

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DES TRANSPORTEURS DE ZINC
DANS LE TRANSPORT INTESTINAL ET
OSTÉOBLASTIQUE DE CADMIUM

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
BOUTIN VINCENT

MAI 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

«La clef de toutes les sciences est sans contredit le point d'interrogation; nous devons la plupart des grandes découvertes au comment? Et la sagesse dans la vie consiste peut-être à se demander, à tout propos, pourquoi? »

Honoré de Balzac

«On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres, mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.»

Henri Poincaré

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord adresser mes plus sincères remerciements à Catherine Jumarie, pour son support constant, sa générosité, sa patience et sa gentillesse. Je remercie également Robert Moreau, pour son écoute, ses conseils. Vous avez cru en moi depuis le début et m'avez donné la chance de faire cette maîtrise. Ces deux années de maîtrise m'ont apporté énormément, tant au-niveau de l'organisation, que de la curiosité intellectuelle, mais surtout de la confiance en moi. Je me servirai de cette expérience tout au long de ma vie.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire : Marc pour m'avoir conseillé et aidé dans les débuts du projet. À Amandine, qui a fini sa maîtrise trop tôt! J'aurais aimé passer plus de temps avec toi au laboratoire, avec nos musiques et nos discussions. À tous mes collègues dans le laboratoire de Robert Moreau : Céline, Corine, Olga, Marine, Abdallah et Rachel.

Un grand merci à mes amis Gwenaël Brisé et Virginie Roposte pour tous les moments passés ensemble, pour vos conseils, vos encouragements, et votre amitié! Enfin, merci à mes parents Marie et Gérard, qui m'ont permis de poursuivre mes études, pour leur soutien constant et surtout pour leur amour sans limite. Je remercie également mon frère Fabien, mes sœurs Aurélia et Stéphanie, mes grands-parents Annick et Gérard. Et bien sûr, un merci à toi, Louis.

Qu'il me soit aussi permis d'associer à ces remerciements toutes les personnes non citées qui, d'une façon ou d'une autre ont participé à mes travaux.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION	1
PREMIÈRE PARTIE	
MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET JUSTIFICATION DE LA DÉMARCHE EXPERIMENTALE	3
CHAPITRE I	
LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT.....	4
1.1 Propriétés physico-chimiques	4
1.2 Sources de Cd.....	5
1.2.1 Naturelles.....	5
1.2.2 Anthropiques.....	6
1.3 Cd dans le sol et l'eau.....	7
CHAPITRE II	
LE MÉTABOLISME DU CADMIUM.....	9
2.1 Absorption.....	9
2.2 Distribution.....	9
2.3 Excrétion.....	10
2.4 Effets toxiques.....	11
2.4.1 Système digestif.....	11
2.4.2 Poumons.....	11
2.4.3 Reins.....	11

2.4.4 Os.....	12
---------------	----

CHAPITRE III

L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....	13
------------------------------	----

3.1 Paroi du tube digestif.....	13
3.2 Épithélium de l'intestin grêle.....	14
3.3 Villosités.....	15
3.4 Entérocytes.....	15
3.5 Transport intestinal de Cd.....	16

CHAPITRE IV

LE MÉTABOLISME OSSEUX.....	17
----------------------------	----

4.1 Histologie de l'os.....	17
4.2 Régulation de la calcémie.....	17
4.3 La matrice osseuse.....	18
4.4 Remodelage osseux.....	19
4.4.1 Ostéoblastes.....	19
4.4.2 Ostéoclastes.....	21
4.5 Rôle du zinc dans le métabolisme osseux.....	22
4.6 Effets du Cd sur le tissu osseux.....	23

CHAPITRE V

LES TRANSPORTEURS DE ZINC.....	25
--------------------------------	----

5.1 Généralités sur le Zn.....	25
5.2 Absorption du Zn.....	27
5.3 Transporteurs de Zn.....	28
5.4 La famille des ZIP.....	28
5.5 La famille des ZnT.....	30

CHAPITRE VI	
OBJECTIF ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	33
6.1 Hypothèses.....	33
6.2 Choix des transporteurs de Zn étudiés.....	34
6.3 Modèles cellulaires.....	35
6.3.1 La lignée cellulaire Caco-2.....	35
6.3.2 La lignée cellulaire MG63.....	36
CHAPITRE VII	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	38
7.1 Culture cellulaire.....	38
7.2 Mesures du transport transépithélial et de l'accumulation cellulaire du Cd.....	38
7.3 Localisation par immunofluorescence.....	39
7.4 Quantification des protéines.....	39
7.5 Réaction en chaîne par la transcriptase-inverse et polymérase.....	40
7.6 Analyses statistiques.....	40
DEUXIÈME PARTIE	
PRÉSENTATION DES RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	41
CHAPITRE VIII	
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	42
8.1 Profils d'expression géniques des transporteurs de Zn des lignées à l'étude.....	42
8.2 Transport de ¹⁰⁹ Cd.....	46
8.3 Localisation cellulaire de ZIP4.....	57
CONCLUSION.....	62
RÉFÉRENCES.....	64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Répartition de l'usage du Cd dans différents secteurs d'activité pour l'année 1997.....	7
3.1	Représentation des différentes couches de l'intestin grêle.....	14
3.2	Structure de la barrière intestinale.....	16
4.1	Représentation des cellules osseuses.....	19
4.2	Le remodelage osseux	22
6.1	Structure de l'épithélium intestinal.....	34
6.2	Cultures de cellules Caco-2 A) indifférenciées (J7) et B) différenciées (J21) (grossissement: 10X).....	36
6.3	Cellules MG63 après 7 jours de culture (grossissement: 10X).....	37
8.1	A) Expression génique des transporteurs de Zn dans les cellules MG63 et B) Analyses densitométriques normalisées sur l'expression de l'actine.....	43
8.2	A) ARNm de ZIP1, ZIP4, ZIP8 et hZTL1 dans les cellules Caco-2 B) Analyses densitométriques normalisées sur l'expression de l'actine. et C) Niveaux d'expression obtenus au jour 21 normalisés sur ceux du jour 7.....	44
8.3	A) Accumulation (3 min) de 0.5 µM de ¹⁰⁹ Cd dans les cellules MG63 à pH 5.5, 7.4 et 8.5, en absence (Ctrl) ou en présence de 100 µM de Cd, de Mn ou de Zn B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la situation Ctrl respective à chaque pH.	48

8.4	A) Accumulation (3 min) de 0.5 μM de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J7) à pH 5.5, 7.4 et 8.5, en absence (Ctrl) ou en présence de 100 μM de Cd, de Mn ou de Zn. B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la condition Ctrl respective.	50
8.5	A) Niveaux d'accumulation (3 min) de 0.5 μM de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J21) à pH 5.5, 7.4 et 8.5, en absence (Ctrl) ou en présence de 100 μM de Cd, de Mn ou de Zn.	52
8.6	Accumulation (3 min) de 0.5 μM de ^{109}Cd dans les cellules MG63 à pH 7.4 en absence (Ctrl), en présence de 100 μM de Cd, de Mn ou de Zn avec ou sans 20 mM de HCO_3^- B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la situation Ctrl respective.	53
8.7	A) Niveaux d'accumulation (3 min) de 0.5 μM de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J7, J21) dans un milieu chloré ou nitraté, en absence (Ctrl) ou en présence de 100 μM de Cd, de Mn ou de Zn. B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la situation Ctrl respective.....	55
8.8	Détection de ZIP4 par immunofluorescence dans des cellules Caco-2 A) (J7) B) (J21).	57
8.9	Détection de ZIP4 par immunofluorescence dans des cellules MG63.....	59
8.10	Détection de ZIP4 par immunofluorescence dans des cellules COS-7.....	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Caractéristiques physico-chimiques du Cd.....	5
2.1	Échelle de gravité d'une intoxication aiguë	11
5.1	Sources alimentaires de Zn	26
8.1	Fréquence d'observation de l'expression génique des transporteurs de Zn dans toutes les cultures indépendantes testées.....	46
8.2	Spéciation du cadmium dans le milieu de transport selon le pH.....	56

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
GSH	glutathion réduit
MT-Cd	complexe métallothionéine-cadmium
PCR	polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
RE	réticulum endoplasmique
RT	reverse transcriptase (transcriptase inverse)
Si-RNA	small interfering ribonucleic acid (petit ARN interférent)

