



HAL
open science

Conséquences d'une exposition chronique à des doses modérées de cadmium sur le métabolisme du glucose de rats à différents stades de la vie

Adeline Jacquet

► To cite this version:

Adeline Jacquet. Conséquences d'une exposition chronique à des doses modérées de cadmium sur le métabolisme du glucose de rats à différents stades de la vie. Chimie inorganique. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV051 . tel-02083357v1

HAL Id: tel-02083357

<https://theses.hal.science/tel-02083357v1>

Submitted on 29 Mar 2019 (v1), last revised 13 May 2019 (v2)

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie et science du vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Adeline JACQUET

Thèse dirigée par **Eric FONTAINE, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Université Grenoble Alpes**, et codirigée par **Christine DEMEILLIERS, Maître de conférences, Université Grenoble Alpes**

préparée au sein du **Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée**
dans l'**École Doctorale Chimie & Sciences du Vivant**

Conséquences d'une exposition chronique à des doses faibles de cadmium sur le métabolisme du glucose de rats à différents stades de la vie.

Thèse soutenue publiquement le **28 septembre 2017**, devant le jury composé de :

Mme Anne, MAITRE

PU-PH, Université de Toulouse, Présidente

M. Hervé, GUILLOU

DR2, Université de Toulouse, Rapporteur

Mme Béatrice, MORIO

DR2, Université de Lyon 1, Rapporteur

Mme Brigitte, LE MAGUERESSE-BATTISTONI

DR2, Université de Lyon 1, Membre

M. Jérôme, RUZZIN

Principal Investigator, Université de Bergen, Membre



Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail et pour leur disponibilité pour relire ce manuscrit durant l'été. Je suis très reconnaissante à Hervé Guillou et Béatrice Morio, qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Merci pour l'implication que cela requière. Je remercie également Brigitte Le Magueresse-Battistoni, Anne Maître et Jérôme Ruzzin pour avoir accepté de lire et d'examiner mon travail.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la participation de l'Agence Nationale de la Recherche, qui a permis de me financer ainsi que le projet.

Je souhaite remercier Uwe Schlattner pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée. Mes remerciements vont aussi à Eric Fontaine pour sa contribution au projet et pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Je souhaite remercier ma co-directrice de thèse Christine Demeilliers pour la confiance qu'elle m'a accordée. Elle a accompagné mon travail et m'a permis de mener ces travaux à leur terme.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Jean-Marc Moulis qui a suivi le déroulement de ma thèse et a toujours été disponible lorsque j'avais besoin de conseils.

Ce travail a abouti grâce à la participation active de nombreux collègues que je souhaite remercier chaleureusement : Josiane Arnaud pour son grand professionnalisme et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, à toutes les étapes ; Damien Barbeau pour m'avoir initiée au logiciel R et avoir répondu à mes questions, pour sa patience et son implication ces derniers mois ; Cindy Tellier et Pauline Durrenbach pour leur aide immense à l'animalerie, pour leur bonne humeur et pour avoir rendu cette partie du travail moins désagréable ; Frédéric Lamarche pour les différentes casquettes qu'il a eu, tout au long de ce projet et Régis Montmayeul pour les nombreux coups de main et pour sa sympathie.

Un grand merci également à toute les personnes avec qui j'ai travaillé, qui m'ont apporté leur aide et donné des conseils, en particulier à Stéphane Attia, Karine Couturier, Hervé Dubouchaud, Eric Fanchon, Anne-Sophie Gauchez, Alfonso Gomez, Isabelle Hininger, Gérard Larmurier, Marine Lénon, Oded Maler, Mireille Osman, Fayçal Ounnas, Claudie Pinteur, Florence Puch, Alexandre Rocca, les techniciens de l'IBP, et l'équipe Bosco/Berney de l'Université de Genève. Merci aux stagiaires de Master 2 que j'ai co-encadré pendant cette thèse : Manon, Kévin, Aarushi et Samer.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire pour leur accueil sympathique et pour avoir partagé mon quotidien pendant près de quatre ans.

Cette thèse a été une expérience faite de rebondissements et de moments chargés en émotions que j'ai eu la chance de pouvoir partager avec des personnes formidables. Elles sont devenues de vrais amis et des soutiens de poids. Merci à : (sans ordre logique)

- *Charline pour les nombreux coups de main et astuces à l'animalerie,*
- *Martin pour son grain de folie et pour m'avoir fait beaucoup rire,*
- *Camille pour avoir discuté/partagé/vécu avec moi, toutes les étapes de ce parcours du combattant, quasiment du début à la fin. Elle est celle qui m'aura supportée le plus longtemps !*
- *Julien pour sa bonne humeur et son enthousiasme,*
- *Arthur pour sa spontanéité, sa personnalité unique et sa bienveillance,*
- *Céline pour son écoute et sa douceur,*
- *La « merveilleuse » Morgane pour une montagne de choses parmi lesquelles son optimisme dont j'avais bien besoin, son dévouement pour nous tous et son kit de survie à la rédaction de ce manuscrit,*
- *Aurélie pour sa gentillesse et pour les muffins et autres bonnes pâtisseries faites maison dont Arthur s'est injustement attribué les mérites !*
- *Clovis pour son savoir sans fin, du western blot au nœud de corde de canyoning, en passant par la mise en page sur Word. Avoir quelqu'un comme lui dans son entourage, pendant sa thèse est une chance,*
- *Fela pour avoir été ma confidente et pour tous les excellents moments passés ensemble.*

J'ai une pensée également pour les amies que j'ai parfois un peu délaissées mais qui se sont montrées très compréhensives : Annaïck, Capucine, Elodie, Laura et Priscylia.

Enfin j'aimerais adresser un remerciement tout particulier à Olivier. Sans lui, ces derniers mois auraient été autrement plus difficiles. Merci pour sa patience, pour toutes les petites attentions, et pour m'avoir permis de penser à autre chose.

Et évidemment, je voudrais terminer ces remerciements en m'adressant à ma famille qui m'a soutenue, aidée, motivée pendant cette thèse mais aussi permis de prendre du recul de temps en temps et de me ressourcer. Merci mille fois à Elise et Hippolyte. Je mesure la chance que j'ai d'avoir une fratrie comme cela. Merci à Elise pour ses conseils d'experte pour tous les aspects de ma vie et pour me faire régulièrement mourir de rire. Quant à Hippolyte, j'espère une future collaboration, peut-être prochainement ! Enfin je souhaite remercier mes parents pour m'avoir soutenue sans jamais me mettre de pression, pour m'avoir aidée financièrement cette dernière année, pour m'avoir emmenée en vacances afin de me changer les idées et pour avoir totalisé un nombre d'heures astronomique au téléphone.

Table des matières

Remerciements.....	- 1 -
Liste des abréviations	- 7 -
Publications, participation à des congrès et formations suivies pendant le doctorat.....	- 11 -
INTRODUCTION	- 16 -
I - LE CADMIUM	- 17 -
A. Un polluant environnemental.....	- 17 -
B. Toxicocinétique du cadmium.....	- 18 -
1. Absorption	- 18 -
2. Transport et distribution	- 23 -
3. Excrétion	- 27 -
C. Exposition de la population au cadmium.....	- 27 -
1. Contamination de la chaîne alimentaire	- 27 -
2. Les niveaux d'exposition	- 28 -
D. Impact d'une exposition au cadmium sur la santé.....	- 29 -
1. Exposition aiguë.....	- 29 -
2. Exposition chronique.....	- 30 -
3. Les facteurs de susceptibilité liés à une exposition au Cd.....	- 33 -
E. Réglementation et suivi des expositions.....	- 37 -
1. Réglementation et valeurs de référence.....	- 37 -
2. Biomarqueurs de suivi d'exposition et d'effets	- 39 -
II - METABOLISME ENERGETIQUE.....	- 43 -
A. Le métabolisme glucidique et lipidique	- 43 -
1. Physiologie de la régulation du glucose et des lipides	- 44 -
2. Mécanismes et voies de signalisation de la régulation du glucose	- 52 -

B.	Troubles et maladies métaboliques	- 56 -
1.	Les pathologies et leur expansion.	- 56 -
2.	Manifestations physiopathologiques	- 58 -
3.	Les facteurs de risque et de susceptibilité aux atteintes métaboliques.....	- 64 -
III – IMPACT DU CADMIUM SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE		- 70 -
A.	Données épidémiologiques	- 70 -
1.	Expositions professionnelles.....	- 70 -
2.	Expositions environnementales de la population générale	- 72 -
3.	Limites des études épidémiologiques	- 79 -
B.	Données expérimentales	- 80 -
1.	Etudes in vivo et ex vivo:.....	- 80 -
2.	Etudes in vitro :.....	- 86 -
OBJECTIFS SCIENTIFIQUES		- 89 -
REVUE.....		- 92 -
Exposition chronique à de faibles doses de Cd et développement du diabète : rôle du stress oxydant et comparaison avec les polychlorobiphényles (PCB).....		- 93 -
RESULTATS.....		- 126 -
Impact d'une exposition chronique à faibles doses de Cd chez des rats adultes : altérations du métabolisme glucidique dépendantes du sexe		- 127 -
Impact de l'exposition maternelle à faibles doses de cadmium avant et pendant la gestation et la lactation, sur le métabolisme de la descendance à différents âges.		- 160 -
DISCUSSION.....		- 202 -
1.	Modèles expérimentaux pour évaluer l'impact des polluants environnementaux : limites et paramètres à prendre en compte.....	- 205 -
2.	Impact différentiel de l'exposition au Cd sur les deux sexes.	- 217 -

3. Impact de l'exposition maternelle au Cd sur la descendance et évolution des effets.....	- 219 -
4. Limites de l'évaluation actuelle des risques dues aux expositions aux polluants et intérêt de nos travaux.....	- 227 -
5. Perspectives	- 228 -
REFERENCES	- 232 -
ANNEXES	- 259 -
Annexe 1 : Définition des valeurs toxicologiques de référence	- 260 -
Annexe 2 : Résumé des études in vivo et in vitro sur l'exposition au Cd et le métabolisme glucidique et lipidique (Tinkov et al, 2017).....	- 261 -
Annexe 3 : Résultats préliminaires in vitro	- 266 -

Liste des abréviations

A

ACC: acetyl CoA carboxylase
ADP: adenosine diphosphate
AGE: advanced glycation end products
AGL: acides gras libres
AhR: aryl hydrocarbon receptor
AKT: protein kinase B
ALAT: alanine-aminotransferase
AMPK: AMP-activated protein kinase
ANOVA : analysis of variance
ANR : agence nationale de la recherche
ARNm: acide ribonucléique messenger
AS160: AKT substrate 160
ASAT: aspartame-aminotransferase
ATP: adenosine triphosphate
ATSDR: agency for toxic substances and disease registry
AUC: area under curve

B

B2M: β -2-microglobulin
BMDL: benchmark dose lower confidence limit
BMI: body mass index
BPA: bisphenol A

C

CAT: catalase
CAECAM1: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)
CCT: collision cell technology
Cd: cadmium
CD36: cluster of differentiation 36
CHOL: cholesterol
CYP450: cytochrome 450

D

DL: dose létale
DL-PCB: dioxin-like polychlorobiphenyl
DMT1: divalent metal transporter 1
DNA: deoxyribonucleic acid
DOHaD: developmental origins of health and diseases
DT2: diabète de type 2
DTT: dichlorodiphényltrichloroéthane

E

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA: European food security agency
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
EPA: environmental protection agency
ER : endoplasmic reticulum
ERK : extracellular signal-regulated kinase

F

FAO : food and agriculture organization

FAS : fatty acid synthase

FOXO1 : forkhead box protein O1

G

GGT : gamma-glutamyl transferase

GIP : gastric inhibitory polypeptide

GLUT : glucose transporter

GPx : glutathion peroxidase

GR : glutathione reductase

GS : glycogen synthase

GSIS: glucose stimulated insulin secretion

GSK3 : glycogen synthase kinase 3

GSSG : glutathion disulfide

GSH : glutathion

H

HDL : high density lipoprotein

HOMA-B: homeostasis model assessment of β cell function

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

HSL : hormone-sensitive lipase

I

ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry

IL-6: interleukin 6

Ip: intraperitoneal

IpGTT: intraperitoneal glucose tolerance test

IpITT: intraperitoneal insulin tolerance test

IRS : insulin receptor substrate

J

JEFCA: joint FAO/WHO expert committee on food additives

JNK: c-jun N-terminal kinase

K

KIM-1: kidney injury molecule 2

KNHANES: korean national health and nutrition examination survey

KO: knock out

L

LC : lethal concentration

LDL: low density lipoprotein

LOAEL: lowest observed adverse effect level

M

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MDA : malonyldialdehyde

MRL : minimum risk level

MT : metallothionein

mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 2

MTP1 : metal tolerance protein

N

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAG : N-acetyl-glucosaminidase

NDL-PCB : non-dioxin-like polychlorobiphenyl

NEFA : non-esterified fatty acid

NHANES: national health and nutrition examination survey

NO : nitric oxide

NOAEL: no observed adverse effect level

NTP: national toxicology program

O

OGTT: oral glucose tolerance test

OMS: organisation mondiale de la santé

OR: odds ratio

P

PBDE : polybromodiphényléthers

PCB : polychlorobiphenyl

PCF : perfluorinated chemicals

PDE3B : phosphodiesterase 3b

PK1 : phosphoinositide dependent kinase-1

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKA : protein kinase A

PND : post-natal day

POP : persistent organic pollutant

PP : polypeptide pancréatique

PTWI : provisional tolerable weekly intake

Q – R

Quicki : quantitative insulin sensitivity check index

RBP : retinol binding protein

ROS : reactive oxygen species

S

Sc : sous cutané

SEM : standard error mean

SOD : superoxide dismutase

SREPB-1: sterol regulatory element-binding protein-1c

T

TBARS : thiobarbituric acid reactive species

TBT : tributyltin

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TF : transcription factor

TG: triglycerides

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

U – V

UPR : unfolded protein response

USA : united states of america

VLDL : very low density lipoprotein

VTR : valeur toxicologique de référence

W – Z

WC: waist circumference

WHO: world's health organization

ZIP: zinc transporter

*Publications, participation à des
congrès et formations suivies
pendant le doctorat*

Publications

- **Chronic exposure to low level cadmium in diabetes: role of oxidative stress and comparison with polychlorinated biphenyls.**

Jacquet Adeline, Ounnas Fayçal, Lenon Marine, Arnaud Josiane, Demeilliers Christine, Moulis Jean-Marc.

Current Drug Targets 17: 1385–1413.

- **Impact of chronic and low cadmium exposure of rats: sex specific disruption of glucose metabolism.**

Jacquet Adeline, Arnaud Josiane, Hininger-Favier Isabelle, Hazane-Puch Florence, Couturier Karine, Lenon Marine, Lamarche Frédéric, Ounnas Fayçal, Fontaine Eric, Moulis Jean-Marc, Demeilliers Christine.

Soumis dans Environmental Health Perspectives

- **Impact of maternal low-level cadmium exposure before and during gestation and lactation on metabolism of offspring at different ages.**

Jacquet Adeline, Barbeau Damien, Hijazi Samer, Arnaud Josiane, Hazane-Puch Florence, Lamarche Frédéric, Quiclet Charline, Fontaine Eric, Moulis Jean-Marc, Demeilliers Christine.

En préparation

Participation à des congrès

Présentation sous forme de posters :

- **Modèle d'intoxication chronique et modérée au Cadmium : impact sur le fonctionnement endocrine du pancréas**
Jacquet A, Cordier M, Lenon M, Arnaud J, Hininger-Favier I, Osman M, Cottet C, Couturier K, Fontaine E, Moulis JM, Demeilliers C.
 - Première édition des « Rencontres de CENS » (Centre Européen de Nutrition pour la Santé)
Octobre 2014 – Lyon
 - Premier meeting scientifique de la fondation Rovaltain
Octobre 2014 - Valence
 - Journée Francophone de la Nutrition (JFN)
Décembre 2014 – Bruxelles

- **Effect of low level Cadmium exposure on glucose homeostasis and β cells metabolism: a Systems Biology approach.**
Jacquet A, Julien Saint Amand K, Lénon M, Arroudj Y, Rocca A, Dang T, Fanchon E, Arnaud J, Hininger-Favier I, Osman M, Couturier K, Bottari S, Fontaine E, Moulis JM, Demeilliers C.
 - Congrès « Perspectives in Environmental and Systems Biology »
Avril 2015 - Grenoble
 - Journée de l'EDCVS
Avril 2015 – Grenoble

- **Effect of low level Cadmium exposure on glucose homeostasis and function of β cells**
Jacquet A, Julien Saint Amand K, Lénon M, Arnaud J, Hininger-Favier I, Osman M, Couturier K, Fontaine E, Moulis JM, Demeilliers C.
 - Congrès international « 2nd Cadmium Symposium »
Juin 2015 - Sassari, Sardaigne, Italie

Présentation sous forme de communications orales :

- **Journée thématique « Santé-Environnement, Santé des écosystèmes »**
Septembre 2015 – Grenoble
« Avancées du programme Cadmidia s'intéressant à l'association entre exposition au cadmium à faibles doses et diabète »

- **Journée thématique « Santé-Environnement, Santé des écosystèmes »**
Juillet 2016 – Grenoble
« Etude de l'impact d'une exposition chronique à des doses modérées de Cadmium sur le métabolisme du glucose »

- **6^{ième} International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM)**
Mai 2016 – Catane, Sicile, Italie
« Dams exposure to cadmium in drinking water impacts glucose homeostasis of their offspring »
Prix de jeune chercheur attribué par la Société Francophone d'Etude et de Recherche sur les Eléments Toxiques et Essentiels (SFERETE)

Formations suivies :

- Formation à l'utilisation de Zotero
31 octobre 2013, Université Grenoble Alpes

- Initiation à la cytométrie en flux.
3 et 5 février 2014, Université Grenoble Alpes

- Formation aux risques biologiques
6 février 2014, Université Grenoble Alpes

- Tronc commun des Label (série de petites formations concernant l'établissement d'un projet professionnel, la création de son réseau, savoir se « pitcher », ...)
19 – 20 février 2014, Université Grenoble Alpes

- Obtention du niveau 1 en Expérimentation animale
19 mai – 6 juin 2014, Université Grenoble Alpes

- Journée de formation à la purification des îlots pancréatiques au Laboratoire d'Isolément et Transplantation Cellulaires (Groupe Posco/Berney)
7 octobre 2014, Genève

- Label de l'Université Grenoble-Alpes REI (Recherche, Entreprise et Innovation) :
 - groupement de formations dans le but de l'insertion professionnelle dans le secteur privée
 - participation à une structure type « junior entreprise » proposant les compétences des doctorants aux entreprises de la région.Année scolaire 2014 – 2015

- Formation au management « Ce que manager veut dire »
26 – 27 avril 2016, Université Grenoble Alpes

INTRODUCTION

I - LE CADMIUM

A. Un polluant environnemental

Le cadmium (Cd) est un métal naturellement présent dans la croûte terrestre et dans les océans, à une concentration, respectivement de l'ordre de 0.1 à 0.5 ppm et de moins de 5 à 110ppm. Il est généralement associé à d'autres minerais comme le zinc, le plomb ou le cuivre. Ainsi, environ 3 kg de Cd peuvent être extraits par tonne de zinc.

D'un point de vue chimique, le Cd fait partie du groupe IIB du tableau périodique avec le zinc et le mercure. Selon le milieu et les conditions environnantes (pH, salinité), le Cd peut se trouver sous différentes formes. Dans l'air, le Cd est présent sous forme oxydé. Dans l'eau faiblement salée, on trouve du Cd en ion libre Cd^{2+} , sous forme d'hydroxyde $\text{Cd}(\text{OH})_2$ ou lié avec du matériel organique soluble. Dans l'eau de mer, le Cd forme des complexes avec le chlore : CdCl_2 et CdCl^+ . Enfin dans l'eau de sol, il est principalement présent sous forme d'ions libres mais aussi, en moindre concentration, en complexe CdCl^+ , CdSO_4 . A pH plus élevé, on peut le trouver sous forme de CdOH^+ et CdCO_3 . Dans le sol, le Cd est souvent immobilisé suite à sa forte affinité à du matériel organique. Dans les organismes vivants (mammifères, oiseaux et poissons), le Cd est généralement lié à des protéines, principalement à la métallothionéine, l'albumine, et les molécules portant un groupement thiol (EFSA 2009).

Le Cd est dispersé dans l'environnement suite à des phénomènes naturels et indépendants de l'Homme : éruptions volcaniques, feu de forêt, effritement et érosion des roches. Toutefois, les sources anthropologiques accentuent de manière considérable la dissémination du Cd. Le Cd est utilisé, majoritairement, dans la fabrication d'électrodes pour les batteries au nickel. Cela correspond à environ 83% des utilisations de ce métal, mais ce chiffre tend à baisser avec le remplacement par les batteries au lithium. Le Cd intervient également dans la production de pigments pour les plastiques, les céramiques, et le verre (8%). Il est utilisé comme agent stabilisant dans des plastiques (1.2%), dans la fabrication de cellules photovoltaïques grâce à ses propriétés de semi-conducteur et dans certains alliages (0.8%). En 2015, 23 200 tonnes de Cd raffiné ont été produites dans le monde entier (hors Etats-Unis pour lesquels cette donnée n'est pas communiquée). 62% de cette production provient d'Asie (Chine, Corée du Sud,

Australie, Inde), 23 % d'Europe et d'Asie centrale (Kazakhstan, Russie, Pays Bas, Pologne, Allemagne, Norvège, Bulgarie, Ouzbékistan), 11% du Mexique et Canada et 4 % des pays d'Amérique du Sud (United States Geological Survey 2016)

En raison des inquiétudes et des réglementations concernant son impact sur l'environnement et la santé, l'emploi du Cd tend à baisser. Cependant, le recyclage des batteries, l'extraction du zinc ainsi que diverses sources anthropologiques continuent de propager du Cd dans l'environnement (ATSDR 2012; EFSA 2009). En effet, l'exploitation minière, l'industrie de la métallurgie, l'incinération de déchets et la combustion d'énergies fossiles émettent des particules de Cd dans l'atmosphère qui retombent ensuite à la surface de l'eau ou sur le sol. On estime que 0.1- 5ng.m⁻³ de Cd sont présent dans l'air dans les zones rurales contre 2-15 ng.m⁻³ en zone urbaine et 15 à 150 ng.m⁻³ en zone industrielle (ATSDR 2012). Ces particules de Cd mettent entre un et dix jours pour se déposer et peuvent dans l'intervalle être déplacées jusqu'à 1000 km. Ainsi, des zones éloignées des sites d'émission peuvent aussi être contaminées. L'épandage d'engrais phosphaté, contenant environ 30 mg Cd.kg⁻¹ P₂O₅ en moyenne, et de boue d'épuration contenant, elle-aussi, du Cd entraîne la contamination des sols, de l'eau et des aliments. En plus de l'érosion des roches qui charrie une quantité non négligeable de Cd dans les rivières et les océans, on estime que 900 à 3600 tonnes de Cd atmosphérique sont déposés à la surface de l'eau par an. Cela résulte en une concentration en Cd dans l'eau des mers et océans de 5-20 ng.L⁻¹ et de 10-100ng.L⁻¹ dans les rivières et les lacs. Le Cd adsorbé sur des sédiments représente 0.03-1mg.kg⁻¹ de sédiments marins et jusqu'à 5mg.kg⁻¹ dans les rivières. Dans le sol de surface, la concentration de Cd est en général de 0.01 à 2.7 mg.kg⁻¹ mais peut être bien plus élevée dans des zones très contaminées (ATSDR 2012).

B. Toxicocinétique du cadmium

1. Absorption

Du fait de sa dissémination dans différents éléments de notre environnement, le Cd peut être absorbé par trois voies différentes.

a. Inhalation

Le Cd inhalé peut être en partie expiré mais aussi se déposer dans le système respiratoire. Les grosses particules auront tendance à rester dans les voies respiratoires hautes alors que les plus petites pourront atteindre les alvéoles. L'absorption, elle, se fait en majorité au niveau alvéolaire. De ce fait, la taille des particules de Cd est le critère qui semble impacter principalement le dépôt et l'absorption du Cd dans les poumons. En effet, il est estimé à partir d'un modèle toxicocinétique que seulement 5% des particules de diamètre supérieur à 10µm se déposeront dans les voies respiratoires alors que pour les particules de moins de 0.1µm, ce pourcentage monte jusqu'à 50% (ATSDR 2012). De plus, entre 50 et 100% du Cd déposé dans les alvéoles est absorbé ce qui résulte en une absorption globale d'environ 25% des particules de petites tailles inhalées.

L'absorption du Cd par le tabagisme est accrue par rapport aux poussières volatiles de ce métal. En effet, l'espèce de Cd présente dans la fumée de cigarette (oxyde de cadmium) associée à la taille réduite des particules entraîne un dépôt alvéolaire plus grand (Takenaka et al. 2004).

b. Voie cutanée

Une exposition cutanée au Cd peut aussi entraîner, dans une moindre mesure, l'entrée du Cd dans l'organisme. Parmi le peu d'études réalisées sur ce sujet, on trouve des travaux effectués sur peau humaine *in vitro*, perfusée de façon percutanée pendant 16h avec, soit de l'eau contenant du CdCl₂, soit de la terre contaminée (Wester et al. 1992). Après exposition par l'eau, la grande majorité de la dose de Cd n'est pas absorbée, 0.1 à 0.6% traverse la peau et 2.4 à 12.7% reste dans les cellules. Ces proportions sont diminuées dans le cas de l'exposition à la terre contaminée avec seulement 0.01 à 0.07% de la dose de Cd qui traverse la peau. Chez l'animal, Kimura et Otaki ont observé, chez des lapins, que 0.4 à 0.6% de la dose de Cd administrée était retrouvée dans les reins et le foie, deux semaines après application d'eau ou de pommade contenant du Cd, sur une zone de peau rasée, 5 fois en 3 semaines (Kimura et Otaki 1972). Dans la même étude, une pommade contenant du Cd a été appliquée 5 fois par semaine à des souris sans poils. 0.2 à 0.8% du Cd ainsi administré a été retrouvé dans le foie et les reins de ces animaux, une semaine après. Ces résultats montrent que l'absorption du Cd par

voie cutanée est réelle mais est un processus limité et lent qui pourrait potentiellement se révéler un problème dans des cas de contact prolongé avec une substance contaminée. De ce fait, dans la suite de ce manuscrit, elle ne sera pas détaillée plus précisément.

c. Voie orale

La plupart de la quantité de Cd ingéré traverse le système digestif sans être absorbé. Chez l'Homme, le taux d'absorption du Cd par voie orale a été estimé entre 1.1 à 10.6%. (Flanagan et al. 1978; McLellan et al. 1978; Newton et al. 1984; Shaikh and Smith 1980). Cependant cette valeur varie en fonction de l'espèce : chez la souris, il est approximativement de 0.3 à 3% (Bhattacharyya et al. 1981; Engström and Nordberg 1979) et chez le rat, il varie de 0.2 à 3% selon les conditions expérimentales (Moore et al. 1973; Müller et al. 1986; Schäfer et al. 1990).

Le passage du Cd de l'intestin à la circulation sanguine s'effectue en trois étapes : le passage de la membrane apicale des cellules épithéliales du côté du lumen intestinal, le transport dans le cytoplasme de ces cellules, puis le passage de la membrane basolatérale pour rejoindre la circulation sanguine (Zalups and Ahmad 2003). Les mécanismes d'absorption et de transport du Cd ne sont pas complètement élucidés à l'heure actuelle mais plusieurs pistes décrites ci-dessous ont été proposées.

o Passage de la membrane apicale :

Concernant la première étape d'absorption dans les cellules intestinale, l'entrée du Cd semble s'effectuer en grande partie par mimétisme ionique (Bridges and Zalups 2005) c'est-à-dire en utilisant des transporteurs réservés à d'autres éléments essentiels comme le fer, le zinc ou le calcium. Le transporteur DMT1 (*divalent metal transporter 1*) qui est connu principalement pour participer à l'homéostasie du fer, peut aussi transporter du Cd (Gunshin et al. 1997; Okubo et al. 2003). En effet, il a une bonne affinité pour le Cd et une étude sur des œufs de Xénopes exprimant le DMT1 humain a montré que la spécificité du transporteur pour différents ions métalliques diminuait dans l'ordre suivant : $Cd^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}, Mn^{2+} \gg Zn^{2+}, Ni^{2+}, Vo^{2+}$ (Illing et al. 2012). Le rôle de DMT1 dans l'absorption du Cd a aussi été démontré dans des études sur une lignée cellulaires d'entérocytes humains Caco-2, où une diminution de

l'expression de DMT1 (par *knock-down* ou traitement avec du fer) entraîne une réduction significative de l'absorption du Cd (Bannon et al. 2003; Tallkvist et al. 2001) . A l'inverse, l'augmentation de 15 fois de l'expression de DMT1 chez des rats déficients en fer induit une augmentation de l'absorption du Cd et une quantité de Cd dans les organes dix fois supérieure à celle de rats supplémentés en fer (Park et al. 2002).

Bien que la contribution de ce transporteur dans l'absorption intestinale du Cd soit bien documentée, il semble que ce ne soit pas le seul acteur. En effet, des souris ayant des transporteurs DMT1 dysfonctionnels, restent capable d'absorber du Cd après ingestion (Suzuki et al. 2008). D'autres mécanismes d'entrée du Cd dans les cellules ont été proposés mais nécessitent des investigations plus poussées pour affirmer leur rôle dans l'absorption du Cd. La compétition entre le Cd et le zinc pour un transporteur autre que DMT1 a été mise en évidence (Elisma and Jumarie 2001). Un candidat possible pourrait être le transporteur de zinc hZTL1 qui est présent à la membrane apicale des entérocytes. D'autres études proposent l'implication des transporteurs ZIP8 et ZIP14 (He et al. 2009; Himeno et al. 2009). Un mimétisme ionique similaire qui permettrait l'entrée du Cd dans différents types de cellules (dans le foie, le rein, ...) est envisagé avec les processus de transport du calcium mais reste assez peu documenté (Blazka and Shaikh 1991; Friedman and Gesek 1994; Hinkle et al. 1987; Souza et al. 1997). Le Cd complexé avec des petits polypeptides ou des acides aminés pourrait emprunter la voie de l'endocytose grâce aux transporteurs d'acides aminés correspondant, comme c'est le cas pour le mercure (Cannon et al. 2000). Enfin, certains travaux indiquent que le Cd lié à la métallothionéine (MT) est capable d'entrer intact dans la circulation portale (Cherian 1979; Cherian et al. 1978; Sugawara and Sugawara 1991).

- [Passage dans la circulation sanguine :](#)

Les mécanismes de sortie du Cd des entérocytes sont à ce jour, encore très mal compris. Au regard des processus impliqués dans l'entrée du Cd et notamment du rôle de DMT1, le transporteur de fer MTP1, présent à la membrane basolatérale, est un possible candidat (Kim et al. 2007; Ryu et al. 2004).

- Facteurs impactant l'absorption :

Différents aspects ont un impact sur le taux d'absorption intestinale du Cd. Tout d'abord, il a été décrit que le taux d'absorption augmente avec la dose de Cd ingérée. En effet, alors que la concentration de Cd retrouvée dans les organes de rats 7 jours après administration intraveineuse est proportionnelle à la dose de Cd, les rats exposés par voie orale présentent une quantité de Cd dans les organes plus grande et non proportionnelle à la dose ingérée (Lehman and Klaassen 1986). Le pourcentage de Cd retenu dans l'organisme passe de 0.4% pour les rats ayant reçu $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cd à 1.65% pour ceux ayant ingéré $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. De plus, dans cette même étude, la distribution du Cd dans les organes diffère aussi selon la quantité de Cd ingérée. Dans une autre étude, des absorptions de Cd allant de 0.09% après administration de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ à 3.4% pour $10\,000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ont été observés chez le rat (Goon and Klaassen 1989).

La teneur en métaux essentiels dans la nourriture a aussi un impact sur l'absorption intestinale du Cd. En effet, il a été montré dans de nombreux travaux qu'une faible consommation de fer, calcium ou zinc favorise l'absorption du Cd et son accumulation (Felleo-Bosco and Diezi 1992; Flanagan et al. 1978; Kim et al. 2007; Park et al. 2002; Reeves and Chaney 2004, 2008; Ryu et al. 2004). A l'inverse, une réduction de l'absorption de Cd est observée chez des animaux supplémentés en ces métaux essentiels (Groten et al. 1991; Park et al. 2002; Ryu et al. 2004). Ce phénomène serait probablement dû à une compétition au niveau des transporteurs et à l'induction de l'expression de ces transporteurs du fait de la carence, notamment pour DMT1 dans le cas du fer. Des études épidémiologiques appuient ces résultats et en particulier pour les femmes carencées en fer qui présente des quantités plus grandes de Cd dans les organes (Akesson et al. 2002; Berglund et al. 1994; Gallagher et al. 2011; Kippler et al. 2007; Meltzer et al. 2010; Mijal and Holzman 2010; Satarug et al. 2004; Vahter et al. 2002).

La spéciation du Cd dans l'intestin a aussi son importance et influe sur l'entrée du Cd et sa distribution (Müller et al. 1986). Il a été observé par exemple que l'absorption intestinale du Cd inorganique était plus élevée que lorsque le Cd est complexé avec la métallothionéine (Groten et al. 1990; Sugawara and Sugawara 1991) ou des phytochélatines (Fujita et al. 1993).

Enfin une différence de concentration en Cd sanguin et urinaire a été observée entre les femmes et les hommes suggérant une absorption intestinale plus élevée chez les femmes

(ATSDR 2012; Berglund et al. 2011; Lee and Kim 2014; Olsson et al. 2002). Ceci s'explique en partie par l'anémie rencontrée chez les femmes à certaines périodes de leur vie comme pendant la grossesse (références citées plus haut). Sur l'animal, il a été remarqué une augmentation de l'absorption du Cd pendant la gestation dans des études sur les rongeurs. Chez des rates gavées avec du CdCl₂ marqué, à 19 jours de gestation, les reins et foie prélevés 20 jours plus tard présentaient deux fois plus de Cd que chez les rates non gestantes (Leazer 2002). La concentration de Cd était 2.5 fois supérieure dans le duodenum, jejunum et ileum, et le niveau d'expression de DMT1 dans le duodénum était augmenté à partir du 15^{ième} jour de gestation. De façon intéressante, les auteurs ont aussi noté une augmentation de l'expression de DMT1 dans le placenta. Une augmentation de Cd a également été mesurée dans le duodénum de souris gestantes gavées avec du CdCl₂ marqué, au 15^{ième} jour de gestation (Bhattacharyya et al. 1981). De plus, dans la même étude mais sur des souris ayant ingéré du Cd au 10 ou 17^{ième} jour de lactation, l'absorption du Cd était 2 à 3 fois plus élevée comparée aux souris n'ayant pas été gestantes et la concentration de Cd dans le rein était 3 à 4 fois plus élevée. A la fin de la lactation, un retour à des taux d'absorption normaux a été observé.

2. Transport et distribution

a. Transport

Après ingestion et absorption par les entérocytes, le Cd passe dans la circulation sanguine hépatique. Les différentes molécules avec lesquels le Cd est effectivement lié dans le sang ne sont pas encore complètement connues et répertoriées. En effet, la spéciation du Cd dépend grandement du type d'exposition (chronique ou aiguë), de la voie d'administration, et de la composition de la nourriture (Vesey 2010). Le grand nombre d'études avec des modèles expérimentaux différents fait qu'il est pour l'instant difficile d'avoir des conclusions claires sur ce point. Cependant, il est bien établi que le Cd a une bonne affinité pour les groupements thiols et les protéines riches en cystéines et, de ce fait, il a la capacité de se lier avec l'albumine, la cystéine, le glutathion et la métallothionéine (MT) (Nordberg et al. 1971; Rabenstein et al. 1983; Verma et al. 1982; Zalups and Ahmad 2003). Dans le sang, la majorité du Cd se trouve dans les érythrocytes, complexé avec la MT ou l'hémoglobine (Rabenstein et al. 1983; Satarug et al. 2017a). La portion restante de Cd dans le plasma (environ 10 %) est majoritairement liée

à l'albumine avec une constante de dissociation de 10^4 qui permet au Cd de se dissocier et de rentrer dans les cellules des organes (Verma et al. 1982; Zalups and Ahmad 2003). Les mécanismes d'entrée dans les cellules ne sont pas encore totalement définis mais certains transporteurs notamment ceux mentionnés précédemment sont suspectés de jouer un rôle (Thévenod 2010; Zalups and Ahmad 2003). Le tableau ci-dessous regroupe les transporteurs avérés, potentiels et controversés décrits dans la littérature (Thévenod 2010).

Table 1: Transporteurs de Cd dans les cellules de mammifères (Thévenod, 2010)

	Transported Cd ²⁺ moiety	Mechanism of transport	References
<i>Proven Cd²⁺ transport pathways</i>			
Megalyn/cubilin (receptor)	CdMT	Receptor-mediated endocytosis	Klassen et al. (2004), Wolff et al. (2006)
DMT1/SLC11A2	Cd ²⁺	Cd ²⁺ /H ⁺ cotransport	Gunshin et al. (1997), Bannon et al. (2003) Okubo et al. (2003), Garrick et al. (2006)
ZIP8/SLC39A8	Cd ²⁺	Cd ²⁺ /2HCO ₃ ⁻ cotransport	Dalton et al. (2005), He et al. (2006), Liu et al. (2008)
ZIP14/SLC39A8	Cd ²⁺	Cd ²⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransport (?)	Girijashanker et al. (2008)
<i>Likely Cd²⁺ transport pathways</i>			
MRP1/ABCC1	CdGSH	ATP-dependent efflux	Tommasini et al. (1996)
CFTR/ABCC7	CdGSH	ATP-dependent efflux (?)	Kogan et al. (2003), L'Hoste et al. (2009)
TRPM7	Cd ²⁺	Channel	Monteilh-Zoller et al. (2003), Levesque et al. (2008)
CaV3.1-3 T-type Ca ²⁺ channels (VDCCs)	Cd ²⁺	Channel	Lacinova et al. (2000), Diaz et al. (2005), Lopin et al. (2007), Jamieson et al. (2008), Kaku et al. (2003)
Mitochondrial Ca ²⁺ uniporter	Cd ²⁺	Channel	Lee et al. (2005a, b)
<i>Less likely Cd²⁺ transport pathways</i>			
ICRAC (SOCs)	Cd ²⁺	Channel	Hoth and Penner (1993)
L- and N-type Ca ²⁺ channels (VDCCs) (with the possible exception of CaV1.3 channel)	Cd ²⁺	Channel	Thévenod and Jones (1992), Lansman et al. (1986), Swandulla and Armstrong (1989), Chow (1991)
<i>Unclear or controversial Cd²⁺ transport pathways</i>			
MDR1/ABCB1	Cd ²⁺ /CdGSH/ CdATP	ATP-dependent efflux	Endo et al. (2002), Kimura et al. (2005), Achard-Joris et al. (2005)

CdMT cadmium–metallothionein complex, *CdGSH* cadmium–glutathione complex, *VDCCs* voltage dependent Ca²⁺ channels, *ICRAC* Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current, *SOCs* store-operated Ca²⁺ channels. References support but do not prove Cd²⁺ transport. For further details, please refer to the text

b. Distribution

Chez l'homme, après exposition, le Cd est présent dans quasiment tous les organes mais principalement dans le foie et les reins, les principaux organes cibles (Chung et al. 1986; Goullé et al. 2010; Lech and Sadlik 2017; Sumino et al. 1975). Ceci est aussi observé chez les rats (Kotsonis and Klaassen 1978). Il est estimé que deux tiers de la charge corporelle de Cd se trouve dans le rein et le foie (Satarug et al. 2017a). Néanmoins, la distribution du Cd peut varier en fonction de la spéciation (Groten et al. 1991) mais aussi du type d'exposition. En effet, lors d'une exposition orale courte ou aiguë, le Cd se trouvera en concentration similaire dans le foie et les reins (Andersen et al. 1988). Cependant, à la suite d'une exposition chronique, le Cd s'accumulera préférentiellement dans le rein atteignant des concentrations 3 à 34 fois supérieure au foie (Kjellström 1979; Kotsonis and Klaassen 1978). La demi-vie du Cd dans l'organisme a été évalué de 10 à 30 ans, ce qui engendre une accumulation du métal tout au long de la vie (Järup and Akesson 2009).

Après ingestion et absorption, le Cd passe dans le foie. Le Cd ionique ou lié avec une constante de dissociation relativement grande est alors disponible pour rentrer dans les hépatocytes avec l'aide des transporteurs mentionnés précédemment. L'exposition au Cd induit alors l'expression de la MT dans différents organes et particulièrement dans le foie (Klaassen et al. 2009; Sabolić et al. 2010). Le Cd dans le foie est donc séquestré par la MT ce qui diminue sa disponibilité et ses potentiels effets toxiques à l'intérieur de la cellule (Klaassen et al. 2009; Sabolić et al. 2010). La sortie du Cd du foie peut s'effectuer par une excrétion dans le système biliaire ou par un relargage dans le sang sous forme de Cd-MT lorsque les cellules sont endommagées (Nomiyama et al. 1998; Zalups and Ahmad 2003).

Le Cd complexé avec la MT est difficilement dissociable et rend impossible l'entrée du Cd dans la plupart des cellules sauf certaines cellules rénales. En effet, la petite taille de la MT lui permet d'être filtré par le rein et réabsorbé dans les tubules proximaux qui sont capables de transporter efficacement le Cd-MT intact (Thévenod and Wolff 2016; Zalups and Ahmad 2003), ce qui explique que le rein soit l'organe accumulateur principal du Cd. Une fois entré dans les tubules proximaux, très peu de Cd s'en échappe. Tant que la capacité de liaison avec des protéines comme la MT n'est pas dépassée, le Cd est séquestré. Dans le cas inverse, la réactivité du Cd avec d'autres molécules augmente et peut entraîner une toxicité (Vesey 2010).

c. Rôle de la métallothionéine

La métallothionéine est une petite protéine riche en cystéine qui a la capacité de se lier fortement avec les métaux (Sabolić et al. 2010). Comme mentionné précédemment son expression est induite dans plusieurs organes par l'exposition à divers métaux dont le Cd (Klaassen et al. 2009). Un possible impact de la MT dans l'absorption intestinale du Cd n'a pas été clairement élucidé. En revanche, elle est à l'origine de la rétention importante du Cd dans divers tissus et donc de sa longue demi-vie dans l'organisme. Le rôle protecteur de la MT vis-à-vis de la toxicité du Cd a été souligné dans plusieurs études. En effet, la liaison du Cd à la MT dans le cytoplasme des cellules empêche son action et ne le rend pas disponible à l'entrée dans les organelles ou à la sortie de la cellule. Cependant, on estime qu'au-delà d'une concentration de Cd dépassant les capacités de liaisons de la MT, des dommages cellulaires apparaissent (Sabolić et al. 2010). Il a ainsi été montré que des souris sauvages ont une meilleure tolérance à la létalité du Cd comparées à des souris n'exprimant pas la MT (Park et al. 2001).

Dans le foie, et à la suite d'une exposition aiguë au Cd, les rats exprimant de haut taux de MT présentent moins d'hépatotoxicité (Goering and Klaassen 1984; Liu et al. 1995). A l'inverse, chez des souris n'exprimant pas la MT, la toxicité hépatique augmente (Masters et al. 1994). Cet effet est retrouvé dans le cas d'exposition plus longue mais dans une moindre mesure puisqu'avec ce type d'exposition, le foie est moins ciblé par la toxicité du Cd que dans le cas d'exposition aiguë (Habeebu et al. 2000a; Nomiyama et al. 1998).

Dans le rein, le rôle protecteur de la MT est plus ambigu puisque le Cd-MT est capable de rentrer efficacement dans les cellules des tubules proximaux et donc favorise une entrée importante de Cd dans les cellules. A l'intérieur de ces cellules, la liaison est hydrolysée et la MT dégradée dans les lysosomes (Sabolić et al. 2010). Le Cd est alors relargué dans le cytoplasme (Dorian et al. 1992) où il peut se lier à la MT néo-synthétisée. De même que dans le foie, lorsque la capacité de liaison de la MT à l'intérieur des cellules des tubules proximaux est dépassée, du Cd ionique s'accumule et entraîne la toxicité (Sabolić et al. 2010; Thévenod 2003).

L'aspect protecteur de la MT a aussi été décrit au niveau de l'os et vis-à-vis du potentiel carcinogène du Cd (Habeebu et al. 2000b; Klaassen et al. 2009).

3. Excrétion

Une grande partie du Cd ingéré n'est pas absorbée et est donc excrétée rapidement dans les fèces. Le Cd qui entre dans l'organisme est très peu éliminé. Grâce à des transporteurs spécifiques, le Cd présent dans le foie sous forme complexée avec du glutathion ou de la cystéine peut être sécrété dans le système biliaire. Il passe alors dans le lumen intestinal et est éliminé dans les fèces (Zalups and Ahmad 2003). Le taux de sécrétion de Cd dans la bile est très faible et varie selon les études. A titre d'exemple, dans une étude sur des rats soumis à une série d'injections sous-cutanées de Cd (12 injections de 0.5 mg.kg^{-1} ou 5 injections de 0.125 mg.kg^{-1}), les auteurs ont mesuré que seulement 0.015% de la charge corporelle en Cd était sécrété par 24 heures, 4 à 5 semaines après la dernière injection (Elinder and Pannone 1979). Chez l'humain, peu de données sont disponibles. Une concentration d'environ 2.5 ng.g^{-1} de Cd a été mesurée dans la bile de patients suédois hospitalisés pour calculs biliaires (Elinder et al. 1978).

L'excrétion urinaire du Cd correspond, chez l'Homme, à environ 0.005 à 0.015% de la charge corporelle totale de Cd (Kjellström 1979). Dans le cas d'expositions faibles, la quantité de Cd relarguée dans l'urine est faible et proportionnelle à l'accumulation du métal dans les reins. Cependant on estime qu'au-delà d'un seuil de 150 à 200 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de rein humide, les cellules rénales commencent à subir des dommages importants révélant une néphrotoxicité (Bernard 2004; Prozialeck and Edwards 2010; Suzuki 1980). Cela entraîne la libération de cellules mortes et de leur contenu cytosolique dans l'urine. On observe alors une augmentation importante de la concentration de Cd dans l'urine.

C. Exposition de la population au cadmium

1. Contamination de la chaîne alimentaire

Le Cd présent dans le sol et l'eau peut être transféré dans les plantes et s'y accumuler (Hossain et al. 2007; Smolders 2001). Ce transfert dépend du pH du sol et de sa composition, de la forme de Cd, mais aussi de l'espèce des plantes. Ce phénomène engendre la contamination de la nourriture et la présence du Cd dans quasiment toute la chaîne alimentaire

(EFSA 2009). Néanmoins, les études ne montrent pas de preuve d'une biomagnification du Cd (Barwick and Maher 2003; Beyer 1986).

Par conséquent, 90% de l'exposition au Cd de la population générale non fumeuse est attribuable à l'ingestion de nourriture contenant ce métal. Une étude de l'EFSA (European Food Safety Agency) a déterminé pour une grande variété d'aliments, leur teneur en Cd et leur apport résultant dans l'exposition des Hommes au Cd. Les concentrations de Cd les plus remarquablement élevées se trouvent dans les céphalopodes, les algues, les graines oléagineuses, la viande de cheval, les champignons, les abats et les mollusques (EFSA 2012). Pourtant, ce ne sont pas ces aliments contenant de fortes concentrations de Cd qui contribuent le plus à l'exposition quotidienne, mais plutôt les aliments qui sont ingérés en grandes quantités et fréquemment. Ainsi, les aliments principalement responsables de l'exposition au Cd sont les céréales et produits céréaliers (26.9%), les légumes (particulièrement les légumes à feuilles) (16%), les féculents et tubercules (13.2%). Les pommes de terre, le pain, le chocolat, les fruits de mer et le riz participent eux aussi à l'apport en Cd.

L'exposition via l'eau de boisson est, dans la plupart des cas minime, sauf dans les régions proches d'industries qui émettent du Cd.

Les plants de tabac, absorbent particulièrement efficacement le Cd et l'accumulent dans leurs feuilles. Une cigarette contient environ 1.7 μg de Cd. Par conséquent, le tabagisme représente la source de contamination majoritaire pour les individus fumeurs.

2. Les niveaux d'exposition

L'EFSA a estimé, dans son rapport de 2012, la quantité hebdomadaire de Cd ingéré par les européens en se basant sur les concentrations de Cd trouvées dans les aliments (EFSA 2012). Il en résulte qu'en moyenne les Européens sont exposés par leur alimentation à 2.04 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Cd par semaine. Cette valeur est calculée pour tous âges confondus mais on observe une variation en fonction de l'âge. Ainsi, chez les enfants en bas âge, la quantité estimée de Cd ingérée par semaine est de 4.85 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ alors qu'elle est de 1.56 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ chez les personnes âgées. De plus, une partie non négligeable de la population est susceptible d'ingérer des quantités de Cd bien plus grandes, du fait d'un régime alimentaire différent comme par

exemple les végétariens ou les personnes consommant beaucoup de fruits de mer ou d'abats. L'ingestion hebdomadaire pour les personnes les plus exposés, correspondant au 95^{ième} percentile, a été évaluée à 3.66 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour la population générale, 2.82 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les personnes âgées et 8.19 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les jeunes enfants. Ces niveaux d'exposition calculés peuvent aussi varier selon la situation géographique et le niveau de pollution de la zone, ainsi que les habitudes alimentaires.

Aux Etats-Unis, l'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) indique que les citoyens américains non-fumeurs ingèrent environ 0.33 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Cd par jour, ce qui correspond à une exposition similaire aux données de l'EFSA.

Cette façon de calculer l'exposition des populations en se basant sur les concentrations mesurées dans la nourriture permet d'évaluer la contribution de chaque type d'aliment à l'exposition totale mais sa pertinence dans l'évaluation des niveaux d'exposition a ses limites. En effet, les niveaux d'expositions calculés ne montrent pas toujours de corrélation avec les concentrations de Cd retrouvées dans l'urine ou le sang des mêmes populations (Satarug et al. 2017a). Il apparaît donc important de prendre ces valeurs avec précautions et de se référer aux marqueurs biologiques d'exposition (décrit en I.E.2.b).

D. Impact d'une exposition au cadmium sur la santé

Le Cd est un métal non-essentiel et toxique qui a un impact sur la santé au niveau de différents organes. La partie suivante se concentrera sur le lien entre l'exposition au Cd par ingestion et plusieurs pathologies.

1. Exposition aigue

L'ingestion de très fortes doses de Cd conduit à la mort suite à la perte massive de fluides biologiques, d'œdèmes et de la destruction des organes. Chez les rongeurs, la dose létale médiane (correspondant à la dose qui résulte en la mort de 50% de l'effectif) varie de 100 à 300 mg.kg^{-1} (ATSDR 2012). La plus faible dose causant la mort a été observé chez des rats Sprague-Dawley pour 15.3 mg.kg^{-1} (ATSDR 2012).

Il a également été décrit que l'exposition orale aiguë à de fortes doses de Cd entraîne des irritations sévères de l'épithélium gastrointestinal pouvant induire des nausées, des vomissements, de la salivation, des douleurs, des crampes abdominales et des diarrhées (ATSDR 2012).

2. Exposition chronique

L'exposition chronique à de fortes doses de Cd conduit au développement de la maladie de Itai-itai. Cette pathologie a été découverte dans les années 1960 suite à la contamination du bassin de la rivière Jinzu au Japon, par une usine d'extraction de zinc. De très fortes concentrations de Cd se sont retrouvées dans le riz et l'eau que consommaient les habitants de cette région. On estime que la quantité de Cd ingérée par les personnes qui ont développé cette maladie était d'environ 600 µg par jour. La maladie de Itai-itai se caractérise par une atteinte sévère de la fonction rénale (tubulaire et glomérulaire) doublée d'une ostéomalacie et d'une ostéoporose. Les personnes atteintes subissent de fortes douleurs, des fractures multiples et des distorsions des os longs (Satarug et al. 2010). La maladie de Itai-itai touche particulièrement les femmes.

a. Impact sur la fonction rénale

Une exposition chronique à de faibles doses de Cd par voie orale est associée à une altération de la fonction rénale. Celle-ci se caractérise, en particulier, par une perte de la capacité de réabsorption des nutriments par les tubules rénaux. On observe alors le relargage, dans l'urine, de zinc, de cuivre, de Cd, de glucose, de β2-microglobuline, de rétinol-binding protein (RBP), d'acides aminés et d'autres protéines de faibles poids moléculaires (Satarug et al. 2010). En plus, de l'altération de la fonction tubulaire, des dommages glomérulaires peuvent apparaître et entraîner ensuite des néphrites et néphrose similaires au syndrome de Fanconi (Maret and Moulis 2013). Les dommages rénaux peuvent s'exacerber jusqu'à déboucher sur une insuffisance rénale terminale menant à la mort si l'exposition est forte et prolongée. Ainsi, des risques élevés d'insuffisance rénale ont été observés chez des personnes exposées environnementalement mais vivant dans des zones polluées proches d'usines de fabrication de piles (Järup and Akesson 2009). A partir de plusieurs études épidémiologiques, il est estimé

que, selon le biomarqueur utilisé pour détecter la néphrotoxicité, le seuil de Cd associé aux dommages rénaux se trouve à approximativement $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créatinine pour les premiers symptômes d'altération biochimique et à $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créatinine pour le développement de microprotéinurie (Nawrot et al. 2010).

b. Impact sur les os

Un risque augmenté d'ostéoporose est associé à l'augmentation du Cd urinaire ou sanguin. L'ostéoporose se caractérise par un faible poids des os et une détérioration du tissu osseux qui induit une plus grande fragilité des os et des risques élevés de fractures. Dans plusieurs études, un risque élevé de fractures des os a été observé chez des sujets ayant une concentration de Cd urinaire supérieure à $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créatinine (Järup and Akesson 2009; Nawrot et al. 2010). De plus, une augmentation de deux fois de l'excrétion de Cd est associée à une augmentation de 73% du risque de fractures chez les femmes (Järup and Akesson 2009). Des données expérimentales sur l'animal confirment ces résultats épidémiologiques indiquant que l'os est une cible sensible de la toxicité du Cd (Järup and Akesson 2009). L'interprétation généralement admise est que le Cd impacte les tubules rénaux et diminue la réabsorption du calcium, ce qui entraîne un relargage important de calcium dans l'urine et une diminution de la densité minérale osseuse (Nawrot et al. 2010).

c. Hypertension et maladies cardiovasculaire

L'impact d'une exposition chronique à faibles doses de Cd sur l'hypertension a été étudié chez l'homme et chez l'animal. Mais la relation n'a pas clairement été établie jusqu'à présent. La plupart des études épidémiologiques réalisées, en prenant en compte le tabagisme des sujets, ne montrent pas d'association entre les concentrations de Cd dans le sang ou l'urine et l'hypertension. Cependant des corrélations positives ou négatives ont été décrites dans d'autres travaux (Järup and Akesson 2009). Des résultats contrastés ont aussi été observés dans les études expérimentales. D'une manière générale, les effets observés relèvent de faibles variations de pression sanguines.

d. Diabète de type II

Une association entre Cd sanguin ou urinaire et diabète a été montrée, dans certaines études épidémiologiques et expérimentales. Ce sujet sera développé, en détails, dans la troisième partie de cette introduction.

e. Cancer

Depuis 1993, le Cd et ses composés sont classés comme carcinogène de groupe 1 par l'IARC (International Agency for Research on Cancer). Cette évaluation a été basée sur des études de personnes exposées professionnellement par inhalation et qui ont développé des cancers du poumon. L'estimation générale qui en ressort est que ces personnes présentent une élévation des risques de cancer de 20% comparé aux personnes non exposées (Nawrot et al. 2010). A la suite de ces travaux, d'autres études ont analysé les possibles propriétés carcinogènes du Cd sur des populations exposées environnementalement par voie orale. Un lien a été envisagé entre exposition chronique au Cd et cancer du poumon, de la prostate, du sein, de l'endomètre et de la vessie (Satarug et al. 2010). Depuis quelques années, le Cd a été considéré comme un potentiel métallo-œstrogène, ce qui alimente les questionnements sur son rôle dans le développement de cancers hormono-dépendants (Järup and Akesson 2009). Cependant, à ce jour, l'ensemble des données épidémiologiques présente des contradictions et ne mène pas à une conclusion claire. De plus, les niveaux d'exposition pour lesquels les risques de cancer seraient plus élevés ne sont pas du tout élucidés.

Des études *in vitro* ont pourtant mis en évidence des propriétés carcinogènes du Cd notamment par sa capacité à induire du stress oxydant, à modifier l'activité des facteurs de transcription et à inhiber la réparation de l'ADN (Nawrot et al. 2010).

f. Autres pathologies

L'exposition chronique au Cd est incriminée dans d'autres pathologies, mais les données sont trop peu nombreuses et concluantes pour établir une vraie corrélation. Ainsi, on pense que le Cd pourrait induire des états anémiques notamment à cause de la compétition avec le fer pour l'absorption. Par ailleurs, une quantité supérieure de Cd a été retrouvée dans le sang

et le liquide séminal d'hommes infertiles suggérant un possible impact du Cd sur la reproduction. Cependant, des études épidémiologiques sur des personnes exposées professionnellement ne confirment pas ces résultats (Nawrot et al. 2010).

3. Les facteurs de susceptibilité liés à une exposition au Cd

Parmi les facteurs de susceptibilité liés à une exposition au Cd se trouve le tabagisme, le sexe, la gestation et l'âge.

a. Le tabagisme

Le tabagisme est la source non alimentaire la plus importante d'exposition au Cd. La concentration élevée de Cd dans les feuilles de tabac et l'absorption par inhalation relativement élevée engendre des concentrations de Cd dans le sang et l'urine des fumeurs significativement augmentées par comparaison avec des non-fumeurs (ATSDR 2012). De plus, d'anciens fumeurs ont généralement des taux de Cd sanguin et urinaire plus élevés après l'arrêt du tabagisme comparés aux personnes n'ayant jamais fumé. Cette exposition accrue au Cd augmente les risques d'effets néfastes dus à la toxicité du Cd.

b. Le sexe

Au-delà des aspects toxicocinétiques décrits précédemment, des différences, selon le sexe, dans la toxicité du Cd ont été décrites avec des travaux montrant une susceptibilité plus grande chez les femelles vis-à-vis de la toxicité du Cd. La mortalité due à l'exposition aiguë au Cd par injection sous-cutanée de 5 mg.kg^{-1} est exacerbée chez les femelles rates comparés aux mâles ou aux femelles ovariectomisées. De plus, les femelles ovariectomisées traitées avec de la progestérone ou de l'estradiol retrouvent une sensibilité à la toxicité du Cd similaire aux femelles non ovariectomisées (Shimada et al. 2012). Plusieurs travaux ont montré que les femelles étaient plus sensibles aux effets toxiques du Cd au niveau des reins, des os (Vahter et al. 2007), du foie (Shimada et al. 2012) et du système immunitaire (Pillet et al. 2006).

Ces différences entre les sexes pourraient provenir d'interactions du Cd avec les hormones sexuelles féminines. En effet, le Cd est considéré comme un perturbateur endocrinien (Choe et al. 2003; Höfer et al. 2010; Johnson et al. 2003). Il est capable de former un complexe avec les domaines de liaisons des récepteurs aux œstrogènes et de mimer, dans une certaine mesure, ces hormones. Ainsi, une injection intrapéritonéale unique de $5\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Cd, chez des rates ovariectomisées, entraîne une hyperplasie utérine, une croissance des glandes mammaires et l'induction de gènes liés aux hormones (Johnson et al. 2003). Par ailleurs, une exacerbation de la toxicité du Cd par la progestérone a été décrite, en particulier dans le foie, sur des hépatocytes isolés (Baker et al. 2003).

c. L'âge

La plus grande vulnérabilité des enfants vis-à-vis de l'exposition au Cd vient de plusieurs aspects.

o Aspects toxicocinétiques

Tout d'abord, on estime que les enfants sont soumis à des niveaux de Cd plus élevés en moyenne que les adultes (cf paragraphe I. B.3). De plus, il a été montré chez des rongeurs que l'absorption intestinale pendant les premières heures de vie est particulièrement élevée, atteignant 12% de la quantité ingérée, 2 heures après la naissance et diminuant ensuite à 5% après 24 heures et 0.5% quand les rats atteignent 6 semaines (Sasser and Jarboe 1977). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un système gastro-intestinal encore immature à cet âge (Milsap and Jusko 1994; Morselli et al. 1980; National Research Council 1993). Le Cd peut potentiellement être distribué dans des compartiments peu atteints chez les adultes comme par exemple le cerveau, due à l'immaturité de la barrière hémato-encéphalique (Adinolfi 1985). Chez les rats nouveau-nés, la répartition et l'accumulation du Cd dans les organes, 2 heures après injection intraveineuse de 1 mg.kg^{-1} de Cd, sont différentes de l'adulte, avec des concentrations 3 à 6 fois plus fortes de Cd dans la rate, le cerveau, les testicules et le muscle et un ratio du Cd dans le foie et le rein modifiés (Wong and Klaassen 1980).

○ Exposition dès l'enfance

Du fait de la longue demi-vie du Cd dans l'organisme, les enfants exposés très tôt, même à des doses faibles, accumuleront du Cd sur une longue période et pourront développer des complications à long terme. Cette hypothèse semble particulièrement adaptée en ce qui concerne le cancer ou les maladies chroniques qui se développent sur une longue période. De façon intéressante, quelques publications montrent une plus grande vulnérabilité à la toxicité au Cd des sujets exposés dès l'enfance. En effet, Trzcinka-Ochacka et al, ont observé une plus grande concentration de β 2-microglobuline, attestant de dommages rénaux, chez des adultes exposés au Cd dans leur enfance (due à leur situation géographique proche d'une fonderie de zinc) comparé à des sujets exposés seulement à l'âge adulte (Trzcinka-Ochacka et al. 2004). En accord avec ces observations, une étude sur des rats issus de rates exposées oralement et quotidiennement à 0.5 mg.kg^{-1} Cd pendant la gestation, montrent qu'en grandissant, ces rats développent une insuffisance rénale (Jacquillet et al. 2007). Ce phénomène de sensibilité accrue au Cd des jeunes rats en développement a aussi été observé dans une étude portant sur la résistance mécanique des os (Ogoshi et al. 1989).

Cette idée que des facteurs environnementaux intervenant pendant la période de développement de l'enfant peuvent avoir des répercussions sur leur santé future est reprise par l'hypothèse DOHaD (Developmental Origins of Health and Diseases) développée plus en détails en II.B.3.b. Ainsi, les possibles altérations suite à une exposition au Cd pendant la période de gestation ou de début de vie sont particulièrement importants à prendre en compte.

○ Transfert du Cd de la mère à l'enfant

Une accumulation du Cd dans le placenta a été décrite dans plusieurs travaux mais les quantités mesurées semblent relativement variables. Dans une étude au Bangladesh, la concentration médiane de Cd dans le placenta était de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de placenta humide (Kippler et al. 2010). Dans une population suédoise, la concentration de Cd dans le placenta variait d'environ 1 à $19 \mu\text{g.kg}^{-1}$ avec une concentration médiane de $5.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Osman et al. 2000). La capacité du placenta à faire barrière au Cd et éviter la contamination du fœtus est un sujet débattu. Dans certaines études, le placenta semble retenir efficacement le Cd. Par exemple, dans une étude sur des femmes canadiennes, dans 80% des échantillons, aucune quantité

délectable de Cd n'a été mesurée dans le sang de cordon alors que ces femmes présentent une concentration de Cd sanguine de $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Arbuckle et al. 2016). Par ailleurs, un rapport de 59:1 a été mesuré entre la concentration de Cd dans le placenta et dans le sang de cordon, chez des femmes japonaises (Sakamoto et al. 2013). Un transfert du Cd limité mais néanmoins présent a été décrit chez des femmes suédoises (Osman et al. 2000), polonaises (Olszowski et al. 2016) et d'Afrique du Sud (Rudge et al. 2009). Dans ces études, la concentration de Cd dans le sang de cordon représente en moyenne 10 à 15% de la concentration sanguine de la mère. Cependant, dans d'autres travaux, la barrière placentaire semble inefficace. Chez des femmes françaises non fumeuses, la concentration moyenne de Cd dans le sang de cordon est de $0.53 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une concentration sanguine moyenne à mi-grossesse de $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Menai et al. 2012). Des concentrations de Cd de même ordre de grandeur entre le sang de cordon et le sang maternel ont aussi été mesurées dans d'autres travaux (Röllin et al. 2015; Salpietro et al. 2002).

Dans des études expérimentales, l'accumulation du Cd dans le placenta est également rapportée. Des souris recevant une injection intrapéritonéale de Cd ($4.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) au 9^{ème} jour de gestation, présentent une concentration de Cd dans le placenta, plus de 60 fois supérieure aux contrôles, 24 heures après (Wang et al. 2016). Les placentas de rates exposés à 10 ppm de Cd dans l'eau de boisson pendant les 21 jours de gestation contiennent une concentration de Cd 17.4 fois plus élevée que les rates contrôles (Benitez et al. 2009). Le transfert du Cd de la mère à la descendance est suggéré, dans les études *in vivo*, par l'augmentation des concentrations de Cd dans les organes des ratons ou des souriceaux dont les mères ont été exposées au Cd, dans différents modèles, pendant la gestation seulement (Jacquillet et al. 2007; Wang et al. 2016) ou pendant la gestation et la lactation (Bekheet 2011; Chemek et al. 2016). En effet, il a été montré que le Cd s'accumule aussi dans les glandes mammaires et le lait de rates exposées par voie intraveineuse pendant la lactation, à différentes doses de Cd ($8.8, 62$ et $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) (Petersson Grawé and Oskarsson 2000a). Dans cette étude, la concentration de Cd dans le lait est 2 à 6 fois supérieure que dans le plasma des rates.

E. Réglementation et suivi des expositions

1. Réglementation et valeurs de référence

Depuis une quarantaine d'année, les autorités en charge de la sécurité alimentaire établissent des valeurs toxicologiques de références (VTR) d'exposition dont les principales sont présentées dans le tableau 2. Un récapitulatif des notions utilisées se trouve en annexe 1.

En 1972, une dose provisoire de consommation hebdomadaire tolérable (PTWI) de Cd a été déterminée à $7\mu\text{g}/\text{kg}$, par le Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA). En 1993, des inquiétudes sont émises concernant la faible marge de sécurité entre l'exposition alimentaire au Cd de la population générale et celle qui peut potentiellement induire des effets néfastes. Les limites tolérables d'exposition au Cd sont réévaluées en 1999, par l'ATSDR qui définit un niveau de risque minimum (MRL) à $0.2\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Le rapport suivant de l'ATSDR, publié en 2012, propose plusieurs valeurs de référence selon la voie et la durée d'exposition. En 2009, l'EFSA évalue une Dose Hebdomadaire Admissible (*Tolerable weekly intake* - TWI) à $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$.

Parmi les valeurs de référence se trouvent aussi les doses sans effet nocif observé, NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Ces valeurs sont très variables d'une étude à l'autre, selon l'espèce et le type d'exposition. A titre d'exemple, pour des études sur le rat, pendant des périodes d'exposition intermédiaires, la NOAEL est estimée entre 0.2 et $13\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. La limite basse correspond à une étude sur rats exposés pendant un an, par l'eau de boisson à $0.08\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ induisant une altération de la densité osseuse (Brzoska and Moniuszko-Jakoniuk 2005). La valeur haute provient de l'étude de la fonction rénale (excrétion de β 2-microglobuline) chez des rates exposées pendant 7 à 12 mois par l'eau de boisson à 100 ppm (Viau et al. 1984).

À la vue de ces valeurs, il apparaît que les niveaux d'exposition réels de la population générale sont très proches des doses hebdomadaires admissibles et des niveaux de risques minimum. De plus, pour certaines populations, en particulier les enfants, ces niveaux peuvent être dépassés.

Table 2 : Principales valeurs toxicologique de référence établies par les autorités en charge de l'évaluation des risques (EFSA, 2009 ; ATSDR, 2012)

Nom, organisme et date	Espèce concernée	Voie d'exposition	Durée	Valeur de la VTR	Effets biologiques considérés	Méthodologie
MRL ATSDR 2012	Humain	Inhalation	Aigue (<14j)	0.03 µg.m ⁻³	Voies respiratoires altérée	A partir de la LOAEL calculée sur des rats exposés par inhalation à l'oxyde de Cd pendant 6h/jour, 5j/semaine, pendant 2 semaines
MRL ATSDR 2012	Humain	Inhalation	Chronique >1 an	0.01 µg.m ⁻³	Protéinurie élevée (attestant de l'atteinte rénale)	Evaluation d'une concentration de Cd urinaire associée à l'augmentation de 10% des risques de protéinurie élevée. Utilisation de modèles pharmacocinétiques pour estimer la dose correspondante de Cd inhalé
PTWI FAO/WHO 1972	Humain	Orale	Chronique	7 µg.kg ⁻¹ .sem ⁻¹	Protéinurie élevée (attestant de l'atteinte rénale)	Evaluation de la concentration critique de Cd dans le cortex rénal qui induirait l'augmentation de 10% des risques de protéinurie élevée
TWI EFSA 2009	Humain	Orale	Chronique	2.5 µg.kg ⁻¹ .sem ⁻¹	B2-microglobuline urinaire élevée (attestant de l'atteinte rénale)	Evaluation d'une concentration de Cd urinaire associée à l'augmentation de 5% de la B2-microglobuline. Utilisation de données épidémiologiques pour faire le lien avec la dose de Cd ingéré
MRL ATSDR 1999	Humain	Orale	Chronique	0.2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	B2-microglobuline urinaire élevée (attestant de l'atteinte rénale)	Evaluation de l'exposition sur une vie entière associée à une altération de la fonction rénale
MRL ATSDR 2012	Humain	Orale	Chronique > 1 an	0.1 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Protéinurie élevée (attestant de l'atteinte rénale)	Evaluation d'une concentration de Cd urinaire associée à l'augmentation de 10% des risques de protéinurie élevée. Utilisation de modèles pharmacocinétiques pour estimer la dose correspondante de Cd ingérée
MRL ATSDR 2012	Humain	Orale	Intermédiaire (15 à 364 j)	0.5 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Altération des os (densité osseuse, propriétés mécaniques)	A partir d'une étude sur des jeunes rates exposés oralement pendant 12 mois à 0.2-0.4 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (Brzóska et Moniuso-Jakoniū) Utilisation de modèles pharmacocinétiques pour estimer la dose correspondante de Cd ingérée
BMDLsd1 ATSDR 2012	Rat	Orale	Intermédiaire (15 à 364 j)	50 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Altération des os (densité osseuse, propriétés mécaniques)	A partir d'une étude sur des jeunes rates exposés oralement pendant 12 mois à 0.2-0.4 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (Brzóska et Moniuso-Jakoniū)

Ces valeurs de référence, bien qu'informatives et utiles pour la prévention des risques, présentent des limites. En effet, les démarches méthodologiques pour les obtenir sont assez diverses et il en résulte une variabilité qui rend confuse la comparaison. Les facteurs de sécurité appliqués pour justifier la variabilité interindividuelle et l'extrapolation aux Hommes sont relativement subjectifs et imprécis. Certains facteurs peuvent entraîner des incertitudes et influencer les paramètres utilisés pour les calculs, comme par exemple, l'âge, le régime alimentaire, la supplémentation orale, l'imprégnation hormonale, ... De plus, les marqueurs observés sont, le plus souvent, ceux reliés aux effets du Cd estimés les plus sensibles et les plus connus mais il n'est pas exclu que d'autres effets moins décrits puissent apparaître à doses plus faibles. Enfin, ces valeurs ne prennent pas en compte les effets des mélanges qui peuvent potentiellement être synergiques. Tous ces aspects justifient le besoin continu de nouvelles données, obtenues dans des conditions expérimentales pertinentes qui permettront d'ajuster ces valeurs de référence.

2. Biomarqueurs de suivi d'exposition et d'effets

En complément des valeurs de référence présentées ci-dessus, le suivi de biomarqueurs est primordial pour surveiller les expositions au Cd.

a. Biomarqueurs d'exposition

Un biomarqueur d'exposition est une substance, un métabolite d'une substance ou le produit de l'interaction de cette substance avec des molécules cibles que l'on peut mesurer dans l'organisme et qui atteste de l'exposition de l'individu à cette substance. Un bon biomarqueur doit être spécifique de l'exposition. Or, certains facteurs confondants sont à prendre en compte comme la contamination possible des échantillons par d'autres sources que l'exposition étudiée ou la présence naturelle du biomarqueur dans l'organisme qui fausserait les mesures, la cinétique d'absorption et d'élimination du composé qui définit la fenêtre de temps pour mesurer le marqueur. Dans le cas du Cd, le choix du biomarqueur d'exposition est simplifié par le fait qu'il n'est pas métabolisé et donc que le Cd lui-même peut être utilisé

comme marqueur. De plus, le Cd n'est pas naturellement présent dans l'organisme et sa longue demi-vie permet de s'affranchir partiellement des questions de cinétique.

Les marqueurs d'exposition classiquement utilisés pour suivre l'exposition au Cd sont les concentrations de Cd sanguin et urinaire. Du fait de la distribution du Cd et de son accumulation dans certains organes, la concentration de Cd dans le sang reflète plutôt l'exposition récente. Le Cd sanguin est un marqueur d'exposition à privilégier pour le suivi des expositions des personnes âgées ou souffrant d'hypertension, des diabétiques et des fumeurs, puisque la prévalence élevée de dysfonctionnements rénaux chez ces populations peut biaiser la dosage de Cd dans l'urine (Satarug et al. 2017a). L'intervalle de référence du Cd sanguin pour l'Homme est de 0.09 à 1.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Batárióvá et al. 2006; Bjermo et al. 2013).

Le Cd urinaire est quant à lui, à la fois un marqueur d'exposition et un marqueur d'effet nocif sur le rein. Le Cd circulant dans le sang est retenu dans les cellules épithéliales des tubules proximaux dans le rein où il s'accumule. Dans cette première phase d'exposition chronique, la concentration de Cd dans l'urine est relativement proportionnelle à la quantité de Cd présente dans le rein et donc reflète assez fidèlement l'exposition. Cependant, à des doses plus élevées de Cd ou après une plus longue exposition, les cellules commencent à subir des dommages et de la mort cellulaire, entraînant l'excrétion du Cd dans l'urine en quantité significativement plus élevée (cf I.C.3). Dans ce cas-là, l'augmentation remarquable de la concentration de Cd urinaire est un marqueur de toxicité du Cd (Prozialeck and Edwards 2010; Suzuki 1980) qui doit être confirmé par le dosage d'autres marqueurs de la fonction rénale (mentionnés plus bas). Une limite du Cd urinaire comme marqueur d'exposition est son imprécision pour des expositions très faibles. En effet, dans ce cas, le Cd filtré par le glomérule est presque totalement réabsorbé par les cellules épithéliales des tubules proximaux et donc une quantité négligeable de Cd est excrété dans l'urine (Järup and Akesson 2009; Prozialeck and Edwards 2010). De plus, du fait de la longue demi-vie du Cd dans le rein, le Cd urinaire dépend de l'âge de l'individu. D'un point de vue méthodologique, la détermination du Cd urinaire se fait idéalement sur des échantillons d'urine prélevés pendant 24h. Dans le cas inverse, une normalisation par la quantité de créatinine est en général effectuée. Cependant, il est important de garder en tête que la concentration de créatinine dans l'urine peut varier notamment en fonction de la masse musculaire. L'intervalle de référence pour les non-fumeurs est de 0.28 à 0.75 $\mu\text{g}/\text{g}$ de créatinine

(Chaumont et al. 2013) et la concentration limite tolérable maximum dans l'urine a été fixée à 0.5 µg/g de créatinine pour les expositions professionnelles (Järup and Akesson 2009; Roels et al. 1999).

La détermination de Cd dans les fèces est parfois utilisée. Bien que n'étant pas un bon indicateur d'une exposition passée et cumulée, le dosage de Cd dans les fèces permet d'estimer la quantité de Cd récemment ingérée puisque la grande majorité du Cd n'est pas absorbée.

D'autres marqueurs peu invasifs sont parfois envisagés, comme le dosage du Cd dans les cheveux ou les ongles (Fréry et al. 1993; Hussein Were et al. 2008; Kim and Kim 2011). Cependant, ces marqueurs sont assez peu sensibles pour les faibles expositions et le risque de contamination venant de l'environnement extérieur (particulièrement pour les expositions professionnelles) est important. L'utilisation des 8 cm de cheveux les plus proches du crâne et des techniques de lavages spécifiques permettent de diminuer la variabilité due à la contamination extérieure (Fréry et al. 1993).

Le foie et le rein étant les organes qui accumulent le plus de Cd, leur concentration en ce métal est un marqueur très pertinent pour le suivi des expositions. Chez l'homme, quelques techniques sont envisageables sans avoir recours à des biopsies : l'analyse par activation neutronique *in vivo* ou par fluorescence des rayons X (Scott and Chettle 1986; Skerfving et al. 1987). Cependant ces techniques sont très coûteuses et ne sont pas très adaptées à l'étude de faibles expositions environnementales. Lorsque les premières atteintes du rein apparaissent, la concentration de Cd dans le rein diminue alors que celle du foie continue d'augmenter avec l'exposition. La quantité de Cd dans le foie peut donc être à privilégier à partir d'un certain âge ou d'un certain niveau d'exposition. Pour les études expérimentales sur animaux, ces concentrations de Cd dans les différents tissus sont plus faciles à obtenir à la fin de l'expérience par prélèvement des organes. Elles permettent une mesure précise de la quantité de Cd qui a été absorbée sur la période d'exposition et qui s'est accumulée.

b. Biomarqueurs d'effets

Les biomarqueurs les plus utilisés pour attester des effets d'une exposition au Cd sont les marqueurs de la fonction rénale. En effet, nous avons vu précédemment que l'exposition chronique au Cd était connue pour entraîner une néphrotoxicité et à partir d'une concentration

urinaire d'environ 2 µg/g de créatinine, il est recommandé d'évaluer d'autres paramètres rénaux pour suivre l'effet du Cd. Plusieurs marqueurs (regroupés avec leurs avantages et inconvénients, dans le tableau 3) sont utilisés sans qu'un d'eux ne se dégage actuellement comme le standard.

Table 3 : Comparaison des marqueurs de néphrotoxicité (Jacquet et al, 2016)

Marker	Advantage	Drawback
2-microglobulin (B2M)	Early marker of tubular dysfunction Routine analysis	Instability Increase with age and physical activity Cannot be used when tubular reabsorptive pathways are saturated
N-acetyl-glucosaminidase (NAG)	Early marker of tubular dysfunction Quite stable Very sensitive Easy to measure	Endogenous urea inhibits activity Lack of specificity (increase in rheumatic arthritis, impaired glucose tolerance, hyperthyroidism)
Microalbumin	Marker of glomerulus function	Lack of specificity Increase with physical activity, hematuria, urinary tract infection and dehydration
Retinol-binding protein (RBP)	Early marker of tubular dysfunction Stable	Cannot be used when tubular reabsorptive pathways are saturated
Cd-binding metallothionein	Specific Sensitive	Not routinely determined Late marker of nephrotoxicity
1-microglobulin	Early marker of tubular dysfunction. High levels predict severity of tubulopathy. Stable	Cannot be used when tubular reabsorptive pathways are saturated Lack of specificity (increase in liver diseases, HIV, mood disorders)
Kidney injury molecule-1 (KIM-1)	Highly sensitive Highly specific Very early marker of renal proximal tubule dysfunction Not expressed in normal kidney Very stable	Not routinely determined

II - METABOLISME ENERGETIQUE

A. Le métabolisme glucidique et lipidique

L'énergie nécessaire à l'organisme est apportée principalement par la nourriture sous forme de glucides et lipides qui sont métabolisés pour produire de l'ATP et construire des stocks de glycogène et triglycérides (TG), respectivement, qui permettent de survivre aux périodes de jeûne. Le glucose est oxydé par la glycolyse tandis que les lipides subissent la β -oxydation. Dans le cas de jeûne prolongé, les protéines peuvent également apporter des substrats énergétiques mais nous ne développerons pas cette voie dans ce manuscrit. Les mécanismes impliqués dans la dégradation du glucose et des lipides sont bien connus (figure 1).

Le métabolisme du glucose et des lipides, et leur régulation sont extrêmement liés et difficilement dissociables. Ainsi, ils seront traités ensemble dans la partie suivante.

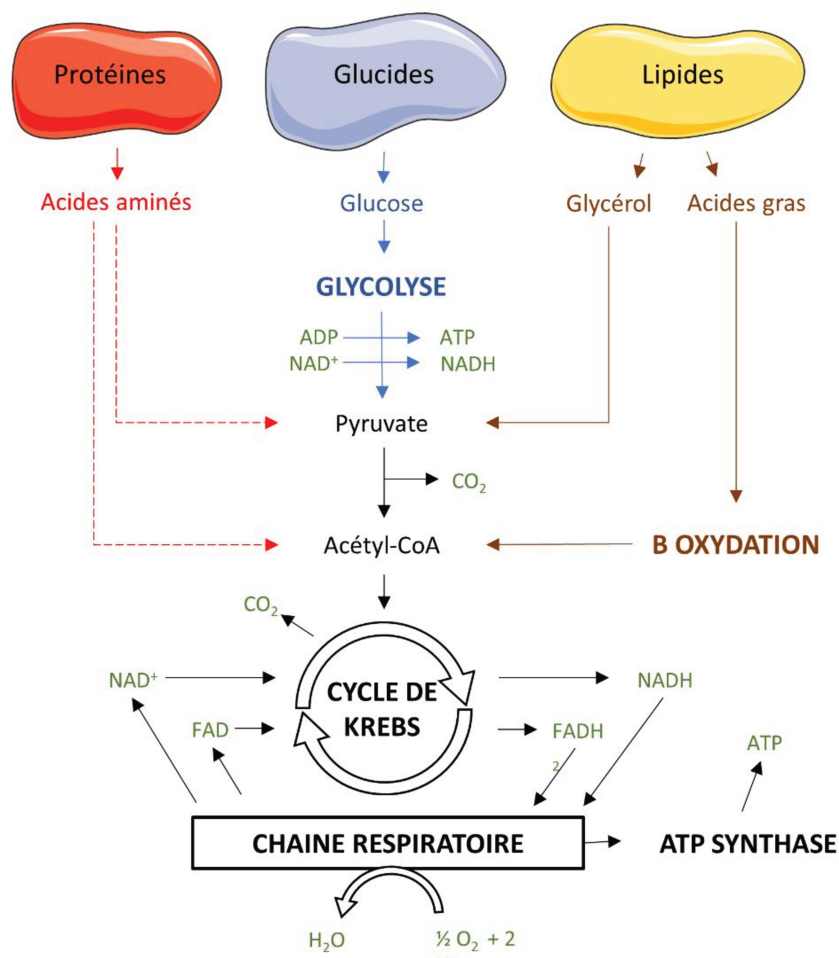


Figure 1 : Etapes de la dégradation des nutriments (adapté de Jaspard, 2008)

1. Physiologie de la régulation du glucose et des lipides

Plusieurs organes participent, en interconnexion, à la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. Schématiquement, le pancréas produit de l'insuline qui est captée par les organes périphériques, principalement le foie, le muscle et le tissu adipeux. Dans ces organes, cette signalisation insulinique entraîne la régulation du métabolisme du glucose et des lipides ainsi que du stockage sous forme de glycogène et de triglycérides.

a. Pancréas

Le pancréas est un organe composé de cellules exocrines, et de cellules endocrines regroupées en îlots appelés îlots de Langerhans. Ils sont composés à 65-90 % de cellules β sécrétant de l'insuline, 15 à 20 % de cellules α produisant du glucagon, 3 à 10 % de cellules δ sécrétant de la somatostatine et environ 1 % de cellules PP (polypeptide pancréatique) (Skelin 2010) (figure 2). L'insuline et le glucagon sont deux hormones incontournables dans la régulation du glucose. En effet, l'insuline est la seule hormone hypoglycémisante et le glucagon a un rôle hyperglycémiant.

