Several authors showed that the increase in 8-OHdG is explained by the reduction, by Cd or other compounds, of cells capacities to repair DNA oxidative damages. Indeed, Cd is known to interact with the OGG1 action, an enzyme which eliminates the 8-oxoguanin by base excision repair system (Bravard et al., 2006; Filipic and Hei, 2004; Potts et al., 2003; Watjen and Beyersmann, 2004; Zharkov and Rosenquist, 2002). The inhibition of human OGG1 (hOGG1) by Cd results from an indirect oxidation of cysteines (which are essential for enzyme activity) (Bravard et al., 2006). Cd can also lower the rate of transcription of hOGG1 by decreasing or preventing the Sp1 transcription factor from binding to hOGG1 promoter (Youn et al., 2005). Altogether our results with the comet assay showed no direct damage induced by Cd but the breaks in DNA provoked by FpG were in favour of the formation of 8-OHdG and of an inhibitory effect of Cd on the base excision repair system in HaCaT cells.

ROS are known to play different roles in living organisms and in cells according to their level. A low and regulated production is necessary for the regulation of several fundamental processes, while an increased level is harmful (Valko et al., 2004). At physiological levels ROS are implicated in normal processes such as cellular division and probably differentiation. Indeed, the hydroxyl radical OH• resulting from H₂O₂ decomposition would play a significant physiological role in the growth and cellular maturation (Zs-Nagy, 1992), but it is also the most dangerous species among the ROS when overproduced. In pathology, the free radical species are involved in many processes like carcinogenicity or neurodegeneration (McCord, 2000; Schulz et al., 2000). In

excess these radicals can damage DNA and produce 8-OHdG, they can also oxidize proteins and lipids. ROS can be generated by endogenous physiological mechanisms or after exposure to exogenous compounds. Cd is one of the exogenous sources, it has been shown to indirectly generate ROS production in various cell lines (Ikediobi et al., 2004; Stohs et al., 2001; Szuster-Ciesielska et al., 2000a; Szuster-Ciesielska et al., 2000b; Watanabe et al., 2003; Watjen and Beyersmann, 2004). However, Cd has only one redox state and is unable to take part in redox cycles like some other metals such as iron or copper. The mechanisms by which it induces an oxidative stress in the cells are still poorly documented. It has been shown that Cd can compete with zinc, iron and copper and displace them from their physiological enzymes and proteins. This can alter the homeostasis and the metabolism of these metals and be partly responsible for the ROS generation (Block et al., 1992; Fotakis and Timbrell, 2006; Yang et al., 2000a; Yang et al., 2000b). Cd has also been shown to inhibit the electron transfer chain in mitochondria and thus provoke the generation of an abnormal level of ROS (Latinwo et al., 2006; Wang et al., 2004).

In order to determine if Cd generated an oxidative stress in HaCaT cells and if the antioxidant defenses in these cells could be involved in their resistance to Cd cytotoxicity and genotoxicity, several oxidative stress markers and the response of antioxidant enzymes were studied after a treatment with different concentrations of Cd. Our results confirmed that Cd induced an oxidative stress at least when incubating the cells with 100 μ M Cd. Not only the results obtained with FpG indicated a base oxidation in DNA, but we also showed that the TBARS level was increased and that the protein SH groups were decreased indicating, respectively, lipid and protein oxidation. The induction of lipid peroxidation by Cd has been reported in many studies on various cell types (Babu et al., 2006; Figueiredo-Pereira et al., 1998; Lopez et al., 2006).

In addition, the increase in GSSG level and the decrease in GSH/GSSG ratio were also in favour of the modification of the intracellular redox status and of an increased generation of ROS.

The balance between ROS and free radical generation, and the antioxidant systems is the key for maintaining a physiological intracellular redox status. The main components of the cellular antioxidant systems are: GSH and the enzymes CAT, SODs, GPx and GRase (McCord, 2000).

At high concentration, Cd provoked an increase in GSH level. The GRase which is the enzyme regenerating GSH from GSSG was increased significantly after

24 and 48 h treatment with Cd. The SODs activities were not affected while those of the peroxidases namely CAT and GPx were significantly decreased by Cd. Several studies showed that Cd affects the pattern expression of antioxidants enzymes differently (Choi et al., 2007; Croute et al., 2005; Hansen et al., 2007; Jung et al., 2002).

Altogether our results showed that Cd was able to break down the pro-oxidant/anti-oxidant balance and generate an oxidative stress. Two hypotheses can be proposed:

- either it is only the action of Cd on the mitochondrial respiratory chain which generates by itself an overproduction of ROS, leading to the inactivation of some important enzymes such as CAT and GPx,
- or Cd is able to interact directly with GPx and CAT, decreasing their efficiency in detoxifying peroxides and H_2O_2 .

The oxidative stress could also result from a combination of both processes. In all cases this would lead to an increased amount of H_2O_2 in the cells since we showed that the SODs activities remained unchanged. Consequently the production of the hydroxyl radical $OH^\bullet$ would increase in the cells and be responsible for the oxidative damage to the macromolecules and also the direct oxidation of GSH into GSSG. We have demonstrated that the increased GSSG level was at least not linked to modifications in GRase or GPx activities. It has been shown by Tweeddale et al. (2007) that proteins and thiol compounds such as GSH protect lipid membranes from oxidation by $OH^\bullet$ and thiol radicals. This report together with our observations concerning the early occurrence of an effect on thiol groups (after 24 h incubation with Cd) and a delayed increase in TBARS level after 48 h of incubation with Cd) could confirm the involvement of $OH^\bullet$.

Our results showed that HaCaT cells maintained their GSH level and their GRase activity in the presence of Cd. Glutathione has been considered as the first line of defense against metal toxicity (Freedman et al., 1989; Singhal et al., 1987). A Cd-induced depletion has been found in many cell lines (Figueiredo-Pereira et al., 1998; Koyuturk et al., 2006). For better understanding the role played by glutathione in the protection of HaCaT cells to Cd-induced cytotoxicity and genotoxicity, we used BSO and NAC as modulators of the intracellular level of GSht. The depletion of the HaCaT cells in GSht using BSO rendered them more sensitive to Cd since both the mortality and the DNA damage were increased. These results showed that glu-

tathione takes part in the cell protection to Cd and is particularly involved in the protection of DNA. However, the mechanisms remain to be determined. Glutathione could interact directly with Cd or with the free radicals generated by Cd. It has been shown that the intracellular glutathione can chelate Cd and contribute to protect the cell against this metal together with the metallothioneins (Gallego et al., 1996; Kang and Enger, 1987; Ochi et al., 1988).

NAC is known for its role as a precursor for glutathione synthesis and as an antioxidant agent being able to scavenge the ROS (Kelly, 1998; Wispriyono et al., 1998). Our results showed a significant decrease in cellular viability when HaCaT cells were incubated with Cd and NAC at the same time. These observations suggested a cumulative toxic effect of NAC and Cd in our experimental conditions this could result from an interaction between NAC and Cd in HaCaT cells or in the culture medium. NAC could chelate Cd and facilitate its uptake by the cells leading to an increased cellular Cd level.

NAC restored the cellular viability when incubated with the cells prior to Cd exposition. This was in agreement with some studies in other cell types (Hatcher et al., 1995; Prozialeck and Lamar, 1995) which showed that the increase in the intracellular glutathione protected the cells from the cytotoxicity of Cd. This protective effect was shown to be dependent on the NAC amount, but not on the period of preincubation (Wispriyono et al., 1998). These observations confirmed the study carried out with BSO and the fact that glutathione plays a significant role in the protection of HaCaT cells to the toxic effects of Cd. A recent study in the plant *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze demonstrated that Cd induced an increase in the transcripts levels of two enzymes involved in glutathione synthesis: the gamma-glutamylcysteine synthetase and the glutathione synthetase. The authors related that to the resistance of this plant to high level Cd exposure (Mohanpuria et al., 2007). This could also be the mechanism involved in HaCaT cells exposed to Cd and explain the increase in GSH level.

In conclusion, our results suggested that the hydroxyl radical could be the major compound involved in the oxidative stress generated by Cd. Glutathione could play a major role in the protection of HaCaT cells from cytotoxicity, but mostly from DNA damage induced by Cd. The Cd-induced increase in GSH level reflects an adaptative capacity of HaCaT cells to resist to Cd. Glutathione precursors could be of help in the protection of Cd-exposed populations toward the genotoxic effects induced by this metal.

Acknowledgments

We thank Philippe Schaeffer, Malika Kadri-Dakir, Sandra Grange and Angèle Krawiec for their technical assistance, and Muriel Stocklov for the cellular cadmium determination.

References

- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Alapetite, C., Wachter, T., Sage, E., Moustacchi, E., 1996. Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays. *Int. J. Rad. Biol.* 69, 359–369.
- Babu, K.R., Rajmohan, H.R., Rajan, B.K., Kumar, K.M., 2006. Plasma lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes status in workers exposed to cadmium. *Toxicol. Indust. Health* 22, 329–335.
- Baker, M.A., Cerniglia, G.J., Zaman, A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.* 190, 360–365.
- 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.
- Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Rykala, J., Kolacinska, A., Morawiec, Z., Drzewoski, J., Zadrozny, M., 2004. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat. Res.* 554, 139–148.
- Block, C., Freyermuth, S., Beyersmann, D., Malviya, A.N., 1992. Role of cadmium in activating nuclear protein kinase C and the enzyme binding to nuclear protein. *J. Biol. Chem.* 267, 19824–19828.
- 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.
- Bulaj, G., Kortemme, T., Goldenberg, D.P., 1998. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965–8972.
- Cao, F., Zhou, T., Simpson, D., Zhou, Y., Boyer, J., Chen, B., Jin, T., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W., 2007. p53-Dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 174–185.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.
- Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2007. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 595–600.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733–1735.
- 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.
- Croute, F., Beau, B., Murat, J.C., Vincent, C., Komatsu, H., Obata, F., Soleilhavoup, J.P., 2005. Expression of stress-related genes in

- a cadmium-resistant A549 human cell line. *J. Toxicol. Environ. Health* 68, 703–718.
- Didier, C., Pouget, J.P., Cadet, J., Favier, A., Beani, J.C., Richard, M.J., 2001. Modulation of exogenous and endogenous levels of thioredoxin in human skin fibroblasts prevents DNA damaging effect of ultraviolet A radiation. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 537–546.
- Dusinska, M.C., 1996. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern. Lab. Anim.* 24, 405–411.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Emonet, N., Leccia, M.T., Favier, A., Beani, J.C., Richard, M.J., 1997. Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol.* 40, 84–90.
- Emonet-Piccardi, N., Richard, M.J., Ravanat, J.L., Signorini, N., Cadet, J., Beani, J.C., 1998. Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. *Free Radic. Res.* 29, 307–313.
- 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.
- Figueiredo-Pereira, M.E., Yakushin, S., Cohen, G., 1998. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 273, 12703–12709.
- Filipic, M., Fatur, T., Vudrag, M., 2006. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 25, 67–77.
- Filipic, M., Hei, T.K., 2004. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 546, 81–91.
- Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–121.
- Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D., Timbrell, J.A., 2005. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol. In Vitro.* 19, 481–489.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol. Lett.* 164, 97–103.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598–5605.
- Fusenig, N.E., Boukamp, P., 1998. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinogen.* 23, 144–158.
- Galan, A., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernandez, C., de Blas, E., Aller, P., 2001. Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 38–46.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant. Sci.* 121, 151–159.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K., 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res.* 559, 49–57.
- Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67, 2241–2249.
- Hartwig, A., Schwerdtle, T., 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127, 47–54.
- Hatcher, E.L., Chen, Y., Kang, Y.J., 1995. Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 805–812.
- Hiratsuka, H., Katsuta, O., Toyota, N., Tsuchitani, M., Umemura, T., Marumo, F., 1996. Chronic cadmium exposure-induced renal anemia in ovariectomized rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 228–236.
- Horiguchi, H., Teranishi, H., Niiya, K., Aoshima, K., Katoh, T., Sakuragawa, N., Kasuya, M., 1994. Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on itai-itai disease in Japan. *Arch. Toxicol.* 68, 632–636.
- Huang, Y.H., Shih, C.M., Huang, C.J., Lin, C.M., Chou, C.M., Tsai, M.L., Liu, T.P., Chiu, J.F., Chen, C.T., 2006. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J. Cell. Biochem.* 98, 577–589.
- IARC, I.a.f.r.o.c., 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, vol. 58. IARC Scientific Publications, Lyon. pp. 119–237.
- 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.
- Jourdan, E., Emonet-Piccardi, N., Didier, C., Beani, J.C., Favier, A., Richard, M.J., 2002. Effects of cadmium and zinc on solar-simulated light-irradiated cells: potential role of zinc-metallothionein in zinc-induced genoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 405, 170–177.
- Jung, H.I., Lee, Y.Y., Lim, H.W., Ahn, K.S., Park, E.H., Lim, C.J., 2002. Regulation of the manganese-containing superoxide dismutase gene from fission yeast. *Mol. Cell.* 14, 300–304.
- Kang, Y.J., Enger, M.D., 1987. Effect of cellular glutathione depletion on cadmium-induced cytotoxicity in human lung carcinoma cells. *Cell. Biol. Toxicol.* 3, 347–360.
- Kelly, G.S., 1998. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* 3, 114–127.
- Kim, S.C., Cho, M.K., Kim, S.G., 2003. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. *Toxicol. Lett.* 144, 325–336.
- Kjellstrom, T., 1986. Renal effects. In: Cadmium and Health. In: Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellstrom et al., T., Nordberg, G. (Eds.), A Toxicological and Epidemiological appraisal. General Aspects. Effects and Response. Boca Raton, Florida, pp. 21–109.
- Klaassen, C.D., Liu, J., 1997. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metabol. Rev.* 29, 79–102.
- Koyuturk, M., Yanardag, R., Bolkent, S., Tunali, S., 2006. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 235–240.
- Latinwo, L.M., Badisa, V.L., Ikediobi, C.O., Odewumi, C.O., Lambert, A.T., Badisa, R.B., 2006. Effect of cadmium-induced oxidative stress on antioxidative enzymes in mitochondria and cytoplasm of CRL-1439 rat liver cells. *Int. J. Mol. Med.* 18, 477–481.
- Lazarova, M., Labaj, J., Eckl, P., Slamenova, D., 2006. Comparative evaluation of DNA damage by genotoxins in primary rat cells applying the comet assay. *Toxicol. Lett.* 164, 54–62.
- Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., Canadas, S., Gonzalez, M.P., 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 940–951.

- 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.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108, 652–659.
- Mohanpuria, P., Rana, N.K., Yadav, S.K., 2007. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ. Toxicol.* 22, 368–374.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- O'Brien, P., Salacinski, H.J., 1998. Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch. Toxicol.* 72, 690–700.
- Ochi, T., Otsuka, F., Takahashi, K., Ohsawa, M., 1988. Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. *Chem. Biol. Interact.* 65, 1–14.
- Oh, S.H., Choi, J.E., Lim, S.C., 2006. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology* 220, 1–12.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C., 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16, 359–364.
- Potts, R.J., Watkin, R.D., Hart, B.A., 2003. Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 184, 189–202.
- Pouget, J.P., Douki, T., Richard, M.J., Cadet, J., 2000. DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 541–549.
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C., 1995. Effects of glutathione depletion on the cytotoxic actions of cadmium in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 285–295.
- Richard, M.J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., Favier, A., 1992. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin. Chem.* 38, 704–709.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicol. (Amsterdam, Netherlands)* 53, 65–76.
- Sakata, S., Iwami, K., Enoki, Y., Kohzuki, H., Shimizu, S., Matsuda, M., Moriyama, T., 1988. Effects of cadmium on in vitro and in vivo erythropoiesis: erythroid progenitor cells (CFU-E), iron, and erythropoietin in cadmium-induced iron deficiency anemia. *Exp. Hematol.* 16, 581–587.
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J., 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem./FEBS* 267, 4904–4911.
- 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.
- Singhal, R.K., Anderson, M.E., Meister, A., 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1, 220–223.
- Stohs, S.J., 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.
- Szuster-Ciesielska, A., Lokaj, I., Kandefer-Szerszen, M., 2000a. The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells. *Toxicology* 145, 135–145.
- Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kamin-ska, T., Snieszko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J., Kandefer-Szerszen, M., 2000b. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145, 159–171.
- Tweeddale, H.J., Kondo, M., Gebicki, J.M., 2007. Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 459, 151–158.
- US NTP, 2000. Ninth report on carcinogens. In: National Toxicology Program. Research Triangle Park, NC, USA.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266, 37–56.
- 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 transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1434–1443.
- 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.
- Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65–78.
- Wispiyono, B., Matsuoka, M., Igisu, H., Matsuno, K., 1998. Protection from cadmium cytotoxicity by *N*-acetylcysteine in LLC-PK1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 344–351.
- Wozniak, K., Blasiak, J., 2003. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat. Res.* 535, 127–139.
- Yamada, H., Murata, M., Suzuki, K., Koizumi, S., 2004. Ultraviolet irradiation increases the sensitivity of cultured human skin cells to cadmium probably through the inhibition of metallothionein gene expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200, 251–257.
- Yang, M.S., Lai, K.P., Cheng, K.Y., Wong, C.K., 2000a. Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of CdCl₂. *Toxicology* 154, 103–111.
- Yang, X.F., Wang, S.Y., Zhao, R.C., Ao, S.Q., Xu, L.C., Wang, X.R., 2000b. Changes in tissue metals after cadmium intoxication and intervention with chlorpromazine in male rats. *Biomed. Environ. Sci.* 13, 19–25.
- Youn, C.K., Kim, S.H., Lee, D.Y., Song, S.H., Chang, I.Y., Hyun, J.W., Chung, M.H., You, H.J., 2005. Cadmium down-regulates human OGG1 through suppression of Sp1 activity. *J. Biol. Chem.* 280, 25185–25195.
- Zharkov, D.O., Rosenquist, T.A., 2002. Inactivation of mammalian 8-oxoguanine-DNA glycosylase by cadmium(II): implications for cadmium genotoxicity. *DNA Rep.* 1, 661–670.
- Zs-Nagy, I., 1992. A proposal for reconsideration of the role of oxygen free radicals in cell differentiation and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 673, 142–148.