Produits chimiques

BSA	bovine serum albumin (albumine du sérum bovin)
DMEM	dulbecco's modified eagle essential minimum medium (milieu minimum essential modifiée par Dulbecco eagle)
EDTA	acide éthylènediaminotétraacétique
FBS	fetal bovin serum (sérum bovin foetal)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
PBS	phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

Symboles chimiques

Ca	calcium
Ca ²⁺	ion calcium (II)
Cd	cadmium
Cd ²⁺	ion cadmium (II)
CdCl ₂ :	chlorure de cadmium
CdCO ₃ :	carbonate de cadmium
CdO	oxyde de cadmium
Cl ⁻	ion chlorure (I)
CO ₂ :	dioxyde de carbone
Fe	fer
Fe ²⁺ :	ion ferreux (II)
H ⁺	proton
HCO ₃ ⁻	ion bicarbonate (I)
K	potassium
K ⁺	ion potassium (I)
Mg	magnésium
Mg ²⁺	ion magnésium (II)
Mn	manganèse
Mn ²⁺	ion manganèse (II)
Na	sodium
Na ⁺	ion sodium (I)
NO ₃ ⁻	ion nitrate (I)
Ni	nickel
O ₂	dioxygène
-OH	groupement hydroxyle
Pb ²⁺	ion plomb (II)
PO ₄ ²⁻	ion phosphate (II)
Zn	zinc
Zn ²⁺	ion zinc (II)
ZnS	sulfure de zinc
¹⁰⁹ Cd	isotope radioactif du Cadmium

Protéines

Alb	albumine
ALP	phosphatase alcaline
CAII	anhydrase carbonique (II)
CDF	cation diffusion facilitator
Cys	acide aminé cystéine
DMT1/DCT1	divalent metal transporter 1 (transporteur de métal divalent 1)
DCT2	divalent metal transporter 2 (transporteur de métal divalent 2)
DCT3	divalent metal transporter 3 (transporteur de métal divalent 3)
hZTL1	zinc transporter (ZnT5)
NRAMP2	protéine associée à la résistance naturelle du macrophage 2
M-CSF	facteur de stimulation des colonies de macrophages
MT	métallothionéine
MTF-1	facteur de transcription qui répond aux métaux
OPG	ostéoprotégérine
PTH	parathormone
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RBP	rétinol binding protéine
TRAP	acide tartrate-résistante
ZnT1-8	zinc transporter 1-8
ZIP1-14	zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter 1-14

Autres abréviations

AE	acrodermatite entéropathique
DO	densité optique
pH	potentiel d'hydrogène
UV	ultraviolet
Ctrl	contrôle

LISTE DES SYMBOLES

[]	concentration
%	pourcentage
°C	degrés Celsius
g	accélération due à la pesanteur (m/s^2)
g	gramme
h	heure
kb	kilobase
kbp	kilo paires de bases
Da	dalton
kg	kilogramme
cm ²	centimètre carré
l	litre
m	mètre
mm	millimètre
cm	centimètre
cm ²	centimètre carré
m ³	mètre cube
m ²	mètre carré
<	inférieur
>	supérieur
M	molaire
min	minute
mol	mole
α	alpha
β	bêta
γ	gamma
μ	micro

RÉSUMÉ

Le Zinc (Zn) est un métal important pour de nombreux processus physiologiques, notamment dans le métabolisme osseux. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'implication possible de transporteurs de zinc (ZIP) dans l'influx de Cd dans la cellule. Le cadmium (Cd), métal cancérigène pour l'homme est suspecté d'emprunter certains ZIP, en particulier ZIP4 responsable de l'absorption intestinale du Zn, par mimétisme ionique. Des études montrent que ZIP8 participe à l'accumulation de Cd dans certains tissus. Parallèlement à la lignée cellulaire intestinale Caco-2, indifférenciés (J7) et différenciés (J21), la lignée ostéoblastique MG63 a été choisie. L'expression d'acide ribonucléique messager (ARNm) de ZIP 1, 4, 8 et hZTL1 a été déterminée par transcription inverse et polymérisation en chaîne (RT-PCR). Dans les cellules Caco-2, l'expression de ZIP8 et de hZTL1 est stable, celle de ZIP4 augmente avec la différenciation tandis que l'expression de ZIP1 diminue avec celle-ci. Les cellules MG63 expriment les ZIP et hZTL1 à des niveaux comparables. La détection par immunofluorescence de ZIP4 à la membrane des cellules Caco-2 confirme les résultats obtenus par RT-PCR. Le transport de ^{109}Cd ($0.5 \mu\text{M}$) a été mesuré dans plusieurs conditions expérimentales afin de tester une éventuelle compétition entre le Zn, le Cd et le manganèse (Mn). Dans les cellules Caco-2 (J7, J21), les pourcentages d'inhibition (70% du transport saturable) par le Zn et le Mn sont comparables. Dans les cellules MG63, l'accumulation de ^{109}Cd est plus fortement inhibée par le Zn que par le Mn. L'ajout de HCO_3^- augmente l'inhibition par le Zn et le Mn. Ces résultats suggèrent que ZIP8 et ZIP4 sont impliqués en partie dans l'accumulation de Cd.

Mots-clés : cellules Caco-2; cellules MG63; zinc; ZIP4; ZIP8; cadmium

INTRODUCTION

Le Cd est un métal lourd, cancérigène pour l'Homme. Son utilisation par l'Homme concerne surtout la production industrielle. En effet, le Cd est utilisé pour la production des piles nickel-cadmium, mais aussi pour les pigments de peintures, les alliages pour les pièces mécaniques et automobiles. Cette grande utilisation du Cd augmente considérablement ses rejets dans l'environnement. Sa tendance à s'accumuler dans l'eau et le sol est responsable d'un phénomène appelé bio-accumulation. Le Cd peut s'accumuler dans les espèces animales et végétales et remonter ainsi la chaîne alimentaire jusqu'à l'Homme.

Le Cd est un problème de santé majeur. La population globale est exposée au Cd par l'alimentation mais aussi par l'inhalation (tabagisme, exposition en milieu professionnel). Les épithélia intestinal et pulmonaire sont les premières barrières biologiques franchies lors d'une intoxication au Cd. De plus, dans les années 1912, au Japon, il y a eu une intoxication massive au Cd lorsqu'il y a eu des rejets miniers dans la rivière Jinzu et cette eau a été utilisée pour irriguer les rizières. Le Cd s'est accumulé dans le riz dont la consommation a provoqué de l'ostéomalacie et une néphrotoxicité aigüe. Les organes cibles du Cd sont donc les reins et les os.

Comme le Cd est un métal lourd non-essentiel, il semble improbable qu'il existe des transporteurs spécifiquement dédiés à son absorption dans les cellules. De par sa nature de cation divalent sous forme ionique, le Cd est suspecté d'emprunter des transporteurs cellulaires nécessaires pour l'absorption de nutriments essentiels pour l'homéostasie du corps. Dans le cadre de ce mémoire, nous focaliserons sur les ZIP *zinc-regulated transporter*, *iron-regulated transporter* (ZRT, IRT), transporteurs responsables de l'influx de Zn dans la cellule. Comme l'épithélium intestinal est la première barrière franchie lors d'une intoxication au Cd par la nourriture, nous nous intéresserons aux transporteurs de Zn intestinaux. De plus, comme l'os est un organe cible, on cherchera à déterminer l'implication des transporteurs de Zn dans l'accumulation de Cd dans ces tissus.

La première partie de ce mémoire présentera le Cd dans l'environnement, son utilisation, ainsi que son métabolisme dans l'organisme. Nous décrirons aussi l'épithélium intestinal, et plus particulièrement les entérocytes, cellules principalement responsables de l'absorption intestinale. Le tissu osseux sera ensuite décrit, avec ses rôles physiologiques, les différents types de cellules impliquées dans le remodelage osseux. Enfin, on s'intéressera au Zn, ainsi qu'aux transporteurs responsables de son transport dans les cellules. La problématique et les objectifs seront ensuite présentés. La seconde partie sera composée de nos résultats ainsi que d'une discussion générale.