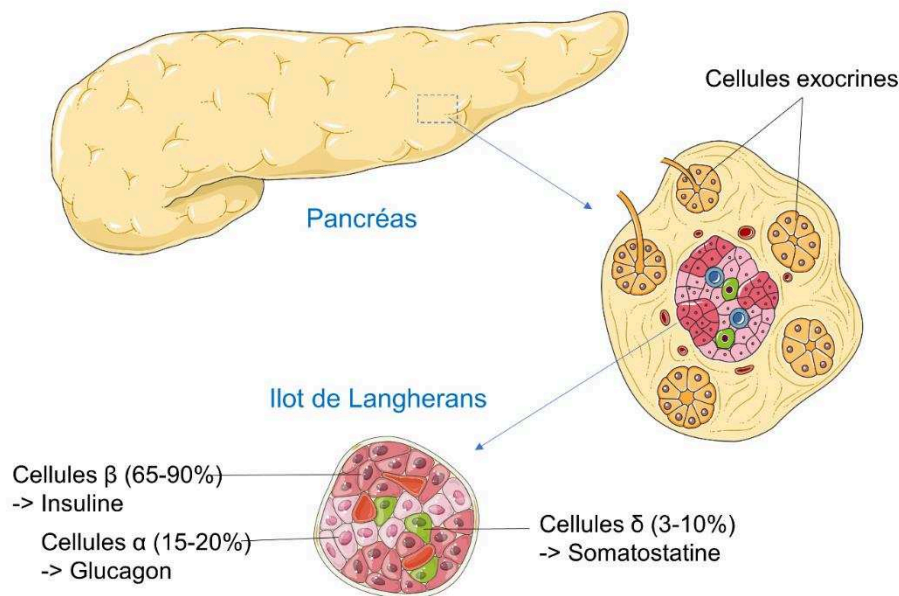


Figure 2: Structure du pancréas et des îlots de Langerhans

Après un repas, la concentration de glucose dans le sang augmente et stimule la production et la sécrétion d'insuline par les cellules β . L'augmentation du niveau d'insuline circulante engendre l'entrée et le métabolisme du glucose dans les cellules des organes périphériques ce qui a pour effet de réguler la glycémie. L'augmentation du glucose entraîne également une activation de la transcription du gène de l'insuline dans le pancréas et la traduction de son ARNm, entraînant la production d'un précurseur appelé pré-proinsuline. Le glucose joue donc un rôle primordial dans la biosynthèse de l'insuline (Fu et al. 2013). La pré-proinsuline se compose d'une chaîne A, du peptide C, d'une chaîne B et d'un peptide de signal positionné en N-terminal qui permet l'entrée dans le réticulum endoplasmique. La pré-proinsuline y est transformée en proinsuline à la suite du clivage du peptide de signal et de la formation de liaisons disulfures entre les chaînes A et B (figure 3). La proinsuline va ensuite dans l'appareil de Golgi où elle est stockée dans des vésicules. A l'intérieur de ces vésicules, la proinsuline est de nouveau clivée libérant l'insuline et le peptide C. L'insuline est alors conservée sous forme d'hexamères complexés avec du zinc, jusqu'à sa sécrétion par exocytose (Skelin 2010). Ce stock d'insuline dans les cellules pancréatiques varie avec la présence ou non de nutriments dans le sang. Il est élevé à l'état post-prandial et diminue dans les périodes de déprivation (Skelin 2010).

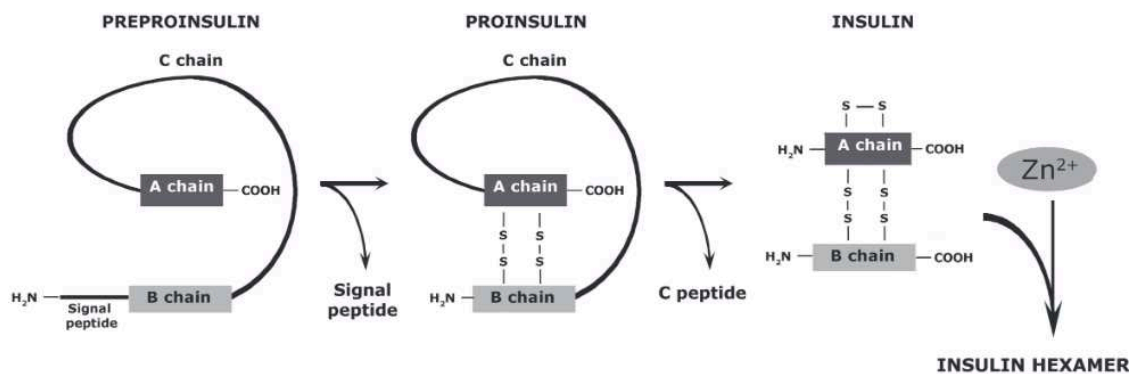


Figure 3: Biosynthèse de l'insuline (Skelin 2010)

Le glucose est le principal agent stimulant la sécrétion d'insuline de façon dose-dépendante, dans des conditions physiologiques. Il a été montré, *in vitro*, que d'autres molécules peuvent permettre l'exocytose des granules d'insuline mais dans une moindre mesure, comme la leucine, le mannose, le glycéraldéhyde, les sulfonilurées et les glinides (Magnan and Ktorza

2005). Par ailleurs, certaines molécules sont capables d'amplifier l'effet d'un sécrétagogue principal comme certaines substrats énergétiques ou hormones (glucagon, GIP (*gastric inhibitory polypeptide*), acétylcholine, ...) (Magnan and Ktorza 2005). Enfin, certains neuromédiateurs et hormones peuvent atténuer la sécrétion d'insuline (somatostatine, pancréastatine, cortisol, noradrénaline,...) (Magnan and Ktorza 2005).

La sécrétion d'insuline est biphasique. En effet, un premier pic de sécrétion appelé « pic précoce » est observé très peu de temps après stimulation par le glucose. Cela correspond à la libération de l'insuline des vésicules déjà accolées à la membrane et prêtes à être sécrétées, qui représentent environ 1 % des vésicules des cellules β . Dans un second temps, les vésicules localisées dans le cytoplasme se rapprochent de la membrane et l'insuline contenue est sécrétée de façon plus lente et progressive jusqu'à ce que la stimulation s'arrête. Cette deuxième phase met aussi en jeu la sécrétion d'insuline nouvellement synthétisée (Fu et al. 2013; Magnan and Ktorza 2005).

A jeun, la sécrétion d'insuline est inhibée pendant que les cellules α du pancréas produisent et sécrètent du glucagon. Cette hormone favorise la néoglucogénèse hépatique, la glycogénolyse et l'utilisation des acides gras stockés dans le tissu adipeux afin de fabriquer de l'ATP, source d'énergie nécessaire à l'organisme et de maintenir la glycémie, pendant les périodes de jeûne (Guo 2014).

b. Foie

Le foie est un organe central dans la régulation de la glycémie et du métabolisme des glucides et des lipides.

Après un repas, le foie capte une partie du glucose sanguin, qui entre dans les hépatocytes par le transporteur GLUT2. Celui-ci ne requiert pas de stimulation par l'insuline contrairement au transporteur GLUT4 présent dans les muscles et le tissu adipeux (Chiang 2014; Titchenell et al. 2017). Environ 20-30% du glucose qui entre dans le foie est métabolisé par la glycolyse et la phosphorylation oxydative pour fournir de l'énergie rapidement à l'organisme. Une partie du reste de glucose est utilisé pour former des réserves sous forme de glycogène. Lorsque la capacité de stockage de glycogène est atteinte dans les hépatocytes, des acides gras sont fabriqués à partir d'acétyl-CoA et stockés sous forme de triglycérides (Chiang 2014). Le foie

produit aussi des VLDL (very low density lipoproteins) à partir des triglycérides. Les VLDL sont sécrétées dans la circulation comme moyen de transport des TG jusque dans le tissu adipeux où elles sont stockées et dans le muscle où elles sont utilisées comme source d'énergie (Chiang 2014). L'acétyl-CoA en excès est utilisé pour la synthèse du cholestérol ou de corps cétoniques qui serviront à fournir de l'énergie aux muscles et au cerveau dans les périodes de jeûne prolongé. Tous ces processus se déroulent sous le contrôle de l'insuline qui stimule donc la glycolyse, la glycogénèse, la lipogénèse *de novo* et le stockage des lipides, tout en inhibant la production de glucose hépatique (néoglucogénèse) et la glycogénolyse. Par ailleurs, le foie reçoit aussi les acides gras provenant de l'alimentation, majoritairement sous forme de triglycérides.

A jeun, la diminution du rapport entre insuline et glucagon circulant induit une stimulation de la glycogénolyse qui dégrade les stocks de glycogène pour produire du glucose permettant de subvenir aux besoins énergétiques de l'organisme. Pendant les périodes de jeûne, le foie reçoit les acides gras provenant de la lipolyse du tissu adipeux *via* le transporteur d'acide gras CD36 et les métabolise par la β -oxydation. Ce phénomène s'accompagne de la synthèse de glucose hépatique à partir de lactate, de glycérol et d'acides aminés, appelée néoglucogénèse. La néoglucogénèse est régulée par divers mécanismes dépendants ou non de la signalisation insulinique hépatique, notamment la disponibilité en substrats, la concentration en glucagon et la contribution de la lipolyse du tissu adipeux (Petersen et al. 2017).

c. Le muscle squelettique

Le muscle squelettique est considéré comme le tissu le plus sensible à l'insuline. Il est responsable de l'absorption d'environ 75 à 80 % du glucose suite à une stimulation par l'insuline (DeFronzo and Tripathy 2009).

Après un repas, l'insuline stimule la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane des cellules du muscle, par une cascade de signalisation décrite en II.A.2. Ce transporteur permet l'entrée du glucose dans la cellule et son métabolisme par une série d'étapes sous le contrôle de l'insuline (décrit en II.A.2). Approximativement 75% du glucose entrant dans les muscles est stocké sous forme de glycogène. En effet, le muscle squelettique est le site

prédominant de la synthèse de glycogène (DeFronzo and Tripathy 2009). Une autre partie du glucose subit le processus de glycolyse pour fournir de l'énergie disponible immédiatement.

Pendant les périodes de jeûne, les stocks de glycogène sont mobilisés pour fournir l'énergie nécessaire aux muscles. Des acides gras provenant soit de la lipolyse du tissu adipeux soit de l'hydrolyse des lipoprotéines présentes dans le sang peuvent être utilisés directement comme source d'énergie *via* la β oxydation.

d. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est constitué d'adipocytes, de préadipocytes, de cellules immunitaires et de cellules endothéliales. Il possède une fonction de stockage des graisses et une fonction endocrine. En effet, le tissu adipeux sécrète des adipokines et des hormones dont les plus importantes sont TNF α , IL6, la leptine, la résistine et l'adiponectine. Ces adipokines peuvent impacter la consommation de nourriture, la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie des nutriments (Guo 2014).

Après un repas, l'élévation de l'insuline augmente l'entrée du glucose dans les cellules, par le même système de transport que dans le muscle. Elle stimule aussi le stockage des acides gras, sous forme de triglycérides, provenant majoritairement de l'hydrolyse des lipoprotéines sanguines, de l'absorption d'acides gras libres sanguins et dans une moindre mesure de la lipogenèse *de novo* (Grundy 2015). L'insuline favorise aussi la différenciation des adipocytes et inhibe la lipolyse ce qui réduit la concentration d'acides gras libres circulants (Guo 2014).

A jeun, la lipolyse des stocks de triglycérides est stimulée via l'activation de lipase hormono-sensible, ce qui entraîne le relargage d'acide gras libre et de glycérol dans la circulation sanguine. Cela alimente la β -oxydation, principalement dans le foie, qui fournit l'énergie nécessaire aux périodes de jeûne.

e. Le rein

Le rein est impliqué dans la régulation du glucose par plusieurs aspects que l'on peut résumer schématiquement à trois mécanismes : l'utilisation de glucose pour ses besoins en énergie (environ 10% du glucose circulant après un repas), la production de glucose par la néoglucogénèse et la réabsorption du glucose par filtration glomérulaire (Gerich 2010).

Après un repas, le glucose utilisé par le rein peut être stocké sous forme de glycogène, en quantité nettement inférieure à celles retrouvées dans le foie ou les muscle. De plus, à l'inverse du foie, les cellules stockant le glycogène dans la médulla sont dépourvues d'enzyme glucose-6-phosphate ce qui empêche la formation de glucose en période de jeûne par glycogénolyse (Gerich 2010; Triplitt 2012). Les cellules du cortex, elles, ne stockent pas de glycogène mais possèdent la glucose-6-phosphate permettant la néoglucogénèse (Triplitt 2012). La néoglucogénèse par le rein contribue à 20-25% de la production de glucose en situation de jeûne, les 75-80% restant provenant du foie (Gerich 2010; Wilding 2014). La néoglucogénèse rénale est régulée par négativement par l'insuline et positivement par les catécholamines comme l'adrénaline (Wilding 2014). De façon intéressante, la néoglucogénèse est augmentée dans le rein 4 à 6 heures après un repas. Il est proposé que le glucose ainsi produit serait dirigé vers le foie pour accroître les stocks de glycogène (Gerich 2010; Wilding 2014), mais les mécanismes associés restent, à ce jour, inconnus.

Enfin, le rôle principal du rein dans le maintien de l'homéostasie du glucose provient de la réabsorption du glucose par filtration. En effet, le rein filtre approximativement 180 litres de plasma par jour. Le glucose présent dans ce filtrat est réabsorbé à hauteur d'environ 180 g de glucose par jour (Gerich 2010). Les mécanismes de réabsorption impliquent un transport actif du glucose couplé au sodium via les transporteurs de sodium et glucose SGLT1 et SGLT2 au niveau des tubules proximaux. Le glucose est ensuite relargué dans la circulation par les transporteurs de glucose (GLUT) (DeFronzo et al. 2012; Gerich 2010). Dans des conditions normales chez des sujets sains, quasiment la totalité du glucose plasmatique est réabsorbé (Wilding 2014). Le taux de réabsorption du glucose augmente linéairement avec la concentration plasmatique de glucose jusqu'à ce que la capacité maximale de réabsorption soit atteinte (approximativement 11 mmol/L chez les adultes sains) (Gerich 2010). Cela correspond à un taux maximal de transport d'environ de 375 mg/min (DeFronzo et al. 2012). Au-dessus de ce seuil, une partie du glucose plasmatique n'est pas réabsorbé et une glucosurie apparaît.

f. L'intestin

L'intestin est un organe important dans le métabolisme glucidique de par son rôle dans l'absorption du glucose dans l'organisme et dans la régulation de la prise alimentaire. Une propriété supplémentaire de l'intestin a été découverte plus récemment. En effet, il a été montré chez l'homme et le rat que l'intestin grêle peut fabriquer du glucose majoritairement à partir de la glutamine (Croset et al. 2001; Mithieux and Gautier-Stein 2014). L'intestin possède l'enzyme glucose-6-phosphate permettant la néoglucogénèse pendant les périodes de jeûne (Mithieux and Gautier-Stein 2014; Penhoat et al. 2014). Cette production de glucose est rapidement inhibée dès lors que la concentration en insuline plasmatique augmente (Mithieux and Gautier-Stein 2014).

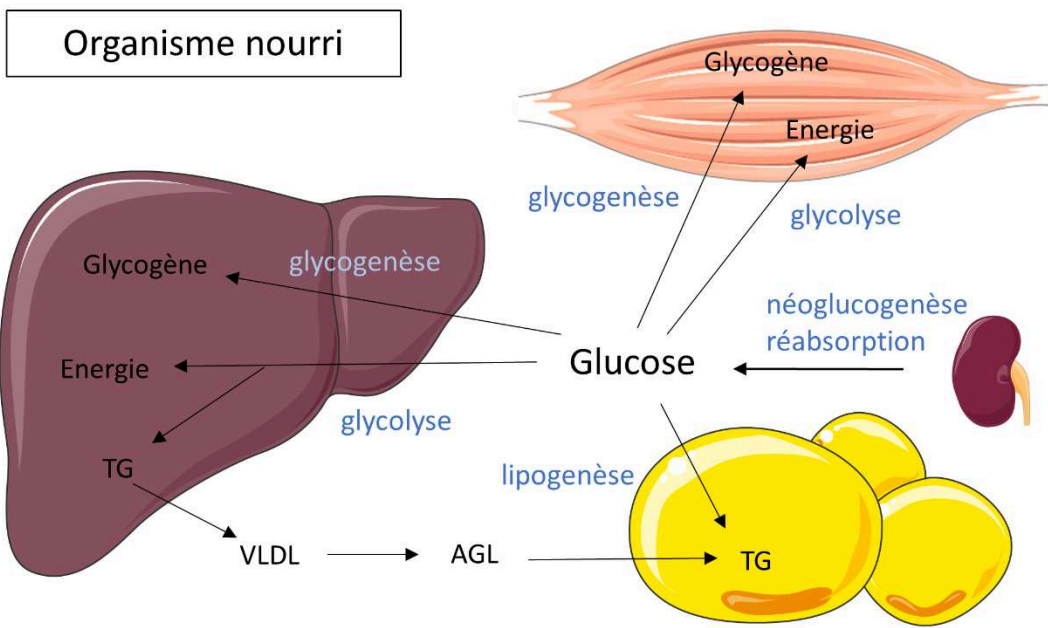
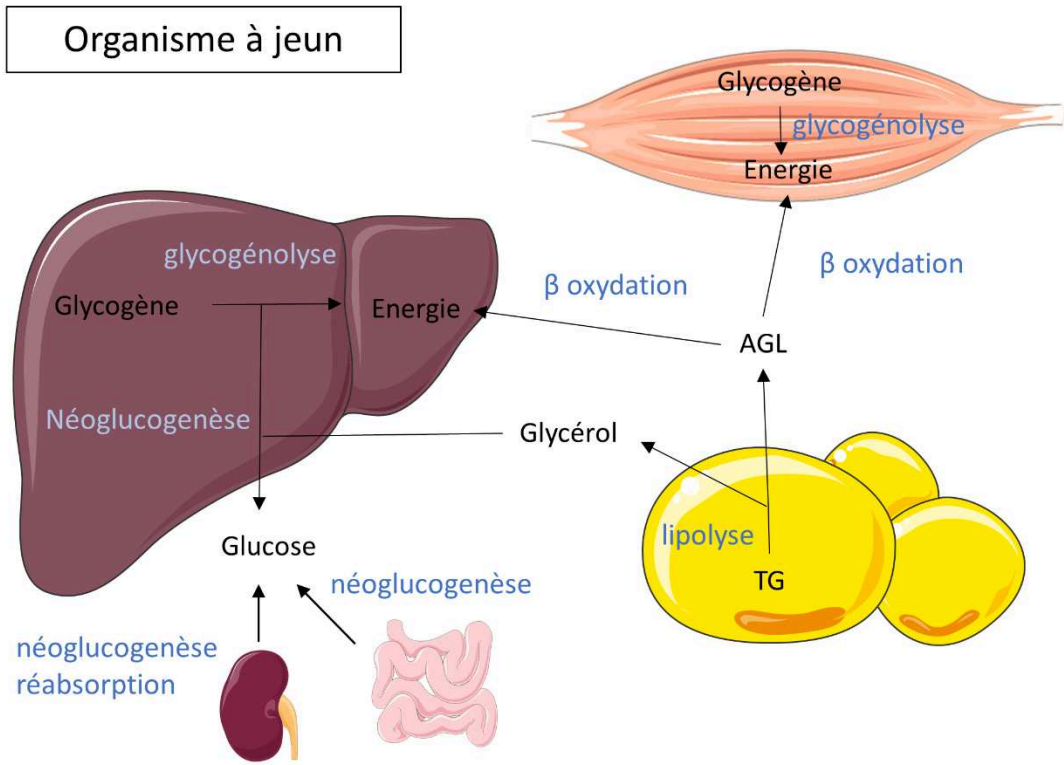


Figure 5: Représentation schématique du métabolisme glucidique et lipidique dans le foie, le muscle et le tissu adipeux, à jeun et à l'état nourri. AGL : acides gras libres, TG : triglycérides, VLDL : very low density lipoprotein

2. Mécanismes et voies de signalisation de la régulation du glucose

a. Mécanisme de la sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline est stimulée par l'augmentation de la concentration sanguine de glucose qui entre dans les cellules β du pancréas grâce aux transporteurs GLUT2 chez les rongeurs et GLUT1 chez l'homme (Fu et al. 2013). Contrairement à GLUT4 présent dans les muscles et le tissu adipeux, GLUT2 et GLUT1 ne nécessitent pas d'activation par l'insuline pour être externalisés à la membrane. Ils permettent donc, un flux direct et élevé de glucose dans la cellule (Fu et al. 2013). Le glucose est alors métabolisé dans la cellule β , principalement par les processus de glycolyse et de phosphorylation oxydative qui produisent de l'ATP. L'augmentation du rapport ATP/ADP intracellulaire qui en découle entraîne la fermeture des canaux potassique ATP-dépendants. Ce processus est responsable d'une dépolarisation de la membrane cellulaire et induit l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. Le flux calcique résultant, déclenche alors l'exocytose des vésicules contenant l'insuline (figure 5).

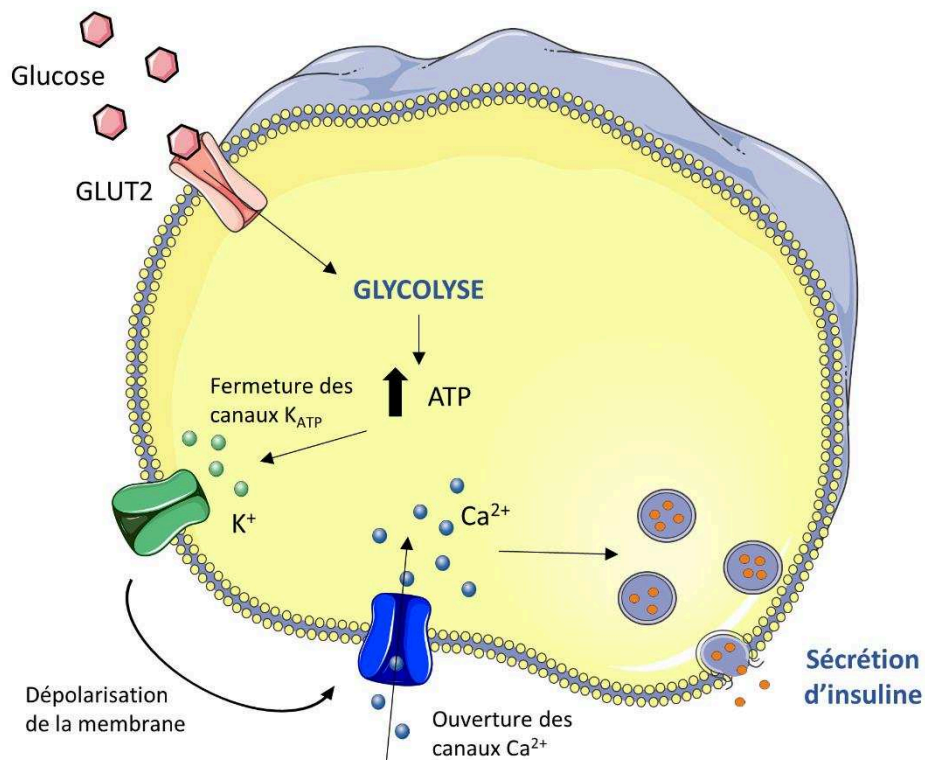


Figure 7: Mécanisme de la sécrétion d'insuline dans la cellule β .

b. Voie de signalisation de l'action de l'insuline sur les tissus périphériques

L'action de l'insuline dans les tissus périphériques est initiée par sa liaison avec le récepteur dédié, à la surface des cellules. Cela entraîne la formation d'un dimère de ce récepteur qui s'autophosphoryle, ce qui active sa propriété de tyrosine kinase. Une fois activé, le récepteur de l'insuline déclenche deux cascades de signalisation distinctes : la première met en jeu la voie des MAPK qui régule les effets de l'insuline sur la mitogenèse et la croissance cellulaire. La seconde voie passe par la *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K) et AKT et concerne l'action de l'insuline sur le métabolisme (Guo 2014; Pansuria et al. 2012). C'est cette cascade de signalisation que nous allons décrire dans le paragraphe suivant (figure 6).

Le récepteur à l'insuline activé phosphoryle l'*insulin receptor substrate* (IRS) qui se lie avec PI3K et l'active. PI3K activé permet la conversion du *phosphatidylinositol-4,5-diphosphate* (PIP2) en *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate* (PIP3). Cela entraîne l'activation de la *phosphoinositide dependent kinase-1* (PDK1) qui phosphoryle AKT (ou *protein kinase B*) au niveau de la thréonine 308. Par ailleurs, AKT est aussi phosphorylée sur son site sérine 473 par le *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) (Guo 2014). AKT est alors activée et va pouvoir induire une multitude de voies de signalisation en aval. Dans le muscle et le gras, l'activation d'AKT mène à l'activation de AS160 qui permet la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane cellulaire et donc l'entrée du glucose dans la cellule. Dans le muscle et le foie, AKT inhibe la *glycogen synthase kinase 3* (GSK3) entraînant l'activation de la *glycogen synthase* (GS) qui stimule la production de glycogène dans ces organes. Dans le foie et le gras, AKT activée favorise l'expression du facteur de transcription SREPB-1C (*Sterol regulatory element-binding protein-1c*) qui induit l'expression des gènes de la lipogenèse comme la *fatty acid synthase* (FAS) ou l'*acetyl CoA carboxylase* (ACC). La néoglucogenèse est inhibée par l'intermédiaire de la phosphorylation de FOXO1 (*Forkhead box protein O1*), dans le foie. Enfin dans le tissu adipeux, l'activation d'AKT entraîne l'activation de la *phosphodiesterase 3b* (PDE3B) qui inhibe la lipolyse par l'intermédiaire de l'inhibition de la protéine kinase A (PKA) et de la lipase hormono-sensible (HSL).

c. Exemple de facteur clé du métabolisme indépendant de la signalisation insulinique

D'autres voies de signalisation, indépendante de l'insuline, entrent en jeu dans la régulation du métabolisme dans les tissus périphériques. A titre d'exemple, de nombreuses études de ces 15 dernières années se sont concentrées sur le rôle clé de médiateur des effets transcriptionnels du glucose de ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*). Il s'agit d'un facteur de transcription, senseur du glucose qui interagit aux niveaux des gènes avec *le carbohydrate response element* (ChoRE). L'activation de ChREBP semble médiée par des métabolites du glucose (Abdul-Wahed et al. 2017). Il est exprimé dans le foie et le tissu adipeux mais aussi dans les îlots pancréatiques, l'intestin grêle et les muscles squelettiques. Son implication dans la régulation de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux est reconnue (Abdul-Wahed et al. 2017). De plus, des études plus récentes proposent un rôle de ChREBP dans la synthèse d'adipokines, la différenciation des adipocytes et la sensibilité à l'insuline (Abdul-Wahed et al. 2017).

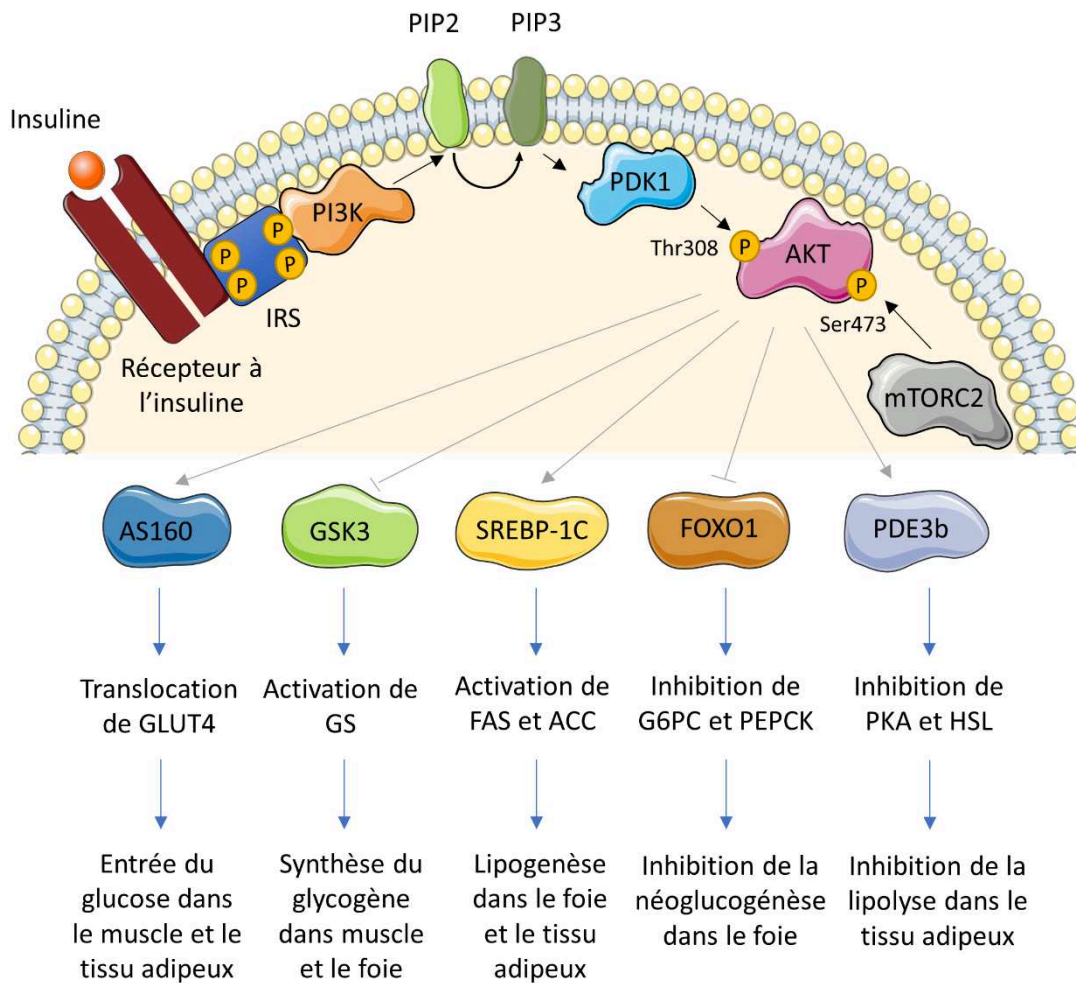


Figure 9: Représentation schématique de la cascade de signalisation de l'insuline dans les cellules des tissus périphériques. IRS : insulin receptor substrate, PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase, PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PDK1: phosphoinositide dependent kinase-1, mTORC2: mammalian target of rapamycin complex 2, AKT: protein kinase B, AS160 : Akt substrate of 160 kDa, GSK3: glycogen synthase kinase 3, GS : glycogen synthase, SREBP-1C : Sterol regulatory element-binding protein-1c, FAS: fatty acid synthase, ACC: acetyl CoA carboxylase, FOXO1 : Forkhead box protein O1, G6PC : glucose-6-phosphatase catalytic-subunit, PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PDE3b : phosphodiesterase 3b, PKA : protein kinase A, HSL : hormone-sentitive lipase.

B. Troubles et maladies métaboliques

1. Les pathologies et leur expansion.

a. Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique se définit comme la combinaison et l'interaction de plusieurs troubles du métabolisme tels que la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie, la dyslipidémie, et l'obésité. Il se caractérise aussi par une inflammation chronique et de l'hypertension. Différents critères définissant le syndrome métabolique ont été proposés depuis 1998 (récapitulé dans le tableau 4), les derniers en date provenant de la fédération internationale du diabète en 2005. Ces diverses définitions ont en commun des taux de glucose et triglycérides élevés, une pression sanguine forte, un tour de taille élevé et un taux de HDL faible.

Table 4: Critères de diagnostic du syndrome métabolique proposés par différentes organisations depuis 1998 (Kaur, 2014)

Clinical measures	WHO (1998) [5]	EGIR (1999) [6]	ATPIII (2001) [7]	AACE (2003) [8]	IDF (2005) [9]
Insulin resistance	IGT, IFG, T2DM, or lowered insulin Sensitivity ^a plus any 2 of the following	Plasma insulin >75th percentile plus any 2 of the following	None, but any 3 of the following 5 features	IGT or IFG plus any of the following based on the clinical judgment	None
Body weight	Men: waist-to-hip ratio >0.90; women: waist-to-hip ratio >0.85 and/or BMI > 30 kg/m ²	WC ≥94 cm in men or ≥80 cm in women	WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women	BMI ≥ 25 kg/m ²	Increased WC (population specific) plus any 2 of the following
Lipids	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <35 mg/dL in men or <39 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <39 mg/dL in men or women	TGs ≥150 mg/dL HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL or on TGs Rx. HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or on HDL-C Rx
Blood pressure	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg or on hypertension Rx	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg systolic or ≥85 mm Hg diastolic or on hypertension Rx
Glucose	IGT, IFG, or T2DM	IGT or IFG (but not diabetes)	>110 mg/dL (includes diabetes)	IGT or IFG (but not diabetes)	≥100 mg/dL (includes diabetes) ^b
Other	Microalbuminuria: Urinary excretion rate of >20 mg/min or albumin: creatinine ratio of >30 mg/g.			Other features of insulin resistance ^c	

^aInsulin sensitivity measured under hyperinsulinemic euglycemic conditions, glucose uptake below lowest quartile for background population under investigation.

^bIn 2003, the American Diabetes Association (ADA) changed the criteria for IFG tolerance from >110 mg/dl to >100 mg/dl [10].

^cIncludes family history of type 2 diabetes mellitus, polycystic ovary syndrome, sedentary lifestyle, advancing age, and ethnic groups susceptible to type 2 diabetes mellitus.

BMI: body mass index; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; Rx: receiving treatment; TGs: triglycerides; T2DM: type 2 diabetes mellitus; WC: waist circumference.

Le syndrome métabolique est un facteur de risque de plusieurs maladies métaboliques. En effet, il est estimé que les personnes atteintes de ce syndrome ont 5 fois plus de risques de développer du DT2 dans les 5 à 10 ans suivants. De plus, le syndrome métabolique entraîne 2 fois plus de risques de contracter des maladies cardiovasculaires, ainsi que 2 fois plus de risques de décéder d'une crise cardiaque ou d'un infarctus, comparé à des personnes sans syndrome métabolique (Kaur 2014). Le syndrome métabolique touche une grande partie de la population mondiale puisqu'on estime que sa prévalence mondiale est de 20 à 40% (Grundy 2015).

b. L'obésité

L'obésité est définie par l'OMS comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Les personnes adultes atteintes d'obésité sont diagnostiquées par un indice de masse corporelle (BMI) (rapport du poids en kg sur la taille au carré en m²) supérieur à 30. L'obésité est un facteur de risque majeur de plusieurs pathologies comme l'hypertension, la dyslipidémie, le DT2 ou l'insulinorésistance, les maladies cardiovasculaires, l'apnée du sommeil, certains cancers et la stéatose hépatique non-alcoolique (Højlund 2014). En 2014, selon l'OMS, plus de 1.9 milliard d'adultes étaient en surpoids dont 600 millions obèses. La prévalence de l'obésité a doublé entre 1980 et 2014 : elle était de 13% de la population mondiale en 2014. L'obésité et le surpoids touchent aussi les enfants (41 millions d'enfants de moins de 4 ans étaient obèses ou en surpoids en 2014).

c. Le diabète

Le terme diabète regroupe en réalité plusieurs pathologies différentes dont les 3 principales sont le diabète de type I, diabète de type II et diabète gestationnel. Le diabète de type I est une maladie auto-immune, qui se caractérise par une destruction des cellules β pancréatiques. Par conséquent, la production et la sécrétion d'insuline sont atteintes voir complètement supprimées. Cette maladie atteint des personnes de tout âge mais elle se déclare en général chez l'enfant. Le diabète gestationnel apparaît pendant la grossesse, généralement à partir de la 24^{ième} semaine et disparaît dans la plupart des cas après l'accouchement. Le diabète gestationnel augmente les risques de développer un diabète de type II par la suite chez l'enfant et la mère. Enfin, le diabète de type II (DT2) est la forme de diabète la plus courante (91 à 97%

des diabétiques). Cette maladie se traduit par une hyperglycémie, une résistance à l'insuline des tissus périphériques et un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques. Les critères de l'organisation mondiale de la santé qui conduisent au diagnostic du diabète de type II sont : une concentration de glucose plasmatique à jeun supérieure ou égale à 7 mmol.L^{-1} (126 mg/dL^{-1}) et/ou une glycémie deux heures après une charge orale de 75 g de glucose, supérieure ou égale à 11.1 mmol.L^{-1} (200 mg/dL^{-1}). Le DT2 est une pathologie qui se développe progressivement. Ainsi, elle touche principalement les adultes mais on observe que des cas de T2D se déclarent de plus en plus tôt entraînant une proportion grandissante d'enfants et d'adolescents atteints de cette maladie. Les patients diabétiques peuvent développer des complications associées comme la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie (lésions nerveuses), des gingivites, et des risques d'ulcération, d'infections et d'amputation jusqu'à 25 fois supérieures aux personnes sans diabète. De plus, le diabète est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires qui sont la première cause de décès des personnes diabétiques. En 2015, la prévalence du diabète était d'un adulte sur 11 (International Diabetes Federation 2015). De plus, un adulte sur 15 présente une intolérance au glucose. L'augmentation « épidémique » du nombre de cas de diabète est préoccupante. En effet, on dénombrait environ 415 millions de diabétiques (tout type confondu) dans le monde en 2015 et la fédération internationale du diabète estime que ce nombre atteindra 642 millions en 2040 (International Diabetes Federation 2015). Ainsi, le diabète est considéré un problème de santé publique majeur. De plus, 5 à 20% des dépenses totales de santé dans le monde, sont dépensées pour le diabète, ce qui représente un coût financier énorme (International Diabetes Federation 2015).

2. Manifestations physiopathologiques

Les maladies métaboliques telles que le diabète de type II et le syndrome métabolique se caractérisent par plusieurs manifestations physiopathologiques extrêmement liées entre elles et dont les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés. De plus, l'enchaînement de ces effets et la hiérarchie dans le développement de la pathologie ne sont pas très clairs. Dans la partie suivante, nous allons décrire quelques-uns des aspects les plus importants que sont la résistance à l'insuline des tissus périphériques, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, le dysfonctionnement des cellules β , la dyslipidémie et la lipotoxicité.

a. Résistance à l'insuline des tissus périphériques

La résistance à l'insuline se définit par une altération, souvent une diminution, de la réponse à la suite d'une augmentation de l'insuline circulante dans les tissus insulino-sensibles comme le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux. Les personnes résistantes à l'insuline présentent une moins bonne tolérance au glucose et une diminution de l'action de l'insuline parfois accompagnée d'une hyperglycémie et d'une hyperinsulinémie.

Comme le muscle est l'organe responsable du métabolisme de la majorité du glucose circulant, les altérations de ce processus peuvent avoir des conséquences particulièrement importantes. Chez des patients diabétiques de type II, l'action de l'insuline sur le muscle est retardée et moins efficace (DeFronzo and Tripathy 2009). Cela semble provenir d'une diminution du transport du glucose dans les cellules qui impacte ensuite la production de glycogène (Shulman 2000). Du point de vue moléculaire, la voie de signalisation de l'insuline semble altérée à différents niveaux : perte de sensibilité des récepteurs de l'insuline, perte de la fonctionnalité de la protéine IRS, inhibition de la cascade PI3K-AKT et donc altération des processus qui en découlent : translocation de GLUT4 à la membrane et inhibition de la néoglucogénèse (Choi and Kim 2010; Guo 2014). Il a été montré chez des souris que la suppression des récepteurs à l'insuline dans le muscle n'induisait pas l'hyperglycémie. Cela semble s'expliquer par le développement compensatoire du tissu adipeux qui lui, reste sensible à l'insuline et sécrète davantage d'adiponectine pour sensibiliser les tissus (Cariou et al. 2004)

Dans le foie résistant à l'insuline, l'action de l'insuline est diminuée dans les hépatocytes, induisant l'altération de la synthèse de glycogène. De plus, la production hépatique de glucose n'est plus inhibée en période post-prandiale ce qui participe à l'hyperglycémie. Cependant, bien que l'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique soit amoindrie lors de résistance à l'insuline, il a été observé une augmentation de la lipogenèse *de novo* hépatique et une hypertriglycéridémie. Ce paradoxe suppose une résistance partielle à l'insuline du foie : l'insuline perd sa capacité à inhiber la néoglucogénèse mais favorise toujours la production de gras (Højlund 2014; Pansuria et al. 2012; Titchenell et al. 2017). L'explication apportée dans la littérature est que la signalisation insulinique dans le foie resterait efficace mais que la résistance à l'insuline du tissu adipeux serait en partie responsable, par un mécanisme indirect, de la perte de l'inhibition de la néoglucogénèse (Petersen et al. 2017; Samuel and Shulman 2016; Titchenell et al. 2017).

En effet, lorsque le tissu adipeux devient résistant à l'insuline, l'insuline ne parvient plus à inhiber la lipolyse, ce qui augmente la quantité d'acides gras et de glycérol relargués dans la circulation sanguine. Il en résulte un stockage ectopique du gras dans les autres organes pouvant induire une lipotoxicité (Guo 2014), ainsi qu'une altération de la régulation de la néoglucogenèse hépatique. Différents mécanismes sont décrits pour expliquer cet effet indirect du gras insulino-résistant sur le foie : l'augmentation du glycérol par la lipolyse accrue favorise la néoglucogenèse hépatique puisqu'il en est l'un des substrats ; l'augmentation des acides gras libres circulants entraîne une élévation de l'acétyl-CoA mitochondrial dans le foie, ce qui active de façon allostérique la pyruvate carboxylase. Celle-ci catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate, un autre substrat de la néoglucogenèse hépatique (Petersen et al. 2017; Samuel and Shulman 2016; Titchenell et al. 2017). Par ailleurs, comme dans les autres organes résistants à l'insuline, l'entrée du glucose dans les cellules du tissu adipeux est fortement réduite. L'utilisation de ce glucose pour la fabrication de stocks de triglycérides ne se fait plus et le développement des adipocytes est retardé (Guo 2014). L'insulino-résistance du gras entraîne aussi une inflammation chronique. Par ailleurs une augmentation de la masse de tissu adipeux, particulièrement du tissu adipeux viscéral est fortement associée à la résistance à l'insuline et au diabète de type II (Giorgino et al. 2005)

b. Hyperglycémie

L'hyperglycémie ou dans une moindre mesure l'altération de la glycémie à jeun sont la caractéristique la plus connue des troubles métaboliques. C'est d'ailleurs avec ce paramètre que le diagnostic du diabète est réalisé. L'hyperglycémie provient de l'altération de l'entrée du glucose dans les cellules des tissus périphériques (cf paragraphe précédent) mais aussi de la dérégulation de la production hépatique de glucose (Pansuria et al. 2012). En effet, la néoglucogenèse est augmentée à jeun et à l'état post-prandial, dans le foie des patients diabétiques et de manière plus forte encore dans le rein (Gerich 2010; Wilding 2014). Par ailleurs, il a été montré que le taux maximal de réabsorption du glucose par le rein est plus élevé chez des sujets diabétiques, entraînant une réabsorption excessive du glucose qui contribue à exacerber l'hyperglycémie (Wilding 2014). Cependant l'hyperglycémie ne semble pas être seulement une conséquence de la perte de sensibilité à l'insuline puisqu'il a été montré que l'hyperglycémie aggrave à son tour la résistance à l'insuline en impactant la voie de

signalisation PI3K-AKT dans le foie, le tissu adipeux et les muscles (Pansuria et al. 2012). En effet, l'exposition chronique des organes à de fortes concentrations de glucose entraîne la formation de AGE (*advanced glycation end products*) qui altèrent la signalisation (inhibition de IRS-1, IR2) et les activités de certaines enzymes (NADPH oxydase) entraînant la production de ROS (Pansuria et al. 2012). De plus, les cellules β sont particulièrement sensibles à la glucotoxicité qui induit leur apoptose, ce qui accentue encore l'hyperglycémie (Pansuria et al. 2012). Enfin, une hyperglycémie entraîne des dommages glomérulaires au niveau du rein, menant à une perte de la capacité de filtration, une microalbuminurie et à la néphropathie (Triplitt 2012).

c. Hyperinsulinémie

La résistance à l'insuline est généralement associée à une augmentation de la concentration d'insuline circulante (Shanik et al. 2008). Cela peut être vu comme une augmentation de la sécrétion par le pancréas afin de compenser la perte de sensibilité des tissus périphériques. Cela impliquerait que l'hyperinsulinémie est une conséquence de la résistance à l'insuline. Or cela n'est pas si clair puisque les processus de sécrétion et de sensibilité à l'insuline sont particulièrement entremêlés. En effet, l'augmentation de la concentration sanguine en insuline à l'état basal participe à l'induction de l'insulino-résistance. Tous les tissus possédant des récepteurs de l'insuline sont impactés par l'hyperinsulinémie, particulièrement ceux qui ne sont pas résistants à l'insuline comme par exemple les cellules β . Dans ces tissus, la réponse est donc proportionnelle à la quantité d'insuline qui est sécrétée ce qui induit une sur-activation des voies sensibles à l'insuline. Cette réponse exagérée des tissus non insulino-résistants peut mener à des symptômes du syndrome métabolique (Guo 2014; Kaur 2014).

d. Disfonctionnement des cellules β

Les personnes atteintes de résistance à l'insuline, comme par exemple les sujets obèses, ne développent pas toutes du diabète de type II. En effet, ces dernières années, l'idée émerge qu'un disfonctionnement des cellules β est nécessaire en plus de la résistance chronique à l'insuline pour entraîner le diabète (Fu et al. 2013). Cela se passe lorsque les cellules β ne sont plus capables de sécréter des quantités adéquates d'insuline en réponse à la sensibilité

diminuée des tissus. Ce dysfonctionnement provient de l'altération de la sécrétion d'insuline ainsi que de la perte de cellules β fonctionnelles. Les mécanismes ne sont pas, à l'heure actuelle, complètement compris mais la théorie principalement retenue propose que les cellules β sont soumises à un stress métabolique venant des quantités accrues de glucose, insuline et acides gras présents dans la circulation. Ce stress fini par induire un « épuisement » irréversible des cellules qui ne sont plus capables de sécréter suffisamment d'insuline pour maintenir l'homéostasie du glucose (Fu et al. 2013).

L'hyperglycémie induit une exposition chronique des cellules β à des concentrations élevées de glucose qui peut avoir des effets néfastes à long terme. Le transporteur GLUT2, très présent à la surface des cellules β participe à l'entrée de quantités excessives de glucose dans les cellules puisqu'il a une grande affinité pour le glucose et ne requiert pas d'activation par l'insuline. La synthèse et la sécrétion d'insuline sont alors suractivées. De plus, l'hyperglycémie mène à une augmentation du calcium cytosolique qui induit la destruction des cellules β . Elle entraîne aussi l'augmentation de la production de ROS et d'AGE, de cytokines qui favorise les dommages cellulaires auxquels les cellules β sont particulièrement sensibles (Fu et al. 2013).

Plusieurs études suggèrent l'importance de la signalisation de l'insuline dans l'exocytose des vésicules. Une altération de ces voies de signalisation similaire à la résistance à l'insuline observés dans les autres tissus, peut donc aussi induire des dysfonctionnement des cellules β (Pansuria et al. 2012).

Enfin, l'augmentation des acides gras circulant applique un stress métabolique supplémentaire sur les cellules β . Il est décrit qu'une exposition temporaire des îlots à des acides gras libres augmente la sécrétion d'insuline alors qu'à plus long terme, cela induit une diminution de la sécrétion (Fu et al. 2013).

e. Dyslipidémie et lipotoxicité

Lorsque le tissu adipeux devient résistant à l'insuline, celle-ci n'inhibe plus la lipolyse en état postprandial, ce qui entraîne une augmentation des acides gras relargués dans le sang. Ce processus est amplifié par le gain de poids et de masse grasseuse. Dans le foie, l'augmentation d'AGL induit la production excessive de triglycérides et de VLDL et LDL menant à une dyslipidémie qui présente des risques athérogènes (Kaur 2014).

Cette hyperlipidémie engendre l'accumulation ectopique de gras dans le foie et les muscles, fortement associée à l'obésité, le diabète et la résistance à l'insuline (Samuel et al. 2010a). Ces dépôts ectopiques se composent de triglycérides mais aussi, et surtout, de métabolites d'acides gras (fatty acyl CoA, diacylglycérol, céramides,...) qui sont responsables d'altérations de la signalisation de l'insuline et nourrissent la résistance à l'insuline (Samuel et al. 2010; Shulman 2000). L'augmentation du flux d'acides gras surpasse en effet la capacité des cellules à les oxyder ou à convertir le diacylglycérol en triglycérides, d'autant plus si ces cellules présentent par ailleurs une fonction mitochondriale altérée (Samuel et al. 2010). Il a longtemps été pensé que les acides gras interféraient avec le métabolisme du glucose, par l'inhibition de l'activité de la phosphofructokinase, selon la théorie de Randle *et al* (Randle et al. 1963). Cependant, des études plus récentes ont montré l'impact de l'augmentation des AGL sur l'entrée du glucose dans les cellules, résultant de l'inhibition de la translocation de GLUT4 (Shulman 2000). Cet effet viendrait de l'altération par les acides gras ou de ses métabolites, de la voie de signalisation, notamment au niveau de l'activation de PI3K (Shulman 2000). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, l'hyperlipidémie dégrade la capacité de l'insuline à inhiber la production de glucose hépatique et augmente la production de ROS qui peuvent à leur tour contribuer à la résistance à l'insuline (Pansuria et al. 2012).

La dyslipidémie impacte le fonctionnement et la viabilité des cellules β . En particulier, l'augmentation du flux d'acides gras combiné à une augmentation du glucose impose un stress énorme sur l'oxydation mitochondriale menant à la production de ROS. Les cellules β sont particulièrement sensibles au stress oxydant du fait de la faible expression des enzymes antioxydantes (Fu et al. 2013).

Enfin, un excès d'accumulation de lipides dans de tissus adipeux, le foie et le muscle entraîne une inflammation chronique à bas bruit d'abord dans le tissu adipeux avec production de cytokines pro-inflammatoires, qui s'étend ensuite à tout l'organisme (Guo 2014).

3. Les facteurs de risque et de susceptibilité aux atteintes métaboliques

Parmi les facteurs de risques mentionnés précédemment, les paragraphes suivants se concentreront sur deux aspects : le sexe et la période périnatale.

Parmi les facteurs de risques liés aux maladies métaboliques se trouvent la génétique et les antécédents familiaux. La prédisposition génétique du diabète de type II a été démontré dans des études sur des jumeaux monozygotes qui présentent un taux de concordance du diabète plus élevée que les jumeaux dizygotes (faux-jumeaux)(Højlund 2014). De plus, les personnes ayant un de leur parent diabétique de type II, ont un risque de 40% de développer à leur tour cette maladie. Le risque est encore augmenté si les deux parents sont diabétiques (Højlund 2014) .

Cependant, les raisons de l'expansion de ces maladies, ces dernières décennies sont plutôt à chercher du côté des changements de mode de vie et de l'industrialisation. En effet, l'évolution de la consommation de nourriture vers des aliments, tout prêts, très caloriques, riches en lipides et glucides favorise le développement de dérégulation du métabolisme (International Diabetes Federation 2015). Par ailleurs, l'urbanisation et le développement de nouveaux modes de transport ont engendré un mode de vie plus sédentaire avec une activité physique réduite, ce qui représente un autre facteur de risque pour le diabète et l'obésité. Le vieillissement de la population participe aussi au plus grand nombre de cas de diabète. Toutefois, ces aspects ne suffisent pas à eux seuls à expliquer l'explosion des maladies métaboliques. A titre d'exemple, une étude s'intéressant à l'augmentation de la prévalence de l'obésité a montré que des animaux sauvages, domestiques, ainsi que des rongeurs de laboratoires étaient de plus en plus gros au fil des décennies (Klimentidis et al. 2011). Ces résultats suggèrent que les changements du mode de vie des humains (habitude alimentaire, sédentarité) qui sont habituellement considérés comme les facteurs majeurs expliquant l'expansion des maladies métaboliques, ne sont pas les seuls responsables. D'autres aspects moins bien définis participeraient donc à ce phénomène.

a. Importance de la période périnatale

L'importance de l'environnement extérieur pendant la période fœtale et la petite enfance sur la santé future a été mise en évidence par le concept DOHaD (*developmental origins of health and adult diseases*), selon lequel les modifications apportées pendant le développement précoce de l'enfant pourraient avoir un impact sur les maladies développées à l'âge adulte.

Les premières études alimentant cette idée ont été réalisées dans les années 1980 et ont observé, à partir de données d'archives, une relation inverse entre le poids de naissance et l'apparition de maladies chroniques à l'âge adulte (Barker 1998; Barker et al. 2002; Charles et al. 2016). Au fil des années, les observations épidémiologiques mais aussi expérimentales, allant dans ce sens, se sont accumulées et ont approfondi la compréhension de ce lien. D'autres disciplines comme la sociologie, les neurosciences, l'épigénétique et la toxicologie se sont associées à cette recherche et ont apporté d'autres points de vue sur ce sujet (Charles et al. 2016). Ces dernières années, les avancés en matière d'épigénétique ont permis de proposer des explications biologiques plus détaillées sur l'impact de l'environnement pendant le développement (Seki et al. 2012). Tous ces travaux contribuent à définir la période périnatale comme une période critique pour la santé future et en particulier concernant les maladies métaboliques.

Concernant le diabète de type II, une relation en « U » est montrée entre le poids de naissance et le risque de développement de cette pathologie : la descendance dont la croissance fœtale a été restreinte et celle qui a reçu un excès de nutriments présentent une susceptibilité accrue au diabète de type II à l'âge adulte (Charles et al. 2016). En effet, des études sur des rongeurs femelles gestantes dont le régime alimentaire a été modifié (restriction calorique, faible teneur en protéine, restriction utéro-placentaire ou au contraire régime trop riche en gras) montrent que la descendance développe des troubles métaboliques en grandissant (intolérance au glucose, impact sur la masse des cellules β , et de la fonction pancréatique, altération de la réponse insulinaire, obésité) (Charles et al. 2016; Seki et al. 2012). Des changements épigénétiques pendant la période de développement, et donc avant l'apparition des effets sur le métabolisme, seraient, en partie, responsables de ces observations à l'âge adulte (Seki et al. 2012).

De façon intéressante, la nutrition du père impacte aussi la santé future de la descendance suggérant que les spermatozoïdes subissent des transformations épigénétiques qui se transmettent à la descendance (Dunford and Sangster 2017; Seki et al. 2012).

Enfin, au-delà de la nutrition, d'autres paramètres environnementaux peuvent générer des modifications précoces ayant des répercussions ultérieures. C'est le cas, par exemple, de l'exposition aux polluants pendant la gestation, la lactation et la petite enfance qui induit, selon les polluants, des effets sur le métabolisme de la descendance (altérations diabétogènes et obésogènes) mais qui peuvent aussi se répercuter sur les générations suivantes (Le Magueresse-Battistoni et al. 2016).

Prises dans leur ensemble, ces considérations démontrent que l'environnement durant les premiers moments de la vie est déterminant pour le développement de l'organisme et que les perturbations pendant cette période critique peuvent avoir des conséquences importantes sur l'apparition de pathologies chroniques.

b. Dimorphisme sexuel

En 2015, il y avait 215.2 millions d'hommes diabétiques contre 199.5 millions de femmes (International Diabetes Federation 2015). Par ailleurs, selon l'OMS, 11% des hommes sont obèses contre 13% des femmes. Ces différences de prévalence des maladies métaboliques s'expliquent en partie par des différences physiologiques, notamment au niveau des tissus adipeux. En effet, la répartition du gras ainsi que ses propriétés métaboliques sont différentes entre les hommes et les femmes. Les hommes présentent plus de gras viscéral alors que les femmes accumulent plutôt le gras au niveau sous cutané (Varlamov et al. 2015). Globalement, les femmes présentent un pourcentage corporel de gras plus élevé que les hommes (Kim et al. 2014; Varlamov et al. 2015). Des différences dans le métabolisme lipidique sont également observées chez l'humain et chez les rongeurs : les femelles ont une capacité supérieure à stocker les acides gras comparée aux mâles chez qui les acides gras sont plus facilement oxydés. Après un repas, l'insuline a une meilleure capacité inhibitrice de la lipolyse chez les femelles ce qui entraîne un risque supérieur de prise de poids (Varlamov et al. 2015). Par ailleurs, les adipocytes abdominaux des femelles ont une meilleure sensibilité à l'insuline avec des niveaux d'expression élevée d'ARNm et de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et du

glucose (Kim et al. 2014). Au contraire, chez les hommes, l'action anti-lipolytique de l'insuline est moins bonne, suggérant une moins bonne sensibilité du gras à l'insuline (Varlamov et al. 2015). Au niveau du métabolisme du glucose, des études montrent une meilleure sensibilité globale à l'insuline et efficacité du glucose chez les femmes (Varlamov et al. 2015). Les mécanismes relatifs à ces observations ne sont pas totalement compris. Certaines publications font état de différence de sécrétion d'insuline. Mais le sujet est débattu (Varlamov et al. 2015). Considérées dans leur ensemble, ces observations pourraient expliquer les risques de diabète de type II plus élevés chez les hommes et la prévalence légèrement supérieure de l'obésité chez les femmes. Par ailleurs, les profils lipidiques diffèrent entre hommes et femmes rendant les femmes moins à risques pour les maladies cardiovasculaires que les hommes (Rochlani et al. 2015).

Les interactions des hormones sexuelles dans le métabolisme pourraient aussi expliquer le dimorphisme sexuel. En effet, il a été observé que la castration des mâles augmente la réponse à l'insuline dans le tissu adipeux alors que l'ovariectomie la diminue chez les femmes (Varlamov et al. 2015). Plusieurs travaux suggèrent ainsi le rôle protecteur des œstrogènes sur la résistance à l'insuline. De manière générale, les œstrogènes améliorent la distribution du gras, la régulation de l'homéostasie énergétique et la fonction pancréatique (Mauvais-Jarvis et al. 2013). Ils favorisent la β oxydation, réduisent le stockage des triglycérides et diminuent l'inflammation (Mauvais-Jarvis et al. 2013).

En parallèle des différences physiologiques, les paramètres sociologiques ont un rôle important dans les différences sexuelles vis à vis des maladies métaboliques, notamment en ce qui concerne les habitudes alimentaires et l'activité physique. A titre d'exemple, chez les femmes, une diminution importante de l'activité physique est observée de manière générale à partir de l'adolescence, comparé aux hommes. Cette sédentarité, en partie inculquée par des phénomènes socioculturels, contribue d'une façon non négligeable aux différences de prise de poids entre hommes et femmes et donc, peuvent potentiellement influencer la prévalence des maladies métaboliques (Rochlani et al. 2015).

c. Impact des polluants

L'industrialisation et le changement de mode de vie associé, semblent jouer un rôle prépondérant dans l'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques. Toutefois, les habitudes alimentaires et la sédentarité n'expliquent pas, à eux seuls, l'explosion du nombre de personnes atteintes de troubles métaboliques. En 2002, pour la première fois, l'idée que l'exposition à des produits chimiques présents dans l'environnement pourrait expliquer l'augmentation des cas d'obésité, est avancé (Russ and Howard 2016). En 2011, le National Toxicology Program (NTP) organise un séminaire international pour débattre de la question du rôle des polluants chimiques environnementaux dans le développement du diabète et de l'obésité. Les experts présents identifient alors des liens entre le diabète de type II et plusieurs polluants comme l'arsenic ou certains polluants organiques persistants. En 2012, l'OMS publie un rapport détaillant les effets observés dans des études expérimentales sur des animaux exposés à différents polluants. Ces effets incluent des altérations du métabolisme du cholestérol, un gain de poids et le développement de symptômes de diabète de type II. En 2015, la société d'endocrinologie atteste, dans son rapport, des propriétés diabétogènes et obésogène de certains perturbateurs endocriniens (Russ and Howard 2016).

Ainsi, depuis une dizaine d'année, de nombreux travaux ont mis en évidence l'impact des polluants environnementaux dans le développement de troubles métaboliques. Les principaux polluants incriminés sont les polluants présents dans l'air, comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques (Balti et al. 2014; Brook et al. 2013; Li et al. 2014; Zheng et al. 2013), le bisphénol A (BPA), retrouvé dans les tickets de caisses, l'intérieur des boîtes de conserve métalliques et certains plastiques (Alonso-Magdalena et al. 2006; Batista et al. 2012), les phtalates, présents dans les cosmétiques et certains plastiques (Rajesh et al. 2013), les polybromodiphényléthers (PBDE) dans les produits ignifugés et le matériel électronique, les hydrocarbures perfluorés (PCF) dans les produits lubrifiants et détachants, les polychlorobiphényles (PCB) utilisés comme agents ignifugeants, les pesticides organochlorés (comme le DDT) et les organostanniques comme le TBT utilisé dans les peintures pour bateaux et certains plastiques. Parmi ces polluants, certains, comme les PCB et le DDT, ont été interdits depuis les années 70 mais sont tellement persistants qu'on les trouve encore dans l'environnement. D'autres substances ont des demi-vies beaucoup plus courtes (par exemple le BPA et les phtalates), mais sont produites en de tellement grandes quantités qu'elles sont

largement dispersées dans l'environnement. La population générale est majoritairement exposée par son alimentation à un mélange de plusieurs de ces polluants à la fois. Ainsi, plusieurs études ont montré l'impact de l'exposition à un cocktail de polluants dans une matrice alimentaire (Gauthier et al. 2014; Ibrahim et al. 2011a, 2012; Labaronne et al. 2017; Naville et al. 2013, 2015; Ounnas et al. 2016; Ruzzin et al. 2010).

Bien que l'impact des polluants sur les maladies métaboliques soit de plus en plus étudié et reconnu, pour certaines substances, le sujet reste débattu, les données ne sont pas toutes concordantes et les mécanismes ne sont pas entièrement élucidés (Kuo and Navas-Acien 2015). Cependant certains aspects liés aux risques que représentent ces polluants se dégagent. En effet, pour plusieurs de ces molécules, des propriétés de perturbateurs endocriniens ont été identifiées. Cela signifie que ces polluants sont capables d'altérer le système endocrinien par une action directe sur des récepteurs nucléaires sensible aux hormones, ou par des altérations de la synthèse, du transport et du métabolisme des hormones (Le Magueresse-Battistoni et al. 2015). Cela peut entraîner des modifications métaboliques sur la sécrétion d'insuline, la sensibilité périphérique ou le métabolisme des lipides. De plus, les perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets ne répondant pas à une courbe dose-réponse linéaire, entraînant des effets importants même à très faibles doses (Russ and Howard 2016). L'exposition à des polluants environnementaux peut avoir impacter le métabolisme de la descendance de façon différente et plus importante que chez les adultes (Russ and Howard 2016). Cela pourrait s'expliquer en partie par des changements épigénétiques pendant la gestation (Russ and Howard 2016). Des effets transgénérationnels ont aussi été décrits sur la descendance, allant jusqu'à l'impact de la troisième génération (Le Magueresse-Battistoni et al. 2015).

Ce sujet est donc préoccupant et davantage d'études sont donc nécessaires pour compléter les données existantes.

III – IMPACT DU CADMIUM SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE

Nous avons vu dans la partie précédente que l'exposition aux polluants environnementaux est un facteur de risque des maladies métaboliques, qui pourrait en partie, expliquer leur expansion ces dernières décennies. Concernant les métaux, plusieurs travaux ont montré les propriétés hyperglycémiantes de certains d'entre eux (fer par exemple), ainsi que celles hypoglycémiantes d'autres éléments (vanadium et chrome) (González-Villalva et al. 2016). L'arsenic, le cobalt, le nickel et le zinc ont, par exemple, été associés à une altération de la glycémie (Yang et al. 2017). De plus, des quantités plus élevées de métaux ont été retrouvées chez des patients diabétiques comparés à des sujets sains, soulevant la question du possible lien entre les deux (Afridi et al. 2013; Kolachi et al. 2011; Tadayon et al. 2013). Le Cd fait partie de ces métaux suspectés d'être liés au développement de maladies métaboliques. Pour répondre à cette interrogation, un corpus d'études assez fourni questionne le lien entre exposition au Cd et développement de diabète et syndrome métabolique. Ces études seront détaillées dans la partie suivante en différents paragraphes traitant des données épidémiologiques et expérimentales *in vivo* et *in vitro*.

A. Données épidémiologiques

1. Expositions professionnelles

Les personnes travaillant dans l'industrie minière, la sidérurgie et la fabrication de piles et batteries sont, par leur occupation professionnelle, exposées à des niveaux élevés de Cd par l'inhalation de poussières et de fumées et par l'ingestion accidentelle de Cd déposé sur les mains, cigarettes et nourriture. Ils sont donc plus susceptibles de développer des pathologies associées à cette exposition. Une étude sur 103 personnes travaillant depuis plus d'un an dans le secteur minier en Chine s'est intéressée à l'impact de l'exposition au Cd sur la fonction pancréatique (Lei et al. 2007a). Ces travailleurs étaient comparés à des personnes n'étant pas exposées *via* leur profession. Les résultats montrent une association dose dépendante entre l'augmentation de la concentration de Cd dans l'urine et la diminution des niveaux d'insuline

sérique. Ces auteurs ont aussi observé une diminution significative des concentrations d'amylase, une enzyme sécrétée par les cellules exocrines du pancréas qui participe à la digestion des graisses et des glucides. Une BMDL correspondant à la valeur limite de référence pouvant entraîner une augmentation de 10% du risque de diminution de l'insuline a été déterminée à 3.7 µg Cd.g⁻¹ créatinine. Une BMDL a également été calculée pour la diminution de l'amylase à 5.3 µg Cd.g⁻¹ créatinine, suggérant que la fonction exocrine du pancréas est relativement moins sensible à l'exposition au Cd que la fonction endocrine. En revanche, dans une étude transversale sur 464 travailleurs chinois de l'industrie de métal, aucune association n'a été observée entre la concentration de Cd urinaire (médiane : 0.68µg/L) et l'intolérance au glucose (Yang et al. 2017). Une autre étude avec un large nombre de participants (1489 travailleurs de 7 usines de fonderies chinoises différentes) a mis en évidence une relation dose-dépendante entre l'élévation de la concentration de Cd dans le sang et la prévalence de dyslipidémie chez ces individus (Zhou et al. 2016). La dyslipidémie était définie par la présence d'un des quatre symptômes suivants : hypertriglycémie, hypercholestérolémie, élévation du taux de LDL ou faible taux de HDL dans le sang. La concentration sanguine moyenne de Cd dans cette population était de 3.61µg/L et la prévalence de dyslipidémie de 66.3%.

Table 5: Résumé des études épidémiologiques sur des expositions professionnelles au Cd. Les études en bleu montrent une association entre exposition au Cd et troubles métaboliques.

Auteurs	Population	Paramètres étudiés	Résultats
Yang 2017	Chine 464 personnes travaillant dans l'industrie du métal	Cd urinaire Glycémie	Pas d'association Cd urinaire moyen: 0.68µg.L ⁻¹
Zhou 2016	Chine 1489 personnes travaillant dans 7 usines différentes de fonderie	Cd sanguin Profil lipidique	Association avec l'augmentation de la prévalence de dyslipidémie Cd sanguin moyen : 3.61 µg.L ⁻¹
Lei 2007	Chine 103 personnes travaillant dans le secteur minier depuis plus d'un an + 36 personnes non exposées professionnellement	Cd urinaire Insuline sérique Amylase sérique	Association avec augmentation de l'insuline BMDL ₁₀ : 3.7µg Cd. ⁻¹ créatinine

2. Expositions environnementales de la population générale

a. Impact du Cd sur le diabète et l'intolérance au glucose :

Ces quinze dernières années, plusieurs travaux épidémiologiques ont été publiés concernant l'exposition environnementale au Cd et la prévalence de diabète ou d'intolérance au glucose. Toutefois, les résultats de ces études ne convergent pas vers une conclusion claire et unanime. En effet, un nombre similaire d'études montre l'existence ou l'absence d'une association entre Cd et diabète.

Les travaux de Afridi *et al.* montrent que des concentrations supérieures de Cd et de plomb sont mesurées dans les cheveux de patients irlandais et pakistanais, atteints de diabète de type 2, comparés à des sujets sains (environ 2 et 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ chez les Irlandais et Pakistanais diabétiques contre 0.6 et 1.6 chez les sujets sains) (Afridi et al. 2013). Des constatations similaires ont été rapportées dans deux autres études sur des femmes iraniennes (Tadayon et al. 2013) et sur des mères diabétiques pakistanaises et leur nourrisson (Kolachi et al. 2011). Dans cette dernière étude, la concentration moyenne de Cd dans les cheveux des mères saines étaient de 1.56 $\mu\text{g.g}^{-1}$ contre 2.42 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour les mères diabétiques. Les nourrissons des mères saines et diabétiques présentaient, respectivement, une moyenne de 1.1 et 1.67 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Cd dans les cheveux. Une étude transversale, réalisée à partir de dosages du Cd sanguin sur un grand nombre d'adultes chinois, met en évidence une association entre élévation du Cd sanguin et augmentation de la prévalence de prédiabète (définie par un niveau de glucose plasmatique à jeun compris entre 5.6 et 7 mmol.L^{-1}) (Nie et al. 2016). D'autres études, basées sur des dosages de Cd urinaire montrent une relation entre Cd et prévalence du diabète dans une population américaine (Schwartz et al. 2003), chez des Thaïlandais habitants des zones contaminées (Tangvarasittichai et al. 2015) et chez des hommes coréens vivant dans des mines abandonnées (Son et al. 2015). Dans cette dernière étude, les auteurs n'ont pas détecté d'association significative en se basant sur les concentrations sanguines de Cd. De plus, la relation observée chez les hommes, ne l'était pas pour les femmes. Par ailleurs, un lien complexe, non linéaire a été établi entre Cd urinaire et prédiabète chez des sujets américains (Wallia et al. 2014). Cette association est plus forte pour les individus âgés de 60 ans et plus, suggérant un seuil au-delà duquel des effets délétères semblent apparaître. Cette augmentation des risques est estimée pour des concentrations urinaires de Cd supérieures à 0.7-0.9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Wallia et al. 2014). Les travaux de Bunio *et al.*

établissent une corrélation entre le contenu en Cd de l'eau de pluie et les hospitalisations dues aux diabètes dans 35 villes et villages polonais entre 2000 et 2002 (Bunio et al. 2010). Une seule étude prospective, sur 5 ans, montre un lien entre l'exposition environnementale relativement forte de sujets thaïlandais et l'augmentation de la prévalence du diabète (Swaddiwudhipong et al. 2012).

Au contraire, plusieurs études transversales dans divers pays n'ont déterminé aucune association entre exposition au Cd et diabète ou hyperglycémie, que ce soit en prenant comme marqueur d'exposition le Cd sanguin (Ettinger et al. 2014; Moon 2013; Nie et al. 2016; Simić et al. 2017) ou urinaire (Menke et al. 2015; Swaddiwudhipong et al. 2010a, 2010b). Deux études prospectives ont été réalisées chez des femmes suédoises de 64 ans sur 5.4 années (Barregard et al. 2013), et chez une population mixte suédoise sur 15 ans (Borné et al. 2014). Ces travaux ne montrent pas de lien entre l'exposition au Cd et la prévalence du diabète étudiée par les niveaux plasmatiques de glucose, d'insuline et d'hémoglobine glyquée.

Une possible explication pour ces différences de résultats pourrait être les niveaux d'exposition variables selon les pays ainsi que les facteurs génétiques et les méthodologies employées. Afin d'apprécier ces différences, les études citées sont compilées dans le tableau 6, mentionnant les concentrations de Cd urinaires ou sanguines mesurées chez ces populations distinctes.

Enfin, deux méta-analyses ont été réalisées sur ce sujet. La première regroupant 9 études, conclue que l'exposition au Cd est significativement associée à la prévalence du diabète (Li et al. 2017). Les auteurs estiment que pour une augmentation de la concentration urinaire de Cd d'environ $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de créatinine, le risque de développer du diabète augmente de 16%. Toutefois, ils soulignent le besoin de larges études prospectives pour confirmer ces résultats. La deuxième, plus récente, montre une association entre le Cd urinaire et l'augmentation de l'incidence du diabète, c'est-à-dire des nouveaux cas de cette maladie, avec un rapport de cote (odds ratio) de 1.38 (Tinkov et al. 2017).

Table 6: Résumé des études épidémiologiques sur les expositions environnementales au Cd en relation avec le diabète. Les études en bleu montrent une association entre exposition au Cd et prévalence du diabète ou prédiabète.

Auteurs	Population	Paramètres étudiés	Résultats
Tinkov 2017	Méta-analyse de 9 études	Association avec l'incidence de diabète Rapport de cote (odds ratio) de 1.38 entre les moins exposés et les plus exposés	
Simic 2017	Norvège 267 patients diabétiques + 609 contrôles sains	Cd sanguin	Pas d'association avec la prevalence de T2D
Liu 2017	Méta-analyse de 9 études	Association avec la prévalence du diabète L'augmentation de Cd urinaire de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ est associé à une augmentation du risque de 16%	
Nie 2016	Chine 5544 adultes	Cd sanguine Glycémie BMI	Association avec la prévalence de prédiabète. Pas d'association avec le diabète, ni l'obésité Cd sanguin médian : $1.97\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (hommes), $1.59\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (femmes)
Swaddiwudhi-pong 2015	Thaïlande 751 adultes dans 3 villages contaminés + 682 dans 3 villages non contaminés	Cd urinaire Diabète Profil lipidique Hypertension Fonction rénale	Pas d'association avec la prévalence du diabète Cd urinaire moyen : $2.96\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créat. (villages contaminés), $0.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (villages non contaminés)
Menke 2015	Etats- Unis 9447 personnes (NHANES)	Cd urinaire Diabète diagnostiqué Hémoglobine glyquée	Pas d'association avec la prévalence de diabète Cd urinaire moyen : $0.42\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Tangvarasitti-chai 2015	Thaïlande 258 adultes dans des villages contaminés + 277 dans des villages non contaminés	Cd urinaire Diabète diagnostiqué	Association avec le diabète Cd urinaire moyen : $0.7\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créat. (villages non contaminés), $8.3\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (village contaminés)
Son 2015	Corée du Sud 719 adultes (40-70 ans) vivant dans des mines abandonnés	Cd urinaire Glycémie	Association avec la prévalence du diabète chez les hommes Cd urinaire moyen : $2.13\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créat. (hommes), 2.63 (femmes)
Wallia 2014	Etats Unis 2398 adultes de plus de 40 ans (NHANES)	Cd urinaire Tolérance au glucose Hémoglobine glyquée Glycémie	Association non linéaire avec le prédiabète Cd urinaire moyen : $0.4\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ créat.
Ettinger 2014	Ghana, Afrique du Sud, Seychelles, Jamaïque, Etats-Unis 150 hommes (25-45)	Cd sanguin glycémie	Pas d'association avec hyperglycémie Cd sanguine moyen : $0.01\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Borné 2014	Suède 4585 personnes non diabétiques Etudes prospectives sur 15 ans	Cd sanguine Glycémie Insulinémie Hémoglobine glyquée	Pas d'association avec la prévalence du diabète Cd sanguin médian : 0.24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (hommes), 0.27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (femmes)
Moon 2013	Corée du Sud 1588 hommes + 1596 femmes (KNHANES)	Cd sérique HOMA-IR HOMA-B	Pas d'association avec la prévalence du diabète Cd sérique moyen : 1.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (non diabétiques), 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (diabétiques)
Tadayon 2013	Iran 100 femmes de 30-70 ans	Cd dans les cheveux	Concentration de Cd plus élevée chez les diabétiques comparés aux contrôles
Barregard 2012	Suède 2595 femmes, 64 ans Etude prospective sur 5.4 ans	Cd sanguin et urinaire Tolérance au glucose Production d'insuline Hémoglobine glyquée	Pas d'association avec le diabète Cd sanguine moyen: 0.34 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd urinaire moyen: 0.36 $\mu\text{g/g}^{-1}$ créat.
Afridi 2013	Irlande et Pakistan 177 adultes avec du diabète de type II et 145 adultes sains	Cd dans les cheveux	Concentration de Cd plus élevée chez les diabétiques que chez les contrôles. Cd dans les cheveux des contrôles : 1.58 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Pakistan), 0.65 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Irlande), chez les diabétiques : 3.02 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Pakistan), 2.01 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Irlande)
Swaddiwudhipong, 2010	Thaïlande 5273 personnes vivant dans des villages ruraux contaminés	Cd urinaire Diabète	Pas d'association avec la prévalence du diabète Cd urinaire moyen : 2.4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ créat. (femmes), 2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (hommes)
Bunio 2010	Pologne 35 villes et villages entre 2000 et 2002	Cd dans l'eau de pluie Hospitalisation pour du diabète et obésité	Corrélation entre le Cd dans l'eau de pluie et les hospitalisations pour diabète. Cd dans l'eau de pluie : 1.8 - 4.8 $\text{g.ha}^{-1}\text{.année}^{-1}$
Schwartz 2003	Etats-Unis 8722 adultes (NHANES)	Cd urinaire Glycémie Diabète	Association avec la prévalence de diabète et d'hyperglycémie Cd urinaire moyen : 0.63 $\mu\text{g.g}^{-1}$ créat. (non fumeurs)
Kolachi 2010	Pakistan 76 femmes diabétiques + 68 femmes saines (et leur nourrisson)	Cd sanguine, urinaire et dans les cheveux	Concentrations de Cd plus élevées chez les mères diabétiques et leur nourrisson. Cd sanguin moyen chez les mères : 3.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (contrôles), 4.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (diabétique). Cd sanguin moyen chez les nourrissons : 1.9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (contrôles), 3.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (mères diabétiques)
Swaddiwudhipong, 2012	Thaïlande 436 personnes Etudes prospective sur 5 ans	Cd urinaire Diabète	Association avec prévalence du diabète Cd urinaire moyen 9.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ créat. (2005), 8.8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (2010)

b. Etudes sur la sensibilité des patients diabétiques à l'exposition au Cd :

Certains travaux suggèrent que chez les patients déjà diabétiques, l'exposition au Cd pourrait entraîner des effets exacerbés (tableau 7). Dans une étude transversale sur 590 femmes suédoises de 64 ans, Barregard *et al* ont mis en évidence que les femmes diabétiques avaient des risques plus élevés de développer des dommages rénaux glomérulaires dû à l'exposition au Cd que les femmes non diabétiques (Borné et al. 2014). De plus, le risque de dysfonctionnement des tubules rénaux est augmenté avec l'élévation des niveaux de Cd urinaires chez des patients chinois atteints de diabète de type II (Chen et al. 2006). Par ailleurs, chez une population indigène d'Australie encline au développement de diabète, une association entre exposition au Cd et néphropathie diabétique a été observée (Haswell-Elkins et al. 2008). Enfin, une étude prospective sur 18 mois révèle qu'une exposition au Cd pourrait contribuer à une augmentation de la mortalité chez des patients diabétiques hémodialysés chinois (Yen et al. 2011).

Table 7: Résumé des études épidémiologiques sur les expositions environnementales au Cd sur des patients diabétiques. Les études en bleu montrent une association entre exposition au Cd et aggravation des états diabétiques.

Auteurs	Population	Paramètres étudiés	Résultats
Barregard 2014	Suède 590 femmes de 64 ans	Cd sanguin et urinaire Tolérance au glucose Dommages rénaux	Association entre Cd et risques de dommages rénaux, chez les diabétiques. Cd sanguin moyen : 0.53 µg.L ⁻¹
Yen 2011	Chine 212 diabétiques (en hémodialyse) Etude prospective sur 18 mois	Cd sanguin Mortalité	Association avec des risques plus élevés de mortalité chez les diabétiques
Chen 2006	Chine 229 patients diabétiques de type II	Cd urinaire Fonction rénale	Association avec les dysfonctionnements tubulaires rénaux chez les diabétiques Cd urinaire moyen : 0.43 µg.g ⁻¹ créat. (femmes), 0.32 µg.g ⁻¹ (hommes)
Haswell-Elkins 2007	Torres Strait (Australie) 122 personnes indigènes enclines au développement de diabète)	Cd urinaire Albuminuria	Association avec néphropathie chez les diabétiques Cd urinaire moyen 1.91 µg.g ⁻¹ créat. (diabétiques avec néphropathie), 0.74 µg.g ⁻¹ (diabétiques)

c. Impact du Cd sur le diabète gestationnel :

Dans une étude rétrospective de type cas-témoins sur des femmes chinoises enceintes, une association positive entre la quantité de Cd présente dans le méconium (premières selles du nourrisson) et le diabète gestationnel des mères a été observée (Peng et al. 2015). La concentration médiane de Cd dans le méconium des nourrissons de femmes atteintes de diabète gestationnel était de 9.41 ng.g^{-1} contre 4.1 ng.g^{-1} chez les nourrissons de femmes non atteintes. En apparence contradiction, une étude sur des femmes canadiennes, dont la concentration sanguine en Cd a été mesurée au cours du premier trimestre de grossesse, ne montre pas de lien entre exposition au Cd et diabète gestationnel (Shapiro et al. 2015).

Table 8: Résumé des études épidémiologiques sur les expositions environnementales au Cd et le diabète gestationnel. Les études en bleu montrent une association entre exposition au Cd et diabète gestationnel.

Auteurs	Population	Paramètres étudiés	Résultats
Shapiro 2015	Canada 1274 femmes enceintes	Cd sanguin pendant le premier trimestre de grossesse Tolérance au glucose Diabète gestationnel	Pas d'association avec le diabète gestationnel Cd sanguin : $0.2- 0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$
Peng 2015	Chine 137 femmes avec un diabète gestationnel + 190 femmes saines (étude rétrospective)	Cd dans le méconium	Association avec le diabète gestationnel Cd dans le méconium moyen: 9.4 ng.g^{-1} ¹ (femmes avec diabète gestationnel), 4.1 ng.g^{-1} (femmes saines)

d. Impact du Cd sur le syndrome métabolique et l'obésité :

Une association entre exposition au Cd et syndrome métabolique a été relevée dans une étude transversale sur des hommes adultes coréens (Lee and Kim 2016). Le syndrome métabolique a été défini par la présence d'au moins trois des symptômes suivants : pression sanguine élevée ou utilisation d'une médication pour la pression sanguine, faible taux sanguin de HDL, fort taux sanguin de triglycérides ou utilisation de médicament contre la dyslipidémie, glycémie à jeun élevée ou médication contre le diabète, et obésité abdominale. Les auteurs ont montré que les hommes présentant les concentrations sanguines en Cd les plus fortes, dans

cette étude, avaient 36% plus de risque d'être atteint par le syndrome métabolique que les sujets les moins exposés. De façon intéressante, aucun lien n'a été établi chez les femmes, dans cette étude. Cependant, des travaux sur des adultes polonais (Rotter et al. 2015), coréens (Moon 2014) et des adolescents iraniens (Kelishadi et al. 2013) n'ont pas décrit d'association entre Cd et syndrome métabolique. De plus, Moon *et al.* ont mis en évidence un possible effet synergique de l'exposition concomitante au Cd, plomb et mercure sur le développement du syndrome métabolique (Moon 2014).

Table 9: Résumé des études épidémiologiques sur les expositions environnementales au Cd et le syndrome métabolique. Les études en bleu montrent une association entre exposition au Cd et syndrome métabolique.

Auteurs	Population	Paramètres étudiés	Résultats
Lee et Kim 2016	Corée du Sud 4882 hommes et 4998 femmes (KNHANES)	Cd sanguin Critères de syndrome métabolique (pression sanguine, profil lipidique, glycémie, obésité)	Association avec le syndrome métabolique chez les hommes. Les hommes avec des concentrations sanguines dans le plus haut tercile, ont un risque 36% plus élevé d'avoir le syndrome métabolique Cd sanguin moyen : 1.16 µg.L ⁻¹ (femmes), 0.82 µg.L ⁻¹ (hommes)
Rotter 2015	Pologne 313 hommes de 50-75 ans	Cd sanguin HOMA Profil lipidique Glycémie Insulinémie	Pas d'association avec le syndrome métabolique Cd sanguin moyen : 1.5 µg.L ⁻¹
Moon 2014	Corée du Sud 1961 hommes et 1989 femmes (KNHANES)	Cd sanguin critères du syndrome métabolique	Pas d'association entre Cd seul et syndrome métabolique Association entre Cd, Pb et Hg et syndrome métabolique Cd sanguin moyen : 0.52 µg.L ⁻¹ (personnes saines), 1.7 µg.L ⁻¹ (personnes avec syndrome métabolique)
Kelishadi 2013	Iran 160 adolescents avec le syndrome métabolique + 160 adolescents sains	Cd sanguin Pression sanguine Profil lipidique Glycémie Enzymes hépatiques	Pas association avec le syndrome métabolique Cd sanguin moyen : 10.1 µg.L ⁻¹ (syndrome métabolique), 9.97 µg.L ⁻¹ (sains)

Les données épidémiologiques publiées à ce jour, concernant le lien entre exposition au Cd et obésité sont donc contradictoires. Quelques études montrent une association positive entre les concentrations de Cd urinaire, sanguin, ou dans les cheveux et le BMI de femmes indigènes d’Australie (Haswell-Elkins et al. 2007), italiennes (Filippini et al. 2016) et russes (Skalnaya et al. 2014), ainsi que de patients atteints de diabète de type 2 (Akinloye et al. 2010). Dans d’autres travaux, une association négative a été détectée, par exemple chez des femmes suédoises ménopausées (Rignell-Hydbom et al. 2009), dans une population coréenne habitant dans des anciennes mines (Son et al. 2015) et dans une population amérindienne (Tellez-Plaza et al. 2013). De plus, de façon surprenante, une relation négative a été établie entre Cd sanguin et prévalence du surpoids (défini par un index de masse corporelle entre 25 et 29.9), dans une étude transversale chinoise alors qu’elle n’a pas été observée avec l’obésité (Nie et al. 2016). Les auteurs avancent l’hypothèse d’une perte de poids associée aux effets toxiques du Cd dans l’intestin. Enfin, certains travaux ne détectent aucune relation significative entre concentration de Cd urinaire ou sanguine et obésité (Ahn et al. 2017; Gonzalez-Reimers et al. 2014; Huzior-Balajewicz et al. 2001; Jawdat et al. 2012; Kelishadi et al. 2013; Park and Lee 2013). Par ailleurs, une étude s’intéressant à la teneur en Cd de l’eau de pluie, n’a pas établie de corrélation avec les cas d’obésité dans une population polonaise (Bunio et al. 2010).