This article was downloaded by:[Nzengue, Yves]
On: 23 February 2008
Access Details: [subscription number 790809856]
Publisher: Informa Healthcare
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954
Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Free Radical Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713642632>

Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines

Yves Nzengue ^a, Régine Steiman ^a, Pascale Guiraud ^a

^a EA-3776, LRC CEA 8M UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier, Domaine de La Merci, Laboratoire Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xénobiotiques (ORSOX), La Tronche, France

First Published on: 20 December 2007

To cite this Article: Nzengue, Yves, Steiman, Régine and Guiraud, Pascale (2007) 'Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines', Free Radical Research, 42:2, 142 - 153

To link to this article: DOI: 10.1080/10715760701837100

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10715760701837100>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article maybe used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines

YVES NZENGUE, REGINE STEIMAN, & PASCALE GUIRAUD

Laboratoire 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

Accepted by Professor M. Davies

(Received 29 June 2007; in revised form 30 November 2007)

Abstract

Cell death resulting from cadmium (Cd) intoxication has been confirmed to induce both necrosis and apoptosis. The ratio between both types of cell death is dose- and cell-type-dependent. This study used the human keratinocytes HaCaT expressing a mutated p53 and the rat glial cells C6 expressing a wild p53 as models to characterize Cd-induced apoptosis, using sub-lethal and lethal doses. At these concentrations, features of apoptosis were observed 24 h after C6 cell treatment: apoptotic DNA fragmentation and caspase-9 activation, whereas Cd did not induce caspase-3. In HaCaT, Cd did not induce apoptotic DNA fragmentation or caspase-9 and -3 activation. The results also showed that the inhibition of p53 led to a resistance of the C6 cells to 20 μ M Cd, decreased the apoptosis and increased the metallothioneins in these cells. p53 restoration increased the sensitivity of HaCaT cells to Cd but did not affect the MT expression. The results suggest that Cd induced apoptosis in C6 cells but a non-apoptotic cellular death in HaCaT cells.

Keywords: Cadmium, metallothioneins, apoptosis, p53, C6 cells, HaCaT cells

Abbreviations: CAPS, 3-cyclohexylamino-1-propanesulphonic acid; ROS, reactive oxygen species; Cd, cadmium; PBS, phosphate-buffered saline; ABTS, 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-sulphonate(6)]; TBS-T, tris-buffered saline containing tween 20; LEHD-pNA, N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-pNA (p-nitroanilide); DMSO, dimethylsulphoxide; AU, apoptotic units; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, foetal bovine serum; BCA, bicinchoninic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; BSA, bovin serum albumin; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; FIENA, fluorometric immunosorbent enzyme assay; AFC, 7-amido-4-trifluoromethyl-coumarin; DEVD-AFC, Acetyl-Asp-Lime-Valley-Asp-7-amido-4-trifluoromethyl-coumarin; DTT, dithiothreitol; DMEM, dulbecco modified eagle's medium; RPMI, roswell park memorial institute medium.

Introduction

Cadmium (Cd) is a naturally occurring metallic element, widely used in pigments, stabilizers, coatings and above all in nickel-cadmium batteries. This environmental toxicant has a biological half-life exceeding 25 years and can also be found in tobacco smoke, industrial emissions and food. Cd was classi-

fied as a type I carcinogenic by the International Agency for Research on cancer [1,2]. Mechanisms of Cd toxicity are multifactorious and dose and cell-type dependent. However, in spite of their diversity, the pathways affected in mammals by Cd exposure points to a general threat to basic cellular functions and can lead to cell death. The mechanisms by which

Correspondence: Pascale Guiraud, Laboratoire Oligoéléments et Résistance au Stress Oxydant induit par les Xénobiotiques (ORSOX), UFR de Pharmacie, Bâtiment Jean Roget 4e, Domaine de La Merci, 38700 La Tronche, France. Tél: +33 4 76 63 75 15. Fax: +33 4 76 63 75 14. Email: pascale.guiraud@ujf-grenoble.fr

Cd induces cellular death are usually discussed in view of the cell lines studied and the concentrations in this metal. In particular high doses of Cd (acute exposure) induce both necrosis and apoptosis. It seems that the oxygen reactive species formation, the lipid peroxidation, the generation of conditions which decrease the antioxidant levels and the inhibition of DNA repair are necessary for apoptotic induction [3–10].

Apoptosis results from a controlled combination of enzymatic activations and pro- or anti-apoptotic gene expression. This can induce cell self-destruction, without injuring surrounding cells, preserving tissue integrity, even that of the organization [11]. There is no inflammatory reaction [12] and it contradicts necrotic death which assumes an exogenic destruction producing a membrane alteration and the dispersion of the cellular contents. Many disorders in the mechanisms controlling apoptosis can be responsible for the release and progression of several pathologies. These can be characterized either by an apoptosis deficit or an excess of apoptosis. The apoptosis deficit is often associated with autoimmune and lymphoproliferative disease [13,14] development, but also with carcinogenesis [15]. On the other hand, the excess of apoptosis is involved in the development of many pathologies: congenital anomalies and chronic neurodegenerative disease such as Alzheimer's [16] and Parkinson's disease.

Several studies have shown that Cd toxicity leads to apoptosis in many models [17–22] such as HeLa cells [9] or fibroblasts [23]. The pro-apoptotic effect of Cd is mediated by various signalling pathways which trigger caspase-dependent or caspase-independent apoptosis [20]. Recent studies have focused on the role played by signalling cascades in apoptosis after exposure to Cd [17]. In these processes, molecules such as caspases or the p53 protein play an important role. Caspase activation is one of the factors intervening in the disorganization of the cell's cytoskeleton [24]. The p53 protein controls a large variety of genes whose products are involved in cellular cycle arrest and/or apoptosis [25,26] and can direct cellular cycle arrest in the G1 phase through the protein p21 activation. The tumour suppressor p53 is one of the most important factors intervening in the regulation of cellular proliferation and protects the cells against increased tumoural proliferation. It plays a central role in the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of p53 is an important stage of carcinogenesis. The p53 mutations have been observed in more than 50% of human cancers [27,28] activated in response to certain stressful situations such as DNA damage, oncogene activation or Cd cell treatment [29,30].

The upstream apoptotic pathways always converge towards a common effector [31] and lead to apoptotic DNA fragmentation. There are two types of DNA

fragmentation: high-molecular-weight fragmentation, from 50–300 Kpb [32] and low-molecular-weight fragmentation obtained by internucleosomal cleavage, from 150–200 pb [33,34]. These mechanisms constitute powerful apoptotic programmes present in the majority of cell types and are initiated by a variety of intra- or extracellular signals among which is the cell exposure to toxic heavy metals such as Cd.

The aim of the present study was to compare the apoptotic action of Cd in HaCaT cells expressing mutant p53 and C6 cells expressing wild type p53 and to describe the molecular mechanisms of apoptosis induced by Cd in these cell lines. Finally, certain authors have suggested a relation between p53 and metallothioneins. It seems that the absence of p53 involves an increase in metallothionein expression [35–37]. The metallothioneins exert antioxidant functions while acting on the homeostasis of essential elements such as zinc and copper and in the detoxification mechanisms of highly toxic metals such as Cd [38]. However, this relation is debated. To better understand the mechanisms of resistance of HaCaT cells against Cd, not only the relation between p53 and metallothioneins, but also the role of p53 in the cell death induced by Cd was studied.

Materials and methods

Cell culture

The spontaneously immortalized human keratinocyte HaCaT cell line came from the DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) [39]. The cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in RPMI 1640 medium (Invitrogen, France) containing 10% FCS ([Biotechnologie], France), penicillin (5000 U/mL)/streptomycin (50 mg/L) and 2 mm L-glutamine (Invitrogen, France).

C6 (ATCC, France) are cell lines from a rat glial tumour induced by N-methylnitrosourea [40,41]. The cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in D-MEM medium (Invitrogen, France) containing 10% FCS ([Biotechnologie], France), penicillin (5000 U/mL) and streptomycin (50 mg/mL).

Cells treatment with cadmium

A stock solution of cadmium chloride (CdCl₂, 10 mM) was prepared in distilled water and sterilized by filtration. A sufficient quantity of this stock solution was added to the culture medium to obtain the desired final concentrations: 4, 5 and 20 µM Cd for C6 cells and 15, 50 and 100 µM Cd for HaCaT cells. CdCl₂ came from Sigma (France).

Cells were seeded in different materials (96-well microplates, petri dishes) for 24 h incubation with each metal concentration. Then cells were harvested

for each experiment. A control with no treatment was systematically included in each experiment.

Apoptotic DNA fragmentation

The DNA fragmentation was quantified by the Cell Death Detection ELISA^{plus} colourimetric assay kit (Roche Diagnostics, France) after cell treatment with Cd for 24 h. After treatment, the floating cells were harvested and mixed with the coldly separated adherent cells. A total of 5×10^4 cells were taken, centrifuged (1500 rpm, 10 min at 4°C) and lysed. Then DNA fragmentation was measured as described according to the manufacturer's recommendations and revealed by ABTS at 405 nm. Results were expressed as the ratio of apoptotic cells in the treated cells vs the untreated cells and defined as the enrichment factor (AU = apoptotic units; [42]).

Caspase-9 activity

Caspases-9 activity was measured by using the Alexis colourimetric assay kit (Alexis, France). Cells were incubated with the different Cd concentrations for 24 h then were collected and lysed by 50 µL of lysis buffer for 10 min in ice. After centrifugation (10 000 g, 1 min), the proteins in supernatant were quantitated using the Pierce kit (Pierce, France). We incubated 150 µg of protein in reaction buffer (10 mm of DTT) with caspase-9 substrate (LEHD-pNA) for 1 h at 37°C; then the absorbance levels were measured at 405 nm.

Caspase-3 activity

The caspase-3 activity was specifically and quantitatively measured in microplates using the FIENA (Fluorometric Immunosorbent Enzyme Assay; Roche Diagnostics) fluorescent assay kit. A total of 2×10^6 cells were incubated and apoptosis was induced by Cd for 24 h. Cells were recovered and treated according to the method provided by the FIENA kit. Caspase-3 activity was revealed by the DEVD-AFC substrate. Fluorescence (AFC) was measured between 370–425 nm out of the excitation filter and 490–530 nm out of the emission filter. Caspase-3 activity was given by the standard curve.

Western blot detection of p53

Activation of p53 in HaCaT cells. The HaCaT cells were incubated with cell-permeable p53 activator (Calbiochem, France) in increasing concentrations from 0–30 µg/mL for 24 h. This activator is a synthetic peptide of 46 amino acids corresponding to p53 C-terminal amino acids. This peptide binds to the mutant p53 and restores the removed functions of p53 in the cells. The product and the concentrations

used in our study were described by Selivanova et al. [43–45].

Inhibition of p53 in C6 cells. The C6 cells (expressing the wild p53) were incubated with Pifithrin- α cyclic (Calbiochem) in increasing doses: from 0–20 µM for 24 h. This inhibitor and the concentrations used were described by Komarov et al. [46].

Extraction of cellular content. After 24 h of incubation with the activator or the p53 inhibitor, HaCaT and C6 cells were lysed with 100 µL of cytobuster (commercial detergent providing protein insulation without a second treatment; Novagen, France) for 5 min. The cells were harvested and centrifuged at 14 000 rpm, 4°C for 5 min. The supernatants were removed for protein measurement using the Pierce kit and for p53 and metallothionein detection using the western blot assay.

Quantitative protein determination (BCATM Bicinchoninic acid, Pierce kit). Protein levels were determined using the BCATM Bicinchoninic acid kit (Pierce) in total and soluble cell lysates, read in 96-well microplates at 580 nm using a microplate reader (Bio-Tek, USA) and its accompanying software (KC Junior), which directly calculated protein concentrations from the calibration curve.

SDS-PAGE for p53. The samples (50 µg) were diluted in Laemmli buffer and were deposited in gel. After migration in SDS/PAGE, the acrylamide gels (15%) were incubated in transfer buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl (pH 8.5) 20% (v/v) methanol [47]) at room temperature for 20 min. The proteins were then transferred on nitrocellulose membrane (PRO-TAN, France) for 2 h using a 50-V device (Bio-Rad transblotting, France). Then the membranes were saturated in 10% with milk (TBS-1X, Tween-20 at 0.1% and milk at 10% (w/v)) for 1 h at room temperature. After three washings, we cut out the membranes at the 30-KDa molecular weight band. The upper part was incubated overnight at 4°C with primary monoclonal antibody anti-p53 (DO-7; Dako, France) diluted to 1/1000. The lower part was incubated with primary monoclonal antibody WAF1 (Ab1) anti-p21 (Oncogene Research Products, UK) diluted to 1/200. The membranes were washed three times with TBS-Tween (10 min/washing) and the secondary antibody (NA931; Amersham, France) diluted to 1/3000 was added for 1 h. In the end, membranes were washed three times and revealed with the ECL (Enhanced chemiluminescence, Amersham), then exposed on photographic film (HyperfilmTMECLTM, Life Science, Amersham).

Western blot detection of metallothioneins [48,49]

Electrophoresis. The SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) was carried out according to the Laemmli [50] protocol using 15% gels in a Bio-Rad mini-gel device. In this protocol modified by McKeon and Lyman [48] and revised again by Mizzen et al. [49], the samples (20 µg total protein) were denatured in 20 µL sample buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 20% (v/v) glycerol; 1% (w/v) SDS; 0.005% (w/v) bromophenol blue; 100 mM DTT). The samples were heated for 5 min before loading, followed by a migration at 200 V at room temperature [49].

Transfer on membranes and glutaraldehyde treatment. Two transfer buffers were used: (A) After electrophoresis, the gel was incubated in traditional transfer buffer (192 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl (pH 8.5) 20% (v/v) methanol [47]) at room temperature for 20 min and (B) in CAPS buffer (10 mM 3-cyclohexylamino-1-propanesulphonic acid (pH 10.8)) in 10% methanol [51] with or without the addition of 2 mM CaCl_2 to each buffer. The calcium chloride removes the SDS fixed to proteins, thus maximizing their fixation on membrane [48]. Then the proteins were transferred at 40 V at 4°C on nitrocellulose membrane (PROTAN, France) for 1 h using the Bio-Rad transblotting device. Next, the membranes were incubated for 1 h in glutaraldehyde (2.5% final), which increases the retention of low-weight protein by a factor 1.5–12 compared to the untreated membrane [48,49], then washed three times for 5 min in phosphate buffer (8.1 mM Na_2HPO_4 ; 1.2 mM KH_2PO_4 ; 2.7 mM KCl, pH 7.4). With the third washing, we added 50 mM monoethanolamine to stop the residual glutaraldehyde reactivity [49].

Immunodetection. The membranes were blocked in 10% milk in Tris-buffered saline (TBS: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 154 mM NaCl) and 0.1% (v/v) Tween-20 at room temperature for 2 h. Membranes were incubated overnight in primary antibody (Dako, E9 clone) diluted to 1/1000 in 10% milk-TBS-tween at room temperature before washing in TBS-tween and incubation for 4 h in secondary antibody combined with horseradish peroxidase (goat anti-mouse IgG (Bio-Rad) diluted to 1/1000 in TBS-Tween. After three washings in TBS-Tween, blots were developed by ECL, then membranes were exposed on a photographic film (HyperfilmTMECLTM; Amersham).