PREMIERE PARTIE

**MISE EN CONTEXTE DE L'ETUDE ET JUSTIFICATION
DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE**

CHAPITRE I

LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

1.1. Propriétés physico-chimiques

Le Cd a été découvert en 1817 par le pharmacien Friedrich Stromeyer (tableau 1.1). Le Cd, porte le numéro 48 dans le tableau périodique. Son poids atomique est $112,4 \text{ g.mol}^{-1}$. Son électronégativité de Pauling est à 1.7 et sa masse volumique est de 8.7 g.cm^{-3} à 20°C . Le point de fusion est atteint à 321°C et son point d'ébullition à 767°C (Brignon et Malherbe, 2005). L'origine du nom vient d'une mine de Zn à Kadmos situé proche de Thèbes. Le Cd est un métal non essentiel contrairement à d'autres ions divalents tels que le Zn ou le fer (Fe) et est classé comme carcinogène humain du Groupe 1 par l'Agence International de Recherche sur le Cancer (Nordberg, 2007). Le Cd se présente comme un métal blanc-argenté, malléable. Il possède deux degrés d'oxydation (0 et +2) mais c'est sous la forme cationique qu'il est le plus souvent retrouvé. Cette dernière propriété, lui procurant une forte affinité pour les donneurs électrons, permet au Cd de se complexer avec divers ligands pour former l'oxyde de Cd (CdO), le carbonate de Cd (CdCO_3) ou encore le chlorure de Cd (CdCl_2).

Numéro atomique	48
Masse atomique	112,4 g.mol ⁻¹
Electronégativité de Pauling	1,7
Masse volumique	8,7 g.cm ⁻³ à 20°C
Température de fusion	321 °C
Température d'ébullition	767 °C
Rayon atomique (Van der Waals)	0,154 nm
Rayon ionique	0,097 (+2)
Isotope	¹⁰⁹ Cd
Configuration électronique	[Kr] 4d10 5s2
Energie de première ionisation	866 kJ.mol ⁻¹
Energie de deuxième ionisation	1622 kJ.mol ⁻¹
Potentiel standard	-0,402 V

Tableau 1.1 : Caractéristiques physico-chimiques du Cd (Brignon et Malherbe, 2005)

1.2 Sources de Cd

1.2.1 Naturelles

Le Cd est retrouvé naturellement au niveau de la croûte terrestre, dans les roches ainsi que dans les minerais en combinaison avec le Zn (Nordberg, 2007)). De façon naturelle, une grande quantité de Cd est libérée dans l'environnement. Il provient surtout de l'érosion des roches et se retrouve ainsi dans le sol, dans les rivières, mais aussi dans l'air lorsqu'il y a des feux de forêts ou de l'activité volcanique (Brignon et Malherbe, 2005).

1.2.2 Anthropiques

Le Cd est utilisé dans de nombreuses applications, comme anticorrosif pour les processus de galvanisation et d'électrodéposition, comme alliage avec le cuivre pour les pièces automobiles, comme pigments pour les plastiques et les peintures avec des teintes variant entre le jaune, le rouge, l'orangé et le marron (figure 1.1). Le Cd et ses composés sont aussi utilisés pour les batteries électriques, les composantes électroniques et les réacteurs nucléaires. Il est utilisé pour la fabrication des piles rechargeables au Nickel-Cd (Ni-Cd). L'application d'autres métaux moins toxiques que le Cd mais tous aussi performants ont permis de restreindre l'utilisation de Cd dans de nombreux pays (Ford, 2004). Au 21^{ème} siècle, 77% de l'utilisation globale du Cd était destinée aux batteries Ni-Cd, 11% aux pigments et 8% aux processus d'électrodéposition et de galvanisation. Le Cd est aussi présent dans l'industrie comme sous-produit issu de l'extraction du Zn, du plomb et du cuivre (Brignon et Malherbe, 2005). Mais cette diminution d'utilisation concerne surtout les pays les plus industrialisés. Il reste une source majeure de préoccupation pour les travailleurs industriels et les populations vivants dans des zones polluées, surtout dans les pays moins développés. On retrouve aussi le Cd dans les pesticides et les engrais, il peut ainsi se retrouver dans l'environnement au niveau des sols et dans l'eau de ruissellement (Brignon et Malherbe, 2005). Lorsque les composés manufacturés sont finalement détruits, le Cd est dispersé dans l'environnement et peut persister dans le sol et les sédiments pendant des décennies par sa grande demi-vie (Bernard, 2008). Le Cd devient un polluant environnemental et sa demi-vie dans certains compartiments est très longue (Martin *et al.*, 2006).

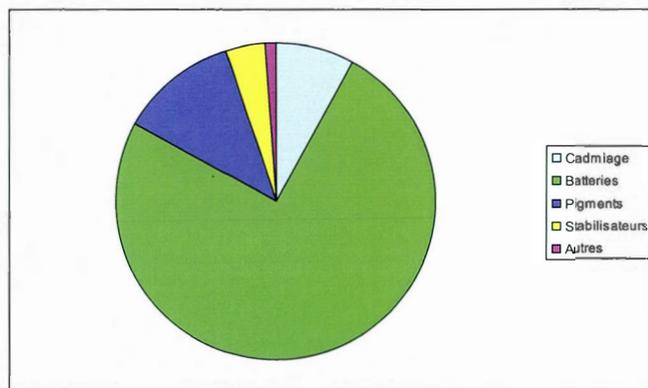


Figure 1.1 : Répartition de l'usage du Cd dans différents secteurs d'activité pour l'année 1997 (Brignon et Malherbe, 2005).

1.3 Cd dans le sol et l'eau

Les déchets des industries du raffinage de métaux finissent la plupart du temps dans les sols. Des flux de Cd peuvent être libérés lors de l'extraction de Zn et l'épandage d'engrais bio-industriels, de fertilisants à base de phosphate ou de boues d'épuration d'eaux usées. Ces fertilisants et ces boues appliqués sur les terres agricoles libèrent du Cd dans les sols et dans les eaux de surface. Le Cd s'adsorbe fortement sur la matière organique du sol. Il peut en résulter une accumulation excessive qui peut avoir des répercussions sur les plantes ainsi que sur l'écosystème du sol. En effet, les organismes essentiels du sol comme les bactéries ou les vers de terre sont très sensibles au Cd et ce, même à de faibles concentrations. De plus, les animaux qui s'alimentent de végétaux ont des niveaux de Cd plus élevés. De nombreux cas rapportés ont montré que les vaches se nourrissant sur des terres contaminées au Cd ont des teneurs rénales en Cd élevées (Mason, 1990). De par son haut taux de transfert entre le sol et les plantes, le Cd est le contaminant le plus trouvé dans les produits alimentaires qui représentent une source d'exposition majeure pour les non-fumeurs et les populations non-professionnellement exposées (Clemens, 2006 ; McLaughlin *et al.*, 2006 ; Satarug *et al.*, 2011). En entrant dans la chaîne alimentaire, le Cd peut être bioamplifié jusqu'à l'humain.

Dans l'eau, le Cd est retrouvé dans les sédiments et sur les particules en suspension et sa concentration est faible dans la phase aqueuse. Dans les eaux non polluées, les concentrations de Cd sont inférieures à 1 µg/L. La contamination de l'eau consommable se produit lorsque des impuretés de Cd se retrouvent dans le Zn utilisé

pour galvaniser les métaux. Le Cd atmosphérique peut, après déposition, augmenter la concentration totale de Cd dans le sol, mais cette concentration est le plus souvent inférieure à 1 mg/Kg (Nordberg, 2007). Au niveau des écosystèmes aquatiques, le Cd est bioaccumulé par les crevettes, les poissons, les huitres et autres crustacés. En revanche, les organismes des eaux salées seraient plus résistants au Cd que ceux des eaux douces(Mason,1990).