3. Limites des études épidémiologiques

L’ensemble des études épidémiologiques mentionnées ci-dessus permettent l’obtention d’un grand nombre de données nécessaires pour tenter de comprendre l’impact de l’exposition au Cd et pour évaluer les risques associés. Toutefois, ce type d’études présente des limites. Tout d’abord, la plupart de ces travaux sont des études transversales qui ne permettent pas d’établir un lien causal entre l’exposition au Cd et les pathologies étudiées. Davantage d’études prospectives où les niveaux de Cd sont mesurés en amont du développement de maladie pourraient conforter ces résultats mais des travaux expérimentaux restent nécessaires pour établir la causalité. Par ailleurs, les résultats des études citées sont très contradictoires et le sujet reste donc controversé. Ces contradictions peuvent être partiellement dues aux différents niveaux d’exposition des populations étudiées. Pour autant, plusieurs études ont été réalisées à partir des mêmes bases de données (NHANES) et résultent en des conclusions parfois différentes selon les analyses statistiques utilisées (Menke et al. 2015; Schwartz et al. 2003;

Wallia et al. 2014). Les différences entre les études peuvent aussi provenir du choix du marqueur d'exposition mesuré. Le Cd urinaire est le marqueur le plus couramment utilisé dans les études épidémiologiques puisqu'il reflète l'exposition cumulée sur une longue période contrairement au Cd sanguin. Cependant, ce marqueur présente des limites, notamment pour les expositions très faibles où l'excrétion de Cd dans l'urine est quasiment indétectable. A l'inverse le Cd sanguin reflète l'exposition récente mais pas la charge corporelle en Cd. Il est cependant conseillé pour l'étude des personnes âgées et diabétiques chez qui la fonction rénale a des risques d'être endommagée, ce qui entraînerait un relargage du Cd dans l'urine, indépendant du niveau d'exposition, et donc un biais dans l'évaluation de celle-ci. Une autre limite de certaines études repose sur les critères d'évaluation des pathologies. Dans le cas du diabète, la glycémie à jeun et l'hémoglobine glyquée sont souvent mesurées pour attester du diabète et définir les groupes étudiés. Toutefois, ces paramètres apportent des informations limitées sur les mécanismes d'homéostasie du glucose et du diabète. L'utilisation de tests plus complets comme le test de tolérance au glucose (suivi de la glycémie après ingestion de glucose), bien qu'invasif et plus compliqué à mettre en place pour un très grand nombre de sujets, permettrait d'affiner la caractérisation des pathologies. Enfin, bien que dans la plupart des études, l'analyse tente de prendre en compte l'âge, le sexe, le tabagisme, etc , il est envisageable que des biais soient apportés par d'autres facteurs confondants comme par exemple, les facteurs génétiques, l'exposition à d'autres substances environnementales ou l'impact d'autres pathologies des sujets.

B. Données expérimentales

1. Etudes *in vivo* et *ex vivo*:

De nombreux travaux sur des animaux de laboratoire ont été réalisés pour évaluer l'impact d'une exposition au Cd sur le développement d'effets diabétogènes. Des modèles d'exposition très divers ont été utilisés (récapitulatif en Annexe). Afin de clarifier les effets de ces différentes expositions, les études seront regroupées par type de modèles (dose et temps d'exposition) dans le paragraphe suivant.

Certains travaux étudient l'impact d'une exposition aiguë (dose unique) de Cd sur le métabolisme du glucose. Bell *et al.* ont montré qu'une injection unique intrapéritonéale de Cd à une dose de 0.84 mg.kg^{-1} entraîne une hyperglycémie chez des rats à jeun et nourris (Bell et al. 1990). Par ailleurs, des rats ayant reçu une injection de 1 ou 2 mg.kg^{-1} présentent une accumulation de Cd dans le pancréas, une intolérance au glucose et une diminution de l'expression des gènes liés à la production d'insuline sans toutefois que cela n'altère la concentration d'insuline circulante (Lei et al. 2007b). Dans cette étude la fonction rénale ne semble pas impactée, suggérant que des effets diabétogènes peuvent apparaître à des doses plus faibles que celles entraînant la néphrotoxicité.

D'autres études ont été menées sur des temps plus longs mais avec des doses de Cd ne pouvant pas être définies comme réalistes par rapport à l'exposition environnementale ($>1 \text{ mg.kg}^{-1}$). Certaines mettent en évidence une altération de la glycémie liée à un dysfonctionnement pancréatique. En effet, dans une étude sur un faible nombre de singes (5 singes exposés au total) exposés à 1 ou 2.5 mg.kg^{-1} par voie intraveineuse pendant 13 à 15 mois, une augmentation de la glycémie et une diminution de l'insulinémie ont été détectées (Kurata et al. 2003). Cela s'accompagne d'une atrophie des îlots pancréatiques et d'une réduction de leur contenu en insuline. Par ailleurs, des injections sous-cutanées de 1 mg.kg^{-1} , deux fois par jour pendant 7 jours entraînent une augmentation de la glycémie, une intolérance au glucose, ainsi qu'une diminution de la concentration sanguine et de la sécrétion de l'insuline, chez des rats adultes (Merali and Singhal 1975). De plus, une augmentation de l'activation des enzymes de la néoglucogénèse dans le foie a été observée. Des effets similaires sur le métabolisme hépatique ont été décrits chez des rats nourris avec une nourriture contenant 25, 50 ou 75 ppm de CdCl_2 (environ 1.5 à $4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), pendant 180 jours (Rajanna et al. 1985). De façon intéressante, cette augmentation de l'activité des enzymes de la néoglucogénèse disparaît 120 jours après l'arrêt de l'ingestion de Cd. D'autres études se sont intéressées à l'impact du Cd sur la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Ainsi, l'exposition de rats pendant 4 jours à 2 mg.kg^{-1} par injection sous-cutanée résulte en une intolérance au glucose qui s'explique par la diminution drastique de la quantité de protéine GLUT4 ainsi que du niveau d'expression de son ARNm dans les adipocytes (Han et al. 2003a). Cet effet est spécifique des adipocytes puisque les niveaux d'expression ne sont pas impactés dans le muscle et le foie. De plus, la translocation de GLUT4 à la membrane des adipocytes ne semble pas altérée par le

traitement au Cd. Une autre étude atteste d'une diminution de la masse du tissu adipeux, d'une différenciation anormale des adipocytes et de la diminution de l'expression d'ARNm d'adipokines (adiponectine et résistine) chez des souris, en réponse à des injections de 1.1 mg.kg⁻¹, 3 fois par semaine pendant 2 semaines (Kawakami et al. 2010). Une étude de la même équipe présente des résultats allant dans le même sens mais à des doses plus faibles de Cd (0.5 et 0.75 mg.kg⁻¹) et sur des souris déficientes en métallothionéine permettant d'évaluer la toxicité du Cd sous des formes non liées avec la MT (Kawakami et al. 2013). De plus, les auteurs montrent que l'exposition au Cd induit le recrutement de macrophages dans le tissu adipeux ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes pro inflammatoires. Les travaux de Zhang *et al*, révèlent que l'exposition de souris par l'eau de boisson contenant 10 mg.L⁻¹ pendant 10 semaines entraîne une augmentation des triglycérides dans le foie et le sérum et des acides gras libres dans le sérum (Zhang et al. 2015). Cela s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse *de novo* et le transport d'acides gras et dans la synthèse des triglycérides. De plus la composition du microbiome intestinal est modifiée engendrant une augmentation de lipopolysaccharides et de marqueurs d'inflammation qui pourrait être responsable des altérations métaboliques observées. Enfin, une étude sur des rats exposés par voie orale à 32.5 ppm décrivent de nombreux symptômes du syndrome métabolique : une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une altération du métabolisme lipidique, des effets pro-athérogènes et une intolérance au glucose dans le muscle, le foie, le tissu adipeux et le système cardiovasculaire (Treviño et al. 2015). Dans cette étude, les données fournies dans l'article ne permettent pas de calculer le dose administrée en mg.kg⁻¹.j⁻¹.

Certains modèles d'exposition chronique à des doses plus faibles, allant de 0.1 à 0.75 mg.kg⁻¹ ont aussi montré des effets diabétogènes (résumés dans la figure 7). Ainsi, une atteinte de la fonction pancréatique a été mise en évidence dans trois études. Ithakissios *et al*. ont observé une diminution de la concentration d'insuline circulante et une inhibition de la sécrétion d'insuline *ex vivo*, dans les pancréas perfusés avec du glucose, de rates femelles ayant reçu 70 injections intrapéritonéales de 0.5 mg.kg⁻¹ en 140 jours (Ithakissios et al. 1975). Ces résultats ne sont pas retrouvés chez des femelles exposées à 0.25 mg.kg⁻¹, dans la même étude. Par ailleurs des rats recevant des injections sous cutanées de 0.6 mg.kg⁻¹, 5 jours par semaine pendant 12 semaines, présentent une augmentation de la glycémie et de l'hémoglobine

glyquée, une diminution de l'insulinémie et des altérations morphologiques du pancréas (Edwards and Prozialeck 2009). Une dégénérescence et une nécrose des îlots pancréatiques ainsi qu'une diminution des zones contenant de l'insuline ont été observés chez des rats recevant des injections sous cutanées de 0.49 mg.kg^{-1} , quotidiennement pendant 30 jours (Demir et al. 2006). Comme pour les doses plus fortes, l'impact du Cd sur la sensibilité des adipocytes à l'insuline a été étudiée et il a été montré que chez des rats buvant de l'eau contenant 9.7 mg Cd.L^{-1} (environ $0.7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), pendant 6 semaines, la densité de récepteurs à l'insuline des adipocytes est diminuée entraînant une hyperglycémie (Ficková et al. 2003). Plusieurs travaux décrivent l'impact du Cd sur le métabolisme hépatique. Deux études de Chapatwala *et al.* montrent une augmentation de l'activité d'enzymes clés de la néoglucogénèse hépatique chez des rats mâles exposés oralement à 200 ppm de Cd pendant 30 jours (Chapatwala et al. 1980) et chez des rates femelles recevant des injections intrapéritonéales de 0.75 mg.kg^{-1} pendant 4 semaines (Chapatwala et al. 1982). Une publication décrit des effets observés à la fois au niveau de la sécrétion et du métabolisme hépatique. De jeunes rats exposés dès leur naissance à 0.1 et $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, par voie orale, pendant 45 jours, présentent une hyperglycémie, une diminution du glycogène dans le foie et une augmentation de l'activité des enzymes de la néoglucogénèse (Merali and Singhal 1980). De plus, la sécrétion d'insuline après stimulation par le glucose des îlots pancréatiques isolés est diminuée.

A l'inverse d'autres études ne montrent pas d'effets de l'exposition au Cd sur les paramètres biochimiques du métabolisme tels que la glycémie, l'insulinémie, ou les paramètres lipidiques (Ithakissios et al. 1974; Lovásová et al. 2013; Ogheneovo Asagba 2010).

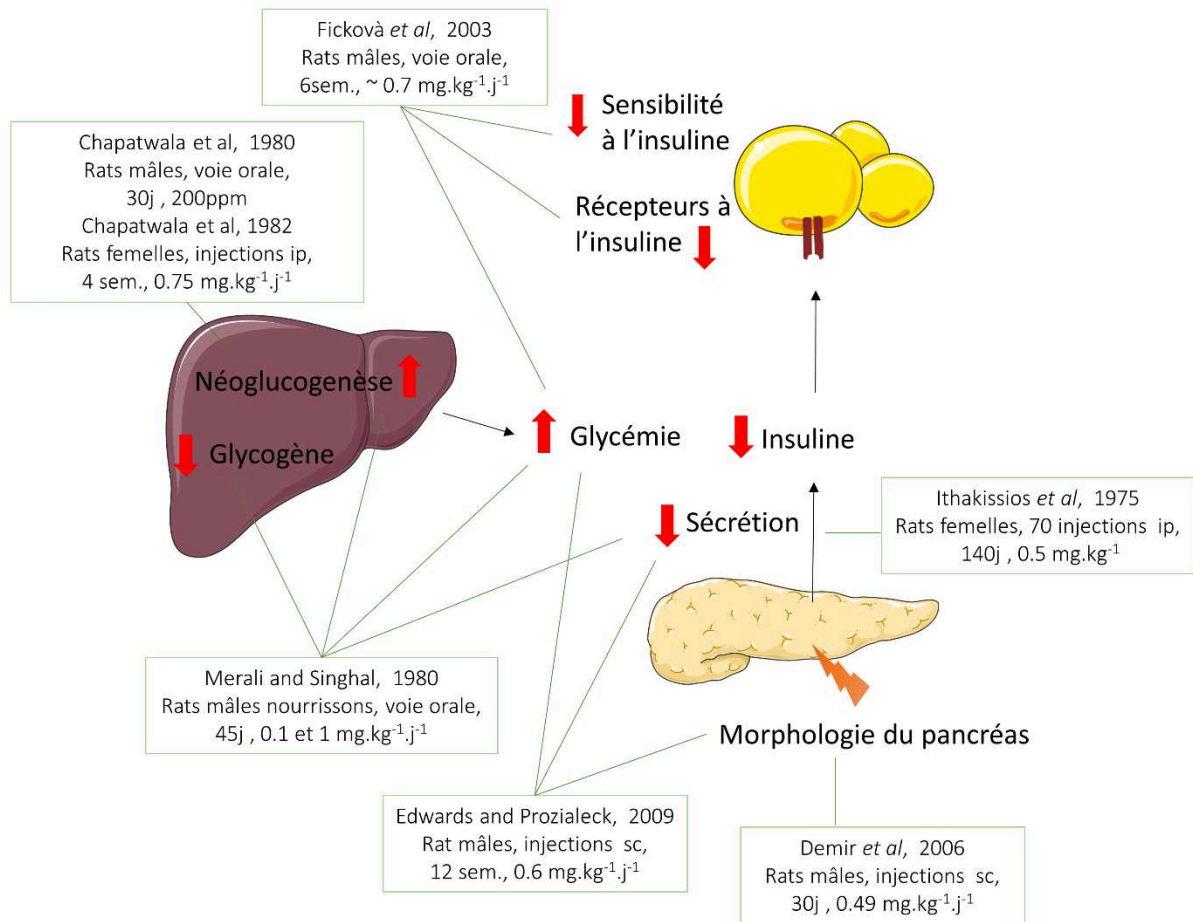


Figure 10: Résumé des principaux effets observés dans des modèles d'exposition chronique à des doses faibles à modérées. Les trois principaux organes impactés sont représentés : le foie, le tissu adipeux et le pancréas. *ip* : intrapéritonéale, *sc* : sous-cutanée, *sem.* : semaines.

Très peu de données sont disponibles sur l'impact de l'exposition maternelle au Cd sur le métabolisme de la descendance. Une étude récente décrit les effets de l'exposition de souris buvant de l'eau contenant 100 nM de Cd, pendant la gestation et la lactation. Les auteurs indiquent que cette concentration entraîne une exposition maternelle correspondant à la dose hebdomadaire tolérable (2.5 µg.kg⁻¹ par semaine) (Ba et al. 2017) . Les souriceaux issus de ces souris ont reçu la même concentration de Cd à partir du sevrage et ont été étudiés à l'âge adulte. Des effets ont été observés chez la descendance mâle mais pas chez les femelles. En effet, les souris mâles présentent une masse de tissu adipeux plus importante, une augmentation des triglycérides, cholestérol et acides gras libres dans le sang, une élévation des triglycérides dans le foie et une augmentation de l'expression de gènes du métabolisme

lipidique. De façon intéressante, les effets observés sur les souris exposées *via* leur mère ne sont pas retrouvés chez des souris exposées seulement depuis le sevrage. Cela indique que l'environnement pendant la période périnatale est critique dans le développement de pathologies à l'âge adulte. Par ailleurs, la composition du microbiote intestinal est modifiée chez les souris issues des mères exposées. De plus, lorsque ce microbiote est transféré à des souris non exposées, celles-ci présentent à leur tour une augmentation de la masse grasse. Les auteurs font donc l'hypothèse que les altérations du microbiote par l'exposition au Cd sont à l'origine des effets observés sur le gras et le métabolisme. Une autre étude s'intéresse à des souris mâles dont les mères ont reçu des injections sous cutanées de Cd et mercure combinés (0.125, 0.5 ou 2 mg.kg⁻¹ pour chaque métal) 4 jours avant et 4 jours après la conception (Camsari et al. 2017). Cette exposition au Cd et mercure autour de la conception altère la tolérance au glucose, le poids corporel et la masse de tissu adipeux abdominal de la descendance mâle à l'âge adulte pour les 3 doses. L'apparition d'une résistance à l'insuline chez les souris mâles dont les mères ont été co-exposées aux doses de 2 mg.kg⁻¹ est indiquée par une augmentation de l'insuline et de la leptine dans le sérum ainsi que par une moins bonne tolérance à l'insuline. De plus, ces souris présentent des modifications de l'expression des gènes associés à l'homéostasie du glucose et des lipides dans le foie et le tissu adipeux abdominal.

- [Limites des études expérimentales in vivo et ex vivo:](#)

De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre l'impact d'une exposition au Cd sur le métabolisme énergétique, résultant en de nombreuses et diverses données. Toutefois, cette variété d'effets observés, autant sur le fonctionnement pancréatique, la sensibilité à l'insuline, le métabolisme des lipides et le fonctionnement hépatique, ne permet pas de dégager des mécanismes clairs et unanimement reconnus. La diversité des modèles employés, en termes de doses, voies d'administration, durée d'exposition, participe grandement à cette confusion. Par ailleurs ces modèles sont, pour la plupart, très éloignés de la réalité des conditions d'exposition environnementale. Il est en effet, important de noter que la majorité des études utilisent un mode d'administration par injections qui ne reflète pas les voies d'exposition physiologiques. De plus, les doses de Cd administrées sont en règle générale, très fortes comparées aux doses réalistes d'exposition ou aux valeurs toxicologiques de référence.

Il en résulte que la question de l'impact d'une exposition chronique à faibles doses de Cd (moins de $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), par des voies physiologiques, reste très peu documentée. Enfin, très peu de données sont disponibles sur l'impact de l'exposition de sujets plus jeunes ou exposés *via* leur mère.

2. Etudes *in vitro* :

Afin d'affiner la compréhension des effets diabétogènes du Cd et des mécanismes associés, des études *in vitro* ont été réalisées sur des lignées cellulaires et sur des cellules primaires (récapitulatif en Annexe).

L'impact du Cd sur la sécrétion d'insuline a été étudié sur des îlots isolés de rongeurs et des modèles cellulaires de cellules β . Une accumulation de Cd a été mise en évidence dans des îlots pancréatiques isolés de souris obèses hyperglycémiques incubés pendant 60 min dans un milieu pauvre en calcium contenant $2.5 \mu\text{M}$ de Cd. La concentration intracellulaire de Cd passe ainsi de $2.5 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ à $180 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Nilsson et al. 1986). De façon intéressante, cette entrée de Cd dans les cellules est réduite de 50% lorsque du calcium est ajouté dans le milieu, suggérant un rôle des canaux calciques dans l'entrée du Cd. Dans la même étude, à une concentration de $5 \mu\text{M}$, la sécrétion basale d'insuline est stimulée alors qu'à $160 \mu\text{M}$, on observe une inhibition de la sécrétion après stimulation par le glucose. Enfin, l'oxydation du glucose est progressivement inhibée à partir de $10 \mu\text{M}$. Une seconde étude de la même équipe indique que la stimulation de la sécrétion observée à $5 \mu\text{M}$ de Cd ne dépend pas de la concentration de calcium dans la cellule (Nilsson et al. 1987). Une autre étude sur des îlots primaires de souris dissociés et exposés pendant 48h à une dose beaucoup plus faible ($0.1 \mu\text{M}$) montre une inhibition de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (El Muayed et al. 2012). Celle-ci s'accompagne d'une diminution du rapport GSSG/GSH suggérant l'induction d'un mécanisme de défense antioxydante.

Dans la même étude, une lignée cellulaire d'insulinôme de souris MIN6 a été incubée pendant 48 et 72h à des doses de 0.1 à $1 \mu\text{M}$ (El Muayed et al. 2012). Les auteurs observent une accumulation dépendante de la dose et de la durée d'exposition dans cette lignée de cellule β , d'une intensité plus grande que dans des fibroblastes (lignée 3T3). Cette exposition engendre l'induction de l'expression de la métallothionéine et l'inhibition de la sécrétion

d'insuline stimulée par le glucose pour les cellules exposées à 1 μM pendant 48h. Enfin, il a été montré que l'exposition à des doses allant de 1 à 10 μM pendant 24h sur un modèle de cellules β de souris RIN-m5F, diminue la viabilité et la sécrétion d'insuline, augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène, entraîne des dysfonctionnements mitochondriaux, l'activation de la cascade des caspases et la phosphorylation de JNK, ERK1/2 et MAPK (Chang et al. 2013). Ces effets disparaissent après traitement avec un antioxydant (N-acétylcystéine). Les auteurs font donc l'hypothèse que l'apoptose observée chez ces cellules serait médiée par un dysfonctionnement mitochondrial et par l'activation de JNK par le stress oxydant.

Plusieurs études sur des adipocytes décrivent qu'une exposition au Cd peut avoir des effets à différents niveaux. Une étude sur des adipocytes primaires de rats montre une diminution de la production de leptine après exposition à 1 et 10 μM (Levy et al. 2000). Par ailleurs, des travaux sur des adipocytes primaires isolés de rats et exposés à des doses de Cd entre 5 et 5000 μM , ont montré que le Cd accélère le métabolisme du glucose dans ces cellules et qu'à 5 μM et en présence d'insuline, la lipogenèse est stimulée (Yamamoto et al. 1984, 1986). Cette stimulation de l'entrée du glucose dans les adipocytes par le Cd semble être un processus saturable à forte dose avec 50 % de la stimulation maximale estimée pour une dose de 0.5 mM de Cd (Lachal et al. 1996b, 1996a). De plus cet effet semble être médié par la modulation de l'activité de GLUT1 et GLUT4. Des études réalisées sur des lignées cellulaires d'adipocytes vont dans le même sens. Ainsi, Kang *et al.* ont observé une augmentation de l'entrée de 2-deoxyglucose dans la lignée cellulaire d'adipocytes 3T3-L1 exposée à 10 et 25 μM pendant 12h. Une altération de la signalisation calcique semble être liée à cet effet. Une autre explication est apportée par Harrison *et al.* qui décrivent une modulation de l'activité de Glut1 dans cette même lignée cellulaire liée à l'augmentation de l'entrée du glucose dans les cellules. Par ailleurs, l'exposition de préadipocytes 3T3-L1 à des doses de 0.3 à 3 μM de Cd entraîne une diminution de l'accumulation de lipides et une altération de la différenciation et de l'expression des activateurs de l'adipogenèse (Lee et al. 2012).

Une étude sur des hépatocytes isolés de rats exposés à des doses de Cd entre 3.2 et 12.5 μM montre une diminution dose-dépendante de la production de glucose hépatique, de la viabilité et des niveaux de glutathion réduit, suggérant que le Cd impacte aussi d'autres tissus que le pancréas et le tissu adipeux (Bell et al. 1991).

- Limites des études expérimentales in vitro :

Si les études sur des cellules primaires et des lignées cellulaires apportent des informations précieuses sur les mécanismes mis en jeu, elles présentent toutefois quelques limites. Tout d'abord, les doses de Cd ajoutées dans le milieu sont très difficilement comparables à la situation réelle d'une exposition environnementale. La durée des expositions est extrêmement réduite dans ces études du fait des conditions de culture des cellules. Enfin, les lignées cellulaires proviennent dans la plupart des cas de la transformation de cellules cancéreuses et donc ne possèdent pas toujours toutes les fonctions physiologiques et les mécanismes des cellules natives.

***OBJECTIFS
SCIENTIFIQUES***

Dans la société actuelle, du fait de l'activité humaine et industrielle, l'émission de polluants ne cesse d'augmenter. Ainsi, l'exposition à ces substances potentiellement nocives est inévitable. A la vue des données présentées dans l'introduction précédente, il apparaît que l'exposition au Cd, qui s'effectue principalement par l'ingestion de nourriture contaminée chez les populations non -fumeuses, est impliquée dans plusieurs pathologies chroniques.

Un corpus important de données associe le Cd au développement de troubles métaboliques. Cependant, les données épidémiologiques sont contradictoires et les études expérimentales disponibles ne permettent pas de tirer une conclusion claire. En effet, dans leur grande majorité, les études *in vivo* et *in vitro* sont réalisées avec des modèles expérimentaux très loin de refléter la réalité des expositions environnementales. Les doses utilisées sont en général élevées et les modes d'administration ne représentent pas les voies physiologiques. De ce fait, les effets d'une exposition au Cd à de faibles doses sont très peu décrits et mal compris. Par ailleurs les mécanismes mis en jeu ainsi que la hiérarchie dans la sensibilité des effets ne sont pas élucidés. Enfin, dans les études *in vivo*, les effets du Cd sur des jeunes individus exposés dès le plus jeune âge sont très peu étudiés. Pourtant, les périodes de gestation, naissance et lactation sont des fenêtres d'étude critiques où de grands changements métaboliques prennent place et où, comme l'atteste l'hypothèse DoHaD (Developmental Origins of Health and Diseases), l'impact de facteurs environnementaux peut avoir des répercussions significatives sur la santé future de la descendance (Barker et al. 2002).

Dans ce contexte, notre équipe a développé un projet nommé « Cadmidia » visant à étudier la relation entre exposition chronique à de faibles doses de Cd et altérations du métabolisme du glucose. Ce projet a débuté en 2013 et a bénéficié d'un financement de l'Agence Nationale pour la Recherche. Trois laboratoires y sont impliqués : le laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (INSERM U1055) pour la partie expérimentale et les laboratoires Vérimag, (UMR CNRS 5104) et TIMC (CR CNRS, UMR CNRS 5525) pour la partie théorique et modélisation. En effet, ce projet se base sur une démarche de biologie systémique avec trois niveaux d'approche :

- Une approche *in vivo* sur des rats exposés à de faibles doses de Cd dans un modèle pertinent vis-à-vis des expositions environnementales.
- Une approche *in vitro* sur des cellules pancréatiques exposées à des doses sub-léthales de Cd.

- Une approche théorique de modélisation mathématique.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce projet et ont eu pour but l'étude des possibles altérations du métabolisme du glucose après une exposition chronique à de faibles doses de Cd, chez des rats adultes mâles et femelles ainsi que sur des populations plus vulnérables et moins étudiées : des jeunes ratons à différents âges dont les mères ont été exposées au Cd avant et pendant la gestation et la lactation.

Dans un premier temps, nous avons rédigé une revue dont l'objectif était de discuter de la pertinence des modèles expérimentaux utilisés pour aborder la question de l'impact des polluants environnementaux, et d'analyser le rôle des altérations du stress oxydant induit par deux types de polluants (Cd et PCB) dans le développement du diabète. L'écriture de cette revue nous a permis d'identifier des aspects particulièrement importants pour le design de nos études expérimentales et de soulever les questionnements associés.

Pour répondre à notre objectif, nous avons donc mis en place un modèle d'exposition au Cd basé sur une administration par voie orale dans l'eau de boisson, et à des doses proches des valeurs toxicologiques de références (équivalentes ou inférieures à la BMDL chez le rat).

La première étude (article 1) porte sur l'impact d'une exposition chronique et à faibles doses de Cd sur le métabolisme du glucose de rats adultes. Des rats femelles et mâles ont été exposés pendant 3 mois afin de pouvoir évaluer l'effet du Cd sur chacun des sexes. Cette étude avait pour but secondaire de valider le modèle d'exposition, notamment en termes de concentration de Cd accumulé dans les organes. La tolérance au glucose et à l'insuline a été évaluée chez ces animaux ainsi que d'autres paramètres physiologiques décrits ultérieurement.

Dans la seconde étude (article 2), l'objectif était d'étudier l'impact de l'exposition des femelles dans le même modèle que la première étude, avant et pendant la gestation et la lactation, sur le métabolisme de la descendance. Afin d'apprécier l'évolution de ces effets dans le temps, nous avons étudié les ratons à trois âges différents à partir du sevrage. La tolérance au glucose, la sécrétion d'insuline ainsi que des paramètres liés à la sensibilité périphérique à l'insuline ont été mesurés.

REVUE

Exposition chronique à de faibles doses de Cd et développement du diabète : rôle du stress oxydant et comparaison avec les polychlorobiphényles (PCB)

Revue sur invitation : Jacquet A, Ounnas F, Lénon M, Arnaud J, Demeilliers C, Moulis J-M. 2016. Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Diabetes: Role of Oxidative Stress and Comparison with Polychlorinated Biphenyls. *Curr. Drug Targets* 17: 1385–1413.

Chronic exposure to low level cadmium in diabetes: role of oxidative stress and comparison with polychlorinated biphenyls.

Jacquet Adeline^{1.2.3}, Ounnas Fayçal^{1.2.3}, Lenon Marine^{1.2.3}, Arnaud Josiane^{1.2.3.4}, Demeilliers Christine^{1.2.3}, Moulis Jean-Marc^{1.2.3.5}.

Présentation

Parmi les fonctions physiologiques cruciales, le maintien de l'équilibre d'oxydoréduction dans les cellules est primordial. Plusieurs polluants environnementaux possèdent la capacité de perturber l'équilibre entre stress oxydant et défense antioxydante mais ce mode de toxicité et son importance sont loin d'être précisément décrits. De plus, la place du stress oxydant dans le développement de maladie chronique comme le diabète, n'est pas clair : est-ce une cause, une conséquence ou juste un phénomène concomitant ? Dans ce contexte, l'objectif de cette revue était de discuter de la pertinence des modèles expérimentaux utilisés pour aborder la question de l'impact des polluants environnementaux, et d'analyser le rôle des altérations du stress oxydant induit par deux types de polluants dans le développement du diabète.

Dans cette démarche, nous avons choisi de comparer le Cd et les PCB, deux types de polluants qui diffèrent du point de vue de la structure, de la toxicocinétique et des organes cibles, mais surtout, qui ont, tous les deux, la capacité d'induire indirectement du stress oxydant et sont suspectés d'avoir des effets diabétogènes. Afin de caractériser ces polluants et leurs mécanismes d'action, différents aspects ont été abordés dans cette revue : les données épidémiologiques, toxicocinétiques et de distribution, les biomarqueurs d'exposition, les mécanismes cellulaires mis en jeu, la définition des doses, les limites des doses admissibles et les modèles expérimentaux.

Concernant les modèles, la plupart des études utilisent de fortes doses de polluants en se basant sur l'idée implicite que les mécanismes observés à fortes concentrations s'appliquent pour les faibles doses. Or cela ne semble pas vrai, les effets à fortes doses pouvant saturer les voies les plus sensibles aux polluants, les masquant par des effets plus prononcés sur des voies moins sensibles. De plus, une majorité des modèles utilisés ne reflètent pas une exposition environnementale réaliste du fait des doses mais aussi des durées et des voies d'administration du polluant. Il apparaît donc crucial de définir les termes de faibles et fortes doses afin de pouvoir apprécier l'intensité de la réponse antioxydante et l'éventuelle apparition de dommages oxydatifs. Ainsi, pour les études *in vivo*, des niveaux d'exposition faibles et les plus réalistes possibles d'un point de vue environnemental mais aussi en prenant en considération les conditions expérimentales, doivent être implémentés. Au niveau cellulaire, une solution

envisageable serait d'utiliser des doses comparables aux concentrations plasmatiques en polluant. Par ailleurs, nous soulignons dans cette revue, l'intérêt de bien distinguer ce qui relève de la réponse antioxydante et donc des mécanismes et de la signalisation permettant de s'adapter à un challenge oxydatif ; et les dommages oxydatifs qui apparaissent lorsque la capacité de l'organisme à s'opposer au déséquilibre rédox est surpassée. Or, dans la plupart des études, cette distinction n'est pas clairement faite. Cet aspect ainsi que la diversité des conditions expérimentales utilisées rendent l'analyse des résultats confuses et peut expliquer certaines des contradictions observées.

Des études épidémiologiques ont montré l'existence d'un lien entre exposition à des doses environnementales de Cd ou de PCB et stress oxydant. Cependant l'interprétation est rendue délicate du fait des nombreux facteurs confondants et de la co-exposition des populations à d'autres composés présents dans l'environnement. D'un point de vue expérimental, les propriétés pro-oxydantes de ces polluants ont été décrites dans de nombreux travaux *in vitro* et *in vivo*, que nous résumons dans cette revue. Le Cd peut déplacer l'équilibre rédox suite à sa liaison avec des molécules biologiques notamment celles portant un groupement thiol et certains antioxydants. Une exposition au PCB entraîne l'induction du cytochrome P450 dont le cycle catalytique génère des radicaux superoxydes réactifs. Les PCB offrent une complexité supérieure puisque les différentes formes de PCB ont des capacités différentes à induire du stress oxydant. Ainsi, dans le cas de ce type de polluant, le choix des espèces de PCB présentes dans le modèle est déterminant.

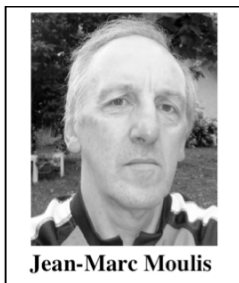
Bien que les mécanismes qui entraînent le stress oxydant sont différents entre PCB et Cd des conclusions similaires ressortent de l'analyse de la littérature sur les modèles animaux et cellulaires. La grande majorité de ces études établissant un lien entre ces polluants et le stress oxydant est établie à hautes concentrations et entraîne de la mort cellulaire. L'impact de doses plus faibles de polluants et l'identification des voies les plus sensibles sont bien moins connus. L'implication du stress oxydant dans de telles conditions d'exposition semble plus ambiguë. En effet, dans le cas d'exposition constante à de faibles doses, les cellules et les tissus paraissent en mesure de développer des mécanismes d'adaptation pour faire face au challenge oxydatif, sans perturber leur fonctionnement. Cependant, le polluant peut s'accumuler dans l'organisme jusqu'à une situation où la concentration locale devient importante et entraîne des dommages

cellulaires oxydatifs. Dans le cas du diabète, et avec les données disponibles, il semble que la défense anti oxydante soit suffisante à des niveaux faibles de Cd, autour de la dose hebdomadaire admissible. Le stress oxydant semble apparaître bien plus tard lorsque le Cd s'est considérablement accumulé dans les organes cibles. Il serait donc, dans ce cas, un phénomène concomitant et pas nécessairement un mécanisme précoce de toxicité.

L'écriture de cette revue et les pistes de réflexion abordées ont servi de base pour le design des travaux dans le cadre de ma thèse. En effet, nous avons mis en avant la nécessité de se concentrer sur des expositions à faibles doses de polluants et de revoir les modèles utilisés afin de pouvoir observer les effets les plus sensibles. De plus, notre équipe avait déjà l'expérience d'un modèle d'exposition environnementale pertinent puisqu'elle avait précédemment montré que l'exposition de rats à une matrice alimentaire contaminée avec un mélange complexe de PCBs (lait de chèvre contaminé via l'environnement) à une dose faible équivalente à deux fois la dose journalière admissible entraînait une augmentation de la peroxydation lipidique dans le sang et des altérations de la fonction mitochondriale dans le cerveau et le foie de rats exposés aux PCB, (Ounnas et al. 2016). Ces résultats renforcent donc l'idée qu'il est aujourd'hui primordial de prendre en compte les effets obtenus avec de faibles doses de polluants, seuls ou en mélange, dans l'évaluation du risque et la détermination des VTR.

Chronic Exposure to Low-level Cadmium in Diabetes: Role of Oxidative Stress and Comparison with Polychlorinated Biphenyls

Adeline Jacquet^{1,2,3}, Fayçal Ounnas^{1,2,3}, Marine Lénon^{1,2,3}, Josiane Arnaud^{1,2,3,4}, Christine Demeilliers^{1,2,3} and Jean-Marc Moulis^{1,2,3,5,*}



Jean-Marc Moulis

¹Université Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, Grenoble, France; ²Environmental and Systems Biology, Grenoble, France; ³Inserm, U1055, Grenoble, France; ⁴CHU Grenoble, Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, Grenoble, France; ⁵Institut de Recherches en Sciences et Technologies du Vivant, CEA-Grenoble; France



Adeline Jacquet

Abstract: Among the most important physiological functions, maintenance of the oxidation reduction equilibrium in cells stands out as a major homeostatic event. Many environmental contaminants efficiently trap cellular reducing compounds, but the actual importance of this mode of toxicity is far from being precisely known. This state-

ment applies to cases of slowly developing chronic diseases, such as neuro-degenerations, diabetes, and many others. The involvement of oxidative challenge in diabetes is considered in connection with chronic dietary exposure to low-level concentrations of cadmium. Comparison is made with polychlorobiphenyl molecules (PCB): they are structurally unrelated to cadmium, they preferentially distribute into different organs than cadmium, and they follow different metabolic pathways. Yet, they have also pro-oxidative properties, and they are associated with diabetes. Since neither cadmium nor PCB is a direct oxidant, they both follow indirect pathways to shift the redox equilibrium. Thus, a difference must be made between the adaptable response of the organism, *i.e.* the *anti-oxidant response*, and the irreversible damage generated by oxidizing species, *i.e.* *oxidative damage*, when exposure occurs at low concentrations. The approximate border between high and low levels of exposure is estimated in this review from the available relevant data, and the strengths and weaknesses of experimental models are delineated. Eventually, chronic low level exposure to these contaminants sparks cellular responses setting ground for dysfunction and disease, such as diabetes: oxidative damage is an accompanying phenomenon and not necessarily an early mechanism of toxicity.

Keywords: Cadmium, diabetes, insulin, oxidative stress, polychlorinated biphenyl compounds (PCB), low dose, biomarkers, risk assessment.

Received: January 16, 2015

Revised: March 26, 2015

Accepted: May 19, 2015

1. INTRODUCTION AND AIM

The toxicity of environmental or processed cadmium (Cd) to human populations was firmly established in the middle of the twentieth century, by finding the main causative agents of the *itai-itai* disease [1, 2] and of occupationally induced renal failure, lung, nasopharyngeal, and possibly prostate cancers [3]. Since then, Cd has been associated with a large variety of conditions including proteinuria and renal Fanconi syndrome, several types of cancer, osteoporosis and osteomalacia, cardiovascular diseases, inflammation, and diabetes [4]. Epidemiological studies continue to suggest updates of this already long list with other human conditions such as depression [5] or atopic dermatitis [6].

In all the above conditions, the mechanism of action of cadmium is rarely unequivocally elucidated. Instead of lacking potential targets, the etiology of Cd-induced diseases

suffers from the abundance of proposed molecular dysfunctions. At the biochemical level, the main characteristics of the cadmium ion (Cd^{2+}) are its large propensity to interact with highly polarizable, large anions, such as biomolecules containing thiolate groups, as well as its steric resemblance to calcium allowing cadmium to interfere with some of the many physiological functions of calcium [7]. These and a few other biochemical properties underlie the traffic of cadmium from its external sources [8]. Many organs accumulate Cd to various degrees, and an impressive number of metabolic and regulatory functions may be impacted upon poisoning.

A majority of the above knowledge has been obtained with exceptionally highly exposed populations, which continue to be locally exposed, *e.g.* [9], and with heavily treated laboratory animals, as gathered in [10, 11] for instance. Now that the noxious biological properties of Cd have been delineated and that stringent regulations have been implemented in most countries, cases of acute heavy exposure have become exceptional. However, the persistent presence

*Address correspondence to this author at the LBFA-INSERM U1055, University Grenoble Alpes, CS 40700, F-38058 Grenoble Cedex 9, France; Tel: +33 (0)4 76 63 55 36; E-mail: jean-marc.moulis@cea.fr

of readily mobilized Cd in the environment and its replenishment *via* various mining activities maintain a latent and diffuse concentration to which human populations are chronically exposed. Another major source of exposure is smoking, which will not be further discussed here as it is a deliberate act which differs from the unconscious exposure of non-smoking populations.

Thus, the main contemporary topic in Cd toxicology is that of low level chronic exposure leading to chronic, often late onset, diseases. At this point it is worth to properly define words that will be used throughout this review. 'Chronic' should be understood in its usual meaning, namely continuous long-lasting, up to life-long, exposure. 'Low level' is meant to represent a concentration of the pollutant which is, as much as possible, close to or below the currently recommended amounts to which populations should not be exposed. In combination, chronic low level equates environmental conditions, the impact of which on human health remains debated.

The biological effects of Cd are very often associated by authors to the redox imbalance the metal ions induce: indeed, the scavenging of thiol-containing biomolecules by Cd²⁺ weakens the ability of cells and organs to equilibrate the oxidizing molecules originating from the environment or generated by metabolism for proper functioning. Yet, animals and other living species have some endogenous capacity to counteract oxidative stress, even in the face of challenging conditions such as those enforced by the presence of Cd. Thus salient questions are to know under which precise conditions low level Cd exposure jeopardizes human health, and whether oxidative stress plays a significant role in the process. The outcome of such analysis should establish whether present regulations are up to the purpose they target, namely protection of the most exposed populations.

Therefore, the present review aims at critically analyzing the available literature on the biological effects, including oxidative stress, of ingested Cd at low doses. Particular attention will be paid to the suitability of the implemented model systems. Outlining the remaining questions to fill the gap between epidemiological results at the population levels and the molecular pathways that are most likely to be relevant at the cellular one is the objective. The impact of two different types of contaminants, Cd and polychlorinated biphenyl compounds (PCB. Note: even though it is common practice, plural forms of abbreviations are not used herein), on insulin production and insulin resistance will be considered. Proper risk assessment must be rooted in observations made under relevant conditions, thus emphasis will be put on quantitative studies.

2. HEALTH EFFECTS OF CADMIUM AND PCB

Treating two contaminants as different as Cd and PCB together or in parallel may seem odd, but it should be kept in mind that exposure to mixtures of contaminants is usually the rule, and these two classes of chemicals have been observed together in polluted areas. Health effects of Cd are regularly reviewed [12-15]. In the general population, the main Cd sources are food and smoking. Occupational Cd exposure has been significant in the manufacturing of batteries, solar cells, plastic stabilizers, coating, painting pigments

and welding, and it remains so in a number of activities, including recycling of batteries and plastics, waste collection and incineration [16]. Inhalation of Cd containing particles has been associated with pulmonary ailments, including cancer, which led to the classification of Cd compounds as carcinogens [17]. Involvement of Cd in other neoplasms, such as kidney, breast, and prostate cancers for instance, is largely suspected. Besides cancers, exposure to Cd compounds has been associated with a large variety of diseases (see 1.) which makes Cd one of the most hazardous metals of industrial interest causing health problems to many populations worldwide, despite the ban of several technological uses of Cd.

PCB are synthetic compounds sharing two joined benzene aromatic rings substituted with a variable number of chlorides, from 1 to 10. They are used in a wide range of applications, such as insulators in transformers, coolants, or stabilizers in the plastic industry. The chemical arrangement of PCB affords a combination of 209 possibilities called congeners. They are divided in two classes, one with coplanar rings and resembling dioxins and the other with non-coplanar rings. The dioxin-like PCB (DL-PCB) with 12 congeners, such as 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126), have affinity for the aryl hydrocarbon receptor, but both categories are toxic. Diet (especially contaminated fatty food) is the main route for human exposure [18]. PCB cause adverse effects on health, including neurological, neuroendocrine, immunological and carcinogenic ones.

2.1. Cadmium, Insulin Resistance and Diabetes

Diabetes is a major public health problem worldwide. Reported risk factors include obesity, lack of physical activity, unbalanced diet, genetic factors, and also environmental factors such as exposure to pollutants. Understanding the role of environmental toxic compounds in the increasing incidence of insulin resistance and diabetes worldwide is an emerging issue in environmental health.

The link between human exposure to Cd and development and severity of diabetes has been explored in several studies (reviewed in [19-21]), but the issue remains controversial. Recently, the Cd concentration was found to be more elevated in the scalp hair, blood, and urine of diabetes mellitus patients than in non-diabetic Pakistani and Irish men [22]. Two cross-sectional studies from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) suggested that a link exists between urinary Cd levels and the prevalence of pre-diabetes and diabetes. The first one [23] was based on 8,722 US citizens older than 40. In the second one [24], a complex non-linear association was established between urinary Cd concentration adjusted to creatinine and pre-diabetic states in 2,398 adults. The association appears stronger for older (over 60 years of age) adults suggesting a Cd-threshold above which deleterious effects appear. However, evaluation of Cd exposure and diagnosis of the (pre)diabetic condition were carried out at the same time, which forbids establishing a causal relationship between both variables. Studies with similar outcomes and limitations are available, *e.g.* [25]. In the long-term (26 years) follow up of Japanese subjects living in Cd polluted areas, the hazard ratios for mortality and for occurrence of diabetes were ele-

vated compared to subjects living in non-polluted areas [26]. This study indicates an association between Cd exposure, renal dysfunction, and occurrence of life-threatening diabetes. In another follow-up survey, which was challenged for recruitment bias and confounding factors [27], prevalence of diabetes increased for highly exposed Thai subjects and this elevated risk remained despite decreased exposure over 5 years [28]. Pancreas dysfunction was suggested for one year-occupationally exposed workers on the basis of the inversed relationship between urinary Cd and serum insulin [29]. In a more targeted cellular study, the Cd content of 10 human islets of Langerhans samples from non-diabetic subjects was measured at a mean value of *ca.* 30 nmol Cd/g protein, in the large 7-72 range [30]. The same study demonstrated the ability of murine pancreatic β -cells, either primary or the MIN6 model, to uptake and to accumulate Cd (CdCl_2) over 3 days. Accumulation from 1 μM Cd in 2 days decreased glucose stimulated insulin secretion (GSIS) by MIN6 cells, whereas the same treatment with 0.1 μM was sufficient to induce a similar effect on isolated murine islets. Thus, the impact of Cd on the endocrine pancreatic function and its contribution to the onset of diabetes seem important topics to consider.

In a study conducted with 4585 Swedish men and women aged 46 to 67 without history of diabetes, significant association was found neither between Cd exposure, estimated by the Cd level in erythrocytes, and development of diabetes 15 years later, nor with glucose and insulin levels at baseline [31]. Another Swedish prospective study on 64 year old women followed for 5.4 years [32] reached the same conclusion. Others studies showed no association between high Cd exposure and diabetes [33, 34]. A synopsis of the available studies examining the occurrence of diabetes as a function of markers of Cd exposure is presented in Table 1. A recent meta-analysis concluded that evidence for association between blood and urine Cd levels and diabetes in humans is not conclusive [35].

A major problem to overcome in studies trying to assess the relationship between oral Cd exposure and diabetes is that the latter disease impacts the renal function (see end of next paragraph), thus potentially confounding the interpretation of the association between urinary Cd and diabetic symptoms [20].

2.2. Glucose Homeostasis in Animals in the Presence of Cadmium

Several animal studies have been carried out to investigate the effects of chronic Cd exposure and their involvement in the development of diabetes. The study design, *i.e.* the Cd concentration, its route of administration, and the duration of exposure, is a key parameter when studying chronic toxic effects.

An early study in which 70 doses of 250 or 500 μg cadmium acetate were injected to female rats for 140 days indicated that the animals receiving the highest dose were lighter, had lower concentrations of plasma insulin, and excreted more glucose in the urine [36]. GSIS of perfused pancreas from the same group was inhibited by more than 80%, but intra-peritoneal injections are not a natural way of exposure. Thus, in the following, focus will be put on oral exposure of animals for prolonged periods, which seems to be a

more realistic approach for a chronic disease like diabetes. In weaning rats receiving cadmium chloride by intubation at 0.1 or 1 mg/kg per day for 45 days [37], the highest concentration interfered with weight gain. Both treatments dose-dependently elevated blood glucose and serum urea, decreased hepatic glycogen, but left serum insulin unchanged, in contrast to the results of the previous study [36]. Gluconeogenic enzymes and adenylate cyclase activities were higher in the Cd groups, and the GSIS was strongly impaired [37]. A similar work with young adult rats fed a Cd contaminated (0.4 mg Cd/kg) food showed slightly increased glycemia and proteinuria after a one-month treatment: these features reversed after 3 months [38]. Urinary creatinine remained high at the end of the experiment, thus suggesting kidney damage [38]. A recently reported study measured the serum parameters after exposure of initially 1 month old rats to 2.5 mg CdCl_2 , corresponding to a daily dose of approximately 300 μg Cd/kg body mass (bm) on average, in drinking water for a year [39]. Glucose, cholesterol and triacyl glycerol did not change, but total circulating proteins in males slightly decreased. The antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione (GSH) peroxidase decreased, but, surprisingly, the total antioxidant capacity increased in all treated rats. A higher daily exposure of *ca.* 1 mg $(\text{kg bm})^{-1}$ for 6 weeks showed increased glycemia and insulinemia associated with a sharp (-60%) decrease of the insulin binding capacity of adipocytes [40]. Considering confluent 3T3-L1 fibroblasts before and after differentiation into adipocytes, the sub-lethal concentration of 5 μM of CdSO_4 for these cellular layers applied for 18 hours stimulated glucose uptake by increasing the apparent kinetic efficiency (k_{cat}/K_m) of the involved transporter [41]. This increase was additive to the stimulatory effect of insulin, but only in GLUT4-producing adipocytes [41]. Increased lipogenesis is a likely consequence of the changes in the rate of glucose metabolism [42] although details would need to be revisited.

Overall, ingested Cd may interfere with glucose metabolism at different levels, including insulin production and glucose uptake, but the range of available data does not provide a clear-cut description of the series of events that may be involved in cases of chronic low level exposure of animals to dietary Cd.

A further confounding observation in these investigations comes from the possible potentiation by Cd exposure of already present diabetogenic effects. Streptozotocin-induced diabetic rats, for which the drug destroyed the pancreatic β -cells, accumulated more Cd from drinking water than non-diabetic ones and displayed proteinuria at Cd doses that appeared safe for non-diabetic rats [43]. Together with a previous similar study [44], these observations suggest that Cd exposure enhances nephrotoxicity in diabetic animals. This justifies exclusion of diabetic patients in epidemiological studies considering the direct health effects, particularly on the kidneys, of Cd exposure.

2.3. Epidemiological Studies Assessing the Impact of Exposure to PCB on Incidence of Diabetes

A wealth of studies has linked diabetes to exposure to persistent organic pollutants (POP) in general, and PCB in particular.

Table 1. Association between cadmium exposure and diabetes or glucose intolerance in humans.

Studied Population and Study Design	Bio and Clinical Markers	Main Results	Reference
Associations			
Cross sectional 8722 American people aged > 40 years (General population)	Cd in urine Impaired fasting glucose (> 6.1 mmol/l) and diagnosed diabetes	Association between urinary Cd levels and fasting blood glucose levels or diagnosed type 2 diabetes	[23]
238 Pakistanis (males and females) suffering from type-2 diabetes mellitus, aged 31-60 year old vs. 196 age and sex matched non-diabetics	Cd in whole blood, urine, and scalp hair	Increased hair, blood and urinary Cd in diabetic patients	[260]
145 Irish and Pakistanis (males and females) type 2 diabetes mellitus, aged 30 - 50 year old vs. 177 age and country matched non-diabetic subjects	Cd in hair	Increased hair Cd in diabetic patients	[22]
126 Torrey Strait Australians above 15 yrs of age exposed to Cd by consuming contaminated seafood	Cd in urine fasting blood glucose glucose tolerance test	Potential positive associations between Cd and diabetes	[25]
76 Pakistanis insulin-dependent diabetic mothers, aged 30-40 and their newly born infants vs. 68 matched non-diabetic mothers and their infants	Cd in blood, urine and hair	Increased Cd in all biological samples of diabetic mothers and their infants	[261]
7529 Japanese inhabitants living in a Cd-polluted area vs. 2149 controls Longitudinal study follow up of 26 years	Urinary glucose	Diabetes mortality in women exposed to Cd and presenting glucosuria was higher than in controls	[26]
436 Thai people with high (≥ 5 $\mu\text{g/g}$ creatinine) urinary Cd levels Longitudinal follow up of 5 years	Cd in urine Treated Diabetes or high fasting plasma glucose (> 7 mmol/l) on 2 occasions.	Increased prevalence of diabetes during follow-up despite decreased urinary Cd	[28]
2398 American non diabetic people aged ≥ 40 years (general population) Patients with nephropathy and overt diabetes excluded	Cd in urine Prediabetes = [5.7-6.5%] glycated hemoglobin or [5.6-7.0 mmol/L] fasting plasma glucose or [7.8-11.1 mmol/L] plasma glucose at end of a 2h-oral glucose (75 g) tolerance test HOMA-IR and HOMA- β	Significant non-linear and complex relationship between urinary Cd and prediabetic markers. Linear association for adults > 60 years	[24]
No association			
2595 Swedish women aged 64 years (general population) Longitudinal follow up of 5.4 years	Cd in blood and urine Oral glucose tolerance tests Glycated hemoglobin	Cd at baseline was not associated (ANOVA) with any indicator of diabetes, glucose intolerance, or β -cell dysfunction	[32]
4585 Swedes without history of diabetes, aged 46 - 67 years Longitudinal follow-up of mean 15 years	Cd in red blood cells Incident cases of diabetes Glucose and insulin in blood	No association between blood Cd and any of the measured markers.	[31]
3184 Korean people aged > 30 years (general population)	Cd in blood HOMA-IR and HOMA- β	No significant association between Cd and diabetes (logistic regression)	[33]
5273 Thai inhabitants living in Cd-polluted area, aged > 35 years	Cd in urine Treated Diabetes or high fasting plasma glucose (> 7 mmol/l) on 2 occasions.	No significant association between urinary Cd and diabetes	[34]

(Table 1) contd....

Studied Population and Study Design	Bio and Clinical Markers	Main Results	Reference
Potentialiation by diabetes			
820 Swedish women with no known history of Cd contamination, aged 53 – 64 year old	Cd in blood and urine Diabetes defined as positive history, or nonfasting glucose > 8 mmol/L followed by a positive result in the oral glucose-tolerance test	Diabetes-induced kidney dysfunction potentiated by Cd (Multiple linear regression model)	[262]
4856 Swedish women aged 64 years (general population)	Cd in blood and urine Oral glucose tolerance tests	Significant association between high blood Cd (>0.56µg/L) and diabetes nephropathy (multivariable models) Cd potentiated diabetes-induced effects on kidney	[263]
182 Torrey Strait Australians aged 18–85 years Longitudinal follow-up of 7 years	Cd in urine and albumin/creatinine ratio diagnosed diabetes or fasting blood glucose ≥ 6.8 mmol/l + positive glucose tolerance test	Association between urinary Cd and albuminuria potentiated by diabetes	[264]

HOMA-IR and HOMA-β: homeostatic model assessment- insulin resistance and β cell function.

A critical review [45] identified recent (2005-2010) non-occupational studies associating persistent organic pollutants (POP) and diabetes. One of the strongest positive associations is with total PCB or PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), which is one of the major contributors to total PCB exposure used as an indicator. A meta-analysis [46], which included 23 original studies between 2003 and 2013, supported the conclusion [45] that exposure to PCB is strongly associated with an increased risk of incidence of type 2 diabetes, with Odd Ratio (OR) of 2.14; 95% CI, 1.53-2.99. Different subgroup analyses (by exposure levels, design of the studies, *etc.*) all resulted in positive associations. Similar conclusions for POP in general, including PCB, were reached in recent reports [46-49] as summarized in Table 2. In addition, the PCB concentration in serum was inversely correlated with serum insulin but not with plasma glucose in children [50], and a positive association between serum PCB and insulin resistance was found [49].

In the data from the NHANES 1999-2004 cohort, blood dioxin and dioxin-like PCB were found to be associated with diabetes complications such as nephropathy [48]. Among PCB, this association applied to PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), 169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl), 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), and 156 (2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl), but not to other PCB such as PCB 167 (2,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), PCB 157 (2,3,3',4,4',5'-hexachlorobiphenyl) and PCB 105 (2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl) for unclear reasons. However, as mentioned above for Cd, diabetic nephropathy cannot be unambiguously related to PCB exposure as it may be either a cause or a consequence.

Collectively, these data, essentially based on epidemiological studies, strongly associate exposure to PCB and diabetes [51], but they cannot establish a causal link between them, and they should be backed by complementary evidence to understand the involved mechanisms

2.4. Limitations of Epidemiological Studies with PCB

Assessing patterns of association for individual PCB across studies is particularly challenging. The difference between “dioxin-like” (DL) or “non dioxin-like” (NDL) is not sufficient because both categories are associated to diabetes. The CARDIA cohort results [52] showed strong diabetogenic effects at low-dose of phenobarbital-type inducers and weak or noninducers of cytochrome P450 (CYP 450), whereas PCB belonging to the group of mixed-type CYP 450 inducers did not show any association [53]. The same data indicated that PCB belonging to group 1B (estrogenic, weak phenobarbital-type inducers, persistent) and group 2B (anti-estrogenic, immunotoxic, dioxin-like, persistent) showed the strongest low-dose effects, whereas no significant association with diabetes was found for group 2A (anti-estrogenic, immunotoxic, dioxin-like, but moderately persistent) congeners [54]. Based on these results, it seems that the most important property of PCB relevant for association with type 2 diabetes is persistency, rather than estrogenic or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD)-like activity. The importance of the number of chloride on the PCB molecule is debated [49, 53]. A key parameter is whether exposure is estimated by serum PCB with reference to total lipids [53] or PCB in visceral and sub-cutaneous adipose tissue [49]. The latter estimation of cumulative internal exposure is a good indicator of chronic exposure to environmental pollutants [55], but it is not always accessible. In contrast, measurements in serum are more appropriate to probe the current individual status, including mobilization of stored PCB in fatty tissues, rather than chronic exposure [56, 57]. But care should be exercised for the reference to total lipids since this measurement is not standardized in different laboratories and studies.

The main confounding parameter in studying the PCB-diabetes relationship in human populations is obesity. PCB have an obesogenic effect [47, 58] which is also enhanced by the consumption of fatty food, making the two variables (PCB exposure and fat intake) difficult to dissociate. Moreo-

Table 2. Association between PCB exposure and diabetes or glucose intolerance in humans.

Population	Monitored PCB in Biological Specimen	Exposure Values	Associations	Reference
44 normal weight and 151 obese individuals with or without bariatric surgery	28 PCB, mainly ND-L-PCB 138, 153, 180 (PCB _i) in serum	Total PCB in serum = 170 - range [14.3–2,189] ng/g lipid	Total serum PCB lower in obese subjects. Negative association with HOMA- β	[47]
NHANES 1999-2004	8 DL-PCB in Non fasting blood samples	Elevated concentrations above the 75 th percentile (214.54 fg/g for PCB 126) or above the detection limit	Diabetes is associated with PCB118 and diabetic nephropathy with 4 DL-PCB	[48]
771 healthy Danish children aged 8-10 years	Total PCB estimated from the sum of 3 (138 + 156 + 180) considered as half of the total in plasma	Total PCB in plasma 0.19 – range [0.12 - 0.31] μ g/g lipid	Inversed association between PCB and serum insulin, with consequent HOMA-IR and HOMA- β decrease, but no association with plasma glucose	[50]
50 patients with or without diabetes	22 PCB congeners in visceral and subcutaneous adipose tissue	Variable with the congener but 5-10 times higher in visceral than in subcutaneous tissue	Association between diabetes or insulin resistance and PCB with 5 or less chlorides	[49]

HOMA-IR and HOMA- β : homeostatic model assessment- insulin resistance and β cell function.

ver, adipose tissue serves as a reservoir of POP, thereby influencing their circulating levels, but elevated fat can also protect important tissues in diabetes, such as the pancreas and muscles. This justifies introducing the Body Mass Index (BMI) as a covariate [48].

Another confounding factor is the potential synergism of mixtures of PCB and other pollutants such as metals and pesticides. This cocktail effect may occur with low doses of pollutants that would not individually exert any effect and for which no association with diabetes is separately demonstrated.

From the above summarized studies, the links between exposure to Cd or PCB and diabetes are strongly suspected, but the available evidence needs to be more thoroughly examined, with particular attention to confounding factors and methodological limitations.

3. COMPARATIVE SKETCH OF THE TRAFFIC OF CADMIUM AND PCB IN THE HUMAN BODY

In order to evaluate the most likely locations of the toxic stress induced by pollutants, it is useful to summarize how these compounds follow absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME: Fig. 2).

3.1. Intestinal Absorption

Cd salts and PCB are both present in contaminated food, but their intestinal absorption is quite different, due in part to their different physico-chemical properties. Even though Cd²⁺ cations are likely bound to molecules present in the acidic gastric chyme, they are taken up in the duodenum. Only a fraction of ingested Cd (of the order of 10% at most, a value depending on the nutritional status of the individual [59]) is absorbed either by active transport of the cation, or by endocytosis or possibly transcytosis of bound Cd [60, 61].

In contrast hydrophobic PCB are associated with lipids which become entrapped in bile acid micelles. PCB diffuse passively through the apical membrane of enterocytes in the ileum [62], thus polarity ($\log K_{ow}$) is the main predictive parameter for efficiency [63-65]. The absorption rates are high (up to 90%) between $\log K_{ow}$ 5.5 and 6.5 and decrease down to 30% for compounds with $\log K_{ow} > 8$ [63-65]. The rates of PCB transfer from maternal blood to placenta (mean 64%) are also correlated negatively with the size of the molecule [66]. PCB end up in the systemic and lymphatic circulations bound to lipoproteins or plasmatic proteins such as albumin [67-69]. Overall, the fraction of ingested PCB being absorbed is significantly larger (usually more than 30%) than that of Cd.

3.2. Metabolism and Excretion: Biological Half-Lives

After absorption, Cd²⁺ ions and PCB are dealt with by the liver after delivery through the portal vein. Yet, what happens to each contaminant in the liver differs. As a simple ion, Cd²⁺, strictly speaking, cannot be transformed, and there is no actual cadmium metabolism. But the molecules coordinating the Cd²⁺ ions (the ligands) can generally bind other cations, such as those of zinc or calcium, their mobilization as Cd²⁺ ligands can interfere with normal metabolism, and they are involved in dynamic exchanges depending on their concentration and the location. One major class of Cd-binding proteins is metallothionein (MT): most isoforms are strongly up-regulated by Cd²⁺ ions, and they provide Cd buffering capacity to different tissues and organs. Another important Cd ligand is the abundant intracellular tripeptide GSH.

In contrast, PCB are subject to pre-systemic metabolism, called the *first pass effect*, which mainly, but not only, occurs in the liver [70, 71]. PCB are first hydroxylated, or substituted with other polar groups (-NH₂, -SH, -COOH), by CYP

450 enzymes [72], and some of the modified PCB are retained in the blood and accumulate in organs, such as the lungs, or in the fetus. Other hydroxylated PCB can be further metabolized in Phase II reactions [73, 74], in which they are conjugated to moieties bearing glucuronic acid or sulfate by the action of transferases (e.g. glucuronyl *S*-transferase). The kinetics of PCB transformations and conjugations vary, with the number and position of chlorine atoms contributing among different parameters.

Conjugated PCB are then excreted mainly in the bile through the entero-hepatic circulation [75]. A smaller fraction is eliminated in the urine in the case of chloride-poor congeners. The elimination rates of PCB vary largely depending on the structure and the rate of modification of absorbed PCB, but the process is usually slow, which explains their long biological half-lives of several years, often longer than 10 years.

Biliary excretion of PCB metabolites expose them to hydrolysis by the gut microbiota which interferes with detoxification [76]. In the case of Cd, biliary excretion mainly occurs as the GSH complex but this process is not very active. In the circulation, a significant fraction of Cd is bound to MT which is efficiently taken up by renal tubular cells [77]. The Cd-MT complex is degraded in the lysosomes and Cd accumulates in the kidneys. Excretion in urine increases following the Cd amount accumulated in these cells, by a not-completely elucidated mechanism but which likely involves release from damaged cells.

3.3. Distribution

Congruent with the main symptom of the *itai-itai* disease -renal damage- Cd ends up in kidneys after sustained Cd uptake, but other organs, such as muscles [78], pancreas [30], lungs, and bones, to name but a few in addition to liver, do experience increased Cd accumulation upon prolonged exposure.

The distribution of PCB in the body depends on the particular congener, on the dose, and on the lipid content of the organs. The large blood perfusion of the liver and the relatively large volume of muscle explain the efficient targeting of PCB to these organs [79]. Also, measuring PCB concentrations in human tissues [80] gives variable values per mass unit, but almost constant ones when referred to the lipid content [81]. Human physiological parameters can modulate the concentration of PCB in tissues: the age and the BMI of the individual are important contributors [82]. PCB are distributed in the vascular circulation bound to lipoproteins, serum albumin, and chylomicron [68, 83]. Chronic exposure to PCB obeys biphasic kinetics [84], with first accumulation in liver and fat tissues, then constant concentration in tissues at steady state when saturation is reached.

A particular case is milk which contains large PCB concentrations due to its high fat content. Nursing infants are thus exposed *via* breast-feeding. Ingested PCB are almost quantitatively absorbed [85, 86], and mean intake at 1, 3 and 6 months of 418, 294 and 165 ng PCB (kg bm^{-1}) per day, respectively [87], has been estimated. These values are to be compared with the levels of PCB in milk which vary from 1 to 150 ng/g lipid in breast milk sampled in European and Asian populations [88-92].

Intravenous infusion of Cd efficiently targets the metal to the mammary gland and more than twice the Cd concentration in plasma is found in milk. Suckling pups proportionally accumulate Cd in the kidneys, but only less than 0.05% of the metal injected to the mother reaches the pups [93].

A recent review based on 30 studies indicated the concentration of any PCB congener is the same in cord blood and in the maternal circulation [94], with wet weight- and lipid-adjusted ratios somewhat higher for hydroxylated PCB than for parent compounds. The relationship between maternal and cord blood Cd concentrations, if any, have not been demonstrated [95], but several studies have correlated maternal or cord blood levels and pregnancy outcome evaluated as newborn's weight, height, or mortality. Although transfer of Cd from mother to fetus is far from being properly understood the placenta may protect the fetus [96].

It is likely that the realistic situation of dietary exposure to mixtures of pollutants alters the above summarized observations monitoring a single component, but the number of studies addressing co-exposure with the possibility of sorting the contribution of each parameter is small.

4. MONITORING TOXICITY: BIOMARKERS

4.1. Clinical Biomarkers of Cadmium Effects

Several analytical procedures have been used for measuring Cd concentrations in biological samples. Over the recent years inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has superseded most other analytical methods. The choice of the suitable analytical method is determined by several factors, including the developments made on specific pieces of equipment, the actual sample matrix and the needed detection limit.

4.1.1. Static Markers Or Markers of Exposure

4.1.1.1. Urinary Cadmium

Urinary Cd is a widespread marker as it can sign exposure to the metal, but it is also most often used to estimate noxious effects. Cd release in urine increases when tubular cells become damaged. With low to moderate chronic exposure, urinary Cd reflects integrated exposure over time and total body burden. In case of renal dysfunction, urine levels reflect recent exposure [97]. Significant renal dysfunction has been observed when urinary Cd levels are higher than 2.4 $\mu\text{g/g}$ creatinine [98]. Despite 24 h-collection is recommended, spot urine is predominantly used. The adult reference interval in non-smokers is set at 0.35 to 0.93 $\mu\text{g/L}$ or 0.28-0.75 $\mu\text{g/g}$ creatinine [99]. A maximum tolerable limit of 0.5 $\mu\text{g Cd/g de creatinine}$ was proposed for occupational exposure [97, 98]. At higher doses, functional indices of nephrotoxicity (see below) are required [97].

To evaluate Cd exposure, most studies considered by evaluation agencies have taken urinary Cd levels as a biomarker. However, with low levels of exposure, any Cd that is filtered at the glomerulus is almost completely reabsorbed by epithelial cells of the proximal tubule, and little or no Cd is excreted in the urine [97, 100]. With chronic exposure, the levels of Cd in the proximal tubule cells continue to increase until a critical threshold concentration. Then, urinary Cd

correlates with Cd body burden and Cd concentration in kidney. Assuming a linear relationship, urinary Cd of 5 µg/g creatinine roughly corresponds to 100 µg/g in the renal cortex [97]. When kidney injury appears, urinary excretion of Cd increases significantly [97, 100].

4.1.1.2. Whole Blood Cadmium

Blood is used as an indicator of recent exposure [97]. Blood Cd concentration reference range is 0.09–1.08 µg/L [101, 102]. The US Occupational Safety and Health Administration (OSHA) proposed a whole blood highest safety level of 5 µg/L.

4.1.1.3. Hair and Fingernail Cadmium

Although hair and nails have been proposed for bio-monitoring Cd [103, 104], the high potential risk of sample contamination does not make them sources as reliable as urine or whole blood.

4.1.2. Functional Markers Or Markers of Effect

4.1.2.1. Markers of Renal Dysfunction

It is highly recommended to determine one or more early markers of renal dysfunction when urinary Cd is higher than 2.4 µg/g creatinine, as a sign of induced progressive and irreversible impairment of tubular function and reduction of glomerular filtration. The most commonly used urinary bio-

markers are indicated in Table 3, with mention of their strengths and limitations. In Cd exposed workers, urine levels greater than 300 µg β2 microglobulin (B2M)/g creatinine indicate possible early kidney disease [105-107]. N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG) is a proximal tubule lysosomal enzyme which is a sensitive, stable, and robust indicator of tubular injury despite its lack of specificity. Urinary retinol binding protein increase precedes urinary NAG elevation and it is more stable than B2M. Urinary α1- macroglobulin is an early sensitive biomarker for proximal tubular dysfunction, but it lacks specificity for Cd injury [106, 107].

Urinary albumin (microalbumin) evaluates mainly the integrity of the glomerulus. It is not an early marker of nephrotoxicity and it corresponds to a pathologic excretion of urinary albumin at levels ranging from 30 to 300 mg/L. However, its excretion is not correlated to urinary Cd [106, 107]. Urinary Cd-binding MT is the most specific low molecular weight protein synthesized in response to Cd. Urinary Cd-MT reflects total Cd body burden and correlates well with urinary Cd levels. However, its kinetics of release is complex and it is not easily measured [108]. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) is a glycoprotein found in the renal proximal tubule epithelial cells, and it is not significantly expressed in normal kidney since it is involved in remodeling. KIM-1 is up-regulated when damage occurs and it is a very early marker of renal dysfunction, preceding Cd-MT and NAG and the onset of clinical symptoms. In humans, urinary KIM-

Table 3. Comparison of nephrotoxicity markers.

Marker	Advantage	Drawback
β2-microglobulin (B2M)	Early marker of tubular dysfunction Routine analysis	Instability Increase with age and physical activity Cannot be used when tubular reabsorptive pathways are saturated
N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG)	Early marker of tubular dysfunction Quite stable Very sensitive Easy to measure	Endogenous urea inhibits activity Lack of specificity (increase in rheumatic arthritis, impaired glucose tolerance, hyperthyroidism)
Microalbumin	Marker of glomerulus function	Lack of specificity Increase with physical activity, hematuria, urinary tract infection and dehydration
Retinol-binding protein (RBP)	Early marker of tubular dysfunction Stable	Cannot be used when tubular reabsorptive pathways are saturated
Cd-binding metallothionein	Specific Sensitive	Not routinely determined Late marker of nephrotoxicity
α1-microglobulin	Early marker of tubular dysfunction. High levels predict severity of tubulopathy. Stable	Cannot be used when tubular reabsorptive pathways are saturated Lack of specificity (increase in liver diseases, HIV, mood disorders)
kidney injury molecule-1 (KIM-1)	Highly sensitive Highly specific Very early marker of renal proximal tubule dysfunction Not expressed in normal kidney Very stable	Not routinely determined

1 and urinary Cd are closely associated [106, 109]. KIM-1 could have important implications regarding the reversibility and potential treatment of Cd induced kidney disease which led the United States Food and Drug Administration and European Medicines Agency to adopt KIM-1 as a standard biomarker for the safety evaluation of novel drug candidates in animals [107, 110].

The characteristics of the nephrotoxic markers presented in Table 3 have not yet enabled agreement for the selection of one, or a subset, of them, particularly for populations exposed at low Cd concentrations [111].

4.1.2.2. Biological Bone Turnover Markers

Bone turnover can be evaluated in different ways. Four markers are now commonly used in current clinical practice (Table 4). Their determination in serum or urine estimates the rate of bone remodeling or turnover. Despite discrepant observations, some studies have reported an increase in both formation (bone alkaline phosphatase) and resorption (deoxypyridinoline) biomarkers in populations exposed to Cd [112-115]. Urinary Cd is more likely associated with bone resorption than with bone formation markers [112, 114, 115]. However, physiological and pathological factors not related to bone turnover may affect the results (Table 4), and significant inter-immunoassays differences make the comparison of results obtained in different laboratories rather difficult [116]. These drawbacks may explain the discrepancies between studies.

4.1.2.3. Bone Mineral Density

Negative association has been reported between bone mineral density and Cd exposure [112, 117, 118]. The most widely validated technique to assess bone mineral density is dual energy X-ray absorptiometry. The measure can be performed at femoral neck, lumbar spine or forearm. The international reference standard for the description of osteoporosis is a femoral neck T-score, which refers to a 20-29 year old population, of -2.5 standard deviations or lower. Osteopenia is defined as a T-score between -1.0 and -2.5 standard deviations [119].

4.2. PCB Biomarkers

In the general population, direct measurements of PCB concentrations in body fluids are usually used as biomarkers of human exposure. Thus, PCB levels in plasma, in serum, and in breast milk are monitored [120-122]. For practical and economic reasons, seven PCB congeners (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) and PCB metabolites are analyzed to assess environmental exposure, but highly chlorinated PCB are the most reliable biomarkers of exposure due to their resistance to bio-transformation [121, 123].

PCB are inducers of CYP 450 enzymes including in immune cells [124], skin [125], and semen [126]. CYP 450 gene transcript levels and enzyme activities induced by PCB were used as sensitive biomarkers in both animals and humans [127, 128]. The liver has been extensively used in animal models to investigate the shape of the dose-response curve of PCB. The reliability of CYP 450 as biomarker is limited since it is influenced by other agonistic contaminants such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins. Furthermore, large inter-individuals and inter-species variability in constitutive and in inducible CYP 450 have been reported [129, 130]. CYP 450 induction seems to be different between DL- and ND-PCB species [131-133]. The degree of chlorination was found to be positively correlated with the induction of CYP2B1 and CYP3A1 [134]. Because of these limitations, newer potential and more global biomarkers of PCB exposure have appeared, including the complete protein profile by proteomics methods [131], the vitamins [132, 135] or thyroid hormones levels [136], and lymphocyte phenotype and immunoglobulins [137]. However, these methods are still expensive and they may lack sensitivity and specificity at low doses of PCB exposure.

5. COMPARATIVE SKETCH OF THE CELLULAR EFFECTS OF CADMIUM AND PCB RELEVANT TO DIABETES

5.1. Cellular Cadmium in the Context of Diabetes

The cellular and molecular targets of Cd can be counted by the hundreds and they will not be listed here, as the topic is regularly reviewed, e.g. [138-145]. Only data of relevance for diabetes are considered.

Table 4. Comparison of bone turnover markers.

Marker	Advantage	Drawback
Serum bone-specific alkaline phosphatase (s-BALP)	Hardly influenced by circadian rhythm. Not influenced by kidney function	Cross-reactivity with liver phosphatase alkaline isoform.
Serum procollagen type I N-terminal propeptide (s-PINP)	Weakly influenced by circadian rhythm. Reference standard for bone formation in osteoporosis according to US National Bone Health Alliance	Available assays recognize trimer alone (intact PINP), or trimer plus monomer (total PINP).
Urine N-terminal telopeptide of type I collagen (u-NTX)		Needs to be corrected for urinary creatinine. Influenced by circadian rhythm.
Serum C-terminal telopeptide of type I collagen (s-βCTX)	Reference standard for bone resorption in osteoporosis according to US National Bone Health alliance	Very dependent on time of day and food (must be collected after an overnight fast) Influenced by renal and liver functions.

As mentioned above (see 2.1.) a causative link between Cd exposure and the onset of diabetes was suspected long ago. For chronic low level exposure to Cd the most relevant cell types for diabetes are the pancreatic β -cells and hepatocytes, muscle cells, and adipocytes. The former secrete insulin in response to circulating glucose, whereas the latter withdraw glucose in response to insulin signaling. Other cell types, such as those of the immune system, may also play a less direct role by producing cytokines which interfere with insulin functions [146].

The uptake of Cd by β -cells [30, 147] has been evidenced (Fig. 1), but its impact on GSIS is complex with apparent stimulation at low concentrations and inhibition at higher ones. The potential targets of Cd in β -cells are illustrated in (Fig. 1). The increase of intracellular calcium signals insulin secretion, and whether Cd impacts this step of the process is not clear [147, 148]. Another upstream step that may be perturbed by the presence of Cd is the ability of mitochondria to increase ATP production upon increased glucose uptake and glycolysis, resulting in blockade of potassium efflux and membrane depolarization. Cd penetrates into mitochondria [81] and cellular bioenergetics is altered [149]. The link between mitochondrial dysfunction and diabetes is exemplified in the condition known as *maternally inherited diabetes and deafness* [150]. It is not completely clear whether the main Cd effect on mitochondrial functions is direct by inhibition of the respiratory chain [151], by induction of the permeability transition [152, 153], or involves production of reactive species due to the presence of Cd (see 7.3). Other potential mechanisms may be related to signaling [154] and to impairment of energy sensing [155].

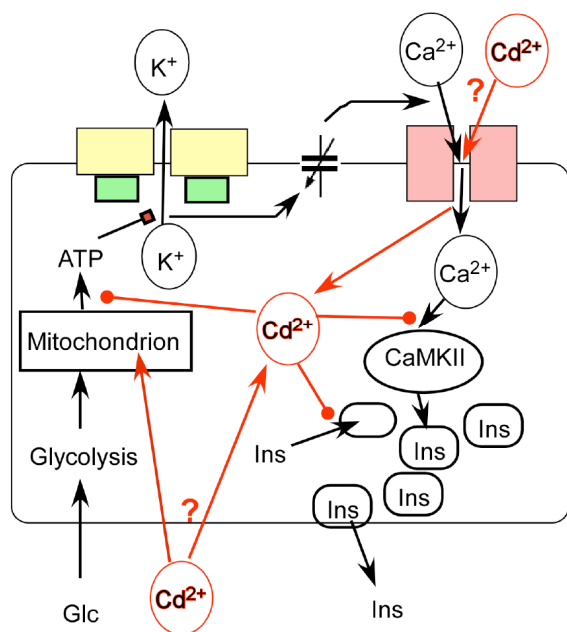


Fig. (1). Insulin secretion by β -cells and possible perturbations by cadmium. A schematic β -cell is represented with the main steps involved in insulin (Ins) secretion by granules exocytosis (lower right) starting with increased glucose (Glc, lower left). Events postulated to involve Cd²⁺ are in red, with traffic represented by arrows, and action on specific pathways and reactions by dot-ended lines. Other details are in the text.

Rats fed a zinc (Zn)-deficient diet had decreased pancreatic Zn and serum insulin levels, and increased glucose intolerance. Reciprocally, Zn-replenishment, and increased MT, decreased diabetic complications associated with oxidative stress [156]. The Zn transporter ZnT-8 is a key protein for both Zn accumulation and regulation of insulin secretion in pancreatic β -cells [157]. Genome-wide association studies analyzed the genetic background of diabetes mellitus and revealed an associated non-synonymous Single Nucleotide Polymorphism, rs13266634, in the gene encoding ZnT8 (SLC30A8) [158]. Yet, the detailed links between ZnT8 function and insulin secretion remain to be elucidated [159]. Overall, the detailed effects, mechanisms, and inter-relationships of Cd on processes related to insulin secretion/utilization, Zn involvement, and blood glucose regulation may summon a range of biological pathways and they may not be simple [19, 20].

Similarly, the effects of Cd on insulin target cells are multifarious. Cd favors lipogenesis in adipocytes [42], likely by increasing glucose uptake and metabolism [41, 160]. Cd appears to mimic insulin signaling [161], but it may decrease the availability of key players of glucose metabolism, such as the insulin receptor and glucose transporter (GLUT4) in adipocytes [40, 162]. Adipokines, such as adiponectin and resistin, are also down-regulated in Cd exposed adipocytes [163].

Several activities relying on metallo-enzymes and metal-dependent reactions, such as Zn association with insulin excreting granules or iron participation in cytokine induced insulin excretion [164], contribute to glucose homeostasis. However, replacement of any of these transition metals by Cd is unlikely to be a mechanism of Cd toxicity [140]. An exception might be signaling calcium for which Cd ions are efficient competitors [165], but the comprehensive consequences of a possible replacement are not available. To illustrate the gaps of knowledge in the relevance of the substitution of essential metals by Cd in integrated biological contexts, Zn inhibits protein-tyrosine phosphatases with exceptional efficiency *in vitro* [166], in a molecular mechanism which seems less affected by Cd than by Zn [167]. Rather, it appears far more likely that Cd at low doses impairs the homeostasis of metals *via* signaling pathways [140] and that mishandling of transition metals (Fe, Cu) ions, stimulates the production of reactive species hence influencing a wide range of cellular functions [140, 168].

5.2. PCB and Insulin Secretion

Exposure of the murine RINm5F cellular model of pancreatic β -cells with the sub-toxic concentration of 10 μ g/ml of the Aroclor A-1254 PCB mixture for 48 hours resulted in a transient insulin release in the external medium with depletion of the total insulin content of the cells [169]. For comparison, this PCB concentration is at least 2 orders of magnitude larger than serum concentrations measured for the most exposed populations. Even though external insulin returned to basal level at the end of the treatment, its rate of synthesis was decreased by Aroclor A-1254. Thus, the decline in cellular insulin in the presence of PCB indicates impaired hormone synthesis, unable to keep up with its release. These observations were recapitulated with pure NDL-PCB conge-

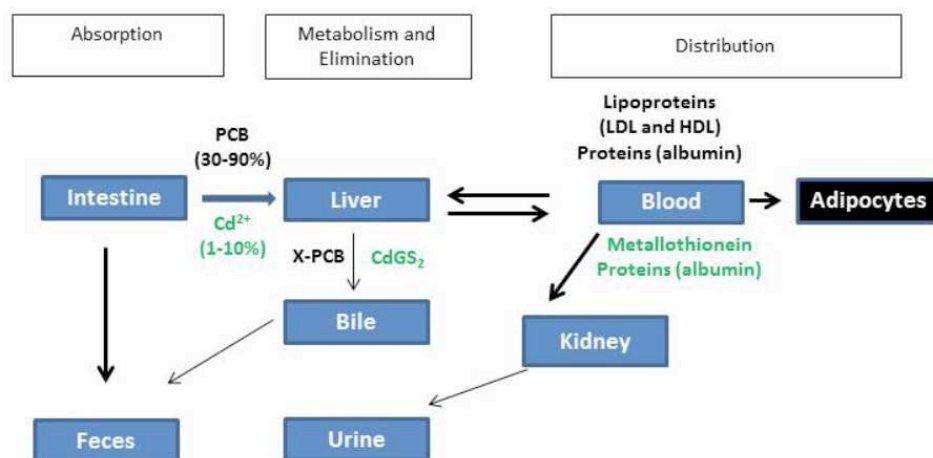


Fig. (2). Schematic ADME of PCB and Cd²⁺ after ingestion. The participants to PCB and Cd distributions are written in brown and black, respectively. Items in blue contribute to the distribution of both pollutants. X-PCB: conjugated PCB; GS₂: Cd²⁺ liganding glutathione molecules.

ners, and the insensitivity to PCB of stimulated insulin secretion by increased KCl-induced depolarization [169] was explained by the ND-L-PCB-triggered increase of intracellular calcium and the subsequent activation of calcium/calmodulin-dependent kinase II [170]. Thus, non-coplanar PCB enhance the calcium dependent steps of insulin secretion. The response to DL-PCB, mediated by the AhR, may also affect the same pathways, but not necessarily in the same way (inhibition or activation). When the concentration of Aroclor 1254 was divided by half, a calcium channel inhibitor (verapamil) did not inhibit PCB-induced insulin release, thus implying additional signaling mechanisms than verapamil-sensitive calcium influx at low PCB concentrations [170]. These results emphasize the importance of different parameters (concentration, duration, composition, for instance) in approaching a realistic model of exposure to PCB. Close monitoring of these factors is mandatory to discriminate between the different mechanisms which support the effects.