Cell viability assay

After cell treatment with Cd alone or first with p53 activator (9 µg/ml) or inhibitor (150 µM) for 24 h and with Cd concentrations for another 24 h, cell viability was determined colourimetrically using the 3-(4,

5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma) assay [52]. Cells were washed with phosphate saline buffer (PBS; Invitrogen) and incubated at 37°C for 2 h in fresh culture medium containing MTT (100 µl/mL medium). Then the cells were washed with PBS and lysed by dimethylsulphoxide (DMSO; Sigma). The coloured formazan crystals formed after conversion of the tetrazolium salt MTT by mitochondrial dehydrogenases were solubilized and measured by spectrophotometry at 570 nm.

Statistical analyses

Each experiment was repeated three times. All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation and were analysed by analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results*Analysis of apoptotic DNA fragmentation*

Apoptosis was evaluated by studying the DNA fragmentation, which is a final step in programmed cell death before cells divide into several apoptotic bodies and are phagocytosed, using an ELISA kit (Figure 1A and B). The results showed that Cd did not induce an apoptotic DNA fragmentation in HaCaT cells. The mono- and oligo-nucleosomes enrichment factor remained relatively stable from 0–100 µM Cd (Figure 1A).

In parallel, we observed a very significant ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) apoptotic event in C6 cells. The mono- and oligo-nucleosomes increased as a result of a dose dependent DNA fragmentation (Figure 1B).

Determination of caspase-9 activity

Caspase-9 activity characterizes the intrinsic apoptotic or mitochondrial pathway. Its study makes it possible to determine whether this transduction is involved in the apoptotic process induced by Cd. After a 24 h HaCaT cells treatment with Cd (15, 50 and 100 µM), we observed no increase in caspase-9 activity compared to untreated control (Figure 2A). C6 cells treated with Cd (4, 5 and 20 µM) showed a significant ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) increase in caspase-9 activity (Figure 2B). These results showed that the mitochondrial pathway (caspase-9) could be the initiating pathway of the apoptotic process in the C6 cells and that caspase-9 was not involved in the high rate of mortality of the HaCaT cells observed with 100 µM Cd.

Determination of caspase-3 activity

The mechanism of Cd action was further studied, looking at the caspases located downstream from

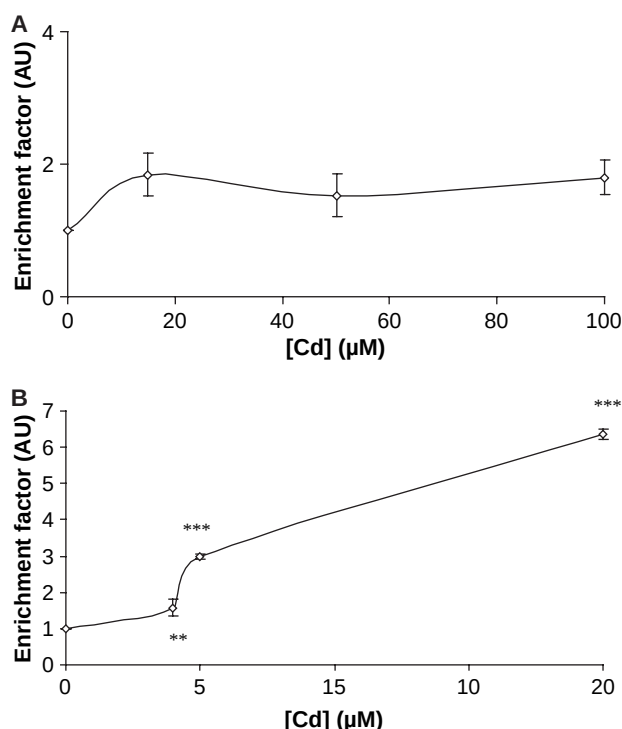


Figure 1. Evaluation of apoptotic DNA fragmentation induced by cadmium (Cd). (A) HaCaT cells were incubated with Cd (0, 15, 50 and 100 µM) for 24 h. (B) C6 cells were incubated with Cd (0, 4, 5, 20 µM) for 24 h. The DNA fragmentation was quantitatively evaluated using a colourimetric cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics), as described in Materials and methods. Apoptosis was reflected by the enrichment of the nucleosomes in the cytoplasm (AU: apoptosis units) and the results were expressed as the mean $\pm$ 1 SD of three independent experiments (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ for (B)).

caspase-9 such as caspase-3. The activity of caspase-3 was specifically and quantitatively measured using the FIENA assay kit (Roche Diagnostics). After 24 h of treatment with Cd, the caspase-3 activity was not modified between untreated controls and the treated HaCaT cells (Figure 3A) or the treated C6 cells (Figure 3B). Caspase-3 activity did not seem to be induced by Cd.

Role of p53 and p21 in apoptosis induced by cadmium

To explore the possible involvement of p53 and 21 in apoptosis and study the effect of p53 on HaCaT cell resistance or C6 cell sensitivity to Cd and the relation between p53 and metallothioneins, the western blot assay was used. The MTT colourimetric test was used to assess the viability of the cells.

p53 and p21 proteins modulation

Given that the HaCaT cells are p53-mutated, we studied the role of p53 in the resistance of these cells to low Cd concentrations by restoring this protein. The restoration of p53 was made by a chemical activator. The results showed that p53 expression in HaCaT was accompanied by the induction of the

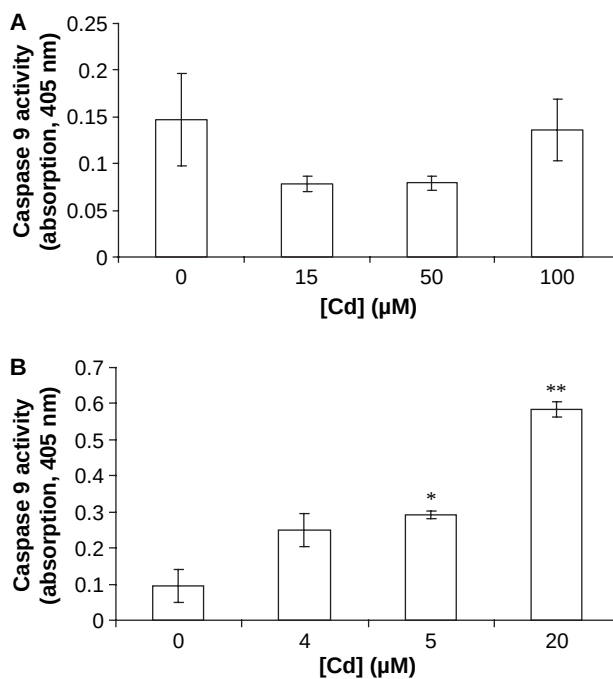


Figure 2. Determination of caspase-9 activity induced by cadmium (Cd). (A) HaCaT cells were incubated with Cd (0, 15, 50 and 100 µM) for 24 h. (B) C6 cells were incubated with Cd (0, 4, 5 and 20 µM) for 24 h. The caspase-9 activity was determined using a colourimetry assay kit (Alexis) as described in Materials and methods. The absorbance was measured at 405 nm and the results were expressed as the mean $\pm$ 1 SD of three independent experiments (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ for (B)).

protein p21, which is its principal target. We observed a strong restoration of the protein p53 when the activator was used at 9 µg/mL (Figure 4A). This concentration was chosen for the rest of the experiments since at higher concentrations the activator became toxic and the p53 band disappeared.

Contrary to HaCaT, C6 cells express a normal p53. An inhibitor was used to block p53 expression in these cells. The results showed a progressive reduction in the intensity of p53 band with the increase in inhibitor concentrations (Figure 4B). With 150 µM of inhibitor, p53 expression was cancelled, therefore this concentration of inhibitor was used for the rest of the study.

The occurrence of the p21 protein band in the cells treated with activator or inhibitor followed the p53 expression pattern. p21 expression increased with p53 expression (HaCaT cells, Figure 4A) and decreased or disappeared when p53 expression was inhibited (C6 cells; Figure 4B).

Cellular response to cadmium after activation (HaCaT) or inhibition (C6) of p53

In order to specify the role of p53 on the HaCaT cell resistance or the C6 cell sensitivity to Cd, we evaluated not only cellular viability and apoptosis but also metallothioneins (MT) expression.

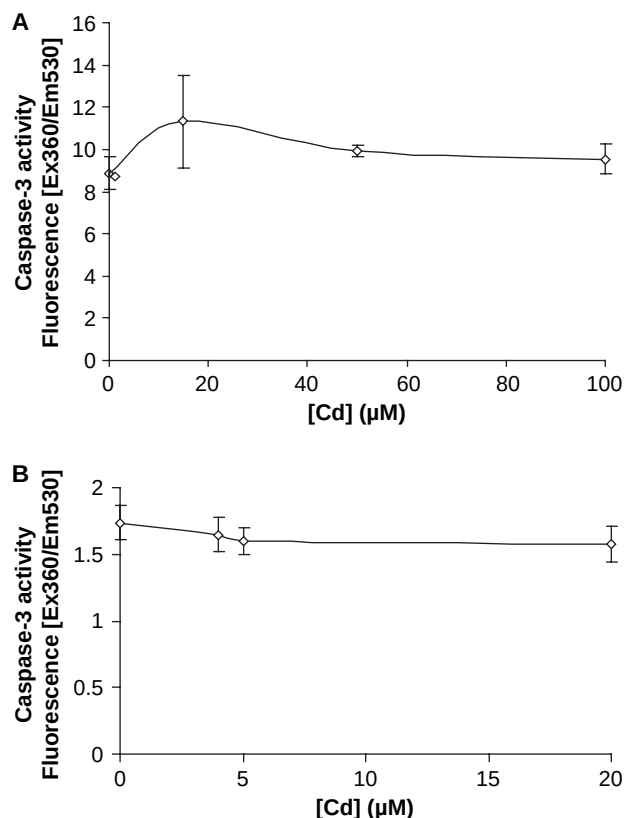


Figure 3. Determination of caspase-3 activity induced by cadmium (Cd). (A) HaCaT cells were treated with Cd (0, 15, 50 and 100 µM) for 24 h. (B) C6 cells were treated with Cd (0, 4, 5 and 20 µM) for 24 h. The caspase-3 activity was measured using the FIENA fluorescent kit (Roche Diagnostics) as described in Materials and methods. The results were expressed as the mean $\pm$ 1 SD of three independent experiments.

HaCaT cells. Cells were incubated with Cd alone or first with 9 µg/ml of p53 activator for 24 h and then with Cd (0, 15, 50 and 100 µM) for another 24 h. Cellular viability was evaluated using the colourimetric MTT test. The results showed that the HaCaT cells remained resistant to low Cd concentrations (up to 50 µM) even when the p53 and the p21 proteins were restored (Figure 5). However, we

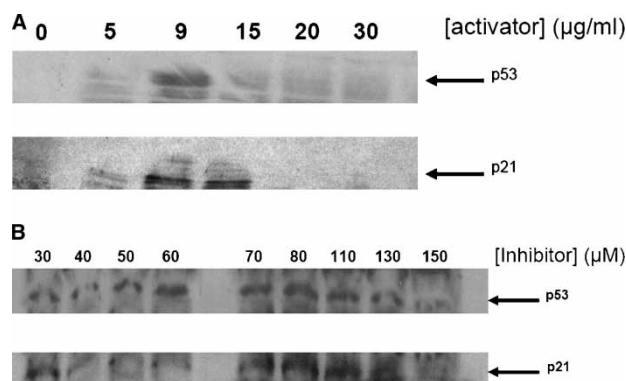


Figure 4. p53 and p21 expression established by western blot. (A) HaCaT cells were incubated with p53 activator 0–30 µg/mL for 24 h. (B): C6 cells were incubated with p53 inhibitor 30–150 µM for 24 h; 50 µg of total protein were deposited in gel.

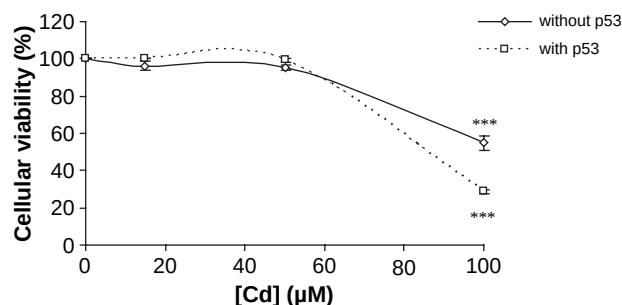


Figure 5. Cell viability after cadmium (Cd) exposure before and after p53 activation. HaCaT cells were incubated with Cd for 24 h or first with p53 activator (9 µg/mL) for 24 h followed by Cd treatment (0, 15, 50 and 100 µM) for another 24 h period. Cell viability was assessed using the colourimetric MTT test: each experiment was repeated three times and data are expressed as mean $\pm$ 1 SD (**: $p < 0.01$).

observed a significant reduction in cellular viability after cell treatment with p53 activator and 100 µM Cd (from 54% without p53 to 28% with p53) (Figure 5). This result suggested the involvement of p53 in HaCaT cell sensitivity to 100 µM Cd. The p53 activation in HaCaT cells led to an increase in the enrichment factor of mono- and oligo-nucleosomes released into the cytoplasm (Figure 6). In view of these results and in agreement with Figure 5, we suggest that p53-dependent apoptotic HaCaT cell death is increased when p53 wild type functions are restored.

Concerning MT expression, the results obtained using western blot did not show any significant change in MT expression after Cd treatment in the absence of p53 (Figure 7A). These proteins were constitutively expressed in the untreated HaCaT control. To explore the relation between p53 and MT expression, we also treated HaCaT first with 9 µg/mL of p53 activator for 24 h then with Cd

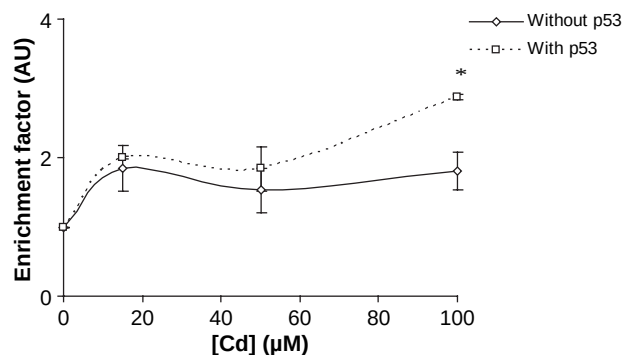


Figure 6. Apoptosis induced by cadmium (Cd) before and after p53 activation. HaCaT cells were treated with Cd or first with p53 activator (9 µg/mL) for 24 h followed by Cd treatment (0, 15, 50, 100 µM) for another 24 h period. The DNA fragmentation was evaluated using a colourimetric cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics), as described in Materials and methods. Apoptosis was reflected by the enrichment of the nucleosomes in the cytoplasm and the results were expressed as the specific enrichment factor and were given as the mean $\pm$ 1 SD of three independent experiments (*: $p < 0.05$).

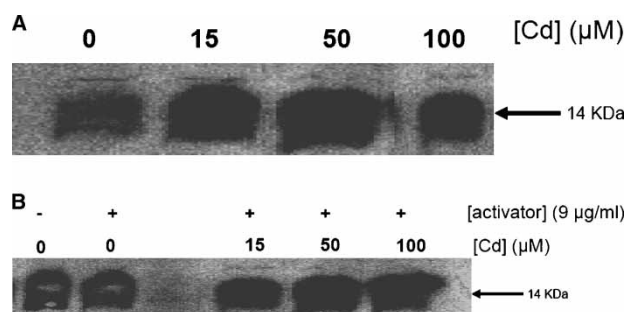


Figure 7. Metallothionein expression. (A) HaCaT cells were incubated with Cd alone (0, 15, 50 and 100 μM) for 24 h. (B) 24 h after HaCaT cell treatment with p53 activator (9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the cells were incubated with Cd (0, 15, 50, 100 μM) for another 24 h period. The effect of p53 restored on metallothionein expression was analysed by western blot, as described in Materials and methods.

(0, 15, 50 and 100 μM) for another 24 h. Any significant changes in MT expression were observed in HaCaT cells in the presence of p53 under our experimental conditions (Figure 7B).