CHAPITRE II

LE MÉTABOLISME DU CADMIUM

2.1 Absorption

Chez l'humain, le Cd est absorbé essentiellement par les voies respiratoires et digestives. L'exposition par inhalation survient surtout chez les travailleurs industriels par les poussières et les fumées. Les fumeurs sont aussi exposés à des niveaux significativement plus élevés en Cd. Les fumées de tabac transportent le Cd directement dans les poumons. Ces expositions au Cd peuvent se produire chez les personnes vivant proche de sites de déchets dangereux, d'usines ou d'industries du raffinage de métaux qui relâchent du Cd dans l'air. Environ 10 à 50% du Cd inhalé est absorbé et ce niveau augmente lorsque les particules et les fumées sont plus petites. L'absorption orale du Cd, voie dominante dans la population, se fait essentiellement par la nourriture (Mason, 1990) et c'est pour cette raison que l'absorption intestinale du Cd a fait l'objet de nombreuses études. Les aliments riches en Cd comme le foie, les champignons, les huîtres, les fruits de mer peuvent représenter un apport alimentaire non négligeable en Cd. Entre 3 à 5% du Cd ingéré est absorbé chez l'humain (Nordberg, 2007). Environ 90 à 95 % du Cd ingéré par l'alimentation n'est pas absorbé et se retrouve directement dans les fèces. Ainsi, le contenu des fèces en Cd représente un bon indicateur de la consommation quotidienne par voie alimentaire. Bien que le taux d'absorption par l'ingestion soit plus faible que par l'inhalation, certains facteurs favorisent l'absorption intestinale comme le jeune âge ou une déficience en fer (Lauwerys, 2007). La biodisponibilité du Cd se retrouve aussi modifiée par la nature du composé et de la source. Des études ont montré que le taux d'absorption orale est plus grand lorsque le Cd est administré sous forme CdCl_2 que sous la forme Cd-métallothionéine (Cd-MT) (Lauwerys, 2007). La voie cutanée n'est pas assez significative pour être prise en compte (Lauwerys, 2007).

2.2 Distribution

Après avoir été absorbé via les poumons ou l'intestin, le Cd est transporté dans tout le reste du corps par la circulation sanguine (Nordberg, 2007). Le Cd est largement distribué dans le foie et les reins. Dans le sang, le Cd est intra-érythrocytaire (90-95%), fixé à l'hémoglobine (Lauwerys, 2007). Dans le plasma, le Cd se lie essentiellement à l'albumine ainsi qu'à d'autres protéines de haut poids moléculaires. Le complexe albumine-Cd se dissocie au foie, résultant en une accumulation de Cd qui induit la synthèse de métallothionéine (MT). C'est sous la forme Cd-MT que le Cd est transporté du foie vers les autres organes. Le transport de Cd dans les organes étant influencé par la concentration de MT dans le plasma, la distribution du Cd est différente selon que l'exposition est aiguë ou chronique (Nordberg, 2007).

2.3 Excrétion

L'excrétion urinaire est la voie d'élimination principale pour le Cd; elle est de 1 à 2 µg par jour. Le Cd est aussi excrété dans les fèces sous forme de fraction non absorbée. Le taux d'excrétion fécale est proportionnel à la charge corporelle de Cd. Une partie du Cd hépatique est excrétée dans les intestins par la bile et le suc pancréatique sous forme de conjugué au glutathion réduit (GSH). La sécrétion biliaire permet d'éliminer les molécules non excrétées par le rein mais peut être contrebalancée par un cycle entéro-hépatique. La bile contenant le GSH-Cd se répand dans le duodénum par l'ampoule de Vater. Le conjugué peut être hydrolysé ce qui entraîne une libération du Cd. Le Cd libre peut ainsi être réabsorbé au niveau du duodénum et être transporté au foie par la veine porte-hépatique. Les nouveaux complexes GSH-Cd sont ensuite déversés par le foie dans la lumière duodénale.

La MT, dont l'expression est inductible par les métaux, est une classe de protéine avec un poids moléculaire d'environ 6 KDa. Elle est composée de plusieurs groupements sulfhydriles qui lui confèrent la capacité de lier divers métaux comme le cuivre, le Zn et le Cd. Étant donnée sa petite taille, le complexe Cd-MT peut être filtré à travers la membrane glomérulaire rénale. Il est ensuite réabsorbé par les cellules du tube proximal où il est catabolisé dans les lysosomes, ce qui relâche les ions Cd²⁺. La tendance du Cd à s'accumuler dans l'organisme et son faible taux d'excrétion sont responsables de sa longue demi-vie d'environ 20 à 40 ans chez l'humain (Mason, 1990)

2.4 Effets toxiques

2.4.1 Système digestif

Une intoxication aiguë au Cd par voie orale peut provoquer des troubles digestifs, notamment des nausées, des crampes épigastriques, des vomissements et de la diarrhée (Tableau 2.1).

<i>Doses uniques</i>	<i>Effets</i>
3 à 90 mg	Seuil émettant. Désordres gastro-intestinaux décrits mais sans issue fatale.
15 mg	Vomissements produits expérimentalement.
10 à 326 mg	Symptomatologie sévère observée.
350 à 500 mg	Dose létale estimée.
1 580 à 8 900 mg	Cas avec issue fatale rapportés.

Tableau 2.1: Échelle de gravité d'une intoxication aiguë (Lauwerys, 2007)

2.4.2 Poumons

L'inhalation aiguë de Cd provoque des pneumonies. Une exposition à long terme à de faibles concentrations dans l'air provoque des maladies d'obstruction chronique des bronches. L'exposition chronique au Cd peut mener à des cancers pulmonaires (Lauwerys, 2007).

2.4.3 Reins

Les reins sont l'organe cible du Cd (Nordberg, 2007). Une exposition chronique au Cd provoque une néphropathie, une tubulopathie proximale pouvant mener à une protéinurie tubulaire se traduisant par une excrétion anormalement élevée de protéines de faible poids moléculaire comme la bêta-2-microglobuline et le *rétnol binding proteine* (RBP). Ces protéines filtrées au glomérule sont normalement réabsorbées par le tubule proximal, mais elles se retrouvent dans l'urine car la néphropathie et la

cytotoxicité du Cd affectent la capacité de réabsorption du rein. C'est un signe primaire d'atteinte rénale.

2.4.4 Os

L'exposition à long terme de Cd, peut mener aussi à une perturbation du métabolisme calcique, à l'ostéoporose ou l'ostéomalacie, surtout chez les femmes post-ménopausées (Suzuki *et al.*, 2004). L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une densité minérale osseuse faible ainsi qu'une dégradation de la micro-architecture de l'os, provoquant une fragilité osseuse et une augmentation du risque de fractures (Meunier, 2005). L'ostéomalacie est un défaut de minéralisation du tissu ostéoïde, généralement causée par un déficit en vitamine D ou un déficit en phosphore. Chez les enfants, on parle de rachitisme (Perrot, 2002). Il n'y a pas de traitement en cas d'empoisonnement au Cd mais lorsqu'il y a des signes d'ostéomalacie, il est possible d'administrer de la vitamine D. En 1940-1950, dans une zone polluée du Japon le Cd a été identifié comme étant la substance provoquant la maladie d'Itaï-Itaï. Cette maladie se caractérise par une néphrotoxicité aigüe et de l'ostéomalacie, signe d'un métabolisme osseux altéré. L'ostéomalacie peut être considérée comme étant un effet indirect de l'atteinte rénale car l'accumulation de Cd est plus importante dans les reins que dans les os. Mais selon certaines études, il a été montré que le Cd a un effet direct sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (Coonse *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2004, Wilson *et al.*, 1996). La section 4.1 décrit plus en détails l'effet du Cd sur les cellules osseuses intervenant dans le remodelage osseux.

CHAPITRE III

L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

3.1 Paroi du tube digestif

La particularité du tube digestif est qu'il est composé de quatre couches ou tuniques (figure 3.1), de l'œsophage au canal anal. On distingue 1) la muqueuse, 2) la sous-muqueuse, 3) la musculuse et 4) la séreuse.

La couche la plus externe, la muqueuse est composée d'un épithélium humide qui tapisse la lumière du tube digestif. Il joue un rôle dans la sécrétion du mucus, d'hormones et d'enzymes digestives, dans l'absorption des nutriments et dans la protection contre les agents pathogènes ou les substances toxiques. Cette muqueuse est composée aussi de trois sous-couches: 1) un épithélium de revêtement, 2) une lamina propria, 3) une muscularis mucosae. L'épithélium de l'intestin grêle, jouant un rôle primordial dans l'absorption des nutriments, sera décrit plus en détail dans la prochaine section. La couche juste en dessous, la lamina propria, est composée de tissu lâche aréolaire. Les nombreux capillaires qui la parcourent nourrissent l'épithélium et permettent une meilleure absorption des nutriments. A l'extérieur de la lamina propria se trouve la muscularis mucosae composée d'une fine couche de cellules de muscles lisses produisant des secousses musculaires localisées afin de déloger les particules qui resteraient collées sur la muqueuse (Marieb, 2005).