6. SETTING LIMITS OF EXPOSURE

The discrimination between high- and low-level exposures is subjective, and the currently implemented tolerable intake, as set by different regulatory agencies, has been chosen as an instrumental limit in the following after reviewing its rationale.

6.1. Exposure to Cadmium

A Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI, the amount of a given substance which can be consumed every week during a lifetime without causing any appreciable health effect for consumers) of 7 µg of Cd (kg bm)⁻¹ per week was established for Cd in 1972 by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). This assessment considered the values of Cd in the renal cortex likely to cause damage (set at 200 µg/g of cortex from occupational exposure to the metal evaluated back then) and average rates of absorption and excretion. In 2010, the JECFA confirmed the evaluation and established a provisional tolerable intake for Cd expressed by month (PTMI) of 25 µg/kg

body weight (*ca.* 6 µg/kg PTWI). Because of the long half-life of Cd in the human body, a health-based guidance value can be adjusted on monthly rather than weekly or daily basis, although irregular uptake may not be totally equivalent to constant ingestion according to the characteristics of intestinal absorption (see 3.1.). The above limits were obtained from the highest average daily exposure of 2 µg (kg bm)⁻¹ that was not associated with excessive excretion of urinary B2M. An arbitrary safety factor of 10 was applied to the estimate.

The US Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) published [10] a chronic oral minimal risk level (MRL). This estimate of concentrations without appreciable adverse effects was set at 0.01 µg Cd/m³ and 0.1 µg (kg bm)⁻¹ for daily human inhalation and oral intake (about 0.7 µg/kg weekly), respectively, for more than one year of exposure. For oral intake, all mammalian species combined, the lowest observed adverse effects occurred with at least a daily exposure of a few tens of µg Cd (kg bm)⁻¹ for proteinuria. This determination was based on the analysis of selected environmental exposure dose-response studies conducted in the general population or in populations living in Cd polluted areas. The relationship between urinary Cd and the prevalence of elevated levels of biomarkers of renal dysfunction (reliable indicators of low molecular weight proteinuria) was in agreement with adverse clinical or biochemical effects on bone and kidney. A pharmacokinetic model and uncertainty factors were applied to derive the above value.

Taking into account new experimental results on the toxicity of Cd and updates in the evaluation of Cd exposure from food in Europe, the European Food Safety Authority (EFSA) provided a scientific opinion based on a meta-analysis of selected studies to evaluate the dose-response relationship between urinary Cd (in µg/g creatinine, as indicator of internal dose) and different renal and bone biomarkers (see 4.). The benchmark doses were calculated with urinary B2M for subjects over 50 years of age and for the whole population.

The combined data showed a clear increase of kidney dysfunction for B2M above 300 µg/(g creatinine) for urinary

Cd above 4 $\mu\text{g}/(\text{g creatinine})$. These data were classically treated with a descriptive representation and consideration of several sources of variability (inter-study, inter-populations, and model-dependent ones). When processed with adjustment factors for these variations, the outcome was a TWI for Cd of 2.5 $\mu\text{g} (\text{kg bm})^{-1}$ [11] applicable to all, including subgroups of the population that are at risk, such as children, vegetarians or people living in highly contaminated areas. Considering the amount of data gathered for this estimate and the problems encountered in some places by the food industry and agriculture to respect the maximum levels in some foodstuffs, it appears likely that any further revision of the TWI would be pointless without new evidence of adverse health effects at lower Cd exposure. The present TWI has thus been taken as a reference in this review to set the difference between *low* and *high* levels of exposure.

6.2. Exposure to PCB

Because of the differences in the structures of PCB in their toxicological profiles and in the biological mechanisms of action, risk assessment of PCB is complex and several different tolerable intake limits have been proposed, depending on the considered group of pollutants.

6.2.1. Dioxin-like-PCB

The toxicity of dioxin-like PCB and dioxins is mainly mediated through binding to the AhR, and it affects the immune and reproductive systems, thyroid metabolism with consequences for development, cancer and diabetes among many diseases and pathological conditions [171].

For benchmark dose calculations, the concept of toxic equivalency (TEQ) was developed to take into account the different toxic potentials of different POP molecules and the cumulative toxicity of complex mixtures. The procedure involves assigning individual toxicity equivalency factors (TEF proposed by WHO in 1997 and updated in 2005) to the dioxins and DL-PCB congeners in terms of their relative toxicity compared to TCDD, which is considered as the most toxic (reference congener, $\text{TEF}=1$). The TEF for the other DL-PCB (or dioxins) range between 0 and 1, indicating the magnitude of their toxicity compared to TCDD. The toxic equivalency (TEQ) of a mixture is calculated by multiplying the concentrations of individual congeners (C_i) by their respective TEF (TEF_i), and adding them to obtain the total TEQ concentration (TEQ_t) of the mixture: $\text{TEQ}_t = \sum(\text{TEF}_i \times C_i)$.

In 2001, the Scientific Committee on Food of the European Commission (SCF) established a TWI of 14 $\text{pg TEQ} (\text{kg bm})^{-1}$ for dioxins, furans and DL-PCB on the basis of the Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) relative to decreased sperm production and altered sexual behavior in rat male offspring [172]. In a different analysis, the United States Environmental Protection Agency (EPA) issued a reference dose for chronic oral exposure of 4.9 $\text{pg} (\text{kg bm})^{-1}$ per week after application of arbitrary error and safety factors. This reference value is based on a decreased sperm concentration and motility observed in an epidemiological cohort study of men who were exposed to TCDD during childhood [173], and on increased thyroid-stimulating hormone levels in highly exposed newborn infants [174].

6.2.2. Non Dioxin-like PCB

NDL-PCB are the predominant congeners found in food matrices. Among them, six (2,4,4'-trichloro, 2,2',5,5'-tetrachloro, 2,2',4,5,5'-pentachloro, 2,2',3,4,4',5'-hexachloro, 2,2',4,4',5,5'-hexachloro, and 2,2',3,4,4',5,5'-heptachloro) are considered as good indicators (PCB_i) together with DL-PCB-118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), as they represent 50% of all PCB present in food. The sum of PCB_i is considered as representative of the NDL-PCB exposure as they are found in the $\text{ng-}\mu\text{g}/(\text{gram of matrix})$ range, in higher amounts than dioxins and DL-PCB.

Even if some health effects are common between the NDL-PCB and the DL-PCB, the mechanisms of action of NDL-PCB are multiple, and they do not involve the AhR, which is the main receptor of DL-PCB. NDL-PCB interact with multiple receptors (ryanodine, transthyretin, estrogen), which does not enable the definition of an equivalent of the TEF. A daily reference dose of 20 $\text{ng} (\text{kg bm})^{-1}$ per day (*i.e.* 140 $\text{ng} (\text{kg bm})^{-1}$ per week) was proposed for a PCB commercial mixture (Aroclor 1254) in 1996 by EPA, and for all 209 PCB congeners in 2000 by ATSDR, following early experimental toxicological studies [175-178]. This dose was based on the LOAEL for immunological effects observed in monkeys, after application of a safety factor of 100 and it is congruent with available human data of contaminated subpopulations [179]. Considering the definition of PCB_i , the tolerable daily intake is set at 10 $\text{ng} (\text{kg bm})^{-1}$ for this sub-group. The TWI of NDL-PCB is roughly 10^3 -fold higher than for DL-PCB, but the database on effects of individual NDL-PCB congeners is rather limited. Thus, the inescapable simultaneous exposure to NDL- and DL-PCB hampers the interpretation of the toxicological and epidemiological results dealing with these compounds.

6.3. Limitations of Tolerable Intake Determinations

Biases and uncertainties may flaw the used approaches to determine the TWI. In the case of ingested Cd, five different procedures were applied. Considering these differences, the results cannot be considered as indisputable values although they all are in rough agreement. Another source of uncertainty are the endpoints, which are chosen arbitrarily [10], and the safety factors. The MRL for humans can be assessed when reliable and sufficient data exist to identify the target organ(s) of effect or the most sensitive health effect(s) for a specific duration and a given route of exposure. Yet, depending on the combination of target-organ biomarkers and uncertainty factors used in the evaluation of risk, MRL vary largely. One important reason for discrepancies is the Cd accumulation by the proximal tubules occurring upon chronic low level exposure up to some ill-apprehended threshold (see 4.1.). Thus, the question of the validity of the selected parameters to estimate exposure over a wide range of doses is a critical point.

Risk assessment is closely associated with the accuracy of the estimates of human exposure: this implies selective endpoints and highly sensitive detection methods (see 4.). In the case of PCB quantification, large discrepancies were observed for the implemented methods and their limits of detection. For Cd, functional biomarkers, such as urinary B2M excretion associated with kidney dysfunction, result

from damage to which various causes may contribute. The incidence of bone and kidney disorders increases with age and this introduces another uncertainty parameter, besides a plethora of other ones (diet, nutritional status, oral supplementation, hormonal impregnation, genetics, *etc.*). These parameters contribute to increased absorption, reduced detoxification or excretion of the pollutants, or worsening of the induced damage by the toxic substance(s).

Overall, the estimate of tolerable intake for a food contaminant is partly a subjective matter. Arbitrary safety factors are difficult to integrate in meta-analysis as the conditions under which data were obtained and for which purpose vary largely. These limitations explain the continuing quest for additional data, which, for experimental studies, should now be obtained under the most realistic conditions.

7. OXIDATIVE STRESS WITH EXPOSURE TO CADMIUM AND PCB: RELEVANCE FOR DIABETES

Chemical stressors such as Cd or PCB may act by shifting the balance between reducing and oxidative (redox) species, *i.e.* those components providing and withdrawing electrons, respectively. Consequently, cells and tissues may respond by engaging into a program changing their characteristics, as in differentiation or apoptosis for instance. The dynamics of these phenomena is not always easy to monitor as the involved species mediating the effects are elusive (highly reactive in a biological context), and the mechanisms leading to the observed outcome are often difficult to decipher. The mediators of the toxic effects are most often derivatives of oxygen (the reactive oxygen species, ROS) or nitrogen *via* nitrogen monoxide (NO). Two different sets of conditions, which are often confusingly combined in the same concept of *oxidative stress*, can be at work: actual oxidative stress with damaging consequences and increased levels of reactive species with signaling functions.

7.1. Oxidative Damage

Exogenous exposure to noxious compounds leads to damage when the intrinsic capacity of the exposed system (cell, tissue, *etc.*) to oppose the redox shift is overwhelmed. Thus the question is not whether damage occurs with pro-oxidative compounds, but when. The outcome is straightforward for high and sustained oxidative conditions which correspond to acute intoxication: the contaminant triggers reversible (*e.g.* disulfide bridges, *S*-nitrosylation) or irreversible (*e.g.* protein carbonylation and cleavage) modifications of cellular components. The former may be protective or signaling, the later lead to destruction of the biological material. The oxidative damage targets all sorts of cellular components including proteins, lipids, nucleic acids, and carbohydrates. Most of these modifications can be monitored by the end products of these deleterious reactions. Protein carbonyls can be detected after derivation into dinitrophenylhydrazine with specific antibodies. Lipid peroxidation generates aldehydes such as 4-hydroxynonenal (HNE) and malondialdehyde (MDA) which reacts with thio-barbituric acid to form easily detected derivatives. Nucleic bases can be modified in different ways and the nucleic acids can be

fragmented by strand breaks, but the most readily oxidized base is guanine into 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua), which can be identified by several methods. In addition, oxidative cross-linking of carbohydrate and proteins forms advanced glycation end products (AGE), the levels of which are elevated in established diabetes.

Thus, oxidative stress should more precisely be associated with the detection of cellular damage rather than simply elevation of the concentration of species mediating the effects of contaminants.

7.2. Antioxidant Response and Redox Signaling

The increase of the level of ROS has multiple consequences, even before the onset of genuine oxidative stress. It is technically difficult to precisely determine the actual concentrations of ROS in cells, and most data are obtained by comparison between samples receiving a treatment and those without, *i.e.* on a relative scale. However, it can be posited that some cellular pathways are affected by the increase of the levels of oxidizing species well below those inducing damage. Some of these pathways rely on transcription factors such as Nrf2, NF- κ B, AP1, CREB, and others. Nrf2 and NF- κ B are activated by a similar inactivation of their inhibitory partners, Keap1 and I κ B, respectively. The released Nrf2 and NF- κ B in the cytosol translocate to the nucleus and bind, with other partner components, to recognition elements, the antioxidant response elements (ARE) and the κ B DNA binding sequence, respectively, on the promoter region of various genes. Both transcription factors stimulate expression of many genes: whereas NF- κ B mainly regulates the immune response and inflammation, the Nrf2 targets include genes encoding antioxidant activities. Hence, the transcriptional activity triggered by increased levels of ROS partly contributes to limit the impact of such species.

In addition, oxidative inactivation of subunits inhibiting transcription factors can occur directly by oxidation of reactive cysteines as in the case of Keap1, or indirectly by phosphorylation as in the case of I κ B. Indeed, redox signaling also targets signal transduction pathways, such as Mitogen Activated Protein Kinases and Protein Kinase C for instance. The targeted cascades may have pro-survival or pro-apoptotic effects, and they may be activated by enhanced kinase activity or decreased phosphatase activity.

These pathways are of relevance in diabetes. Auto immunity at work in Type I diabetes originates in activated macrophages which produce cytokines and ROS. Canonical regulatory pathways (relying on NO, ROS and NF κ B, for instance) and cytokine (interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor α (TNF α), interferon (IFN γ)) action are involved in the process, and promote the progression of islets dysfunction [180]. Oxidative conditions have been found to decrease the promoter activity of the insulin gene and insulin mRNA expression in islet β -cells under hyperglycemic conditions (*glucose toxicity*). Such conditions are also prone to trigger the mitochondrial permeability transition [181]. In apparent contrast, mitochondrial ROS increase is needed for insulin secretion [182].

7.3. Oxidative Stress Triggered By Cadmium

A frequent consequence of the presence of Cd in cells is the shift of the cellular redox potential due to the mobilization by the metal of reactive thiol groups and other antioxidant molecules [183, 184]. In addition, sub-lethal doses of Cd interact with a large number of biological molecules. For instance, the cadherin-catenin complex of adherens junctions may be dissociated by Cd²⁺, in agreement with the small dissociation constant that can be assigned to E-cadherin and Cd²⁺ [185] with induction of β -catenin signaling [186]. As another example, Cd compounds have been shown to induce a cellular stress at the level of the endoplasmic reticulum (ER) which triggers the Unfolded Protein Response (UPR) [187]. A major function of ER is with the proper folding and post-translational modifications of proteins, and part of the UPR is to minimize the damage. But, when damage control is not possible, the UPR commits cells into death by apoptosis. A series of recent studies has shown that Cd-triggered superoxide radical anion production is an upstream event of the UPR [187]. The close connections between Cd exposure and redox signaling are largely treated in recent reviews, *e.g.* [188].

For the insulin-responsive cells, Cd compounds may also induce hyperglycemia, by decreasing expression of the GLUT4 (glucose transporter) gene in adipocytes [162] or by impacting differentiation of adipocytes and production of adipokines [163] in a trend amplified by the absence of MT [189]. These observations can be compared with data showing that the generation of hydrogen peroxide modulates glucose and metabolism of lipids in adipocytes [190], but the action of oxidative compounds on insulin sensitivity can be dual [191] depending on the precise conditions under which the reactive species are produced.

Although difficult to analyze in details, comparison of reports in the literature may afford valuable insight into the above mentioned differences. For instance, treatment of a model of β -cells with μ M concentrations of CdCl₂ impacted viability with clear signs of apoptosis, ROS increase, and decreased GSIS [154]. The exposure of purified islets or of another β -cell model to sub-lethal concentrations resulted in moderate shift of the redox potential as detected by the increase of the GSSG/GSH ratio, no evidence for oxidative damage, yet a decrease of GSIS, particularly for purified islets [30].

7.4. Oxidative Stress Triggered By PCB

Exposure to PCB congeners also lead to oxidative stress. Analysis of the transcriptional response to DL- and NDL-representative PCB indicated that gene sets associated with PCB stress were connected to variations of the redox potential and associated genes [192]. The two types of PCB induced different responses with only a fraction being shared by both. As expected, the DL-PCB activated the AhR, whereas the NDL-one stimulated other pathways such as the TNF triggered ones [192]. Also, treatment of a monkey epithelial cell line with μ M concentrations of a NDL-PCB congener triggered mitochondrial dysfunction with subsequent death [193]. However, these results were obtained with large PCB concentrations likely to generate oxidative stress. Indeed, PCB and their metabolites increase ROS levels

[194]. A contributing mechanism is that modifications of PCB by CYP 450 and peroxidases produce derivatives containing quinones. The latter compounds can cycle through semi-quinones and hydroquinones, thus generating the superoxide radical anion and other ROS [195].

With relevance to diabetes, DL-PCB, such as the 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl congener (PCB-77), contribute to inflammation of the adipose tissue *via* the AhR-dependent pathways and they promote obesity [196, 197]. Glucose homeostasis is impaired with the same type of PCB [198], and PCB 77 increase oxidative stress and reduce insulin-stimulated ratios of p-Akt to Akt and glucose uptake in cultured adipocytes [199]. Resveratrol, a molecule with antioxidant properties, prevents the PCB effects.

When comparing the links between Cd or PCB and induction of oxidative stress (Fig. 3) it appears that, independently of the considered mechanistic pathway, such connections are obvious at high concentrations of contaminants with ensuing cell death. But the series of events occurring at low concentrations and the identification of the most sensitive pathways are far less known and the involvement of oxidative stress under such conditions is not always straightforward.

7.5. Association of Cadmium Or PCB Impact and Oxidative Stress in Different Populations

As a follow up of the above mechanistic links between Cd and redox imbalance at the cellular level, comparison can be made with the situation encountered with populations moderately exposed to Cd compounds. Whether in the general population [200, 201] or occupationally exposed workers [202], correlations have been observed between urinary Cd and markers of oxidative products, such as MDA or some markers of nephrotoxicity. Such correlations may also occur in other biological fluids, such as blood [203] or seminal plasma [204], but they are not always detected under low levels of exposure [205]. At environmental levels and in the general population, the relationship between Cd exposure and oxidative stress is not clear because adaptation mechanisms, such as simple increases of MT and GSH, or more complex series of events, control the oxidative drift induced by Cd [206, 207]. A summary of some studies that deal with oxidative stress markers and Cd exposure are given in Table 5. Differences in the studied populations, the level and type of exposure, the design of the study (*e.g.* case-control, cross sectional), the adjustment factors included in the statistical models and biomarkers lead to discrepant results. In addition, other factors, *e.g.* other pollutants, diet and life style, and genetic background, must be taken into account [208]. However, even in the general population, Cd exposure tends to be positively associated with signs of oxidative stress, whereas the association seems negative with the level of antioxidant molecules or enzymes activities. Oxidative stress is increased upon Cd exposure and diabetes [209], as witnessed by the enhancement of markers of oxidative damage, *e.g.* [210]. Thus, Cd exposure at low level and oxidative stress may be associated, but more evidence is needed to demonstrate it.

Acute high level exposure to PCB triggers oxidative stress to liver of animals or in cell models. In contrast, at

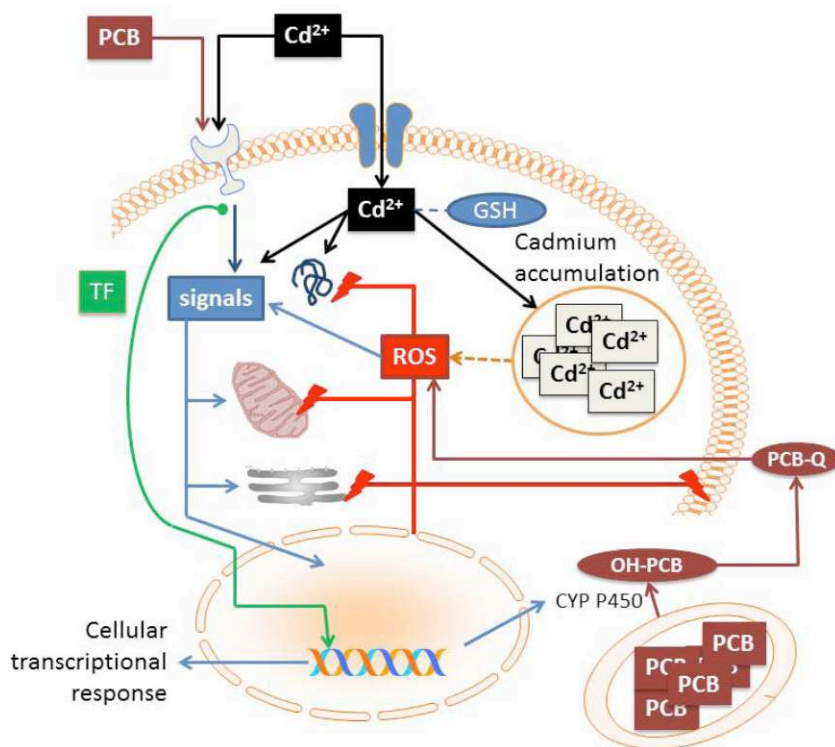


Fig. (3). Intracellular connections between the cadmium and PCB contaminants and oxidative stress. The cellular transcriptional response describes expression or repression of genes occurring upon challenge, including the anti-oxidant response. The black arrows represent the traffic of the Cd cations, the brown ones that of PCB. The green arrow describes activation of transcription factors (TF), the blue ones indicate signaling events, and the red ones oxidative damage. PCB-Q is the set of PCB metabolites with quinone groups. This Figure was partly prepared with graphic elements from Motifolio™.

moderate concentrations, PCB-induced oxidative stress is poorly described. Correlation between PCB levels and markers of oxidative stress in occupational settings and in the general population are conflicting (Table 5). Blood PCB levels of people exposed to hazardous compounds have been positively associated with increased urinary MDA and 8-oxodG [211, 212]. In a general population of 70 year-old Swedish residents, PCB levels were strongly associated with oxidized LDL. Unexpectedly, they were negatively correlated with the plasma GSSG level and the GSSG/GSH ratio, whereas other markers including the total anti-oxidative capacity were not associated [213]. There is mounting evidence that PCB can induce oxidative stress but the involved mechanisms remain ill-understood. PCB were shown to reduce the levels of hepatic GSH [214, 215], to decrease the activity of antioxidant enzymes [216, 217], and to induce loss of hepatic selenium and zinc with concomitant increase of copper [214]. Recently, sub-acute exposure to PCB generated signs of oxidative stress in rat liver with dose-dependent changes of superoxide dismutase and other anti-oxidants [218]. MDA was proposed to be a sensitive biomarker with a calculated low critical effect dose of $0.07 \text{ mg (kg bm)}^{-1}$ for Aroclor 1254 [218]. PCB-induced oxidative stress and cancer were proposed to be correlated in humans [219, 220].

The oxidized PCB metabolites generated by CYP 450 may get reduced, resulting in the waste of NADPH with formation of ROS [221, 222]. ROS can cause oxidative damage by reaction with cellular components [125, 221-223]. Among them, the levels of 8-oxodG in human urine were used to study oxidative stress and DNA damage caused by

halogenated pollutants, including PCB, after occupational exposure [212].

Similarly, the DNA damage induced by Cd has been monitored by the determination of urinary 8-oxodG: positive association was found between urinary Cd and 8-oxodG [224]. However, no correlation between urinary 8-oxodG and the Cd concentration of the kidney cortex has been evidenced [225].

In the few studies in which Cd and POP were considered together, a redox shift and oxidative damage were evidenced [226, 227]. Other biochemical parameters, such as the levels of circulating thyroid hormones, are also adversely impacted by exposure to both contaminants with possible synergy in the toxicological effects [228]. As for the consequences of co-exposure for diabetes, a recent analysis of self-reported health status by participants suggests association between DL (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) PCB and diabetes [229], but the possible modulating effects of urinary Cd were not reported.

Therefore, population studies are very useful to reveal the potential health problems associated with exposure to contaminants. But, partly because of a number of confounding factors, among which co-exposure to different compounds is prominent, they cannot unambiguously establish a causative link between oxidative reactions and various multifactorial chronic diseases for populations exposed to low levels pollutants such as Cd [230] or PCB [231]. The statement applies to diabetes and pre-diabetic states.

Table 5. Exposure of human populations to pollutants and oxidative stress markers.

Studied Population	Biomarkers of Exposure and Redox Balance	Main Results	References
Cd exposed workers (n=50) vs. age and sex matched controls	Urinary Cd Plasma MDA Red blood cell superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX)	In exposed workers, elevated MDA and decreased SOD, GPX. Stepwise multiple correlation indicated a positive association between urinary Cd and MDA and a negative association between SOD and urinary Cd.	[265]
Pregnant women with intrauterine growth restriction (n=100) non-smokers (n=55) or smokers (n=45) vs. control non-smoker pregnant women (n=85) at the third trimester of pregnancy (n=75) and after delivery (n=55)	Whole blood GSH, Cd, Plasma MDA, SOD, GPX, MT Serum 8oxodG, Cu, Zn, cotinine (biomarker of smoking) Red blood cell MT, SOD and GPX	Positive correlation between cotinine and whole blood Cd, plasma MDA, erythrocyte MT, erythrocyte GPX. Negative correlation between cotinine and whole blood GSH, erythrocyte SOD.	[266]
Pregnant women (n=500)	Whole blood Cd, Se, Zn, Mn Plasma ferritin Urinary 8oxodG and Cd	In adjusted model, positive association between urinary Cd and 8oxodG, but no association with whole blood Cd.	[224]
Lead and Cd exposed workers (n=35)	Whole blood SOD, GPX, GSSG/GSH, Glutathione reductase (GR) Cd, Se Plasma MDA Urinary Cd, Se, 8oxodG	Positive correlation between whole blood Cd and GSSG/GSH. Negative correlation between urinary Cd and 8oxodG. Multiple regression analysis did not evidence significant association.	[267]
Lead and Cd exposed workers (n=57) vs matched controls	Whole blood Cd Plasma MDA, Se Red blood cell SOD, GPX, GR Urinary Cd, 8oxodG	In exposed workers, increased whole blood and urinary Cd and MDA and decreased Se. Positive correlation between whole blood Cd and MDA or SOD, and between urinary Cd and MDA. Negative correlation between whole blood Cd and Se.	[268]
Cd exposed workers (n=71) vs. controls (n=31)	Whole blood Cd Plasma advanced oxidation protein products and derivatives of reactive oxygen metabolites Red blood cell GPX, SOD, Urinary Cd, 8oxodG, 8-isoprostane	No differences between exposed subjects and controls. Multiple regression evidence a positive association between SOD and whole blood Cd.	[202]
Male Cd exposed workers (n= 40), 45-55 year old divided in 4 groups of 10 (non-smokers non diabetic, smokers, diabetic, smokers and diabetic) vs. control (n=10)	Whole blood Cd, MDA, GSH, protein carbonyl (PC)	In Cd exposed welders increased Cd, MDA, PC and decreased GSH. Compared to non-smokers, non-diabetic, welders, smoking increases significantly all these differences; and diabetes increases MDA and PC.	[209]
General population (n=290)	Urinary Cd, MDA and 8oxodG	Positive correlation between urinary Cd and the oxidative stress markers.	[200]
Traffic conductors (n=91) vs. control (n=53)	Urinary Cd, Cu, 1-hydroxypyrene glucuronide (1-OHPG), 8oxodG	No difference in urinary Cd. In non-smoking traffic conductors, increased 1-OHPG, Cu and 8-oxodG. In smoking traffic conductors, increased 1-OHPG and Cu.	[226]
Breast fed infants, 11-17 week old (n=96)	Urinary 8oxodG and Cd Breast milk Cd	In multivariable analysis, positive association between 8oxodG and Cd in milk or urine.	[269]
General population (n=10098)	Serum carotenoids, vitamin C and E Urinary Cd	In adjusted models, negative association between urinary Cd and carotenoids, vitamin C and E.	[230]

(Table 5) contd....

Studied Population	Biomarkers of Exposure and Redox Balance	Main Results	References
General population 30-80 year old (n=824)	Lymphocyte 8oxodG and single and double DNA stand breaks Urinary Cd	Multiple linear regression did not evidence any association.	[270]
General population (n=7813)	Whole blood Cd Exhaled NO	Adjusted linear regression indicated a negative association between the two biomarkers.	[271]
Exposed workers (n=32) vs controls (n=21)	Plasma catalase, SOD, GPX, glutathione S-transferase (GST), GR, GSH MDA Erythrocyte fragility Urinary Cd	In exposed workers increased catalase, SOD, GPX, GST, GSH and decreased MDA and erythrocyte fragility Multiple linear regression evidenced significant positive (MDA, erythrocyte fragility) or negative (SOD, catalase) associations with urinary Cd.	[272]
Neonates in polluted area (n=126) vs control (n=75)	Cord whole blood Cd Cord blood plasma 8oxodG	Adjusted linear regression indicated a positive association between the two biomarkers.	[273]
Women 18-44 year old (n=252)	Whole blood Cd Plasma isoprostane, 9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid (9-HODE), 13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid (13-HODE), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)	No association.	[205]
Exposed workers (n=64)	Whole blood Cd Urinary 8oxodG	Multivariate analysis indicated a positive association between these parameters.	[274]
Exposed workers (n = 64) from 18 to 60 years	Hair samples PCB and other halogenated organic pollutants Urinary 8oxodG	Significant association between PCB concentration (but also other organic pollutants) and increase of urinary 8-oxodG.	[212]
Inuit from Nunavik (71 women, 28 men)	Plasma PCB Oxidative stress parameters: α -tocopherol and coenzyme Q10 (CoQ10) Antioxidant defenses: plasma low-density lipoprotein (OxLDL) and glutathione	Multivariate analysis indicated no evidence for PCB-associated oxidative stress.	[231]
Accidental exposure to PCB (44 Yusho victims, Japan and 46 controls),	Serum PCB Urinary 8-isoprostane (8IP)	Increased 8IP for the victims.	[275]
Exposed workers (n = 57)	Serum polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD), polychlorinated dibenzofuran (PCDF), and coplanar-polychlorinated-biphenyl (Co-PCB) in serum Lymphocytic and urinary 8oxodG	Lymphocytic 8-oxodG level showed a negative association with serum dioxin level (including Co-PCB). No correlation of urinary 8-oxodG and serum dioxin.	[276]
Exposed workers (n = 29)	Serum PCDD, PCDF, and Co-PCB Urinary 8oxodG	Urinary 8oxo-dG did not show correlation with serum dioxin levels.	[276]
13 workers, 16 residents near a municipal Waste, and 10 residents near waste incinerators	Blood PCDD, PCDF, and DL-PCB Urinary 8oxo-dG and MDA	Analysis of covariance (ANCOVA) showed significant association between blood dioxin and increase urinary MDA (not 8oxo-dG), after controlling smoking, aging, BMI, and diet habits.	[211]
687 individuals aged 70 years (non-smokers, nondiabetic, no previous cardiovascular disease)	Three groups of markers: (1) Protein stress markers including homocysteine, GSH, GSSG, GSSG/GSH; (2) Lipid stress markers; and (3) antibodies and total antioxidant capacity (TAOC). Plasma PCB and other POP	The multivariate analysis indicated positive correlation between plasma PCB and Ox-LDL. A significant positive association was reported between PCB and GSH and a negative one between PCB and GSSG or the GSSG/GSH ratio.	[213]

8. MODEL SYSTEMS USED TO STUDY THE MECHANISMS OF ACTION OF LOW CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND OXIDATIVE CHALLENGE

Because of the above plethora of molecular and cellular mechanisms associated with Cd impact on living material, it is of the utmost importance to carefully design experiments implementing model systems to generate useful data. This is particularly significant when exposure to a toxic compound occurs at a low level and over long periods of time, with phenomena that may overlap. Indeed, toxic compounds such as Cd containing ones or PCB may have pro-survival and even growth enhancing effects or may lead to cell death, depending on the experimental conditions.

8.1. Animal Studies

The most widespread animal models used to study the impact of Cd and PCB are rodent ones, mainly rats and mice. Even though the currently tolerable levels of pollutants proposed by regulatory and advising bodies were obtained from available data with these models, it is worth reflecting on the relevance of some of the considered studies. Variable safety and uncertainty factors were applied to reach recommendations (see 6.), but, as it is most often the case in Toxicology, the biological effects may qualitatively vary depending on the applied doses.

8.1.1. Exposure of Animals to Cadmium

In a large majority of the studies, rats or mice are exposed by injection of Cd (subcutaneous, intraperitoneal or intravenous injections) for a relatively short period compared to what could be expected for a chronic exposure. The models used in these studies sometimes seem far from environmental relevance. For practical reasons, and also because no alternative is available, the life-long TWI for humans of $3.5\mu\text{g Cd (kg bm)}^{-1}$ [10, 11] is arbitrarily set here as the limit between high- and low-level exposures, and no differences between animals and humans will be made by lack of consistent data for comparison between species.

Very few studies have been carried out in this exposure range, probably because the lower the dose, the lower the effect, which does not help publication of data obtained in lengthy and costly experiments. The studies reporting the effects of *low doses* of Cd in diet or drinking water use a weekly concentration range from 0.5 mg to 70 mg Cd $(\text{kg bm})^{-1}$, *i.e.* at least 140 fold more than the TWI, but for variable periods of time. For example a 23 week-exposure of mice to 10 mg CdCl₂ per liter of drinking water [232] approximately corresponds to weekly 7 mg Cd $(\text{kg bm})^{-1}$, considering a dose uptake of 30 μg of Cd/day, or 2000 fold the TWI for *ca.* one fourth of the life of laboratory mice. Along the treatment, changes in some activities participating to the anti-oxidant response were detected but not signs of oxidative damage to kidneys. However, intra-gastric administration to female rats of a low dose defined as 0.05% of the LD₅₀ value, *i.e.* daily 4.4 mg CdCl₂ $(\text{kg bm})^{-1}$ or weekly 31 mg $(\text{kg bm})^{-1}$ for 120 days [233], may be compared to 50 mg/L of CdCl₂ given to male rats for 12 weeks which should approximately be a weekly dose of 25 mg Cd $(\text{kg bm})^{-1}$ [234]. In both cases signs of oxidative damage (oxidative

stress) were detected: formation of ROS with enhanced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA damage [233] and induction of protein and DNA oxidation [234]. Chronic exposure *via* the diet of bank voles for 6 weeks with 40 mg CdCl₂/kg of wheat grains (*note*: the value of 0.4 mg/kg in the abstract of the quoted article is probably an error) was estimated to correspond to a weekly exposure of 35 mg Cd $(\text{kg bm})^{-1}$ [235] in the same range as above for rats and mice. However, in contrast with them, not only no increases of MDA were measured in the liver and kidneys, but a decrease which followed that of the iron concentration was observed with increased Cd concentration and MT in these organs.

Exposure of female rats to 1 mg Cd/L of drinking water for 2 years, *i.e.* corresponding to life-long exposure, led to a series of changes in bone parameters and to an enhanced risk of fracture [236]. The weekly dose in this case is significantly less than in the above studies as it extends from *ca.* 0.4 mg $(\text{kg bm})^{-1}$ for old animals to *ca.* 1.5 mg $(\text{kg bm})^{-1}$ for young ones after weaning. In the exposed animals significant variations of calciotropic hormones, mainly 1,25-dihydroxyvitamin D and calcitonin, were measured [237]. A similar treatment for males for one year seemed to yield less mechanical problems for bones, yet with similar marked effects on the same hormones [238]. These studies were taken into account to derive the TWI [10, 11] because they appeared to be the most relevant for chronic low level exposure to oral Cd. Significantly, signs of oxidative damage in these studies were only reported for 5 times higher concentrations of Cd in drinking water, *e.g.* [239].

8.1.2. Exposure of Animals to PCB

Similar comments to those made for Cd apply to PCB: few studies are available that implement low concentrations of toxicants and long exposure times. The low doses considered were in the daily mg $(\text{kg bm})^{-1}$ range for less than 5 weeks, which should be compared to the TWI of 140 ng $(\text{kg bm})^{-1}$ for PCB mixtures (see 6.2.).

ROS production induced by PCB may be associated with CYP induction. Dose-response studies performed to determine the threshold of CYP induction and to connect the metabolic activation of 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline to DNA damage showed a threshold at 1 mg $(\text{kg bm})^{-1}$ per day [240]. However, the potency of individual PCB as liver inducers of CYP varies largely, with PCB 126 needing 10 $\mu\text{g (kg bm)}^{-1}$ per day as compared to PCB 153 inducing CYP at 1 mg $(\text{kg bm})^{-1}$ per day only [241]. These different sensitivities to different PCB molecules are not fully explained, but dogs exposed to 5 $\mu\text{g (kg bm)}^{-1}$ of a dietary PCB mixture per day for 20 weeks showed CYP activity in liver tissue [127].

With other routes of PCB administration intra-peritoneal separate injections of mg quantities of different PCB up to 3 weeks associated: (i) CYP 1A1 (EROD) and DT-diaphorase activities with DL-PCB 77, (ii) increased DNA-binding activity of the redox-sensitive transcription factor AP-1 with the highly chlorinated PCB 77 and 153 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl, respectively), and (iii) increased oxidized vitamin E (α -tocopheryl quinone) with all molecules tested [223]. Similar treatments with mixtures of PCB (2 mg $(\text{kg bm})^{-1}$) for 4

weeks increased MDA, H₂O₂ and DNA damage in the rat hippocampus [242], and they decreased the levels of several antioxidant metabolites and activities with elevated H₂O₂ and MDA in rat epididymal sperm [243].

Thus, by only considering animal exposure *via* ingestion, it is not perfectly clear whether oxidative stress is the early mechanism explaining toxicity as often assumed. Oxidative stress may occur only for exposure to relatively high concentrations of the pollutant or after accumulation in easily loaded locations. It is not established whether Cd toxicity linearly follows exposure: low concentrations may be safely handled, *i.e.* with a critical threshold above which toxic effects arise, or not. These questions are further complicated by various sorts of interferences affecting animal studies. For instance, sub-populations, such as pregnant mothers and pups, *e.g.* [93, 244], may display different sensitivities to toxicants than adults. Also laboratory strains may vary for their sensitivity to the toxic effects of Cd [245]. Other characteristics of the animal model, such as its mineral status [156, 246] or its intestinal microbiota [247], modulate the impact of Cd exposure and the appearance of oxidative stress. Considering these and other confounding factors in animal studies, it is advantageous to get molecular insight on the occurrence of oxidative challenge under pollutant exposure with cellular models.

8.2. Cellular Studies

The combination of Cd exposure of cell cultures and evidence for oxidative stress is frequently encountered in the literature. However, defining chronic low level exposure in

such conditions is more difficult than with animals, as the cells cannot be generally kept for long without medium changes.

8.2.1. Exposure of Cells to Cadmium

Accordingly, relatively few studies are available in which cell models were kept in the presence of Cd for a long time and the occurrence of oxidative stress was probed. In the case of differentiated Caco-2 cells, a model of enterocytes, the resistance to Cd exposure at sub-lethal concentrations was higher than that of undifferentiated cells [248]. However, in such experimental settings, it is difficult to make a distinction between intrinsic resistance and development of induced adaptation. Indeed, the question of the onset of resistance mechanisms upon sustained exposure to toxic compounds is quite common with transformed cells [206, 207], and the mediation of the anti-oxidant response was proposed in the case of Caco-2 monolayers to limit oxidative damage [248]. However, the involvement of oxidative stress in mitochondrial dysfunction under similar conditions with undifferentiated Caco-2 cells and high Cd concentration could not be unequivocally evidenced [249].

Furthermore, not all cell models have the same ability to cope with oxidizing species. Table 6 gives quantitative values of some activities participating to the anti-oxidant response in different models to illustrate this variability. Consequently, the anti-oxidant response of the cells to a Cd challenge is quite variable (Table 7). The same holds for their propensity to display signs of oxidative damage.

Table 6. Anti-oxidative capacity of some cellular models.

Anti-oxidant	Model	Cell Type	Enzyme Activity	References
GPx	Jurkat T	human T lymphocyte	43U/g prot	[277]
	HaCaT	human keratinocyte	42U/g prot	[278]
	C6	rat glial cells	12U/g prot	[279]
GRase	Jurkat T	human T lymphocyte	50U/g prot	[277]
	HaCaT	human keratinocyte	30U/g prot	[278]
	C6	rat glial cells	21U/g prot	[279]
SOD	Jurkat T	human T lymphocyte	32U/g prot	[277]
	C6	rat glial cells	8.7U/g prot	[278]
CAT	Jurkat T	human T lymphocyte	6U/mg prot	[279]
	HaCaT	human keratinocyte	4.8U/mg prot	[278]
	C6	rat glial cells	19U/g prot	[279]
GSH	Jurkat T	human T lymphocyte	5.9μM/g prot	[279]
	HaCat	human keratinocyte	120μM/g prot	[278]
	C6	rat glial cells	40μM/g prot	[279]
	RMC	Rat glomerular mesangial cells	128nmol/mg prot	[280]

GPx: GSH peroxidase; GRase: GSH reductase; SOD superoxide dismutase; CAT: catalase.

Table 7. Variations of some anti-oxidant activities upon sub-lethal cadmium challenge for different cell models.

Enzyme	Model	Cell Type	LC ₅₀ μ M (time)	[Cd] μ M	Exposure Time (h)	Fold Change	References
GPx	Jurkat T	human T lymphocyte	40 (24h)	25	24	-2.3	[277]
	HaCaT	human keratinocyte	100 (48h)	100	24	-1.9	[278]
	C6	rat glial cells	20 (24h)	20	24	-3.4	[279]
	V79	hamster lung		50	2	0	[281]
	CHO-K1	hamster ovary		4	4	down	[282]
GRase	Jurkat T	human T lymphocyte	40 (24h)	25	24	0	[277]
	HaCaT	human keratinocyte	100 (48h)	100	24	1.3	[278]
	C6	rat glial cells	20 (24h)	20	24	-1.5	[279]
SOD	Jurkat T	human T lymphocyte	40 (24h)	25	24	-1.2	[277]
	HaCaT	human keratinocyte	100 (48h)	100	24	0	[278]
	C6	rat glial cells	20 (24h)	20	24	-1.6	[279]
SOD2	NKE	human proximal convoluted tubule (PCT)	50 (24h)	10	24	1.45	[283]
	NKE	human PCT	50 (24h)	20	24	0	[283]
	SK RC 45	human PCT derived Renal cell carcinoma	20 (24h)	10	24	-0.25	[283]
CAT	Jurkat T	human T lymphocyte	40 (24h)	25	24	0	[277]
	HaCaT	human keratinocyte	100 (48h)	100	24	-2.2	[278]
	C6	rat glial cells	20 (24h)	20	24	-3.8	[279]
GSH	Model	Cell Type	LC₅₀ μM (time)	[Cd] μM	Exposure Time (h)	GSH Level	References
	Jurkat T	human T lymphocyte	40 (24h)	25	24	-1.9	[279]
	HaCaT	human keratinocyte	100 (48h)	100	24	1.7	[278]
	HaCaT	human keratinocyte		25-45	6	1.7	[284]
	C6	rat glial cells	20 (24h)	20	24	-1.7	[279]
	MIN6	insulinoma		1	48	-0.35	[30]
RMC	Rat glomerular mesangial cells			0.5	24	3.3	[280]

Remarkably, the listed experiments (Table 7), and many others in the literature, implement Cd concentrations smaller, but relatively close, to those inducing 50% of cell death. These conditions are not only remote from chronic exposure, given the short duration of the exposure, but also not comparable to low doses of Cd. As already mentioned [145, 206, 207], short-term high concentration exposure to Cd mobilizes the GSH content of the cells, hence the redox homeostasis, whereas extended low-concentration exposure is more likely to induce adaptive mechanisms. Indeed, in several studies sub-lethal treatments, including exposure to Cd itself, preceding a Cd challenge at high concentrations afforded increased levels of resistance to Cd compounds by complex mechanisms [248, 250]. Hormesis certainly belongs to these

mechanisms, but the molecular details are never presented in an integrated and explanatory overview: it is likely that GSH binding to Cd²⁺ and redox adjustment play a role [145, 168, 206, 207].

For cellular models of relevance in diabetes, GSIS is mediated by higher ATP production by mitochondria. It may be postulated that mitochondrial targeting by Cd compounds should perturb insulin secretion by deregulated mitochondrial production of oxidative species and induced oxidative damage [149]. However, this does not seem to happen [30], even though variations of the levels of ROS are associated with insulin secretion [182]. Similarly, redox regulation of cellular glucose uptake cannot be dismissed, but its perturbation by chronic low level Cd exposure is not demonstrated.

8.2.2. Exposure of Cells to PCB

Once PCB are metabolized to hydroxyl derivatives the production of free radicals by high concentrations (100 μM) can damage DNA as shown with breast cells [251]. Indeed, upon continuous exposure over 5 days, the 2-(4-chlorophenyl)-1,4-benzoquinone metabolite of PCB 3 was more potent in inhibiting growth and killing breast and prostate cell models than PCB 153 and the Aroclor 1254 mixture [252]. ROS levels and superoxide dismutase activities were increased in these conditions [252].

Whereas most studies deal with the effects of relatively high concentrations of PCB on hepatic cells, it appears that some congener specificity exists regarding induction of oxidative damage, which complicates inclusion of cellular studies in risk assessment for human populations.

In the case of cells producing or sensitive to insulin, surprisingly few data are available. Insulin secretion was transiently increased, but intracellular production was reduced by exposure of a β -cell model to a mixture of PCB (Aroclor-1254) or non coplanar congeners, whereas this effect was not apparent with a coplanar one [169]. These data and their limitations were presented above (6.2). Recently, maturation over 11 days of a human preadipocyte model into adipocytes was shown to be impaired by exposure to a DL-PCB congener (PCB 126) in the μM range [253]. Earlier data also evidenced inhibition of myotubes formation by several mixtures of PCB (Aroclor), with sensitivity spanning from 0.01 to 8 $\mu\text{g/mL}$ [254]. These data suggest a strong specificity of PCB congeners in the maturation of insulin-sensitive cells, without obvious involvement of oxidative effects.

9. WHAT ARE THE EXPERIMENTAL CONDITIONS MOST SUITABLE TO TACKLE THE PROBLEM OF CHRONIC LOW LEVEL EXPOSURE?

From early evaluations of the total Cd body burden [78], it appears that humans accumulate a few tens of milligrams, probably around one hundred at most [255], in a life time. Assuming constant exposure, hence constant blood levels, for adults, the safety value of 0.5 $\mu\text{g/L}$ in blood indicates that exposure of internal organs of a 70 kg-person does not exceed 0.5 $\mu\text{g (kg bm)}^{-1}$. In terms of dietary intake, with the currently admitted average transfer rates for intestinal absorption, this would translate into the provision of daily 10 $\mu\text{g Cd (kg bm)}^{-1}$ or weekly 70 $\mu\text{g (kg bm)}^{-1}$. Clearly no experimental studies with cell models or animals are available at comparatively low levels (see 8.). The closest experimental design we found implemented daily 80 μg of dietary Cd (kg bm^{-1}) for nearly the whole life of laboratory mice [236]. Despite the absence of adverse effects observed in some other studies using larger concentrations, this chronic comparatively low level treatment revealed perturbed bone metabolism. It implies that using low concentrations of Cd compounds in laboratory experiments is worth carrying out: it may orient to subtle or unexpected changes of valuable significance to characterize chronic diseases, such as diabetes, and the role pollutants may play in their occurrence.

In such circumstances, the toxic substances act in two complementary ways. First, their concentration determines their ability to interact with bio-molecules. This thermody-

amic parameter selects the impacted pathways at low levels of exposure. For instance, Cd^{2+} binding to estrogen receptor α , with a dissociation constant of the order of 5.10^{-10} M [256], is more likely to occur at low concentration than Zn replacement in Zn-finger proteins, with a constant of 2.10^{-8} M [257].

Secondly, and in contrast to a bolus dose, the effect of the toxic compound also depends on the length of its contact with the biological material. Constant supply in chronic exposure leads to saturation of the interacting sites with the highest affinity. The subsequent involvement of other sites, which may be less strongly interacting, can follow with irreversible effects. Also, the characteristics of the traffic of the toxic substances, which fail to be properly handled by detoxification molecules in the long run and to follow excretion pathways, lead to accumulation in some locations. The actual concentration of the toxic compound may thus considerably increase in the concerned cells and organs, which can turn the low level exposure into a local high level one with different molecular targets. It appears very likely that many of the observations reporting oxidative stress originate from such circumstances.

Furthermore, the long-term exposure of animals may occur in periods of considerable development (gestation, youth) or of decrease ability to cope with foreign insults (aging). Consequently, the effects of toxic compounds have little chances to be qualitatively and quantitatively similar with these populations than they are with young adults.

Last, the dynamics of the cellular response to changes inevitably leads to permanent homeostatic adjustments. The molecular and cellular mechanisms at work are diverse, and they afford a changing landscape as to the sensitivity of the biological material to the toxic substances. For these reasons, interpretations relying on a single end-point may be misleading, since they only give a snapshot of a situation that evolves with time.

With these properties, which are mostly shared between PCB and Cd, the occurrence of, successively, the anti-oxidant response and oxidative damage is not easy to include in the mechanism of action of the toxic compounds (Fig. 3): cause, consequence, or both? Whereas there is no doubt that Cd^{2+} brings forth an oxidative challenge to cells, at least by binding to intra-cellular GSH with an apparent dissociation constant in the sub- μM range [258], many cell types may safely cope with it without damage. In order to properly appreciate the intensity of the anti-oxidant response and the occurrence of oxidative damage, it is recommended to keep the pollutant concentration as low as possible in the experimental setup to mimic realistic conditions.

SUMMARY AND CONCLUSION

The abundant data available on Cd toxicity, as reviewed mainly herein for its aspects related to diabetes, are not yet completely satisfactory to derive consensual exposure values which do not induce health problems (if they exist). This statement is valid for most issues of contemporary toxicology concerned with sustained exposure to low doses and chronic diseases, including a similar questioning for PCB used here for comparative purposes.

A first drawback involves the implemented methodologies. Most laboratory studies, either using animals or cell models, implement toxic concentrations way off those found in the environment, with the implicit assumption that the mechanisms observed at high concentrations apply at lower ones. There is now ample evidence that this is clearly not true, and that biological pathways highly sensitive to toxicants may be saturated and become unnoticed by effects affecting other less sensitive pathways at high toxic loads. The subsequent lack of precise knowledge on the most relevant biological interactions involving the contaminants then does not help deriving valid tools to treat the data, as exemplified by the diversity of the theoretical frameworks in which these data are analyzed.

Another difficulty, also relevant for many aspects of toxicology, lies with epidemiological studies. It is associated with problems of directly connecting exposure to pollutants and clear-cut health effects, even in prospective studies. This is due to the rare availability of trustworthy and convenient exposure/effect biomarker couples, as presented here for Cd and PCB. It is of concern that this situation may persist for a large panel of toxicants, by lack of specific health effects in most cases. This limitation is particularly baffling under conditions of chronic low level pollutions for which no overt phenotype is expected in the initial phases, when compensatory measures could be efficiently implemented to avoid later deleterious health effects.

These initial phases of exposure appear particularly critical for two main complementary reasons. First, the pollutant may regularly accumulate within the body, and more specifically in the target organs, until the situation changes from a chronic low level exposure to a locally significant concentration of the toxic compound(s) with damaging consequences. Second, under constant low level exposure, cells and tissues develop means to adjust to the perturbation, hence changing their ability to respond to other external challenges or to the normal physiological functions. This is noticeably insidious as the adaptation mechanisms are diverse and include adjustments of signaling cascades at the cross-roads of multiple metabolic, regulatory, and developmental pathways. To sort out a single example valid for both Cd and PCB, the hormone-like activity of these compounds, classifying them as endocrine disruptors, likely participates to the adaptive changes occurring under low level exposure.

In order to progress in the evaluation of the potential biological and health effects of Cd and PCB at low doses, experimental work should benefit from data obtained at environmentally relevant concentrations. As detailed above, this means weekly provision of a few μg $(\text{kg bm})^{-1}$ *via* the diet for Cd and a few hundreds of ng $(\text{kg bm})^{-1}$ for PCB. When dealing with cellular studies, the observed blood concentrations measured for different populations should guide the design of experiments: the values are below $5 \mu\text{g/L}$ [101, 102, 259] for both Cd and PCB. It has to be stressed that very few studies have been carried out with these concentrations. Also, at such low concentrations observations made with generic models cannot be translated to specialized cell types as some functions, such as insulin secretion for instance as discussed herein, may be particularly sensitive to weak stresses.

In this context, is oxidative stress relevant at the onset of chronic diseases such as diabetes under exposure to low levels of Cd or PCB?

First it has been stressed above that it is useful to make a difference between oxidative damage and the anti-oxidant response. Detection of these two types of phenomena is possible, but it involves different technical means and different signatures and biomarkers. The experimental and conceptual confusion between the two has generated contradictory results in the literature as summarized in Tables 5-7.

Second, the widespread use of a single endpoint in a majority of studies conceals the complexity of the phenomena occurring upon exposure to contaminants such as Cd or PCB. In particular, kinetic data relative to exposure of naive biological material are needed to reveal the successive phases exhibited by the different experimental models under different conditions. Furthermore, it becomes mandatory nowadays to obtain quantitative data in order to proceed beyond the simple relative comparison between exposed and non-exposed material. Efficient theoretical tools exist and are developing to deal with such data, so that contemporary toxicology may be elevated to a higher level of analysis. The usefulness of quantitative observations and their proper treatment is notably crucial to evaluate the oxidative challenge triggered by chronic low level exposure to Cd and PCB. The questioning about the precise link between Cd toxicity and oxidative stress has already been discussed in a more general context than diabetes alone [206]. From the available information updated here with focus on diabetes, it seems that the anti-oxidant response is effective at the lowest concentrations, possibly even those in the range of the TWI. But oxidative stress *per se*, as witnessed by oxidative damage to biological material, seems a later process occurring after considerable accumulation in specific locations, *i.e.* target organs.

LIST OF ABBREVIATIONS

8-oxodG	= 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
ADME	= Absorption, distribution, metabolism and excretion
AhR	= Aryl hydrocarbon receptor
ATSDR	= United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry
B2M	= β 2-microglobulin
bm	= Body mass
CYP	= Cytochrome
DL/NDL	= Dioxin-like/non dioxin-like
EFSA	= European Food Safety Authority
EPA	= United States Environmental Protection Agency
FAO	= Food and Agriculture Organization of the United Nations

JEFCA	= Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
GSIS	= Glucose stimulated insulin secretion
HOMA-IR & HOMA- β	= Homeostatic model assessment-insulin resistance and β cell function, respectively
KIM-1	= Kidney injury molecule-1
LOAEL	= Lowest Observed Adverse Effect Level
MDA	= Malondialdehyde
MT	= Metallothioneins
MRL	= Minimal risk level
NAG	= <i>N</i> -acetyl- β -glucosaminidase
NHANES	= National Health and Nutrition Examination Survey
OR	= Odd ratio
OSHA	= United States Occupational Safety and Health Administration
PCB	= Polychlorinated dibenzyls
POP	= Persistent organic pollutants
ROS	= Reactive oxygen species
TCDD	= 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin
TEF	= Toxicity equivalency factor
TWI	= Tolerated weekly intake
WHO	= World health organization

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of the work of the authors is supported by a grant from *Agence Nationale de la Recherche* ANR-13-CESA-008-Cadmidia.

REFERENCES

- Tsuchiya K. Causation of Ouch-Ouch Disease (Itai-Itai Byo)-an introductory review. II. Epidemiology and evaluation. *Keio J Med* 1969; 18(4): 195-211.
- Tsuchiya K. Causation of Ouch-Ouch Disease (Itai-Itai Byo)-an introductory review. I. Nature of the disease. *Keio J Med* 1969; 18(4): 181-94.
- Kjellström T, Friberg L, Rahnster B. Mortality and cancer morbidity among cadmium-exposed workers. *Environ Health Perspect* 1979; 28: 199-204.
- Moulis JM, Thevenod F. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals* 2010; 23(5): 763-8.
- Scinicariello F, Buser MC. Blood cadmium and depressive symptoms in young adults (aged 20-39 years). *Psychol Med* 2014; 10.1017/S0033291714001883: 1-9.
- Kim JH, Jeong KS, Ha EH, *et al.* Association between prenatal exposure to cadmium and atopic dermatitis in infancy. *J Korean Med Sci* 2013; 28(4): 516-21.
- Maret W, Moulis JM. The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. *Met Ions Life Sci* 2013; 11: 1-29.
- Moulis JM, Bourguignon J, Catty P. Cadmium. In: Maret W, Wedd A, Eds. *Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells*. Cambridge, UK: Royal Chemical Society; 2014. p. 695-746.
- Chang YF, Wen JF, Cai JF, Xiao-Ying W, Yang L, Guo YD. An investigation and pathological analysis of two fatal cases of cadmium poisoning. *Forensic Sci Int* 2012; 220(1-3): e5-8.
- ATSDR. *Toxicological Profile for Cadmium*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, 2012 September 2012. Report No.
- EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *EFSA J* 2009; 980: 1-139.
- Bernhoft RA. Cadmium toxicity and treatment. *Sci World J* 2013; 2013: 394652.
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, *et al.* Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals* 2010; 23(5): 769-82.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect* 2010; 118(2): 182-90.
- Thévenod F, Lee WK. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Met Ions Life Sci* 2013; 11: 415-90.
- WHO. *Exposure to Cadmium: a major public health concern*. WHO Document Production Services. Geneva: World Health Organization, 2010.
- Nordberg GF, Herber RFM, Alessio L. Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity: World Health Organization; 1992. p. 481.
- Bräuner EV, Raaschou-Nielsen O, Gaudreau E, *et al.* Predictors of polychlorinated biphenyl concentrations in adipose tissue in a general Danish population. *Environ Sci Technol* 2011; 45(2): 679-85.
- Chen YW, Yang CY, Huang CF, Hung DZ, Leung YM, Liu SH. Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets* 2009; 1(3): 169-76.
- Edwards JR, Prozialeck WC. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(3): 289-93.
- Satarug S, Moore MR. Emerging roles of cadmium and heme oxygenase in type-2 diabetes and cancer susceptibility. *Tohoku J Exp Med* 2012; 228(4): 267-88.
- Afridi HI, Kazi TG, Brabazon D, Naher S, Talpur FN. Comparative metal distribution in scalp hair of Pakistani and Irish referents and diabetes mellitus patients. *Clin Chim Acta* 2013; 415: 207-14.
- Schwartz GG, Ilyasova D, Ivanova A. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care* 2003; 26(2): 468-70.
- Wallia A, Allen NB, Badon S, El Muayed M. Association between urinary cadmium levels and prediabetes in the NHANES 2005-2010 population. *Int J Hyg Environ Health* 2014; 217(8): 854-60.
- Haswell-Elkins M, Imray P, Satarug S, Moore MR, O'Dea K. Urinary excretion of cadmium among Torres Strait Islanders (Australia) at risk of elevated dietary exposure through traditional foods. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007; 17(4): 372-7.
- Maruzeni S, Nishijo M, Nakamura K, *et al.* Mortality and causes of deaths of inhabitants with renal dysfunction induced by cadmium exposure of the polluted Jinzu River basin, Toyama, Japan; a 26-year follow-up. *Environ Health* 2014; 13(1): 18.
- Wiwantikit V. Cadmium related health effects. *Environ Res* 2012; 112: 236; author reply 7-8.
- Swaddiwudhipong W, Limpitanachote P, Mahasakpan P, Krinratun S, Punta B, Funkhiew T. Progress in cadmium-related health effects in persons with high environmental exposure in northwestern Thailand: a five-year follow-up. *Environ Res* 2012; 112: 194-8.
- Lei LJ, Chen L, Jin TY, Nordberg M, Chang XL. Estimation of benchmark dose for pancreatic damage in cadmium-exposed smelters. *Toxicol Sci* 2007; 97(1): 189-95.
- El Muayed M, Raja MR, Zhang X, *et al.* Accumulation of cadmium in insulin-producing beta cells. *Islets* 2012; 4(6): 405-16.
- Borné Y, Fagerberg B, Persson M, *et al.* Cadmium exposure and incidence of diabetes mellitus - results from the Malmö Diet and Cancer study. *PLoS One* 2014; 9(11): e112277.
- Barregard L, Bergstrom G, Fagerberg B. Cadmium exposure in relation to insulin production, insulin sensitivity and type 2

- diabetes: a cross-sectional and prospective study in women. *Environ Res* 2013; 121: 104-9.
- [33] Moon SS. Association of lead, mercury and cadmium with diabetes in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Diabet Med* 2013; 30(4): e143-8.
- [34] Swaddiwudhipong W, Mahasakpan P, Limpatanachote P, Krinratun S. Correlations of urinary cadmium with hypertension and diabetes in persons living in cadmium-contaminated villages in northwestern Thailand: A population study. *Environ Res* 2010; 110(6): 612-6.
- [35] Kuo CC, Moon K, Thayer KA, Navas-Acien A. Environmental chemicals and type 2 diabetes: an updated systematic review of the epidemiologic evidence. *Curr Diab Rep* 2013; 13(6): 831-49.
- [36] Ithakissios DS, Ghafghazi T, Mennear JH, Kessler WV. Effect of multiple doses of cadmium on glucose metabolism and insulin secretion in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 31(1): 143-9.
- [37] Merali Z, Singhal RL. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. *Br J Pharmacol* 1980; 69(1): 151-7.
- [38] Asagba SO. Biochemical changes in urine and plasma of rats in food chain-mediated cadmium toxicity. *Toxicol Ind Health* 2010; 26(8): 459-67.
- [39] Lovášová E, Rácz O, Cimbaláková I, Nováková J, Dombrovsky P, Ništiar F. Effects of chronic low-dose cadmium exposure on selected biochemical and antioxidant parameters in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2013; 76(17): 1033-8.
- [40] Ficková M, Eybl V, Kotyzová D, Mičková V, Möstbök S, Brtko J. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. *Biomaterials* 2003; 16(4): 561-6.
- [41] Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1991; 266(29): 19438-49.
- [42] Yamamoto A, Wada O, Ono T, Ono H, Manabe S, Ishikawa S. Cadmium-induced stimulation of lipogenesis from glucose in rat adipocytes. *Biochem J* 1984; 219(3): 979-84.
- [43] Jin T, Nordberg G, Sehlin J, Wallin H, Sandberg S. The susceptibility to nephrotoxicity of streptozotocin-induced diabetic rats subchronically exposed to cadmium chloride in drinking water. *Toxicology* 1999; 142(1): 69-75.
- [44] Bernard A, Schadeck C, Cardenas A, Buchet JP, Lauwerys R. Potentiation of diabetic glomerulopathy in uninephrectomized rats subchronically exposed to cadmium. *Toxicol Lett* 1991; 58(1): 51-7.
- [45] Taylor KW, Novak RF, Anderson HA, *et al.* Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review. *Environ Health Perspect* 2013; 121(7): 774-83.
- [46] Lee DH, Porta M, Jacobs DR, Jr, Vandenberg LN. Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2014; 35(4): 557-601.
- [47] Dirinck EL, Dirtu AC, Govindan M, Covaci A, Van Gaal LF, Jorens PG. Exposure to persistent organic pollutants: relationship with abnormal glucose metabolism and visceral adiposity. *Diabetes Care* 2014; 37(7): 1951-8.
- [48] Everett CJ, Thompson OM. Dioxins, furans and dioxin-like PCBs in human blood: causes or consequences of diabetic nephropathy? *Environ Res* 2014; 132: 126-31.
- [49] Kim KS, Lee YM, Kim SG, *et al.* Associations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in visceral vs. subcutaneous adipose tissue with type 2 diabetes and insulin resistance. *Chemosphere* 2014; 94: 151-7.
- [50] Jensen TK, Timmermann AG, Rossing LI, *et al.* Polychlorinated biphenyl exposure and glucose metabolism in 9-year-old danish children. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(12): E2643-51.
- [51] Tang M, Chen K, Yang F, Liu W. Exposure to organochlorine pollutants and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(10): e85556.
- [52] McFarland VA, Clarke JU. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ Health Perspect* 1989; 81: 225-39.
- [53] Lee DH, Steffes MW, Sjodin A, Jones RS, Needham LL, Jacobs DR, Jr. Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 2010; 118(9): 1235-42.
- [54] Wolff MS, Camann D, Gammon M, Stellman SD. Proposed PCB congener groupings for epidemiological studies. *Environ Health Perspect* 1997; 105(1): 13-4.
- [55] Kohlmeier L, Kohlmeier M. Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ Health Perspect* 1995; 103 (Suppl 3): 99-106.
- [56] Archibeque-Engle SL, Tessari JD, Winn DT, Keefe TJ, Nett TM, Zheng T. Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum. *J Toxicol Environ Health* 1997; 52(4): 285-93.
- [57] Arrebola JP, Pumarega J, Gasull M, *et al.* Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ Res* 2013; 122: 31-7.
- [58] Donat-Vargas C, Gea A, Sayon-Orea C, Carlos S, Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M. Association between dietary intakes of PCBs and the risk of obesity: the SUN project. *J Epidemiol Community Health* 2014; 68(9): 834-41.
- [59] Kim DW, Kim KY, Choi BS, *et al.* Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch Toxicol* 2007; 81(5): 327-34.
- [60] Cherian MG. Metabolism of orally administered cadmium-metallothionein in mice. *Environ Health Perspect* 1979; 28: 127-30.
- [61] Langelueddecke C, Lee WK, Thevenod F. Differential transcytosis and toxicity of the hNGLA receptor ligands cadmium-metallothionein and cadmium-phytochelatin in colon-like Caco-2 cells: implications for *in vivo* cadmium toxicity. *Toxicol Lett* 2014; 226(2): 228-35.
- [62] Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillen MD, Schneider K, Weyand EH. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Toxicol* 2004; 23(5): 301-33.
- [63] Bergman A, Larsen GL, Bakke LE. Biliary secretion, retention and excretion of five 14 C-labelled polychlorinated biphenyls in the rat. *Chemosphere* 1982; 11(3): 249-53.
- [64] Schlummer M, Moser GA, McLachlan MS. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs, and HCB in humans: mass balances and mechanistic considerations. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 152(1): 128-37.
- [65] Tanabe S, Nakagawa Y, Tatsukawa R. Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products. *Agric Biol Chem* 1981; 45: 717-26.
- [66] Mori C, Nakamura N, Todaka E, *et al.* Correlation between human maternal-fetal placental transfer and molecular weight of PCB and dioxin congeners/isomers. *Chemosphere* 2014; 114: 262-7.
- [67] Hjelmborg PS, Andreassen TK, Bonefeld-Jorgensen EC. Cellular uptake of lipoproteins and persistent organic compounds-an update and new data. *Environ Res* 2008; 108(2): 192-8.
- [68] Ljunggren SA, Helmfriid I, Salihovic S, *et al.* Persistent organic pollutants distribution in lipoprotein fractions in relation to cardiovascular disease and cancer. *Environ Int* 2014; 65: 93-9.
- [69] Mohammed A, Eklund A, Ostlund-Lindqvist AM, Slanina P. Distribution of toxaphene, DDT, and PCB among lipoprotein fractions in rat and human plasma. *Arch Toxicol* 1990; 64(7): 567-71.
- [70] Brown JF, Jr., Lawton RW, Morgan CB. PCB metabolism, persistence, and health effects after occupational exposure: implications for risk assessment. *Chemosphere* 1994; 29(9-11): 2287-94.
- [71] Saghir SA, Koritz GD, Hansen LG. Short-term distribution, metabolism, and excretion of 2,2',5-tri-, 2, 2',4,4'-tetra-, and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyls in prepubertal rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; 36(2): 213-20.
- [72] Letcher RJ, Klasson-Wehler E, Bergman A. Methyl sulphone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In: Paarsivirta J, Ed. *Handbook of environmental chemistry: Anthropogenic compounds - New types of persistent halogenated compounds*. Heidelberg: Springer Verlag; 2000. p. 315-59.
- [73] Gibson GG, Skett P. *Introduction to drug metabolism*. 3rd ed: Nelson Thornes Ltd; 2002. p. 256.
- [74] Nebbia C. Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Vet J* 2001; 161(3): 238-52.

- [75] Dybing E, Doe J, Groten J, *et al.* Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(2-3): 237-82.
- [76] Ilett KF, Tee LB, Reeves PT, Minchin RF. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmacol Ther* 1990; 46(1): 67-93.
- [77] Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, Wolff NA, Lee WK, Thevenod F. Lipocalin-2 (24p3/Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL)) receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. *J Biol Chem* 2012; 287(1): 159-69.
- [78] Kjellström T. Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden. *Environ Health Perspect* 1979; 28: 169-97.
- [79] Bachour G, Failing K, Georgii S, Elmalfi I, Brunn H. Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer, and humans. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998; 35(4): 666-73.
- [80] Schecter A, Stanley J, Boggess K, *et al.* Polychlorinated biphenyl levels in the tissues of exposed and nonexposed humans. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1: 149-58.
- [81] Kania-Korwel I, Hornbuckle KC, Peck A, *et al.* Congener-specific tissue distribution of aroclor 1254 and a highly chlorinated environmental PCB mixture in rats. *Environ Sci Technol* 2005; 39(10): 3513-20.
- [82] Hardell E, Carlberg M, Nordstrom M, van Bavel B. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993-2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci Total Environ* 2010; 408(20): 4412-9.
- [83] Busbee DL, Yoo JS, Norman JO, Joe CO. Polychlorinated biphenyl uptake and transport by lymph and plasma components. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; 179(1): 116-22.
- [84] Tonnelier A, Coecke S, Zaldivar JM. Screening of chemicals for human bioaccumulative potential with a physiologically based toxicokinetic model. *Arch Toxicol* 2012; 86(3): 393-403.
- [85] Dahl P, Lindstrom G, Wiberg K, Rappe C. Absorption of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans by breast-fed infants. *Chemosphere* 1995; 30(12): 2297-306.
- [86] McLachlan MS. Digestive tract absorption of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in a nursing infant. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 123(1): 68-72.
- [87] Bergkvist C, Lignell S, Sand S, *et al.* A probabilistic approach for estimating infant exposure to environmental pollutants in human breast milk. *J Environ Monit* 2010; 12(5): 1029-36.
- [88] Bergkvist C, Aune M, Nilsson I, *et al.* Occurrence and levels of organochlorine compounds in human breast milk in Bangladesh. *Chemosphere* 2012; 88(7): 784-90.
- [89] Lignell S, Aune M, Darnerud PO, Cnattingius S, Glynn A. Persistent organochlorine and organobromine compounds in mother's milk from Sweden 1996-2006: compound-specific temporal trends. *Environ Res* 2009; 109(6): 760-7.
- [90] Malarvannan G, Isobe T, Covaci A, Prudente M, Tanabe S. Accumulation of brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk and scalp hair from the Philippines: levels, distribution and profiles. *Sci Total Environ* 2013; 442: 366-79.
- [91] Sun S, Zhao J, Leng J, *et al.* Levels of dioxins and polybrominated diphenyl ethers in human milk from three regions of northern China and potential dietary risk factors. *Chemosphere* 2010; 80(10): 1151-9.
- [92] Xing GH, Chan JK, Leung AO, Wu SC, Wong MH. Environmental impact and human exposure to PCBs in Guiyu, an electronic waste recycling site in China. *Environ Int* 2009; 35(1): 76-82.
- [93] Petersson Grawe K, Oskarsson A. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. *Arch Toxicol* 2000; 73(10-11): 519-27.
- [94] Aylward LL, Hays SM, Kirman CR, *et al.* Relationships of chemical concentrations in maternal and cord blood: a review of available data. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2014; 17(3): 175-203.
- [95] Rudge CV, Rollin HB, Nogueira CM, Thomassen Y, Rudge MC, Odland JO. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *J Environ Monit* 2009; 11(7): 1322-30.
- [96] Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kubota M, Murata K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 84: 179-84.
- [97] Järup L, Åkesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(3): 201-8.
- [98] Roels HA, Hoet P, Lison D. Usefulness of biomarkers of exposure to inorganic mercury, lead, or cadmium in controlling occupational and environmental risks of nephrotoxicity. *Ren Fail* 1999; 21(3-4): 251-62.
- [99] Chaumont A, Voisin C, Deumer G, *et al.* Associations of urinary cadmium with age and urinary proteins: further evidence of physiological variations unrelated to metal accumulation and toxicity. *Environ Health Perspect* 2013; 121(9): 1047-53.
- [100] Prozialeck WC, Edwards JR. Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *Biomaterials* 2010; 23(5): 793-809.
- [101] Batářiová A, Špeváčková V, Benes B, Cejchanová M, Smíd J, Cerná M. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209(4): 359-66.
- [102] Bjeremo H, Sand S, Nalsen C, *et al.* Lead, mercury, and cadmium in blood and their relation to diet among Swedish adults. *Food Chem Toxicol* 2013; 57: 161-9.
- [103] Hussein Were F, Njue W, Murungi J, Wanjau R. Use of human nails as bio-indicators of heavy metals environmental exposure among school age children in Kenya. *Sci Total Environ* 2008; 393(2-3): 376-84.
- [104] Kim M, Kim K. Biomonitoring of lead and cadmium in the hair and fingernails of elderly Korean subjects. *Biol Trace Elem Res* 2011; 143(2): 794-802.
- [105] Nakadaira H, Nishi S. Effects of low-dose cadmium exposure on biological examinations. *Sci Total Environ* 2003; 308(1-3): 49-62.
- [106] Pennemans V, De Winter LM, Munters E, *et al.* The association between urinary kidney injury molecule 1 and urinary cadmium in elderly during long-term, low-dose cadmium exposure: a pilot study. *Environ Health* 2011; 10: 77.
- [107] Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 463-93.
- [108] Andujar P, Bensefá-Colas L, Descatha A. Acute and chronic cadmium poisoning. *Rev Med Interne* 2010; 31(2): 107-15.
- [109] Ruangyuttikarn W, Panyamoon A, Nambunmee K, Honda R, Swaddiwudhipong W, Nishijo M. Use of the kidney injury molecule-1 as a biomarker for early detection of renal tubular dysfunction in a population chronically exposed to cadmium in the environment. *Springerplus* 2013; 2: 533.
- [110] Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, Liu J, Vaidya VS, Bonventre JV. Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(3): 306-14.
- [111] Wallin M, Sallsten G, Lundh T, Barregard L. Low-level cadmium exposure and effects on kidney function. *Occup Environ Med* 2014; 71(12): 848-54.
- [112] Åkesson A, Bjellerup P, Lundh T, *et al.* Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environ Health Perspect* 2006; 114(6): 830-4.
- [113] Aoshima K, Fan J, Cai Y, Katoh T, Teranishi H, Kasuya M. Assessment of bone metabolism in cadmium-induced renal tubular dysfunction by measurements of biochemical markers. *Toxicol Lett* 2003; 136(3): 183-92.
- [114] Schutte R, Nawrot TS, Richart T, *et al.* Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environ Health Perspect* 2008; 116(6): 777-83.
- [115] Sughris M, Penders J, Haufroid V, Nemery B, Nawrot TS. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in children: a cross-sectional study. *Environ Health* 2011; 10: 104.
- [116] Vasikaran SD. Bone turnover markers. The impact of assay standardization on assessing and monitoring osteoporosis. *Clin Lab News* 2013; 39(7): 10-2.
- [117] Alfvén T, Elinder CG, Carlsson MD, *et al.* Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000; 15(8): 1579-86.
- [118] Nawrot T, Geusens P, Nulens TS, Nemery B. Occupational cadmium exposure and calcium excretion, bone density, and osteoporosis in men. *J Bone Miner Res* 2010; 25(6): 1441-5.
- [119] WHO. Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level 2007.

- [120] Chu S, Covaci A, Schepens P. Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium. *Environ Res* 2003; 93(2): 167-76.
- [121] Ritter R, Scheringer M, MacLeod M, Moeckel C, Jones KC, Hungerbühler K. Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom. *Environ Health Perspect* 2011; 119(2): 225-31.
- [122] Wimmerová S, Lancz K, Tihányi J, *et al.* Half-lives of serum PCB congener concentrations in environmentally exposed early adolescents. *Chemosphere* 2011; 82(5): 687-91.
- [123] Antunes-Fernandes EC, Bovee TF, Daamen FE, Helsdingen RJ, van den Berg M, van Duursen MB. Some OH-PCBs are more potent inhibitors of aromatase activity and (anti-) glucocorticoids than non-dioxin like (NDL)-PCBs and MeSO(2)-PCBs. *Toxicol Lett* 2011; 206(2): 158-65.
- [124] van Ede KI, Gaisch KP, van den Berg M, van Duursen MB. Differential relative effect potencies of some dioxin-like compounds in human peripheral blood lymphocytes and murine splenic cells. *Toxicol Lett* 2014; 226(1): 43-52.
- [125] Vorrink SU, Severson PL, Kulak MV, Futscher BW, Domann FE. Hypoxia perturbs aryl hydrocarbon receptor signaling and CYP1A1 expression induced by PCB 126 in human skin and liver-derived cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 274(3): 408-16.
- [126] Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect* 2003; 111(12): 1505-11.
- [127] Korytko PJ, Casey AC, Bush B, Quimby FW. Induction of hepatic cytochromes P450 in dogs exposed to a chronic low dose of polychlorinated biphenyls. *Toxicol Sci* 1999; 47(1): 52-61.
- [128] Fitzgerald EF, Hwang SA, Langguth K, *et al.* Fish consumption and other environmental exposures and their associations with serum PCB concentrations among Mohawk women at Akwesasne. *Environ Res* 2004; 94(2): 160-70.
- [129] Silkworth JB, Koganti A, Illouz K, Possolo A, Zhao M, Hamilton SB. Comparison of TCDD and PCB CYP1A induction sensitivities in fresh hepatocytes from human donors, sprague-dawley rats, and rhesus monkeys and HepG2 cells. *Toxicol Sci* 2005; 87(2): 508-19.
- [130] van Duursen MB, Sanderson JT, van den Berg M. Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. *Toxicol Sci* 2005; 85(1): 703-12.
- [131] Campagna R, Brunelli L, Airoldi L, *et al.* Cerebellum proteomics addressing the cognitive deficit of rats perinatally exposed to the food-relevant polychlorinated biphenyl 138. *Toxicol Sci* 2011; 123(1): 170-9.
- [132] Elabbas LE, Esteban J, Barber X, *et al.* In utero and lactational exposure to a mixture of environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations alters retinoid levels in rat offspring with low margins of exposure. *J Toxicol Environ Health A* 2014; 77(5): 223-45.
- [133] van der Burght AS, Clijsters PJ, Horbach GJ, Andersson PL, Tysklind M, van den Berg M. Structure-dependent induction of CYP1A by polychlorinated biphenyls in hepatocytes of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 155(1): 13-23.
- [134] Gähns M, Roos R, Andersson PL, Schrenk D. Role of the nuclear xenobiotic receptors CAR and PXR in induction of cytochromes P450 by non-dioxinlike polychlorinated biphenyls in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272(1): 77-85.
- [135] Desforges JP, Ross PS, Dangerfield N, Palace VP, Whitticar M, Loseto LL. Vitamin A and E profiles as biomarkers of PCB exposure in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the western Canadian Arctic. *Aquat Toxicol* 2013; 142-143: 317-28.
- [136] Meeker JD, Altshul L, Hauser R. Serum PCBs, p,p'-DDE and HCB predict thyroid hormone levels in men. *Environ Res* 2007; 104(2): 296-304.
- [137] Van Den Heuvel RL, Koppen G, Staessen JA, *et al.* Immunologic biomarkers in relation to exposure markers of PCBs and dioxins in Flemish adolescents (Belgium). *Environ Health Perspect* 2002; 110(6): 595-600.
- [138] Bertin G, Averbek D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 2006; 88(11): 1549-59.
- [139] Hartwig A. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biomaterials* 2010; 23(5): 951-60.
- [140] Moulis JM. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biomaterials* 2010; 23(5): 877-96.
- [141] Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(3): 192-200.
- [142] Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res* 2014; 24(4): 378-99.
- [143] Templeton DM, Liu Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem Biol Interact* 2010; 188(2): 267-75.
- [144] Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533(1-2): 107-20.
- [145] Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192(2-3): 95-117.
- [146] Haase H, Rink L. Immunotoxicology of Cadmium. In: Parvau RG, Ed. *Cadmium in the Environment*: Nova Science Publishers, Inc.; 2009. p. 447-60.
- [147] Nilsson T, Berggren PO, Hellman B. Cadmium-induced insulin release does not involve changes in intracellular handling of calcium. *Biochim Biophys Acta* 1987; 929(1): 81-7.
- [148] Benters J, Flogel U, Schafer T, Leibfritz D, Hechtenberg S, Beyersmann D. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using 19F-NMR spectroscopy. *Biochem J* 1997; 322 (Pt 3): 793-9.
- [149] Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 2009; 9(6): 377-84.
- [150] Maassen JA, Janssen GM, Hart LM. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). *Ann Med* 2005; 37(3): 213-21.
- [151] Belyaeva EA, Sokolova TV, Emelyanova LV, Zakharova IO. Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: effects of cadmium, mercury, and copper. *Sci World J* 2012; 2012: 136063.
- [152] Gavazzo P, Morelli E, Marchetti C. Susceptibility of insulinoma cells to cadmium and modulation by L-type calcium channels. *Biomaterials* 2005; 18(2): 131-42.
- [153] Lee WK, Spielmann M, Bork U, Thevenod F. Cd²⁺-induced swelling-contraction dynamics in isolated kidney cortex mitochondria: role of Ca²⁺ uniporter, K⁺ cycling, and protonmotive force. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289(3): C656-64.
- [154] Chang KC, Hsu CC, Liu SH, *et al.* Cadmium induces apoptosis in pancreatic beta-cells through a mitochondria-dependent pathway: The role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *PLoS One* 2013; 8(2): e54374.
- [155] Chen L, Xu B, Liu L, *et al.* Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(5): 624-32.
- [156] Islam MS, Loots du T. Diabetes, metalloprotein, and zinc interactions: a review. *Biofactors* 2007; 29(4): 203-12.
- [157] Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, *et al.* In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 20): 4199-206.
- [158] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445(7130): 881-5.
- [159] Hardy AB, Wijesekara N, Genkin I, *et al.* Effects of high-fat diet feeding on Znt8-null mice: differences between beta-cell and global knockout of Znt8. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(9): E1084-96.
- [160] Yamamoto A, Wada O, Ono T, Ono H. Cadmium stimulates glucose metabolism in rat adipocytes. *J Inorg Biochem* 1986; 27(3): 221-6.
- [161] Ezaki O. IIB group metal ions (Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1989; 264(27): 16118-22.
- [162] Han JC, Park SY, Hah BG, *et al.* Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 2003; 413(2): 213-20.
- [163] Kawakami T, Sugimoto H, Furuichi R, *et al.* Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology* 2010; 267(1-3): 20-6.