C6 cells. As for the HaCaT cells, we checked the effect of p53 on Cd toxicity in C6 cells. C6 cells were incubated with Cd alone or for 24 h with 150 μM of p53 inhibitor and for 24 h with Cd (0, 4, 5 and 20 μM). Cellular viability was evaluated using the colourimetric MTT assay (Figure 8). The results showed that cellular viability under Cd exposure was significantly increased after p53 inhibition. At 20 μM of Cd, cellular survival amounted to 50% in the presence of p53 while in the absence of p53, the cellular viability reached 83% (Figure 8). In addition, apoptosis decreased significantly with 20 μM Cd ($p < 0.05$) when p53 was inhibited (Figure 9). The enrichment factor of mono- and oligo-nucleosomes released into the cytoplasm of C6 cells reached 6 (with p53) and 2 (without p53). These results suggested that p53 plays a major role in the apoptosis induced by Cd in C6 cells.

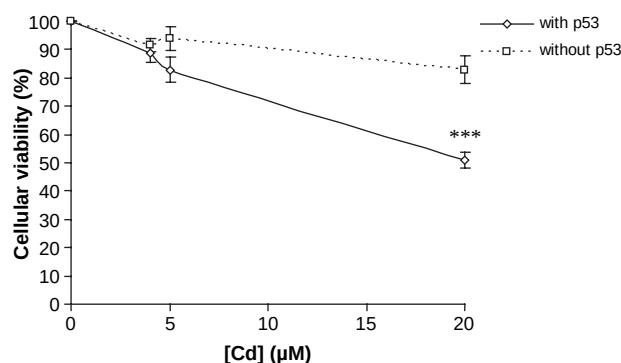


Figure 8. Cell viability after cadmium (Cd) exposure before and after p53 inhibition. C6 cells were incubated with Cd alone for 24 h or with p53 inhibitor (150 μM) for 24 h followed by Cd treatment (0, 4, 5 and 20 μM) for another 24 h. Cell viability was assessed using the colourimetric MTT test and data were expressed as mean $\pm$ 1 SD of three independent experiments (***: $p < 0.001$).

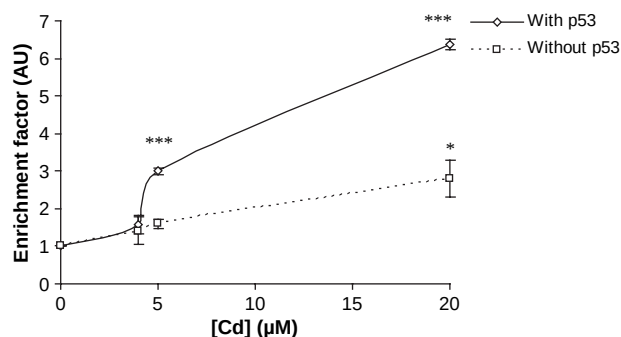


Figure 9. Apoptosis induced by cadmium (Cd) before and after p53 inhibition. C6 cells were incubated with Cd for 24 h or first with p53 inhibitor (150 μM) for 24 h followed by Cd treatment (0, 4, 5 and 20 μM) for another 24 h. The DNA fragmentation was evaluated using a colourimetric cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics). Apoptosis was reflected by the enrichment of the nucleosomes in the cytoplasm and the results were expressed as the specific enrichment factor and were given as the mean $\pm$ 1 SD of three independent experiments (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$).

MT expression was not observed in the untreated C6 control cells. Cd induced MT expression after 24 h of C6 treatment with 4 and 5 but not with 20 μM Cd (Figure 10A). To study whether p53 inhibition could increase MT expression even in untreated control and consequently if the MT take part in the resistance to Cd toxicity, the C6 cells were first incubated with p53 inhibitor (150 μM) for 24 h then with Cd (0, 4, 5 and 20 μM) for another 24 h period. The results showed no variation in MT expression in C6 treated with p53 inhibitor alone or when C6 cells were incubated with Cd up to 5 μM after p53 inhibition (Figure 10B). The MT expression pattern was relatively the same as that obtained without the p53 the p53 inhibitor (Figure 10A and B). However, when p53 was inhibited, a MT band appeared when C6 cells were incubated with 20 μM Cd (Figure 10B). Thus, the absence of p53 led to a

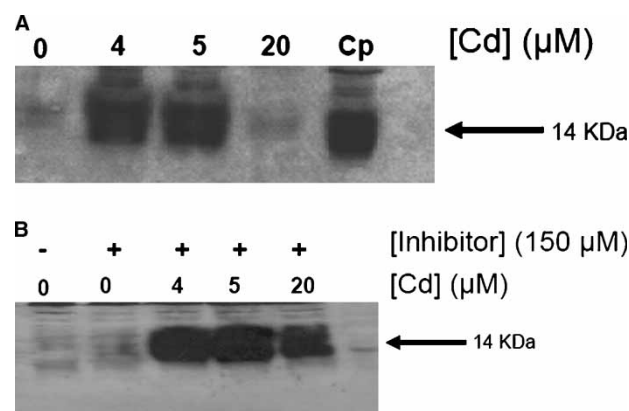


Figure 10. Metallothionein expression. (A) C6 cells were incubated with Cd alone (0, 4, 5 and 20 μM) for 24 h. Cp = positive control (commercial metallothionein; Sigma). (B) 24 h after C6 cell treatment with p53 inhibitor (150 μM), the cells were incubated with Cd (0, 4, 5, 20 μM) for another 24 h period. The effect of inhibited p53 on metallothionein expression was evaluated using western blot as described in Materials and methods.

higher MT expression for 20 μM Cd resulting in a lower Cd toxicity.

Discussion

The data from the literature and our preliminary report (data not presented) showed that cadmium (Cd) can induce ROS generation by lipid peroxidation, a decrease in non-enzymatic antioxidant level (glutathione) and a decrease in enzymatic activities (glutathione peroxidase and reductase (GPx and GRase), superoxide dismutases (SODs) and catalase (CAT)), oxidation of proteins, DNA damage and the inhibition of DNA repair. These processes were involved in oxidative stress and in apoptotic cell death [2–4,6–10,53]. However, the mechanisms of Cd-induced apoptosis remain cell-type-dependent. Our results showed that 24 h of exposure to 100 μM Cd does not induce apoptosis in HaCaT cells. However, the C6 glioma cells do show Cd-induced apoptosis.

Caspases activation is one of the factors intervening in the disorganization of the cell's cytoskeleton [24]. A significant increase in the activities of caspase-9 and caspase-3 were observed in many cells [54]. Mitochondria was the cellular compartment responsible for activation of apoptosis by releasing cytochrome C [55], along with other pro-apoptotic proteins, thereby activating caspase-9 and caspase-3, the major apoptosis execution enzymes [56–58]. Our results showed an increase in caspase-9 activity in C6 but not in HaCaT cells after treatment for 24 h. Several studies proposed that the induction of apoptosis in C6 cells by Cd begins with an externalization of the phosphatidylserine interior towards the outside of the plasmic membrane which would result in mitochondrial membrane potential alteration, followed by activation of caspase-9 and internucleosomal DNA fragmentation [59–61]. Our results were in favour of these observations reported in the literature.

Also, it has been shown that Cd disturbs the homeostasis of calcium [21,62,63]. Indeed, these authors described that the exposure to Cd involved an increase in the intracellular calcium levels which could control the cytochrome C release [64] and thus allow caspase-9 activation. Thus, the apoptotic events induced by Cd in C6 cells may derive not only from mitochondrial membrane potential alteration but also from disturbance of intracellular calcium homeostasis as suggested by literature data [65]. In HaCaT cells, the results suggested that Cd did not induce caspase-9 activities.

Our results suggest that HaCaT and C6 cells had different death mechanisms induced by Cd. In the C6 cells, the caspase-9 pathway did not converge downstream towards the activation of the specific major

executer caspase of apoptosis, caspase-3, as was described by Green and Kroemer [66] and Thompson [31]. Indeed, we showed that Cd did not induce an increase in caspase-3 activity after C6 line treatment for 24 h. This could be explained by the fact that the apoptosis induced by Cd in C6 did not require the caspase-3 pathway even after caspase-9 activation, suggesting that another apoptotic pathway may be responsible. Studies have shown that Cd could induce apoptosis by the mitochondrial pathway independently of some caspases [21,67]. Thus, the pro-apoptotic effect of Cd is mediated by various signalling pathways that trigger caspase-dependent or caspase-independent apoptosis [20]. We also hypothesized that the activity of caspase-9 generated by Cd could be insufficient to activate caspase-3 downstream or that this caspase-3 could be inhibited by Cd which would confirm Yuan et al.'s [68] observations. Thus, the C6 glioma cells do show Cd-induced apoptosis which is dependent on caspase 9, but not caspase 3. However, 100 μM of Cd did not activate caspase 9 or caspase 3 in HaCaT cells. Cd can induce both necrosis and apoptosis. The ratio between both types of cell killing is dose- and cell-type-dependent.

One of the differences between HaCaT and C6 cells is that the HaCaT cells are human keratinocytes mutated in p53 [39] and C6 cells have a wild type p53. Using the colourimetric MTT assay, we showed that there was a high level of cellular survival (Figure 5) and using the comet assay that the Cd concentrations up to 50 μM did not induce genotoxicity in HaCaT cells (data not shown). At the same time, 50% of C6 cell death was obtained with 20 μM Cd after treatment for 24 h (Figure 8). In fact, in agreement with data from the literature Cd-induced cytotoxicity and the delayed inhibition of DNA replication and apoptosis were p53-dependent. Cell treatment with Cd induced p53 protein accumulation and activity [29]. Thus to understand the role of p53 not only in this HaCaT survival and in the C6 cells sensitivity, but also in apoptotic process and metallothionein expression, we restored this protein by p53 activator cell-permeable or inhibited it by p53 inhibitor (Pifitrin- α cyclic cell-permeable). All three domains—N-terminal, C-terminal and p53 core—are involved in intra- and/or intermolecular interaction, ensuring the proper folding of the specific DNA binding domain. Both the DNA binding and transcriptional transactivation contact function as well as structural mutants were amenable to reactivation by the peptide derived from the p53 C-terminal domain [69]. The C-terminal peptide (derived from the COOH terminus residues 361–382) binds to the mutant p53 core domains [45] and can disrupt the negative regulatory role of the C- and N-terminal domains in mutant p53.

The C-terminal peptide has a direct effect on the DNA binding and/or conformation of the mutant core domain itself because of a high content of basic lysine and arginine residues. The binding of the peptide to the mutant p53 core domain may introduce positive charges in the vicinity of the DNA contacting residues which in turn may create novel contacts with DNA. Secondly, interaction of the C-terminal peptide with mutant p53 core domains might stabilize their folding and thus switch the equilibrium towards the wild type conformation [44,70].

The results showed that the HaCaT cells treated with 9 µg/mL of p53 activator presented an accumulation of p53 and p21 proteins which led to a strong sensitivity of these cells to Cd concentrations up to 100 µM (Figure 5). Our results suggested that the absence of p53 intervened in HaCaT resistance to Cd concentrations up to 100 µM, but the high level cellular mortality observed at 100 µM Cd, in the absence of p53, came from a non-apoptotic process. These results are in agreement with Magal et al.'s [71] studies showing that p53 and p21 were not involved in HaCaT cell death. However, the activation of p53 in HaCaT cells by transfection of the C-terminal peptide increases the toxicity of 100 µM Cd by 50% and increases apoptosis. This is evidence that wild type functions of p53 were well restored in HaCaT and that this p53 restoration induced apoptosis via several pathways involving membrane receptors and caspase activation [72–76] until apoptotic DNA fragmentation. Our results also showed that the C-terminal peptide induced toxicity when it was used at high level and in agreement with Senatus et al.'s [77] studies. These authors showed a dose-dependent and cell type-dependent death. Half of this cell death was observed with 30 µM or 50 µM of C-terminal peptide in human and rat glioma cell lines [77]. The process was completely different in C6 cells than in HaCaT cells having mutant p53. The results indicated that mortality (Figure 8) may be related to p53-dependent apoptotic cell death (Figure 9). It was established that the p53 tumour suppressor protein inhibits cell development by inducing cellular cycle arrest and/or apoptosis [27]. In many cell lines, Cd induced p53 expression and later activated transcription and synthesis of the p21 protein, an inhibitor of the cellular cycle [78–80]. The p21 protein belongs to the Cip/Kip family, which controls the checkpoint G1/S transition in the cellular cycle by inhibiting the activity of D/CDK cyclin [27]. The p21 protein is one of the major transcriptional targets of p53 and one of the principal mediators of cellular cycle arrest [81].

However, the increased mortality in C6 cells when p53 is present suggests that the DNA damage to be repaired was substantial in spite of the arrest of

the cellular cycle in the G1 phase which would lead to much greater apoptotic cellular death [27,82]. Indeed, p53 may induce the inhibition of the transcription or the translation of repair genes [83,84] when the lesions induced by Cd are severe. The action of p53 in mitochondria could increase its action on nuclei and thus amplify its pro-apoptotic activity. The p53 localization in mitochondria is on the level of the external mitochondrial membrane potential alteration and precedes its translocation in nucleus [85]. The p53 protein can induce the expression of PIG3, a homologous protein of the NADPH-quinone oxidoreductase, which generates free radicals [86]. Marchenko et al. [87] described that p53 was localized in mitochondria after hypoxia or DNA damage. Our results suggest that the mechanisms that directed apoptotic DNA fragmentation in C6 cells came from the intrinsic p53 and caspase-9-dependent pathway without caspase-3 activation.

For metallothionein (MT) expression, the p53 inhibition did not increase MT levels in untreated C6 control, as occurred with the HaCaT cells. It has been reported in the literature that MTs, a low molecular mass, inducible protein and rich in cysteine residues, direct the detoxification of heavy metals such as Cd [88,89], the storage of essential metals, the scavenging of free radicals and protect cells against oxidative stress [88–95]. Our results showed that the absence of p53 had a significant influence on MT level and these MTs were involved in C6 cells resistance to 20 µM Cd. The results are in agreement with data in the literature [35–37] and also show that normal p53 and the decrease in MT level were involved in the sensitivity of C6 cells (Figures 8–10). These results suggest that the increased MT levels bind and prevent Cd toxicity. In parallel, any changes were observed in MT expression in HaCaT cells in the presence or absence of p53 (Figure 7A and B), which confirms that MT is not involved in HaCaT resistance and that the relation between p53 and MT expression is cell-type-dependent.

In conclusion, the results presented here suggest a model in which Cd induced cell-type-dependent death. In C6 cells, Cd-induced apoptotic DNA fragmentation or oxidative stress induced by Cd causes p53- and caspase-9-dependent apoptotic death without caspase-3 activation. Multiple signaling pathways may be involved in non-apoptotic HaCaT cell death but the apoptosis could be inducible in these cells by p53 restoration. The increased MT levels bind and prevent Cd-induced free radicals which are involving in apoptosis but the data are not sufficient to say that this increased MT is a significant factor in the decrease in apoptotic cell killing.

Acknowledgements

We thank Malika Kadri-Dakir for technical assistance.

References

- [1] (IARC) Iafroc. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Lyon: IARC Scientific Publications; 1993;58:119–237.
- [2] Oh SH, Lim SC. 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. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:212–223.
- [3] Aronis A, Melendez JA, Golan O, Shilo S, Dicter N, Tirosh O. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by attenuated production of mitochondria-derived reactive oxygen species. *Cell Death Different* 2003;10:335–344.
- [4] Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* 2000;21:2097–2104.
- [5] Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Lett* 1996;89:65–69.
- [6] Mattie MD, Freedman JH. Protective effects of aspirin and vitamin E (alpha-tocopherol) against copper- and cadmium-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;285:921–925.
- [7] Poliandri AH, Cabilla JP, Velardez MO, Bodo CC, Duvilanski BH. Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;190:17–24.
- [8] Pourahmad J, O'Brien PJ. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology* 2000;143:263–273.
- [9] Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J, Kandefers-Szerszen M. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 2000;145:159–171.
- [10] Watjen W, Beyersmann D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 2004;17:65–78.
- [11] Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993;262:695–700.
- [12] Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53:55–63.
- [13] Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001;22:21–26.
- [14] Rich T, Stephens R, Trowsdale J. MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochem Soc Trans* 1999;27:781–785.
- [15] Agnantis NJ, Goussia AC. [Apoptosis and cancer]. *Bull l'Acad Natl Med* 1999;183:277–286; discussion 277–286.
- [16] Barinaga M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* 1998;281:1303–1304.
- [17] Coutant A, Lebeau J, Bidon-Wagner N, Levalois C, Lactard B, Chevillard S. Cadmium-induced apoptosis in lymphoblastoid cell line: involvement of caspase-dependent and -independent pathways. *Biochimie* 2006;88:1815–1822.
- [18] Lag M, Refsnes M, Lilleaas EM, Holme JA, Becher R, Schwarze PE. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology* 2005;211:253–264.
- [19] Lee WK, Bork U, Gholamrezaei F, Thevenod F. Cd(2+)-induced cytochrome c release in apoptotic proximal tubule cells: role of mitochondrial permeability transition pore and Ca(2+) uniporter. *Am J Physiol* 2005;288:F27–F39.
- [20] Lemarie A, Lagadic-Gossmann D, Morzadec C, Allain N, Fardel O, Vernhet L. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1517–1531.
- [21] Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192:95–117.
- [22] Zhou T, Zhou G, Song W, Eguchi N, Lu W, Lundin E, Jin T, Nordberg G. Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology* 1999;142:1–13.
- [23] Kim DK, Baek JH, Kang CM, Yoo MA, Sung JW, Chung HY, Kim ND, Choi YH, Lee SH, Kim KW. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int J Cancer* 2000;87:629–636.
- [24] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem* 1999;68:383–424.
- [25] Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 2002;14:86–91.
- [26] Wang Y, Rosengarth A, Luecke H. Structure of the human p53 core domain in the absence of DNA. *Acta Crystallograph* 2007;63:276–281.
- [27] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323–331.
- [28] May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18:7621–7636.
- [29] Cao F, Zhou T, Simpson D, Zhou Y, Boyer J, Chen B, Jin T, Cordeiro-Stone M, Kaufmann W. p53-Dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;218:174–185.
- [30] Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Different* 2006;13:941–950.
- [31] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456–1462.
- [32] Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993;12:3679–3684.
- [33] Kaufmann SH, Mesner PW Jr, Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Meth Enzymol* 2000;322:3–15.
- [34] Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555–556.
- [35] Friedline JA, Garrett SH, Somji S, Todd JH, Sens DA. Differential expression of the MT-1E gene in estrogen-receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. *Am J Pathol* 1998;152:23–27.
- [36] Hamada T, Tanimoto A, Sasaguri Y. Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* 1997;2:359–367.
- [37] Jin R, Bay BH, Chow VT, Tan PH, Lin VC. Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer* 2000;83:319–323.
- [38] Coyole P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2002;59:627–647.