La sous-muqueuse, située sur la face interne de la muqueuse, est un tissu conjonctif composé de neurofibres et de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Son principal rôle est d'assurer une élasticité à l'estomac et de constituer un riche réseau vasculaire aux autres tissus de la paroi du tube digestif.

La musculuse est responsable du péristaltisme et de la segmentation. Cette tunique est composée d'une couche musculaire circulaire interne et d'une couche musculaire longitudinale externe. Elle peut aussi s'épaissir à certains endroits pour former un sphincter qui permet d'assurer un déplacement unidirectionnel de la nourriture.

Enfin, la séreuse qui est la couche la plus interne est composée du péritoine viscéral et d'un tissu conjonctif lâche aréolaire recouvert d'un mésothélium.

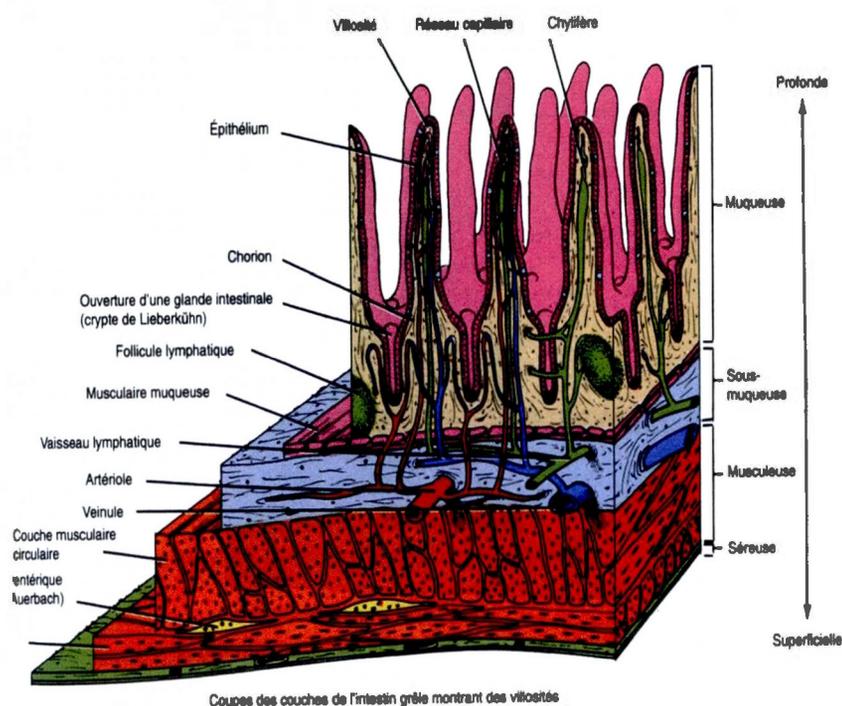


Figure 3.1 : Représentation des différentes couches de l'intestin grêle (Chevrier, 2002).

3.2 Épithélium de l'intestin grêle

L'intestin grêle est l'organe majeur de la digestion et son segment proximal est le site où l'absorption des nutriments est la plus efficace. Il peut se décrire comme étant un tube aux formes complexes qui va du sphincter pylorique, dans la région épigastrique, à la valve iléo-caecale où il rejoint le gros intestin. Il est divisé en trois segments (duodénum, jéjunum et iléon) distingués selon leur apparence anatomique et la structure histologique de leur muqueuse. Pour assurer sa fonction essentielle dans l'absorption des nutriments, l'intestin grêle possède des attributs qui lui permettent d'augmenter considérablement la surface d'absorption. Il y a les plis circulaires, les villosités intestinales et les microvillosités. Les plis circulaires ou valvules conniventes sont des replis de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Leur épaisseur peut atteindre près de 1 cm et leur rôle principal est de ralentir le chyme en le faisant tourner sur lui-même ce qui accroît l'absorption des nutriments. Chaque villosité se compose de capillaires sanguins et d'un capillaire lymphatique large appelé vaisseau chylifère. Les villosités

sont aussi composées d'une bande de muscles lisses leur permettant de se contracter et de s'allonger afin d'accroître le contact avec le contenu de la lumière intestinale ce qui favorise l'absorption (Marieb, 2005).

3.3 Villosités

Les villosités sont séparées par des cryptes où s'effectue la prolifération cellulaire. Elles sont recouvertes d'un épithélium simple dont toutes les cellules dérivent de cellules souches prolifératives de la crypte. Ces cellules souches donnent 4 types de cellules différentes: les entérocytes responsables de l'absorption des nutriments, les cellules endocrines sécrétant divers neuropeptides, les cellules de Paneth qui sécrètent le lysozyme, un puissant bactéricide qui protège l'intestin grêle, et les cellules caliciformes qui sécrètent du mucus. Ces cellules migrent pendant leur différenciation le long de l'axe crypte-villosité pour être relâchées dans la lumière au sommet des villosités lors du renouvellement de l'épithélium intestinal, à l'exception des cellules de Paneth qui restent dans la région de la crypte (Marieb, 2005).

3.4 Entérocytes

Le type cellulaire principal de l'épithélium intestinal est l'entérocyte hautement polarisé structurellement et fonctionnellement. La membrane en bordure en brosse est composée de microvillosités qui sont des petits replis de la membrane apicale plasmique (faisant face à la lumière intestinale) des cellules absorbantes ou entérocytes. Des transporteurs et des hydrolases ancrées sur la membrane en bordure en brosse assurent les fonctions d'absorption et de digestion (Marieb, 2005). On dénombre entre 2000 et 3000 microvillosités par cellule. Il existe deux voies principales qu'empruntent les nutriments pour rejoindre la circulation sanguine (figure 3.2). Il y a la voie transcellulaire qui est le passage à travers les cellules épithéliales elles-mêmes. Les nutriments franchissent donc deux membranes puisqu'ils rentrent dans la cellule par la membrane apicale, traversent le cytoplasme et ressortent par la membrane basolatérale où ils finissent par rejoindre la circulation sanguine. L'autre voie est paracellulaire et implique le passage entre les cellules adjacentes. Quelques ions essentiels comme le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le sodium (Na) et le potassium (K), peuvent passer entre les cellules. Contrairement à l'épithélium rénal, l'épithélium intestinal n'est pas

considéré étanche. Toutefois les molécules tel le glucose de 180 Da, ne franchissent pas les jonctions serrées.

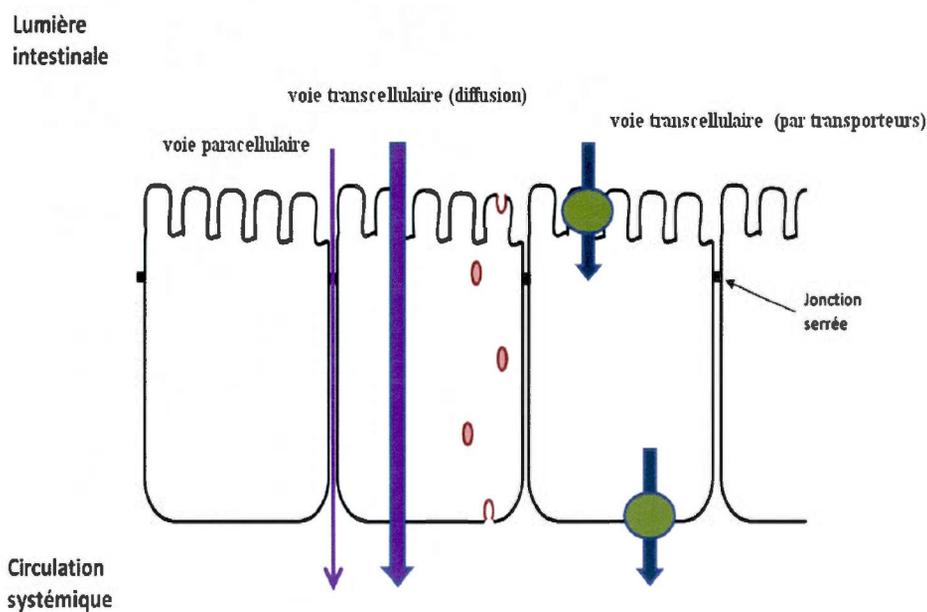


Figure 3.2: Structure de la barrière intestinale (Zeller, 2011).