- [164] Hansen JB, Tonnesen MF, Madsen AN, *et al.* Divalent metal transporter 1 regulates iron-mediated ROS and pancreatic beta cell fate in response to cytokines. *Cell Metab* 2012; 16(4): 449-61.
- [165] Prozialeck WC, Edwards JR. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacol Ther* 2007; 114(1): 74-93.
- [166] Wilson M, Hogstrand C, Maret W. Picomolar concentrations of free zinc(II) ions regulate receptor protein-tyrosine phosphatase beta activity. *J Biol Chem* 2012; 287(12): 9322-6.
- [167] Haase H, Ober-Blobaum JL, Engelhardt G, Hebel S, Rink L. Cadmium ions induce monocytic production of tumor necrosis factor-alpha by inhibiting mitogen activated protein kinase dephosphorylation. *Toxicol Lett* 2010; 198(2): 152-8.
- [168] Hartwig A. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radic Biol Med* 2013; 55: 63-72.
- [169] Fischer LJ, Zhou HR, Wagner MA. Polychlorinated biphenyls release insulin from RINm5F cells. *Life Sci* 1996; 59(24): 2041-9.
- [170] Fischer LJ, Wagner MA, Madhukar BV. Potential involvement of calcium, CaM kinase II, and MAP kinases in PCB-stimulated insulin release from RINm5F cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 159(3): 194-203.
- [171] Crinnion WJ. Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Altern Med Rev* 2011; 16(1): 5-13.
- [172] Faqi AS, Dalsenter PR, Mathar W, Heinrich-Hirsch B, Chahoud I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB 77) in male adult rats. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17(3): 151-6.
- [173] Mocarelli P, Gerthoux PM, Patterson DG, Jr, *et al.* Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ Health Perspect* 2008; 116(1): 70-7.
- [174] Baccarelli A, Giacomini SM, Corbetta C, *et al.* Neonatal thyroid function in Seveso 25 years after maternal exposure to dioxin. *PLoS Med* 2008; 5(7): e161.
- [175] Arnold DL, Bryce F, Karpinski K, *et al.* Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. Part 1B. Prebreeding phase: clinical and analytical laboratory findings. *Food Chem Toxicol* 1993; 31(11): 811-24.
- [176] Arnold DL, Bryce F, Stapley R, *et al.* Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. Part 1A. Prebreeding phase: clinical health findings. *Food Chem Toxicol* 1993; 31(11): 799-810.
- [177] Tryphonas H, Hayward S, O'Grady L, *et al.* Immunotoxicity studies of PCB (Aroclor 1254) in the adult rhesus (*Macaca mulatta*) monkey-preliminary report. *Int J Immunopharmacol* 1989; 11(2): 199-206.
- [178] Tryphonas H, Luster MI, Schiffman G, *et al.* Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and nonspecific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey. *Fundam Appl Toxicol* 1991; 16(4): 773-86.
- [179] Tilson HA, Jacobson JL, Rogan WJ. Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12(3): 239-48.
- [180] Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, *et al.* Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 355-66.
- [181] Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, *et al.* Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Dis* 2011; 2: e134.
- [182] Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009; 58(3): 673-81.
- [183] Cuyper A, Plusquin M, Remans T, *et al.* Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 2010; 23(5): 927-40.
- [184] Nair AR, Degheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuyper A. Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost (or not)? *Int J Mol Sci* 2013; 14(3): 6116-43.
- [185] Prozialeck WC. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 164(3): 231-49.
- [186] Edwards JR, Kolman K, Lamar PC, Chandar N, Fay MJ, Prozialeck WC. Effects of cadmium on the sub-cellular localization of beta-catenin and beta-catenin-regulated gene expression in NRK-52E cells. *Biometals* 2013; 26(1): 33-42.
- [187] Kitamura M, Hiramatsu N. The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals* 2010; 23(5): 941-50.
- [188] Thévenod F, Lee WK. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch Toxicol* 2013; 87(10): 1743-86.
- [189] Kawakami T, Nishiyama K, Kadota Y, Sato M, Inoue M, Suzuki S. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272(3): 625-36.
- [190] Czech MP, Lawrence JC, Jr., Lynn WS. Evidence for electron transfer reactions involved in the Cu2+ -dependent thiol activation of fat cell glucose utilization. *J Biol Chem* 1974; 249(4): 1001-6.
- [191] Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(7-8): 1040-52.
- [192] De S, Ghosh S, Chatterjee R, *et al.* PCB congener specific oxidative stress response by microarray analysis using human liver cell line. *Environ Int* 2010; 36(8): 907-17.
- [193] Shen K, Shen C, Yu J, *et al.* PCB congeners induced mitochondrial dysfunction in Vero cells. *J Hazard Mater* 2011; 185(1): 24-8.
- [194] Dreiem A, Rykken S, Lehmler HJ, Robertson LW, Fonnum F. Hydroxylated polychlorinated biphenyls increase reactive oxygen species formation and induce cell death in cultured cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 240(2): 306-13.
- [195] Zhu Y, Mapuskar KA, Marek RF, *et al.* A new player in environmentally induced oxidative stress: polychlorinated biphenyl congener, 3,3'-dichlorobiphenyl (PCB11). *Toxicol Sci* 2013; 136(1): 39-50.
- [196] Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, Swanson H, Cassis LA. Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ Health Perspect* 2008; 116(6): 761-8.
- [197] Kim MJ, Pelloux V, Guyot E, *et al.* Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environ Health Perspect* 2012; 120(4): 508-14.
- [198] Baker NA, Karounos M, English V, *et al.* Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. *Environ Health Perspect* 2013; 121(1): 105-10.
- [199] Baker NA, English V, Sunkara M, Morris AJ, Pearson KJ, Cassis LA. Resveratrol protects against polychlorinated biphenyl-mediated impairment of glucose homeostasis in adipocytes. *J Nutr Biochem* 2013; 24(12): 2168-74.
- [200] Huang M, Choi SJ, Kim DW, *et al.* Risk assessment of low-level cadmium and arsenic on the kidney. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72(21-22): 1493-8.
- [201] Muzembo BA, Narongpon D, Ngatu NR, Eitoku M, Hirota R, Sukanuma N. Assessment of lifestyle effect on oxidative stress biomarkers in free-living elderly in rural Japan. *Geriatr Gerontol Int* 2012; 12(3): 547-54.
- [202] Hambach R, Lison D, D'Haese P, *et al.* Adverse effects of low occupational cadmium exposure on renal and oxidative stress biomarkers in solderers. *Occup Environ Med* 2013; 70(2): 108-13.
- [203] Bizoń A, Antonowicz-Juchniewicz J, Andrzejak R, Milnerowicz H. The influence of the intensity of smoking and years of work in the metallurgy on pro-oxidant/antioxidant balance in the blood of smelters. *Toxicol Ind Health* 2013; 29(2): 149-61.
- [204] Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, *et al.* High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res* 2007; 120(1-3): 82-91.
- [205] Pollack AZ, Schisterman EF, Goldman LR, *et al.* Relation of blood cadmium, lead, and mercury levels to biomarkers of lipid peroxidation in premenopausal women. *Am J Epidemiol* 2012; 175(7): 645-52.
- [206] Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(3): 209-14.
- [207] Moulis J-M. Cadmium Exposure, Cellular and Molecular Adaptations. In: Kretsinger R, Uversky V, Permyakov E, Eds. *Encyclopedia of Metalloproteins*: Springer New York; 2013. p. 364-71.

- [208] Wang G, Fowler BA. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(1): 92-9.
- [209] Harisa GI, Attia SM, Ashour AE, Abdallah GM, Omran GA, Touliabah HE. Cigarette smoking and hyperglycemia increase renal response to low levels of cadmium in welders: cystatin C as a sensitive marker. *Biol Trace Elem Res* 2014; 158(3): 289-96.
- [210] Kakimoto M, Inoguchi T, Sonta T, *et al.* Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. *Diabetes* 2002; 51(5): 1588-95.
- [211] Leem JH, Hong YC, Lee KH, Kwon HJ, Chang YS, Jang JY. Health survey on workers and residents near the municipal waste and industrial waste incinerators in Korea. *Ind Health* 2003; 41(3): 181-8.
- [212] Wen S, Yang FX, Gong Y, *et al.* Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in male electrical and electronic equipment dismantling workers exposed to high concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls. *Environ Sci Technol* 2008; 42(11): 4202-7.
- [213] Kumar J, Monica Lind P, Salihovic S, van Bavel B, Lind L, Ingelsson E. Influence of persistent organic pollutants on oxidative stress in population-based samples. *Chemosphere* 2014; 114: 303-9.
- [214] Lai I, Chai Y, Simmons D, *et al.* Acute toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in male Sprague-Dawley rats: effects on hepatic oxidative stress, glutathione and metals status. *Environ Int* 2010; 36(8): 918-23.
- [215] Li R, Cao S, Dai J, *et al.* Effect of caffeic acid derivatives on polychlorinated biphenyls induced hepatotoxicity in male mice. *J Biomed Res* 2014; 28(5): 423-8.
- [216] Schramm H, Robertson LW, Oesch F. Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 1985; 34(20): 3735-9.
- [217] Twaroski TP, O'Brien ML, Robertson LW. Effects of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on hepatic glutathione, glutathione-related enzymes, and selenium status: implications for oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(3): 273-81.
- [218] Buha A, Antonijevic B, Milovanovic V, Jankovic S, Bulat Z, Matovic V. Polychlorinated biphenyls as oxidative stress inducers in liver of subacutely exposed rats: Implication for dose-dependence toxicity and benchmark dose concept. *Environ Res* 2015; 136: 309-17.
- [219] Charles MJ, Schell MJ, Willman E, *et al.* Organochlorines and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in cancerous and noncancerous breast tissue: do the data support the hypothesis that oxidative DNA damage caused by organochlorines affects breast cancer? *Arch Environ Contam Toxicol* 2001; 41(3): 386-95.
- [220] Recio-Vega R, Mendez-Henandez A, Gabriel AP, *et al.* Potentially estrogenic polychlorinated biphenyls congeners serum levels and its relation with lung cancer. *J Appl Toxicol* 2013; 33(9): 906-14.
- [221] McLean MR, Twaroski TP, Robertson LW. Redox cycling of 2-(α' -mono-, -di-, -trichlorophenyl)-1, 4-benzoquinones, oxidation products of polychlorinated biphenyls. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376(2): 449-55.
- [222] Schlezinger JJ, Struntz WD, Goldstone JV, Stegeman JJ. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquat Toxicol* 2006; 77(4): 422-32.
- [223] Twaroski TP, O'Brien ML, Larmonier N, Glauert HP, Robertson LW. Polychlorinated biphenyl-induced effects on metabolic enzymes, AP-1 binding, vitamin E, and oxidative stress in the rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 171(2): 85-93.
- [224] Engström KS, Vahter M, Johansson G, *et al.* Chronic exposure to cadmium and arsenic strongly influences concentrations of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(9): 1211-7.
- [225] Hossain MB, Barregard L, Sallsten G, Broberg K. Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex are not associated with urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in living kidney donors. *Int Arch Occup Environ Health* 2014; 87(3): 315-22.
- [226] Huang HB, Chen GW, Wang CJ, *et al.* Exposure to heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage in taiwanese traffic conductors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22(1): 102-8.
- [227] Wlostowski T, Krasowska A, Bonda E. Joint effects of dietary cadmium and polychlorinated biphenyls on metallothionein induction, lipid peroxidation and histopathology in the kidneys and liver of bank voles. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008; 69(3): 403-10.
- [228] Buha A, Antonijevic B, Bulat Z, Jacevic V, Milovanovic V, Matovic V. The impact of prolonged cadmium exposure and co-exposure with polychlorinated biphenyls on thyroid function in rats. *Toxicol Lett* 2013; 221(2): 83-90.
- [229] Van Larebeke N, Sioen I, Hond ED, *et al.* Internal exposure to organochlorine pollutants and cadmium and self-reported health status: A prospective study. *Int J Hyg Environ Health* 2014; 10.1016/j.ijheh.2014.11.002.
- [230] Lee DH, Lim JS, Song K, Boo Y, Jacobs DR, Jr. Graded associations of blood lead and urinary cadmium concentrations with oxidative-stress-related markers in the U.S. population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect* 2006; 114(3): 350-4.
- [231] Bélanger MC, Mirault ME, Dewailly E, Berthiaume L, Julien P. Environmental contaminants and redox status of coenzyme Q10 and vitamin E in Inuit from Nunavik. *Metabolism* 2008; 57(7): 927-33.
- [232] Thijssen S, Cuyper A, Maringa J, *et al.* Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys. *Toxicology* 2007; 236(1-2): 29-41.
- [233] Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, *et al.* Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(3): 471-8.
- [234] Gałazyn-Sidorczuk M, Brzoska MM, Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J. Oxidative damage to proteins and DNA in rats exposed to cadmium and/or ethanol. *Chem Biol Interact* 2009; 180(1): 31-8.
- [235] Wlostowski T, Krasowska A, Godlewska-Zylkiewicz B. Dietary cadmium decreases lipid peroxidation in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J Trace Elem Med Biol* 2000; 14(2): 76-80.
- [236] Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure. *Toxicol Sci* 2004; 82(2): 468-77.
- [237] Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. *Arch Toxicol* 2005; 79(11): 636-46.
- [238] Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(3): 195-211.
- [239] Brzoska MM, Rogalska J, Kupraszewicz E. The involvement of oxidative stress in the mechanisms of damaging cadmium action in bone tissue: a study in a rat model of moderate and relatively high human exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 250(3): 327-35.
- [240] Shimada T, Inoue K, Suzuki Y, *et al.* Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 2002; 23(7): 1199-207.
- [241] Dean CE, Jr., Benjamin SA, Chubb LS, Tessari JD, Keefe TJ. Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers. *Toxicol Sci* 2002; 66(1): 54-61.
- [242] Selvakumar K, Bavithra S, Suganthi M, *et al.* Protective role of quercetin on PCBs-induced oxidative stress and apoptosis in hippocampus of adult rats. *Neurochem Res* 2012; 37(4): 708-21.
- [243] Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh RC, Aruldas MM, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (alpha-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod Toxicol* 2007; 23(2): 239-45.
- [244] Masso EL, Corredor L, Antonio MT. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *J Trace Elem Med Biol* 2007; 21(3): 210-6.
- [245] Shimada H, Takamura Y, Shimada A, Yasutake A, Waalkes MP, Imamura Y. Strain differences of cadmium-induced hepatotoxicity in Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats: involvement of cadmium accumulation. *Toxicology* 2004; 203(1-3): 189-97.
- [246] Rogalska J, Pilat-Marcinkiewicz B, Brzoska MM. Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement

- intake and level of cadmium exposure: a study in a rat model. *Chem Biol Interact* 2011; 193(3): 191-203.
- [247] Breton J, Daniel C, Dewulf J, *et al.* Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicol Lett* 2013; 222(2): 132-8.
- [248] Cardin GB, Mantha M, Jumarie C. Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms. *Biomaterials* 2009; 22(5): 753-69.
- [249] Bolduc JS, Denizeau F, Jumarie C. Cadmium-induced mitochondrial membrane-potential dissipation does not necessarily require cytosolic oxidative stress: studies using rhodamine-123 fluorescence unquenching. *Toxicol Sci* 2004; 77(2): 299-306.
- [250] Rousselet E, Richaud P, Douki T, *et al.* A zinc-resistant human epithelial cell line is impaired in cadmium and manganese import. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 230(3): 312-9.
- [251] Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol* 1996; 9(8): 1285-92.
- [252] Zhu Y, Kalen AL, Li L, *et al.* Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(12): 1762-71.
- [253] Gadupudi G, Gourronc FA, Ludewig G, Robertson LW, Klingelutz AJ. PCB126 inhibits adipogenesis of human preadipocytes. *Toxicol In Vitro* 2015; 29(1): 132-41.
- [254] Coletti D, Palleschi S, Silvestroni L, *et al.* Polychlorobiphenyls inhibit skeletal muscle differentiation in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175(3): 226-33.
- [255] Uetani M, Kobayashi E, Suwazono Y, *et al.* Tissue cadmium (Cd) concentrations of people living in a Cd polluted area, Japan. *Biomaterials* 2006; 19(5): 521-5.
- [256] Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. Activation of estrogen receptor- α by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 2000; 14(4): 545-53.
- [257] Huang M, Krepkiy D, Hu W, Petering DH. Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes. *J Inorg Biochem* 2004; 98(5): 775-85.
- [258] Leverrier P, Montigny C, Garrigos M, Champeil P. Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited. *Anal Biochem* 2007; 371(2): 215-28.
- [259] Hopf NB, Ruder AM, Succop P. Background levels of polychlorinated biphenyls in the U.S. population. *Sci Total Environ* 2009; 407(24): 6109-19.
- [260] Afridi HI, Kazi TG, Kazi N, *et al.* Evaluation of status of toxic metals in biological samples of diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 80(2): 280-8.
- [261] Kolachi NF, Kazi TG, Afridi HI, *et al.* Status of toxic metals in biological samples of diabetic mothers and their neonates. *Biol Trace Elem Res* 2011; 143(1): 196-212.
- [262] Åkesson A, Lundh T, Vahter M, *et al.* Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ Health Perspect* 2005; 113(11): 1627-31.
- [263] Barregard L, Bergstrom G, Fagerberg B. Cadmium, type 2 diabetes, and kidney damage in a cohort of middle-aged women. *Environ Res* 2014; 135C: 311-6.
- [264] Haswell-Elkins M, Satarug S, O'Rourke P, *et al.* Striking association between urinary cadmium level and albuminuria among Torres Strait Islander people with diabetes. *Environ Res* 2008; 106(3): 379-83.
- [265] Babu KR, Rajmohan HR, Rajan BK, Kumar KM. Plasma lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes status in workers exposed to cadmium. *Toxicol Ind Health* 2006; 22(8): 329-35.
- [266] Bizoń A, Milnerowicz-Nabzdzyk E, Zalewska M, Zimmer M, Milnerowicz H. Changes in pro/antioxidant balance in smoking and non-smoking pregnant women with intrauterine growth restriction. *Reprod Toxicol* 2011; 32(3): 360-7.
- [267] Garçon G, Leleu B, Zerimech F, *et al.* Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J Occup Environ Med* 2004; 46(11): 1180-6.
- [268] Garçon G, Leleu B, Marez T, *et al.* Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: usefulness of alpha-glutathione S-transferase. *Sci Total Environ* 2007; 377(2-3): 165-72.
- [269] Kippler M, Hossain MB, Lindh C, *et al.* Early life low-level cadmium exposure is positively associated with increased oxidative stress. *Environ Res* 2012; 112: 164-70.
- [270] Merzenich H, Hartwig A, Ahrens W, *et al.* Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(5): 515-22.
- [271] Min JY, Min KB. Cadmium, smoking, and reduced levels of exhaled nitric oxide among US adults. *Int J Hyg Environ Health* 2014; 217(2-3): 323-7.
- [272] Moitra S, Brashier BB, Sahu S. Occupational cadmium exposure-associated oxidative stress and erythrocyte fragility among jewelry workers in India. *Am J Ind Med* 2014; 57(9): 1064-72.
- [273] Ni W, Huang Y, Wang X, Zhang J, Wu K. Associations of neonatal lead, cadmium, chromium and nickel co-exposure with DNA oxidative damage in an electronic waste recycling town. *Sci Total Environ* 2014; 472: 354-62.
- [274] Yoshioka N, Nakashima H, Hosoda K, Eitaki Y, Shimada N, Omae K. Urinary excretion of an oxidative stress marker, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), among nickel-cadmium battery workers. *J Occup Health* 2008; 50(3): 229-35.
- [275] Shimizu K, Ogawa F, Thiele JJ, Bae S, Sato S. Lipid peroxidation is enhanced in Yusho victims 35 years after accidental poisoning with polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan. *J Appl Toxicol* 2007; 27(2): 195-7.
- [276] Yoshida J, Kumagai S, Tabuchi T, *et al.* Negative association between serum dioxin level and oxidative DNA damage markers in municipal waste incinerator workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79(2): 115-22.
- [277] Nemmiche S, Chabane-Sari D, Kadri M, Guiraud P. Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicol In Vitro* 2011; 25(1): 191-8.
- [278] Nzengue Y, Steiman R, Garrel C, Lefebvre E, Guiraud P. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology* 2008; 243(1-2): 193-206.
- [279] Nzengue Y, Steiman R, Rachidi W, Favier A, Guiraud P. Oxidative stress induced by cadmium in the C6 cell line: role of copper and zinc. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146(3): 410-9.
- [280] Chin TA, Templeton DM. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicology* 1993; 77(1-2): 145-56.
- [281] Ochi T, Takahashi K, Ohsawa M. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutat Res* 1987; 180(2): 257-66.
- [282] Yang JL, Chao JI, Lin JG. Reactive oxygen species may participate in the mutagenicity and mutational spectrum of cadmium in Chinese hamster ovary-K1 cells. *Chem Res Toxicol* 1996; 9(8): 1360-7.
- [283] Sinha K, Pal PB, Sil PC. Cadmium (Cd²⁺) exposure differentially elicits both cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. *Toxicol In Vitro* 2014; 28(2): 307-18.
- [284] Hofmann U, Priem M, Bartzsch C, Winckler T, Feller KH. A sensitive sensor cell line for the detection of oxidative stress responses in cultured human keratinocytes. *Sensors (Basel)* 2014; 14(7): 11293-307.

RESULTATS

Impact d'une exposition chronique à faibles doses de Cd chez des rats adultes : altérations du métabolisme glucidique dépendantes du sexe

Article 1 : (soumis) dans Environmental Health Perspectives

Impact of chronic and low cadmium exposure of rats: sex specific disruption of glucose metabolism.

Jacquet Adeline^{1,2}, Arnaud Josiane^{1,2,3}, Hininger-Favier Isabelle^{1,2}, Hazane-Puch Florence³, Couturier Karine^{1,2}, Lenon Marine^{1,2}, Lamarche Frédéric^{1,2}, Ounnas Fayçal^{1,2}, Fontaine Eric.^{1,2,3}, Moulis Jean-Marc^{1,2,4}, Demeilliers Christine^{1,2}.

Présentation

Dans la revue décrite précédemment, nous avons mis en avant des questionnements quant (1) aux modèles expérimentaux utilisés classiquement dans la littérature pour évaluer les risques d'une exposition environnementale au Cd, (2) à l'implication du pouvoir pro-oxydant du Cd dans sa toxicité, et (3) à l'impact d'une exposition au Cd sur le développement du diabète. En effet, les modèles utilisés (majoritairement à forte dose, sur des durées courtes et par des voies d'administration non physiologiques) et les données disponibles dans la littérature ne permettent pas de tirer des conclusions claires sur ces points. Il apparaît donc crucial de compléter ces résultats en proposant des études avec des modèles d'exposition pertinents et plus représentatifs de l'exposition environnementale réelle en termes de fréquence d'exposition, de durée, de doses et de voie d'administration.

Le but de cette étude a, de ce fait, été de développer et de valider un modèle d'exposition au Cd pertinent et réaliste, d'évaluer les perturbations potentielles du métabolisme du glucose et de quelques paramètres associés au stress oxydant, et d'étudier si l'impact potentiel du Cd peut différer selon le sexe des individus.

La première partie du travail a donc consisté en une réflexion sur la pertinence des modèles proposés sur la base de : (1) la détermination de la dose administrée par rapport aux valeurs toxicologiques de référence (VTR), (2) le niveau de cadmium retrouvé dans les organes, et (3) l'absence de toxicité aiguë dans les organes cibles.

Pour répondre au premier point, nous avons choisis d'administrer, pendant 3 mois, trois doses quotidiennes de Cd, dissout dans l'eau de boisson, aux rats : 5, 50 et 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. La première dose est la plus proche des niveaux d'exposition environnementaux (7 fois la dose ingérée la plus forte estimée en Europe) et 10 fois inférieure à la BMDL calculée pour les expositions intermédiaire chez le rat (ATSDR 2012). La dose intermédiaire de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est 4 fois plus faible que la plus petite NOAEL calculée chez le rat et est égale à la BMDL. Enfin la dose de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a été choisie comme étant la dose la plus faible classiquement utilisée dans la littérature. Elle est du même ordre de grandeur que la NOAEL et correspond à 10 fois la BMDL. Les 3 groupes ainsi formés sont appelés par la suite Cd5, Cd50 et Cd500.

Dans notre modèle, les animaux exposés à la plus faible dose ($5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$), ne présentent pas d'augmentation significative des concentrations de Cd dans le plasma et les organes cibles (rein, foie) quand on compare par rapport aux rats contrôles. Ceci peut s'expliquer par une pollution latente en Cd qui fait que ces rats reçoivent une quantité de Cd finalement assez peu différente de celle à laquelle sont exposés les contrôles par la nourriture faiblement contaminée en Cd. De ce fait, l'étude pour cette dose n'est pas pertinente dans nos conditions expérimentales et n'a pas été poursuivie. A l'inverse, la concentration de Cd sanguin est clairement augmentée chez les rats Cd50 et Cd500. De plus, on observe une accumulation dose-dépendante du Cd dans le rein et le foie de ces animaux. Ces doses de Cd qui auraient pu paraître élevées si l'on résonne en termes de niveaux d'exposition, sont finalement pertinentes dans nos conditions expérimentales, puisqu'elles entraînent une accumulation dans les organes cibles similaires aux concentrations retrouvées dans les tissus humains.

Par ailleurs, cette exposition n'engendre pas de toxicité observable dans ces deux organes cibles. En effet, l'excrétion de Kim-1, une protéine utilisée comme marqueur précoce de dommages rénaux, n'est pas élevée dans les groupes exposés au Cd comparés aux contrôles et nous n'observons pas non plus d'augmentation des transaminases plasmatiques qui attesterait d'une toxicité hépatique.

La deuxième partie du travail a consisté à étudier l'impact de ces expositions au Cd chez des rats adultes mâles et femelles. Les effets observés chez les rats exposés se sont révélés différents selon leur sexe.

En effet, chez les mâles, les TBARS plasmatiques sont plus élevés d'environ 10-15% après l'exposition au Cd, ce qui suggère que ces expositions au Cd pourraient induire des dommages oxydatifs. De plus, la défense antioxydante *via* la glutathion peroxydase ne semble pas altérée. Cet effet sexe-dépendant sur les TBARS, observé à des doses modérées de Cd, ne semble pas lié au développement d'effets diabétogènes puisque les rats mâles, contrairement aux femelles, ne présentent pas d'altération visible des paramètres plasmatiques du métabolisme glucidique. Nous appuyons donc l'hypothèse, avancée dans la revue, qui suppose que le stress oxydant serait plutôt un phénomène concomitant à la toxicité du Cd et non une cause précoce du développement des effets diabétogènes.

A l'inverse, les femelles exposées ne présentent pas de modifications significatives des TBARS plasmatiques. Toutefois, on remarque une augmentation significative de l'insuline plasmatique à jeun d'environ 30% chez les femelles du groupe Cd50 et de 66% pour les Cd500. Après stimulation par ingestion de glucose, l'insuline circulante s'élève de 79% et 100% chez les femelles Cd50 et Cd500, respectivement, par rapport aux contrôles. Cette perturbation des niveaux d'insuline plasmatique, chez les femelles, ne s'accompagne pas de changement dans les concentrations de peptide C à jeun, ce qui suggère que cet effet pourrait résulter d'une moins bonne extraction hépatique de l'insuline plutôt que d'une altération de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Ces observations pourraient révéler un mécanisme d'adaptation aux premiers symptômes de résistance à l'insuline dans les tissus périphériques. En effet, la sensibilité à l'insuline, évaluée par le calcul de l'index Quicki, diminue de 7% chez les femelles Cd50 et Cd500. Cependant, la tolérance globale au glucose et à l'insuline mesurée dans les tests sur animaux vigiles, ne semble pas altérée, suggérant que l'on se trouve aux prémices d'effets nocifs et que l'organisme s'adapte correctement pour maintenir l'homéostasie du glucose. De façon surprenante, nous ne retrouvons pas ces résultats chez les mâles exposés au Cd dans les mêmes conditions.

Ces résultats pris dans leur ensemble, apportent des pistes de réponse par rapport à certaines interrogations soulevées dans notre revue. Ils indiquent qu'une exposition au Cd par voie orale, à des doses inférieures à la NOAEL, a des effets visibles et dépendant du sexe sur le métabolisme glucidique, même si pour cette durée d'exposition, ces modifications semblent correspondre à des adaptations de l'organisme puisque la tolérance au glucose est maintenue. Cependant, ces symptômes de dysfonctionnement du métabolisme observés chez les femelles, pourraient être exacerbés pour une exposition plus prolongée et contribuer, à terme, au développement d'un diabète de type 2.

Ce travail porte par ailleurs une réflexion sur le choix des modèles à mettre en place pour se confronter à la thématique des doses faibles et aux difficultés expérimentales que cela représente. Nous soulignons l'importance de la prise en compte des conditions expérimentales dans le choix des niveaux d'exposition et particulièrement de la pollution latente (dans la

nourriture, eau, ...) qui font que les rats du groupe contrôle ne peuvent pas être considérés comme des animaux exempt d'exposition. De plus, nous mettons en valeur l'intérêt de la mesure de différents biomarqueurs pour mesurer l'exposition (Cd dans le plasma, urine et organes cibles) qui sont plus pertinents pour évaluer le modèle qu'une simple comparaison du niveau d'exposition avec les VTR. Enfin, cette étude met l'accent sur l'utilité de travailler sur les femelles et les mâles afin de pouvoir décrire les différences d'impact de polluants sur les deux sexes.

Ainsi, ces travaux démontrent la nécessité de prendre en compte tous ces aspects dans la détermination des VTR que ce soit pour le Cd, mais aussi pour d'autres polluants.

Impact of chronic and low cadmium exposure of rats: sex specific disruption of glucose metabolism.

Jacquet Adeline^{1,2}, Arnaud Josiane^{1,2,3}, Hininger-Favier Isabelle^{1,2}, Hazane-Puch Florence³, Couturier Karine^{1,2}, Lénon Marine^{1,2}, Lamarche Frédéric^{1,2}, Ounnas Fayçal^{1,2}, Fontaine Eric.^{1,2,3}, Moulis Jean-Marc^{1,2,4}, Demeilliers Christine^{1,2}.

¹Univ. Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, Environmental and Systems Biology, Grenoble, France, ²Inserm, U1055 Grenoble, France, ³Grenoble University Hospital, Grenoble, France, ⁴CEA-DRF-BIG, Grenoble, France

Corresponding author: C. Demeilliers, LBFA-U1055, Université Grenoble Alpes, CS 40700, 38058 Grenoble cedex 9, France. Telephone: +33 476 63 54 80. Email: christine.demeilliers@univ-grenoble-alpes.fr.

Acknowledgements:

The authors thank Hervé Dubouchaud, Cindy Tellier, Pauline Durrenbach and Charline Quiclet for their technical support and helpful suggestions.

This work is supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche ANR-13-CESA-008-Cadmidia.

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

Background: Several epidemiological and animal studies suggest a positive association between cadmium (Cd) exposure and incidence of type 2 diabetes (T2D), but the association remains controversial. Besides, the experimental data have mainly been obtained with high levels of Cd, over various periods of time, and with artificial routes of administration.

Objectives: Is Cd exposure at representative levels of environmental contamination inducing significant disruption of glucose metabolism?

Methods: Adults Wistar rats were exposed for three months to 0, 5, 50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ of CdCl_2 in drinking water. TBARS and relevant parameters of glucose homeostasis were measured.

Results: In rats drinking 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, Cd exposure did not lead to any significant increase of Cd in plasma or in kidney and liver. However, Cd accumulated in these organs of rats exposed to 50 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, without inducing any obvious toxicity. Overall glucose and insulin tolerance were unchanged in both sexes. Nevertheless, Cd-exposed males had slightly higher plasma TBARS, whereas no changes were observed in females. Females exhibited a significant increase of fasting plasma insulin as well as after glucose-stimulation. This effect resulted from impaired hepatic insulin extraction as indicated by unaltered fasting C-peptide plasma levels. Besides, the onset of a peripheral insulin resistance was observed (increased Quicki index).

Conclusions: Rat glucose homeostasis is very sensitive to chronic Cd exposure in a gender-specific way. These observations highlight the strain a widespread low level contaminant such as Cd applies on the glucose homeostasis system with possible long-term consequences on the development of T2D.

Introduction

Cadmium (Cd) is a metal element of the earth's crust which is now widely spread in the environment, mainly due to industrial and agricultural activities as well as daily life habits (such as smoking).

The soil-to-plant transfer together with the direct deposition of airborne Cd lead to the significant contamination of plants, vegetables and cereals and finally to its presence in the entire food chain (Franz et al. 2008; Smolders 2001). Thus, in the non-smoking general population, foodstuffs (mainly as cereals and vegetables) accounts for approximately 90 % of the Cd exposure (European Food Safety Authority (EFSA) 2009). Human average dietary Cd intake was estimated at 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in the USA and the European Union ((ATSDR 2012; European Food Safety Authority 2012). However, these values are highly dependent on age, diet, and geographical localization, and for some population, these exposure levels largely exceed the EFSA recommended tolerable weekly intake (TWI) set at 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{week}^{-1}$ (about 0.36 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) in 2009 (European Food Safety Authority 2012). Following dietary uptake, Cd is efficiently retained in the kidney and liver, with a very long biological half-life estimated between 10 and 30 years (European Food Safety Authority (EFSA) 2009). Even if kidney and liver are known to be the major sites of Cd accumulation, significant amounts of Cd were also found in lung, thyroid and bones (Edwards and Ackerman 2015; Maret and Moulis 2013; Uetani et al. 2006). Moreover, several studies found significant Cd concentrations in pancreas (El Muayed et al. 2012; Satarug et al. 2010; Uetani et al. 2006).

The toxicity of Cd is well established (kidney failure, promotion of cancers, bone disease) (Edwards and Prozialeck 2009; Järup and Akesson 2009; Satarug et al. 2010). However, other health effects upon chronic low level exposure are not comprehensively elucidated.

Among the pathologies for which cadmium might be a risk factor is diabetes. The link between exposure to Cd and development and severity of diabetes has been explored in several epidemiological and experimental studies as we recently reviewed (Jacquet et al. 2016). About this overview of the literature, we must retain that:

(1) for the epidemiological studies, the issue remains controversial since some studies showed association between hair, urinary or plasma Cd concentration and diabetic symptoms

(Afridi et al. 2013; Nie et al. 2016; Schwartz et al. 2003; Wallia et al. 2014) whereas others did not find any association (Anetor et al. 2016; Barregard et al. 2013; Borné et al. 2014; Menke et al. 2015; Moon 2013; Swaddiwudhipong et al. 2015; Yang et al. 2017).

(2) for animal studies, most of the studies used high levels of Cd and unrealistic route of administration. The precise mechanisms of Cd toxicity in connection with the hierarchy of actions have generally not been properly addressed, particularly at low levels of chronic oral Cd exposure (less than 0.5 mg.kg⁻¹.d⁻¹) with physiological routes of administration (Ficková et al. 2003; Lovásová et al. 2013; Merali and Singhal 1980; Ogheneovo Asagba 2010).

Thus, the aim of the present study was to design a pertinent animal model, as close as possible to the reality of human Cd exposure in terms of doses, frequency, and route of administration, and to address the expected subtle and early changes that can lead to the development of chronic diseases such as diabetes.

Material and methods

Animals and experimental design

The study was performed in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE and the recommendations of the French Ministry of Agriculture (2013-118) on the care and use of laboratory animals. Protocols were carried out in the Animal facility of the Department of Biology of the University (D3842110001). Procedures were reviewed by the ethics committee affiliated to the animal facility (224_LBFA-U1055) and authorized by the French Ministry of Research.

Four-month-old Wistar rat (male and female) were purchased from Charles River Laboratories France, (Saint Germain-Nuelles, France) and were maintained in individual cages under controlled conditions of temperature (22°C) and 12h-light/dark cycles with free access to water and diet. The rats were randomly separated into 4 groups of 12 animals (6 females and 6 males) as follows: Control group received demineralized drinking water, Cd5 group, Cd50 group and Cd500 group received demineralized water containing Cd dichloride (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) so as rats drank an average daily amount of 5 µg.kg⁻¹.d⁻¹, 50 µg.kg⁻¹.d⁻¹ and

500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ respectively. The Cd concentration in the drinking water was adjusted each week to ensure a constant and accurate exposure according to the water consumption of each rat. The chow (A04 SAFE Diets, Augy, France) was measured for Cd content: an average amount of 33 $\text{ng Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ of chow was found by ICP-MS. Body weight, food intake, and water consumption were measured every week. Cd exposure lasted 12 weeks. At the end of week 12, 6 females and 6 males per group were assigned for 24 h in metabolic cages in order to collect their urine. The rats were fasted for 16 h before euthanasia which was carried out by decapitation. Blood was collected in heparinized trace elements collecting tubes (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) and centrifuged at 3000 g for 10 minutes. Plasma was aliquoted and stored at -80°C before use. Organs were collected, weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis.

Trace elements assay in tissues, plasma and urine:

Cadmium was determined using a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface option was used. Tissues samples were mineralized in concentrated nitric acid and then diluted 50 or 100 folds in water prior to analysis. Urine and plasma were diluted in nitric acid 1% (v/v). ^{111}Cd isotope was measured and ^{103}Rh isotope was used as internal standard. An external standard calibration curve was generated using four calibration standards (0-1.78-8.9-17.8 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Method accuracy was assessed by analyzing standard reference material or internal quality controls at least at the beginning and at the end of the analytical run. NIST standard reference material 1577 (bovine liver) and 8414 (bovine muscle) were introduced for tissues analysis, and ClinCheck urine and serum controls for Trace elements (Recipe, Munich, Germany) were used for urine and plasma analysis. Copper, Iron, Manganese, Selenium and Zinc in urine were determined on the same instrument for which the Xt interface and collision cell technology (CCT) options were used. The gas used for collision was a mixture of helium and hydrogen (93:7). Urine and plasma were diluted in nitric acid 1% (v/v). ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{56}Fe , ^{55}Mn , ^{78}Se , ^{64}Zn and ^{66}Zn isotopes were measured and ^{71}Ga was used as internal standard. External standard calibration curves were performed for Fe, Mn and Se in urine, whereas standard addition calibration curve performed in plasma were used for Cu and Zn in plasma and urine and for Fe, Mn and Se in plasma. Method accuracy was assessed by analyzing

ClinCheck urine and serum controls for Trace elements (Recipe, Munich, Germany) at least at the beginning and end of the analytical run.

Biochemical analysis:

Urinary rat Kim-1 levels were assayed using ELISA kits purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions.

Rat plasma triglycerides (TG), Non-Esterified Fatty Acids (NEFA), total cholesterol (CHOL) and HDL Cholesterol (HDL) assays were performed by spectrophotometry. TG, CHOL (ThermoScientific, Vantaa, Finland), and NEFA (Diasys, Holzheim, Germany) and their calibrators were measured on the Konelab XT20 instrument (ThermoScientific, Vantaa, Finland). Internal quality controls were Seronorm (Sera, Billingstad, Norway) and Trulab (Diasys, Holzheim, Germany) for NEFA, and Nortrol (ThermoScientific, Vantaa, Finland) for CHOL and TG. HDL-cholesterol was evaluated on the Vista 1500 analyzer (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) using HDL Cholesterol kit (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) and Multiquel (Biorad, Segrate, Italy) as internal quality controls.

Plasmatic Alanine-aminotransferase (ALAT), aspartame-aminotransferase (ASAT) and gamma-glutamyl transferase (GGT) were evaluated on Vista 1500 (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) using AST, ALTI and GGT kit (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) and Multiquel (Biorad, Segrate, Italy) as internal quality control.

Lipid oxidation was assayed by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as published by Richard et al (Richard et al. 1992). Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined, using the method described by Günzler et al (Günzler et al. 1974), by quantifying the rate of GSH oxidation by ter-butyl-hydroperoxide (Sigma Chemical, Paris, France).

Plasma insulin and C peptide levels were assayed using ELISA kits purchased from Alpco (Salem, New Hampshire, USA) and Mercodia AB (Uppsala, Sweden) respectively, according to the manufacturer's instructions.

Intraperitoneal glucose tolerance test (IpGTT):

IpGTT was performed on week 10 after the beginning of Cd exposure. Rats were fasted 16 hours before the test. 1 g.kg⁻¹ of body mass of glucose was administered by intraperitoneal injection, and blood samples were collected from the tail vein before and every 5 min for 45 min, then 60, 90, 120 minutes after glucose administration. Glucose concentration in blood was measured with the Accu-Chek glucometer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The area under the curve (AUC) was obtained from the integrated curve of glucose evolution against time (trapezoidal rule was used to calculate the area).

Additional blood samples were collected before and 15 minutes after glucose injection to assay plasma insulin levels (see below).

Intraperitoneal insulin tolerance test (IpITT):

IpITT was performed on the same rats, on week 11 after the beginning of Cd exposure. Rats were fasted 5 hours before the test. 1 mU.g⁻¹ of body mass of insulin (Novorapid, Novo Nordisk, Glaxo, Denmark) was administered by intraperitoneal injection, and blood samples were collected from the tail vein before and 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 minutes after insulin administration. Glucose concentration in blood and area under curve were measured similarly to IpGTT.

Insulin sensitivity Index:

To assess insulin sensitivity, quantitative insulin sensitivity check index (Quicki) was calculated based on plasma fasting insulin levels and blood glucose levels using the following formula validated on Wistar rats (Cacho et al. 2008) :

$$\text{Quicki: } 1 / [\log(\text{fasting glucose (mg.dL}^{-1})) + \log(\text{fasting plasma insulin (mU.mL}^{-1}))].$$

Statistical analysis:

Results are expressed as Mean ± SEM. One way ANOVAs followed by Holm-Sidak tests were used for the comparisons between groups for each gender. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant in all analyses. When no statistically difference between male and female rats were observed, data were pooled for simplification.

Results

Characterization of Cd exposure model

To set our study at the lowest end of previous conditions applied to laboratory animals, rats were intoxicated with oral 500 μg of $\text{Cd}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Cd500 group) as one of the lowest doses typically used. It corresponds to 10 times the BMDLSd1 (benchmark dose lower bound, defined as the lower confidence limit on the dose that produces a magnitude of change of one standard deviation (ATSDR 2012)), and it is within the range of the rat NOAEL (0.2 - 13 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for systemic effects of oral Cd exposure of intermediate length for rats (ATSDR 2012)). This value served as the upper exposure limit, whereas 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Cd50 group) was implemented to equal the BMDLSd1 and was below the lowest rat NOAEL (4 times lower). Finally, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Cd5 group) was the lowest dose given to the animal (10 times lower than the rat BMDLSd1). It falls in the range of the highest oral exposure estimated for human adults in Europe (European Food Safety Authority (EFSA) 2009) and is only one order of magnitude above the European tolerable weekly intake (TWI) (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{week}^{-1}$ about 0.36 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) (European Food Safety Authority (EFSA) 2009).

Body weight and weight of organs

There were no statistical differences in body weight between the groups and within the same gender, throughout the experiment (See Fig. S1). Moreover, no statistically significant differences were observed in the relative weight of liver, kidney, pancreas, heart and gastrocnemius muscle between control and Cd-exposed rats (data not shown).

c. Analysis of Cd in plasma, liver, kidney and pancreas.

The results of the relative Cd content of liver, kidney, and plasma were not statistically different between male and female rats within the exposure group (Figure 1).

The Cd concentration in plasma, liver, kidney and pancreas of the Cd5 group was not statistically different from controls. However, in Cd50 rats, Cd concentration increased significantly in plasma (1.8 times higher), liver (7.3 times higher) and in kidney (9.3 times higher) ($p < 0.05$), whereas the Cd concentration in pancreas was not significant compared to control

group. Upon higher exposure, the plasma Cd concentration in Cd500 rats was significantly increased by 7.6 times and resulted in a higher accumulation of Cd in organs, with 78, 115 and 88 times higher Cd concentration compared to controls, in liver, kidney and pancreas, respectively ($p < 0.05$).

Thus, in our experimental conditions, the Cd5 group does not differ from the background represented by the control group. Indeed, considering the food and water consumptions of the animals, chow Cd contamination ($0.033 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$) contributes to 24-29 % of total Cd intake of the Cd5 group. Thus, the Cd5 and control groups had too close levels of Cd contamination for significantly different exposures, and the Cd5 group was not kept for further studies.

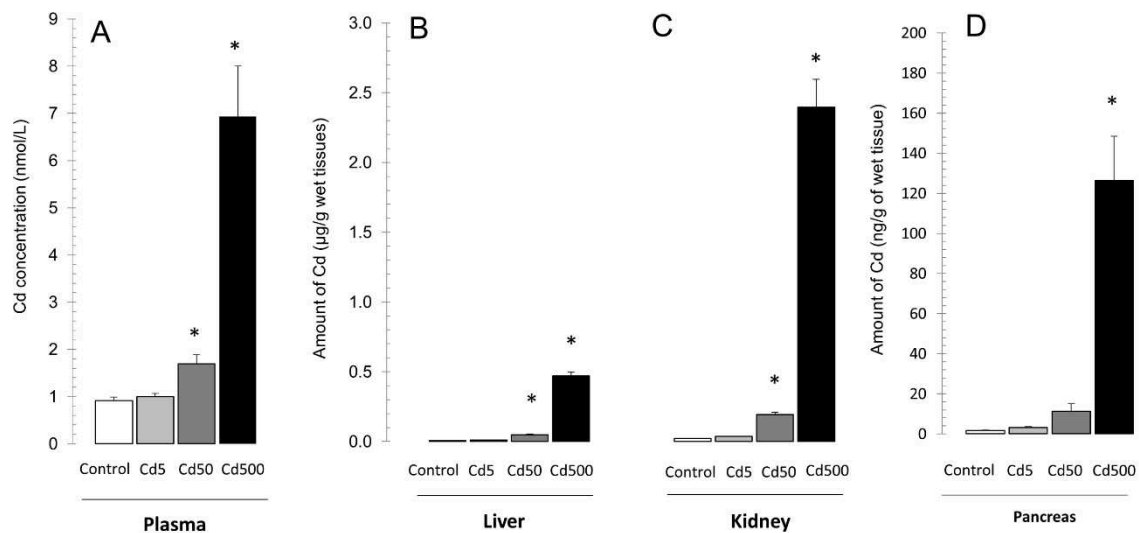


Figure 1. Accumulation of Cd in rats after the 3-month exposure. Cd concentration in plasma (A). Cd amount in liver (B). Cd amount in kidney (C). Cd amount in pancreas (D). Data for males and females were pooled since no statistically significant differences were observed between both sexes. Data are expressed as mean \pm SEM ($n=12$ per group for plasma, liver and kidney, $n=3-6$ for pancreas). * data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$).

Effect of Cd exposure on kidney damage, oxidative status and plasma transaminases

d. Urinary rat Kim-1 levels

Cd nephrotoxicity has been documented for decades (Thévenod and Wolff 2016). Considering that the aim of our study was to understand the impact of chronic low levels of Cd, verifying that the level of Cd applied in our model was not inducing kidney damage was requested. Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1) is considered as an early biomarker of renal damage (Prozialeck et al. 2007), and it was assayed to check this point. Kim-1 excretion was unchanged by Cd exposure (Table1). This result is taken as evidence that no kidney injury accompanied exposure to the Cd doses implemented here.

Table 1: Effect of Cd exposure on urinary parameters.

	Control	Cd50	Cd500
Cd (nmol/mmol creat.)	0.60 ± 0.08	0.98 ± 0.15	1.85 ± 0.37*
Kim-1 (ng/kg/24h)	12.3 ± 1.2	14.6 ± 4.1	12.3 ± 1.6

Kim-1 : kidney injury molecule 1. Data are expressed as mean ± SEM. (n=6 per group). Data for males and females were pooled since no statistically significant differences were observed between both genders. * data are significantly different compared to control group (p<0.05).

e. Trace elements concentration in urine

The urinary Cd concentration normalized by creatinine, at the end of the 3-month exposure, was similar for Ctrl and Cd50 and statistically increased by only 3 folds in Cd500 (Table1). These findings showing only a mild increase in urinary Cd, confirmed that Cd exposure did not induce kidney toxicity in our model, as, in that case, a remarkable rise of Cd excretion would be observed (Prozialeck and Edwards 2010; Suzuki 1980). Other trace elements were assayed in urine (Cu, Fe, Mn, Se, Zn) but no statistically significant differences were found (data not shown).

f. Transaminases in plasma

To assess potential hepatic toxicity, plasma transaminases were assayed (Table 2). Both ASAT and ALAT levels were unchanged between groups and genders suggesting an absence of liver toxicity induced by the implemented Cd treatments.

Table 2: Effect of Cd exposure on plasma parameters

	Females			Males		
	Control	Cd50	Cd500	Control	Cd50	Cd500
ASAT (UI)	167.0 ± 31.4	141.3 ± 16.7	132.3 ± 6.9	142.6 ± 13.0	152.6 ± 3.7	165.4 ± 18.2
ALAT (UI)	56.0 ± 6.7	59.3 ± 9.8	52.5 ± 2.7	51.9 ± 4.0	54.0 ± 1.7	57.2 ± 1.2
TBARS (µM)	5.74 ± 0.19	6.04 ± 0.21	6.12 ± 0.38	5.28 ± 0.16	6.06* ± 0.20	5.85* ± 0.19
GPx (mM)	7.40 ± 0.28	6.92 ± 0.20	7.03 ± 0.32	7.77 ± 0.26	7.84 ± 0.35	7.82 ± 0.11
TG (g.L ⁻¹)	2.43 ± 0.30	1.87 ± 0.20	2.06 ± 0.46	1.79 ± 0.29	2.47 ± 0.64	1.96 ± 0.20
CHOL (g.L ⁻¹)	0.78 ± 0.05	0.90 ± 0.12	0.83 ± 0.05	0.68 ± 0.10	0.71 ± 0.03	0.82 ± 0.11
HDL (g.L ⁻¹)	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.06	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.48 ± 0.05
Quicki	0.342 ± 0.009	0.318* ± 0.003	0.317* ± 0.007	0.295 ± 0.013	0.289 ± 0.004	0.285 ± 0.002

ASAT: aspartate aminotransferase, ALAT: alanine aminotransferase, TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances, GPx: glutathione peroxidase, TG: triglycerides, CHOL: total cholesterol, HDL: High density lipoprotein cholesterol, Quicki: quantitative insulin sensitivity check index. Data are expressed as mean ± SEM. (n=4-8 per group). * data are significantly different compared to control group of the same gender (p<0.05).

g. Oxidative status parameters in plasma

TBARs were assayed in plasma in order to determine the impact of the Cd treatments on the generation of radical species, including upon lipid peroxidation (Table 2). Whereas the TBARs concentration was not statistically different in females, there was a mild significant increase in the male Cd50 and Cd500 groups, ($p < 0.05$) but without proportionality to the Cd dose (Table 2).

The activity of the antioxidant enzyme GPx was not altered by Cd exposure by comparison of groups and genders (Table 2).

Effect of Cd exposure on glucose and lipid homeostasis

h. Parameters of lipid homeostasis

No statistical differences were observed in plasma triglycerides between groups for both sexes (Table 2). Plasma total cholesterol levels were also unchanged as were HDL concentrations. Thus, the applied Cd treatments did not induce major deregulation of plasma lipid concentrations.

i. Glucose metabolism parameters

The 3-month Cd exposure to 50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ did not alter plasma glucose levels after a 16-hour fast in males and females (Figure 2 A, E).

However, the insulin plasma levels of female rats after fasting for 16 hours were increased by 30% in Cd50 ($p = 0.023$) and by 66% in Cd500 ($p = 0.01$) (Figure 2G). This effect was not observed in male rats (Figure 2C).

To assess the endocrine pancreatic function, fasting C peptide levels in plasma were determined. In all groups, the C peptide levels were similar in all groups, suggesting that fasting insulin (basal) secretion was not sensitive to Cd exposure in our study (Figure 2 B, F).

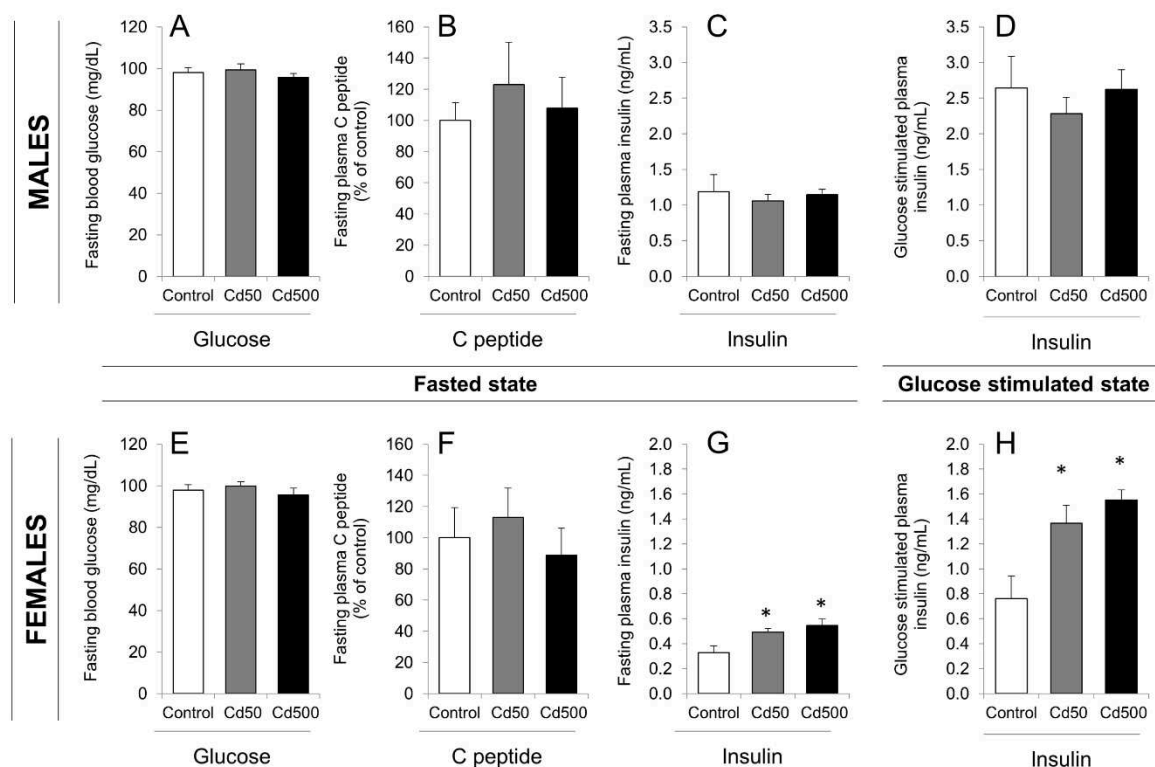


Figure 2. Effect of Cd exposure on glucose metabolism plasma parameters at fasted and glucose stimulated states. Blood was collected after a 16h fast and 15 minutes after an intraperitoneal injection of $2g.kg\text{ }bw^{-1}$ of glucose. Fasting parameters for males: blood glucose (A), plasma C peptide (B), and plasma insulin (C). Glucose stimulated parameter for males: plasma insulin (D). Fasting parameters for females: blood glucose (E), plasma C peptide (F), and plasma insulin (G). Glucose stimulated parameter for females: plasma insulin (H). Data are expressed as mean \pm SEM. ($n=4$ to 8 per group). * data are significantly different compared to control of the same gender ($p<0.05$).

j. Glucose tolerance

Glucose tolerance was then tested with an Intraperitoneal Glucose Tolerance Test. For control rats, blood glucose levels increased by 125% in females and 145% in males during the first 5 minutes after glucose injection. Then, it decreased regularly to reach +17% of fasting glycemia for females and +23% for males after 2 hours. No impact of Cd exposure was noticeable in the regulation of blood glucose levels in both genders as shown by similar IpGTT curves and AUC (Figure 3). Plasma insulin levels circulating 15 minutes after glucose injection were increased in females, by 79% in Cd50 ($p=0.022$) and by 100% in Cd500 ($p=0.01$) (figure 2H), whereas no differences were detected in males (Figure 2D).

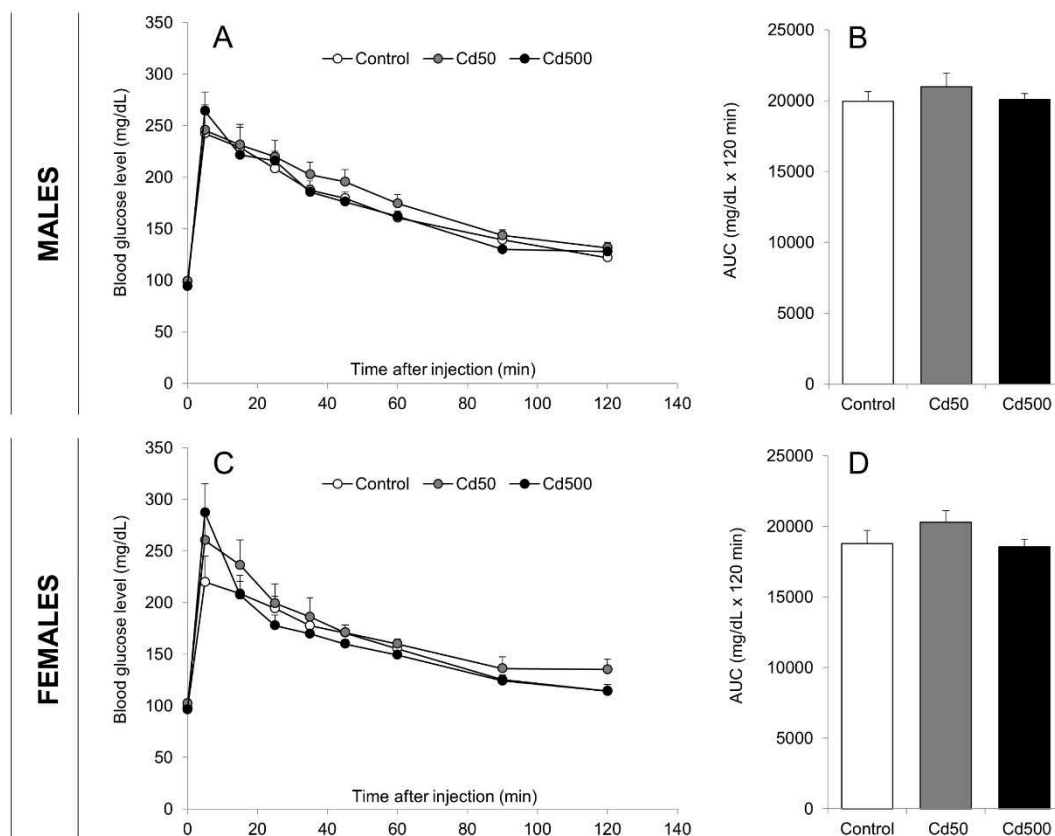


Figure 3. Effect of Cd exposure on an intra-peritoneal glucose tolerance test (IpGTT). Following a 16h fast, glucose was injected intra-peritoneally at 1g/kg of body mass. Area Under Curve (AUC) was calculated with the values for all the time points, IpGTT for males: changes of blood glucose levels over time (A) and AUC (B). IpGTT for females: changes of blood glucose levels over time (C) and AUC (D). Data are expressed as mean \pm SEM. (n=4 to 7 per group).

k. Insulin tolerance

Insulin tolerance was tested with the Intraperitoneal Insulin Tolerance Test. In control rats, blood glucose levels dropped by 29% between 10 and 20 minutes, for both males and females. Then, glycemia progressively decreased to reach -58% of fasting value for females and -56% for males, 90 minutes after injection. IpITT curves as well as calculated AUC did not differ between groups of Cd exposed animals and controls, for both genders (Figure 4).

However, the index of insulin sensitivity Quicki was similarly reduced in females of both Cd50 and Cd500 groups by ca. 7% (p=0.05 and p=0.033, respectively) (Table2). This index was not altered in males.

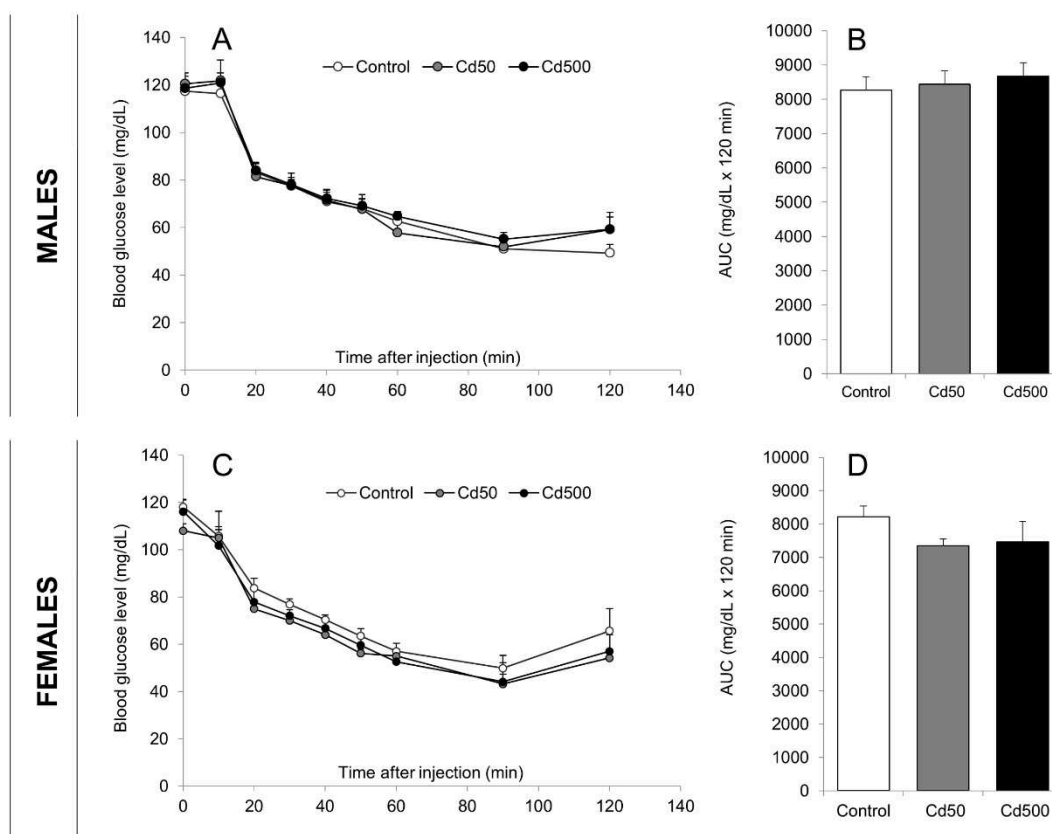


Figure 4. Effect of Cd exposure on an intra-peritoneal insulin tolerance test (IpITT). Following a 5h fast, insulin was intraperitoneally injected at $1\text{mU}\cdot\text{g}^{-1}$ of body mass. IpITT for males: changes of blood glucose levels over time (A) and Area Under Curve (AUC) (B). IpITT for females: changes of blood glucose levels over time (C) and AUC (D). Data are expressed as mean \pm SEM. ($n=5$ to 9 per group).

Discussion

The aim of the present study was to evaluate the effects of a chronic relevant Cd exposure on glucose metabolism of adult rats since, to date, the topic remains controversial. It remains the need to evaluate the impact of realistic and environmentally-derived Cd exposure models with low concentrations, oral administration, and long periods of exposure.

In the present study, we have shown that despite addition of the pollutant to drinking water, the lowest dose of $5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ hardly changes cadmium organs accumulation as compared to the level of exposure of the control group receiving the normal chow. The other two moderate doses induce variations of biochemical parameters relative to plasma oxidative status and glucose homeostasis in sex-dependent but not dose-dependent ways. Specific

attention was given to the choice of the conditions and to the monitoring of animal exposure. As a reminder, the Cd levels administered to the rats have been chosen with reference to environmental exposure and benchmark values (reviewed in (Maret and Moulis 2013)) with retrospective reassessment of the actual values of absorbed Cd concentrations.

In our experimental model of Cd exposure, Cd5 rats did not show any change in Cd concentration in plasma and organs compared to controls. After proper check of the diet given to the animals, this has been assigned to the Cd contamination of the mainly cereal-based chow (33 ng Cd.g^{-1}) which largely exceeds the contamination of water (291 ng.L^{-1}). Indeed, the total amount of ingested Cd (food and intentionally contaminated water) by the rats in Cd5 group was only 3.5 times higher than the daily Cd intake of the control group (see Table S1). However, this increased Cd exposure for 3 months did not trigger any significant enhanced accumulation in the studied organs and in the plasma and urine compartments (Figure 1). The level of exposure in the Cd5 group, even though it is theoretically relevant when referred to the recommended limit values of exposure (see results), illustrates the limitations of laboratory work with very low doses. It shows that the absence of contamination is elusive for some compounds, since control groups are already exposed to non-zero concentrations, as for cadmium in the present case. The idea of non-exposed control groups should, thus, be replaced by that of an experimental baseline of exposure in such studies. Yet, the study of the Cd5 group shows also that Cd health effects at chronic (3 months) low doses may exhibit a threshold below which no effects can be observed within the sensitivity limits of the implemented methods. According to the work reported herein, this threshold lies somewhere between 5 and $50 \mu\text{g Cd.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ which is far lower than the previously reported NOAEL. In view of the absence of differences with the reference group, further studies with the Cd5 group were not pursued.

Concerning Cd50 and Cd500 groups, and in order to validate the relevance of our model, we checked the lack of major toxicity. Moreover, we relied on Cd amount found in organs at the end of the exposure rather than exposure levels which depend on duration, dose, routes of administration, absorption rate and speciation.

The levels of Cd and Kim-1 in urine, on the one hand, and the lack of alteration in plasma transaminases and in body and organs masses after Cd treatment, on the other hand, clearly show that the objective was fulfilled in that chronic moderate level exposure to Cd did not induce major toxicity.

Cd concentrations were significantly increased in plasma, kidney and liver indicating a dose-dependent Cd accumulation in these compartments and organs as expected (Kjellström 1979). In our study, the Cd concentration in kidney, for both group (0.19 ± 0.02 and $2.40 \pm 0.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ in Cd50 and Cd500, respectively), was of the same order of magnitude or below the amounts found in human kidneys. Indeed, Cd concentration was found to range from 0.62 to $61.3 \mu\text{g.g}^{-1}$ and 1.78 to $21.86 \mu\text{g.g}^{-1}$ in kidneys obtained from autopsied non-occupationally exposed Polish and French people, respectively (Goullé et al. 2010; Lech and Sadlik 2017). Cd concentration was about 70-80 $\mu\text{g.g}^{-1}$, reaching 250 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in renal cortex of Japanese people living in supposedly non-polluted areas (Uetani et al. 2006).

Considering the preceding observations, we posit that the model implemented in the present study represents a valid chronic environmentally relevant Cd exposure of animals.

In male rats, no impact of Cd exposure was observed on glucose metabolism in the presently implemented conditions. In contrast with the results with females, showing a non-statistically significant trend, plasma TBARS in males were slightly but statistically significantly increased in Cd50 and in Cd500 rats. However, a lack of dose-dependence was observed for this enhancement, as the Cd50 group displays values similar to those of the Cd500 one.

Mild lipid peroxidation is likely to contribute to this increase, but no large antioxidant response was observed. Multiple studies report the ability of Cd to contribute to the alteration of the cellular redox balance. The possible mechanisms and consequences in target organs have been extensively reviewed (Cuypers et al. 2010; Liu et al. 2009; Nair et al. 2013). The impact of Cd exposure on the redox equilibrium is highly dependent on doses, length of exposure and frequency (Jacquet et al. 2016; Nair et al. 2013). Thus, effects observed in various studies are highly variable and difficult to compare.

In a study on male rats eating Cd contaminated fish for 1 month (corresponding to a daily amount of about $34 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$) about 2.5 times higher TBARS was observed in plasma but this

effect was reversed after 3 months of exposure (Ogheneovo Asagba 2010), which, without deeper monitoring, would suggest systemic adaptation to the mild stress. Even if the daily Cd level administered and the Cd concentration in the kidney of the rats is similar to ours, the amount of Cd in the liver is about 3 times higher than in our study. Thus, our model is not totally comparable with this work, maybe due to the use of a complex food matrix (fish), rich in nutrients that could impact Cd toxicokinetic and distribution.

In accordance to our findings, the enhanced sensitivity for males, upon Cd exposure, to lipid peroxidation was previously reported in serum and liver with a more pronounced increase of TBARS in males than in females (Andersen and Andersen 1988; Kara et al. 2005; Sato and Nagai 1986). This difference could be attributed to difference in antioxidant enzyme (Sobocanec et al. 2003) or to the scavenging effect of estrogen (Behl and Lezoualc'h 1998).

A note of caution with TBARS measurements is that many oxidizing molecules, beyond lipid peroxides, may contribute to the signal (Forman et al. 2015). Thus, the discussion about the 10-15% enhanced TBARS values cannot be restricted to specific lipid peroxidation.

On the basis of these observations, the physio-pathological consequences of the presence of increased oxidizing species in the male plasma should be further explored. Studies on males, for a longer period, of low level exposure should give insight on a possible worsening of these effects.

In female rats, after 3 months of Cd exposure, fasting plasma glucose and lipid parameters (triglycerides, HDL and total cholesterol) were not altered in any groups. These rats exhibited similar response to IpGTT, suggesting that the regulation of glycemia was still maintained. However, fasting plasma insulin in females of both Cd-exposed groups was increased, a trend conserved 15 minutes after glucose stimulation. Remarkably, the ratios of plasma insulin 15 minutes after stimulation to basal fasting were unchanged in these females (2.35 ± 0.40 , 2.78 ± 0.44 , 2.90 ± 0.33 for Control, Cd50 and Cd500, respectively), meaning that the magnitude of the pancreatic response to the increase of blood glucose remained the same despite increased basal and stimulated insulin values in the Cd-treated groups.

The increased circulating insulin may be due to an increase of secretion process by the pancreas. To assess this aspect, fasting C peptide levels were determined since C peptide and

insulin are secreted in equimolar amount by the pancreas. While about 50% of circulating insulin is rapidly extracted by the liver, the C peptide is eventually cleared by the kidney, leading to a longer biological life time in blood (Katz and Rubenstein 1973). This property makes plasma C peptide level a more suitable marker of insulin secretion per se, compared to insulin levels which results from insulin secretion and tissues uptake, especially in the liver. In the present study, fasting C peptide levels were unchanged in the plasma of Cd-exposed rats in both females and males, meaning that insulin secretion was not measurably altered by Cd exposure. Thus, the concomitant increase of fasting insulin levels in females suggests an abnormal extraction of circulating insulin by the liver. Elevated insulin is a classic anomaly detected in type 2 diabetic states and it is usually interpreted as a manifestation of insulin resistance. The quantitative insulin sensitivity check index (Quicki) is a valid parameter to assess insulin resistance in Wistar rats (Cacho et al. 2008). Although no cut-off values were set for rats due to the considerable biological variability of insulin levels, the relative comparison between groups of the same study is possible.

Regarding our results, the significant decrease of the Quicki index of about 7% for the female groups of Cd50 and Cd500 evidences mild alteration of insulin sensitivity. This finding is in line with the rise of fasting insulin levels, which is the main contributor to the shift of this index. Despite the Quicki variations, no differences were noticed in the IpITT measurements of Cd-exposed rats, including females. It thus appears that IpITT could be not sensitive enough to minute changes in individual parameters of glucose homeostasis, since the amount of injected insulin during this test largely exceeds that of endogenous insulin under physiological conditions. Consequently, the subtle effect observed on insulin sensitivity has been hidden by the large bolus of insulin injected during the IpITT.

Most of the studies on the present topic are hardly comparable to the chronic and moderate dietary Cd exposure that we have implemented, due to the applied concentrations of Cd and the route of administration. For the following discussion, comparison with results from the few studies carried out with oral moderate Cd exposure will be made. In most of these studies, the impact of Cd exposure was relatively subtle. In accordance with our results, blood glucose was unchanged after one year of exposure to 0.3 mg.kg⁻¹.d⁻¹ in drinking water (Lovásová et al. 2013) and after 3 months to about 34 µg.kg⁻¹.d⁻¹ in contaminated food (Ogheneovo Asagba 2010). Ficková et al showed that a 6-week exposure to 9.7 mg.L⁻¹ of Cd in

drinking water induced an increase of fasting insulin by ca. 45% (Ficková et al. 2003) which agrees with and extends at higher concentrations our findings reported here. Indeed, in this model, Cd concentration in liver is 12 times higher than in our Cd500 animals. In addition, the same previous study found that the insulin receptor density was decreased on adipocytes. Another study showed a remarkably intense alteration of both insulin sensitivity and glucose tolerance appearing after only 1 month of Cd exposure (Treviño et al. 2015). Although the level of Cd used was defined as chronic and estimated to lead to a low level of Cd intake (6.5-16.25 µg/day), the Cd concentration found in pancreas, liver, and kidneys were 23, 50 and 8 times higher than the ones of our Cd500 group. Moreover, the lack of reported details on the monitoring of exposure do not allow us to clarify this apparent contradiction. Thus, we cannot carry out any valid comparison with our own work.

The consequences of latent insulin resistance and disturbed turnover may worsen after a longer exposure.

An interesting point of our study is the gender-bias of Cd effects. Sexual dimorphism towards Cd toxicity has already been documented, mentioning females being more susceptible to Cd toxicity. Lethal Cd toxicity, after a subcutaneous injection of 5 mg.kg⁻¹, was exacerbated in female rats compared with males or ovariectomized females. Besides treatment of ovariectomized females with progesterone or β-estradiol increased mortality (Shimada et al. 2012). Females were found to be more sensitive to Cd-induced nephrotoxicity and bone effects as reviewed by Vahter et al (Vahter et al. 2007), but also immunotoxicity (Pillet et al. 2006) and hepatotoxicity (Shimada et al. 2012). Several studies suggest interference of Cd with sex-hormones, such as progesterone and estradiol, hence suggesting Cd as an endocrine disruptor (Choe et al. 2003; Höfer et al. 2010; Johnson et al. 2003). Indeed, Cd has the ability to form a complex with the hormone-binding domain of estrogen receptor (Stoica et al. 2000), and a single intraperitoneal low level injection of Cd (5 µg.kg⁻¹) was found to induce uterine hyperplasia, growth of mammary gland and induction of hormone-related genes in ovariectomized rats (Johnson et al. 2003). Furthermore, progesterone is thought to exacerbate Cd toxicity, in particular in liver, through the modulation of receptor-mediated calcium channels in isolated rat hepatocytes (Baker et al. 2003). To our knowledge, no experimental studies were done focusing on sex-related effects of Cd exposure on glucose metabolism,

although they are available for other pollutants (Naville et al. 2013). In view of the interplay between sex hormones and glucose metabolism (Bruns and Kemnitz 2004; Varlamov et al. 2015), the current debate about the estrogenic effects of cadmium (Silva et al. 2012) should be extended to insulin signaling and sensitivity.

Conclusion

Our study provides a now well-characterized and relevant model of environmental exposure to dietary cadmium for a conventional Cd-sensitive rat strain (McKenna et al. 1997). This enables to tackle the issue of experimental moderate level exposure and its difficulties, in particular, the background noise due to latent pollution.

Our findings demonstrate that after oral exposure to low level of Cd, metabolic alterations appeared only in Cd-exposed females. These effects were enhanced at a higher Cd level. Concerning males, Cd exposure impacted certain pathways leading to oxidative damages.

Further studies are thus warranted on this basis to assess the impact of low level chronic cadmium exposure on more vulnerable populations such as younger and older rats, pregnant females or subjects prone to develop metabolic diseases, with unhealthy diet for example.

In the toxicological studies, and whatever the pollutant, there is a need to carefully designed studies focusing on environmentally relevant, (i.e. low concentrations). The relevance of the model must be assessed considering not only theoretical reference values but also the latent surrounding contamination, the lack of a major toxicity, and particularly, the pollutant concentration inside the target organs. In the future, all these aspects must be taken into account in the evaluation or re-evaluation of NOAEL for all pollutants.

References

- Afridi HI, Kazi TG, Brabazon D, Naher S, Talpur FN. 2013. Comparative metal distribution in scalp hair of Pakistani and Irish referents and diabetes mellitus patients. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 415:207–214; doi:10.1016/j.cca.2012.10.029.
- Andersen HR, Andersen O. 1988. Effect of Cadmium Chloride on Hepatic Lipid Peroxidation in Mice. *Pharmacol. Toxicol.* 63:173–177; doi:10.1111/j.1600-0773.1988.tb00934.x.
- Anetor JI, Uche CZ, Ayita EB, Adedapo SK, Adeleye JO, Anetor GO, et al. 2016. Cadmium Level, Glycemic Control, and Indices of Renal Function in Treated Type II Diabetics: Implications for Polluted Environments. *Front. Public Health* 4:114; doi:10.3389/fpubh.2016.00114.
- ATSDR. 2012. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Baker TK, VanVooren HB, Smith WC, Carfagna MA. 2003. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 137:185–192; doi:10.1016/S0378-4274(02)00402-2.
- Barregard L, Bergström G, Fagerberg B. 2013. Cadmium exposure in relation to insulin production, insulin sensitivity and type 2 diabetes: a cross-sectional and prospective study in women. *Environ. Res.* 121:104–109; doi:10.1016/j.envres.2012.11.005.
- Behl C, Lezoualc'h F. 1998. Estrogens with an intact phenolic group prevent death of neuronal cells following glutathione depletion. *Restor. Neurol. Neurosci.* 12: 127–134.
- Borné Y, Fagerberg B, Persson M, Sallsten G, Forsgard N, Hedblad B, et al. 2014. Cadmium exposure and incidence of diabetes mellitus - results from the malmö diet and cancer study. *PloS One* 9:e112277; doi:10.1371/journal.pone.0112277.
- Bruns CM, Kemnitz JW. 2004. Sex Hormones, Insulin Sensitivity, and Diabetes Mellitus. *ILAR J.* 45:160–169; doi:10.1093/ilar.45.2.160.
- Cacho J, Sevillano J, Castro J de, Herrera E, Ramos MP. 2008. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 295:E1269–E1276; doi:10.1152/ajpendo.90207.2008.
- Choe S-Y, Kim S-J, Kim H-G, Lee JH, Choi Y, Lee H, et al. 2003. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci. Total Environ.* 312:15–21; doi:10.1016/S0048-9697(03)00190-6.
- Cuyper A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals* 23:927–940; doi:10.1007/s10534-010-9329-x.

- Edwards J, Ackerman C. 2015. A Review of Diabetes Mellitus and Exposure to the Environmental Toxicant Cadmium with an Emphasis on Likely Mechanisms of Action. *Curr. Diabetes Rev.*
- Edwards JR, Prozialeck WC. 2009. Cadmium, Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:289–293; doi:10.1016/j.taap.2009.03.007.
- El Muayed M, Raja MR, Zhang X, MacRenaris KW, Bhatt S, Chen X, et al. 2012. Accumulation of cadmium in insulin-producing β cells. *Islets* 4:405–416; doi:10.4161/isl.23101.
- European Food Safety Authority. 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10:n/a-n/a; doi:10.2903/j.efsa.2012.2551.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 7:n/a-n/a; doi:10.2903/j.efsa.2009.980.
- Ficková M, Eybl V, Kotyzová D, Micková V, Möstbök S, Brtko J. 2003. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 16: 561–566.
- Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, et al. 2015. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic. Biol. Med.* 78:233–235; doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504.
- Franz E, Römkens P, van Raamsdonk L, van der Fels-Klerx I. 2008. A chain modeling approach to estimate the impact of soil cadmium pollution on human dietary exposure. *J. Food Prot.* 71: 2504–2513.
- Goullé J-P, Mahieu L, Anagnostides J-G, Bouige D, Saussereau E, Guerbet M, et al. 2010. Profil métallique tissulaire par ICP-MS chez des sujets décédés. *Ann. Toxicol. Anal.* 22:1–9; doi:10.1051/ata/2010001.
- Günzler WA, Kremers H, Flohé L. 1974. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12: 444–448.
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Kluxen FM, Degen GH. 2010. Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine. *Arch. Toxicol.* 84:541–552; doi:10.1007/s00204-010-0524-x.
- Jacquet A, Ounnas F, Lénon M, Arnaud J, Demeilliers C, Moulis J-M. 2016. Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Diabetes: Role of Oxidative Stress and Comparison with Polychlorinated Biphenyls. *Curr. Drug Targets* 17: 1385–1413.
- Järup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:201–208; doi:10.1016/j.taap.2009.04.020.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, et al. 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* 9:1081–1084; doi:10.1038/nm902.

- Kara H, Karatas F, Canatan H. 2005. Effect of single dose cadmium chloride administration on oxidative stress in male and female rats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29: 37–42.
- Katz AI, Rubenstein AH. 1973. Metabolism of Proinsulin, Insulin, and C-Peptide in the Rat. *J. Clin. Invest.* 52: 1113–1121.
- Kjellström T. 1979. Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden. *Environ. Health Perspect.* 28: 169.
- Lech T, Sadlik JK. 2017. Cadmium Concentration in Human Autopsy Tissues. *Biol. Trace Elem. Res.*; doi:10.1007/s12011-017-0959-5.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:209–214; doi:10.1016/j.taap.2009.01.029.
- Lovásová E, Rácz O, Cimboláková I, Nováková J, Dombrovský P, Ništiar F. 2013. Effects of chronic low-dose cadmium exposure on selected biochemical and antioxidant parameters in rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 76:1033–1038; doi:10.1080/15287394.2013.828249.
- Maret W, Moulis J-M. 2013. The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. *Met. Ions Life Sci.* 11:1–29; doi:10.1007/978-94-007-5179-8_1.
- McKenna IM, Waalkes MP, Chen LC, Gordon T. 1997. Comparison of inflammatory lung responses in Wistar rats and C57 and DBA mice following acute exposure to cadmium oxide fumes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146:196–206; doi:10.1006/taap.1997.8241.
- Menke A, Guallar E, Cowie CC. 2015. Metals in Urine and Diabetes in United States Adults. *Diabetes db150316*.
- Merali Z, Singhal RL. 1980. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* 69: 151–157.
- Moon S-S. 2013. Association of lead, mercury and cadmium with diabetes in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 30:e143-148; doi:10.1111/dme.12103.
- Nair AR, DeGheselle O, Smeets K, Kerkhove EV, Cuyper A. 2013. Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? *Int. J. Mol. Sci.* 14:6116; doi:10.3390/ijms14036116.
- Naville D, Pinteur C, Vega N, Menade Y, Vigier M, Le Bourdais A, et al. 2013. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27:3860–3870; doi:10.1096/fj.13-231670.
- Nie X, Wang N, Chen Y, Chen C, Han B, Zhu C, et al. 2016. Blood cadmium in Chinese adults and its relationships with diabetes and obesity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*; doi:10.1007/s11356-016-7078-2.

- Ogheneovo Asagba S. 2010. Biochemical changes in urine and plasma of rats in food chain-mediated cadmium toxicity. *Toxicol. Ind. Health* 26:459–467; doi:10.1177/0748233710371108.
- Pillet S, D'Elia M, Bernier J, Bouquegneau J-M, Fournier M, Cyr DG. 2006. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 92:423–432; doi:10.1093/toxsci/kfl005.
- Prozialeck W, Vaidya V, Liu J, Waalkes M, Edwards J, Lamar P, et al. 2007. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int.* 72:985–993; doi:10.1038/sj.ki.5002467.
- Prozialeck WC, Edwards JR. 2010. Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *BioMetals* 23:793–809; doi:10.1007/s10534-010-9288-2.
- Richard MJ, 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.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health Perspect.* 118:182–190; doi:10.1289/ehp.0901234.
- Sato M, Nagai Y. 1986. Sex-related differences in NADPH-dependent lipid peroxidation induced by cadmium. *Arch. Toxicol.* 59: 156–159.
- Schwartz GG, Il'yasova D, Ivanova A. 2003. Urinary Cadmium, Impaired Fasting Glucose, and Diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care* 26:468–470; doi:10.2337/diacare.26.2.468.
- Shimada H, Hashiguchi T, Yasutake A, Waalkes MP, Imamura Y. 2012. Sexual dimorphism of cadmium-induced toxicity in rats: involvement of sex hormones. *Arch. Toxicol.* 86:1475–1480; doi:10.1007/s00204-012-0844-0.
- Silva N, Peiris-John R, Wickremasinghe R, Senanayake H, Sathiakumar N. 2012. Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *J. Appl. Toxicol.* 32:318–332; doi:10.1002/jat.1771.
- Smolders E. 2001. Cadmium uptake by plants. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14: 177–183.
- Sobocanec S, Balog T, Sverko V, Marotti T. 2003. Sex-dependent antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in ageing mouse brain. *Free Radic. Res.* 37: 743–748.
- Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14:545–553; doi:10.1210/mend.14.4.0441.
- Suzuki Y. 1980. Cadmium metabolism and toxicity in rats after long-term subcutaneous administration. *J. Toxicol. Environ. Health* 6:469–482; doi:10.1080/15287398009529866.
- Swaddiwudhipong W, Nguntra P, Kaewnate Y, Mahasakpan P, Limpatanachote P, Aunjai T, et al. 2015. Human health effect from cadmium exposure: comparison between persons

- living in cadmium-contaminated and non-contaminated areas in northwestern thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 46: 133–142.
- Thévenod F, Wolff NA. 2016. Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. *Met. Integr. Biometal Sci.* 8:17–42; doi:10.1039/c5mt00215j.
- Treviño S, Waalkes MP, Flores Hernández JA, León-Chavez BA, Aguilar-Alonso P, Brambila E. 2015. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 583:27–35; doi:10.1016/j.abb.2015.07.010.
- Uetani M, Kobayashi E, Suwazono Y, Honda R, Nishijo M, Nakagawa H, et al. 2006. Tissue cadmium (Cd) concentrations of people living in a Cd polluted area, Japan. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 19:521–525; doi:10.1007/s10534-005-5619-0.
- Vahter M, Åkesson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M. 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* 104:85–95; doi:10.1016/j.envres.2006.08.003.
- Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT. 2015. Sex-Specific Differences in Lipid and Glucose Metabolism. *Front. Endocrinol.* 5; doi:10.3389/fendo.2014.00241.
- Wallia A, Allen NB, Badon S, El Muayed M. 2014. Association between urinary cadmium levels and prediabetes in the NHANES 2005-2010 population. *Int. J. Hyg. Environ. Health;* doi:10.1016/j.ijheh.2014.06.005.
- Yang A, Liu S, Cheng N, Pu H, Dai M, Ding J, et al. 2017. Multiple metals exposure, elevated blood glucose and dysglycemia among Chinese occupational workers. *J. Diabetes Complications* 31:101–107; doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.07.022.