- [39] Fusenig NE, Boukamp P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinogen* 1998;23:144–158.
- [40] Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968;161:370–371.
- [41] Lightbody J. Establishment of differentiated clonal strains of glial brain cells in culture. *Fed Proc* 1968;27.
- [42] Mouret S, Favier A, Beani JC, Leccia MT. Differential p53-mediated responses to solar-simulated radiation in human papillomavirus type 16-infected keratinocytes. *Exp Dermatol* 2007;16:476–484.
- [43] Selivanova G, Iotsova V, Kiseleva E, Strom M, Bakalkin G, Grafstrom RC, Wiman KG. The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region. *Nucl Acids Res* 1996;24:3560–3567.
- [44] Selivanova G, Iotsova V, Okan I, Fritsche M, Strom M, Groner B, Grafstrom RC, Wiman KG. Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat Med* 1997;3:632–638.
- [45] Selivanova G, Ryabchenko L, Jansson E, Iotsova V, Wiman KG. Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol Cell Biol* 1999;19:3395–3402.
- [46] Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999;285:1733–1737.
- [47] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4354.
- [48] McKeon TA, Lyman ML. Calcium ion improves electrophoretic transfer of calmodulin and other small proteins. *Anal Biochem* 1991;193:125–130.
- [49] Mizzen CA, Cartel NJ, Yu WH, Fraser PE, McLachlan DR. Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention. *J Biochem Biophys Meth* 1996;32:77–83.
- [50] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
- [51] LeGendre NM. Purification of proteins and peptides by SDS-PAGE. In: Matsudaira PT, editor. *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*. San Diego: Academic Press; 1989. p 49–69.
- [52] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55–63.
- [53] Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007;401:1–11.
- [54] Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, Booy EP, Los M. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:9–19.
- [55] Barczyk K, Kreuter M, Pryjma J, Booy EP, Maddika S, Ghavami S, Berdel WE, Roth J, Los M. Serum cytochrome c indicates *in vivo* apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy. *Int J Cancer* 2005;116:167–173.
- [56] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770–776.
- [57] Maddika S, Booy EP, Johar D, Gibson SB, Ghavami S, Los M. Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell-death mediators by a Nur77-dependent pathway. *J Cell Sci* 2005;118:4485–4493.
- [58] Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem/FEBS* 1998;252:1–15.
- [59] Vayssiere JL, Petit PX, Rislis Y, Mignotte B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11752–11756.
- [60] Watjen W, Haase H, Biagioli M, Beyersmann D. Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environ Health Persp* 2002;110(Suppl 5):865–867.
- [61] Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;183:1533–1544.
- [62] Joseph P, Muchnok TK, Klishis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ, Ong T. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 2001;61:295–303.
- [63] Misra UK, Gawdi G, Akabani G, Pizzo SV. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 2002;14:327–340.
- [64] Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003;5:1051–1061.
- [65] Zhou T, Jia X, Chapin RE, Maronpot RR, Harris MW, Liu J, Waalkes MP, Eddy EM. Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. *Toxicol Lett* 2004;154:191–200.
- [66] Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998;8:267–271.
- [67] Shih CM, Wu JS, Ko WC, Wang LF, Wei YH, Liang HF, Chen YC, Chen CT. Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells. *J Cell Biochem* 2003;89:335–347.
- [68] Yuan C, Kadiiska M, Achanzar WE, Mason RP, Waalkes MP. Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164:321–329.
- [69] Abarzua P, LoSardo JE, Gubler ML, Spathis R, Lu YA, Felix A, Neri A. Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene* 1996;13:2477–2482.
- [70] Selivanova G. Mutant p53: the loaded gun. *Curr Opin Invest Drugs*. 2001;2:1136–1141.
- [71] Magal SS, Jackman A, Pei XF, Schlegel R, Sherman L. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *Int J Cancer* 1998;75:96–104.
- [72] Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, Fine RL. Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem* 1999;274:34924–34931.
- [73] Li Y, Mao Y, Rosal RV, Dinnen RD, Williams AC, Brandt-Rauf PW, Fine RL. Selective induction of apoptosis through the FADD/caspase-8 pathway by a p53 c-terminal peptide in human pre-malignant and malignant cells. *Int J Cancer* 2005;115:55–64.
- [74] Li Y, Raffo AJ, Drew L, Mao Y, Tran A, Petrylak DP, Fine RL. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. *Cancer Res* 2003;63:1527–1533.
- [75] Li Y, Rosal RV, Brandt-Rauf PW, Fine RL. Correlation between hydrophobic properties and efficiency of carrier-

- mediated membrane transduction and apoptosis of a p53 C-terminal peptide. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;298:439–449.
- [76] Rosal R, Brandt-Rauf P, Pincus MR, Wang H, Mao Y, Li Y, Fine RL. The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:653–660.
- [77] Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, Bruce JN, Fine RL. Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells *in vitro* and *in vivo* by a p53 COOH-terminal peptide. *Molec Cancer Ther* 2006;5:20–28.
- [78] Choi BM, Park R, Pae HO, Yoo JC, Kim YC, Jun CD, Jung BH, Oh GS, So HS, Kim YM, Chung HT. Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol* 2000;86:53–58.
- [79] el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817–825.
- [80] Kim TK. *In vitro* transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;234:300–302.
- [81] Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:5187–5190.
- [82] Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054–1072.
- [83] Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994;370:220–223.
- [84] Gao C, Tsuchida N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:180–187.
- [85] Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* 2001;488:110–115.
- [86] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389:300–305.
- [87] Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2000;275:16202–16212.
- [88] Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Crosta GF. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicol In Vitro* 2005;19:887–892.
- [89] Urani CM, Canevali PC, Morazzoni C, Gribaldo FL. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In Vitro* 2007;21:314–319.
- [90] Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 2000;59:95–104.
- [91] Fatur T, Tusek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT, Filipic M. DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1069–1076.
- [92] Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2001;55:133–145.
- [93] Nordberg M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 1998;46:243–254.
- [94] Penkowa M. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J* 2006;273:1857–1870.
- [95] West AK, Chuah MI, Vickers JC, Chung RS. Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain. *Rev Neurosci* 2004;15:157–166.

Matériels et méthodes

I–Culture cellulaire

1. Cellules HaCaT

Les cellules HaCaT sont des kératinocytes humains mutés p53. Ces cellules sont cultivées dans un milieu R-PMI 1640 (ATGC) tamponné avec du bicarbonate de sodium auquel il faut ajouter pour 500 ml de milieu : 5 ml de L-glutamine (200 mM), 1 mélange de pénicilline (50 000 UI/ml)/streptomycine (50 mg/ml) afin de limiter la contamination par des micro-organismes et du sérum de veau fœtal (10 %).

L'amplification des cellules se fait dans des flasks de 75 cm² dans un ratio de 1/6. Ces flasks sont placés dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie en CO₂ (5 %). Le repiquage s'effectue une fois par semaine. Les HaCaT sont des cellules adhérentes qui poussent donc fixées à un support (formation d'un tapis cellulaire sur la paroi du falcon de culture). Elles nécessitent une trypsination (trypsine pure : 3 ml) afin de décoller les cellules de leur support et obtenir des cellules en suspension.

2. Cellules C6

Les C6 sont des cellules issues d'une tumeur gliale de rat induite par la N-méthylnitrosourée (glioblastome). Ces cellules sont cultivées dans un milieu D-MEM (contient 4.5 g/l de glucose et 4 mM de L-glutamine) auquel on ajoute un mélange pénicilline (50000 UI/ml) /streptomycine (50 mg/ml) et du sérum de veau fœtal (SVF, 10 %, ATGC).

La culture s'effectue également dans des flacons de culture en plastique (falcons^R ou flasks) de 75 cm² placés dans un incubateur à 37°C. L'atmosphère est enrichie en CO₂ (5 %). Le repiquage se fait une fois tous les 3 jours avec un ratio de 1 pour 6. Bien que les cellules C6 se fixent bien à un support plastique, elles y adhèrent tout de même moins fortement que les HaCaT. Le protocole du repiquage est le même que celui des HaCaT sauf que la trypsine est diluée au 1/3 dans du PBS.

Qu'il s'agisse des cellules HaCaT ou C6, le comptage des cellules est effectué sous microscope optique en utilisant le bleu de trypan, un colorant qui reflète la modification de la perméabilité membranaire. Selon les besoins des expériences, le volume de la suspension cellulaire est chaque fois ajusté. Ainsi 20 millions de cellules sont nécessaires pour le dosage des TBARs, 20000 cellules pour évaluer les dommages de l'ADN, etc.

3. *Traitement des cellules aux métaux, au BSO et à la NAC*

Les cellules C6 et HaCaT sont incubées pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. Le milieu de culture est éliminé et remplacé par le mélange « milieu + métal, BSO ou NAC » dans des concentrations croissantes.

Au préalable, des solutions mères de chlorure de zinc (ZnCl₂, 10 mM), de chlorure de cadmium (CdCl₂, 10 mM), de chlorure de cuivre (CuCl₂, 10 mM), de buthionine sulfoximine (BSO, 10 mM) et de N-acétylcysteine (NAC, 0.1 mM) sont respectivement préparées par dissolution dans de l'eau millipore, puis stérilisée par filtration (0,22 µm). Une quantité suffisante de ces solutions mères est prélevée et ajoutée au milieu de culture pour obtenir la concentration finale souhaitée. Les cellules sont ensuite réincubées pendant 24h ou 48h. Après ces deux temps d'incubation, les cellules sont utilisées pour réaliser les différents tests. Un témoin sans traitement est systématiquement inclus dans chaque expérience.

Pour les expériences avec le BSO et la NAC, ces composés sont rajoutés 24h avant le stress métallique. Les concentrations de travail choisies correspondent à celles qui donnent le maximum de déplétion du taux intracellulaire de glutathion pour le BSO et à celles qui donnent le maximum de glutathion aux cellules pour la NAC. Le test MTT a été réalisé pour s'assurer que les concentrations de BSO et de NAC utilisées n'étaient pas toxiques pour les cellules (Kelly 1998; Wispriyono *et al.* 1998).

II-Test MTT

Pour évaluer les effets cytotoxiques du cadmium, du cuivre et du zinc, nous avons utilisé la technique du MTT. Le MTT (bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) peut être réduit à différents niveaux de la chaîne respiratoire (Slater 1963). Cette technique colorimétrique permet de mesurer la viabilité cellulaire. Dans ce test, la viabilité cellulaire est appréciée par la mesure de l'activité de l'enzyme (succinate déshydrogénase : SD) mitochondriale des cellules vivantes (Mosmann 1983). Cette méthode est basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire, par l'intermédiaire de la SD, le MTT en sel de formazan de couleur bleue, ce qui a pour effet de permettre l'évaluation par colorimétrie de la respiration cellulaire.

Le test est réalisé dans des microplaques de 96 puits. 20000 cellules sont incubées dans un volume de 100 µl de milieu de culture. Après 24h et 48h de traitement par les métaux,

les cellules sont incubées avec 10 µl de MTT (5 mg/ml dans du PBS) par puits. Le milieu de stress est éliminé et le précipité de formazan est solubilisé dans 100 µl de DMSO. Les plaques sont ensuite agitées jusqu'à homogénéisation de la coloration (5 min). Les densités optiques (DO) sont ensuite mesurées à 570 nm. Cette densité optique mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules non traitées selon la formule : % de viabilité cellulaire = $[(A-B)/(C-B)] \times 100$

Avec : A = DO de l'échantillon.

B = DO du milieu de culture.

C = DO des cellules non traitées par les métaux et correspondant à 100% de viabilité.

Remarque : La technique du MTT ne permet pas toujours de déterminer le nombre réel de cellules viables.

III-Test des comètes.

Pour évaluer les dommages de l'ADN causés par une exposition des cellules au cadmium, au cuivre ou au zinc, nous avons utilisé le test des comètes. Cette technique permet de quantifier les cassures alcali-labiles, simples et doubles brins de l'ADN dans la cellule entière. Les lésions sont tantôt directement induites par le génotoxique, tantôt consécutives au stress oxydant induit par l'agent, tantôt la conséquence de la mise en œuvre de système de réparation de l'ADN. Le test des comètes a été décrit pour la première fois par Ostling and Johanson (1984). Singh *et al.* (1988) en introduisant un traitement alcalin, ont optimisé la dénaturation de l'ADN et permis une évaluation des simples et doubles brins de l'ADN ainsi que des sites alcali-labiles. La méthode des comètes implique donc une analyse microélectrophorétique à pH alcalin sur gel d'agarose de l'ADN qui a été libéré de cellules isolées.

Après avoir été traitées pendant 24h et 48h par les métaux aux valeurs DI, DL₂₅ et DL₅₀, 20000 cellules sont mélangées avec de l'agarose à basse température (Low-Melt) (1,2 % dans PBS). Un volume de 110 µl de ce mélange est ensuite déposé sur une sous-couche d'agarose (1% dans PBS) coulée préalablement sur une lame de verre dépolie puis recouvert d'une lamelle et déposé sur un lit de glace et protégé de la lumière par une feuille d'aluminium pendant 10 min pour une prise en masse rapide du Low-Melt. Les cellules sont lysées (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-acide, 1% de sacosinate de sodium, pH 10,

additionné extemporanément par 1% de triton X100 et de 10% de DMSO). Les lames sont immergées dans ce tampon toute la nuit à 4°C et à l'obscurité. 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 (75 ml de NaOH 10 N, 12,5 ml EDTA 200 mM, qsp 2500 ml d'eau distillé), pendant 40 min 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 (Figure 72). 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, 300 mA est appliquée pendant 30 min 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, $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$) 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 épifluorescence Zeiss Axioscope 20 (lampe à vapeur HBO JOW) à raison de 50 cellules par lame. Pour chaque essai, trois lames sont réalisées.

Le logiciel Comète [Komet 4.0 (Kinitic Imaging)] mesure l'intensité lumineuse des cellules et détermine de manière semi-empirique la taille de la tête et celle de la comète. Ce logiciel utilise des paramètres qui peuvent être changés par l'utilisateur, selon ses besoins. L'intégration se fait grâce à une caméra digitale reliée au système informatique d'analyse Komet 4.0 (Kinitic Imaging). Les résultats sont exprimés en Tail DNA, qui représente le pourcentage de l'ADN dans la queue de la comète.