3.5 Transport intestinal de Cd

Il a été montré *in vitro* au laboratoire du Dr Jumarie que le Cd n'emprunte pas la voie paracellulaire (Jumarie *et al.*, 1999). Le Cd rentre par le pôle apical, ressort très peu du côté basolatéral mais s'accumule dans l'entérocyte, ce qui est en accord avec la faible biodisponibilité orale de 3 à 5% *in vivo*. L'épithélium intestinal, qui est la première barrière devant être franchie par le Cd ingéré, offre donc une importante protection mais il représente aussi un tissu cible (Jumarie *et al.*, 1999). En effet, le Cd peut perturber l'intégrité de l'épithélium intestinal, augmenter la perméabilité paracellulaire, altérer la viabilité cellulaire ainsi qu'induire une réponse inflammatoire (Berzina *et al.*, 2007 ; Boveri *et al.*, 2004 ; Duizer *et al.*, 1999). Dans le cadre de ce projet, l'épithélium intestinal sera étudié relativement au rôle des transporteurs de Zn, élément essentiel à plusieurs fonctions cellulaires et au métabolisme osseux, dans l'absorption du Cd.

CHAPITRE IV

LE MÉTABOLISME OSSEUX

4.1 Histologie de l'os

L'os est un tissu conjonctif dense et dynamique qui, avec le cartilage, constitue le squelette. On dénombre chez l'Homme adulte environ 206 os alors que chez le nourrisson il y en a 350. Cette différence est due à la soudure de certains d'entre eux lors de la croissance. Le squelette et les os jouent un rôle clé dans diverses fonctions du corps. En effet, ils assurent une protection des organes internes, ils facilitent la mobilité du corps avec l'action des muscles, ils supportent toutes les structures corporelles, interviennent dans la régulation de la calcémie et ils sont impliqués dans la formation des cellules sanguines et immunitaires (Youyou, 2007).

4.2 Régulation de la calcémie

Le tissu osseux joue un rôle primordial dans la régulation de la calcémie. En effet, le corps humain adulte contient environ 1200 à 1400 g de calcium (Ca), dont 99% se trouvent sous forme de cristaux dans les os. Il existe deux grandes boucles de régulation; la première est un processus de régulation hormonale par inhibition rétroactive qui maintient l'homéostasie du Ca dans le sang et la seconde dépend des forces gravitationnelles et mécaniques qui agissent sur le squelette (Marieb, 2005). La régulation hormonale du métabolisme osseux est médiée par la parathormone (PTH) et la calcitonine. La PTH est libérée dans la circulation par les grandes parathyroïdes quand les niveaux de calcium sanguin sont bas. La PTH se lie à des récepteurs membranaires à la surface des ostéoblastes qui sont les cellules responsables de la formation osseuse, les conduisant à produire des facteurs qui stimulent l'activité des ostéoclastes qui sont les cellules responsables de la dégradation osseuse. La résorption osseuse ainsi stimulée provoque la libération de Ca dans le sang (Marieb, 2005). A l'inverse, lors d'une augmentation du Ca sanguin, il y a sécrétion de calcitonine et cette hormone inhibe l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes. Cette inhibition

provoque un dépôt de sels de Ca dans la matrice osseuse, baissant ainsi la concentration calcique sanguine (Marieb, 2005).

4.3 La matrice osseuse

Le tissu osseux est composé d'une matrice osseuse minéralisée elle-même constituée en majeure partie de collagène de type I. On distingue deux types de matrice osseuse. La première est une matrice inorganique composée de cristaux d'hydroxyapatite de Ca $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ainsi que d'impuretés comme le carbonate de magnésium, le carbonate de Ca ou encore le phosphate d'ammonium. Les cristaux d'hydroxyapatite se forment dans un réseau de fibres de collagène selon un processus appelé nucléation. Cet espace sert par la suite à conférer une rigidité à l'os et à stocker les différents nutriments comme les ions calcium (Ca^{2+}), phosphate (PO_4^{2-}) et magnésium (Mg^{2+}). On distingue aussi la matrice organique composée de micro-fibrilles de collagène I, de protéoglycane, d'ostéonectine, d'ostéopontine, d'ostéocalcine, de thrombospondine. La matrice osseuse contient des cytokines et facteurs de croissance qui sont sécrétés par les ostéoblastes et jouent un rôle important dans la régulation du remodelage du tissu osseux et de la minéralisation de la matrice osseuse (André *et al.*, 2008).

Quatre grands types de cellules sont présents dans le tissu osseux humain. Elles participent à la production, l'entretien ainsi qu'au modelage de l'ostéoïde. L'ostéoïde est une couche de fibrilles non minéralisées, produites par les ostéoblastes, qui fournit l'armature organique des lamelles osseuses en formation. On distingue les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes (Figure 4.1). Les cellules ostéoprogénitrices proviennent de cellules mésenchymateuses et constituent une population de cellules souches qui pourront se différencier pour donner des cellules aux caractéristiques plus spécifiques (ostéoblastes et ostéocytes) (Stevens, 1997).

La forme des cellules ostéoprogénitrices dépend de l'intensité du renouvellement osseux. En effet, dans l'os mature, avec un faible taux de remodelage, les cellules sont petites, en forme de fuseau et peuvent s'apparenter à des fibroblastes. Dans l'os fœtal ou dans un os adulte en période de remodelage intense, les cellules ostéoprogénitrices sont plus grosses, plus nombreuses, de forme cubique et correspondent aux ostéoblastes actifs (Stevens, 1997).

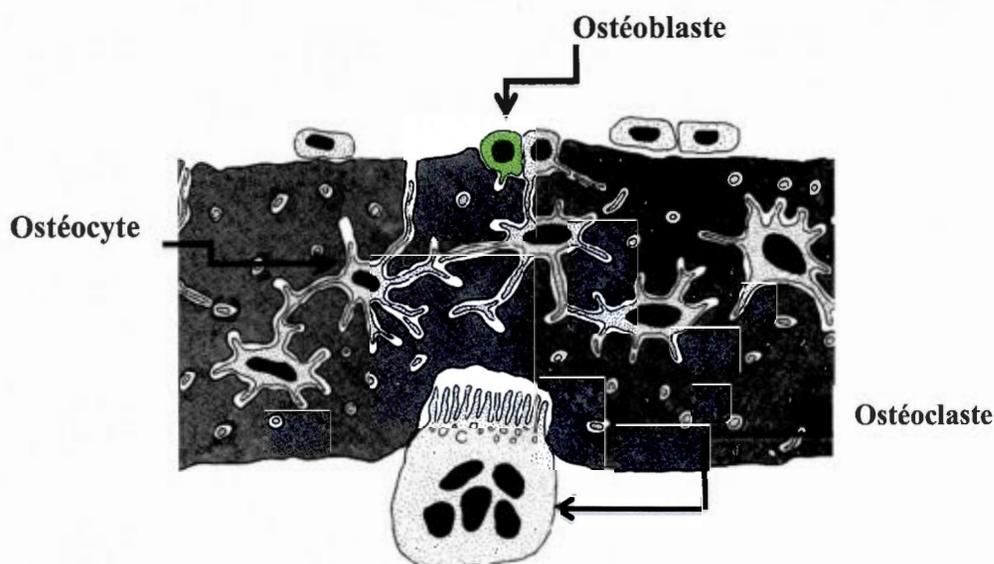


Figure 4.1 : Représentation des cellules osseuses (André *et al.*, 2008).

4.4 Remodelage osseux

Le tissu osseux est en continuel remodelage dont le taux est rigoureusement contrôlé. Les ostéoclastes sont responsables de la dégradation de l'ancienne matrice osseuse selon un processus de résorption alors que les ostéoblastes se chargent de former de la nouvelle matrice lors du processus de formation osseuse. L'équilibre entre ces deux processus distincts est fondamental pour conserver les propriétés mécaniques de l'os, prévenir le risque de fractures et maintenir l'homéostasie calcique. L'unité multicellulaire de base est la structure où se produit le remodelage. Les ostéoblastes et les ostéoclastes réalisent chacun leurs fonctions selon un ordre de temps très précis. Le cycle du remodelage osseux est d'environ 4 mois chez l'adulte avec une phase de résorption durant 2 semaines et une phase de formation pouvant s'étendre de 2 à 3 mois.