Supplemental material

Table S1: Contribution of chow, water and intentionally given Cd to total Cd intake

Group	Sex	In chow		In pure drinking water		Intentional contamination	
		Amount of Cd (µg.kg-1.d-1)	% of total Cd intake	Amount of Cd (µg.kg-1.d-1)	% of total Cd intake	Amount of Cd (µg.kg-1.d-1)	% of total Cd intake
Control	Female	2.2	98.2	0.041	1.8	0	0
	Male	1.7	98.7	0.022	1.3	0	0
Cd5	Female	2.3	29.4	0.034	0.4	5.5	70.2
	Male	1.7	24.2	0.021	0.3	5.3	75.5
Cd50	Female	2.5	4.5	0.034	0.1	53.3	95.5
	Male	1.8	3.1	0.023	0.0	55.8	96.8
Cd500	Female	2.3	0.5	0.033	0.0	495.9	99.5
	Male	2.0	0.4	0.02	0.0	515.0	99.6

Data are expressed as mean, calculated based on mean body mass, water and food consumption and Cd concentration of each component as described in formulas below. Cd brought by pure drinking water remained negligible whereas chow Cd contamination added a significant contribution to the total intake for control and Cd5 groups.

Calculations for average daily amounts of Cd in chow (1), pure drinking water (2) and intentionally given Cd (3). Calculations were done for each group and each sex separately.

$$(1) \frac{\text{Cd concentration in chow } (\mu\text{g.g}^{-1}) \times \text{Average daily food intake } (\text{g.d}^{-1})}{\text{Average body mass } (\text{kg})}$$

$$(2) \frac{\text{Cd concentration in pure drinking water } (\mu\text{g.L}^{-1}) \times \text{Average daily water consumption } (\text{L.d}^{-1})}{\text{Average body mass } (\text{kg})}$$

(3) Each week:

$$\frac{\text{Cd concentration intentionally added in drinking bottle } (\mu\text{g.L}^{-1}) \times \text{Real daily water consumption } (\text{L.d}^{-1})}{\text{Body mass } (\text{kg})}$$

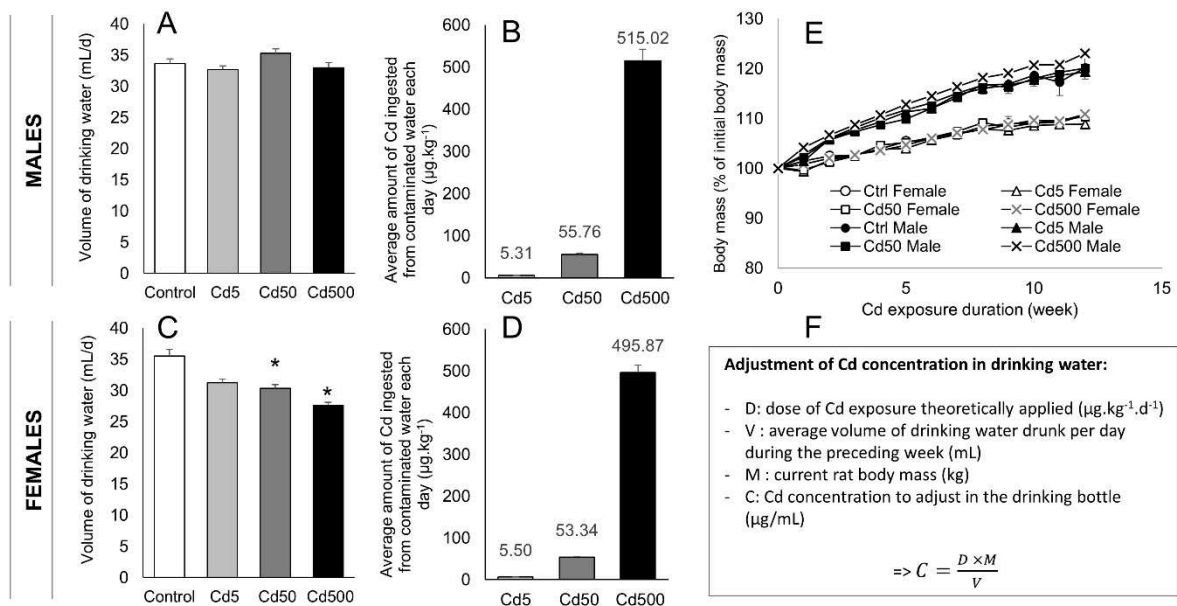


Figure S1. Experimental model parameters. For males, average daily water consumption (A) and average daily amount of Cd ingested from contaminated water (B). For females, average daily water consumption (C) and average daily amount of Cd ingested from contaminated water (D). Average daily amount of ingested Cd was calculated based on water consumption, rat body mass and Cd concentration in drinking bottle each week. Change of rat body mass against time (E). Calculation for weekly adjustment of Cd concentration in drinking bottle (F). Data are expressed as mean \pm SEM ($n=9-10$ per group). * data are significantly different compared to control group ($p<0.05$).

Impact de l'exposition maternelle à faibles doses de cadmium avant et pendant la gestation et la lactation, sur le métabolisme de la descendance à différent âges.

Article 2: en préparation

Impact of maternal low-level cadmium exposure before and during gestation, and during lactation on metabolism of offspring at different ages.

Jacquet Adeline^{1,2}, Barbeau Damien^{3,4}, Arnaud Josiane^{1,2,3}, Hazane-Puch Florence³, Lamarche Frédéric^{1,2}, Quiclet Charline^{1,2}, Couturier Karine^{1,2}, Fontaine Eric^{1,2,3}, Moulis Jean-Marc^{1,2,5}, Demeilliers Christine^{1,2}.

Présentation :

Dans la première étude, nous avons étudié les effets d'une exposition chronique à faible doses de Cd, pendant 3 mois, sur le métabolisme du glucose de rats adultes mâles et femelles. Pour ce faire, nous avons mis en place un modèle pertinent et réaliste en termes de dose, de mode et de durée d'administration du Cd et prenant en compte les contraintes et les limites liés à une expérimentation. Dans ce modèle, les concentrations de Cd retrouvées dans les organes sont comparables aux données disponibles chez l'homme. De plus, cette exposition chronique n'entraîne pas chez les adultes de toxicité visible au niveau des reins, ni du foie. Cependant, les rats adultes femelles exposées à 50 et 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ présentent une augmentation significative de l'insuline plasmatique à jeun et en état de stimulation par le glucose, et une perte légère de sensibilité périphérique à l'insuline.

A la vue de ces résultats, nous nous sommes demandés si ces effets seraient exacerbés dans une population plus vulnérable. Nous nous sommes donc intéressés aux effets d'une exposition maternelle sur le métabolisme de la descendance. En effet, cette population présente une susceptibilité plus grande au Cd mais aussi aux maladies métaboliques : (1) l'absorption du Cd par les mères pendant la gestation peut être augmentée, entraînant une plus grande exposition et le transfert du Cd au fœtus pendant la gestation et à l'enfant par la lactation ; (2) l'impact de facteurs environnementaux pendant la période périnatale et de développement est déterminant pour la santé future et en particulier pour les maladies chroniques et métaboliques comme le diabète.

Dans ce contexte, le but de cette étude était d'étudier l'impact de l'exposition de rates avant et pendant la gestation et la lactation sur le métabolisme de la descendance. Nous avons utilisé le même modèle d'exposition que dans l'étude précédente : 0, 50 et 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de Cd dans l'eau de boisson, formant 3 groupes de mère : contrôles, Cd1 et Cd2. Afin d'étudier l'évolution des effets d'une telle exposition sur la descendance, nous avons étudié les ratons à 3 âges différents : 21, 26 et 60 jours après la naissance.

Dans une première partie du travail, nous avons étudié les ratons à 21 jours au moment où ils viennent d'être sevrés. Cela correspond à la fin de l'exposition via la mère. Les ratons des

mères exposées présentent des concentrations de Cd augmentée de façon dose-dépendante dans le rein, le foie et le pancréas, ce qui indique que le Cd des mères est transféré à la descendance pendant la gestation et la lactation. Chez ces ratons, la sécrétion d'insuline n'est pas altérée alors que la tolérance au glucose est diminuée. L'exposition maternelle au Cd semble donc impacter la sensibilité périphérique à l'insuline. L'augmentation de 20% de la concentration plasmatique en acides gras libre chez les ratons des mères les plus exposées (Cd2) semble en accord avec cette hypothèse.

Comme la période autour du sevrage est très particulière d'un point de vue métabolique avec des changements rapides dont l'impact peut avoir des conséquences à long terme, nous avons étudié l'évolution des effets quelques jours plus tard, chez les ratons de 26 jours. A cet âge, les différences de tolérance au glucose observée à 21 jours, ne sont plus visibles suggérant que la résistance à l'insuline a disparu ou est compensée par un autre mécanisme. L'augmentation de la concentration d'adiponectine dans le plasma des rats Cd1 et Cd2 pourraient expliquer ce regain de sensibilité dans les tissus périphériques. Parallèlement, pour le groupe Cd2, nous avons observé une diminution des taux de peptide C dans le plasma de 30%, après que les rats aient ingéré du glucose. Ceci suggère une modification de la fonction pancréatique soit par adaptation soit par effet direct du Cd.

Pour étudier l'évolution à moyen terme de ces effets, nous avons fait vieillir des ratons jusqu'à 2 mois. 60 jours après la naissance, la tolérance au glucose n'est pas visiblement altérée. Cependant, dans le groupe Cd2, la concentration de peptide C plasmatique à jeun est augmentée de 70%, indiquant que pour maintenir la glycémie, l'organisme a besoin de plus quantité d'insuline. Ceci suggère que l'adaptation transitoire à la perte de sensibilité, par la sécrétion d'adiponectine, observée à 26 jours, n'est plus suffisante et que le pancréas prend le relais en sécrétant davantage d'insuline.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent qu'une exposition chronique de rates, à faibles doses de Cd, avant et pendant la gestation et la lactation entraînent des altérations précoces du métabolisme de la descendance. Les ratons présentent une perte de sensibilité à l'insuline qui, à ce jeune âge, est compensée par des mécanismes d'adaptation. Cependant, ces effets pourraient s'exacerber avec le temps et entraîner l'apparition de diabète de type II.

Par ailleurs, nous avons mis en place, dans ces travaux, une démarche méthodologique et statistique particulière et adaptée à notre modèle. Après observation de la variabilité d'imprégnation engendrée par l'administration orale de Cd chez les mères, nous avons réévaluer les expositions à partir des quantités de Cd retrouvées dans le rein, le principale organe accumulateur. Cela nous a permis de redéfinir des groupes homogènes en termes d'exposition. Afin de prendre en compte la dépendance qui existe entre les ratons provenant de la même portée, nous avons développé un modèle statistique capable d'intégrer l'effet variable venant de la mère (modèle à effets mixtes). Le poids des ratons a été ajouté comme effet fixe dans le modèle afin de prendre en compte les différences pouvant provenir de la prise alimentaire (notamment de lait contaminé). Comme nous avons observé des effets différentiels du Cd selon les sexes dans la première étude, nous avons, dans un premier temps, ajouté dans notre modèle un terme permettant l'étude de l'interaction Cd/sexe. Cette première analyse statistique ne montrant pas d'effets différents selon les sexe qui serait dus au Cd, nous avons mis en place un deuxième modèle permettant de prendre en compte les différences physiologiques « naturelles » entre mâles et femelles pour observer l'impact global de l'exposition au Cd. Cette démarche poussée nous a permis d'analyser nos données avec précision et en prenant en compte les spécificités de notre modèle. Ces travaux proposent donc une approche méthodologique et statistiques extrapolable à des études sur d'autres polluants.

Impact of maternal low-level cadmium exposure before and during gestation, and during lactation on metabolism of offspring at different ages.

Jacquet Adeline^{1,2}, Barbeau Damien^{3,4}, Hijazi Samer^{1,2}, Arnaud Josiane^{1,2,3}, Hazane-Puch Florence³, Lamarche Frédéric^{1,2}, Quiclet Charline^{1,2}, Couturier Karine^{1,2} Fontaine Eric^{1,2,3}, Moulis Jean-Marc^{1,2,5}, Demeilliers Christine^{1,2}.

¹Univ. Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, Environmental and Systems Biology, Grenoble, France, ²Inserm, U1055 Grenoble, France, ³Grenoble University Hospital, Grenoble, France, ⁴EPSP-TIMC UMR CNRS 5525, Grenoble, France, ⁵CEA-DRF-BIG, Grenoble, France

Corresponding author: C. Demeilliers, LBFA-U1055, Université Grenoble Alpes, CS 40700, 38058 Grenoble cedex 9, France. Telephone: +33 476 63 54 80. Email: christine.demeilliers@univ-grenoble-alpes.fr.

Acknowledgements:

The authors thank Hervé Dubouchaud, Cindy Tellier and Pauline Durrenbach for their technical support and helpful suggestions.

This work is supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche ANR-13-CESA-008-Cadmidia.

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

Background: Cadmium (Cd) is a widespread toxic metal which is suspected, among others environmental factors, to be involved in the current epidemic of type 2 diabetes (T2D). However, studies focusing on low level relevant exposure are scarce. Furthermore, although evidence suggest the transfer of Cd from mother to child, very few data are available on the effect of maternal Cd low level exposure on glucose metabolism of the offspring.

Objectives: The aim of this study was to assess the impact of Cd maternal exposure before and during gestation and lactation on the metabolism of the offspring at several ages after weaning. Specific attention was paid to the relevance of the Cd exposure model characterized by low levels of Cd in drinking water.

Methods: Female Wistar rats were exposed to 0, 50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ of CdCl_2 in drinking water, 3 weeks before mating and during the gestation and lactation until pups were weaned. Parameters related to glucose and lipid metabolism were assessed on pups on post-natal day (PND) 21, 26 and 60.

Results: Maternal Cd exposure led to significantly increased amounts of Cd found in liver, kidney and pancreas of pups on PND21, without inducing any visible kidney damage. On PND21, no alteration of insulin secretion was observed whereas glucose tolerance was decreased in both exposed groups. Together with increased plasma NEFA, this suggests a loss of peripheral insulin sensitivity. On PND26, glucose tolerance was recovered meaning that the loss of insulin sensitivity was compensated. Increased adiponectin secretion observed in both exposed groups could contribute to the sensitizing of peripheral tissues. Additionally, decreased C peptide was observed, in the highest exposure group, suggesting altered pancreatic function. On PND60, pups of the highest exposure group exhibited increased fasting C peptide level but normal glucose tolerance indicating the establishment of insulin resistance.

Conclusions: These findings show that perinatal pollutant exposure can lead to alteration of metabolism until 60 days after birth. In the present study, maternal Cd exposure led to the onset of insulin resistance in the offspring with early metabolic changes at weaning which may exacerbate over time and lead to T2D.

Introduction

Cadmium (Cd) is a well-known toxic metal whose contamination is unavoidable, nowadays, due to its widespread use in industrial and agriculture activities (metallurgic industry, batteries, paints, plastics and phosphate fertilizers). Significant Cd contamination of plants, vegetables and cereals have been observed leading to its presence in the entire food chain (Franz et al. 2008; Smolders 2001). As a consequence, about 90% of Cd exposure in non-smoking general population is accountable for daily ingestion of contaminated foodstuffs (EFSA 2009).

Cd is known to induce severe nephrotoxicity upon long chronic exposure and play an important role in the development of pathologies such as osteoporosis, cancer and cardiovascular diseases (Bernhoft 2013; Järup and Akesson 2009; Satarug et al. 2010). Cd has a very long biological half-life (from 10 to 30 years) and is efficiently retained in several organs after dietary exposure, and especially kidney and liver (EFSA 2009; Satarug et al. 2010). Moreover, it was also shown that Cd accumulates in placenta of pregnant women (Sakamoto et al. 2013). The ability of placenta to prevent Cd transfer to the fetus is debated, however, in numerous studies, significant amount of Cd have been detected in umbilical cord blood (Arbuckle et al. 2016; Guo et al. 2017; Menai et al. 2012; Olszowski et al. 2016; Röllin et al. 2015; Salpietro et al. 2002). In addition, Cd was found in maternal milk in several studies reviewed in (Rebello and Caldas 2016). Furthermore, in experimental studies, Cd exposure of female rats during gestation was associated with accumulation of Cd in placenta (Benitez et al. 2009; Wang et al. 2016a). Increased Cd concentration was found in organs of pups whose mothers were exposed to Cd during gestation only (Jacquillet et al. 2007; Wang et al. 2016a) or gestation and lactation (Bekheet 2011; Chemek et al. 2016). Female rats exposed during lactation showed Cd accumulation in mammary glands and milk (Pettersson Grawé and Oskarsson 2000).

Cd exposure of pregnant subjects is of great concern because during this period intestinal absorption is thought to be increased in women (Nishijo et al., 2004), but also in rodents (Bhattacharyya et al. 1981; Leazer 2002), leading to a higher amount of Cd entering their body and possibly contaminating the fetus (Nishijo et al. 2004).

Growing concerns are rising about the impact of Cd exposure on the development of metabolic diseases. Several epidemiological studies, reviewed recently, explored the possible association between Cd concentration in urine and plasma and incidence and severity of diabetes without leading to any clear-cut conclusion (Tinkov et al. 2017). In experimental studies on animals exposed to Cd levels ranging from 0.1 to 2 mg.kg⁻¹.d⁻¹, diabetogenic effects such as overall impaired glucose tolerance, altered insulin secretion, decreased insulin sensitivity, in particular in adipocytes, and increased gluconeogenesis have been described. The diversity of observed effects together with the unrealistic characteristics of most exposure models in terms of Cd levels and route of administration, do not enable to define any clear mechanism and hierarchy in these effects, especially at low level. A previous study from our team, carried out on adult male and female rats exposed in an environmentally relevant model for 3 months, showed a sex-related impact of Cd exposure leading to higher circulating insulin levels and decreased insulin sensitivity in females only (submitted).

In the light of these findings, one can reasonably wonder whether the impact of Cd exposure on adult rats could be emphasized in a more vulnerable population, on younger subjects exposed from their earliest childhood, for example. Indeed, Merali and Singhal showed that rat neonates orally exposed to 0.1 and 1 mg.kg⁻¹ for 45 days displayed decreased glucose stimulated insulin secretion, lower glycogen levels in liver and increased gluconeogenic potential. Moreover, very few data are available on the impact of maternal Cd exposure on glucose metabolism of the offspring. In a study where female mice were orally exposed to low level of Cd (corresponding to the tolerable weekly intake) during gestation and lactation, adult male offspring displayed increased mass of adipose tissue, dyslipidemia, increased expression of gene related to lipid metabolism and altered microbiota composition (Ba et al. 2017). In another study, the combined maternal Cd and mercury exposure (subcutaneous injections of 0.125, 0.5 or 2 mg.kg⁻¹ for each metal) during periconception period, induced impaired glucose tolerance and increased body weight and mass of abdominal adipose tissue in male mice. Insulin resistance was observed for mice whose mothers were co-exposed to 2 mg.kg⁻¹ as well as changes in the expression of genes associated with glucose and lipid metabolism (Camsari et al. 2017).

Nevertheless, this issue is important to tackle for several reasons, the first being that among the dramatically increased number of T2D, a considerable and growing proportion is young

subjects. Besides, perinatal phase and weaning are critical life stages when great metabolic changes occur and impact of environmental factor such as exposure to pollutants, during this period could be significant (Le Magueresse-Battistoni et al. 2016). This is the hypothesis of the DOHaD concept (Developmental Origins of Health and Diseases) which states that the environmental factors surrounding young subjects during gestational and perinatal period or early childhood, impact future health and the development of several diseases (Barker 1998; Charles et al. 2016; Seki et al. 2012).

Therefore, the aim of the present study was to investigate whether maternal Cd exposure before and during gestation and lactation could disrupt glucose and lipid metabolism in the offspring at different ages. The study was, first, carried out on pups at weaning (21 days after birth) and evolution of the effect was, additionally, assessed 26 and 60 days after birth. Emphasis was put on environmentally relevant Cd exposure model, with low levels of Cd and oral route of administration *via* drinking water.

The exposure model of the mothers used in this study has been described in our previous work and validated as a chronic environmentally relevant exposure (Jacquet et al., submitted article). Rats were exposed to 50 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ of Cd in drinking water.

2. Material and methods

2.1 Animal and experimental design

The study was performed in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE and the recommendations of the French Ministry of Agriculture (2013-118) on the care and use of laboratory animals. Protocols were carried out in the Animal facility of the Department of Biology of the University (D3842110001). Procedures were approved (224_LBFA-U1055) by the ethics committee affiliated to the animal facility and agreed by the French Ministry of Research.

Given the large number of parameters assayed in this study, animal experiment was carried out in two separate parts which were done in the exact same conditions, only using different animals.

Dams' Cd exposure. Wistar female rats, weighing 225 ± 2.6 g, and male rats were purchased from Charles River Laboratories France (Saint Germain-Nuelles, France) and were maintained in individual cages under controlled condition of temperature (22°C) and 12h-light/dark cycle with free access to water and diet. At the beginning of the experiment, the female rats were randomly separated into 3 groups receiving demineralized drinking water containing Cd dichloride (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) or not, so as rats drank a daily amount of 0, 50 or $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in each group respectively. Cd concentration was adjusted each week to the water consumption of each rat. Diet Cd concentration was estimated by the manufacturer to be around 54 ng/g of diet (A03 SAFE Diets, Augy, France). Body weight, food intake and water consumption were weekly measured. After 3 weeks of Cd exposure, female rats were mated with males for one week. During this period, the female rats drank only demineralized water in order to avoid contamination of male rats. Some females were not pregnant (2 were drinking only pure water, 3 were drinking $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Cd and 3 were drinking $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Cd) and were excluded from the experiment. Daily Cd exposure continued during gestation, lactation, until euthanasia, 2 weeks after weaning.

At the end of Cd exposure, we observed, among the two experiments, a significant variability in Cd concentration in organs of the females within each group, attesting that the same dose of ingested Cd led to different levels of actual exposure inside the organism (supplemental data). Consequently, and to better characterize the effect of such exposures, the groups were redefined considering dam's Cd kidney concentration. Indeed, the kidney is the main Cd accumulator in the body and the half-life of Cd, in this organ, is especially elevated making it a good indicator of actual exposure (Kjellström 1979). Groups were constituted as follow: Control ($n=14$), Cd1 ($n=14$), Cd2 ($n=7$) for females whose Cd kidney concentration ranged from $[0 - 60 \text{ ng Cd}\cdot\text{g}^{-1} \text{ wet tissue}]$, $[60 - 300 \text{ ng Cd}\cdot\text{g}^{-1} \text{ wet tissue}]$, $[300 - 1500 \text{ ng Cd}\cdot\text{g}^{-1} \text{ wet tissue}]$, respectively. Five females had Cd kidney concentration higher than $1500 \text{ ng Cd}\cdot\text{g}^{-1}$. These females were used in the first part of this study and unfortunately there were no female as highly exposed, to complete this group, in the second part that we carried out. In order to create homogenous exposure groups these females were not included in the study. Thus, this study will only display the results of Cd exposure resulting in Cd kidney concentrations ranging for 0 to $1500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

A blood sampling from tail vein was done on the second week of gestation to assess Cd concentration in plasma. A sample of maternal milk (about 150 μ L) was collected on the second week of lactation. Briefly, dams were put on one side of a cage with a separation wire mesh in the middle. Pups were positioned on the other side of wire mesh and remained so for 5 hours so that milk could be produced by dams without being drunk by pups. The dams were, then, anesthetized with isoflurane for 20 to 30 minutes during which mammary glands were manually stimulated and milk collected directly from dam's teat, with a capillary. Milk samples were then stored at -20°C until Cd determination. Two weeks after weaning, female rats were killed after a 16-hour-fast by decapitation. Blood was collected in heparinized trace elements collecting tubes (Becton Dickinson, Pont de Claix, France). Complete, EDTA-Free, Protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Basel, Switzerland) was added to prevent sample deterioration. Tubes were centrifuged at 3000g for 10 minutes. Plasma was aliquoted and stored at -80°C before use. Organs were collected, weighted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

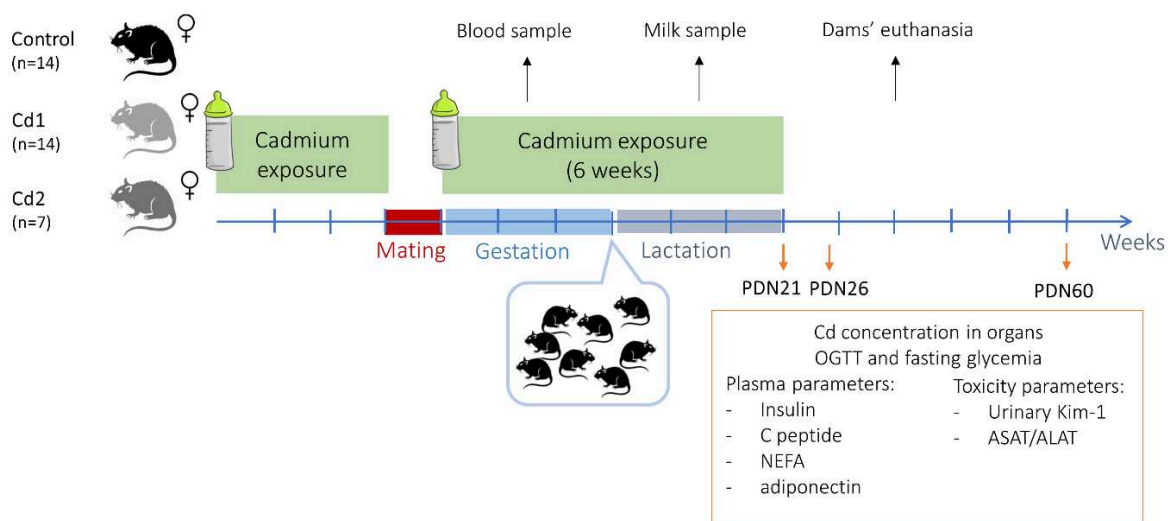


Figure 1: Schematic representation of experiment design.

Pups studies. Shortly after birth, litter size was adjusted to 8 pups per dams. In doing so, the number of female and male pups were balanced in each litter, as far as possible. The additional pups were euthanized at PND1 and liver and kidney were removed to determine Cd concentration. Body weights of pups were weekly measured from birth until PND26 and on PND60.

Study on PND21. On PND 20, pups were separated from dams and put in another cage. They were fasted for 16h overnight. On PND 21, pups underwent either (1) an oral glucose tolerance test, or (2) fasted euthanasia by decapitation, or (3) an oral administration of $2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ glucose and euthanasia by decapitation, 30 minutes after. These two latter procedures will be mentioned as “fasted state” and “glucose stimulated state”, respectively. Plasma and organs were collected as for dams.

Study on PND26. On PND 20, pups were weaned, separated from dams and put in another cage. They were provided free access to diet and non-contaminated water for 5 days. On PND25, pups were fasted for 16h, overnight. On PND26, pups underwent either (1) an oral glucose tolerance test, or (2) fasted euthanasia by decapitation, or (3) an oral administration of $2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ glucose and euthanasia by decapitation 30 minutes after. These two latter procedures will be mentioned as “fasted state” and “glucose stimulated state”, respectively. Plasma and organs were collected as for dams.

Study on PND60. These pups were weaned and maintained in the same conditions than weanling pups mentioned above. On PND30, they spend 16 hours in metabolic cages in order to collect urine. They were provided with free access to diet and non-contaminated water until they reached 2 months old. On PND60, pups underwent oral glucose tolerance test. A week later, they were fasted for 16h and euthanatized by decapitation the day after. Plasma and organs were collected as for dams.

2.2. Trace elements assay in tissues, plasma:

Cadmium was determined using a quadrupole ICP-MS Thermo X serie II (Thermo Electron, Bremen, Germany) equipped with quartz impact bead spray chamber and concentric nebulizer. The Xt interface option was used. Tissues samples were mineralized in concentrated nitric acid and then diluted 50 or 100 times in water prior to analysis. Plasmas and milk were diluted in nitric acid 1% (v/v). ^{111}Cd was measured and ^{103}Rh was used as internal standard. An external standard calibration curve was generated using four calibration standards (0-1.78-8.9-17.8 nmol/l). Method accuracy was assessed by analyzing standard reference material or internal quality controls at least at the beginning and end of the analytical run. NIST standard reference material 1577 (bovine liver) was introduced for tissues analysis, NIST standard reference

material 1549 for milk analysis and ClinCheck serum controls for Trace elements (Recipe, Munich, Germany) were used for plasma analysis. The limits of detection and quantification were respectively 8.75 and 29.2 pmol.L⁻¹.

2.3. Biochemical analysis

Urinary rat kim-1 levels were assayed, using ELISA kits purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions.

Rat plasma Non-Esterified Fatty Acids (NEFA) assays were performed by spectrophotometry on the Konelab XT20 instrument (ThermoScientific, Vantaa, Finland). Internal quality controls were Seronorm (Sera, Billingstad, Norway) and Trulab (Diasys, Holzheim, Germany) for NEFA,

Plasmatic Alanine-aminotransferase (ALAT) and aspartame-aminotransferase (ASAT) were evaluated on Vista 1500 (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) using AST and ALTI kit (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) and Multiquel (Biorad, Segrate, Italy) as internal quality control.

Plasma insulin levels at fasted and glucose-stimulated states, were assayed using Ultra Sensitive Rat Insulin Elisa kit from Mercodia AB (Uppsala, Sweden). To improve sensitivity, 50µL of samples and standards were used. Plasma fasting and glucose-stimulated C-peptide levels were determined with Rat C-peptide Elisa kit purchased from Mercodia AB (Uppsala, Sweden). Plasma adiponectin concentration were assayed in samples from glucose-stimulated pups, using Rat Total Adiponectin Quantikine Elisa Kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Unless stated otherwise, assays were carried out according to manufacturer's instructions.

2.4. Oral glucose tolerance test (OGTT):

OGTT was performed on pups, on PND21, PND26 and PND60 after a 16h fast. 2g.kg⁻¹ of body weight of glucose was orally administered to each animal and blood samples were collected from the tail vein before and 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 minutes after glucose administration. Glucose concentration in blood was measured with Accu-Chek glucometer

(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Area under curve was obtained from the integrated curve of glucose evolution against time (trapezoidal rule was used to calculate the area).

2.5. Glycogen assay in muscle

100 mg of gastrocnemius muscle was digested in KOH (40%) for 30 minutes at 100 °C in a water bath. Glycogen was precipitated with ethanol (95%) at -20 °C overnight. On the next day, the tubes were centrifuged at 10000 rcf for 15 minutes at 0 °C. Glycogen precipitate was hydrolyzed into glucose using HCl (2N) for 3 hours in a 100 °C water bath. After pH adjustment, 4 µL of an enzyme mix of Hexokinase (HK) and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PDH) was added to a cuvette containing 530 µL ultrapure water, 530 µL of triethanolamine buffer and 40 µL of the prepared sample. This reaction yields NADPH which was assayed by spectrophotometry (Specrod 210, Analytikjena) at 340nm (Slein 1965).

2.6. Statistics

All statistics were performed with R 3.3.3 software. Normality of the distribution of variables was ensured using Box-cox transformation with “boxcox” function from “car” package. Anova tests were performed to analyze parameters value differences from dams between Cd exposure groups (*ie* maternal Cd kidney concentration groups) using “lm” function from “stats” package. Due to the dependence of pups born from the same dam, linear mixed effects models were performed to analyze parameters value differences from pups between Cd exposure groups using “lme” function from “nlme” package (Pinheiro and Bates 2000). Thus, dams were included as random effect while cd group and body weight, to take into account individual milk and food consumption of the pups, were included as fixed effects. As sex-specific effects of Cd have already been described on adult rats, upon similar exposure (Jacquet et al., submitted article), pups’ sex was included as a fixed effect.

Firstly, a model including an interaction term between Cd and sex was built in order to determine potential differential effect of maternal Cd exposure on female and male pups, as follow: $Y_{ij} = Cd_i + (Cd_i \times sex_j) + weight_j + b_i + \epsilon_{ij}$

Where Y_{ij} were boxcox transformed values of parameters for the j^{th} pup from i^{th} dam, Cd_i was the maternal Cd kidney concentration group, sex_j was the gender of pups, $weight_j$ was the body weight of pups, b_i was the random effect for the i^{th} dam and ε_{ij} was the error term. It was assumed that b_i and ε_{ij} were independent, $b_i \sim N(0; \sigma^2_b)$ and $\varepsilon_{ij} \sim N(0; \sigma^2_w)$. This analysis concluded that in our experiment, no Cd-induced sex-specific effect was observed in pups on PND21, 26 and 60.

Then, a model without interaction term was built in order to take into account potential biological differences between males and females whatever the Cd group, as follow:

$$Y_{ij} = Cd_i + sex_j + weight_j + b_i + \varepsilon_{ij}$$

Finally, because pancreatic Cd concentration and urinary kim-1 concentration were assayed on only one pup per litter, linear regression model was performed using “lm” function from “stats” package to analyze impact of maternal Cd kidney concentration group, sex and body weight on these parameters values.

Results are expressed as mean \pm SEM. Values of $p < 0.05$ were considered significant in all analysis.

3. Results:

3.1 Characterization of dams Cd exposure model:

In the exposure model implemented in the present work, Cd levels and route of administration were chosen in order to resemble environmental chronic low-level Cd exposure. This model has already been characterized and validated in a previous work (publication under review). The Cd level of 500 μg of $\text{Cd} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ administered to the rats theoretically corresponds to 10 times the $\text{BMDL}_{\text{sd}1}$ (benchmark dose lower bound, defined as the lower confidence limit on the dose that produces a magnitude of change of one standard deviation (ATSDR 2012)), and it is within the range of the rat NOAEL (0.2 - 13 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for systemic effects of oral Cd exposure of intermediate length for rats (ATSDR 2012)). 50 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was implemented to equal the $\text{BMDL}_{\text{sd}1}$ and was below the lowest rat NOAEL (4 times lower).

According to the experiments, it may be noticed a high variability in Cd concentration in dam's organs resulting for the same Cd exposure (supplemental data). As for example, it ranged from 506 to 3583 ng.g⁻¹ in females exposed to 500 µg of Cd.kg⁻¹.d⁻¹ and from 117 to 426 ng.g⁻¹ in females exposed to 50 µg of Cd.kg⁻¹.d⁻¹. Difference in water or food intake can not be accountable for such a variability since no significant differences in the consumption of chow or water was observed (data not shown).

With regards to this aspect, the groups were redefined according to dams Cd kidney concentration as follow: Control, Cd1, Cd2 for females whose Cd kidney concentration ranged from [0 - 60 ng Cd.g⁻¹ wet tissue), [60 -300 ng Cd.g⁻¹ wet tissue), [300 – 1500 ng Cd.g⁻¹ wet tissue), respectively.

Analysis of Cd in liver, kidney, plasma and milk.

In the Cd1 group, Cd concentration was significantly increased by 5.6 and 6.3 times in liver and kidney, respectively, compared to control dams (figure 2A, B). Plasma Cd concentration, during the second week of gestation, was 1.5 times higher than in controls (figure 2C). No significant difference was observed in milk Cd concentration compared to controls (figure 2D).

In Cd2 dams, Cd concentration was significantly increased by 32 and 26 times in liver and kidney, respectively, compared to control dams (figure 2A,B). Plasma Cd concentration, during the second week of gestation, was 3 times higher than in controls and Cd concentration in milk was significantly increased by 2.5 times (figure 2C,D).

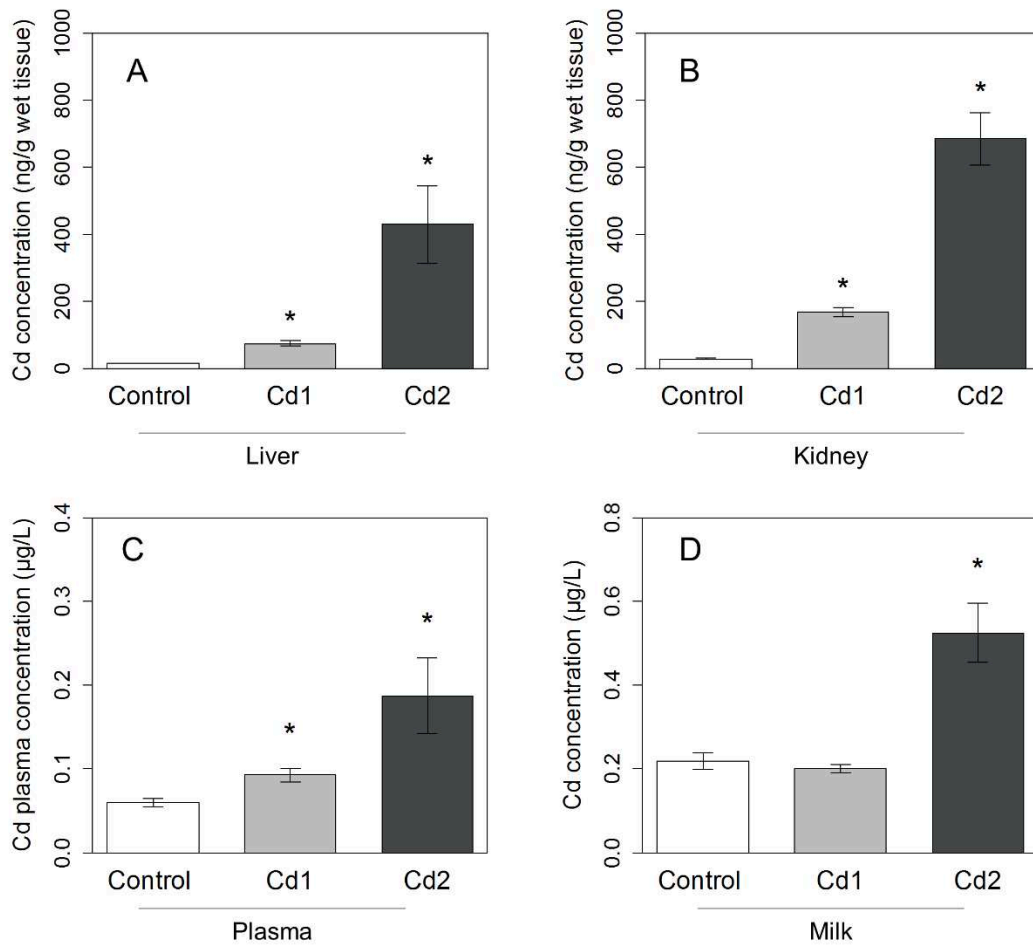


Figure 2: Cd Concentration in dams. Cd concentration in liver (A) and kidney (B). Cd concentration in dams' plasma collected during the second week of gestation (C). Cd concentration in dams' milk collected two weeks after pups' birth (D). Data are expressed as mean \pm SEM (n=7-14 for kidney and liver, n=6-10 for plasma and milk). * Data are significantly different compared to control group (p<0.05)

Effect of Cd exposure on kidney damage

Urinary Kim-1 level was assayed in order to check whether Cd exposure, in our model would induced kidney damages in dams. Kim-1 concentration was unchanged in both exposed groups compared to controls (table1).

Table 1: Effect of maternal Cd exposure on target organs' toxicity on dams and pups

	Control	Cd1	Cd2
Dams			
Urinary Kim-1 (pg/h)	174.7 ± 19.4	161.8 ± 15.0	185.6 ± 17.1
Pups			
Plasma ASAT (UI)	247.2 ± 16.0	272.9 ± 16.3	251.9 ± 18.0
Plasma ALAT (UI)	21.5 ± 1.7	24.2 ± 2.3	23.8 ± 2.3
Urinary Kim-1 (pg/h)	280 ± 38.9	217.6 ± 19.8	194.7 ± 53.1

Kim-1: kidney injury molecule 1, ASAT: aspartate aminotransferase, ALAT: alanine aminotransferase. Data are expressed as mean ± SEM. (n=9-13 for ASAT and ALAT, and 4-10 for Kim-1, per group).

3.2 Results on pups at PND21

3.2.1 Characterization of pups:

Impact of maternal Cd exposure on litter size, sex ratio and birth body mass

There were not statistical differences in the number of pups per litter and sex ratio between Cd exposed groups and control (data not shown). Pups' birth body mass was not altered by Cd maternal exposure (supplemental data). Cd was detected in liver of one-day-old pups from Cd-exposed dams attesting to the transfer of Cd from dams to the fetus during gestation (supplemental data).

Body and organs masses

Pups' body mass was not statistically different between groups at PND21 (45.3 ± 0.4, 47.8 ± 0.7, 45.2 ± 0.9 g for Control, Cd1 and Cd2, respectively). Liver and pancreas mass were also unchanged (data not shown).

Analysis of Cd in kidney, liver and pancreas.

In Cd1 pups, Cd concentration was significantly increased by 5.9, 2.8 and 6.5 times in kidney, liver and pancreas, respectively, compared to control pups. In Cd2 pups, Cd concentration was

significantly increased by 21.9, 9.8 and 9 times in kidney, liver and pancreas, respectively, compared to control pups.

Table 3: Cd concentration in pups' organs and Cd content in liver on PND21, 26 and 60

	Control	Cd1	Cd2
<i>PND21</i>			
Cd concentration in liver (ng.g ⁻¹)	0.97 ± 0.05	2.71 ± 0.29*	9.5 ± 1.9*
Cd concentration in kidney (ng.g ⁻¹)	1.14 ± 0.08	6.69 ± 0.91*	24.96 ± 4.99*
Cd concentration in pancreas (ng.g ⁻¹)	0.18 ± 0.02	1.18 ± 0.82*	1.63 ± 0.68*
<i>PND26</i>			
Cd concentration in liver (ng.g ⁻¹)	2.54 ± 0.25	3.64 ± 0.39	8.96 ± 2.51*
Cd concentration in kidney (ng.g ⁻¹)	2.8 ± 0.45	6.91 ± 1.00	10.11 ± 0.73
Cd concentration in pancreas (ng.g ⁻¹)	1.01 ± 0.47	0.88 ± 1.06	3.47 ± 1.09
<i>PND60</i>			
Cd concentration in liver (ng.g ⁻¹)	3.57 ± 0.34	4.12 ± 0.27	6.69 ± 1.17*
Cd concentration in kidney (ng.g ⁻¹)	3.18 ± 0.19	4.12 ± 0.27*	11.82 ± 2.31*

Data are expressed as mean ± SEM. * Data are significantly different compared to control group (p<0.05)

Impact of maternal Cd exposure on liver toxicity.

To assess potential liver toxicity, ASAT and ALAT were assayed in pups' plasma et PND21. No differences were observed between groups (table 1).

3.2.2 Effect of Cd exposure on glucose and lipid metabolism at PND21

Glucose tolerance and fasting glycemia

Glucose tolerance of 21-day-old pups was tested with an OGTT. For control pups, blood glucose level increased by 85% from basal fasting glycemia, in the first 30 minutes after glucose administration (figure 3A). Both Cd1 and Cd2 pups displayed altered glucose tolerance as exhibited by the higher OGTT curve 30 minutes after glucose administration. Indeed, glucose levels increased by 89 and 132 % compared to fasting glucose in Cd1 and Cd2 pups, resulting in a significantly higher AUC by 6.4 and 12.4 % , respectively, compared to controls ($p < 0.05$) (figure 3B). No difference in fasting blood glucose was observed between groups (figure 3C).

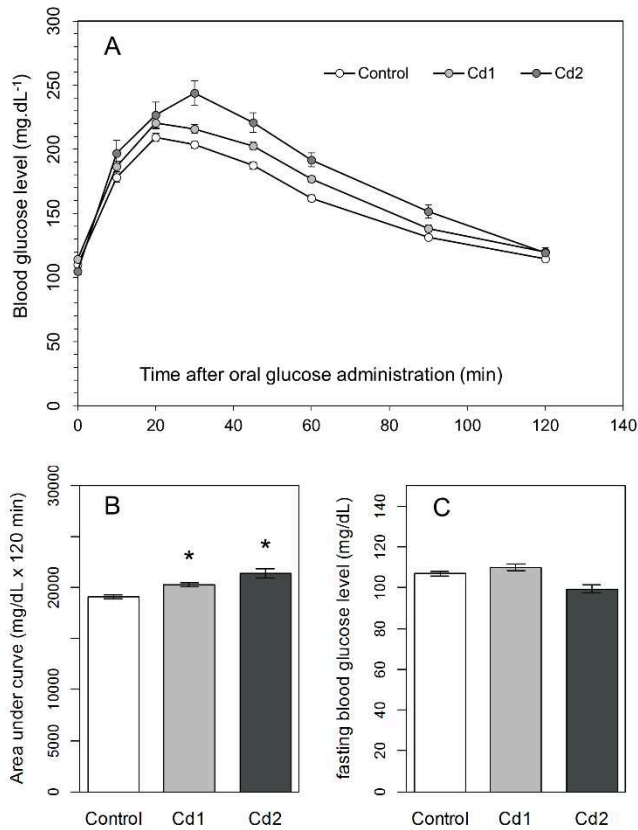


Figure 3: Effect of maternal Cd exposure on pups' glucose tolerance on PND21. Following a 16h fast, 2g/kg glucose was orally administered. Changes of blood glucose levels over time (A), AUC (B) and fasting blood glucose (C). Data are expressed as mean \pm SEM ($n=45$, 35 and 8 for control, Cd1 and Cd2 groups, respectively). * Data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$)

Parameters related to insulin secretion

Maternal Cd exposure did not alter plasma fasting insulin and C peptide levels of both exposed pups at PND21. Moreover, glucose-stimulated insulin and C peptide levels in plasma were unchanged (table 2).

Table 2: Effect of maternal Cd exposure on plasma insulin and C peptide levels of pups on PND21.

PND21	Control	Cd1	Cd2
Fasting parameters			
Insulin (ng/mL)	0.057 ± 0.007	0.057 ± 0.01	0.053 ± 0.016
C peptide (ng/mL)	1.17 ± 0.08	1.55 ± 0.19	1.083 ± 0.08
Glucose-stimulated parameters			
Insulin (ng/mL)	0.32 ± 0.06	0.31 ± 0.05	0.23 ± 0.04
C peptide (ng/mL)	3.21 ± 0.25	3.31 ± 0.25	3.43 ± 0.26

Glucose-stimulated parameters were assessed on plasma samples collected 30 minutes after oral 2g/kg glucose administration. Data are expressed as mean ± SEM. (n= 8-17 for fasting insulin and C peptide; n=12-20 for glucose stimulated parameters).

Parameters related to insulin sensitivity.

Glycogen content in gastrocnemius muscle, after glucose stimulation, was not significantly altered (figure 4A). A significant increase of 20% in fasting plasma NEFA concentration was observed in Cd2 21-day-old pups (figure 4).

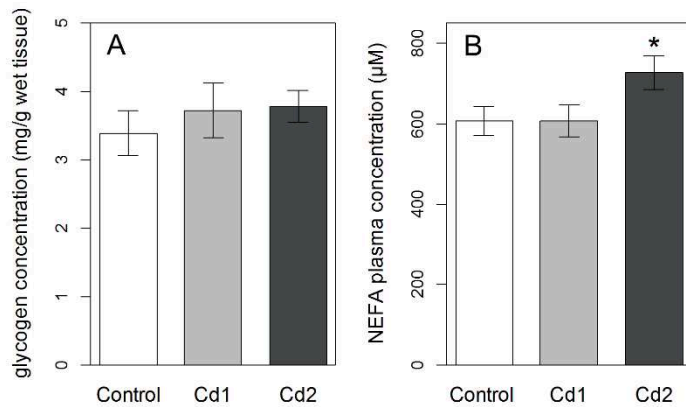


Figure 4: Effect of maternal Cd exposure on pups' glucose-stimulated glycogen concentration in muscle (A) and fasting plasma NEFA concentration on PND21. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5 per group for glycogen and 10-15 per group for NEFA). * Data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$)

3.3 Results on pups at PND26

3.3.1 Characterization of pups:

Body and organs masses

Pups' body mass was not statistically different between groups at PND26 (62.4 ± 0.9 , 63.3 ± 1.1 , 66.1 ± 1.6 g for Control, Cd1 and Cd2, respectively). Liver, pancreas and gastrocnemius muscle masses were also unchanged (data not shown).

Analysis of Cd in kidney, liver and pancreas.

In Cd1 pups, Cd concentrations in liver, kidney and pancreas were not significantly different from controls. In Cd2 pups, Cd concentration was significantly increased by 3.5 times in liver whereas it was not statistically different in kidney probably due to the lower number of samples assayed (n=3). Cd concentration in pancreas of Cd2 pups was not different from controls.

3.3.2 Effect of Cd exposure on glucose and lipid metabolism at PND26.

Glucose tolerance and fasting glycemia

Glucose tolerance of 26-day-old pups was tested with an OGTT. For control pups, blood glucose level increased by 2.4 from basal fasting glycemia, in the first 30 minutes after glucose administration (figure 5A). The response to this test was not statistically different in both Cd1 and Cd2 pups compared to controls, as shown by the similar curve and AUC (figure 5B). No difference in fasting blood glucose was observed between groups (figure 5C).

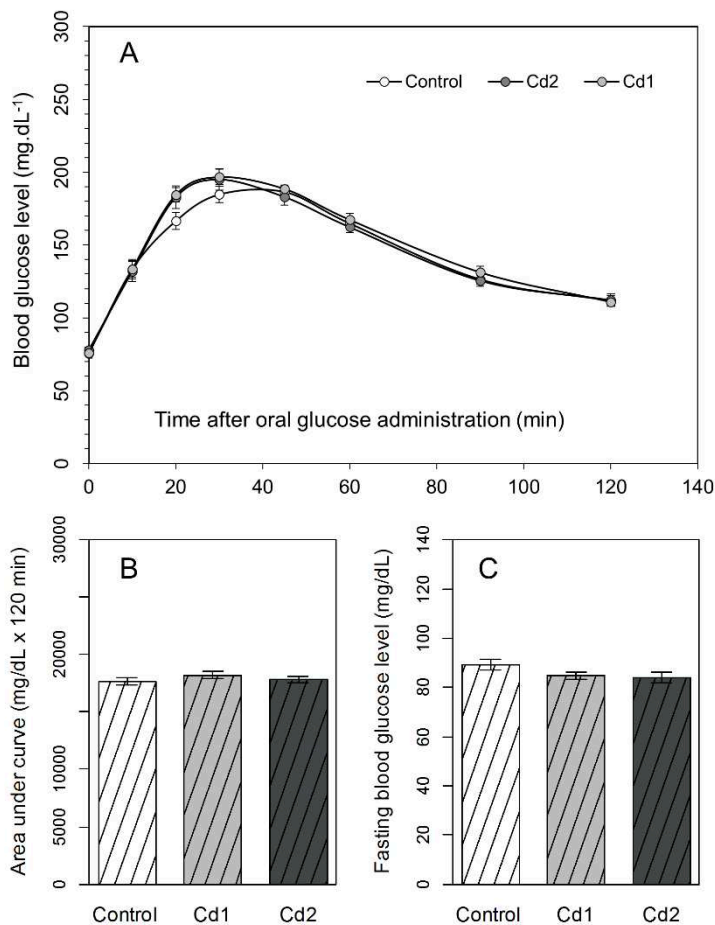


Figure 5: Effect of maternal Cd exposure on pups' glucose tolerance on PND26. Following a 16h fast, 2g/kg glucose was orally administered. Changes of blood glucose levels over time (A), AUC (B) and fasting blood glucose (C). Data are expressed as mean \pm SEM (n=10-18 per group).

Parameters related to insulin secretion

Fasting insulin and C peptide were not altered by maternal Cd exposure in 26-day-old pups (figure 6A,B). However, glucose-stimulated C peptide levels in plasma were significantly decreased by 30% in Cd2 pups, indicating lower glucose-stimulated insulin secretion on PND26 (figure 6C).

Parameters related to insulin sensitivity

Plasma NEFA concentration was not statistically different between groups (data not shown). Plasma adiponectin was significantly increased by 2.1 and 1.6 times in Cd1 and Cd2, respectively, at PND26 (figure 6D).

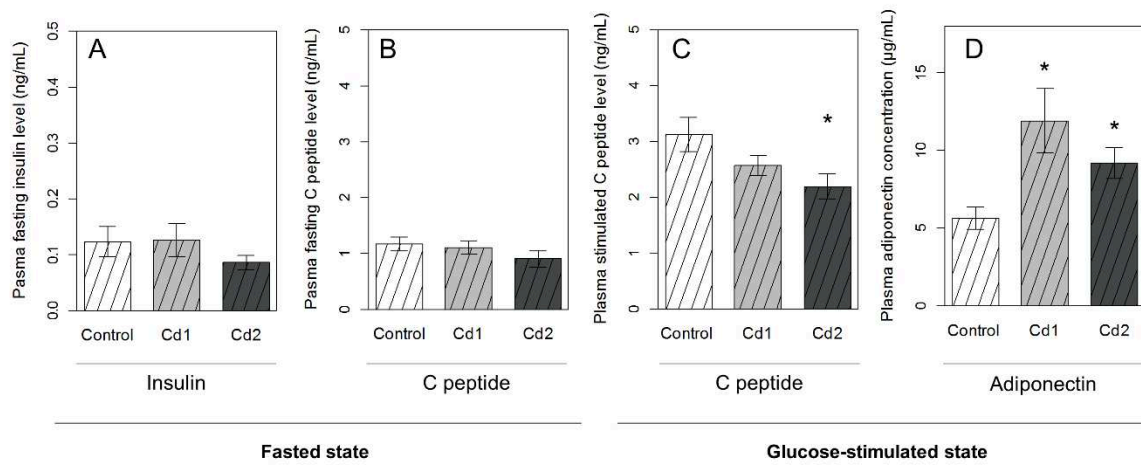


Figure 6: Effect of maternal Cd exposure on pups' plasma parameters on PND26. Plasma fasting insulin (A) and C peptide (B) levels. Glucose-stimulated plasma C peptide level (C) and adiponectin concentration (D) were assessed in plasma sample collected 30 minutes after oral glucose administration (2mg/kg) (n=4-17 for fasted parameters, n=12-17 for glucose stimulated C peptide level and n=8-9 for adiponectin, per group) Data are expressed as mean \pm SEM. * Data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$)

3.4 Results on pups at PND60

3.4.1 Characterization of pups:

Body and organs masses

Pups' body mass was not statistically different between groups at PND60 (196.7 ± 10.4 , 207.4 ± 10.6 , 219.3 ± 13.4 g for Control, Cd1 and Cd2, respectively). Liver, pancreas and gastrocnemius muscle masses were also unchanged (data not shown).

Analysis of Cd in kidney, liver and pancreas.

In Cd1 pups, Cd concentration was significantly increased by 1.3 times in kidney whereas it was not statistically different in liver compared to controls. In Cd2 pups, Cd concentration was significantly increased by 3.7 and 1.9 times in kidney and liver, respectively.

Impact of maternal Cd exposure on kidney toxicity.

To assess potential kidney damages, urinary Kim-1 was assayed in pups at PND30. No differences were observed between groups (Table2).

3.4.2 Effect of Cd exposure glucose and lipid metabolism at PND60

Glucose tolerance and fasting glycemia

Glucose tolerance of 2-month-old pups was tested with an OGTT. For control pups, blood glucose level increased by 2.2 from basal fasting glycemia, in the first 30 minutes after glucose administration (figure 7A). The response to this test was not statistically different in both Cd1 and Cd2 pups compared to controls, as shown by the similar curve and AUC (figure 7B). No difference in fasting blood glucose was observed between groups (figure 7C).

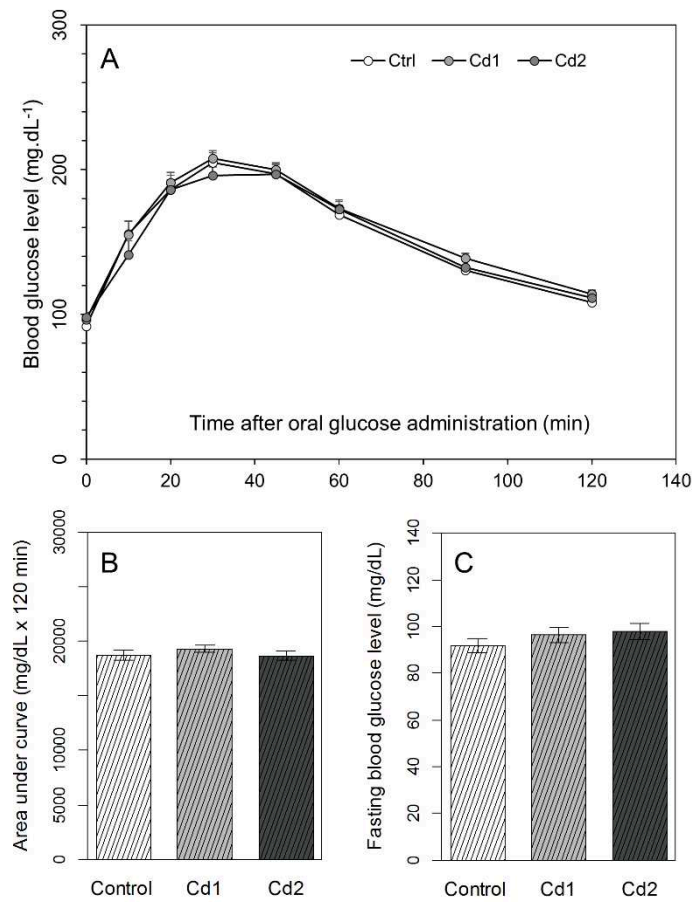


Figure 7: Effect of maternal Cd exposure on pups' glucose tolerance on PND60. Following a 16h fast, 2g/kg glucose was orally administered. Changes of blood glucose levels over time (A), AUC (B) and fasting glucose (C). Data are expressed as mean \pm SEM (n=11-17 per group).

Parameters related to insulin secretion

Fasting insulin was not altered by maternal Cd exposure in 2-month-old pups. However, fasting C peptide level was increased by 70% in Cd2 pups (p<0.05).

Parameters related to insulin sensitivity

A significant elevation of 25% of plasma NEFA concentration was observed in Cd2. No difference in plasma adiponectin was observed between groups.

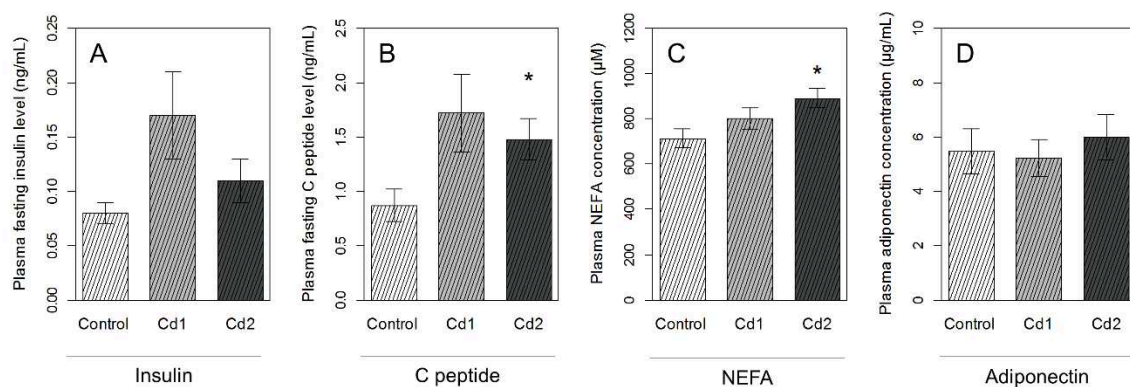


Figure 8: Effect of maternal Cd exposure on pups' fasting plasma parameters on PND60. Plasma fasting insulin (A), C peptide (B), NEFA (C) and adiponectin (D) concentrations. (n=11-18 per group) Data are expressed as mean \pm SEM. * Data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$)

4. Discussion:

The aim of the present work was to assess the impact of Cd maternal exposure before and during gestation and lactation on the glucose metabolism of the offspring, at several ages. Indeed, the effect of Cd exposure in the development of metabolic diseases has hardly been addressed in low-level, environmentally relevant models and the topic of offspring exposed through maternal exposure has been relatively overlooked.

In this study, we have shown that maternal Cd exposure induces Cd accumulation in dam's organs as well as in pups' liver and kidney on PND21, attesting to the transfer of Cd during gestation and lactation. Pups at PND21, 26 and 60 displayed several alterations of glucose and lipid metabolism suggesting the onset of insulin resistance counterbalanced, in a certain way, by adaptive mechanisms. Specific attention was given to the monitoring of animal exposure and the statistical analysis in order to consider pups' sex and belonging to a litter (see material and method 2.6). Cd levels administered to the rats have been chosen with reference to our previous work and benchmark values with retrospective reassessment of the actual values of absorbed Cd concentrations.

Indeed, in order to assess the relevance of our experimental model towards environmental exposure, we compared exposure markers such as Cd concentrations in plasma, milk and target organs to non-occupationally exposed human data. This approach seems more suitable than comparing exposure levels since they depend on duration, dose, routes of administration, absorption rate and speciation. In our study, mean dams' plasma Cd concentration sampled during the second week of gestation was $0.093 \pm 0.008 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Cd1 group and $0.19 \pm 0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Cd2 group. These values are similar to the lowest levels of Cd found in pregnant women. Indeed, reported human Cd concentration in maternal blood during gestation range from $0.15 \mu\text{g.L}^{-1}$ in South Africa (Rudge et al. 2009) to $1.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ in China (Wang et al. 2016b). Besides, a publication reviewing 29 studies on Cd contamination in maternal milk, published since 2000, showed that, in most of them, Cd concentration in milk was below $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Rebello and Caldas 2016). In Europe, the lowest contamination was found in Sweden with a Cd concentration in milk of $0.09 \mu\text{g.L}^{-1}$ and the highest in Turkey with $4.62 \mu\text{g.L}^{-1}$. In our study, Cd concentration in maternal milk, for Cd2 dams, reached $0.52 \pm 0.07 \mu\text{g.L}^{-1}$. Finally, Cd concentration in kidney, for both exposed groups, was of the same order of magnitude or below the amounts found in human kidneys. Indeed, Cd concentration was found to range from 0.62 to $61.3 \mu\text{g.g}^{-1}$ and 1.78 to $21.86 \mu\text{g.g}^{-1}$ in kidneys obtained from autopsied non-occupationally exposed Polish and French people, respectively (Goullé et al. 2010; Lech and Sadlik 2017). Thus, the administered levels of Cd in the present study led to Cd concentration in milk, plasma and kidney of the same order of magnitude than the ones found in environmentally Cd exposed humans.

Considering that the exposure model was implemented in order to correspond to low level chronic conditions, it was requested to check whether it resulted in any major toxicity in target organs in dams and pups. Urinary Kim-1, an early biomarker of kidney damage, was not altered by Cd exposure in our conditions, in dams and in pups. The absence of liver toxicity was indicated, by similar ASAT and ALAT levels in pups' plasma on PND21. Taken together, these data clearly define the exposure model implemented in this study as chronic and environmentally relevant.

Several animal studies report the ability of Cd to cross the placental barrier to contaminate the fetus (Jacquillet et al. 2007; Wang et al. 2016a). In the present work, even though maternal plasma Cd was only increased by 1.5 and 3 times in Cd1 and Cd2, significant amount of Cd could

be found in liver of 1-day-old pups (supplemental data), attesting to the transfer from dams to fetus during gestation. Cd concentration in liver at birth was significantly increased by 1.5 times in Cd2, compared to controls. Besides, Cd content in maternal milk was doubled in Cd2 groups, leading to Cd exposure of pups through breastfeeding. Although Cd concentration in milk was not different for Cd1 group, pups fed by these dams displayed significantly increased amounts of Cd in kidney and liver on PND21. This apparent contradiction could be explained by the single Cd assay in milk done for each dam during the second week of gestation. Indeed, it has been reported that Cd concentration in women milk is variable and decrease with time during postpartum period (Chao et al. 2014; Leotsinidis et al. 2005). Thus, the assay of Cd concentration in a single sample of milk does not seem sufficient to accurately characterize pups' exposure.

Maternal low Cd exposure led to a significant and dose-dependent increase of Cd concentration in kidney, liver and pancreas in 21-day-old pups. Besides, it is noteworthy that non-negligible concentration of Cd was found in organs of control pups, attesting to the unavoidable latent contamination, even in experimental conditions. This is in accordance with Cd concentration found in milk of control dams. Thus, rather than Cd-free animals, control group should be considered as low basal contamination to refer to.

In order to assess the evolution of Cd amount in the organs, the change of organs' mass, while growing up, has to be taken into account. In doing so, it appears that Cd content in liver is increased in all the groups between PND21 and PND60, although Cd exposure through dams had stopped (Supplemental data). This increased amount of Cd could be due to Cd ingestion through food, starting on PND21. Indeed, Cd contamination in food was assessed by the manufacturer to about 54 ng.g⁻¹ which correspond to roughly 11.7 times the concentration of Cd in milk of Cd2 dams. Consequently, dietary Cd exposure remained after weaning in all groups, including controls. Thus, the metabolic effects observed on PND60 can be attributed to early maternal-exposure-induced changes that developed when pups grew older, rather than actual Cd content in organs which results from contaminated food ingestion in all groups.

On PND21, maternal exposure resulted in an altered glucose tolerance in both Cd1 and Cd2 pups as exhibited by a different curve for OGTT and a higher AUC. To understand the origin of this effect, impact on insulin secretion was evaluated by assaying insulin and C peptide levels in fasted and glucose-stimulated states. C peptide and insulin are secreted in equimolar amount by the pancreas. While about 50% of circulating insulin is rapidly extracted by the liver, the C peptide is eventually cleared by the kidney, leading to a longer biological life time in blood (Katz and Rubenstein 1973). This property makes plasma C peptide level a more suitable marker of insulin secretion *per se*, compared to insulin levels which results from insulin secretion and tissues uptake, especially in the liver. On PND21, insulin and C peptide values were unchanged compared to control pups meaning that altered insulin secretion was not responsible for the lower glucose tolerance. Thus, a possible explanation for the results on OGTT, could be the decrease in peripheral insulin sensitivity in peripheral tissues.

Muscle glycogen content, after glucose stimulation, was assessed as the endpoint of glucose uptake in this organ. On PD21, glycogen muscle content was not statistically different between groups suggesting that insulin sensitivity in muscle was not altered.

An increase by 20% of NEFA concentration in plasma was observed in Cd2 pups, suggesting decreased insulin ability to inhibit adipose tissue lipolysis or altered lipid oxidation.

Weaning is a critical window in terms of metabolism with maturation of pancreas and important changes in insulin sensitivity (Aguayo-Mazzucato et al. 2006; Ferre et al. 1986). Alterations occurring during this period could have significant impact on future health. Thus, we explored the potential changes induced by maternal Cd exposure during this period by studying pups few days after weaning. Pups were weaned on PND20 and fed with laboratory chow until PND26. At this age, glucose tolerance was not visibly altered in any group suggesting that the effect observed on OGTT on PND21 had reversed. To understand how peripheral insulin sensitivity was restored, plasma adiponectin was assayed. Elevated level of circulating adiponectin in Cd1 and Cd2 pups were observed. This adipokine secreted mainly by the visceral adipose tissue, has an autocrine function on adipocytes differentiation and insulin sensitivity as well as endocrine action on muscle and liver insulin sensitivity. Adiponectin stimulates free fatty

acid oxidation in the muscle and liver, increases glucose uptake and reduces triglycerides in the muscle (Balsan et al. 2015; Dyck et al. 2006). Although the precise mechanisms are not completely elucidated, it is thought to be partly mediated by the AMPK axis (Dyck et al. 2006). In our study, the increased levels of adiponectin on PND26 could contribute to improve peripheral insulin sensitivity and restore NEFA concentration to controls' level.

Surprisingly, after oral glucose administration, Cd2 pups displayed decreased C peptide levels by about 30%, indicating a lower glucose-stimulated insulin secretion. This effect could result from an adaptation to the increased insulin sensitivity. Another possible explanation could be to direct impact of maternal Cd exposure on pancreatic function. Indeed, Cd-induced alteration of insulin secretion has been described in other studies on adult rats subjected to 70 intraperitoneal injections of $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Cd for 140 days (Ithakissios et al. 1975) and on neonate rats, orally exposed, from birth, to 0.1 and $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 45 days (Merali and Singhal 1980). A decreased amount of β cells, in the pancreas, leading to the production of lower amount of insulin is also worth considering. Indeed, this kind of alteration of pancreatic islets has been reported on adult rats receiving daily subcutaneous injections of $0.49 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ Cd for 30 days, resulting in islets degeneration and decreased insulin content (Demir et al. 2006). Another study on monkeys intravenously injected with 1 and $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 15 months showed atrophied pancreatic islets and reduced insulin content (Kurata et al. 2003). Since, maturation of the pancreas happens during weaning with a remarkable increase in β cells mass between PND20 and 28, this specific and transient period makes pancreas particularly vulnerable to environmental stimuli (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Thus, Cd exposure around this period could impact the development and function of pancreas.

In the light of these findings, study of pups was extended until they reached 60 days, in order to evaluate the evolution of the observed effects and the possible appearance of others. Indeed, as stated by the DOHAD concept, perinatal environment can have harmful consequences when offspring reach adulthood, that were not visible at younger age. In the present study, on PND60, glucose tolerance and fasting glycemia of pups was not visibly altered in any groups. However, a significant increase in fasting plasma C peptide was noticed in Cd2

pups, indicating that higher amount of insulin was required in order to maintain normal glycemia. This suggest the onset of insulin resistance in peripheral tissues and compensatory increased insulin secretion by the pancreas. Increased insulinemia coupled with insulin resistance have already been described on adult rats exposed through drinking water containing 32.5 ppm Cd (Treviño et al. 2015).

In addition, similarly to the result on PND21, plasma NEFA concentration were increased by 25% in Cd2 pups. This kind of effect together with dyslipidemia has already been described after oral Cd exposure to higher levels (0.4 to 5 mg.kg⁻¹.d⁻¹) in adults rats and mice (Prabu et al. 2010; Rogalska et al. 2009; Samarghandian et al. 2015; Zhang et al. 2015). This effect might result from the inhibition of β oxidation of fatty acid in the liver as suggested in several publications on rodents, ultimately leading to the release of NEFA in plasma (Murugavel and Pari 2007; Prabu et al. 2010; Rogalska et al. 2009; Samarghandian et al. 2015). Moreover, a study on exposed toads to relatively high concentration of Cd, displayed down-regulated genes transcription related to fatty acid oxidation in liver (Wu et al. 2017). Another possible explanation could be the loss of insulin sensitivity in adipose tissue, resulting in a decreased inhibition of lipolysis. Indeed, decreased density of insulin receptor in adipose tissue after Cd exposure has been described in adult rats orally exposed to moderate levels of Cd (9.7mg.L⁻¹) (Ficková et al. 2003). Increased plasma NEFA is thought to induce alteration in insulin signaling and glucose uptake (Shulman 2000), possibly contributing to the insulin resistance observed in the present study.

To sum up, maternal Cd exposure led to diverse alterations of parameters related to glucose and lipid metabolism in the weanling offspring. However, these very early changes are important to take into account since they might lead to adverse effects later in life. Indeed, the weaning period is a specific time for the development of organs and especially those related to metabolism (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). At weaning, pups transitioned from a lipid-rich diet (maternal milk) to a high carbohydrate food which required to adjust to glucose metabolism. Thus, it results in a specific time where great metabolic changes happen and where environmental factors are likely to impact the future health (Ostadalova and Babický 2012).

On PND21, decreased glucose tolerance was observed but this effect was not visible on PND26 and PND60. This could be due to an adaptive response starting few days after weaning. The effects observed on PND26 on pancreas seemed transient since the decreased C peptide levels was reversed on PND60. This might reveal the impact of Cd in a very specific time on pancreas development, possibly altering or delaying the process of beta cells maturation. Even though this effect was supplanted by an increased C peptide level on PND60, the possible impact of Cd on pancreatic function cannot be excluded. During the same weaning period, plasma adiponectin concentration was increased and on PND60, it returned to similar levels to controls. Thus, the sensitizing action of adiponectin seems to be a transient short-term adaptive mechanism during post-weaning period where insulin sensitivity is known to undergo different changes (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

On PND60, pups born from Cd-exposed dams of Cd2 group displayed higher C peptide and NEFA levels suggesting the loss of peripheral insulin sensitivity. This effect was initiated at PND21 with increased NEFA concentration and altered glucose tolerance. Even though, on PND60, the organism coped with Cd-induced metabolic changes and that glycemia was maintained, the increased C peptide levels suggest that pancreas has to adapt by secreting more insulin. This might lead to the “exhaustion” of pancreas and the development of type II diabetes, later in life. Moreover, hyperinsulinemia could also fuel the insulin resistance as its role as cause or consequence of insulin resistance is still uncertain (Shanik et al. 2008). Furthermore, chronic exposure to high levels of NEFA is known to contribute to insulin resistance, altered beta cell function, increased ROS and chronic inflammation (Girard 2003; Grundy 2015; Pansuria et al. 2012; Shulman 2000).

Very few data are available on the impact of maternal Cd exposure on glucose metabolism of the offspring. Ba *et al*, have shown that adult male mice born from dams exposed to 100 nM Cd in drinking water, during gestation and lactation and exposed, themselves, to the same level after weaning, displayed increased adipose tissue, plasma TG, cholesterol and NEFA, higher TG in liver and increased expression of gene related to lipid metabolism (Ba et al. 2017). No impact was observed on glycemia or body mass. The authors indicate that these effects are due to perinatal exposure rather than Cd ingestion after weaning. Furthermore, observed alteration of microbiota composition could be responsible for the changes in metabolism. These effects

were observed starting at week 8 (microbiota alteration), week 12-16 (increased adipose tissue) and week 20 and 30 (metabolic changes). This could explain the more intense results compared to our 60-day-old pups. However, our results on NEFA concentration and possible alteration of lipid metabolism are in line with this work. Another study showed that adult male mice from dams co-exposed to Cd and mercury at levels of 0.125, 0.5 and 2 mg.kg⁻¹ by subcutaneous injections during periconception period, presented altered glucose tolerance, body weight and adipose tissue mass at adulthood. Additional symptoms of metabolic syndrome were detected in mice with the highest Cd level, such as increased fasting insulin and leptin, insulin resistance and altered expression of genes associated with glucose and lipid metabolism. Even though these results could be somewhat linked with this study, comparison remains difficult due to different exposure model (administration route, length and levels), older age of the animals and most of all the contribution of mercury co-administration which remains to assess.

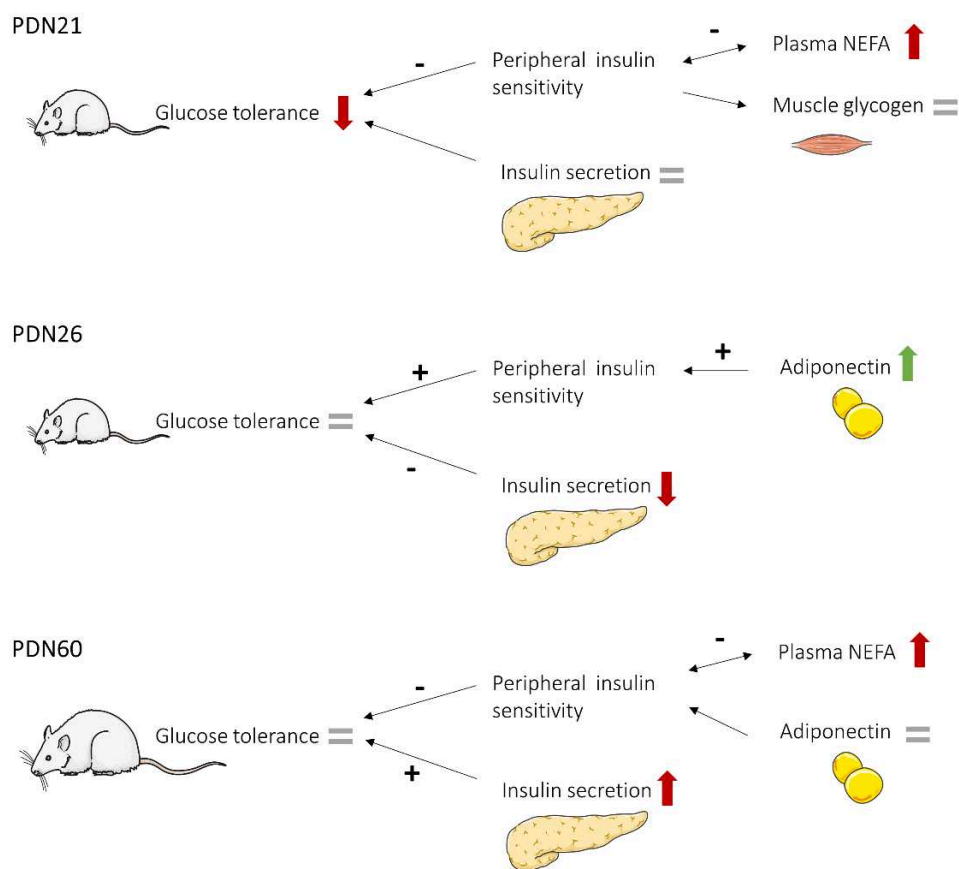


Figure 9: Schematic representation of results for Cd2 group. Thick colored arrows represent changes in measured parameters.

Conclusion:

These findings demonstrate that maternal exposure to relatively low level of Cd, 3 weeks before and during gestation and lactation led to early metabolic changes in the offspring although the amount of Cd transferred from dams to pups remained very low. These alterations occurred before any toxicity in the accumulating organs (kidney and liver). Overall, pups from dams exposed to $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ exhibited symptoms of an onset of insulin resistance starting at weaning and evolving to compensatory increased insulin secretion, 2 months after birth. Thus, Cd exposure during perinatal period could lead to increased risk of developing metabolic diseases such as type II diabetes.

Further studies are needed in order to understand the mechanism involved and to evaluate the outcome of these early changes in a longer term. In the present study, since the purpose was to assess the impact of maternal exposure, intentional Cd contamination stopped after weaning. However, to further understand the risk associated with Cd exposure from the earliest days, it would be of great interest to continue this work with animals exposed to Cd through maternal exposure followed by individual dietary exposure of pups after weaning.

References:

- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1:e35; doi:10.1371/journal.pone.0000035.
- Arbuckle TE, Liang CL, Morisset A-S, Fisher M, Weiler H, Cirtiu CM, et al. 2016. Maternal and fetal exposure to cadmium, lead, manganese and mercury: The MIREC study. *Chemosphere* 163:270–282; doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.023.
- ATSDR. 2012. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Ba Q, Li M, Chen P, Huang C, Duan X, Lu L, et al. 2016. Gender-Dependent Effects of Cadmium Exposure in Early Life on Gut Microbiota and Fat Accumulation in Mice. *Environ. Health Perspect.*; doi:10.1289/EHP360.
- Balsan GA, Vieira JL da C, Oliveira AM de, Portal VL. 2015. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev. Assoc. Medica Bras.* 1992 61:72–80; doi:10.1590/1806-9282.61.01.072.
- Barker DJP. 1998. *Mothers, babies and health in later life*. 2nd ed. Edinburgh : Churchill Livingstone.
- Bekheet SHM. 2011. Comparative effects of repeated administration of cadmium chloride during pregnancy and lactation and selenium protection against cadmium toxicity on some organs in immature rats' offsprings. *Biol. Trace Elem. Res.* 144:1008–1023; doi:10.1007/s12011-011-9084-z.
- Benitez MA, Méndez Armenta M, Montes S, Rembao D, Sanin LH, Rios C. 2009. Mother-fetus transference of lead and cadmium in rats, involvement of metallothionein.
- Bernhoft RA. 2013. Cadmium Toxicity and Treatment. *Sci. World J.* 2013; doi:10.1155/2013/394652.
- Bhattacharyya MH, Whelton BD, Peterson DP. 1981. Gastrointestinal absorption of cadmium in mice during gestation and lactation I. Short-term exposure studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61: 335–342.
- Camsari C, Folger JK, McGee D, Bursian SJ, Wang H, Knott JG, et al. 2016. Effects of Periconception Cadmium and Mercury Co-Administration to Mice on Indices of Chronic Disease in Male Offspring at Maturity. *Environ. Health Perspect.*; doi:10.1289/EHP481.
- Chao H-H, Guo C-H, Huang C-B, Chen P-C, Li H-C, Hsiung D-Y, et al. 2014. Arsenic, cadmium, lead, and aluminium concentrations in human milk at early stages of lactation. *Pediatr. Neonatol.* 55:127–134; doi:10.1016/j.pedneo.2013.08.005.
- Charles M-A, Delpierre C, Br?ant B. 2016. Le concept des origines développementales de la santé: évolution sur trois décennies. *m?decine/sciences* 32:15–20; doi:10.1051/medsci/20163201004.

- Chemek M, Mimouna SB, Boughammoura S, Delbès G, Messaoudi I. 2016. Protective role of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. *Reprod. Toxicol.* 63:151–160; doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.005.
- Demir H, Kanter M, Coskun O, Uz YH, Koc A, Yildiz A. 2006. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on heart rate, some hematological values, and pancreatic beta-cell damage in cadmium-treated rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 110:151–162; doi:10.1385/BTER:110:2:151.
- Dyck DJ, Heigenhauser GJF, Bruce CR. 2006. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 186:5–16; doi:10.1111/j.1748-1716.2005.01502.x.
- EFSA. 2009. Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 7:n/a-n/a; doi:10.2903/j.efsa.2009.980.
- Ferre P, Decaux J-F, Issad T, Girard J. 1986. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod. Nutr. Dév.* 26: 619–631.
- Ficková M, Eybl V, Kotyzová D, Micková V, Möstbök S, Brtko J. 2003. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 16: 561–566.
- Franz E, Römkens P, van Raamsdonk L, van der Fels-Klerx I. 2008. A chain modeling approach to estimate the impact of soil cadmium pollution on human dietary exposure. *J. Food Prot.* 71: 2504–2513.
- Girard J. 2003. Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline : mécanismes de la lipotoxicité. *médecine/sciences* 19:827–833; doi:10.1051/medsci/20031989827.
- Goullé J-P, Mahieu L, Anagnostides J-G, Bouige D, Sausseureau E, Guerbet M, et al. 2010. Profil métallique tissulaire par ICP-MS chez des sujets décédés. *Ann. Toxicol. Anal.* 22:1–9; doi:10.1051/ata/2010001.
- Grundy SM. 2015. Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *Eur. J. Clin. Invest.* 45:1209–1217; doi:10.1111/eci.12519.
- Guo J, Wu C, Qi X, Jiang S, Liu Q, Zhang J, et al. 2017. Adverse associations between maternal and neonatal cadmium exposure and birth outcomes. *Sci. Total Environ.* 575:581–587; doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.016.
- Ithakissios DS, Ghafghazi T, Mennear JH, Kessler WV. 1975. Effect of multiple doses of cadmium on glucose metabolism and insulin secretion in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 143–149.
- Jacquillet G, Barbier O, Rubera I, Tauc M, Borderie A, Namorado MC, et al. 2007. Cadmium causes delayed effects on renal function in the offspring of cadmium-contaminated pregnant female rats. *AJP Ren. Physiol.* 293:F1450–F1460; doi:10.1152/ajprenal.00223.2007.