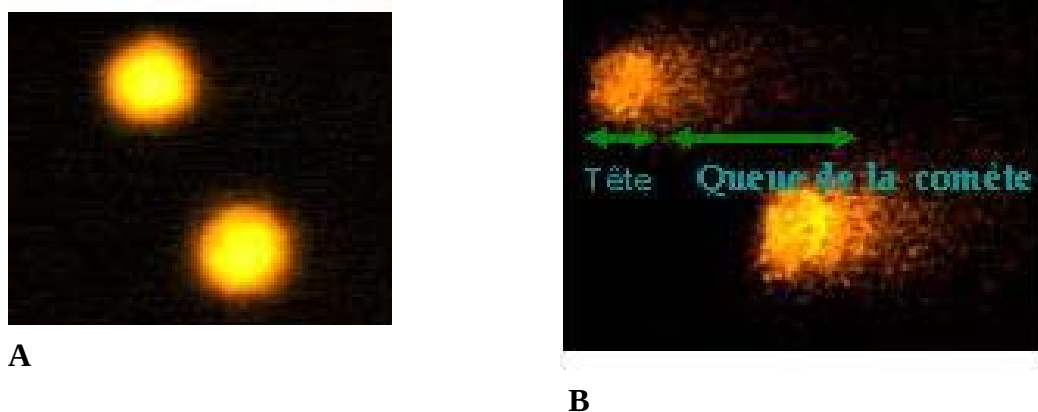


Figure 72 : Comètes avec un tail DNA évalué à 2% dans les cellules non traitées par les métaux (A) et avec un tail DNA de 15% dans les cellules traitées par les métaux (B)

Evaluation de la FpG. Le principe du test des comètes est identique à celui décrit ci-dessus. Cependant après la lyse cellulaire, on effectue 3 lavages de 10 min chacun dans le tampon d'endonucléase (40 mM HEPES ; 0,1 M KCl ; 0,5 mM EDTA, pH 8). On effectue une dilution de l'enzyme au 1/50^{ème} dans le tampon d'endonucléase ; puis on dépose 100 µl de la dilution entre lames et lamelles suivi d'une incubation à 37°C pendant 30-45 min. Les témoins contiennent le tampon endonucléase seulement. Ensuite on passe aux autres étapes jusqu'à la lecture (Collins et al., 1993; Dusinska, 1996; Lazarova et al., 2006; Pouget et al., 2000).

Avantages et inconvénients du test comètes : Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple, très sensible et peu coûteuse, elle peut facilement être mise en place dans un laboratoire possédant un microscope. Une mesure de la réparation de l'ADN *in cellulo* est possible, ce qui permet de se rapprocher des conditions physiologiques. En fin cette technique permet de mesurer les activités de plusieurs systèmes de réparation (recombinaison non homologue, BER et NER). Les inconvénients résident tout d'abord dans le fait que cette méthode ne permet pas une mesure quantitative et spécifique d'un dommage donné comme le serait l'utilisation du HPLC pour le dosage de la 8-OHdG. De plus, cette technique est longue, notamment la phase d'analyse des comètes, et ne permet pas de réaliser des expériences en haut débit.

IV-Mort cellulaire

1. Fragmentation apoptotique de l'ADN

L'apoptose est quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics, France). Les lysats cellulaires sont déposés dans les puits d'une plaque d'analyse recouverte de streptavidine. Un mélange d'anticorps anti-histones biotinylé et d'anti-ADN conjugué à la peroxydase est ensuite ajouté dans les puits. Au cours de l'incubation (2h sous agitation), les mono- et les oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés avec les anticorps (Ac) anti-histones, eux-mêmes capturés au fond des puits par la streptavidine. De plus, les Ac anti-ADN réagissent avec l'ADN nucléosomique. Après lavage, une solution d'ABTS (2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]), substrat de la peroxydase, est ajoutée dans les puits. Au cours de l'incubation (15 min sous agitation à température ambiante), une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase portée par les Ac anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est mesurée à 405 nm au lecteur de plaque ELISA ; le blanc de

lecture étant la solution d'ABTS (longueur d'onde de référence 490 nm).

Les valeurs moyennes d'absorbance (405 – 490 nm) sont déterminées pour chaque échantillon et rapportées aux valeurs des témoins. Les résultats sont exprimés en ratio apoptotique (facteur d'enrichissement cytoplasmique en mono- et oligo-nucléosomes) des cellules traitées/cellules non traitées (AU).

2. Activité de la caspase-3

L'activité de la caspase-3 est spécifiquement et quantitativement mesurée en microplaque par le test FIENA (Fluorometric Immunosorbent Enzyme Assay, Roche). Les caspases-3 des lysats cellulaires sont captées par un anticorps monoclonal, suivi d'une étape de lavage et d'un ajout du substrat [Ac-DEVD-AFC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethyl-coumarin) fluorescence substrate] qui va être dégradé en AFC fluorescent et proportionnellement à la quantité de caspase-3 activé. La lecture de l'AFC fluorescent libre se fait à 505 nm et les concentrations en caspases-3 sont déterminées grâce à une courbe standard. 2×10^6 cellules sont incubés et l'apoptose est induite par les métaux pendant 24h. Les cellules sont récupérées et traitées selon la méthode fournie par le kit (Caspase 3 Activity Assay, Roche).

3. Activité de la caspase-9

L'activité des caspases-9 était mesurée en utilisant le kit Alexis. Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de chlorure de cadmium pendant 24h ; puis les cellules sont recollectées, lavées au PBS et perméabilisées par 50 µl de tampon de lyse et 10 min dans la glace. Après centrifugation ($10\,000 \times g$, 1 min), la quantité des protéines du surnageant est mesurée par le kit Pierce. 150 µg de protéine sont incubés dans le tampon de réaction (possédant 10 mM de DTT) et du substrat de la caspase-9 (LEHD-pNA). Après 60 min à 37°C, la DO est mesurée colorimétriquement à 405 nm.

4. Activation de p53

Les cellules HaCaT mutées p53 sont incubées 24h avec l'activateur de p53 (p53 Activator, cell-permeable, Calbiochem) à des concentrations croissantes : de 0 à 30 µg/ml. Cet activateur est un peptide synthétique de 46 acides aminés correspondant aux acides aminés C-terminal de p53. Ce peptide se lie au mutant p53 au niveau de la région centrale et restaure les fonctions inhibées de p53 dans les cellules. Le produit et les concentrations

utilisées dans nos travaux ont été décrits par Brugidou *et al.* (1995), Selivanova *et al.* (1996), Selivanova *et al.* (1997) et Selivanova *et al.* (1999).

5. *Inhibition de p53*

Les cellules C6 possédant un p53 natif sont incubées 24h avec l'inhibiteur de p53 (Pifithrin- α , Cyclic-, Calbiochem) à des doses croissantes : de 0 à 200 μ M. Cet inhibiteur et les concentrations utilisées ont été décrits par Komarov *et al.* (1999) et Kondratov *et al.* (2001).

V-Evaluation du MDA

Au cours de la peroxydation lipidique, un nombre important d'aldéhydes est formé par cassure des hydroperoxydes lipidiques. Les aldéhydes les mieux étudiés sont le 4-hydroxynonénal (4-HNE), le 4-hydroxyhexenal et le dialdéhyde malonique (MDA). Ils réagissent avec des antioxydants comme le glutathion, augmentant le stress radicalaire. Ainsi, une partie des produits de la peroxydation est rapidement métabolisée et un changement de concentration sera donc plus difficile à mettre en évidence. La méthode la plus employée est la mesure du dialdéhyde malonique par fluorimétrie après réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) qui permet la quantification des complexes formés. (Halliwell 1989a, b; Lefevre *et al.* 1998; Placer *et al.* 1966; Richard *et al.* 1992). Cette méthode est la première mesure globale de la peroxydation lipidique et est utilisée pour sa sensibilité et sa simplicité (Watjen and Beyersmann 2004). Il est important de noter que la réaction au TBA n'a pas la spécificité d'une technique comme la HPLC ou l'immuno-détection. En effet, TBA n'est pas spécifique au MDA mais beaucoup d'autres molécules possédant des activités proches réagissent avec le TBA d'où la nécessité d'effectuer un témoin pour chaque dosage et il convient d'employer le terme d'évaluation de la peroxydation lipidique plutôt que de mesure des MDA par la méthode des TBARS.

750 μ l d'un mélange (2/1 v:v) d'acide thiobarbiturique (TBA 0,55 mM, pH 7,4) et d'acide perchlorique (HClO₄) 7% sont ajoutés à 100 μ l d'échantillon. Après agitation (vortexer vigoureusement pendant 2 min), le mélange est incubé au bain marie à 95°C pendant 1h. Durant cette étape, les fonctions aldéhydes du MDA sont libérées par l'hydrolyse acide à 95°C. Elles réagissent avec le TBA en formant un complexe coloré en rose (MDA-TBA). Pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace. Le complexe ainsi formé est extrait par le butanol pendant 2 min. Après centrifugation, la quantification du complexe

est effectuée sur un spectrophotomètre à fluorescence Hitachi F4500 (Roche diagnostic France) à une longueur d'onde d'excitation de 532 nm et une longueur d'onde d'émission de 553 nm. La courbe de calibration est obtenue à partir d'une solution stock de 1,1,3,3-Tétraethoxypropane (TEP) à 20 mM, la gamme étant comprise entre 1 et 8 mM.

VI-Western blot (McKeon and Lyman 1991; Mizzen et al. 1996)

Extraction du contenu cellulaire. L'extraction s'est faite au cytobuster qui est un détergent commercial (Novagen, France). Le cytobuster permet l'isolation des protéines sans un second traitement. Ce détergent a été spécifiquement formulé pour l'extraction des protéines destinées au western blot, à l'immunoprécipitation et aux études des kinases/phosphatases. Le cytobuster est compatible avec les inhibiteurs de protéases, de kinases et de phosphatases et avec un dosage des protéines par le kit Pierce. Par ailleurs, les extraits cellulaires contiennent des protéases tels que les sérines, cystéines et métalloprotéases. Ainsi pour inhiber ces protéases, on a utilisé le « complete » (Roche Diagnostics, France) qui possède un large spectre d'action. Le « complete » est directement ajouté au cytobuster (1 comprimé pour 50 ml de cytobuster).

Après 24h d'incubation en présence des métaux, de l'activateur ou de l'inhibiteur de p53, les cellules HaCaT et C6 sont lysées au cytobuster (Novagen, France). Les cellules sont lavées au PBS avant ajout de 1 ml de cytobuster. La solution agit pendant 5 min à 37°C, suivi d'un « scrapage » sous un support sombre. La solution est récupérée dans un tube et centrifugée à 14000 rpm 4°C pendant 5 min. Le surnageant est ensuite récupéré et les protéines dosées par le kit pierce avant western blot de p53 ou des métallothionéines.

Dosages des protéines (kit Pierce). Le dosage s'est fait au BCATM (Bicinchoninic acid, kit Pierce). C'est une méthode colorimétrique de détection et de quantification des protéines totales. La technique combine la réduction de Cu²⁺ en Cu⁺ dans un milieu alcalin (réaction du Biuret) et la haute sensibilité et sélectivité de la détection colorimétrique des Cu⁺ en utilisant un seul réactif contenant le BCA. La solution colorée produite est formée par la chélation de deux molécules de BCA et d'un ion Cu¹⁺. Ce complexe, soluble dans l'eau, montre une forte absorbance à 562 nm mais aussi à 580 nm et l'absorbance augmente avec la concentration en protéine dans l'échantillon.

On introduit, 25 µl/puits des différentes concentrations en BSA et de chaque extrait cellulaire puis on rajoute 200 µl/puits d'une solution obtenue après addition du réactif A avec

le réactif B (le réactif A est dans un rapport de B/50). La plaque est agitée 30 secs et incubée 30 min à 37°C. La lecture se fait ensuite à 580 nm grâce à un lecteur de microplaque muni d'un logiciel (KC junior) qui détermine directement les concentrations en protéines.

1. Mise en évidence de l'expression des métallothionéines

Électrophorèse. Le SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) a ensuite été réalisé d'après le protocole (Laemmli 1970) utilisant un mini gel à 15% dans les appareils Bio-Rad. Dans le protocole modifié par McKeon et Lyman (1991) et repris par (Mizzen *et al.* 1996), les échantillons (20 µg de protéine totale) sont dénaturés dans 20 µl de tampon (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 10 mM EDTA ; 20% (v/v) glycérol ; 1% (w/v) SDS ; 0,005% (w/v) de bleu de bromophénol ; 100 mM de DTT). Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min avant le dépôt dans le gel, suivie d'une migration à 200 V à température ambiante (Mizzen *et al.* 1996).

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 classique [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 (McKeon and Lyman 1991). 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 (Mizzen *et al.* 1996).

Immunodétection. La membrane est saturée avec 10% de régilait dans du Tris-buffered saline (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 (Dako, clone E9) dilué au 1/1000^{ème} 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 1/1000^{ème} 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 (HyperfilmTMECLTM, Life Science, Amersham).

2. Expression de p53

Les protéines sont extraites et dosées ; puis les échantillons (50 µg) sont dilués dans le tampon Laemmli et déposés dans le gel. Après migration en SDS/PAGE, les gels d'acrylamide (15%) ont été incubés avec 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. Les protéines ont été alors transférées sur une membrane de nitrocellulose pour 2h à l'aide d'un appareil (Bio-Rad transblotting) à 50 V. La membrane a ensuite été saturée dans 10% de lait (TBS-1X, Tween-0,1 et lait de 10% (w/v)) pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages, on découpe la membrane juste au dessus de la bande de 30 kDa du marqueur de taille. La partie supérieure est incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire monoclonal anti-p53 (DO-7, Dako) dilué au 1/1000^{ème}. La partie inférieure est incubée avec l'anticorps primaire monoclonal WAF1 (Ab1) anti-p21 (Oncogène Research Products, Angleterre) dilué au 1/200^{ème}. Les membranes ont été lavées 3 fois avec TBS-Tween (15 min/lavage) et l'anticorps secondaire (NA931, Life Science, Amersham) dilué au 1/3000^{ème} est ajouté (1h). En fin 3 lavages sont réalisés et les membranes sont révélées à l'ECL puis les membranes sont exposées sur un film photographique.

VII-Gène rapporteur

Transfection transitoire des cellules. Quel que soit le composé lipidique utilisé, les cellules sont ensemencées en boîte de pétri (35 mm de diamètre) à une densité de 2×10^5 cellules la veille de la transfection.

Pour le Transfast (Promega, France) : l'ADN (0 à 4 µg) est mélangé avec le Transfast (3 µl/µg d'ADN), puis le mélange est incubé 15 min à température ambiante. Le milieu des cellules est ensuite éliminé, et remplacé par 650 µl du mélange ADN-Transfast. Les cellules sont alors incubées 1h à 37°C. Après l'incubation, 1,4 ml de milieu neuf est ajouté aux cellules. Les cellules sont ensuite récoltées 24h après la transfection pour analyse.

Pour la Lipofectamine (Invitrogen, France) : l'ADN (0 à 4 µg) est d'abord mélangé dilué dans 100 µl de milieu sans sérum ; le réactif est également dilué dans 100 µl de milieu sans sérum et on incube 15 min à température ambiante. Puis on mélange tout et on incube à nouveau 15 min à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu des cellules est éliminé et remplacé par 800 µl de milieu sans sérum. Les 200 µl du mélange ADN-Lipofectamine sont ensuite ajoutés sur les cellules, et les cellules sont incubées pour 4-5h à 37°C. Après cette incubation, le milieu de transfection est éliminé et remplacé par 2 ml de milieu neuf complet. Comme précédemment, les cellules sont ensuite récoltées 24h après la transfection pour analyse.

Extraction du contenu cellulaire. Le milieu est éliminé, les cellules sont lavées deux fois par le PBS et lysées par ajout de 200 µl de tampon de lyse 1X (tampon 5X dilué avec l'eau distillée, Promega). Après incubation pendant 15 min à 37°C, les cellules sont grattées et le lysat de chaque boîte est récupéré dans un eppendorf et vortexé. Les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm pendant 4 min à 4°C et le surnageant est récupéré et conservé à -80°C ou les protéines sont dosées (kit Pierce) et l'activité luciférase mesurée.

Activité de la luciférase. Reconstituer le kit de la luciférase assay (10 ml de la luciférase assay buffer + 1 flacon de luciférase). L'activité de la luciférase est mesurée en déposant 20 µl du lysat dans un tube pour luminomètre. Le tube est ensuite introduit dans l'appareil (luminomètre LB 9507 Berthold). L'appareil va injecter 100 µl de lucigénine (kit reconstitué, Promega) et effectuer la mesure de la luminescence pendant 10 secondes. Les résultats sont donnés en unités arbitraires et normalisées sur les quantités de protéines.