4.4.1 Ostéoblastes

Les ostéoblastes ou cellules bordantes ont pour rôle de synthétiser la matrice osseuse ou ostéoïde. Ils assurent ensuite une minéralisation adéquate par dépôt de cristaux d'hydroxyapatite de Ca en modulant les réserves d'ions Ca^{2+} et PO_4^{2-} . L'ostéoïde est composé de collagène de type I, de protéoglycanes ainsi que de glycosaminoglycanes. Selon le stade du remodelage osseux, il est possible de distinguer différentes protéines exprimées par les ostéoblastes. Lors de la phase de formation de la matrice osseuse, les

ostéoblastes expriment des niveaux élevés de phosphatase alcaline (ALP) et de collagène de type I. Enfin, lors de la phase de minéralisation, on remarque l'expression d'ostéocalcine, d'ostéopontine et de sialoprotéine osseuse. On distingue 2 types d'ostéoblastes selon leur activité de synthèse. Lorsque les ostéoblastes synthétisent de l'ostéoïde, les cellules adoptent une forme plus aplatie et fusiforme. Mais certains ostéoblastes peuvent être entourés de matrice osseuse minéralisée et demeurer dans de petites cavités de l'os appelées lacunes ostéocytaires. Ces cellules sont des ostéocytes (Stevens, 1997). Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os. Ils accumulent du glycogène cytoplasmique tout en produisant les composants de la matrice osseuse. Les ostéocytes peuvent communiquer entre eux et avec les ostéoblastes avoisinants par le biais de longs prolongements cytoplasmiques situés dans de minces canaux appelés canalicules. Ces prolongements cytoplasmiques permettent aussi aux ostéocytes de recevoir les nutriments essentiels à leur survie. Les ostéocytes, dans leurs lacunes, maintiennent autour d'eux une mince couche d'ostéoïde tout en développant un important appareil de Golgi, ce qui suggère un rôle dans l'entretien de la matrice organique (Stevens, 1997, (Youyou, 2007). En effet, les ostéocytes ont la particularité de synthétiser et de dégrader l'os autour d'eux afin d'assurer un maintien qualitatif de l'os (André *et al.*, 2008). Les ostéocytes peuvent rester longtemps insérés dans les lacunes même si l'importante proportion de lacunes vides dans les os âgés suggère une mort programmée par apoptose ou un processus de lyse par les ostéoclastes (André *et al.*, 2008; Stevens, 1997). Les cellules ostéoblastiques réalisent la formation et la minéralisation osseuse par sécrétion de composés matriciels, comme le collagène de type I et les protéines non-collagèneuses, et sécrètent aussi certains facteurs de différenciation ostéoclastique comme le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et le facteur de transcription *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL). Les ostéoblastes ont donc aussi pour rôle de moduler la résorption osseuse. Il va sans dire qu'une prolifération ostéoblastique, une différenciation, des fonctions sécrétoires ainsi qu'un taux d'apoptose adéquat sont importants pour maintenir un remodelage osseux normal (Mackie, 2003). Une perturbation de cet équilibre peut conduire à une perte de masse osseuse, au développement de l'ostéoporose ainsi qu'à l'augmentation du risque de fractures lorsque l'activité ostéoblastique est inhibée. Il peut y avoir aussi une surproduction de tissu osseux lorsque l'activité des ostéoblastes est favorisée par rapport l'activité ostéoclastique

4.4.2 Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la dégradation de la matrice osseuse et appartiennent à la famille des cellules myéloïdes (Ganong, 2005). Ce sont des cellules multinucléées avec des noyaux localisés à l'opposé de la surface osseuse. De plus, les ostéoclastes contiennent un nombre élevé d'organites comme les mitochondries, un appareil de Golgi développé et des vacuoles remplies de lysozymes (Youyou, 2007). Les ostéoblastes et les cellules du stroma expriment à leur surface le RANKL. Lorsque ces cellules viennent en contact avec les monocytes appropriés, le RANKL se lie au RANK à la surface des monocytes. Le M-CSF est également sécrété et se lie à un récepteur sur le monocyte (C-FMS). Cette combinaison de facteurs permet la différenciation du précurseur monocyte en ostéoclaste. De plus, les cellules précurseurs des ostéoblastes sécrètent l'ostéoprotégérine (OPG) qui exerce un contrôle sur la conversion des monocytes en agissant comme un compétiteur du RANKL pour la liaison au RANK (Ganong, 2005).

On distingue 5 phases lors du remodelage osseux. En premier lieu, la phase d'activation, où les cellules bordantes perçoivent un signal d'origine hormonale ou mécanique, qui se traduit par une dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située juste en dessous des cellules bordantes. Ceci permet aux précurseurs ostéoclastiques d'avoir accès à la matrice osseuse. La phase de résorption débute avec l'activation de précurseurs ostéoclastiques, présents dans la moelle osseuse, qui fusionnent entre eux, se différencient en ostéoclastes plurinucléés et finissent par s'attacher à la surface osseuse (Youyou, 2007). Les bords des ostéoclastes en contact avec l'os sont plissés, ce qui forme une membrane ondulée (bordure en brosse) qui adhère fortement à l'os et isole l'aire de destruction du tissu osseux (Marieb, 2005). Les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse par sécrétion d'enzymes lysosomiales et d'acide chlorhydrique. L'acidification de l'environnement permet la solubilisation des cristaux de la phase inorganique, tandis que les enzymes dégradent la partie organique, ce qui laisse un fossé appelé lacune de résorption ou lacune de Howship (Marieb, 2005).

À la fin de la résorption, les ostéoclastes meurent par apoptose. La phase de réversion est une phase de transition qui se produit lorsque les ostéoclastes en apoptose sont remplacés par les cellules bordantes et pré-ostéoblastiques dans les lacunes. Il y a alors apparition d'une ligne cémentante correspondant aux limites de l'ancien et du nouvel os. Cette ligne cémentante est riche en ostéopontine, ce qui permet l'activation des ostéoblastes (Youyou, 2007). Pendant la phase de formation, les ostéoblastes

amorcent la synthèse de la matrice protéique non minéralisée ou ostéoïde. Au bout de 2-3 semaines, l'ostéoïde se minéralise par la formation d'hydroxyapatite suite à un apport de Ca et de phosphate. Finalement durant la phase quiescente, les ostéoblastes se différencient en cellules bordantes et recouvrent la surface osseuse en attente d'une prochaine activation focale des ostéoclastes (Figure 4.2) (Youyou, 2007).

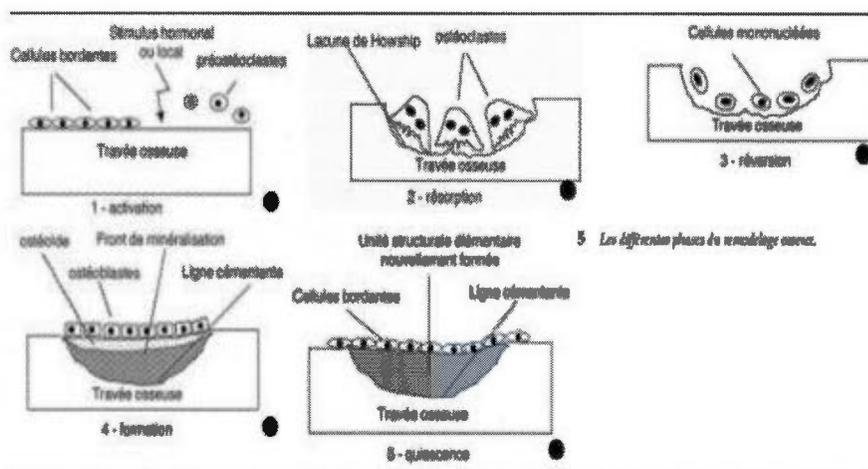


Figure 4.2 : Le remodelage osseux (Youyou, 2007).