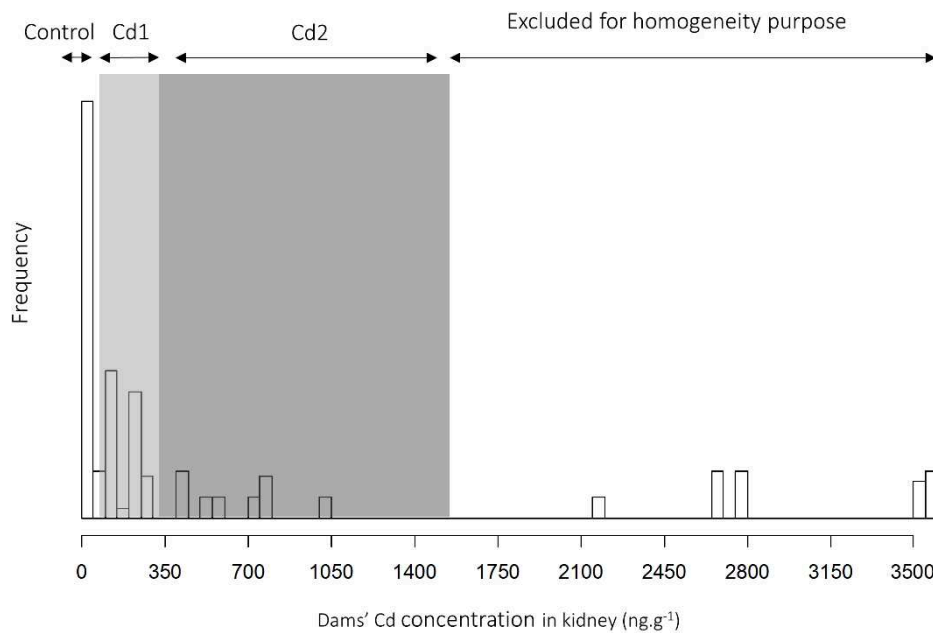
- Järup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:201–208; doi:10.1016/j.taap.2009.04.020.
- Katz AI, Rubenstein AH. 1973. Metabolism of Proinsulin, Insulin, and C-Peptide in the Rat. *J. Clin. Invest.* 52: 1113–1121.
- Kjellström T. 1979. Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden. *Environ. Health Perspect.* 28: 169.
- Kurata Y, Katsuta O, Doi T, Kawasuso T, Hiratsuka H, Tsuchitani M, et al. 2003. Chronic cadmium treatment induces islet B cell injury in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Jpn. J. Vet. Res.* 50: 175–183.
- Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. 2016. Exposition maternelle aux polluants et altération de la santé métabolique à l'âge adulte. *médecine/sciences* 32:51–56; doi:10.1051/medsci/20163201009.
- Leazer T. 2002. Cadmium Absorption and Its Relationship to Divalent Metal Transporter-1 in the Pregnant Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185:18–24; doi:10.1006/taap.2002.9505.
- Lech T, Sadlik JK. 2017. Cadmium Concentration in Human Autopsy Tissues. *Biol. Trace Elem. Res.*; doi:10.1007/s12011-017-0959-5.
- Leotsinidis M, Alexopoulos A, Kostopoulou-Farri E. 2005. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. *Chemosphere* 61:238–247; doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.084.
- Menai M, Heude B, Slama R, Forhan A, Sahuquillo J, Charles M-A, et al. 2012. Association between maternal blood cadmium during pregnancy and birth weight and the risk of fetal growth restriction: The EDEN mother–child cohort study. *Reprod. Toxicol.* 34:622–627; doi:10.1016/j.reprotox.2012.09.002.
- Merali Z, Singhal RL. 1980. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* 69: 151–157.
- Murugavel P, Pari L. 2007. Diallyl tetrasulfide protects cadmium-induced alterations in lipids and plasma lipoproteins in rats. *Nutr. Res.* 27:356–361; doi:10.1016/j.nutres.2007.04.012.
- Nishijo M, Satarug S, Honda R, Tsuritani I, Aoshima K. 2004. The gender differences in health effects of environmental cadmium exposure and potential mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 255: 87–92.
- Olszowski T, Baranowska-Bosiacka I, Rębacz-Maron E, Gutowska I, Jamioł D, Prokopowicz A, et al. 2016. Cadmium Concentration in Mother's Blood, Milk, and Newborn's Blood and Its Correlation with Fatty Acids, Anthropometric Characteristics, and Mother's Smoking Status. *Biol. Trace Elem. Res.* 174:8–20; doi:10.1007/s12011-016-0683-6.
- Ostadalova I, Babický A. 2012. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiol. Res.* 61: S1.

- Pansuria M, Xi H, Li L, Yang X-F, Wang H. 2012. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 4: 916–931.
- Petersson Grawé K, Oskarsson A. 2000. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. *Arch. Toxicol.* 73: 519–527.
- Prabu SM, Shagirtha K, Renugadevi J. 2010. Amelioration of cadmium-induced oxidative stress, impairment in lipids and plasma lipoproteins by the combined treatment with quercetin and α -tocopherol in rats. *J. Food Sci.* 75:T132-140; doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01757.x.
- Rebelo FM, Caldas ED. 2016. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. *Environ. Res.* 151:671–688; doi:10.1016/j.envres.2016.08.027.
- Rogalska J, Brzóška MM, Roszczenko A, Moniuszko-Jakoniuk J. 2009. Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chem. Biol. Interact.* 177:142–152; doi:10.1016/j.cbi.2008.09.011.
- Röllin HB, Kootbodien T, Channa K, Odland JØ. 2015. Prenatal Exposure to Cadmium, Placental Permeability and Birth Outcomes in Coastal Populations of South Africa. *PloS One* 10:e0142455; doi:10.1371/journal.pone.0142455.
- Rudge CV, Röllin HB, Nogueira CM, Thomassen Y, Rudge MC, Odland JØ. 2009. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *J. Environ. Monit. JEM* 11:1322–1330; doi:10.1039/b903805a.
- Sakamoto M, Yasutake A, Domingo JL, Chan HM, Kubota M, Murata K. 2013. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ. Int.* 60:106–111; doi:10.1016/j.envint.2013.08.007.
- Salpietro CD, Gangemi S, Minciullo PL, Briuglia S, Merlino MV, Stelitano A, et al. 2002. Cadmium concentration in maternal and cord blood and infant birth weight: a study on healthy non-smoking women. *J. Perinat. Med.* 30:395–399; doi:10.1515/JPM.2002.061.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Shabestari MM, Azad FJ, Farkhondeh T, Bafandeh F. 2015. Effect of chronic exposure to cadmium on serum lipid, lipoprotein and oxidative stress indices in male rats. *Interdiscip. Toxicol.* 8:151–154; doi:10.1515/intox-2015-0023.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health Perspect.* 118:182–190; doi:10.1289/ehp.0901234.
- Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ. 2012. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. *Endocrinology* 153:1031–1038; doi:10.1210/en.2011-1805.

- Shanik MH, Xu Y, Škrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. 2008. Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *Diabetes Care* 31:S262–S268; doi:10.2337/dc08-s264.
- Shulman GI. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:171; doi:10.1172/JCI10583.
- Slein MW. 1965. d-Glucose: Determination with Hexokinase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase*). In *Methods of Enzymatic Analysis (Second Printing, Revised)* (H.-U. Bergmeyer ed.), pp. 117–130, Academic Press.
- Smolders E. 2001. Cadmium uptake by plants. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14: 177–183.
- Tinkov AA, Filippini T, Ajsuvakova OP, Aaseth J, Gluhcheva YG, Ivanova JM, et al. 2017. The role of cadmium in obesity and diabetes. *Sci. Total Environ.* 601–602:741–755; doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.224.
- Treviño S, Waalkes MP, Flores Hernández JA, León-Chavez BA, Aguilar-Alonso P, Brambila E. 2015. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 583:27–35; doi:10.1016/j.abb.2015.07.010.
- Wang H, Wang Y, Bo Q-L, Ji Y-L, Liu L, Hu Y-F, et al. 2016a. Maternal cadmium exposure reduces placental zinc transport and induces fetal growth restriction in mice. *Reprod. Toxicol.* 63:174–182; doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.010.
- Wang Y, Chen L, Gao Y, Zhang Y, Wang C, Zhou Y, et al. 2016b. Effects of prenatal exposure to cadmium on neurodevelopment of infants in Shandong, China. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 211:67–73; doi:10.1016/j.envpol.2015.12.038.
- Wu C, Zhang Y, Chai L, Wang H. 2017. Histological changes, lipid metabolism and oxidative stress in the liver of *Bufo gargarizans* exposed to cadmium concentrations. *Chemosphere* 179:337–346; doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.131.
- Zhang S, Jin Y, Zeng Z, Liu Z, Fu Z. 2015. Subchronic Exposure of Mice to Cadmium Perturbs Their Hepatic Energy Metabolism and Gut Microbiome. *Chem. Res. Toxicol.* 28:2000–2009; doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00237.

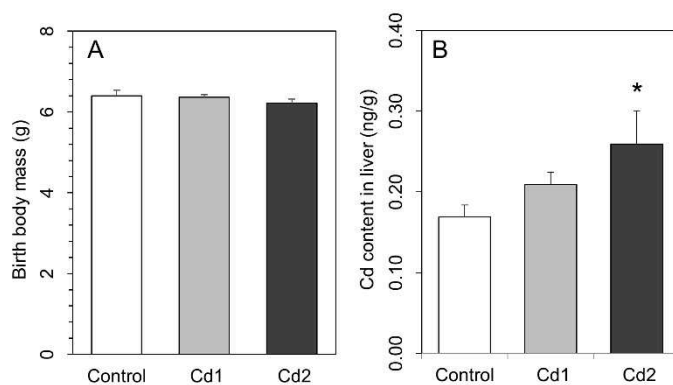
Supplemental data:

Figure S1: Distribution of dams' Cd concentration in kidney. Exposure groups were defined as follow:



Control (n=14), Cd1 (n=14), Cd2 (n=7) for females whose Cd kidney concentration ranged from [0 - 60 ng Cd.g⁻¹ wet tissue), [60 -300 ng Cd.g⁻¹ wet tissue), [300 – 1500 ng Cd.g⁻¹ wet tissue), respectively. Five females had Cd kidney concentration higher than 1500 ng Cd.g⁻¹. These females were used in the first part of this study and unfortunately there were no female as highly exposed, to complete this group, in the second part that we carried out. In order to create homogenous exposure groups these females were not included in the study.

Figure S2: Results on pups at birth. Pups' body mass at birth (A) and Cd concentration in liver (B).



Data are expressed as mean \pm SEM (n=63-102 for body mass and 7-21 for Cd concentration, per group). * Data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$)

Table S2: Cd amount in the liver of pups on PND21 and PND60.

Data are expressed as mean \pm SEM. * Data are significantly different compared to control group ($p < 0.05$)

	Control	Cd1	Cd2
<i>PND21</i>			
Cd content in liver (ng)	1.23 \pm 0.06	3.60 \pm 0.47*	12.74 \pm 3.48*
<hr/>			
<i>PND60</i>			
Cd content in liver (ng)	22.47 \pm 1.91	28.83 \pm 1.91	46.32 \pm 8.20*

DISCUSSION

En 2016, l'OMS a mis au point un nouveau modèle d'évaluation de la qualité de l'air qui montre que « 92% de la population mondiale vit dans des lieux où les niveaux de qualité de l'air ne respectent pas les limites fixées par l'OMS ». Cette pollution de l'air est en partie responsable de la dispersion des polluants dans quasiment tous les éléments de la vie courante (eau, alimentation, matériaux, air, ...). Ainsi, de nos jours, l'exposition aux polluants environnementaux est inévitable, à toutes les étapes de notre vie. En effet, toujours selon l'OMS, plus d'un quart des décès d'enfants de moins de 5 ans, dans le monde est attribuable à la pollution environnementale. Il est donc essentiel et urgent, dans le contexte actuel, d'évaluer et de comprendre l'impact de ces polluants sur la population afin d'être en mesure de minimiser les risques.

Concernant le Cd, l'enjeu est d'autant plus grand qu'il est impossible, au-delà de limiter sa dispersion due à l'activité humaine (industrie minière), de pouvoir supprimer ce polluant. En effet, le Cd est naturellement présent dans la croûte terrestre et les océans. Sa dissémination dans l'environnement entraîne la contamination de toute la chaîne alimentaire. De plus, ce métal ne peut pas être dégradé et possède une très longue demi-vie biologique, ce qui mène à l'accumulation de quantités non négligeables dans l'organisme.

En parallèle, l'expansion quasiment « épidémique » des maladies métaboliques est un problème de santé publique majeur. Ainsi la Fédération Internationale du Diabète estime qu'en 2040, 642 millions de personnes seront atteintes de diabètes dans le monde (International Diabetes Federation 2015). Parmi les facteurs de risques expliquant cette augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, les changements des habitudes alimentaires ainsi que la sédentarité sont les plus reconnus mais ne suffisent pas à expliquer entièrement le phénomène. De nombreux travaux des dernières décennies indiquent que l'exposition aux polluants environnementaux pourrait jouer un rôle significatif dans le développement de ces maladies. Des études montrent, ainsi, les effets néfastes sur le métabolisme dûs à l'exposition, entre autres, à des polluants organiques persistants, aux phtalates, au bisphénol A ou à l'arsenic (Hectors et al. 2013). Parmi ces polluants, l'impact du Cd reste controversé et de nombreux aspects notamment concernant les mécanismes et les effets à de faibles doses ne sont pas encore élucidés. Il est donc crucial de poursuivre les études sur l'impact des expositions environnementales au Cd sur le métabolisme et sur les mécanismes mis en jeu. Il est également fondamental de prendre en compte l'impact des expositions pendant la gestation et/ou dès les

premiers jours de la vie puisqu'il est maintenant fortement suspecté que l'environnement périnatal et de la petite enfance programme, en partie, la santé future de l'individu (Barker et al. 2002; Charles et al. 2016).

Dans ce contexte, l'objectif du projet Cadmidia était d'étudier la relation entre exposition chronique à de faibles doses de Cd et les altérations du métabolisme du glucose, au niveau physiologique chez le rongeur, au niveau cellulaire sur une lignée de cellules pancréatique et avec une approche mathématique. Au sein de ce projet, ce travail de thèse avait pour buts de mettre en place un modèle expérimental réaliste d'exposition au Cd *in vivo*, d'évaluer sa pertinence et ses limites et surtout, d'étudier l'impact de cette exposition sur le métabolisme du glucose des rats à différents stades de la vie.

Ces travaux et les résultats présentés précédemment nous ont conduits à une réflexion sur les points suivants :

- Quelles sont les considérations à prendre en compte dans l'établissement et l'évaluation de modèles expérimentaux (*in vivo*, *in vitro*) afin d'étudier les effets de polluants environnementaux ?
- Y a-t-il un impact différentiel de l'exposition au Cd en fonction du sexe ?
- Quel pourrait être l'impact de l'exposition maternelle au Cd sur la descendance à différents âges et quelle serait l'évolution au cours du temps des potentiels effets observés ?
- Quels pourraient être les impacts de ces travaux en termes d'évaluation des risques dus aux expositions environnementales à des polluants.

1. Modèles expérimentaux pour évaluer l'impact des polluants environnementaux : limites et paramètres à prendre en compte

Nous avons remarqué dans notre revue de littérature (cf introduction) que concernant les études expérimentales sur les polluants, les modèles d'exposition utilisés étaient majoritairement peu réalistes et qu'il existait un manque d'information sur les effets à faibles doses dans des modèles pertinents vis-à-vis de la réalité. Or ces données sont cruciales pour pouvoir évaluer correctement les risques associés à l'exposition aux polluants et déterminer les valeurs toxicologiques de référence. Il est donc important de développer des modèles expérimentaux d'exposition qui soient pertinents en prenant en compte un certain nombre de critères détaillés ci-dessous.

Pour répondre à la question de l'impact de l'exposition environnementale aux polluants, le choix de la dose utilisée dans le modèle animal est crucial. Choisir une dose pertinente qui mime les expositions réelles présente des difficultés. En effet, il est possible de se référer aux données d'exposition réelle chez l'Homme estimée dans plusieurs études (ATSDR 2012; EFSA 2012) à partir des habitudes alimentaires et des niveaux de contamination des différents aliments. Cependant, il faudrait prendre en compte la différence d'espèce. De plus, bien qu'informatives, ces données présentent des limites. En effet, pour certaines populations, il n'a pas été observé de corrélation entre les niveaux d'exposition calculés avec cette approche et les concentrations de Cd sanguin et urinaire réelles des individus (Satarug et al. 2017b). Se référer aux valeurs toxicologiques de référence tel que la dose hebdomadaire tolérable ou les MRL n'est pas tout à fait satisfaisant non plus, car ces valeurs sont déterminées pour les Hommes et calculées à partir d'études des effets toxiques les plus connus du polluant (la néphrotoxicité dans le cas du Cd) et donc ne prennent pas en compte d'autres effets pouvant apparaître à plus faibles doses. Enfin, il est possible de choisir les doses du modèle à partir des doses benchmark et des NOAEL définies pour l'espèce correspondante, ce qui évite de devoir extrapoler entre les espèces. Différentes NOAEL ont été calculées pour le Cd dans des études sur le rat. Elles varient fortement en fonction des modèles (chronique ou aigu), de la voie d'administration et du type d'effet observé (ATSDR 2012). Dans notre cas, nous avons choisi nos doses en les comparant aux NOAEL pour des administrations orales, sur une période de

longueur intermédiaire (15 à 364 jours) ayant des effets systémiques chez le rat ($0.2 - 13 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$), ainsi que la BMDL calculée pour les durées intermédiaires sur le rat ($50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

Bien que ces différentes valeurs soient disponibles, on constate que la plupart des travaux, y compris des travaux récents, emploient des doses fortes de Cd. Ainsi, 2 publications de 2017 utilisent respectivement $7.8 \text{ mg Cd.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ par voie orale et $6.5 \text{ mg CdCl}_2.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ par injection intrapéritonéale (Boughammoura et al. 2017; Elmallah et al. 2017).

Au cours de nos travaux, nous avons observé que la définition d'une dose de Cd à administrer aux animaux ne suffisait pas à caractériser leur exposition. En effet, dans la première étude, nous avons mis en évidence que les rats exposés à une faible dose de $5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de Cd ne présentaient pas de différences observables avec les animaux contrôles en terme de concentration plasmatique de Cd et d'accumulation dans les organes cibles. Dans la seconde étude, nous avons observé une variation importante de la concentration de Cd dans les organes des rates au sein d'un même groupe d'exposition (concentrations de Cd dans le rein allant de 117 à 426 ng.g^{-1} dans le groupe de rates buvant $50 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et de 506 à 3583 ng.g^{-1} dans le groupe de rates buvant $500 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Dans ces deux cas, la valeur de la dose administrée ne suffisait pas à décrire l'exposition résultante. Par ailleurs, à la vue des très divers modèles d'exposition utilisés dans les publications et des nombreux facteurs qui rentrent en jeu (taux d'absorption, dose, voie d'administration, durée), les biomarqueurs d'exposition sont indispensables pour pouvoir établir des comparaisons entre les résultats d'expériences indépendantes.

Les biomarqueurs d'exposition classiquement utilisés sont le Cd sanguin et urinaire. Le Cd sanguin bien qu'utile, dans notre étude sur les rats adultes ayant une exposition continue, n'était pas satisfaisant pour les rats sevrés qui n'étaient plus exposés au moment du sacrifice. En effet, il reflète l'exposition récente et ne permet pas d'évaluer l'imprégnation totale en fin d'expérience. Le Cd urinaire lui, reflète mieux l'exposition cumulée. Cependant, à la suite d'une exposition faible, n'induisant pas de dommages rénaux, comme dans nos études, il ne donne pas d'indication assez sensible sur l'exposition. Les biomarqueurs qui apparaissent, donc, les plus adaptés pour les études sur animaux de laboratoire sont les concentrations de polluants dans les organes cibles. Pour le Cd, et dans le cas d'exposition aiguë, la distribution du Cd se

fait majoritairement dans le foie et donc la concentration du métal dans cet organe est à privilégier. En revanche, à la suite d'exposition longue et chronique, la concentration de Cd dans le rein est la plus pertinente pour l'évaluation de l'exposition puisque le Cd s'y accumule principalement, en n'en étant que très faiblement excrété. Une limite de cette approche est qu'elle ne permet pas un suivi de l'évolution de l'exposition puisque le dosage du polluant s'effectue généralement en fin d'expérience, après l'euthanasie des animaux. Une alternative serait la détermination non invasive de l'exposition par la teneur en polluant dans les poils ou les ongles des animaux. Ces méthodes sont parfois utilisées chez l'homme mais nécessitent une attention particulière car ces matrices sont fortement soumises à des problèmes de contamination des échantillons par l'environnement extérieur (Fréry et al. 1993; Hussein Were et al. 2008; Kim and Kim 2011). Cependant, à notre connaissance, cela n'a jamais été décrit chez des rongeurs.

Schématiquement, les espèces de Cd que nous sommes susceptibles d'ingérer peuvent se résumer à trois formes : Cd^{2+} dans l'eau (ou sous forme $CdCl_2$), Cd complexé à des phytochélatines dans les aliments provenant de plantes, et Cd complexé à la métallothionéine dans la viande et les abats. Ces différentes spéciations du Cd sont d'importance puisqu'elles induisent des différences d'absorption et de distribution dans l'organisme. En effet, lorsque du Cd lié aux phytochélatines ou à la métallothionéine est donné par voie orale à des souris ou des rats, l'absorption intestinale est diminuée et l'accumulation dans le rein est augmentée par rapport au foie, comparé à l'ingestion de $CdCl_2$ (Cherian 1979; Fujita et al. 1993; Groten et al. 1990; Sugawara and Sugawara 1991). De plus, la toxicité semble plus marquée pour les animaux ayant ingéré du $CdCl_2$ (Groten et al. 1990).

Dans la littérature, le Cd sous forme $CdCl_2$ est très majoritairement utilisé et très peu de détails sont disponibles sur l'exposition aux autres formes notamment du point de vue toxicocinétique. Dans nos travaux, nous avons choisi d'exposer les animaux à $CdCl_2$ puisque le Cd était administré dissous dans l'eau et pour pouvoir comparer avec la littérature abondante avec cette forme. Néanmoins, cela représente une limite de notre modèle en ce sens que les deux autres formes mentionnées dans ce paragraphe se rapprochent davantage de la spéciation réelle dans la nourriture.

Une grande partie des études sur l'impact du Cd, utilise des injections (intrapéritonéales, sous cutanées ou intraveineuses) comme voie d'exposition (Edwards and Prozialeck 2009; Kawakami et al. 2013; Lei et al. 2007b). Ces méthodes sont pratiques et faciles à mettre en place d'un point de vue expérimental. La dose de Cd administrée à l'animal est ainsi parfaitement contrôlée. Pour autant, en injectant de façon intrapéritonéale ou sous-cutanée, il est difficile de connaître la proportion de Cd qui passe réellement dans la circulation sanguine. Dans le cas de l'injection intraveineuse, si l'on s'affranchit des incertitudes liées à l'absorption intestinale en administrant directement une dose connue de Cd dans la circulation sanguine, on supprime aussi les interactions avec d'autres molécules, qui peuvent intervenir durant le processus d'absorption et de passage de la barrière intestinale. Une possible différence de spéciation ainsi que de distribution est donc à prendre en compte. En effet, après injection intraveineuse, contrairement au cas de la voie orale, la substance ne passe pas, en premier lieu, par le foie. Cela est d'importance pour les polluants pour lesquels cet organe joue un rôle dans la toxicocinétique (métabolisme, site d'accumulation, interaction avec des molécules spécifiques dans le foie...) ou la toxicité, ce qui est le cas pour le Cd.

Dans un modèle visant à étudier de façon plus réaliste l'impact d'un polluant, il semble donc plus pertinent de choisir des modes d'administration physiologiques. Dans le cas du Cd, il s'agit de l'inhalation et de l'ingestion qui correspondent à deux voies bien distinctes d'exposition : le tabagisme et l'alimentation. Dans le cas de l'ingestion, le gavage quotidien est une méthode précise qui présente néanmoins plusieurs inconvénients. En effet, le gavage limite l'absorption et les modifications de la substance au niveau des muqueuses buccales, ce qui peut être important pour certains polluants. Le gavage consiste en général en une à deux prises par jour, ce qui entraîne une cinétique différente comparée à l'ingestion régulière tout au long de la journée de la substance présente dans la nourriture ou dans l'eau. Par ailleurs, cette procédure peut générer du stress, notamment chez les femelles gestantes, ce qui résulte en l'élévation, pendant plusieurs heures, des concentrations de certaines hormones et pourrait impacter le métabolisme des animaux. Enfin, les risques associés au gavage quotidien et sur de longues périodes ne sont pas anodins : inflammation, risque d'introduction de fluide dans la trachée et de perforation du tube digestif (Vandenberg et al. 2014).

Pour ces raisons, dans nos études, nous avons choisi d'administrer le Cd dans l'eau de boisson. Une limite que cela impose est la fluctuation du volume d'eau que chaque rat va consommer par jour. Dans nos expériences, ces incertitudes ont été minimisées par un suivi rigoureux de la consommation d'eau de chaque rat individuellement, chaque semaine et par l'adaptation de la concentration du biberon en fonction de la consommation de chacun. Pour autant, une incertitude réside dans le fait que cette mesure ne prend pas en compte le faible gaspillage d'eau notamment lorsque le rat joue avec le biberon.

La durée de l'exposition est aussi un paramètre à prendre en compte dans la mise en place d'un modèle expérimental *in vivo*. Bien souvent, la durée de l'exposition fait la différence entre ce qui relève de l'exposition aiguë et chronique où des doses plus faibles sont administrées de façon régulière et répétée sur une plus longue période. Dans le cas de l'étude de l'impact de polluant, une exposition chronique et longue est évidemment à privilégier. Le temps alloué à l'expérience est un facteur qui conditionne généralement le temps d'exposition des animaux. Dans la littérature sur plusieurs types de polluants, la durée d'exposition dépasse rarement un an, du fait du coût de l'entretien des animaux et de l'espérance de vie des rongeurs. De plus, chez des animaux vieillissants, des effets non spécifiques du polluant, dus à l'âge, peuvent apparaître, ce qui induit un biais et rend compliquée l'interprétation des données.

Dans la thématique concernant le lien entre Cd et diabète, les durées d'exposition dans les études sont généralement comprises entre 4 (Han et al. 2003b) et 370 jours (Lovásová et al. 2013). Dans nos études, nous avons exposé les rats pendant environ 3 mois. Au regard de la durée de vie d'un rat, cela correspond à une exposition pendant environ 10% de sa vie. Cela représente une limite expérimentale de notre modèle qui nous permet de voir seulement les prémises des altérations causées par le Cd. Cependant, les observations faites dans ce temps attestent d'un réel impact du Cd qui s'aggraverait probablement si la durée d'exposition était augmentée. Toutefois, des études sont nécessaires pour le démontrer car il n'est pas exclu que face à une exposition faible dose pendant une longue période, l'organisme puisse mettre en place des phénomènes adaptatifs efficaces.

Dans les études avec la plupart des polluants, le groupe contrôle peut rarement être considéré comme une condition correspondant à une exposition nulle. En dosant le Cd présent dans les organes, le plasma et le lait des animaux du groupe contrôle de nos deux études, nous nous sommes rendus compte qu'ils contenaient des quantités détectables de Cd (environ 23 ng.g⁻¹ dans le rein, 0.08 ng.mL⁻¹ dans le plasma et 0.21 ng.mL⁻¹ dans le lait maternel). A titre d'exemple, dans une publication étudiant l'impact, sur des paramètres biochimiques, d'une exposition à faible dose de Cd *via* une alimentation contaminée, les rats du groupe contrôle utilisé présentent des quantités de Cd dans le foie supérieures à celles retrouvées dans les rats du groupe Cd50 de notre première étude (Ogheneovo Asagba 2010). Ce bruit de fond peut provenir d'une exposition au Cd antérieure à l'expérience (ce que nous ne maîtrisons pas lorsque les animaux sont achetés à des entreprises extérieures dont nous ne connaissons pas les conditions environnementales d'élevage) ou de la contamination *via* l'environnement expérimental. Il est donc primordial, lors de la mise en place du modèle d'étudier, dans la mesure du possible, les conditions dans lesquelles va se dérouler l'expérience en particulier la teneur en polluant de l'eau, de la nourriture, de la litière, de l'air et/ou éventuellement le relargage possible du plastique des cages et biberons. Dans nos études, la nourriture contenait du Cd à hauteur d'environ 33 à 54 ng Cd.g⁻¹. Selon le type de polluants, il est peut-être envisageable d'utiliser un régime alimentaire fabriqué sans ce composé mais dans la majorité des cas, dont celui du Cd, il semble impossible d'éviter totalement leur présence. Il faut donc en prendre compte dans le suivi des animaux et l'interprétation des résultats. Le suivi de la consommation de nourriture et d'eau est donc nécessaire pour évaluer l'ingestion non intentionnelle de polluant.

Dans l'analyse des résultats, il est préférable de ne plus se baser sur l'idée d'un groupe contrôle non-exposé mais plutôt sur celle d'un niveau de base d'exposition. L'évaluation des niveaux d'exposition des autres groupes doit aussi être revue par rapport à ce niveau de base, ce qui pose la question de la sensibilité des mesures permettant d'observer des effets à des doses proches de l'exposition de base. Dans notre première étude, le groupe Cd5 (qui ingérait seulement 3.5 fois plus de Cd que les contrôles) n'était pas statistiquement différent du groupe contrôle en termes d'imprégnation au Cd et se situait donc en dessous d'un seuil de sensibilité permettant l'étude de ce groupe. C'est pourquoi nous avons pris la décision de ne pas poursuivre l'étude sur ce groupe.

L'étude de l'effet de l'exposition maternelle sur la descendance apporte une complexité supplémentaire dans la mise en place du modèle et dans l'analyse des résultats.

Au niveau du modèle expérimental, si tous les points mentionnés précédemment peuvent être pris en considération pour les mères, l'exposition réelle de la descendance est plus difficilement évaluable et contrôlable. En dehors de la quantité de polluant retrouvée dans les organes à la fin de l'exposition, d'autres biomarqueurs d'exposition sont envisageables comme la quantification du polluant dans le placenta, le sang de cordon et le lait. Toutefois, ces mesures sont difficiles à réaliser, les volumes d'échantillons faibles rendent les dosages compliqués voire infaisables et les résultats en découlant sont difficilement extrapolables à une dose de polluant à laquelle la progéniture serait exposée. En effet, l'apport en polluant à chaque fœtus pendant la gestation et la prise alimentaire de chaque raton pendant la lactation n'est pas facilement mesurable. Enfin, les aspects de spéciation et de matrice alimentaire ne peuvent pas être contrôlés.

D'autre part, plusieurs sources de variabilité possibles sont à prendre en compte dans l'analyse des données :

- la variabilité interindividuelle entre les mères qui répondent de manière différente après une exposition théoriquement à la même dose de polluant. Par exemple, dans notre étude, la concentration de Cd dans le rein des femelles varie de 223 à 3583 ng.g^{-1} dans le groupe exposé à $500 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ bien que nous ayons ajusté de façon hebdomadaire la quantité de Cd dans le biberon selon la consommation d'eau et le poids des mères.
- la variabilité intra-portée entre les ratons provenant de la même mère. Par exemple, la concentration de Cd dans le rein des ratons, de 26 jours, provenant de la même mère exposée à $500 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ varient de 8 à 23 ng.g^{-1} .

Pour essayer de minimiser la variabilité inter-portée qui découle de ce modèle, il est conseillé d'égaliser le nombre de ratons par portée dès la naissance pour normaliser le plus possible la prise alimentaire des ratons et donc leur prise de poids et ainsi leur consommation de Cd *via* le lait maternel. Au niveau expérimental, cela implique aussi de faire, dans la mesure du possible, chaque mesure et chaque dosage sur plusieurs ratons par portée.

Pour l'analyse des résultats, tous les aspects mentionnés précédemment doivent être pris en compte. La démarche statistique a donc été développée en ce sens.

Premièrement, afin d'estimer au mieux l'exposition in-utero des ratons et de former des groupes plus homogènes, les mères ont été regroupées sur la base de leur teneur rénale en Cd : groupe contrôle = 0 – 60 ng Cd.g⁻¹ ; groupe Cd1 = 60 - 300 ng Cd.g⁻¹ ; groupe Cd2 = 300 - 1500 ng Cd.g⁻¹.

Deuxièmement, il nous est apparu fondamental de prendre en compte la dépendance des résultats des différents ratons d'une même portée, ces derniers étant issus d'une même femelle. Pour cela, nous avons utilisé des modèles statistiques à effets mixtes. Les variables à effets fixes dans ces modèles étaient le groupe d'exposition et le sexe des ratons, tandis que la mère représentait la partie aléatoire. Ainsi modélisés, les ratons au sein d'une même portée étaient considérés comme des mesures répétées. Pour améliorer la pertinence toxicologique du modèle, le poids des ratons a également été ajouté en tant qu'effet fixe, afin de prendre en compte les différences potentielles de consommation de lait ou de nourriture contaminés pouvant être responsable d'une différence d'exposition.

Enfin, un terme d'interaction entre le Cd et le sexe a été inséré dans les modèles afin d'étudier un potentiel effet différentiel du Cd en fonction du genre des ratons, tel que précédemment observé dans la première étude chez les rats adultes (voir Résultat – Article1). Cette analyse statistique n'a pas montré d'interaction significative entre le Cd et le sexe des ratons, ce qui indique qu'à ces âges-là, nous n'observons pas d'effets différents entre les sexes dus à l'exposition au Cd. Les mêmes modèles sans ce terme d'interaction ont également été construits pour contrôler un possible effet du sexe des ratons sur les valeurs des paramètres mesurés quel que soit le groupe d'exposition.

Cette démarche méthodologique et statistique n'est pas spécifique au Cd et pourrait s'adapter à des études concernant l'impact d'autres polluants ou plus largement d'autres facteurs environnementaux sur la descendance.

Afin d'approfondir les mécanismes liés aux effets observés au niveau physiologique sur l'animal, et pour répondre aux exigences éthiques visant à la réduction de l'utilisation des animaux de laboratoire (règle des 4R), des études *in vitro* sur modèles cellulaires peuvent être développés. De la même façon que pour les études *in vivo*, une réflexion est nécessaire sur les modèles utilisés. Pour répondre à la thématique du métabolisme du glucose, les types cellulaires d'intérêt sont les cellules bêta pancréatiques qui sécrètent de l'insuline en réponse au taux de glucose circulant et les cellules des tissus périphériques qui utilisent le glucose en réponse à la signalisation insulinaire, en particulier, les cellules musculaires, les adipocytes et les hépatocytes.

Afin d'étudier l'impact d'un polluant sur la sécrétion d'insuline, plusieurs lignées cellulaires sont utilisées dans la littérature (Skelin 2010) (tableau 9). Leurs avantages sont qu'elles permettent de réduire l'utilisation d'animaux de laboratoire et apportent une meilleure reproductibilité (cellules clonales). Ces lignées cellulaires ont été établies de façon à maintenir autant que possible les propriétés physiologiques des cellules bêta pancréatiques. Cependant, chaque lignée présente certaines limites. Une des lignées les plus utilisées sont les INS1. Elles proviennent d'insulinômes de rat induits par irradiation aux rayons X (Asfari et al. 1992) et contiennent environ 20% de la quantité d'insuline des cellules bêta de rats.

Pour étudier les effets de l'exposition à un polluant, le choix des doses est crucial et plus compliqué à définir que dans le cas des études *in vivo*. En effet, il est difficile d'effectuer une comparaison entre les quantités de Cd ajoutées dans le milieu de culture et les expositions réelles au polluant. Une possibilité est de choisir des doses en fonction des concentrations de Cd retrouvés dans le pancréas ou le sang. Une autre approche est de choisir des doses n'engendrant pas de mort cellulaire en effectuant des mesures de viabilité à doses croissantes. A titre d'exemple, des expériences préliminaires réalisées en parallèle des travaux *in vivo*, sur des cellules INS1 exposées au Cd dans leur milieu de culture pendant 72 heures, montrent qu'en dessous de 2.5 μM nous n'observons pas d'effet significatif sur la viabilité (Annexe 2). Ainsi, les doses de 0.125 à 2 μM pourraient donc être considérées comme des faibles doses et utilisées dans le cadre d'une étude sur un modèle d'exposition sub-léthale.

Table 4: Lignées cellulaires disponibles, sécrétant de l'insuline. (Skelin, 2010)

Cell line	Cell origin	Species	Methods	Advantages	Disadvantages	References
HIT	Insulinoma	Hamster	SV40 T-antigen transfected	Contain membrane-bound insulin granules.	Low insulin content. Only HIT-T15 responds to glucose stimulation.	(Santerre et al., 1981)
MIN6	Insulinoma	Mouse	SV40 T-antigen transgenic mouse	Express glucokinase. and Glut2	Treatment with nicotinamide makes them responsive to glucose.	(Ishihara et al., 1993)
βTC1	Insulinoma	Mouse	SV40 T-antigen transgenic mouse	Produce proinsulin I and II and insulin.	Hexokinase activity. Not responsive to glucose stimulation.	(Efrat et al., 1988)
IgSV195	Insulinoma	Mouse	SV40 T-antigen transgenic mouse	Retain certain morphological and physiological characteristics of pancreatic beta cells.	Need to be exposed to fetal bovine serum and a combination of 3-isobutyl-1-methylxanthine and glutamine for insulin secretion. Not responsive to glucose in the physiological range.	(Gilligan et al., 1989)
βHC	Hyperplastic islets	Mouse	SV40 T-antigen transgenic mouse	βHC9 express GLUT2 and glucokinase. Normal concentration-dependency curve.	High hexokinase activity developed after several generations. Only clone 9 responds to glucose stimulation.	(Radvanyi et al., 1993)
NIT-1	Insulinoma	Mouse	NOD/Lt mouse, SV40 T-antigen	High levels of insulin mRNA.	Not responsive to glucose in the physiological range.	(Hamaguchi et al., 1991)
RINm	Insulinoma	Rat	Radiation induced		Insulin level decreases with passages. Also secrete somatostatin. Not responsive to glucose stimulation.	(Gazdar et al., 1980)
RINm5F	Insulinoma	Rat	Radiation induced		Inappropriate sensitivity to glucose. Abnormal properties of glucose transport and/or phosphorylation.	(Gazdar et al., 1980; Praz et al., 1983)
RINr	Insulinoma	Rat	Radiation induced		Inappropriate sensitivity to glucose. Abnormal properties of glucose transport and/or phosphorylation.	(Gazdar et al., 1980; Praz et al., 1983)
BRIN-BD11	Insulinoma and normal β-cells	Rat	Electrofusion derived	Express GLUT-2 and high glucokinase activity.	Also express hexokinase.	(McClenaghan and Flatt, 1999)
INS-1	Insulinoma	Rat	Radiation induced	Responsiveness to glucose within the physiological range. Relatively high insulin content.	Require mercaptoethanol in culture medium.	(Asfari et al., 1992)
CRI-G1	Insulinoma	Rat	Radiation induced		In parallel to insulin they release glucagon. Not responsive to physiological glucose concentrations.	(Carrington et al., 1986)
In-111	Insulinoma	Rat	BK-virus induced		Not responsive to physiological glucose concentrations.	(Uchida et al., 1979)
CM	Insulinoma	Human	from the ascitic fluid of a patient with liver metastasis of a malignant insulinoma	Express GLUT2 and glucokinase concentrations.	No insulin secretion in response to increasing glucose	(Baroni et al., 1999)
TRM-1	Foetal pancreas	Human	SV40 T-antigen, H-ras ^{v6112}	Express GLUT2.	Express small amounts of insulin and glucagon. Not responsive to glucose stimulation.	(Wang et al., 1997)
Blox5	Foetal pancreas	Human	SV40 T-antigen, H-ras ^{v6112} , hTERT oncogene	Exhibit glucose responsive insulin secretion. Express glucokinase.	Low insulin content.	(Dufayet de la Tour et al., 2001)

Les paramètres de durée et de fréquence de l'exposition sont également importants pour caractériser le modèle cellulaire. Si le but est d'étudier l'impact d'une exposition chronique, il faudrait privilégier les durées longues. Cependant, les conditions expérimentales liées à la culture cellulaire (temps de doublement, changement de milieu et passages des cellules) restreignent fortement le temps d'exposition. Dans le cas des INS1, l'exposition maximum que nous pouvions utiliser était de 72h car un temps plus long aurait nécessité le passage des cellules et engendré leur prolifération.

De plus, l'expérimentation sur des lignées cellulaires de cellules β présentent des limites : (1) elles ne reproduisent pas la structure en trois dimensions des îlots pancréatiques, (2) elles proviennent de tumeurs et peuvent donc présenter des anomalies génétiques, d'expressions protéiques ou de métabolisme, (3) elles peuvent facilement dériver dans le temps, après plusieurs passages, et donc perdre des caractéristiques comme la réponse au glucose. Dans la mise en place de modèle cellulaire, il est donc crucial d'effectuer des vérifications concernant les lignées, en particulier de caractériser leur fonctionnalité. De plus, il est important de garder à l'esprit que ces lignées cellulaires ne miment pas parfaitement la physiologie des cellules bêta et que le risque de dérive est conséquent.

Une perspective concernant ces modèles pourrait être l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites qui peuvent être différenciées en cellules bêta (Kawser Hossain et al. 2016; Stepniewski et al. 2015).

Concernant l'étude de la sensibilité à l'insuline et les voies de signalisation associées, il est possible d'utiliser des lignées cellulaires de muscles (C2C12, L6, ...), de foie (HEPG2) ou d'adipocytes (3T3, OB17,...) qui présentent toutefois des limites similaires aux lignées de cellules β .

Une autre possibilité concernant les études *in vitro* est l'utilisation de cellules primaires. Des îlots pancréatiques de rats peuvent être obtenus à partir de la digestion du pancréas par la collagénase et des processus de purification (Carter et al. 2009). L'utilisation de ces cellules primaires présente des avantages : on garde les caractéristiques physiologiques de ces cellules ainsi que la structure en forme d'îlots et cela permet d'étudier les mécanismes plus en détails

par des techniques classiques de biologie cellulaire et moléculaire. De plus, il est possible de soumettre les îlots à des conditions d'exposition soit *in vivo* chez l'animal avant prélèvement du pancréas, soit *in vitro* après préparation des îlots. Toutefois, en pratiquant un peu cette technique, nous avons perçu des limites et des difficultés expérimentales à prendre en compte pour l'étude de polluants. En fait, on observe des variations qualitatives et quantitatives relativement élevées entre les préparations d'îlots purifiés et une hétérogénéité au sein d'une même préparation (taille des îlots) qui font que les expériences sont difficilement reproductibles. Pour l'étude de la sécrétion, cette variabilité notamment dans la taille des îlots impacte fortement les résultats et des solutions pour normaliser les valeurs doivent être envisagées (dissociation des îlots, rapport à la quantité de protéine, sélection des îlots selon leur taille). La question de l'exposition d'une population si hétérogène peut poser problème : le polluant atteint-il le centre de l'îlot ? Les petits et les gros îlots sont-ils soumis à la même exposition ? De plus, la durée d'exposition est restreinte par le fait qu'il n'est pas possible de garder les îlots en culture pendant une longue période. Les îlots posent aussi des défis techniques : pénétration des marqueurs jusqu'au centre de l'îlot pour l'étude par microscopie, dissociation nécessaire pour les études par cytométrie, manque de méthodes robustes pour la détermination de la viabilité par exemple, ...

Afin d'étudier l'impact de polluant sur la sensibilité périphérique à l'insuline, il est possible d'utiliser des myoblastes préparés à partir de muscle de rongeurs et de les différencier en myotubes (Ohanna et al. 2005). Une gamme de doses de Cd ajouté dans le milieu de culture peut être utilisée afin de définir, comme décrit précédemment, des doses sub-léthales. A titre d'exemple, nous avons déterminé une courbe de viabilité montrant que la dose létale DL₅₀ se trouvait aux alentours de 50 µM de Cd pour des myotubes de souris, exposés pendant 48 heures (Annexe 2). Les avantages de ces myoblastes sont qu'ils sont utilisables sur plusieurs passages consécutifs et leurs fonctions physiologiques sont bien préservés, notamment leur fonction contractile. De plus, ces cellules permettent l'étude mécanistique des voies de signalisations en activant les voies de signalisation de la sensibilité à l'insuline par exemple. Les limites de ces cellules sont qu'elles nécessitent un processus de différenciation précis sur lequel le Cd peut agir.

Il est aussi envisageable de préparer des adipocytes et hépatocytes primaires par des techniques connues (Björntorp et al. 1978; Papeleu et al. 2006). Nous n'avons pas réalisé

d'expériences préliminaires sur ce type de cellules, dans le cadre de ma thèse. C'est pourquoi, nous ne développerons pas cette partie plus en détails.

2. Impact différentiel de l'exposition au Cd sur les deux sexes.

Les résultats de notre première étude ont montré l'intérêt de travailler avec les deux sexes, en toxicologie. En effet, on observe des effets différents après exposition au Cd chez les mâles et les femelles. Les mâles présentent une augmentation des TBARS dans le plasma alors que chez les femelles, la concentration d'insuline plasmatique à jeun est augmentée et la sensibilité à l'insuline réduite. Dans la littérature, les études sont majoritairement réalisées avec des animaux de sexe masculin. Cependant, en réduisant l'étude à un seul sexe, il se peut que nous passions à côté d'effets impactant spécifiquement l'autre sexe, comme c'est le cas pour les femelles, dans notre étude.

Dans notre étude, les mâles semblent présenter une sensibilité supérieure au stress oxydant comme observée par l'augmentation des TBARS dans le sang. Pour discuter ces résultats, il est important de rester prudent, en ce sens que nous n'avons mesuré que ce paramètre et la glutathion peroxydase et que le dosage des TBARS n'est pas hautement spécifique de la peroxydation lipidique dans des systèmes biologiques complexes (Forman et al. 2015). En effet, d'autres molécules biologiques, comme des glucides ou des produits de l'oxydation de protéines ou d'acides nucléiques, peuvent réagir avec l'acide thiobarbiturique utilisé dans ce dosage. Une différence de sensibilité au stress oxydant induit par le Cd, entre les mâles et les femelles a déjà été décrite chez des rats exposés au Cd par injections intrapéritonéales et sous cutanées à des doses allant de 0.5 à 4 mg.kg⁻¹.j⁻¹ (Andersen and Andersen 1988; Kara et al. 2005; Sato and Nagai 1986). Dans ces études, les mâles présentaient des niveaux de peroxydation lipidique dans le foie plus élevés que les femelles pour les mêmes doses d'exposition. Quelques pistes d'explications sont avancées dans la littérature. Plusieurs publications font état de quantités de métallothionéine plus élevées chez les femelles rongeurs que chez les mâles après injection de Cd (Blazka et al. 1988; Shaikh et al. 1993; Shimada et al. 2012). Etant donné son rôle dans la distribution et la détoxification du Cd, les plus faibles quantités de métallothionéine chez les mâles pourraient augmenter la réactivité du Cd présent dans les cellules, espèce qui en se liant avec d'autres molécules portant des groupements

thiols, en particulier GSH, peut induire le déplacement de l'équilibre rédox entraînant du stress oxydant (Kara et al. 2005). Par ailleurs, une étude sur des hépatocytes isolés de rats montre une différence de capacité du Cd à induire de la peroxydation lipidique entre mâles et femelles qui est en partie médié par un mécanisme dépendant de NADPH, dans les microsomes hépatiques (Sato and Nagai 1986).

Chez les femelles, nous avons observé une sensibilité plus grande à la toxicité du Cd sur le métabolisme glucidique. Pour les mêmes niveaux d'exposition, elles présentent une élévation des concentrations d'insuline circulante à jeun et après injection de glucose. Du fait que les concentrations de peptide C ne sont pas altérées chez ces animaux, nous faisons l'hypothèse que l'exposition au Cd impacte la capacité du foie à extraire l'insuline de la circulation sanguine.

La sensibilité accrue des femelles par rapport aux mâles vis-à-vis de la toxicité du Cd a déjà été décrite dans la littérature. Des effets toxiques plus marqués chez les femelles que chez les mâles ont ainsi été observés au niveau du foie, des reins, des os et du système immunitaire (Baker et al. 2003; Pillet et al. 2006; Shimada et al. 2012; Vahter et al. 2007). Les mécanismes liés à ces observations ne sont pas encore clairement compris toutefois plusieurs pistes sont proposées :

- Dans plusieurs études, chez l'Homme et chez l'animal, des quantités plus importantes de Cd ont été mesurées chez les femelles que chez les mâles (Vahter et al. 2002). Cela s'explique en partie par une absorption plus grande lors d'une déficience en fer, touchant plus les femelles que les mâles. Dans notre étude, ce phénomène ne peut pas expliquer les différences observées puisque les concentrations de Cd dans le foie et le rein sont les mêmes entre mâles et femelles.
- D'autres études montrent des interactions entre le Cd et les hormones sexuelles féminines. Sur des hépatocytes primaires isolés de rats traités au CdCl₂ (1-50µM), l'ajout de progestérone augmente la cytotoxicité (Baker et al. 2003). Les auteurs attribuent cet effet à une modulation, potentialisée par la progestérone, des canaux calciques, qui permettent l'entrée du Cd dans les cellules. Autre exemple, une injection intrapéritonéale d'une faible dose de Cd (5µg.kg⁻¹) induit une hyperplasie, la croissance de glandes mammaires et l'induction de gènes liés aux hormones chez des rates

ovariectomisées (Johnson et al. 2003). Ceci et plusieurs autres travaux suggèrent le rôle de perturbateur endocrinien du Cd (Choe et al. 2003; Höfer et al. 2010; Silva et al. 2012). *In vitro*, le Cd est capable de se lier aux récepteurs aux œstrogènes, de les activer, d'interagir avec les gènes régulés par les œstrogènes, d'altérer leur transcription et leur traduction, et d'entraîner la prolifération des cellules dépendantes des œstrogènes (Silva et al. 2012). *In vivo*, des résultats mettent en évidence que le Cd peut mimer l'œstrogène dans des tissus sensibles à cette hormone, activer les récepteurs aux œstrogènes dans l'utérus et les glandes mammaires et altérer les concentrations d'hormones (Silva et al. 2012). Toutefois, les données épidémiologiques ne permettent pas d'établir un lien clair entre exposition au Cd et maladies hormono-dépendantes (Silva et al. 2012). Ces différences proviendraient en partie du fait que les études expérimentales ont été réalisées avec des doses relativement fortes de Cd à l'exception des travaux mentionnés précédemment de Johnson et al.

A notre connaissance, il n'existe pas de données reliant les effets dépendants du sexe suite à une exposition au Cd et le métabolisme du glucose. Cependant, cela a déjà été décrit pour d'autres polluants (DeBenedictis et al. 2016; Enan et al. 1996; Nakayama et al. 2011; Naville et al. 2013; van Esterik et al. 2014). Le débat actuel sur les effets ostrogéniques du Cd doit donc être étendu à la signalisation et la sensibilité à l'insuline.

3. Impact de l'exposition maternelle au Cd sur la descendance et évolution des effets.

Pour évaluer l'impact de l'exposition maternelle au Cd sur la descendance, nous avons décidé d'étudier les ratons à trois âges différents. La première partie de l'étude a été faite au sevrage (21 jours après la naissance). En effet, à ce moment-là, on se place juste à la fin de l'exposition maternelle et lorsque les ratons passent d'un régime principalement composé de lait riche en lipides à la nourriture de laboratoire plus riche en glucides. Par ailleurs, le sevrage est une période particulière où d'importants changements métaboliques s'opèrent à différents niveaux. Pendant la lactation, les ratons présentent un état de résistance à l'insuline qui disparaît au sevrage lorsque les ratons passent à un régime riche en glucide (Girard et al. 1993).

Une augmentation des stocks de glycogène est alors observée. Cependant, si les ratons sont sevrés avec un régime riche en gras, la résistance à l'insuline se prolonge (Girard et al. 1993). Ceci montre l'impact de la nutrition à cet âge sur la santé métabolique future. Au niveau du foie, la néoglucogénèse est particulièrement active pendant la lactation puisque le lait ne fournit qu'environ 20% des besoins en glucose du raton (Ferre et al. 1986). Au sevrage, la néoglucogénèse réduit progressivement pour atteindre son niveau basal à partir de 30 jours après la naissance (Ferre et al. 1986). Parallèlement, l'oxydation des acides gras libres dans le foie, élevée pendant la lactation diminue à partir du sevrage. La lipogénèse, elle, augmente à partir du sevrage. Au niveau du pancréas, d'important changements structurels et fonctionnels se déroulent également pendant la période de sevrage (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Pendant la lactation, les cellules β du pancréas ne sont pas complètement matures et les taux d'insuline circulant sont faibles. A partir du sevrage, une transition vers un fonctionnement mature s'opère entre 20 et 28 jours après la naissance (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Pendant cette transition, une période d'insensibilité transitoire au glucose est observée dans le pancréas, possiblement liée au développement progressif des cellules sécrétrices d'insuline. Ainsi, pendant la période de sevrage, la masse de cellules β augmente (Aguayo-Mazzucato et al., 2006).

Tous ces aspects font que la période autour du sevrage présente un métabolisme spécifique avec des changements parfois transitoires. De plus, cette période est une fenêtre critique pendant laquelle des altérations provenant de l'environnement peuvent influencer la santé future de l'individu. De ce fait, nous avons poursuivi l'étude par des mesures sur les ratons de 26 jours puisque comme décrit auparavant, des changements métaboliques s'effectuent rapidement à partir du sevrage. Enfin, nous avons étudié les effets résultants à moyen terme (60 jours) car l'adaptation aux altérations observées pendant le sevrage peuvent être visibles immédiatement ou entraîner des effets à plus long terme (Ostadalova and Babický 2012).

Dans cette discussion générale, nous allons reprendre les résultats observés à ces trois âges par groupe d'exposition.

Concernant le groupe Cd1 dont les mères présentent une concentration de Cd dans le rein entre 60 et 300 ng Cd.g⁻¹, nous avons observé à 21 jours, une altération de la tolérance au glucose des rats sans que la sécrétion ne soit altérée (récapitulatif des effets pour ce groupe figure 13). Ceci suggère une perte de sensibilité des tissus périphériques dont nous n'avons pas déterminé l'origine. A 26 jours, la tolérance au glucose est restaurée chez les rats des mères exposées, indiquant qu'un mécanisme s'est mis en place pour contrebalancer la perte de sensibilité observée à 21 jours. L'augmentation de l'adiponectine plasmatique pourrait contribuer à sensibiliser les tissus périphériques. En effet, l'adiponectine est une adipokine principalement sécrétée par le tissu adipeux viscéral qui participe au métabolisme glucidique et lipidique. Chez l'homme, elle est directement corrélée à la sensibilité à l'insuline et inversement corrélée à l'accumulation ectopique de gras (Samuel et al. 2010). Ainsi, de faibles taux d'adiponectine sont associés à l'insulino-résistance, au diabète de type 2 et à l'obésité. Au niveau du tissu adipeux, l'action autocrine de l'adiponectine active la différenciation des adipocytes et favorise la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux en augmentant l'entrée du glucose dans les adipocytes et le stockage des lipides (Balsan et al. 2015). Elle diminue aussi l'inflammation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Balsan et al., 2015). Au niveau périphérique, l'adiponectine inhibe la néoglucogénèse hépatique et améliore la sensibilité à l'insuline du muscle. En effet, elle a un effet additif sur l'action de l'insuline notamment au niveau de la phosphorylation du récepteur à l'insuline. Enfin l'adiponectine favorise l'oxydation des acides gras libres (Dyck et al. 2006). L'action compensatrice et sensibilisante de l'adiponectine a, par ailleurs, été décrite chez des souris n'ayant pas de récepteur à l'insuline dans les muscles (souris KO) qui pourtant ne présentent pas d'hyperglycémie (Cariou et al. 2004). A 60 jours, les rats du groupe Cd1 ne présentent plus de différence, comparé aux contrôles que ce soit vis-à-vis de la tolérance au glucose ou de la sécrétion d'adiponectine. Il semble alors que les effets observés à 21 jours, pour ce groupe, aient été abolis. Pour tenter d'expliquer cette réversibilité, il est important de prendre en compte que les concentrations de Cd retrouvés dans les organes des rats de ce groupe sont très proches de celles des contrôles (pas de différence significative pour la concentration dans le foie et seulement 1.3 fois plus élevée dans le rein à 60 jours). Cela pourrait expliquer que les effets ne soient plus visibles et

que l'organisme ait réussi à restaurer les altérations précédemment mises en évidence. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure que l'exposition maternelle à cette dose n'induit aucun effet néfaste sur la descendance car il n'est pas exclu que les modifications précoces observées juste après le sevrage puissent entraîner l'apparition d'autres effets sur du plus long terme.

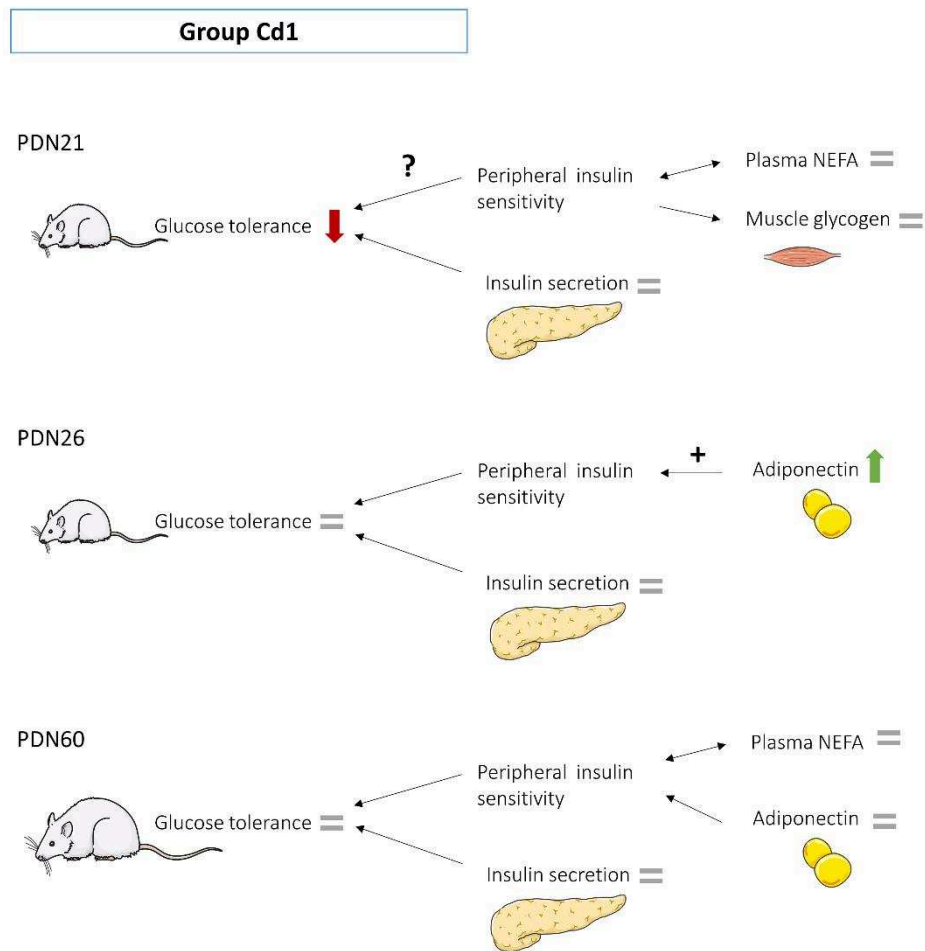


Figure 12: Représentation schématique des effets observés sur le groupe Cd1, aux différents âges, après l'exposition maternelle au Cd. Les flèches colorées représentent les effets mesurés. Les signes « égal » représentent les paramètres mesurés non modifiés.

Le groupe Cd2 est défini par les ratons dont les mères ont des concentrations de Cd dans le rein allant de 300 et 1500 ng Cd.g⁻¹. A 21 jours, comme pour le groupe Cd1, ces ratons présentent une diminution de la tolérance au glucose suggérant une diminution de la sensibilité à l'insuline (récapitulatif des effets pour ce groupe figure 14). Cependant, à la différence du groupe Cd1, ces ratons présentent également une augmentation d'environ 20% de la concentration d'acides gras libres dans le plasma. Cela pourrait provenir d'une résistance à l'insuline du tissu adipeux ou d'une moindre oxydation des lipides dans le foie. A 26 jours, la tolérance au glucose n'est plus visiblement altérée et comme pour les ratons Cd1, la sécrétion d'adiponectine est augmentée probablement pour augmenter la sensibilité des tissus périphériques. En parallèle de cette restauration de la sensibilité à l'insuline, nous avons observé une diminution de la sécrétion d'insuline, mise en évidence par une diminution de 30% du peptide C plasmatique, chez les ratons du groupe Cd2. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : (1) l'organisme pourrait s'adapter à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline induite par la sécrétion d'adiponectine ; (2) l'exposition maternelle au Cd pourrait avoir un impact direct sur les mécanismes de la sécrétion d'insuline ou (3) un impact sur la quantité de cellules β dans le pancréas qui, dans le cas où elle serait diminuée, pourrait entraîner la diminution de la production d'insuline. Concernant les deux derniers points, sachant que pendant le sevrage, le pancréas subit des modifications pour devenir progressivement mature, il est particulièrement vulnérable aux stimuli extérieurs. De plus, il a déjà été décrit que le Cd impacte le pancréas en diminuant la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Ithakissios et al. 1975; Merali and Singhal 1980) ainsi qu'en induisant une dégénérescence des îlots et une diminution du contenu en insuline (Demir et al. 2006; Kurata et al. 2003). A 60 jours, l'élévation de l'adiponectine ainsi que la diminution de la sécrétion d'insuline ne sont plus observées. Ces effets étaient donc soit transitoires ce qui semble être le cas pour l'adiponectine, soit supplantés par d'autres effets. En effet, à 60 jours, bien que la tolérance au glucose ne soit pas visiblement altérée, le niveau de peptide C à jeun est significativement élevé chez les ratons Cd2. Ceci atteste de l'installation de la résistance à l'insuline qui était apparue à 21 jours et de la compensation par une sécrétion d'insuline accrue. Par ailleurs, la concentration d'acide gras plasmatiques est, tout comme à 21 jours, plus élevée pour les ratons Cd2. Une élévation des acides gras, ainsi qu'une dyslipidémie a déjà été décrite après l'exposition orale de rat et de souris à des doses élevées de Cd (0.4 to 5 mg.kg⁻¹.j⁻¹) (Prabu et al. 2010; Rogalska et al. 2009; Samarghandian et al. 2015; Zhang et al. 2015). Cet effet

pourrait provenir de l'inhibition de l'oxydation des acides gras dans le foie et les muscles due à l'exposition au Cd (Murugavel and Pari 2007; Prabu et al. 2010; Wu et al. 2017 ; Rogalska et al. 2009; Samarghandian et al. 2015) ou de la perte de sensibilité à l'insuline du tissu adipeux entraînant une augmentation de la lipolyse. En effet, une diminution de la densité de récepteurs à l'insuline dans le tissu adipeux a été montrée chez des rats adultes exposés par voie orale à une dose modérée de Cd (9.7mg.L^{-1}) (Ficková et al. 2003). L'augmentation des acides gras dans le sang est aussi un facteur contribuant à la résistance à l'insuline notamment dans le foie (Petersen et al. 2017; Samuel and Shulman 2016; Titchenell et al. 2017). Ainsi, dans notre étude, il est difficile de statuer sur le lien de cause ou conséquence de cette augmentation des acides gras sur le développement de la résistance à l'insuline. Pour conclure sur le groupe Cd2, nous avons montré qu'à ce niveau d'exposition des mères, les effets apparaissant au moment du sevrage, persistent jusqu'à 2 mois et tendent à s'aggraver puisque le pancréas se met à sécréter plus d'insuline. Dans ce groupe, l'exposition maternelle entraîne des concentrations plus grandes de Cd dans les organes que pour le groupe Cd1, et qui restent significativement plus élevées d'environ 2 fois dans le foie et 3.7 fois dans le rein, comparées au groupe contrôle, à 60 jours. Cela pourrait expliquer qu'à cette exposition, les effets persistent quand les ratons grandissent.

A plus long terme, pour les ratons Cd2, la sécrétion d'insuline accrue pourrait entraîner un épuisement du pancréas. De plus, l'hyperinsulinémie est connue pour alimenter la résistance à l'insuline périphérique et imposer un stress métabolique sur les cellules β (Shanik et al. 2008). Par ailleurs, une exposition chronique à des niveaux élevés d'acides gras libres contribue à la résistance à l'insuline, à l'altération de la fonction des cellules β et à l'apparition d'une inflammation chronique (Girard 2003; Grundy 2015; Pansuria et al. 2012; Shulman 2000). Ces différents aspects pourraient à terme contribuer au développement d'un diabète de type II.

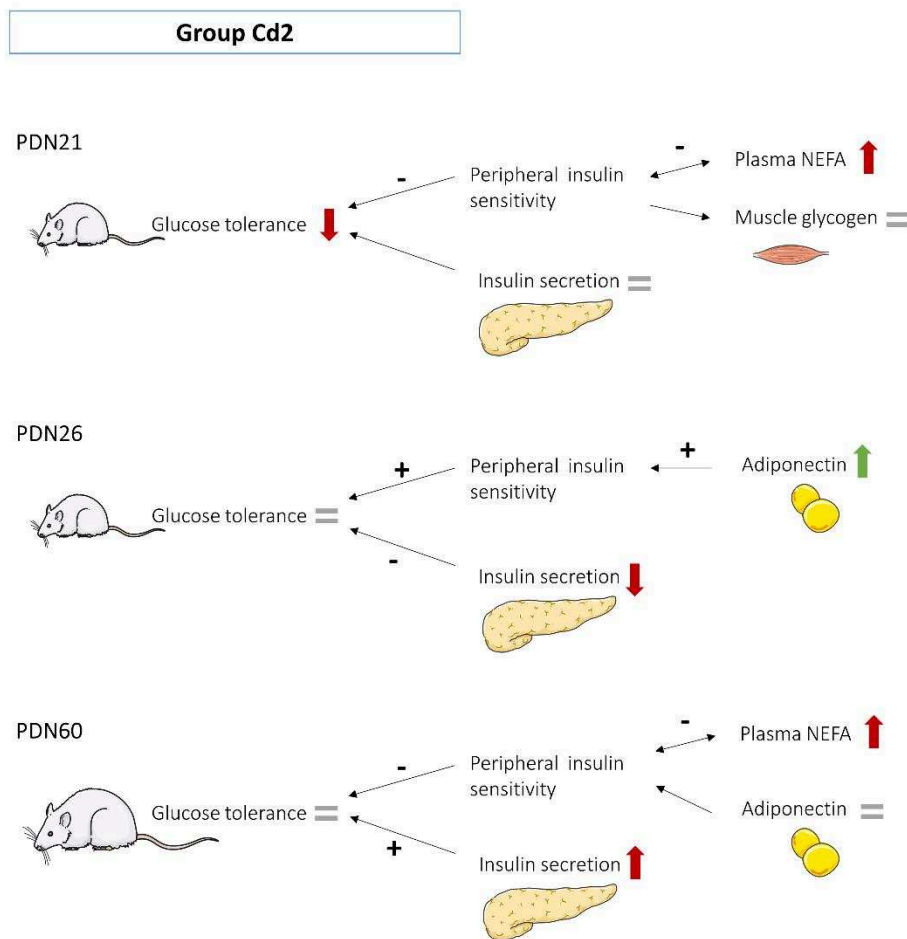


Figure 13: Représentation schématique des effets observés sur le groupe Cd2, aux différents âges, après l'exposition maternelle au Cd. Les flèches colorées représentent les effets mesurés. Les signes « égal » représentent les paramètres mesurés non modifiés.

Les effets sur le métabolisme des rats observés dans cette étude résultent de l'exposition des mères. Cependant, les mécanismes associés pourraient impliquer différents aspects :

- Les effets pourraient provenir de l'impact direct du Cd auquel est exposé le raton, c'est à dire le Cd qui a été transféré de la mère et est entré dans l'organisme du raton. En effet, il a déjà été montré (et mentionné tout au long de ce manuscrit) qu'une exposition directe au Cd entraîne des effets diabétogènes sur des rongeurs. Dans ce cas-là, la concentration en Cd retrouvée chez les rats serait associable aux effets observés.

- Les effets pourraient résulter d'une modification de la composition du lait que consomment les ratons. En effet, il a été montré dans plusieurs études que le régime alimentaire de la mère ainsi que la composition du lait qui en découle, influent sur le métabolisme de la descendance (Hue-Beauvais et al. 2017; Lee and Kelleher 2016; Pomar et al. 2017). De plus, le fonctionnement des glandes mammaires ainsi que la composition du lait peuvent être impactés par l'exposition à des polluants (Lee and Kelleher 2016). Dans le cas du Cd, les résultats sont contradictoires. Dans une étude sur des souris recevant des injections sous-cutanées de 5, 100 et 2000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pendant 8 jours, durant la lactation, des changements morphologiques des glandes mammaires ainsi qu'une réduction de la β caséine dans le lait ont été observés (Ohrvik et al. 2006). Le lait de rates exposées par l'eau de boisson contenant 25 ppm de Cd, présente une légère diminution des acides gras à chaînes moyennes (Grawé et al. 2004). Cependant, aucun effet n'a été observé sur la morphologies des glandes mammaires ni sur la composition du lait dans une étude sur des rates exposées par voie intraveineuse à 8,8, 62 et 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pendant 13 jours (Petersson Grawé and Oskarsson 2000b). Dans ces trois études, le poids de la descendance n'était pas impacté. De la même façon, dans notre étude, le fait que les ratons ne présentent pas de différence de poids au sevrage suggère que l'apport calorique par le lait était le même. Cependant, cela n'exclut pas d'autres effets dus à des modifications de la composition du lait. Dans nos études, du fait de la quantité de lait qu'il était possible de prélever, nous n'avons pas pu explorer cette piste plus en détail.
- Enfin une autre possibilité que nous n'avons pas explorée dans cette étude est que les effets observés pourraient venir de mécanismes indirects comme des modifications épigénétiques ayant lieu pendant la gestation et la lactation. En effet, des données disponibles suggèrent qu'une exposition prénatale à des doses faibles ou fortes de Cd est associée à des modifications épigénétiques pouvant représenter un mécanisme de toxicité (Vilahur et al. 2015). Par exemple, l'implication d'altérations épigénétiques a été suggérée pour expliquer le lien entre une exposition au Cd dès le plus jeune âge et l'obésité (Park et al. 2017). Ces modifications pourraient impacter directement le fœtus ou le placenta. En effet, des modifications épigénétiques ont été observées au niveau du placenta, entraînant par exemple, la diminution de l'expression du transporteur

GLUT3 (Xu et al. 2016). Ces données sont prometteuses, mais nécessitent d'être confirmées et approfondies, notamment avec des expositions faibles.

Il est aussi tout à fait envisageable que les mécanismes associés aux effets observés soient une résultante de ces trois aspects combinés. Pour l'instant et avec les données disponibles, nous ne sommes pas en mesure de tirer des conclusions sur ce point.

4. Limites de l'évaluation actuelle des risques dues aux expositions aux polluants et intérêt de nos travaux.

Avec ces travaux de thèse, nous avons identifié plusieurs points qui paraissent primordiaux lorsque l'on étudie l'impact de polluants à l'aide de modèles pertinents par rapport à l'exposition environnementale réelle. Or, de manière générale, ces aspects sont relativement délaissés dans les discussions des publications pour se focaliser sur les résultats obtenus. Pourtant, il nous paraît crucial de bien caractériser et justifier le modèle ainsi que de comparer les résultats présents dans la littérature en prenant en compte les différences de modèles en termes de voie d'administration, de durée, de dose mais surtout de concentrations en polluant dans les organes cibles, résultantes de cette exposition.

Actuellement, et malgré les efforts conséquents fournis ces dernières années (Ba et al. 2017; Ibrahim et al. 2011b; Labaronne et al. 2017; Naville et al. 2013; Ounnas et al. 2016), les effets de faibles doses de polluants restent assez peu caractérisés. De ce fait, ces effets ne sont pas pris en compte lors de l'évaluation des risques associés et de la détermination des recommandations et des doses admissibles. Dans le cas du Cd, la dose hebdomadaire tolérable a été déterminée à partir des doses de Cd susceptibles d'induire des dommages rénaux. Or, nous montrons dans nos travaux que des effets sur des voies plus sensibles se déclarent avant la toxicité rénale.

La question du sexe est relativement délaissée dans les études épidémiologiques et de toxicologie et de ce fait est très peu considérée dans les évaluations des risques. Pourtant, une influence du sexe est attendue à de nombreux niveaux d'intérêt pour la toxicologie comme les caractéristiques d'exposition (différences de comportement et aspects socio-économiques), la

toxicocinétique (absorption, transport, métabolisme et excrétion), réponses des organes cibles, expression génique, ... (Vahter et al. 2007). De plus, concernant les expositions aux métaux, des données expérimentales et épidémiologiques attestent de l'existence de différence de distribution et de toxicité entre les deux sexes (Vahter et al. 2007). Il est donc nécessaire de prendre en compte le sexe dans tous les aspects de la toxicologie, ainsi que dans la démarche statistique (comme décrit plus haut), afin de pouvoir conforter ou clarifier les observations disponibles et surtout d'alimenter les données pour l'évaluation des risques.

Enfin, nous avons montré des effets de l'exposition maternelle au Cd sur le métabolisme de la descendance, un sujet sur lequel très peu de données sont disponibles pour l'instant. Nos travaux sont donc d'intérêt pour la prise de conscience que les effets transgénérationnels doivent être pris en compte dans l'évaluation des risques.

5. Perspectives

A la vue des résultats présentés dans ces travaux, plusieurs perspectives sont envisageables :

a. Perspectives mécanistiques.

Dans le but d'expliquer les effets observés dans nos deux études, des perspectives aux niveaux cellulaires et protéiques sont envisageables. Pour les rates adultes de la première étude, nous pourrions étudier la voie de signalisation de l'insuline dans les muscles, le gras et le foie en mesurant les expressions des protéines impliquées comme AKT PI3K ou GLUT4. Chez les femmes adultes, nous avons émis l'hypothèse que l'extraction de l'insuline par le foie pourrait être impactée. Le dosage de la protéine CAECAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) qui favorise l'extraction de l'insuline de la circulation sanguine par le foie, permettrait de vérifier si la clairance hépatique de l'insuline est effectivement altérée chez ces rates (Al-Share et al. 2015). Concernant la deuxième étude, il serait intéressant d'évaluer le contenu en insuline et la masse de cellules β du pancréas chez les rats de 26 jours afin de voir si l'exposition au Cd impacte le développement du pancréas pendant le sevrage. A 60 jours, les voies de signalisation de l'insuline dans le gras et le foie pourraient être étudiées.

L'évaluation de la lipolyse du gras (par exemple, dosage du glycérol, expression de FAS (*fatty acid synthase*)) et l'oxydation des acides gras dans le foie (expression des ARNm des enzymes impliquées par exemple acetyl-CoA carboxylase) pourraient permettre de comprendre l'origine de l'augmentation des acides gras dans le sang. Le possible impact de cette augmentation sur la sensibilité à l'insuline du foie serait intéressant à étudier, notamment les enzymes de la néoglucogenèse et de la lipogenèse hépatique, puisqu'il a été montré un lien entre la résistance à l'insuline du tissu adipeux et l'altération du métabolisme hépatique (Petersen et al. 2017; Samuel and Shulman 2016; Titchenell et al. 2017).

b. Etude de l'impact de l'exposition au Cd sur une plus longue durée des rats adultes et des ratons.

Les effets observés à faibles doses et sur des durées intermédiaires pourraient évoluer au cours d'exposition plus longue. Certaines études montrent que l'organisme semble capable de s'adapter dans une certaine mesure, possiblement grâce à l'adaptation de la défense antioxydante (Ogheneovo Asagba 2010). Dans d'autres travaux, les effets diabétogènes sont exacerbés lorsque l'exposition persiste (Treviño et al. 2015). Il serait particulièrement intéressant d'étudier le devenir des ratons du groupe Cd1 de l'étude 2, qui ne présentent plus d'altération visible à 60 jours mais pourrait développer des complications à plus long terme des effets. Bien entendu, l'évolution des effets vu à 60 jours dans le groupe Cd2 serait à étudier également.

c. Etude de la prolongation de l'exposition après le sevrage des ratons issus de mères exposées au Cd.

Le but de notre seconde étude était de déterminer l'impact de l'exposition maternelle pendant la gestation et la lactation sur le métabolisme de la descendance. Or dans la réalité, les enfants continuent d'être exposés après l'arrêt de l'allaitement, via la nourriture et l'environnement. Ainsi, l'étape suivante logique sur ce sujet de recherche serait de poursuivre l'exposition des ratons pendant leur croissance afin d'étudier les effets résultants d'une exposition continue dès le plus jeune âge.

d. Etudes de l'exposition au Cd dans différentes conditions (régimes à risques ou mélange de polluants)

A la suite de nos études, il serait intéressant d'étudier si le Cd potentialise l'apparition des effets diabétogènes chez une population encline au développement de troubles métaboliques. Pour cela, il serait possible de nourrir des rats avec des régimes alimentaires à risques, tout en les exposant au Cd dans un modèle similaire au notre. En effet, les régimes gras peuvent exacerber les effets d'un polluant par rapport à un régime normal, comme cela a déjà été montré chez des souris exposées à des polluants organiques persistants et nourries avec un régime riche en gras (Ibrahim et al. 2011b; Naville et al. 2015). Cependant dans certaines conditions (matrice alimentaire, âge), l'effet inverse peut être observé : l'exposition aux polluants semble améliorer la tolérance au glucose des rats nourris avec un régime riche en graisses (Ibrahim et al. 2012; Naville et al. 2015). Pour poursuivre nos études, nous pourrions donner le régime gras aux adultes dans un modèle d'exposition au Cd similaire à l'étude 1, donner le régime gras aux femelles de l'étude 2 pendant la gestation et/ou la lactation, ou encore donner le régime gras aux ratons après le sevrage. Un suivi des effets diabétogènes pourrait être réalisé à plusieurs temps (avec des tests sur animaux vigiles et des prélèvements sanguins) afin de pouvoir comparer la cinétique d'apparition des effets entre les groupes et de détecter un éventuel effet biphasique, comme cela a déjà été observé (Naville et al. 2015). A notre connaissance, ce type d'expérience n'a jamais été réalisé sur des rats exposés au Cd.

Le Cd n'est évidemment pas le seul polluant auquel la population générale est exposée. Dans la même matrice alimentaire, il peut se trouver divers autres polluants qui seront ingérés en même temps que le Cd. Ainsi, la thématique de l'exposition à des mélanges de polluants se développe depuis quelques années, permettant l'évaluation d'une exposition plus proche de la réalité avec la prise en compte des potentiels effets synergiques (Ibrahim et al. 2011b, 2012; Labaronne et al. 2017; Naville et al. 2015; Ounnas et al. 2016; Rizzati et al. 2016; Ruzzin et al. 2010). Quelques études récentes se sont intéressées aux potentielles interactions et effets synergiques que l'exposition à un mélange de polluants comprenant le Cd pourrait induire (Camsari et al. 2017; He et al. 2015; Ollson et al. 2017; Pillai et al. 2010; Venter et al. 2017). Cependant, dans le cas du Cd ce domaine reste largement inexploré, se focalise surtout sur les mélanges avec d'autres métaux et nécessite d'être approfondi notamment avec des modèles réalistes et pertinents où les effets du Cd seul et, du ou des polluants associés sont déjà connus.

e. Solutions pour limiter les effets toxiques du Cd.

Ces dernières années, plusieurs articles proposent l'utilisation de molécules généralement d'origine naturelle (jus de raisin, curcumine, extrait de myrtille ou de fraise,...) qui agissent comme antioxydant ou chélateur, pour atténuer les effets toxiques du Cd (Elmallah et al. 2017; Gong et al. 2014; Lamas et al. 2015; Nna et al. 2017; Ramakrishnan et al. 2017). La plupart de ces études (citées ci-dessus) se focalisent sur le stress oxydant induit par le Cd, notamment au niveau testiculaire. De fortes doses de Cd sont utilisées, ainsi que des modèles peu réalistes, afin d'observer un stress oxydant marqué. Il existe donc un manque, dans la littérature, d'études sur ce sujet avec des doses faibles et des effets du Cd plus réalistes.

D'autres pistes sont abordées comme la supplémentation en éléments essentiels (comme le calcium) pour réduire l'absorption et la rétention du Cd (Sarić et al. 2002), ou la synthèse de molécule chimique permettant l'extraction du Cd stocké dans le rein en utilisant les propriétés physiologiques de cet organe (Tang et al. 2016). De nombreuses possibilités restent donc encore à explorer dans ce domaine en particulier sur l'impact métabolique.

Récemment notre équipe a déposé un brevet concernant les propriétés bénéfiques de l'aleurone de blé qui prévient des altérations induites pas des polluants comme les PCB. Il serait donc intéressant de tester la supplémentation en aleurone de blé sur des animaux exposés au Cd.

REFERENCES

- Abdul-Wahed A, Guilmeau S, Postic C. 2017. Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metab.* 26:324–341; doi:10.1016/j.cmet.2017.07.004.
- Adinolfi M. 1985. The Development of the Human Blood-Csf-Brain Barrier. *Dev. Med. Child Neurol.* 27:532–537; doi:10.1111/j.1469-8749.1985.tb04581.x.
- Afridi HI, Kazi TG, Brabazon D, Naher S, Talpur FN. 2013. Comparative metal distribution in scalp hair of Pakistani and Irish referents and diabetes mellitus patients. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 415:207–214; doi:10.1016/j.cca.2012.10.029.
- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1:e35; doi:10.1371/journal.pone.0000035.
- Ahn B, Kim S-H, Park M-J. 2017. Blood cadmium concentrations in Korean adolescents: From the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010-2013. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220:37–42; doi:10.1016/j.ijheh.2016.10.003.
- Akesson A, Berglund M, Schütz A, Bjellerup P, Bremme K, Vahter M. 2002. Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *Am. J. Public Health* 92: 284–287.
- Akinloye O, Ogunleye K, Oguntibeju OO. 2010. Cadmium, lead, arsenic and selenium levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 5189–5195.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ. Health Perspect.* 114: 106–112.
- Al-Share QY, DeAngelis AM, Lester SG, Bowman TA, Ramakrishnan SK, Abdallah SL, et al. 2015. Forced Hepatic Overexpression of CEACAM1 Curtails Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* 64:2780–2790; doi:10.2337/db14-1772.
- Andersen HR, Andersen O. 1988. Effect of Cadmium Chloride on Hepatic Lipid Peroxidation in Mice. *Pharmacol. Toxicol.* 63:173–177; doi:10.1111/j.1600-0773.1988.tb00934.x.
- Andersen O, Nielsen JB, Svendsen P. 1988. Oral cadmium chloride intoxication in mice: effects of dose on tissue damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology* 48: 225–236.
- Arbuckle TE, Liang CL, Morisset A-S, Fisher M, Weiler H, Cirtiu CM, et al. 2016. Maternal and fetal exposure to cadmium, lead, manganese and mercury: The MIREC study. *Chemosphere* 163:270–282; doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.023.
- Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167–178; doi:10.1210/endo.130.1.1370150.
- ATSDR. 2012. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

- Ba Q, Li M, Chen P, Huang C, Duan X, Lu L, et al. 2017. Gender-Dependent Effects of Cadmium Exposure in Early Life on Gut Microbiota and Fat Accumulation in Mice. *Environ. Health Perspect.*; doi:10.1289/EHP360.
- Baker TK, VanVooren HB, Smith WC, Carfagna MA. 2003. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 137:185–192; doi:10.1016/S0378-4274(02)00402-2.
- Balsan GA, Vieira JL da C, Oliveira AM de, Portal VL. 2015. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev. Assoc. Medica Bras.* 1992 61:72–80; doi:10.1590/1806-9282.61.01.072.
- Balti EV, Echouffo-Tcheugui JB, Yako YY, Kengne AP. 2014. Air pollution and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 106:161–172; doi:10.1016/j.diabres.2014.08.010.
- Bannon DI, Abounader R, Lees PSJ, Bressler JP. 2003. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *AJP Cell Physiol.* 284:C44–C50; doi:10.1152/ajpcell.00184.2002.
- Barker DJP. 1998. *Mothers, babies and health in later life*. 2nd ed. Edinburgh : Churchill Livingstone.
- Barker DJP, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int. J. Epidemiol.* 31:1235–1239; doi:10.1093/ije/31.6.1235.
- Barregard L, Bergström G, Fagerberg B. 2013. Cadmium exposure in relation to insulin production, insulin sensitivity and type 2 diabetes: a cross-sectional and prospective study in women. *Environ. Res.* 121:104–109; doi:10.1016/j.envres.2012.11.005.
- Barwick M, Maher W. 2003. Biotransference and biomagnification of selenium copper, cadmium, zinc, arsenic and lead in a temperate seagrass ecosystem from Lake Macquarie Estuary, NSW, Australia. *Mar. Environ. Res.* 56:471–502; doi:10.1016/S0141-1136(03)00028-X.
- Batárióvá A, Spěváčková V, Beneš B, Čejchanová M, Šmíd J, Černá M. 2006. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209:359–366; doi:10.1016/j.ijheh.2006.02.005.
- Batista TM, Alonso-Magdalena P, Vieira E, Amaral MEC, Cederroth CR, Nef S, et al. 2012. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS One* 7:e33814; doi:10.1371/journal.pone.0033814.
- Bekheet SHM. 2011. Comparative effects of repeated administration of cadmium chloride during pregnancy and lactation and selenium protection against cadmium toxicity on some organs in immature rats' offsprings. *Biol. Trace Elem. Res.* 144:1008–1023; doi:10.1007/s12011-011-9084-z.