VIII-Immunofluorescence

Cette technique permet de localiser les métallothionéines dans la cellule. Les cellules sont trypsinées et remises en culture dans des chambres plastiques 4 puits (Lab-teck, NUNC). 2×10^5 cellules sontensemencés par compartiment. Les cellules sont traitées par les métaux (Cd, Cu ou Zn). On passe ensuite au marquage indirecte; qui commence par un lavage au PBS, suivi d'une fixation au méthanol froid (-20°C) pendant 10 min à température ambiante et d'une perméabilisation des membranes cellulaires par triton X-100 (0,2%) dans du PBS (10 min, température ambiante). Les cellules sont incubées dans l'anticorps primaire anti-métallothionéine (Dako, clone E9 ; dilution au $1/1000^{\text{ème}}$ dans PBS à 1% BSA) pendant 1h à 37°C . Suivi de 2 lavages au PBS-T 0,1% ; puis on incube les cellules avec un anticorps secondaire F(ab)'2 anti IgG de souris (Alexa fluor 488 (6 $\mu\text{g/ml}$, dilué dans PBS-T 0,1%), Molecular probes). Deux lavages dans le PBS-T 0,1% sont réalisés avant observation au microscope « Zeiss » avec une goutte de « Fluorescent Mounting Medium » entre lames et lamelles. Les cellules exprimant les métallothionéines (MTs) apparaissent plus ou moins brunes en fonction de la concentration en MTs et les cellules MT négatives apparaissent non colorées.

IX-Taux de zinc intracellulaire (Coyle et al. 1994; Zalewski et al. 1993)

Le taux de zinc intracellulaire est évalué par une sonde fluorogénique spécifique du zinc : le zinquin-éthyl-ester ou 2-Méthyl-8-[(4-méthylphényl) sulfonylamino]-6-(ethyloxycarbonylmethyloxy) quinoline. 24h après traitement aux métaux, les cellules (2×10^5 cellules) sont incubées à 37°C avec une solution micromolaire (25 μM) de zinquin-éthyl-ester dans le PBS. Le groupe ester du zinquin est hydrolysé par les cellules vivantes, assurant sa rétention intracellulaire ; suivi de la visualisation du Zn^{2+} libre ou faiblement lié (labile) par fluorescence. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et observées dans le PBS au microscope à fluorescence « Zeiss » (λ_{exc} : 365 nm ; $\lambda_{\text{ém}}$: 420 nm).

X-EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

La migration (retard sur gel) part sur le principe qu'un ADN complexé à une protéine, migre moins vite (en condition non dénaturante) qu'un ADN seul. Il suffit de séparer différents extraits cellulaires et de « mélanger » avec des sondes marquées ; puis faire migrer. Les sondes correspondent à la séquence MRE situées en amont du gène de métallothionéine. Les brins auront été biotinylés afin de permettre une détection non radioactive. Après stress métallique, on réalise une extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires censées contenir le facteur de transcription de la métallothionéine (MTF-1). On dose les protéines et une certaine quantité est utilisée pour la liaison de MTF-1 à sa séquence cible (ADN cible). C'est le complexe ADN-MTF-1 qui va être déterminé par la technique EMSA.

1. Extraction du contenu cytoplasmique et nucléaire

Protéines cytoplasmiques. 10^7 cellules sont cultivées pendant 24h et incubées avec les métaux (Cd, Cu, Zn) aux concentrations DI, DL₂₅ et DL₅₀ pendant une autre période de 24h. Les cellules sont trypsinées et centrifugées à 2000 rpm pendant 2 min (4°C). Le culot est resuspendu dans 500 µl de solution hypotonique froid (10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanesulfonic acid)-KOH ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; pH 7,9. A cette solution, on rajoute extemporanément 0,5 mM de DTT et le complète à 1X final) ; suivi d'une centrifugation. Le culot est repris avec 1 ml de solution hypotonique (vortexer), incubé 15 min dans la glace et ajouter 50 µl de NP-40 (sans dépasser 10%) ; puis vortexer vigoureusement pendant 10 secondes et centrifuger à 14000 g pendant 3 secondes. Aliquoter le surnageant (protéines cytoplasmiques) et conserver à – 80°C.

Protéines nucléaires. Eliminer le maximum de surnageant à l'étape précédente pour réduire les contaminations de la fraction nucléaire et reprendre doucement le culot avec 60 µl de solution hypertonique froid (10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanesulfonic acid)-KOH ; 50 mM KCl ; 300 mM NaCl ; 0,1 mM EDTA ; 10% (v/v) Glycérol ; pH 7,9). A cette solution il faut rajouter extemporanément 0,5 mM de DTT ; le complète (inhibiteur de protéases, 1X final) et vortexer vigoureusement avant l'incubation dans la glace pendant 30 min (avec agitation toutes les 5 min). Centrifuger à 12000 g pendant 10 min (4°C). Aliquoter le surnageant et le congeler rapidement à l'azote avant conservation à – 80°C. Le dosage des protéines se fait avec le kit Pierce. Il faut noter que la concentration en

protéines du noyau tourne autour de 3 à 5 mg/ml. Les deux types de protéines (cytoplasmiques et nucléaires) vont être passés à l'EMSA séparément. Les trois sondes d'ADN (MREa, MREe et MREg) utilisées dans notre étude sont les suivantes :

MREa : GCTTTTGCACCTCGTCCCGGCTC
CGAAAACGTGAGCAGGGCCGAG

MREe : GGCTCTGCACACGGGCGCGGG
CCGAGACGTGTGCCCGGCGCCC

MREg : AGCTGTGCACACGGCGGAGGCG
TCGACACGTGTGCCCGCCTCCGC

Figure 5 : MREs en amont du gène codant pour la métallothionéine IIA humaine (Sigma-prolig, France)

2. Biotinylation des MREs (metal regulatory elements)

La technique EMSA nécessite un marquage de l'ADN. Le marquage peut être radioactif (utilisation du ^{32}P) mais nous avons opté pour un marquage par biotinylation (non radioactif). La biotinylation se fait sur l'extrémité 3'-OH de l'ADN. La biotine est incorporée par la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transférase) sur ADN simple brin. Incuber pendant 30 min à 37°C le mélange [tampon TdT (1X) + oligonucléotides (100 nM) + Biotine (0,5 μM) + TdT dilué (0,2 U/ μl) + H_2O pour un volume final de 50 μl] puis ajouter l'EDTA (0,2 M) pour arrêter la réaction et le chloroforme (50 μl) pour extraire la TdT. Centrifuger 2 min à vitesse maximale pour séparer les phases. La phase aqueuse est à conserver.

3. Hybridation des sondes et efficacité de la biotinylation

Après la biotinylation de chaque brin, on mélange à volume égal chaque brin biotinylé ; suivi d'une incubation à température ambiante pendant 1h. Les doubles brins d'ADN biotinylés obtenus sont passés en Dot blot (Bio-Rad) pour vérifier l'efficacité de la biotinylation. Le protocole est fourni par sigma (France). Pour déterminer l'efficacité de la biotinylation (exprimée en pourcentage) il faut comparer les intensités des spots des échantillons à ceux des standards (courbe standard). Selon les indications du protocole du kit, la détection en EMSA est bonne même pour une efficacité de biotinylation inférieure à 50%.

4. Réaction EMSA

Plan de la réaction. Une série de 3 réactions contrôles est d'abord réalisée pour déterminer les conditions de liaison. Ces réactions contrôles se font grâce au système EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen, présent dans le kit). La première réaction permet de montrer qu'en absence de protéine, il n'y a pas de liaison à l'ADN et donc pas de complexe observé (MTF-1/sonde d'ADN = « Shift »). Elle établit la position de la bande non « shiftée » (référence). Par contre la deuxième réaction contient suffisamment d'ADN et de protéines pour une liaison effective. Le « shift » sera détecté par comparaison à la bande de la première réaction. En fin la troisième réaction démontre que le signal (« shift ») observé à la deuxième réaction résulte d'une interaction spécifique ADN-protéine.

Formation du complexe ADN biotinylé/MTF-1. L'ADN biotinylé double brin est d'abord reconstitué. Pour cela il faut mixer à volume égal (v/v) les deux brins et chauffer 1 min à 94°C avant de laisser refroidir lentement pendant 45 min à température ambiante puis mettre dans la glace (4°C) avant dépôt dans le gel. Les ADN sont dilués dans le tampon STE : [Tris-HCl (10 mM, pH 8,8) + NaCl (50 mM) + EDTA (1 mM)].

Ne connaissant pas les conditions spécifiques de liaison, on utilise un minimum de composés réactionnels : [tampon de liaison (1X) + poly (dI.dC) (50 mg/μl) + ADN cible biotinylé + l'extrait protéique (cytoplasmique ou nucléaire)]. L'extrait protéique a été utilisé à 4 μg pour un volume final réactionnel de 20 μl.

La réaction EMSA a ensuite été optimisée par addition d'autres composés comme KCl (Triplett 1992; Winston *et al.* 1999), glycérol, MgCl₂ (Szczelkun and Connolly 1995; Winston *et al.* 1999) et un détergent (Hodgson and Enrietto 1995; Zhang *et al.* 1992); en déterminant leurs effets sur le « shift ». Il a été également montré que le BSA peut induire ou optimiser la liaison ADN-protéine (Bannister and Kouzarides 1992; Kozmik *et al.* 1990; Zhang *et al.* 1992). La poly (dA.dT) peut être utilisée à la place de la poly (dI.dC) si la séquence cible d'ADN est riche en GC.

Préparation, prémigration du gel et électrophorèse des échantillons. Préparer un gel polyacrylamide (8%) en condition native dans le tampon TBE (1X au lieu de 0,5X préconisé par le kit. A 1X, le tampon TBE chauffe moins vite). Le gel est ensuite monté sur un appareil d'électrophorèse et la cuve est remplie de tampon TBE (1X). Faire migrer le gel 30 min à 100 V. Une fois préparé (dans la glace) et incubé 20 min à température ambiante, on ajoute à chaque échantillon (ADN biotinylé/protéines ou EBNA) 5 μl de bleu de bromophénol (5X) et mélanger doucement. Les échantillons sont déposés dans les puits et on applique 100 V.

Transfert sur membrane. Arrêter la migration quand le bleu de bromophénol atteint les 3/4 du gel. Démonter le système et équilibrer la membrane 10 min dans le tampon TBE (1X) et monter la membrane et le gel en sandwich (matériels Bio-Rad). Transférer à 380 mA (environ 100 V) pendant 30 min. La procédure du transfert est la même que celle décrite pour un western blot normal.

Détection du complexe ADN/MTF-1 en chimiluminescence. Après le transfert, prendre la membrane et la déposer sur papier absorbant rapidement (moins d'une 1 min). Passer immédiatement la membrane sous UV (même procédure que celui du dot blot : 120 mJ/cm², 50 secondes) pour optimiser la liaison du complexe ADN-protéine sur la membrane. On bloque la membrane par ajout de 20 ml de tampon bloquant (tampon bloquant 4X chauffé au bain marie jusqu'à une dissolution complète des particules) suivi d'une incubation de 15 min. Pendant ce temps, préparer un tampon bloquant conjugué dilué au 1/300^{ème} (66,7 µl de streptavidine-HRP (HorseRadish Peroxidase) à 20 ml de tampon bloquant). Vider le tampon bloquant, mettre le tampon bloquant conjugué et incubé pendant 15 min sous agitation. Pendant l'incubation, préparer une solution de lavage 1X en mélangeant 40 ml de tampon de lavage (4X) et 120 ml d'eau. Après incubation dans le tampon conjugué, la membrane est transférée dans un autre bac et lavée 4 fois 5 min avec 20 ml de la solution de lavage 1X nouvellement préparée. Mettre la membrane dans un autre bac et y introduire 30 ml de tampon de substrat pour équilibrer la membrane (5 min en agitation).

Préparer le substrat en mélangeant 6 ml de la solution « inductrice/luminol » et 6 ml de solution stable de peroxyde (anticorps streptavidin-HRP qui va se fixer sur la biotine de l'ADN en 3'). La membrane est ensuite déposée sur papier absorbant (pour enlever l'excès de tampon) ; puis elle est plongée dans la solution de substrat (peracide qui va être oxydé par HRP pour libérer sa forme oxydée et du luminol détectable) et laissée en agitation pendant 5 min. Comme pour la détection des protéines en western blot, les membranes (en nylon, chargé positivement et 0,45 µm de diamètre) du dot blot et de l'EMSA sont placées dans une cassette et exposées à un film hypersensible en chambre noire.

XI-Enzymes de stress

1. Extraction du contenu cellulaire

Les cellules sont récoltées par trypsination et les culots cellulaires obtenus sont lavés 3 fois au tampon tris-HCl isotonique (pH 7,4). Après le dernier lavage, le culot est repris par du tampon hypotonique (tris-HCl isotonique/20) et la lyse des cellules est réalisée par 5 cycles successifs de congélation dans l'azote liquide (- 196°C) et décongélation au bain-marie (37°C). Les extractions (surnageants) sont conservées à - 80°C ou utilisées pour le dosage immédiat des enzymes. Et les résultats sont normalisés sur la quantité des protéines dosées par le kit Pierce.

2. Glutathion peroxydase Sélénium-dépendante (GPx)

La méthode utilise un couplage entre la réaction de la GPx qui produit du glutathion oxydé (GSSG) et celle de la glutathion réductase (GRase) qui réduit GSSG formé tout en oxydant le bêta-nicotinamide (NADPH). Le NADPH peut être détecté à 340 nm par spectrométrie de façon très sensible, ce qui permet de mesurer des activités très faibles de GPx. Le recyclage du GSSG, produit de la GPx, permet en outre d'éviter une sous estimation de l'activité de la peroxydase due à un rétrocontrôle négatif de l'activité par une accumulation des produits de la réaction.

L'activité de la GPx est mesurée par la méthode de Flohe and Gunzler (1984) légèrement modifiée. La détermination de l'activité de la GPx repose ainsi sur la mesure de la disparition du NADPH, H^+ suivie par spectrométrie à 340 nm, avec comme réactif le t-butyl hydroperoxyde. Le milieu réactionnel a tout d'abord été préparé [1 mM d'EDTA Na_2 ; 50 mM de Tris base (pH 7,6) ; 4 mM d'azide de sodium]. On dépose ensuite 50 μ l d'échantillon, 20 μ l de GRase (208 U/ml), 20 μ l de glutathion (0,15), 20 μ l de NADPH (8,4 mM), 900 μ l de milieu réactionnel. Après une minute d'attente, 20 μ l d'une solution de t-butyl hydroperoxyde (tBOOH 30 mM) sont rajoutés au mélange réactionnel, la décroissance de densité optique du NADPH₂ est mesurée à 340 nm sur un spectrophotomètre thermostaté à 25°C. Une courbe standard a été établie au préalable grâce à une gamme de NADPH.

Malgré l'emploi d'une enzyme, cette technique est assez stable et reproductible. Elle donne environ 10% de variations autour de la valeur moyenne pour 3 essais.

Le GSH et le tBOOH. Bien que le glutathion soit recyclé, on doit constituer le milieu réactionnel avec le glutathion réduit ainsi que le tBOOH (Maral *et al.* 1977) en excès par rapport au NADPH pour éviter que ces deux produits soient des facteurs limitant de la réaction.

L'azide : l'azide est un inhibiteur de la catalase, il évite que cette peroxydase influe sur l'activité mesurée.

La GRase : la réductase à glutathion doit être aussi en quantité suffisante pour ne pas limiter la réaction, et que le glutathion oxydé formé par la peroxydase à glutathion soit immédiatement réduit par la réductase en échange de l'oxydation du NADPH.

3. *Glutathion réductase (GRase)*

Cette enzyme est chargée de réduire le glutathion qui a été oxydé par les nombreux processus cellulaires. La GRase utilise l'oxydation du NADPH en NADP pour réduire le GSSG, suivant la réaction : $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP} + \text{H}_2$. Comme avec la GPx, le protocole de mesure de l'activité GRase utilise la disparition du NADPH mesurée à 340 nm d'après la méthode développée par Carlberg and Mannervik (1985). Un milieu réactionnel (pH 7,6) est préparé à partir du MOPS (520 mg pour 25 ml final), de l'EDTA (9,2 mg pour 25 ml final) et du NADPH (6,2 mg). Déposer le mélange [50 µl d'échantillon + 50 µl de GSSG (1 mM) + 900 µl du milieu réactionnel] pour suivre l'oxydation du NADPH. Comme décrit dans la mesure de la GPx, une courbe standard est construite à partir d'une gamme de NADPH.

4. *Superoxydes dismutases (SODs)*

La superoxyde dismutase est l'enzyme antioxydante chargée d'éliminer les ions superoxydes. Les molécules les plus souvent utilisées comme cibles des ions superoxydes sont le NBT et le pyrogallol. Nous avons utilisé la technique au pyrogallol. Elle repose sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol (10 mM) par les radicaux superoxydes et la dismutation de ces radicaux par la SOD (Marklund and Marklund 1974), quantifié par spectrophotométrie à 420 nm.

Le protocole commence par une préparation du tampon à partir du Tris pH 8,2 (50 mM) et du DTPA (1 mM). Puis dissoudre le pyrogallol dans du HCl (1N) pour avoir une solution à 10 mM.

Evaluation de l'autooxydation du pyrogallol : le mélange réactionnel est constitué de : 960 µl de tampon tris/DTPA, 40 µl de pyrogallol, après 45 secondes, la cinétique est lancée à 420 nm pendant 1 min. La DO/min doit être comprise entre 30 et 31. Sinon, faire varier le pH avec l'acide cacodylique afin d'obtenir une variation d'absorbance maximum correspondant à 0% d'inhibition de l'oxydation du pyrogallol. Chaque dosage est réalisé en double : pour chaque essai, on dépose 880 µl de Tampon Tris/EDTA, 80 µl d'échantillon, 40 µl de pyrogallol.

Une unité d'activité enzymatique étant définie comme la quantité capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol. Pour la Mn-SOD, déposer 5 µl de KCN (0,5 mg/ml) sur l'échantillon. Ce protocole permet de mesurer l'activité SOD totale de l'échantillon. En utilisant un inhibiteur de SOD cytoplasmique à cuivre-zinc, on peut mesurer l'activité de la SOD mitochondriale à manganèse, et en déduire celle de la SOD cuivre-zinc par soustraction de l'activité SOD totale. Les inhibiteurs de SOD à cuivre-zinc sont généralement des chélateurs du cuivre. Les deux les plus utilisés sont le cyanure (sous la forme cyanure de potassium (KCN) ou de sodium) et le Diethyldithiocarbamate (DETC). Il est à noter que les deux molécules ont une influence non négligeable sur la vitesse d'oxydation du pyrogallol, le cyanure accélérant l'oxydation et le DETC la ralentissant. Pour travailler à la même vitesse optimale de 0.02 DO/min, on doit respectivement diminuer ou augmenter les quantités de pyrogallol dans chaque essai.

Cette technique est stable et reproductible. Elle donne environ 5% de variations autour de la valeur moyenne pour 3 essais. Cependant la technique mesure l'activité superoxyde dismutase à un pH non physiologique (pH 8,2). Elle est moins sensible que la technique au NBT. Cependant, la NBT est moins stable, donnant environ 15% de variations autour de la valeur moyenne pour 5 essais et KCN a une influence bien plus importante sur l'oxydation du NBT. Par ailleurs, NBT ne peut être utilisé sur des échantillons de faible activité.

5. *Catalase (CAT)*

La superoxyde dismutase et la catalase sont les enzymes antioxydantes les plus couramment mesurées dans les recherches liées aux radicaux libres. La catalase est l'enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le protocole le plus couramment utilisé est le plus direct (Aebi 1984; Goth 1991a, b). Il consiste à mesurer la disparition de H_2O_2 induite par la catalase contenue dans l'échantillon en mesurant l'absorbance de H_2O_2 à 240 nm. Les extraits (200 μ l) sont incubés 30 min à 0°C avec 2 μ l d'éthanol 95%. 2 μ l de triton à 1% sont ensuite ajoutés et les homogénats sont centrifugés à 5000 g pendant 5 min. Le surnageant ainsi récupéré sera utilisé pour le dosage qui est réalisé dans un tampon à pH 7,4 (KH_2PO_4 [40 mM], HNa_2PO_4 [60 mM]). Une mesure est effectuée en présence du surnageant seul et correspond au blanc. Puis 50 μ l de H_2O_2 (10 mM) sont ajoutés pour déclencher la réaction et les mesures sont effectuées. Une courbe standard est au préalable construite à partir d'une gamme de H_2O_2 .

Cette technique est stable et assez reproductible. Elle donne environ 10% de variations autour de la valeur moyenne pour 3 essais.

Si l'activité de la catalase dépend de la concentration initiale en H_2O_2 , elle dépend aussi de la concentration à chaque moment de mesure. En conséquence, l'activité de la catalase décroît en même temps que la concentration en H_2O_2 décroît au fur et à mesure de sa consommation par l'enzyme. L'activité catalase en fonction du temps et donc de forme exponentielle décroissante. On ne peut mesurer l'activité de la catalase que dans la partie linéaire de cinétique de décroissance de H_2O_2 . Cela limite donc les activités enzymatiques à environ 60% de la quantité initiale en H_2O_2 .

XII-Dosage des groupements thiols ; (Bulaj et al. 1998; Ellman 1959)

C'est une méthode colorimétrique qui repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH). En présence des groupements thiols de l'échantillon, le pont disulfure (SS) contenu dans le réactif d'Ellman 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 (Ellman 1959). 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 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 (DO_1). 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 (DO_2). Sur la courbe d'étalonnage lire $DO = DO_1 - DO_2$

Tampon phosphate (50 mM) pH 8 : Mettre 6,8 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml (solution A). Mettre 8,89 g de Na_2HPO_4 dans 1000 ml (solution B). Dans une fiole de 100 ml, on ajoute 5,5 ml de solution A, 29 mg d'EDTA et 94,5 ml de la solution B. Vérifier que le pH est à 8.

Réactif d'Ellman : 10 mg de DTNB dans 10 ml de tampon phosphate pH 8.

XIII-Glutathion réduit et oxydé

La compréhension du rôle physiologique exact du glutathion nécessite le développement de méthodes de dosages sensibles, spécifiques et rapides. Aucune méthode de référence n'a été établie. L'enzymocorimétrie et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont les principales actuellement utilisées. La méthode CLHP a l'avantage de permettre de doser un grand nombre d'échantillons dans un temps limité. De plus, dans cette technique ce sont le glutathion réduit et le glutathion total qui sont dosés alors que, dans la méthode colorimétrique, la valeur du GSH est déduite à partir du GSH total et du glutathion oxydé. En raison de la faible teneur en GSSG des échantillons biologiques, une erreur due à un manque de sensibilité de la méthode de dosage n'est pas exclue et elle peut, de ce fait, être répercutée sur l'expression du GSH. Toutefois, la qualité du dosage spectrophotométrique n'a jamais à notre connaissance été remise en cause.

Le dosage du glutathion, selon la méthode de Akerboom and Sies (1981) et Baker *et al.* (1990), se fait à partir de lysat cellulaire total et déprotéinisé par l'acide métaphosphorique (MPA) à 6%. Les homogénats déprotéinisés sont neutralisés par une solution de MOPS 0,4 M/EDTA 2 mM, pH 6,75. Le principe du dosage est basé sur la réduction du 5-5'-Dithiobis (2-acide Nitrobenzoïque) (DTNB à 1,5 mg/ml par le NADPH (4 mg/ml, dissoudre 16 mg dans 4 ml de bicarbonate à 0,5%). La formation de 5-thio-2-Nitrobenzoate (TNB) est suivie par spectrophotométrie à 412 nm. La sensibilité dosage peut être augmentée en mesurant la

disparition du NADPH par fluorimétrie. Les valeurs sont déterminées par comparaison du taux de réduction contre une courbe standard de glutathion à 40 μM (de 2 μM à 40 μM).

Dosage du glutathion oxydé (GSSG) : Les échantillons sont préparés selon la procédure suivante : 500 μL ou 250 μL d'échantillon, 40 μL ou 20 μL d'éthanolamine (dilué au $\frac{1}{2}$), 10 μL ou 5 μL du 2 vinyl pyridine (à 97%). Après 1h d'attente à température ambiante, les échantillons sont dosés comme précédemment.

La 2-Vp bloque totalement les groupements thiols libres en 30 min. L'éthanolamine neutralise les surnageants de déprotéinisation afin de permettre la réaction GSH avec le 2 vinyl pyridine. La réactivité du GSSG reste inchangée par la 2-Vp après une heure. Lors de la préparation de l'échantillon, l'acidification et la centrifugation servent à éliminer les protéines dont les groupements thiols pouvaient réagir avec le DTNB. Les étapes de dilutions de l'échantillon sont très importantes car l'acidification de l'échantillon conduit à une forte réduction de la vitesse de réaction du DTNB avec les groupements thiols.

Calcul : $[\text{GSSG}] = Y \text{ (lue sur la gamme)} \times 5 \mu\text{M/l}$. Facteur 5 = dilution par 10 dans MPA et divisé par 2 (car 2 molécules de GSH réduit pour une molécule de GSSG). Ainsi, $\text{GSH} = [\text{GSht}] - [\text{GSSG}]$.

XIV-Dosage du cadmium, du cuivre et du zinc

Les cellules sont incubées avec le cadmium pendant 24h puis trypsinées et les culots cellulaires obtenus sont lavés 3 fois dans du NaCl physiologique (0,9%). Les culots sont remis en suspension dans l'eau désionisée et lysées par 3 cycles de congélation (- 196°C, azote liquide)/décongélation (bain marie, 37°C). Les lysats sont centrifugés à 13000 rpm pendant 10 min pour obtenir la fraction soluble. Les concentrations de cadmium, zinc et cuivre sont déterminées par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (Perkin-Elmer, USA). L'échantillon est pulvérisé dans une flamme ou dans un four en graphite où il est transformé en vapeurs atomiques. On envoie sur ces vapeurs une radiation caractéristique des atomes à doser (longueur d'onde de la raie de résonance la plus souvent) qui est produite par la source qui est généralement une lampe à cathode creuse contenant l'élément à doser. La radiation est absorbée par les atomes non excités sur le trajet de la lumière. Un détecteur photoélectrique mesure les intensités des radiations transformées et on compare les absorbances obtenues pour les solutions étalons et la solution à doser dans les mêmes conditions. Leurs taux sont normalisés sur le contenu protéique mesuré avec le kit Pierce.

XV-Evaluation de la production des radicaux libres

En complément des dosages des oligoéléments et des paramètres du stress oxydant, nous avons cherché à mettre en évidence les ERO apportés par le cadmium, le cuivre et le zinc. Plusieurs sondes fluorescentes permettant une détection in situ des ROS dans les cellules vivantes sont disponibles dans le commerce. Elles permettent des études qualitatives et quantitatives en fluorimétrie. Parmi ces sondes fluorescentes, nous avons la dihydrorhodamine 123 (DHR 123) qui est classiquement utilisée comme marqueur mitochondrial mettant en évidence la production de H_2O_2 sans être toute fois très spécifique car elle peut réagir avec d'autres ERO cellulaires. La DHR 123 est le produit réduit non chargé, non fluorescent et non toxique, dérivé de la rhodamine 123. Cette sonde franchit librement la membrane cellulaire et est transformée par réaction avec les ERO en composé fluorescent retenu par la cellule (rhodamine 123) (Chenais *et al.* 2000; Sobreira *et al.* 1996).

Les cellules (2×10^5 cellules) sont mises dans des chambres à 4 puits (Labtek) et incubées avec les métaux pendant 24h. Après l'élimination du milieu et deux lavages avec du PBS, la sonde est extemporanément préparé (2 μ M dans du PBS), 1 ml de solution sont ajoutés dans chaque chambre. Les lames sont incubées 30 min à 37°C et les cellules sont observées dans du PBS. Les images sont prises après l'excitation de la sonde ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 505/534 nm). Des cellules non traitées servent de contrôle pour une éventuelle autofluorescence. C'est une méthode facile d'utilisation mais elle ne permet pas de déterminer la quantité des ERO induite par chaque métal.

ABSTRACT

DNA damage induced by cadmium (Cd) come not only from various antioxidant molecules inactivation, but also from the interference of this metal with other systems involved an alteration of essential metals homeostasis such as zinc (Zn) and copper (Cu). To understand the involvement of oxidative stress in the mechanisms of toxicity induced by metals, we analyzed their impact on antioxidant balance (biomarkers of oxidative stress, the major antioxidant enzymes activities, synthesis of other antioxidants factors such as metallothionein and glutathione) of two cellular lines, a cell line derived from human keratinocytes and immortalized by p53 gene mutation (HaCaT), and a line issue of rat glioblastoma (C6). Our results are in favour of prooxidant effects. The results showed that the 3 metals affect the cells redox status. This is revealed by an increased of oxidized glutathione level (GSSG), MDA level, inducing DNA damage, and not only a decrease in protein thiols groups (SH) levels, glutathione (GSH) level, but also glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione reductase (GRase) and superoxide dismutases (SODs) activities. The metals impact on the antioxidant enzymes activities is accompanied by an increase in free radicals concentrations such as the hydroxyl radical, which can initiates lipid peroxidation; proteins, GSH oxidation and DNA damage.

Unlike other metals, Cd up 50 μ M has a relatively low toxicity in HaCaT cells. This resistance is mainly explained by the presence of metallothionein (MTs) in basal state on the one hand and a synthesis of GSH and MTs induced by Cd on the other hand. The MT expression induced by Cd, Cu or Zn and MTs nuclear translocation suggests DNA protection role of these MTs against oxidative damage. The expression of MTs is regulated not only by a synthesis metals-induced but also by the GSH and p53 protein levels whose mutation has an impact on intracellular MTs levels and impact on HaCaT resistance to Cd.

These studies indicate that the imbalance between inhibition of antioxidants activities and synthesis of other factors such as GSH and MTs is strongly involved in metals toxicities. This imbalance is the cause of the oxidative stress increasing and explains the C6 cells sensitivity and high mortality induced by Cd. In these C6 cells, the antioxidant enzymes activities, GSH and MTs levels decrease at 20 μ M Cd and 475 μ M Cu. This decrease is accompanied by an increased cell death. The cell death obtained after incubation with Cd, Cu or Zn is dose-dependent and very different between C6 and HaCaT lines. Indeed, HaCaT cells in the presence of Cd and Cu have a nonapoptotic death while C6 cells, incubated with Cd, die via a p53-dependent apoptosis.

RESUME

Les dommages engendrés par l'exposition au cadmium (Cd) proviennent non seulement de l'inactivation de diverses molécules antioxydantes mais aussi de l'interférence du métal avec d'autres systèmes impliqués dans la régulation de l'homéostasie redox et de l'homéostasie de métaux essentiels comme le zinc (Zn) et le cuivre (Cu). Afin de mieux comprendre l'implication du stress oxydant dans les mécanismes de toxicité induits par ces métaux de transition, nous avons analysé leur impact sur la balance antioxydante (biomarqueurs de stress oxydant, activités des principales enzymes antioxydantes, synthèse d'autres facteurs antioxydants comme les métallothionéines, le glutathion intracellulaire) de deux lignées cellulaires ; une lignée cellulaire dérivée de kératinocytes humains et immortalisée par mutation du gène p53 (HaCaT); ainsi qu'une lignée issue du glioblastome de rat (C6). Nos résultats sont en faveur d'un effet globalement pro-oxydant. Ils montrent que les 3 métaux affectent le statut redox des cellules. Ceci est révélé par une augmentation du taux de glutathion oxydé (GSSG), du taux de MDA, des lésions de l'ADN, et une décroissance non seulement du taux des thiols protéiques (SH), de glutathion (GSH) mais aussi des activités glutathion peroxydase (GPx), catalase (CAT), glutathion réductase (GRase) et des superoxydes dismutases (SODs). L'impact des métaux sur les activités des enzymes antioxydantes s'accompagne d'une augmentation de la quantité de radicaux libres comme le radicale hydroxyle qui peut initier la peroxydation lipidique, ainsi que l'oxydation des protéines, du GSH et de l'ADN.

Contrairement aux autres métaux, le Cd présente une toxicité relativement faible dans les cellules HaCaT pour des concentrations inférieures ou égales à 50 μM . Cette résistance s'explique principalement par la présence des métallothionéines (MTs) à l'état basal d'une part et par une synthèse induite par le Cd du GSH et des MTs d'autre part. L'induction des MTs par le Cd, le Cu ou le Zn et leur redistribution nucléaire fait de ces protéines un acteur prépondérant dans la protection du génome contre les dommages oxydatifs. L'expression des MTs est régulée non seulement par une synthèse induite par les métaux mais aussi par le GSH et la protéine p53 dont la mutation a un impact sur le taux intracellulaire de MTs et sur la résistance des HaCaT au Cd.

Ces études indiquent que le déséquilibre entre l'inhibition des activités antioxydantes et la synthèse des facteurs comme le GSH et les MTs est très impliqué dans la toxicité des métaux. C'est ce déséquilibre qui est à l'origine de l'augmentation du stress oxydant et qui explique la sensibilité et la forte mortalité des cellules C6 induite par le Cd. En effet dans ces cellules, les activités des enzymes antioxydantes et les taux de GSH et de MTs diminuent dès 20 μM . Cette diminution s'accompagne d'une mort cellulaire accrue. La mort cellulaire obtenue après incubation avec le Cd, le Cu ou le Zn est dose-dépendante et très différente entre les lignées C6 et HaCaT. En effet, les cellules HaCaT en présence de Cd ou de Cu présentent une mort non apoptotique alors que les cellules C6, incubées avec le Cd, meurent par une voie apoptotique p53-dépendante.