- Bell RR, Early JL, Nonavinakere VK, Mallory Z. 1990. Effect of cadmium on blood glucose level in the rat. *Toxicol. Lett.* 54: 199–205.
- Bell RR, Nonavinakere VK, Soliman MR, Early JL. 1991. Effect of in vitro treatment of rat hepatocytes with selenium, and/or cadmium on cell viability, glucose output, and cellular glutathione. *Toxicology* 69: 111–119.
- Benitez MA, Méndez Armenta M, Montes S, Rembao D, Sanin LH, Rios C. 2009. Mother-fetus transference of lead and cadmium in rats, involvement of metallothionein.
- Berglund M, Akesson A, Nermell B, Vahter M. 1994. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environ. Health Perspect.* 102: 1058.
- Berglund M, Lindberg A-L, Rahman M, Yunus M, Grandér M, Lönnerdal B, et al. 2011. Gender and age differences in mixed metal exposure and urinary excretion. *Environ. Res.* 111:1271–1279; doi:10.1016/j.envres.2011.09.002.
- Bernard A. 2004. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals* 17: 519–523.
- Beyer WN. 1986. A reexamination of biomagnification of metals in terrestrial food chains. *Environ. Toxicol. Chem.* 5:863–864; doi:10.1002/etc.5620051001.
- Bhattacharyya MH, Whelton BD, Peterson DP. 1981. Gastrointestinal absorption of cadmium in mice during gestation and lactation I. Short-term exposure studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61: 335–342.
- Bjeremo H, Sand S, Nälsén C, Lundh T, Enghardt Barbieri H, Pearson M, et al. 2013. Lead, mercury, and cadmium in blood and their relation to diet among Swedish adults. *Food Chem. Toxicol.* 57:161–169; doi:10.1016/j.fct.2013.03.024.
- Björntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U. 1978. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J. Lipid Res.* 19: 316–324.
- Blazka ME, Nolan CV, Shaikh ZA. 1988. Developmental and sex differences in cadmium distribution and metallothionein induction and localization. *J. Appl. Toxicol. JAT* 8: 217–222.
- Blazka ME, Shaikh ZA. 1991. Sex differences in hepatic and renal cadmium accumulation and metallothionein induction. Role of estradiol. *Biochem. Pharmacol.* 41: 775–780.
- Borné Y, Fagerberg B, Persson M, Sallsten G, Forsgard N, Hedblad B, et al. 2014. Cadmium exposure and incidence of diabetes mellitus - results from the malmö diet and cancer study. *PloS One* 9:e112277; doi:10.1371/journal.pone.0112277.
- Boughammoura S, Chemek M, Mimouna SB, Banni M, Messaoudi I. 2017. Involvement of Zn Depletion in Cd-Induced Toxicity on Prenatal Bone Formation in Rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 1–11; doi:10.1007/s12011-017-0981-7.

- Bridges CC, Zalups RK. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204:274; doi:10.1016/j.taap.2004.09.007.
- Brook RD, Xu X, Bard RL, Dvonch JT, Morishita M, Kaciroti N, et al. 2013. Reduced metabolic insulin sensitivity following sub-acute exposures to low levels of ambient fine particulate matter air pollution. *Sci. Total Environ.* 448:66–71; doi:10.1016/j.scitotenv.2012.07.034.
- Bunio A, Szygula R, Tubek S, Krasowski G. 2010. The content of elements in rainwater and its relation to the frequency of hospitalization for diabetes and obesity in Opole Voivodship, Poland, during 2000–2002. *Biol. Trace Elem. Res.* 136:149–156; doi:10.1007/s12011-009-8531-6.
- Camsari C, Folger JK, McGee D, Bursian SJ, Wang H, Knott JG, et al. 2017. Effects of Periconception Cadmium and Mercury Co-Administration to Mice on Indices of Chronic Diseases in Male Offspring at Maturity. *Environ. Health Perspect.* 125:643–650; doi:10.1289/EHP481.
- Cannon VT, Barfuss DW, Zalups RK. 2000. Molecular homology and the luminal transport of Hg²⁺ in the renal proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 11: 394–402.
- Cariou B, Postic C, Boudou P, Burcelin R, Kahn CR, Girard J, et al. 2004. Cellular and molecular mechanisms of adipose tissue plasticity in muscle insulin receptor knockout mice. *Endocrinology* 145:1926–1932; doi:10.1210/en.2003-0882.
- Carter JD, Dula SB, Corbin KL, Wu R, Nunemaker CS. 2009. A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment. *Biol. Proced. Online* 11:3–31; doi:10.1007/s12575-009-9021-0.
- Chang K-C, Hsu C-C, Liu S-H, Su C-C, Yen C-C, Lee M-J, et al. 2013. Cadmium induces apoptosis in pancreatic β -cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *PloS One* 8:e54374; doi:10.1371/journal.pone.0054374.
- Chapatwala KD, Hobson M, Desai D, Rajanna B. 1982. Effect of cadmium on hepatic and renal gluconeogenic enzymes in female rats. *Toxicol. Lett.* 12: 27–34.
- Chapatwala KD, Rajanna B, Desai D. 1980. Cadmium induced changes in gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver. *Drug Chem. Toxicol.* 3:407–420; doi:10.3109/01480548009030129.
- Charles M-A, Delpierre C, Br?ant B. 2016. Le concept des origines développementales de la santé: évolution sur trois décennies. *m?decine/sciences* 32:15–20; doi:10.1051/medsci/20163201004.
- Chaumont A, Voisin C, Deumer G, Haufroid V, Annesi-Maesano I, Roels H, et al. 2013. Associations of Urinary Cadmium with Age and Urinary Proteins: Further Evidence of Physiological Variations Unrelated to Metal Accumulation and Toxicity. *Environ. Health Perspect.* 121:1047; doi:10.1289/ehp.1306607.

- Chemek M, Mimouna SB, Boughammoura S, Delbès G, Messaoudi I. 2016. Protective role of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. *Reprod. Toxicol.* 63:151–160; doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.005.
- Chen L, Lei L, Jin T, Nordberg M, Nordberg GF. 2006. Plasma metallothionein antibody, urinary cadmium, and renal dysfunction in a Chinese type 2 diabetic population. *Diabetes Care* 29:2682–2687; doi:10.2337/dc06-1003.
- Cherian MG. 1979. Metabolism of orally administered cadmium-metallothionein in mice. *Environ. Health Perspect.* 28: 127.
- Cherian MG, Goyer RA, Valberg LS. 1978. Gastrointestinal absorption and organ distribution of oral cadmium chloride and cadmium-metallothionein in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 4:861–868; doi:10.1080/15287397809529707.
- Chiang J. 2014. Liver Physiology: Metabolism and Detoxification. In *Pathobiology of Human Disease*, pp. 1770–1782, Elsevier.
- Choe S-Y, Kim S-J, Kim H-G, Lee JH, Choi Y, Lee H, et al. 2003. Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci. Total Environ.* 312:15–21; doi:10.1016/S0048-9697(03)00190-6.
- Choi K, Kim Y-B. 2010. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J. Intern. Med.* 25:119–129; doi:10.3904/kjim.2010.25.2.119.
- Chung J, Nartey NO, Cherian MG. 1986. Metallothionein levels in liver and kidney of Canadians -a potential indicator of environmental exposure to cadmium. *Arch. Environ. Health* 41:319–323; doi:10.1080/00039896.1986.9936704.
- Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot J-M, Montano S, Mithieux G. 2001. Rat Small Intestine Is an Insulin-Sensitive Gluconeogenic Organ. *Diabetes* 50:740–746; doi:10.2337/diabetes.50.4.740.
- DeBenedictis B, Guan H, Yang K. 2016. Prenatal Exposure to Bisphenol A Disrupts Mouse Fetal Liver Maturation in a Sex-Specific Manner. *J. Cell. Biochem.* 117:344–350; doi:10.1002/jcb.25276.
- DeFronzo RA, Tripathy D. 2009. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 32:S157; doi:10.2337/dc09-S302.
- DeFronzo RA, Davidson JA, Del Prato S. 2012. The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes Obes. Metab.* 14:5–14; doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01511.x.
- Demir H, Kanter M, Coskun O, Uz YH, Koc A, Yildiz A. 2006. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on heart rate, some hematological values, and pancreatic beta-cell damage in cadmium-treated rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 110:151–162; doi:10.1385/BTER:110:2:151.

- Dorian C, Gattone VH, Klaassen CD. 1992. Accumulation and degradation of the protein moiety of cadmium-metallothionein (CdMT) in the mouse kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117: 242–248.
- Dunford AR, Sangster JM. 2017. Maternal and paternal periconceptional nutrition as an indicator of offspring metabolic syndrome risk in later life through epigenetic imprinting: A systematic review. *Diabetes Metab. Syndr.*; doi:10.1016/j.dsx.2017.04.021.
- Dyck DJ, Heigenhauser GJF, Bruce CR. 2006. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 186:5–16; doi:10.1111/j.1748-1716.2005.01502.x.
- Edwards JR, Prozialeck WC. 2009. Cadmium, Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:289–293; doi:10.1016/j.taap.2009.03.007.
- EFSA. 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10:n/a-n/a; doi:10.2903/j.efsa.2012.2551.
- EFSA. 2009. Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 7:n/a-n/a; doi:10.2903/j.efsa.2009.980.
- El Muayed M, Raja MR, Zhang X, MacRenaris KW, Bhatt S, Chen X, et al. 2012. Accumulation of cadmium in insulin-producing β cells. *Islets* 4:405–416; doi:10.4161/isl.23101.
- Elinder CG, Kjellstöm T, Lind B, Molander ML, Silander T. 1978. Cadmium concentrations in human liver, blood, and bile: comparison with a metabolic model. *Environ. Res.* 17: 236–241.
- Elinder C-G, Pannone M. 1979. Biliary excretion of cadmium. *Environ. Health Perspect.* 28: 123.
- Elisma F, Jumarie C. 2001. Evidence for Cadmium Uptake through Nramp2: Metal Speciation Studies with Caco-2 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285:662–668; doi:10.1006/bbrc.2001.5245.
- Elmallah MIY, Elkhadragey MF, Al-Olayan EM, Abdel Moneim AE. 2017. Protective Effect of *Fragaria ananassa* Crude Extract on Cadmium-Induced Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes Suppression, and Apoptosis in Rat Testes. *Int. J. Mol. Sci.* 18; doi:10.3390/ijms18050957.
- Enan E, Overstreet JW, Matsumura F, VandeVoort CA, Lasley BL. 1996. Gender differences in the mechanism of dioxin toxicity in rodents and in nonhuman primates. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 10: 401–411.
- Engström B, Nordberg GF. 1979. Dose dependence of gastrointestinal absorption and biological half-time of cadmium in mice. *Toxicology* 13: 215–222.
- Ettinger AS, Bovet P, Plange-Rhule J, Forrester TE, Lambert EV, Lupoli N, et al. 2014. Distribution of metals exposure and associations with cardiometabolic risk factors in the “Modeling

- the Epidemiologic Transition Study.” *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 13:90; doi:10.1186/1476-069X-13-90.
- Felley-Bosco E, Diezi J. 1992. Dietary calcium restriction enhances cadmium-induced metallothionein synthesis in rats. *Toxicol. Lett.* 60: 139–144.
- Ferre P, Decaux J-F, Issad T, Girard J. 1986. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod. Nutr. Dév.* 26: 619–631.
- Ficková M, Eybl V, Kotyzová D, Micková V, Möstbök S, Brtko J. 2003. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 16: 561–566.
- Filippini T, Michalke B, Malagoli C, Grill P, Bottecchi I, Malavolti M, et al. 2016. Determinants of serum cadmium levels in a Northern Italy community: A cross-sectional study. *Environ. Res.* 150:219–226; doi:10.1016/j.envres.2016.06.002.
- Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian G, Chamberlain MJ, Valberg LS. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74: 841–846.
- Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, et al. 2015. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic. Biol. Med.* 78:233–235; doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504.
- Fréry N, Girard F, Moreau T, Blot P, Sahuquillo J, Hajem S, et al. 1993. Validity of hair cadmium in detecting chronic cadmium exposure in general populations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 736–743.
- Friedman PA, Gesek FA. 1994. Cadmium uptake by kidney distal convoluted tubule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128:257–263; doi:10.1006/taap.1994.1205.
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D. 2013. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 9: 25–53.
- Fujita Y, el Belbasi HI, Min KS, Onosaka S, Okada Y, Matsumoto Y, et al. 1993. Fate of cadmium bound to phytochelatin in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82: 357–365.
- Gallagher CM, Chen JJ, Kovach JS. 2011. The relationship between body iron stores and blood and urine cadmium concentrations in US never-smoking, non-pregnant women aged 20–49 years. *Environ. Res.* 111:702–707; doi:10.1016/j.envres.2011.03.007.
- Gauthier M-S, Rabasa-Lhoret R, Prud’homme D, Karelis AD, Geng D, van Bavel B, et al. 2014. The metabolically healthy but obese phenotype is associated with lower plasma levels of persistent organic pollutants as compared to the metabolically abnormal obese phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99:E1061-1066; doi:10.1210/jc.2013-3935.

- Gerich JE. 2010. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 27:136–142; doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x.
- Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. 2005. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol. Scand.* 183:13–30; doi:10.1111/j.1365-201X.2004.01385.x.
- Girard J. 2003. Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline : mécanismes de la lipotoxicité. *médecine/sciences* 19:827–833; doi:10.1051/medsci/20031989827.
- Girard J, Issad T, Maury J, Foufelle F, Postic C, Leturque A, et al. 1993. Influence of the weaning diet on the changes of glucose metabolism and of insulin sensitivity. *Proc. Nutr. Soc.* 52:325–333; doi:10.1079/PNS19930068.
- Goering PL, Klaassen CD. 1984. Resistance to cadmium-induced hepatotoxicity in immature rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 321–329.
- Gong P, Chen F, Wang L, Wang J, Jin S, Ma Y. 2014. Protective effects of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) extract against cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37:1015–1027; doi:10.1016/j.etap.2014.03.017.
- Gonzalez-Reimers E, Martín-González C, Galindo-Martín L, Aleman-Valls MR, Velasco-Vázquez J, Arnay-de-la-Rosa M, et al. 2014. Lead, cadmium and zinc in hair samples: relationship with dietary habits and urban environment. *Biol. Trace Elem. Res.* 157:205–210; doi:10.1007/s12011-014-9896-8.
- González-Villalva A, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Rojas-Lemus M, Rodríguez-Lara V, García-Pelaez I, et al. 2016. Pollution by metals: Is there a relationship in glycemic control? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 46:337–343; doi:10.1016/j.etap.2016.06.023.
- Goon D, Klaassen CD. 1989. Dosage-dependent absorption of cadmium in the rat intestine measured in situ. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100: 41–50.
- Goullé J-P, Mahieu L, Anagnostides J-G, Bouige D, Saussereau E, Guerbet M, et al. 2010. Profil métallique tissulaire par ICP-MS chez des sujets décédés. *Ann. Toxicol. Anal.* 22:1–9; doi:10.1051/ata/2010001.
- Grawé KP, Pickova J, Dutta PC, Oskarsson A. 2004. Fatty acid alterations in liver and milk of cadmium exposed rats and in brain of their suckling offspring. *Toxicol. Lett.* 148:73–82; doi:10.1016/j.toxlet.2003.12.012.
- Groten JP, Sinkeldam EJ, Luten JB, van Bladeren PJ. 1990. Comparison of the toxicity of inorganic and liver-incorporated cadmium: a 4-wk feeding study in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 28: 435–441.
- Groten JP, Sinkeldam EJ, Muys T, Luten JB, van Bladeren PJ. 1991. Interaction of dietary Ca, P, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn and Se with the accumulation and oral toxicity of cadmium in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 29: 249–258.

- Grundy SM. 2015. Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *Eur. J. Clin. Invest.* 45:1209–1217; doi:10.1111/eci.12519.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482–488; doi:10.1038/41343.
- Guo S. 2014. Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *J. Endocrinol.* 220:T1–T23; doi:10.1530/JOE-13-0327.
- Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. 2000a. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 55: 223–232.
- Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. 2000b. Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl₂-induced bone injury. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 56: 211–219.
- Han JC, Park SY, Hah BG, Choi GH, Kim YK, Kwon TH, et al. 2003a. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 413: 213–220.
- Han JC, Park SY, Hah BG, Choi GH, Kim YK, Kwon TH, et al. 2003b. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 413: 213–220.
- Haswell-Elkins M, McGrath V, Moore M, Satarug S, Walmbay M, Ng J. 2007. Exploring potential dietary contributions including traditional seafood and other determinants of urinary cadmium levels among indigenous women of a Torres Strait Island (Australia). *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 17:298–306; doi:10.1038/sj.jes.7500547.
- Haswell-Elkins M, Satarug S, O'Rourke P, Moore M, Ng J, McGrath V, et al. 2008. Striking association between urinary cadmium level and albuminuria among Torres Strait Islander people with diabetes. *Environ. Res.* 106:379–383; doi:10.1016/j.envres.2007.10.004.
- He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. 2009. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:250; doi:10.1016/j.taap.2009.02.017.
- He W, Guo W, Qian Y, Zhang S, Ren D, Liu S. 2015. Synergistic hepatotoxicity by cadmium and chlorpyrifos: disordered hepatic lipid homeostasis. *Mol. Med. Rep.* 12:303–308; doi:10.3892/mmr.2015.3381.
- Hectors TLM, Vanparys C, Van Gaal LF, Jorens PG, Covaci A, Blust R. 2013. Insulin resistance and environmental pollutants: experimental evidence and future perspectives. *Environ. Health Perspect.* 121:1273–1281; doi:10.1289/ehp.1307082.

- Himeno S, Yanagiya T, Fujishiro H. 2009. The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie* 91:1218–1222; doi:10.1016/j.biochi.2009.04.002.
- Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC. 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* 262: 16333–16337.
- Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Kluxen FM, Degen GH. 2010. Investigations on the estrogenic activity of the metallothionein cadmium in the rat intestine. *Arch. Toxicol.* 84:541–552; doi:10.1007/s00204-010-0524-x.
- Højlund K. 2014. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan. Med. J.* 61: B4890.
- Hossain MZ, Ullah SM, Ahad SA, Ullah MB. 2007. Transfer of cadmium from soil to vegetable crops. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 42: 327–334.
- Hue-Beauvais C, Miranda G, Aujean E, Jaffrezic F, Devinoy E, Martin P, et al. 2017. Diet-induced modifications to milk composition have long-term effects on offspring growth in rabbits. *J. Anim. Sci.* 95:761–770; doi:10.2527/jas.2016.0847.
- Hussein Were F, Njue W, Murungi J, Wanjau R. 2008. Use of human nails as bio-indicators of heavy metals environmental exposure among school age children in Kenya. *Sci. Total Environ.* 393:376–384; doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.035.
- Huzior-Bałajewicz A, Pietrzyk JJ, Schlegel-Zawadzka M, Piatkowska E, Zachwieja Z. 2001. The influence of lead and cadmium environmental pollution on anthropometric health factors in children. *Przegl. Lek.* 58: 315–324.
- Ibrahim MM, Fjære E, Lock E-J, Frøyland L, Jessen N, Lund S, et al. 2012. Metabolic impacts of high dietary exposure to persistent organic pollutants in mice. *Toxicol. Lett.* 215:8–15; doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.022.
- Ibrahim MM, Fjære E, Lock E-J, Naville D, Amlund H, Meugnier E, et al. 2011a. Chronic Consumption of Farmed Salmon Containing Persistent Organic Pollutants Causes Insulin Resistance and Obesity in Mice. *G.P. Fadinied. PLoS ONE* 6:e25170; doi:10.1371/journal.pone.0025170.
- Ibrahim MM, Fjære E, Lock E-J, Naville D, Amlund H, Meugnier E, et al. 2011b. Chronic Consumption of Farmed Salmon Containing Persistent Organic Pollutants Causes Insulin Resistance and Obesity in Mice. *PLoS ONE* 6; doi:10.1371/journal.pone.0025170.
- Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, Mackenzie B. 2012. Substrate Profile and Metal-ion Selectivity of Human Divalent Metal-ion Transporter-1. *J. Biol. Chem.* 287:30485; doi:10.1074/jbc.M112.364208.
- International Diabetes Federation. 2015. *IDF Diabetes Atlas*. 7th edn. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium.

- Ithakissios DS, Ghafghazi T, Mennear JH, Kessler WV. 1975. Effect of multiple doses of cadmium on glucose metabolism and insulin secretion in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 143–149.
- Ithakissios DS, Kessler WV, Arvesen JN, Born GS. 1974. Effect of Multiple Doses of Cadmium on Glucose Metabolism in the Rat. *J. Pharm. Sci.* 63:146–149; doi:10.1002/jps.2600630141.
- Jacquillet G, Barbier O, Rubera I, Tauc M, Borderie A, Namorado MC, et al. 2007. Cadmium causes delayed effects on renal function in the offspring of cadmium-contaminated pregnant female rats. *AJP Ren. Physiol.* 293:F1450–F1460; doi:10.1152/ajprenal.00223.2007.
- Järup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:201–208; doi:10.1016/j.taap.2009.04.020.
- Jawdat AA, Shah SA, Jaafar MH, Jadoo SA. 2012. Urinary cadmium concentration and its risk factors among adults in Tanjung Karang, Selangor. *Am.-Eurasian J Toxicol Sci* 4: 80–8.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, et al. 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* 9:1081–1084; doi:10.1038/nm902.
- Kara H, KARATAŞ F, Canatan H. 2005. Effect of single dose cadmium chloride administration on oxidative stress in male and female rats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29: 37–42.
- Kaur J. 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014:e943162; doi:10.1155/2014/943162.
- Kawakami T, Nishiyama K, Kadota Y, Sato M, Inoue M, Suzuki S. 2013. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272:625–636; doi:10.1016/j.taap.2013.07.015.
- Kawakami T, Sugimoto H, Furuichi R, Kadota Y, Inoue M, Setsu K, et al. 2010. Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology* 267:20–26; doi:10.1016/j.tox.2009.07.022.
- Kawser Hossain M, Abdal Dayem A, Han J, Kumar Saha S, Yang G-M, Choi HY, et al. 2016. Recent Advances in Disease Modeling and Drug Discovery for Diabetes Mellitus Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17:256; doi:10.3390/ijms17020256.
- Kelishadi R, Askarieh A, Motlagh ME, Tajadini M, Heshmat R, Ardalan G, et al. 2013. Association of blood cadmium level with cardiometabolic risk factors and liver enzymes in a nationally representative sample of adolescents: the CASPIAN-III study. *J. Environ. Public Health* 2013:142856; doi:10.1155/2013/142856.
- Kim D-W, Kim K-Y, Choi B-S, Youn P, Ryu D-Y, Klaassen CD, et al. 2007. Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Arch. Toxicol.* 81:327–334; doi:10.1007/s00204-006-0160-7.

- Kim JH, Cho HT, Kim YJ. 2014. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr. J.* 61: 1055–1067.
- Kim M, Kim K. 2011. Biomonitoring of lead and cadmium in the hair and fingernails of elderly Korean subjects. *Biol. Trace Elem. Res.* 143:794–802; doi:10.1007/s12011-010-8942-4.
- Kimura et Otaki. 1972. Percutaneous absorption of cadmium in rabbit and hairless mouse. *Ind. Health* 10.
- Kippler M, Ekström E-C, Lönnerdal B, Goessler W, Akesson A, El Arifeen S, et al. 2007. Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222:221–226; doi:10.1016/j.taap.2007.04.009.
- Kippler M, Hoque AMW, Raqib R, Öhrvik H, Ekström E-C, Vahter M. 2010. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol. Lett.* 192:162–168; doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.018.
- Kjellström T. 1979. Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden. *Environ. Health Perspect.* 28: 169.
- Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. 2009. Metallothionein Protection of Cadmium Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:215; doi:10.1016/j.taap.2009.03.026.
- Klimentidis YC, Beasley TM, Lin H-Y, Murati G, Glass GE, Guyton M, et al. 2011. Canaries in the coal mine: a cross-species analysis of the plurality of obesity epidemics. *Proc. Biol. Sci.* 278:1626–1632; doi:10.1098/rspb.2010.1890.
- Kolachi NF, Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Khan S, Kandhro GA, et al. 2011. Status of Toxic Metals in Biological Samples of Diabetic Mothers and Their Neonates. *Biol. Trace Elem. Res.* 143:196–212; doi:10.1007/s12011-010-8879-7.
- Kotsonis FN, Klaassen CD. 1978. The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46: 39–54.
- Kuo C-C, Navas-Acien A. 2015. Commentary: Environmental chemicals and diabetes: which ones are we missing? *Int. J. Epidemiol.* 44:248–250; doi:10.1093/ije/dyv004.
- Kurata Y, Katsuta O, Doi T, Kawasuso T, Hiratsuka H, Tsuchitani M, et al. 2003. Chronic cadmium treatment induces islet B cell injury in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Jpn. J. Vet. Res.* 50: 175–183.
- Labaronne E, Pinteaur C, Vega N, Pesenti S, Julien B, Meugnier-Fouilloux E, et al. 2017. Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 45:83–93; doi:10.1016/j.jnutbio.2017.04.001.
- Lachal M, Liu H, Kim S, Jung CY. 1996a. Effects of cadmium on glucose transport in rat adipocytes and human erythrocytes: stimulation of GLUT1 catalytic activity. *Exp. Mol. Med.* 28:33–40; doi:10.1038/emm.1996.6.

- Lachaal M, Liu H, Kim S, Spangler RA, Jung CY. 1996b. Cadmium increases GLUT1 substrate binding affinity in vitro while reducing its cytochalasin B binding affinity. *Biochemistry (Mosc.)* 35: 14958–14962.
- Lamas CA, Gollücke APB, Dolder H. 2015. Grape juice concentrate (G8000(®)) intake mitigates testicular morphological and ultrastructural damage following cadmium intoxication. *Int. J. Exp. Pathol.* 96:301–310; doi:10.1111/iep.12141.
- Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. 2016. Exposition maternelle aux polluants et altération de la santé métabolique à l'âge adulte. *médecine/sciences* 32:51–56; doi:10.1051/medsci/20163201009.
- Le Magueresse-Battistoni BL, Vidal H, Naville D. 2015. Lifelong consumption of low-dosed food pollutants and metabolic health. *J. Epidemiol. Community Health* 69:512–515; doi:10.1136/jech-2014-203913.
- Leazer T. 2002. Cadmium Absorption and Its Relationship to Divalent Metal Transporter-1 in the Pregnant Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185:18–24; doi:10.1006/taap.2002.9505.
- Lech T, Sadlik JK. 2017. Cadmium Concentration in Human Autopsy Tissues. *Biol. Trace Elem. Res.*; doi:10.1007/s12011-017-0959-5.
- Lee B-K, Kim Y. 2016. Association of Blood Cadmium Level with Metabolic Syndrome After Adjustment for Confounding by Serum Ferritin and Other Factors: 2008–2012 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Biol. Trace Elem. Res.* 171:6–16; doi:10.1007/s12011-015-0499-9.
- Lee B-K, Kim Y. 2014. Sex-specific Profiles of Blood Metal Levels Associated with Metal–Iron Interactions. *Saf. Health Work* 5:113–117; doi:10.1016/j.shaw.2014.06.005.
- Lee EJ, Moon JY, Yoo BS. 2012. Cadmium inhibits the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte through the C/EBP α and PPAR γ pathways. *Drug Chem. Toxicol.* 35:225–231; doi:10.3109/01480545.2011.591401.
- Lee S, Kelleher SL. 2016. Biological underpinnings of breastfeeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 311:E405–E422; doi:10.1152/ajpendo.00495.2015.
- Lehman LD, Klaassen CD. 1986. Dosage-dependent disposition of cadmium administered orally to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84: 159–167.
- Lei L-J, Chen L, Jin T-Y, Nordberg M, Chang X-L. 2007a. Estimation of benchmark dose for pancreatic damage in cadmium-exposed smelters. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 97:189–195; doi:10.1093/toxsci/kfm016.
- Lei L-J, Jin T-Y, Zhou Y-F. 2007b. Insulin expression in rats exposed to cadmium. *Biomed. Environ. Sci. BES* 20: 295–301.

- Levy JR, Gyarmati J, Lesko JM, Adler RA, Stevens W. 2000. Dual regulation of leptin secretion: intracellular energy and calcium dependence of regulated pathway. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 278: E892–E901.
- Li C, Fang D, Xu D, Wang B, Zhao S, Yan S, et al. 2014. Main air pollutants and diabetes-associated mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* 171:R183-190; doi:10.1530/EJE-14-0287.
- Li Y, Zhang Y, Wang W, Wu Y. 2017. Association of urinary cadmium with risk of diabetes: a meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24:10083–10090; doi:10.1007/s11356-017-8610-8.
- Liu YP, Liu J, Iszard MB, Andrews GK, Palmiter RD, Klaassen CD. 1995. Transgenic Mice That Overexpress Metallothionein-I Are Protected from Cadmium Lethality and Hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135:222–228; doi:10.1006/taap.1995.1227.
- Lovásová E, Rácz O, Cimboláková I, Nováková J, Dombrovský P, Ništár F. 2013. Effects of chronic low-dose cadmium exposure on selected biochemical and antioxidant parameters in rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 76:1033–1038; doi:10.1080/15287394.2013.828249.
- Magnan C, Ktorza A. 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule béta pancréatique. *EMC - Endocrinol.* 2:241–264; doi:10.1016/j.emcend.2005.07.001.
- Maret W, Moulis J-M. 2013. The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. *Met. Ions Life Sci.* 11:1–29; doi:10.1007/978-94-007-5179-8_1.
- Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD. 1994. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 584–588.
- Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. 2013. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr. Rev.* 34:309–338; doi:10.1210/er.2012-1055.
- McLellan JS, Flanagan PR, Chamberlain MJ, Valberg LS. 1978. Measurement of dietary cadmium absorption in humans. *J. Toxicol. Environ. Health* 4:131–138; doi:10.1080/15287397809529650.
- Meltzer HM, Brantsaeter AL, Borch-Johnsen B, Ellingsen DG, Alexander J, Thomassen Y, et al. 2010. Low iron stores are related to higher blood concentrations of manganese, cobalt and cadmium in non-smoking, Norwegian women in the HUNT 2 study. *Environ. Res.* 110:497–504; doi:10.1016/j.envres.2010.03.006.
- Menai M, Heude B, Slama R, Forhan A, Sahuquillo J, Charles M-A, et al. 2012. Association between maternal blood cadmium during pregnancy and birth weight and the risk of fetal growth restriction: The EDEN mother–child cohort study. *Reprod. Toxicol.* 34:622–627; doi:10.1016/j.reprotox.2012.09.002.

- Menke A, Guallar E, Cowie CC. 2015. Metals in Urine and Diabetes in United States Adults. Diabetes db150316.
- Merali Z, Singhal RL. 1980. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. Br. J. Pharmacol. 69: 151–157.
- Merali Z, Singhal RL. 1975. Protective effect of selenium on certain hepatotoxic and pancreatotoxic manifestations of subacute cadmium administration. J. Pharmacol. Exp. Ther. 195: 58–66.
- Mijal RS, Holzman CB. 2010. Blood Cadmium Levels in Women of Childbearing Age Vary by Race/Ethnicity. Environ. Res. 110:505; doi:10.1016/j.envres.2010.02.007.
- Milsap RL, Jusko WJ. 1994. Pharmacokinetics in the infant. Environ. Health Perspect. 102: 107–110.
- Mithieux G, Gautier-Stein A. 2014. Intestinal glucose metabolism revisited. Diabetes Res. Clin. Pract. 105:295–301; doi:10.1016/j.diabres.2014.04.008.
- Moon S-S. 2014. Additive effect of heavy metals on metabolic syndrome in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009–2010. Endocrine 46:263–271; doi:10.1007/s12020-013-0061-5.
- Moon S-S. 2013. Association of lead, mercury and cadmium with diabetes in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009–2010. Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc. 30:e143-148; doi:10.1111/dme.12103.
- Moore W, Stara JF, Crocker WC. 1973. Gastrointestinal absorption of different compounds of 115m cadmium and the effect of different concentrations in the rat. Environ. Res. 6: 159–164.
- Morselli PL, Franco-Morselli R, Bossi L. 1980. Clinical pharmacokinetics in newborns and infants. Age-related differences and therapeutic implications. Clin. Pharmacokinet. 5: 485–527.
- Müller L, Abel J, Ohnesorge FK. 1986. Absorption and distribution of cadmium (Cd), copper and zinc following oral subchronic low level administration to rats of different binding forms of cadmium (Cd-acetate, Cd-metallothionein, Cd-glutathione). Toxicology 39: 187–195.
- Nakayama K, Sei N, Handoh IC, Shimasaki Y, Honjo T, Oshima Y. 2011. Effects of polychlorinated biphenyls on liver function and sexual characteristics in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Mar. Pollut. Bull. 63:366–369; doi:10.1016/j.marpolbul.2011.01.015.
- National Research Council. 1993. *Pesticides in the Diets of Infants and Children*. National Academies Press.
- Naville D, Labaronne E, Vega N, Pinteur C, Canet-Soulas E, Vidal H, et al. 2015. Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model. PLoS One 10:e0124015; doi:10.1371/journal.pone.0124015.

- Naville D, Pinteur C, Vega N, Menade Y, Vigier M, Le Bourdais A, et al. 2013. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27:3860–3870; doi:10.1096/fj.13-231670.
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, et al. 2010. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *BioMetals* 23:769–782; doi:10.1007/s10534-010-9343-z.
- Newton D, Johnson P, Lally AE, Pentreath RJ, Swift DJ. 1984. The uptake by man of cadmium ingested in crab meat. *Hum. Toxicol.* 3: 23–28.
- Nie X, Wang N, Chen Y, Chen C, Han B, Zhu C, et al. 2016. Blood cadmium in Chinese adults and its relationships with diabetes and obesity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23:18714–18723; doi:10.1007/s11356-016-7078-2.
- Nilsson T, Berggren P-O, Hellman B. 1987. Cadmium-induced insulin release does not involve changes in intracellular handling of calcium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 929:81–87; doi:10.1016/0167-4889(87)90243-6.
- Nilsson T, Rorsman F, Berggren PO, Hellman B. 1986. Accumulation of cadmium in pancreatic beta cells is similar to that of calcium in being stimulated by both glucose and high potassium. *Biochim. Biophys. Acta* 888: 270–277.
- Nna VU, Usman UZ, Ofutet EO, Owu DU. 2017. Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride - induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 102:143–155; doi:10.1016/j.fct.2017.02.010.
- Nomiyama K, Nomiyama H, Kameda N. 1998. Plasma cadmium–metallothionein, a biological exposure index for cadmium-induced renal dysfunction, based on the mechanism of its action. *Toxicology* 129:157–168; doi:10.1016/S0300-483X(98)00083-3.
- Nordberg GF, Piscator M, Nordberg M. 1971. On the Distribution of Cadmium in Blood. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* 30:289–295; doi:10.1111/j.1600-0773.1971.tb00660.x.
- Ogheneovo Asagba S. 2010. Biochemical changes in urine and plasma of rats in food chain-mediated cadmium toxicity. *Toxicol. Ind. Health* 26:459–467; doi:10.1177/0748233710371108.
- Ogoshi K, Moriyama T, Nanzai Y. 1989. Decrease in the mechanical strength of bones of rats administered cadmium. *Arch. Toxicol.* 63: 320–324.
- Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, et al. 2005. Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat. Cell Biol.* 7:286–294; doi:10.1038/ncb1231.

- Ohrvik H, Yoshioka M, Oskarsson A, Tallkvist J. 2006. Cadmium-induced disturbances in lactating mammary glands of mice. *Toxicol. Lett.* 164:207–213; doi:10.1016/j.toxlet.2005.12.008.
- Okubo M, Yamada K, Hosoyamada M, Shibasaki T, Endou H. 2003. Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187: 162–167.
- Ollson CJ, Smith E, Herde P, Juhasz AL. 2017. Influence of co-contaminant exposure on the absorption of arsenic, cadmium and lead. *Chemosphere* 168:658–666; doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.010.
- Olsson I-M, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. 2002. Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ. Health Perspect.* 110: 1185–1190.
- Olszowski T, Baranowska-Bosiacka I, Rębacz-Maron E, Gutowska I, Jamioł D, Prokopowicz A, et al. 2016. Cadmium Concentration in Mother's Blood, Milk, and Newborn's Blood and Its Correlation with Fatty Acids, Anthropometric Characteristics, and Mother's Smoking Status. *Biol. Trace Elem. Res.* 174:8–20; doi:10.1007/s12011-016-0683-6.
- Osman K, Akesson A, Berglund M, Bremme K, Schütz A, Ask K, et al. 2000. Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clin. Biochem.* 33: 131–138.
- Ostadalova I, Babický A. 2012. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiol. Res.* 61: S1.
- Ounnas F, Privé F, Lamarche F, Salen P, Favier-Hininger I, Marchand P, et al. 2016. A relevant exposure to a food matrix contaminated environmentally by polychlorinated biphenyls induces liver and brain disruption in rats. *Chemosphere* 161:80–88; doi:10.1016/j.chemosphere.2016.06.040.
- Pansuria M, Xi H, Li L, Yang X-F, Wang H. 2012. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 4: 916–931.
- Papeleu P, Vanhaecke T, Henkens T, Elaut G, Vinken M, Snykers S, et al. 2006. Isolation of rat hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 320:229–237; doi:10.1385/1-59259-998-2:229.
- Park JD, Cherrington NJ, Klaassen CD. 2002. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 68: 288–294.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD. 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1). *Toxicology* 163: 93–100.
- Park S, Lee B-K. 2013. Body Fat Percentage and Hemoglobin Levels Are Related to Blood Lead, Cadmium, and Mercury Concentrations in a Korean Adult Population (KNHANES 2008–2010). *Biol. Trace Elem. Res.* 151:315–323; doi:10.1007/s12011-012-9566-7.

- Park SS, Skaar DA, Jirtle RL, Hoyo C. 2017. Epigenetics, obesity and early-life cadmium or lead exposure. *Epigenomics* 9:57–75; doi:10.2217/epi-2016-0047.
- Peng S, Liu L, Zhang X, Heinrich J, Zhang J, Schramm K-W, et al. 2015. A nested case-control study indicating heavy metal residues in meconium associate with maternal gestational diabetes mellitus risk. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 14:19; doi:10.1186/s12940-015-0004-0.
- Penhoat A, Fayard L, Stefanutti A, Mithieux G, Rajas F. 2014. Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice. *Metabolism*. 63:104–111; doi:10.1016/j.metabol.2013.09.005.
- Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. 2017. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*; doi:10.1038/nrendo.2017.80.
- Petersson Grawé K, Oskarsson A. 2000a. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. *Arch. Toxicol.* 73: 519–527.
- Petersson Grawé K, Oskarsson A. 2000b. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. *Arch. Toxicol.* 73: 519–527.
- Pillai P, Pandya C, Gupta S, Gupta S. 2010. Biochemical and molecular effects of gestational and lactational coexposure to lead and cadmium on ovarian steroidogenesis are associated with oxidative stress in F1 generation rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24:384–394; doi:10.1002/jbt.20351.
- Pillet S, D'Elia M, Bernier J, Bouquegneau J-M, Fournier M, Cyr DG. 2006. Immunomodulatory effects of estradiol and cadmium in adult female rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 92:423–432; doi:10.1093/toxsci/kfl005.
- Pomar CA, van Nes R, Sánchez J, Picó C, Keijer J, Palou A. 2017. Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *Int. J. Obes.* 2005; doi:10.1038/ijo.2017.42.
- Prabu SM, Shagirtha K, Renugadevi J. 2010. Amelioration of cadmium-induced oxidative stress, impairment in lipids and plasma lipoproteins by the combined treatment with quercetin and α -tocopherol in rats. *J. Food Sci.* 75:T132-140; doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01757.x.
- Prozialeck WC, Edwards JR. 2010. Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *BioMetals* 23:793–809; doi:10.1007/s10534-010-9288-2.
- Rabenstein DL, Isab AA, Kadima W, Mohanakrishnan P. 1983. A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of cadmium with human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 762: 531–541.
- Rajanna B, Fikes E, Simpson H, Chapatwala KD, Hobson M. 1985. Reversibility effects on renal and hepatic gluconeogenic enzymes in rats from chronic exposure of cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health* 15:521–529; doi:10.1080/15287398509530679.

- Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, Selvaraj J, Balasubramanian K. 2013. Phthalate is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: role of antioxidant vitamins. *J. Cell. Biochem.* 114:558–569; doi:10.1002/jcb.24399.
- Ramakrishnan R, Elangovan P, Pari L. 2017. Protective Role of Tetrahydrocurcumin: an Active Polyphenolic Curcuminoid on Cadmium-Induced Oxidative Damage in Rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.*; doi:10.1007/s12010-017-2430-7.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet Lond. Engl.* 1: 785–789.
- Reeves PG, Chaney RL. 2008. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Sci. Total Environ.* 398:13–19; doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.009.
- Reeves PG, Chaney RL. 2004. Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ. Res.* 96:311–322; doi:10.1016/j.envres.2004.02.013.
- Rignell-Hydbom A, Skerfving S, Lundh T, Lindh CH, Elmståhl S, Bjellerup P, et al. 2009. Exposure to cadmium and persistent organochlorine pollutants and its association with bone mineral density and markers of bone metabolism on postmenopausal women. *Environ. Res.* 109:991–996; doi:10.1016/j.envres.2009.08.008.
- Rizzati V, Briand O, Guillou H, Gamet-Payraastre L. 2016. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chem. Biol. Interact.* 254:231–246; doi:10.1016/j.cbi.2016.06.003.
- Rochlani Y, Pothineni NV, Mehta JL. 2015. Metabolic Syndrome: Does it Differ Between Women and Men? *Cardiovasc. Drugs Ther.* 29:329–338; doi:10.1007/s10557-015-6593-6.
- Roels HA, Hoet P, Lison D. 1999. Usefulness of Biomarkers of Exposure to Inorganic Mercury, Lead, or Cadmium in Controlling Occupational and Environmental Risks of Nephrotoxicity. *Ren. Fail.* 21:251–262; doi:10.3109/08860229909085087.
- Rogalska J, Brzóška MM, Roszczenko A, Moniuszko-Jakoniuk J. 2009. Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chem. Biol. Interact.* 177:142–152; doi:10.1016/j.cbi.2008.09.011.
- Röllin HB, Kootbodien T, Channa K, Odland JØ. 2015. Prenatal Exposure to Cadmium, Placental Permeability and Birth Outcomes in Coastal Populations of South Africa. *PloS One* 10:e0142455; doi:10.1371/journal.pone.0142455.
- Rotter I, Kosik-Bogacka D, Dołęgowska B, Safranow K, Lubkowska A, Laszczyńska M. 2015. Relationship between the concentrations of heavy metals and bioelements in aging men with metabolic syndrome. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12:3944–3961; doi:10.3390/ijerph120403944.

- Rudge CV, Röllin HB, Nogueira CM, Thomassen Y, Rudge MC, Odland JØ. 2009. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *J. Environ. Monit. JEM* 11:1322–1330; doi:10.1039/b903805a.
- Russ K, Howard S. 2016. Developmental Exposure to Environmental Chemicals and Metabolic Changes in Children. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 46:255–285; doi:10.1016/j.cppeds.2016.06.001.
- Ruzzin J, Petersen R, Meugnier E, Madsen L, Lock E-J, Lillefosse H, et al. 2010. Persistent Organic Pollutant Exposure Leads to Insulin Resistance Syndrome. *Environ. Health Perspect.* 118:465; doi:10.1289/ehp.0901321.
- Ryu D-Y, Lee S-J, Park DW, Choi B-S, Klaassen CD, Park J-D. 2004. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol. Lett.* 152:19–25; doi:10.1016/j.toxlet.2004.03.015.
- Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 23:897–926; doi:10.1007/s10534-010-9351-z.
- Sakamoto M, Yasutake A, Domingo JL, Chan HM, Kubota M, Murata K. 2013. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ. Int.* 60:106–111; doi:10.1016/j.envint.2013.08.007.
- Salpietro CD, Gangemi S, Minciullo PL, Briuglia S, Merlino MV, Stelitano A, et al. 2002. Cadmium concentration in maternal and cord blood and infant birth weight: a study on healthy non-smoking women. *J. Perinat. Med.* 30:395–399; doi:10.1515/JPM.2002.061.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Shabestari MM, Azad FJ, Farkhondeh T, Bafandeh F. 2015. Effect of chronic exposure to cadmium on serum lipid, lipoprotein and oxidative stress indices in male rats. *Interdiscip. Toxicol.* 8:151–154; doi:10.1515/intox-2015-0023.
- Samuel VT, Shulman GI. 2016. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 126:12–22; doi:10.1172/JCI77812.
- Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375:2267; doi:10.1016/S0140-6736(10)60408-4.
- Sarić MM, Blanusa M, Piasek M, Varnai VM, Juresa D, Kostial K. 2002. Effect of dietary calcium on cadmium absorption and retention in suckling rats. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 15: 175–182.
- Sasser LB, Jarboe GE. 1977. Intestinal absorption and retention of cadmium in neonatal rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41: 423–431.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. 2010. Cadmium, Environmental Exposure, and Health Outcomes. *Environ. Health Perspect.* 118:182–190; doi:10.1289/ehp.0901234.

- Satarug S, Ujjin P, Vanavanitkun Y, Baker JR, Moore MR. 2004. Influence of body iron store status and cigarette smoking on cadmium body burden of healthy Thai women and men. *Toxicol. Lett.* 148:177–185; doi:10.1016/j.toxlet.2003.09.015.
- Satarug S, Vesey DA, Gobe GC. 2017a. Health Risk Assessment of Dietary Cadmium Intake: Do Current Guidelines Indicate How Much is Safe? *Environ. Health Perspect.* 125:284–288; doi:10.1289/EHP108.
- Satarug S, Vesey DA, Gobe GC. 2017b. Kidney Cadmium Toxicity, Diabetes and High Blood Pressure: The Perfect Storm. *Tohoku J. Exp. Med.* 241:65–87; doi:10.1620/tjem.241.65.
- Sato M, Nagai Y. 1986. Sex-related differences in NADPH-dependent lipid peroxidation induced by cadmium. *Arch. Toxicol.* 59: 156–159.
- Schäfer SG, Schwegler U, Schümann K. 1990. Retention of cadmium in cadmium-naive normal and iron-deficient rats as well as in cadmium-induced iron-deficient animals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20: 71–81.
- Schwartz GG, Il'yasova D, Ivanova A. 2003. Urinary Cadmium, Impaired Fasting Glucose, and Diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care* 26:468–470; doi:10.2337/diacare.26.2.468.
- Scott MC, Chettle DR. 1986. In vivo elemental analysis in occupational medicine. *Scand. J. Work. Environ. Health* 12: 81–96.
- Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ. 2012. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. *Endocrinology* 153:1031–1038; doi:10.1210/en.2011-1805.
- Shaikh ZA, Jordan SA, Tewari PC. 1993. Cadmium disposition and metallothionein induction in mice: strain-, sex-, age-, and dose-dependent differences. *Toxicology* 80: 51–70.
- Shaikh ZA, Smith JC. 1980. Metabolism of orally ingested cadmium in humans. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 8: 569–574.
- Shanik MH, Xu Y, Škrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. 2008. Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *Diabetes Care* 31:S262–S268; doi:10.2337/dc08-s264.
- Shapiro GD, Dodds L, Arbuckle TE, Ashley-Martin J, Fraser W, Fisher M, et al. 2015. Exposure to phthalates, bisphenol A and metals in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: The MIREC study. *Environ. Int.* 83:63–71; doi:10.1016/j.envint.2015.05.016.
- Shimada H, Hashiguchi T, Yasutake A, Waalkes MP, Imamura Y. 2012. Sexual dimorphism of cadmium-induced toxicity in rats: involvement of sex hormones. *Arch. Toxicol.* 86:1475–1480; doi:10.1007/s00204-012-0844-0.
- Shulman GI. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:171; doi:10.1172/JCI10583.

- Silva N, Peiris-John R, Wickremasinghe R, Senanayake H, Sathiakumar N. 2012. Cadmium a metalloestrogen: are we convinced? *J. Appl. Toxicol.* 32:318–332; doi:10.1002/jat.1771.
- Simić A, Hansen AF, Åsvold BO, Romundstad PR, Midthjell K, Syversen T, et al. 2017. Trace element status in patients with type 2 diabetes in Norway: The HUNT3 Survey. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* 41:91–98; doi:10.1016/j.jtemb.2017.03.001.
- Skalnaya MG, Tinkov AA, Demidov VA, Serebryansky EP, Nikonorov AA, Skalny AV. 2014. Hair Toxic Element Content in Adult Men and Women in Relation to Body Mass Index. *Biol. Trace Elem. Res.* 161:13–19; doi:10.1007/s12011-014-0082-9.
- Skelin M. 2010. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX* 105–113; doi:10.14573/altex.2010.2.105.
- Skerfving S, Christoffersson JO, Schütz A, Welinder H, Spång G, Ahlgren L, et al. 1987. Biological monitoring, by in vivo XRF measurements, of occupational exposure to lead, cadmium, and mercury. *Biol. Trace Elem. Res.* 13:241–251; doi:10.1007/BF02796636.
- Smolders E. 2001. Cadmium uptake by plants. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14: 177–183.
- Son H-S, Kim S-G, Suh B-S, Park D-U, Kim D-S, Yu S, et al. 2015. Association of cadmium with diabetes in middle-aged residents of abandoned metal mines: the first health effect surveillance for residents in abandoned metal mines. *Ann. Occup. Environ. Med.* 27:20; doi:10.1186/s40557-015-0071-2.
- Souza V, Bucio L, Gutiérrez-Ruiz MC. 1997. Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 120: 215–220.
- Stepniewski J, Kachamakova-Trojanowska N, Ogrocki D, Szopa M, Matlok M, Beilharz M, et al. 2015. Induced pluripotent stem cells as a model for diabetes investigation. *Sci. Rep.* 5:8597; doi:10.1038/srep08597.
- Sugawara N, Sugawara C. 1991. Gastrointestinal absorption of Cd-metallothionein and cadmium chloride in mice. *Arch. Toxicol.* 65: 689–692.
- Sumino K, Hayakawa K, Shibata T, Kitamura S. 1975. Heavy metals in normal Japanese tissues. Amounts of 15 heavy metals in 30 subjects. *Arch. Environ. Health* 30: 487–494.
- Suzuki T, Momoi K, Hosoyamada M, Kimura M, Shibasaki T. 2008. Normal cadmium uptake in microcytic anemia mk/mk mice suggests that DMT1 is not the only cadmium transporter in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227:462–467; doi:10.1016/j.taap.2007.10.026.
- Suzuki Y. 1980. Cadmium metabolism and toxicity in rats after long-term subcutaneous administration. *J. Toxicol. Environ. Health* 6:469–482; doi:10.1080/15287398009529866.
- Swaddiwudhipong W, Limpatanachote P, Mahasakpan P, Krintratun S, Punta B, Funkhiew T. 2012. Progress in cadmium-related health effects in persons with high environmental

- exposure in northwestern Thailand: a five-year follow-up. *Environ. Res.* 112:194–198; doi:10.1016/j.envres.2011.10.004.
- Swaddiwudhipong W, Limpatanachote P, Nishijo M, Honda R, Mahasakpan P, Krintratun S. 2010a. Cadmium-exposed population in Mae Sot district, Tak province: 3. Associations between urinary cadmium and renal dysfunction, hypertension, diabetes, and urinary stones. *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaihet Thangphaet* 93: 231–238.
- Swaddiwudhipong W, Mahasakpan P, Limpatanachote P, Krintratun S. 2010b. Correlations of urinary cadmium with hypertension and diabetes in persons living in cadmium-contaminated villages in northwestern Thailand: A population study. *Environ. Res.* 110:612–616; doi:10.1016/j.envres.2010.06.002.
- Tadayon F, Abdollahi A, Nia SR, Ostovar R. 2013. Relationship between the level of zinc, lead, cadmium, nickel and chromium in hair of people with diabetes. *E3S Web Conf.* 1.
- Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Schulz H, Ziesenis A, et al. 2004. Fate and Toxic Effects of Inhaled Ultrafine Cadmium Oxide Particles in the Rat Lung. *Inhal. Toxicol.* 16:83–92; doi:10.1080/08958370490443141.
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lönnnerdal B. 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol. Lett.* 122:171–177; doi:10.1016/S0378-4274(01)00363-0.
- Tang X, Zhu J, Zhong Z, Luo M, Li G, Gong Z, et al. 2016. Mobilization and removing of cadmium from kidney by GMDTC utilizing renal glucose reabsorption pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 305:143–152; doi:10.1016/j.taap.2016.06.001.
- Tangvarasittichai S, Niyomtarn S, Meemark S, Pingmuangkaew P, Nunthawarasilp P. 2015. Elevated cadmium exposure associated with hypertension, diabetes and chronic kidney disease, in the population of cadmium-contaminated area. *Int J Toxicol Pharm Res.*
- Tellez-Plaza M, Guallar E, Howard BV, Umans JG, Francesconi KA, Goessler W, et al. 2013. Cadmium Exposure and Incident Cardiovascular Disease. *Epidemiol. Camb. Mass* 24:421; doi:10.1097/EDE.0b013e31828b0631.
- Thévenod F. 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *BioMetals* 23:857–875; doi:10.1007/s10534-010-9309-1.
- Thévenod F. 2003. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.* 93:p87-93; doi:70241.
- Thévenod F, Wolff NA. 2016. Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. *Metallomics* 8:17–42; doi:10.1039/C5MT00215J.
- Tinkov AA, Filippini T, Ajsuvakova OP, Aaseth J, Gluhcheva YG, Ivanova JM, et al. 2017. The role of cadmium in obesity and diabetes. *Sci. Total Environ.* 601–602:741–755; doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.224.

- Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. 2017. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* 28:497–505; doi:10.1016/j.tem.2017.03.003.
- Treviño S, Waalkes MP, Flores Hernández JA, León-Chavez BA, Aguilar-Alonso P, Brambila E. 2015. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 583:27–35; doi:10.1016/j.abb.2015.07.010.
- Triplitt CL. 2012. Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. *Am. J. Manag. Care* 18: S11-16.
- Trzcinka-Ochocka M, Jakubowski M, Razniewska G, Halatek T, Gazewski A. 2004. The effects of environmental cadmium exposure on kidney function: the possible influence of age. *Environ. Res.* 95:143–150; doi:10.1016/j.envres.2003.10.003.
- United States Geological Survey. 2016. 2015 Minerals Yearbook - Cadmium.
- Vahter M, Åkesson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M. 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* 104:85–95; doi:10.1016/j.envres.2006.08.003.
- Vahter M, Berglund M, Åkesson A, Lidén C. 2002. Metals and Women's Health. *Environ. Res.* 88:145–155; doi:10.1006/enrs.2002.4338.
- van Esterik JCJ, Dollé MET, Lamoree MH, van Leeuwen SPJ, Hamers T, Legler J, et al. 2014. Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by exposure to bisphenol A during gestation and lactation. *Toxicology* 321:40–52; doi:10.1016/j.tox.2014.04.001.
- Vandenberg LN, Welshons WV, vom Saal FS, Toutain P-L, Myers JP. 2014. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? *Environ. Health* 13:46; doi:10.1186/1476-069X-13-46.
- Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT. 2015. Sex-Specific Differences in Lipid and Glucose Metabolism. *Front. Endocrinol.* 5; doi:10.3389/fendo.2014.00241.
- Venter C, Oberholzer HM, Cummings FR, Bester MJ. 2017. Effects of metals cadmium and chromium alone and in combination on the liver and kidney tissue of male Sprague-Dawley rats: An ultrastructural and electron-energy-loss spectroscopy investigation. *Microsc. Res. Tech.*; doi:10.1002/jemt.22877.
- Verma MP, Sharma RP, Bourcier DR. 1982. Macromolecular interactions with cadmium and the effects of zinc, copper, lead, and mercury ions. *Biol. Trace Elem. Res.* 4:35–43; doi:10.1007/BF02789132.
- Vesey DA. 2010. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focus on the interaction with essential metals. *Toxicol. Lett.* 198:13–19; doi:10.1016/j.toxlet.2010.05.004.
- Vilahur N, Vahter M, Broberg K. 2015. The Epigenetic Effects of Prenatal Cadmium Exposure. *Curr. Environ. Health Rep.* 2:195–203; doi:10.1007/s40572-015-0049-9.

- Wallia A, Allen NB, Badon S, El Muayed M. 2014. Association between urinary cadmium levels and prediabetes in the NHANES 2005-2010 population. *Int. J. Hyg. Environ. Health*; doi:10.1016/j.ijheh.2014.06.005.
- Wang H, Wang Y, Bo Q-L, Ji Y-L, Liu L, Hu Y-F, et al. 2016. Maternal cadmium exposure reduces placental zinc transport and induces fetal growth restriction in mice. *Reprod. Toxicol.* 63:174–182; doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.010.
- Wester RC, Maibach HI, Sedik L, Melendres J, DiZio S, Wade M. 1992. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19: 1–5.
- Wilding JPH. 2014. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. *Metabolism.* 63:1228–1237; doi:10.1016/j.metabol.2014.06.018.
- Wong K-L, Klaassen CD. 1980. Tissue distribution and retention of cadmium in rats during postnatal development: minimal role of hepatic metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53: 343–353.
- Wu C, Zhang Y, Chai L, Wang H. 2017. Histological changes, lipid metabolism and oxidative stress in the liver of *Bufo gargarizans* exposed to cadmium concentrations. *Chemosphere* 179:337–346; doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.131.
- Xu P, Wu Z, Xi Y, Wang L. 2016. Epigenetic regulation of placental glucose transporters mediates maternal cadmium-induced fetal growth restriction. *Toxicology* 372:34–41; doi:10.1016/j.tox.2016.10.011.
- Yamamoto A, Wada O, Ono T, Ono H. 1986. Cadmium stimulates glucose metabolism in rat adipocytes. *J. Inorg. Biochem.* 27:221–226; doi:10.1016/0162-0134(86)80063-0.
- Yamamoto A, Wada O, Ono T, Ono H, Manabe S, Ishikawa S. 1984. Cadmium-induced stimulation of lipogenesis from glucose in rat adipocytes. *Biochem. J.* 219: 979–984.
- Yang A, Liu S, Cheng N, Pu H, Dai M, Ding J, et al. 2017. Multiple metals exposure, elevated blood glucose and dysglycemia among Chinese occupational workers. *J. Diabetes Complications* 31:101–107; doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.07.022.
- Yen T-H, Lin J-L, Lin-Tan D-T, Hsu C-W, Chen K-H, Hsu H-H. 2011. Blood cadmium level's association with 18-month mortality in diabetic patients with maintenance haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26:998–1005; doi:10.1093/ndt/gfq448.
- Zalups RK, Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186:163–188; doi:10.1016/S0041-008X(02)00021-2.
- Zhang S, Jin Y, Zeng Z, Liu Z, Fu Z. 2015. Subchronic Exposure of Mice to Cadmium Perturbs Their Hepatic Energy Metabolism and Gut Microbiome. *Chem. Res. Toxicol.* 28:2000–2009; doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00237.

- Zheng Z, Xu X, Zhang X, Wang A, Zhang C, Hüttemann M, et al. 2013. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model. *J. Hepatol.* 58:148–154; doi:10.1016/j.jhep.2012.08.009.
- Zhou Z, Lu Y-H, Pi H-F, Gao P, Li M, Zhang L, et al. 2016. Cadmium Exposure is Associated with the Prevalence of Dyslipidemia. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 40:633–643; doi:10.1159/000452576.

ANNEXES

Annexe 1 : Définition des valeurs toxicologiques de référence

- LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect*) : C'est la dose la plus faible utilisée dans une étude qui produit un effet néfaste d'une intensité ou d'une fréquence statistiquement différentes des contrôles. La LOAEL correspond à un seuil d'effet statistique, dépendant du protocole expérimental mais pas à un seuil biologique.
- NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*): C'est la dose immédiatement inférieure à la LOAEL, testée dans le protocole expérimental, qui n'entraîne pas d'effet néfaste.
- BMD (*Benchmark Dose*) : Cette dose est obtenue par modélisation statistique de la relation dose-réponse à partir de données expérimentales ou épidémiologiques. Elle correspond à la dose induisant un effet néfaste déterminé d'une amplitude déterminée. La BMD la plus souvent utilisée est la BMDL qui est la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95%. A titre d'exemple, un BMDL₁₀ correspond la dose limite, à 95% de l'intervalle de confiance, entraînant une variation du paramètre étudié de 10%. Un avantage de la BMD/BMDL est qu'elle prend en compte la totalité de la courbe dose-réponse ainsi que sa forme (pas nécessairement linéaire).
- MRL (*Minimal Risk Level*) : C'est l'estimation de l'exposition humaine quotidienne à une substance nocive qui est considérée comme sans risque observable (hors cancer) sur une durée d'exposition déterminée. Cette valeur est utilisée dans l'évaluation des risques encourus par la population mais ne représente pas de valeur réglementaire.
- TWI (*Tolerable Weekly Intake*) : C'est l'estimation de la quantité d'une substance nocive présente dans la nourriture ou dans l'eau, qu'il est possible de consommer pendant la vie entière sans encourir de risques perceptibles. Cette valeur à une visée réglementaire.

Annexe 2 : Résumé des études in vivo et in vitro sur l'exposition au Cd et le métabolisme glucidique et lipidique (Tinkov *et al*, 2017).

The influence of Cd exposure on metabolic parameters in laboratory studies (in a chronologic order).

Object	Tissue	Cd exposure	Effect	Reference
In vivo Male Wistar rats	WAT	9.7 mg/l – 6 weeks	↔ Weigh gain ↑ Cd content in liver ↔ Adipocyte size ↓ Total insulin receptors number and density ↔ GLUT4 content	Ficková et al., 2003
MT-null mice	WAT	n.s. – 7 days	↓ Epididymal adipocyte size ↓ Adiponectin mRNA ↓ Leptin mRNA ↑ MCP-1 expression ↑ Macrophage infiltration	Kawakami et al., 2012
MT-null mice	WAT	0–0.75 mg/kg (s.c.) – 7 days	↓ WAT weight ↓ Adipocyte size ↓ Plasma leptin ↓ Leptin mRNA ↓ Resistin mRNA ↓ PPAR γ 2 mRNA ↓ C/EBP α mRNA ↑ MCP-1 expression ↑ Macrophage infiltration	Kawakami et al., 2013
In vitro Wistar rats	Adipocytes	0–5000.0 μ M	↑ Lipogenesis ↔ 3-O-methylglucose uptake	Yamamoto et al., 1984
Cell line	3T3-L1 adipocytes	5–25 μ M	↑ 2-Deoxyglucose uptake ↑ ROS ↑ GSH ↓ Adipocytes viability	Kang et al., 1986
Wistar rats	Adipocytes	5–5000 μ M	↑ CO $_2$ formation from glucose ↑ Lipogenesis	Yamamoto et al., 1986
Cell line	3 T3-L1 adipocytes	5, 10 μ M	↑ Glucose uptake ↑ GLUT1 ↔ GLUT4	Harrison et al., 1991
Sprague- Dawley rats	Adipocytes	0–5 mM	↑ Glucose uptake ↑ GLUT1 ↑ GLUT4	Lachaal et al., 1996a, 1996b
Sprague- Dawley rats	Adipocytes	0.01–10 mM	↓ Leptin secretion	Levy et al., 2000

Sprague-Dawley rats	Adipocytes	2 ml/kg b.w. for 4 days	↓ GLUT4 protein ↓ GLUT4 mRNA ↔ GLUT1 protein ↔ GLUT1 mRNA ↓ 3-O-methy-D-glucose uptake	Han et al., 2003
Cell line	3T3-L1 adipocytes	30 μM	↓ Adipocytes viability	Moon and Yoo, 2008
Slc:ICR mice	Adipocytes	0–30 μmol Cd/kg b.w. – 6 h (0–20 μmol Cd/kg b.w., 3.5 times/week) – 2 weeks	↓ Gene 1/Mesoderm-specific transcript mRNA ↓ Peroxisome proliferator-activated receptor γ2 ↓ CCAAT/enhancer-binding protein α mRNA ↓ Adiponectin mRNA ↓ Resistin mRNA	Kawakami et al., 2010
Cell line	3T3-L1 adipocytes	0.3–3 μM	↓ Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) ↓ Lipid accumulation ↓ C/EBPα mRNA ↓ PPARγ mRNA	Lee et al., 2012
MT-null mice	Adipocytes	0–100 μM (6–48 h)	↓ PPARγ2 mRNA ↓ Fatty acid synthase mRNA ↓ Acetyl CoA carboxylase α mRNA ↓ Hormone-sensitive lipase mRNA ↓ Adipose triglyceride lipase mRNA ↓ Perilipin 1 mRNA ↓ Resistin mRNA ↓ Adiponectin mRNA ↓ PAI-1 mRNA	Kawakami et al., 2013

↑– significant increase; ↓– significant decrease; ↔– no significant changes; n.s. – not specified.

The influence of Cd exposure on carbohydrate metabolism in laboratory models.

Object	Sample	Cd exposure	Effect	Reference
In vivo Male adrenalectomized mice	Blood	2–6 mg/kg b.w. (Cd acetate)	↑ Blood glucose, dose-dependent	Ghafghazi and Mennear, 1973
Diabetic rats	Blood	0.25–0.50 mg/kg b.w. (20 doses) (Cd acetate)	↔ Plasma glucose ↔ Plasma insulin ↔ Body weight ↑ Glucose oxidation	Ithakissios et al., 1974
Female alloxan-diabetic rats	Pancreas Liver Blood Spleen Kidneys	15 μCi of ¹⁰⁹ Cd, 0.0625 mg Cd acetate per dose, single-shot	↓ Liver Cd uptake ↓ Pancreas Cd level ↑ Blood Cd levels ↑ Kidney Cd levels ↔ Spleen Cd levels	Ithakissios et al., 1974

Female rats	Blood	0.25–0.50 mg/kg b.w. (70 doses) (Cd acetate)	↓ Insulin secretion ↓ Body weight ↑ Urine glucose ↔ Plasma glucose	Ithakissios et al., 1975
Male Sprague-Dawley rats	Blood, liver	1 mg/kg b.w. twice daily for 7 days	↓ Insulin release ↑ Serum glucose ↑ Hepatic cAMP ↑ Gluconeogenic enzymes activity in liver ↓ Liver glycogen	Merali and Singhal, 1976, 1980
Male Sprague-Dawley rats	Blood Kidney Liver	0–200 ppm for 30 days (CdCl ₂)	↓ Body weight gain ↑ Serum glucose ↑ Serum protein ↑ Gluconeogenic enzymes activity in liver and kidney	Chapatwala et al., 1980
Female rats	Blood	200 µg/g of diet for 40 weeks	↑ Serum GPT ↓ Serum glucose ↑ Serum insulin	Nakamura et al., 1983
Diabetic rats	Blood	2 mg/kg i.p. for 21 days	↑ Blood Cd levels ↑ Blood glucose ↑ Brain dopamine ↑ Brain 5-hydroxytryptamine	Chandra et al., 1985
Male Sprague-Dawley rats	Blood	0.84 mg/kg b.w.	↑ Blood glucose	Bell et al., 1990
Female Wistar rats	Pancreas	0.49 mg/kg/day for 20 days 50 mg STZ/kg b.w. once	↑ Pancreas degeneration, necrosis, and degranulation ↑ Serum glucose ↓ Serum insulin ↑ Pancreas changes in Cd + STZ group	Kanter et al., 2003
Female ovariectomized cynomolgus monkeys	Pancreas	1.0–2.5-mg/kg group (CdCl ₂)	↓ Islet number and vacuolation of the islet cells ↔ Exocrine acinar cells ↓ Insulin-positive areas in the islets ↔ Glucagon-positive areas ↑ Blood glucose ↓ Blood insulin ↑ Cd levels in liver, kidney and pancreas ↑ MT levels in liver, kidney and pancreas	Kurata et al., 2003
Male Wistar rats	Blood	50 mg/l (CdCl ₂)	↓ Plasma IGF-I and IGFBP-3 levels ↔ GH	Turgut et al., 2005
Sprague-Dawley rats	Pancreas Blood Urine	0.5–2.0 mg/kg b.w.	↑ Pancreas Cd ↑ Serum glucose ↔ Serum insulin ↔ Urine NAG ↑ Insulin, MT-I and MT-II mRNA	Lei et al., 2007b

Sprague-Dawley rats	Blood Pancreas	0.6 mg/kg 5 days/week, for 12 weeks (CdCl ₂)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Serum glucose ↑ HbA_{1c} levels ↓ Serum insulin ↑ Pancreatic Cd ↔ Renal dysfunction ↑ Disruption of pancreatic cell morphology 	Edwards and Prozialeck, 2009
Wistar rats	Blood, liver, muscle, adipose and cardiovascular tissue	32.5 ppm (CdCl ₂)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Blood glucose ↑ Fasting insulin ↑ Proatherogenic changes ↑ HOMA-IR ↓ Insulin sensitivity in muscle and liver ↑ Insulin resistance in the liver, AT and CV system 	Treviño et al., 2015
C57BL/6 male mice	Liver, fat, blood, feces	1.0–10.0 mg/l for 10 weeks (CdCl ₂)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Hepatic GluT2 ↑ Chrebp ↑ Glucokinase mRNA ↑ Pyruvate kinase mRNA ↑ Serum glucose ↑ Hepatic TG 	Zhang et al., 2015
			<ul style="list-style-type: none"> ↑ Serum FFA, TG, and LPS levels ↓ Gut microbiome ↑ TNFα, IL-1β, and IL-6 mRNA 	
In vitro Male Sprague-Dawley rats	Perfused pancreas	1–5 mM Cd ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Glucose, potassium ions, and tolbutamide-stimulated insulin secretion 	Ghafghazi and Mennear, 1973
Cd-exposed male Swiss mice	Pancreatic islets cells	2.0 mg Cd/kg bw 1 μM Cd ²⁺ as Cd acetate	<ul style="list-style-type: none"> ↔ Glucose-stimulated insulin secretion in Cd-pretreated mice ↑ Metallothionein level 	Yau and Mennear, 1977
Cd-exposed neonatal male Sprague-Dawley rats	Pancreatic islets cells	0.1 and 1.0 μg CdCl ₂ /g daily for 45 days	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Glucose-stimulated insulin secretion 	Merali and Singhal, 1980
Adult obese-hyperglycemic mice	Pancreatic islets cells	5–160 μM Cd ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Basal insulin secretion by 5 μM Cd²⁺ ↔ Basal insulin secretion by 160 μM Cd²⁺ ↓ Glucose-stimulated insulin secretion by 160 μM Cd²⁺ ↓ Glucose oxidation above 10 μM Cd²⁺ ↑ Cd²⁺ uptake of by the activation of voltage-dependent Ca²⁺ channels 	Nilsson et al., 1986
Adult obese-hyperglycemic mice	Pancreatic islets cells	5 μM Cd ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> ↓ IP3-induced Ca²⁺ release ↑ Insulin release 	Nilsson et al., 1987

			↔ Independent of cytoplasmic Ca ²⁺ levels	
Mice	Kidney cortical tubule cells	0–0.6 μM for 24 h	↓ Uptake of alpha-methylglucoside ↔ Amino acid analogue alpha-(methylamino)isobutyric acid uptake ↔ Lactate dehydrogenase activity ↔ Na ⁺ and K ⁺ concentrations	Blumenthal et al., 1990
Male Sprague-Dawley rats	Hepatocytes	0–12.5 μM for 2 h (Cd acetate)	↓ Cell viability ↓ Glucose output ↓ GSH level	Bell et al., 1991
Sprague-Dawley rats	Adipocytes	0.1–5 mM CdSO ₄ for 30 min	↑ 3OMG flux ↑ GluT4 and GluT1	Lachaal et al., 1996a, 1996b
Human	β-Cell line MIN6	0.1–1.0 μmol/l for 72 h	↑ Metallothionein expression ↓ Glucose-stimulated insulin secretion ↓ GSH level ↑ GCLM and HMOX1 mRNA	El Muayed et al., 2012
Rats	RIN-m5F pancreatic β-cell	3–10 μM for 24 h (CdCl ₂)	↓ Cell viability ↑ Intracellular ROS generation ↑ Intracellular MDA ↑ Cytosolic cytochrome c release ↓ Insulin secretion ↑ Phosphorylations of JNK, ERK1/2, and MAPK ↓ Bcl-2 expression ↑ p53 expression ↑ PARP cleavage ↑ Caspase cascades	Chang et al., 2013

↑– significant increase; ↓– significant decrease; ↔– no significant changes; abbreviations: Chrebp – carbohydrate regulatory element binding protein; IGF-I - insulin-like growth factor I; IGFBP-3 - insulin-like growth factor-binding protein 3; GH - growth hormone; NAG - N-acetyl-beta-glucosaminidase; IP3 - inositol 1,4,5-trisphosphate; JNK - c-jun N-terminal kinases; ERK1/2 - extracellular signal-regulated kinases 1/2; MAPK - p38-mitogen-activated protein kinase; PARP - poly (ADP-ribose) polymerase; 3OMG - 3-O-methyl-D-glucose.

Annexe 3 : Résultats préliminaires in vitro

Modèles d'exposition au Cd in vitro pour l'étude de la sécrétion d'insuline et de la sensibilité à l'insuline.

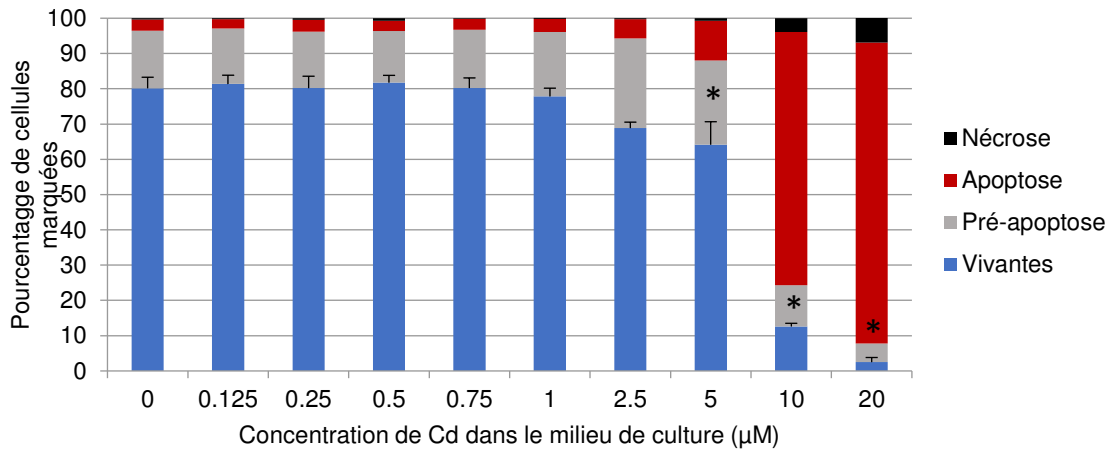


Figure 15: Viabilité des cellules INS1 après 72h d'exposition au Cd dans le milieu de culture. La viabilité a été mesurée par cytométrie en flux avec un co-marquage Annexine-Iodure de propidium. En dessous d'une dose de 2.5µM de Cd, la viabilité n'est pas altérée significativement. *p<0.05 vs 0 µM Cd. n=4

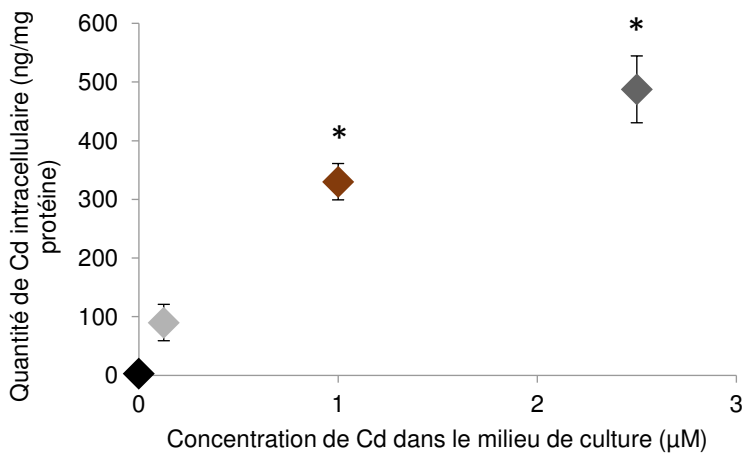


Figure 14: Quantité de Cd intracellulaire (ng/mg de protéine) en fonction de la concentration de Cd ajoutée dans le milieu de culture (µM) dans des cellules INS1 cultivées pendant 72h en présence de Cd. La quantité de Cd a été déterminée par ICP-MS *p<0.05, n=3

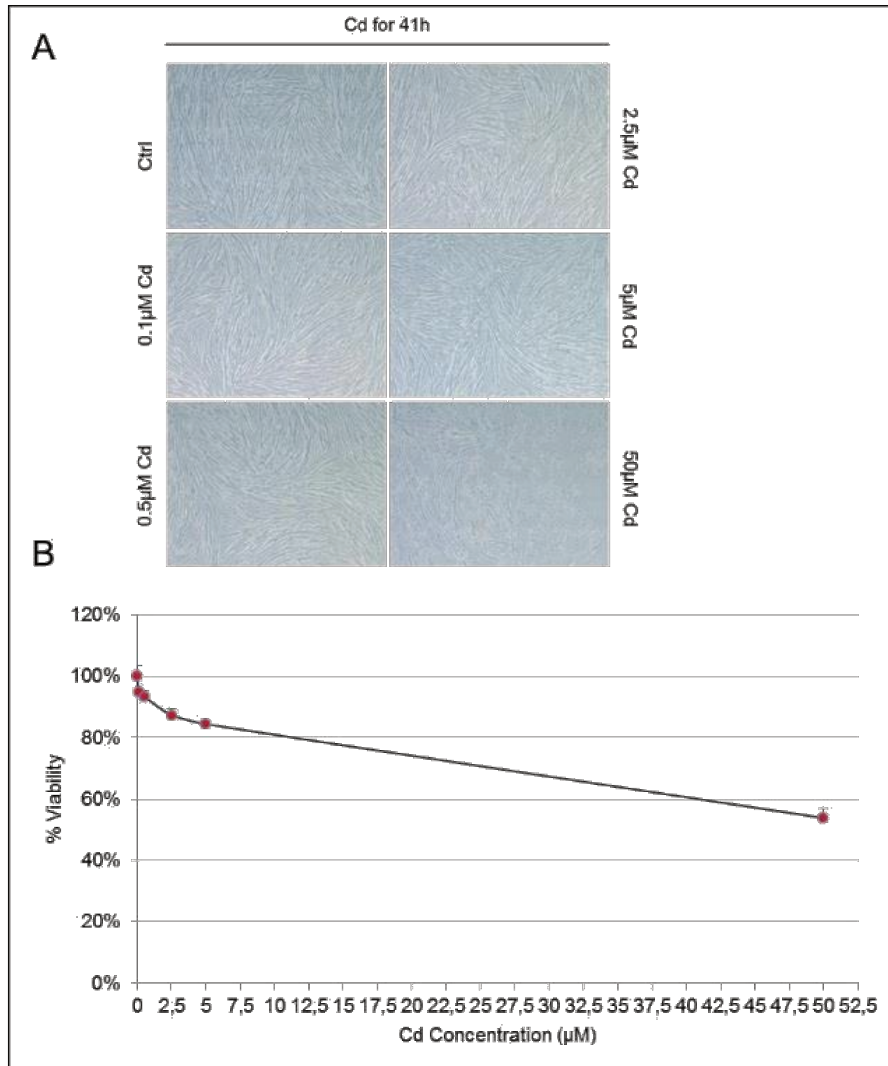


Figure 16: Viabilité cellulaire de myotubes de souris, traités avec 0, 0.1, 0.5, 2.5, 5 et 50µM de Cd pendant 48h. A) Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope (Ziss Axiovert 25).

B) Pourcentage de viabilité des cellules, évalué par le test MTT. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=2.

Conséquences d'une exposition chronique à des doses faibles de cadmium sur le métabolisme du glucose de rats à différents stades de la vie.

L'exposition à des polluants environnementaux est considérée comme l'un des facteurs pouvant expliquer l'augmentation exponentielle des maladies métaboliques dans le monde. Parmi ces polluants, plusieurs études épidémiologiques suggèrent une association entre exposition au cadmium (Cd) et incidence et sévérité des cas de diabète, mais le sujet reste controversé. Des travaux expérimentaux sur des modèles animaux montrent qu'une exposition au Cd induit des effets divers sur le métabolisme du glucose. Toutefois, ces études ont été réalisées avec des doses de Cd relativement fortes et avec des modèles d'exposition peu réalistes. De plus, très peu de données sont disponibles sur l'effet de l'exposition maternelle sur la descendance. L'objectif de ces travaux était donc d'étudier les possibles altérations du métabolisme du glucose après une exposition orale à des doses faibles de Cd, chez des rats adultes ainsi que sur des jeunes rats exposés via leur mère. Nos résultats montrent qu'à des niveaux de Cd proche des doses de références sans effets chez le rat, les femelles adultes présentent des perturbations du niveau d'insuline plasmatique ainsi qu'une légère diminution de la sensibilité à l'insuline. Ces effets diabétogènes ne sont pas retrouvés chez les mâles. Les résultats de notre seconde étude indiquent que l'exposition maternelle au Cd, pendant la gestation et la lactation, induit des modifications métaboliques précoces chez les descendants, 21, 26 et 60 jours après la naissance. A 21 jours, la tolérance au glucose est altérée. A 26 jours, la sensibilité périphérique à l'insuline est transitoirement restaurée mais la fonction pancréatique est impactée. Enfin, à 60 jours, le défaut de sensibilité à l'insuline est compensé par une sécrétion accrue. Ces travaux mettent en évidence les effets d'une exposition à doses faibles de Cd sur le métabolisme du glucose et renforcent l'idée que l'environnement périnatal, en particulier l'exposition aux polluants, impacte la santé de la descendance, à plus ou moins long terme. Au-delà de ces résultats, ces travaux portent une réflexion sur l'intérêt et la difficulté à mettre en place des modèles animaux d'exposition pertinents, pour répondre à l'enjeu de l'évaluation des risques de l'exposition chronique au Cd.

Mot clés : Cadmium, Métabolisme glucidique, Toxicité, Faibles doses, Descendance

Consequences of chronic exposure to low doses of cadmium on glucose metabolism in rats at different stages of life

The exposure to environmental pollutants is considered one of the factors that could explain the exponential increase in metabolic illnesses worldwide. Among these pollutants, many epidemiological studies suggest a link between Cadmium (Cd) exposure and the occurrence and severity of diabetes, although the subject remains controversial. Experimental work on animals shows that exposure to Cd induces various effects on glucose metabolism. However, these studies were performed with relatively high doses of Cd and with unrealistic exposure models. In addition, very little data are available on the effect of maternal exposure and effect on descendants. The aim of this work was to study possible alterations in glucose metabolism after oral exposure to low doses of Cd in adult rats as well as in young rats exposed via their mothers. Results show that when exposed to Cd levels close to no-observed-effect reference values in rats, female rats show disturbances in plasma insulin level and a slight decrease in insulin sensitivity. These diabetogenic effects are not found in male rats. The results of the second study indicate that maternal exposure to Cd during pregnancy and lactation induces early metabolic changes in the offspring, 21, 26 and 60 days after birth. At 21 days, glucose tolerance is altered. At 26 days, the peripheral insulin sensitivity is transiently restored but the pancreatic function is impacted. Finally, at 60 days, the lack of insulin sensitivity is compensated by increased secretion. This work demonstrates the effects of low doses of Cd on glucose metabolism and reinforces the idea that the perinatal environment, in particular exposure to pollutants, affects the health of offspring in the long term. Beyond these results, this work allows the reader to reflect on the interest and difficulty of setting up relevant experimental animal models, in order to tackle the issue of risk assessment of chronic Cd exposure.

Key Words: Cadmium, Carbohydrate metabolism, Toxicity, Low doses, Offspring.