4.5 Rôle du zinc dans le métabolisme osseux

Un apport nutritionnel minimal en Zn pour la formation osseuse normale a été décrit pour la première fois en 1941 (Hadley, Newman et Hunt, 2010). Les effets positifs du Zn sur la croissance osseuse et la minéralisation chez le rat (Becker et Hoekstra, 1966 ; Hurley, Gowan et Milhaud, 1969), ainsi que son effet inhibiteur sur l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes *in vitro* (Holloway *et al.*, 1996) démontrent le rôle essentiel du Zn dans la santé de l'os. Le Zn est important pour l'activité de plusieurs enzymes osseuses comme la phosphatase alcaline (ALP) (Oner, Bhaumick et Bala, 1984), la gélatinase de type IV (Collier *et al.*, 1988), l'anhydrase carbonique II (CAII) (Pocker et Sarkanen, 1978) et la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) (Minkin, 1982 ; Susi, Goldhaber et Jennings, 1966). Plusieurs études ont corrélé l'apport adéquat en Zn et la santé osseuse. Des diètes pauvres en Zn et de

faibles concentrations plasmatiques en Zn sont associées à une ostéopénie, baisse de la densité osseuse, à de l'ostéoporose et à un risque accru de fractures (Elmstahl *et al.*, 1998 ; Hadley, Newman et Hunt, 2010 ; Hyun, Barrett-Connor et Milne, 2004). Le Zn a des fonctions essentielles diverses dans l'organisme et joue clairement un rôle dans le métabolisme osseux. En effet, une déficience en Zn se traduit par un retard dans le développement du squelette (Long, 1997).

Le Zn exerce un effet direct sur la minéralisation de l'os par son action sur la nucléation et la croissance minérale. Dans les cellules MC3T3-E1, un clone de la lignée ostéoblastique murine MC3T3, le Zn stimule la prolifération cellulaire et l'activité de l'ALP tout en augmentant l'expression de plusieurs marqueurs ostéoblastiques comme le pro-collagène de type I, l'ostéopontine et l'ostéocalcine (Hadley, Newman et Hunt, 2010). De plus, même en petite quantité, le Zn inhiberait l'ostéoclastogénèse et la résorption et stimulerait l'activité ostéoblastique ce qui favorise la formation osseuse (Tang *et al.*, 2006). Les mécanismes de stimulation de la formation osseuse par le Zn ne sont pas encore élucidés tant le nombre de protéines et d'enzymes contenant du Zn est important dans les cellules osseuses (Tang *et al.*, 2006).

4.6 Effets du Cd sur le tissu osseux

L'exposition au Cd provoque des dommages au squelette qui se traduisent par le développement de l'ostéoporose et une augmentation du risque de fractures chez l'humain (Coonse *et al.*, 2007). Le Cd peut se fixer au niveau du tissu osseux et entrer en compétition directe avec le Ca. Les effets délétères sont augmentés lorsque l'apport de Ca par l'alimentation est insuffisant. Il y a deux mécanismes qui sont proposés pour expliquer les effets toxiques du Cd sur les os. Le premier mécanisme serait indirect, le Cd circulant affecte les cellules du tubule rénale proximal, amenant une diminution d'activation de la vitamine D3 ce qui diminue l'absorption intestinale de calcium et donc affecte le remodelage osseux (Chalkley, Richmond et Barltrop, 1998 ; Jarup, 2002). Le deuxième mécanisme impliquerait une action directe du Cd sur l'os en stimulant la résorption osseuse ou en inhibant la formation osseuse. Dans ces deux cas, le Cd induit une perte osseuse (Coonse *et al.*, 2007; Levesque *et al.*, 2008; Long, 1997; Martin *et al.*, 2006). Il a été montré *in vitro* que le Cd altère les fonctions et la viabilité des ostéoblastes (Angle *et al.*, 1993; Coonse *et al.*, 2007 ; Iwami et Moriyama, 1993 ; Levesque *et al.*, 2008) et des ostéoclastes (Iwami *et al.*, 1993). Le Cd a un effet cytotoxique direct sur des cultures ostéoblastiques qui se traduit par une diminution de

la synthèse de collagène, une altération de l'homéostasie calcique et une réduction du nombre de nodules de formation osseuse (Coonse *et al.*, 2007). De plus, le Cd perturbe les mécanismes de régulation du processus apoptotique dans de nombreux types cellulaires dont les cellules osseuses (Smith *et al.*, 2009). Une régulation adéquate de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est essentielle puisqu'elle permet de maintenir l'équilibre entre les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, et les ostéoblastes qui favorisent la formation osseuse. La perte d'apoptose des ostéoclastes altère le remodelage osseux et conduit à une perte osseuse comme l'ostéoporose (Coonse *et al.*, 2007). Le Cd stimule l'activité ostéoclastique sur de courtes périodes d'exposition et inhibe l'activité ostéoblastique lorsque l'exposition est prolongée (Suzuki *et al.*, 2004).

CHAPITRE V

LES TRANSPORTEURS DE ZINC

5.1 Généralités sur le Zn

Le Zn, de masse atomique 65 (Yu, Kirschke et Huang, 2007), est de couleur blanche. On trouve le Zn à l'état naturel dans de très nombreuses sources et malgré qu'il soit très toxique à hautes doses, il est un oligo-élément indispensable tant aux animaux qu'aux végétaux (Santé Canada, 1979). Il est un composant essentiel pour un grand nombre de protéines et d'enzymes (Berg et Shi, 1996; Jou *et al.*, 2010; (Berg et Shi, 1996 ; Wolfe, Grant et Pabo, 2003). Le Zn participe à de nombreuses réactions métaboliques, surtout comme agent catalyseur. On trouve le Zn dans plus de 80 systèmes enzymatiques où il a des rôles très variés. En effet, il peut jouer un rôle important dans la formation des membranes et des motifs à doigts de Zn (facteurs de transcription), comme catalyseur dans la fonction des métallo-enzymes, dans la réponse immunitaire, le développement des gonades sexuelles, la reproduction, l'activation d'hormones, la régénération des tissus lésés, ainsi que dans la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines (Matsuura *et al.*, 2009; Murgia *et al.*, 1999; Reeves, Briske-Anderson et Johnson, 2001). Les fonctions importantes du Zn dans la croissance et le développement demandent un apport important en Zn durant l'enfance (Jou *et al.*, 2010; MacDonald, 2000). L'observation d'une haute teneur en Zn dans la composition du lait durant les premières lactations suggère le besoin d'un apport élevé de Zn durant la période néonatale (Krebs et Hambidge, 1986). Dans la nourriture, on retrouve le Zn surtout dans les viandes, les fruits de mer, les noix, les poissons, mais l'huître est l'aliment qui en contient le plus (Santé Canada, 1979) (Tableau 5.1). Le Zn est aussi impliqué dans la transmission synaptique ainsi que dans la sécrétion de l'insuline par le pancréas (Semrad, 1999; Yu, Kirschke et Huang, 2007). Les cellules eucaryotes ont une remarquable capacité à réguler leur niveau de Zn intracellulaire. Une étude a montré que bien que les cellules soient exposées à des concentrations micromolaires de Zn libre, le niveau intracellulaire de Zn libre nécessaire pour réguler la transcription des transporteurs de Zn responsables de l'influx et de l'efflux est de l'ordre du femtomolaire (Outten et O'Halloran, 2001). Le Zn étant un oligo-élément, on trouve entre 2 à 3 g de Zn dans l'organisme. On retrouve 65% du Zn corporel total dans les muscles et 20% dans les os (100-300 µg/kg) (Tang *et al.*, 2006). Le reste du Zn se situe surtout dans le foie, les cheveux, les reins, le sperme, la prostate et les yeux (Santé Canada, 1979).

De plus, les concentrations en Zn sont élevées dans les os, les cartilages et les dents (Bergman et Soremark, 1968) et le Zn pourrait jouer un rôle dans le métabolisme osseux par la stimulation de la formation et de la minéralisation osseuse.

Aliments	Portions	Zn
Huîtres du Pacifique	100g	16-33 mg
Foie de veau	100g	9-12 mg
Bœuf, épaule, flanc ou surlonge	100g	7- 11 mg
Foie de bœuf ou de porc	100g	6-7 mg
Graines de sésame	60ml	3 mg
Beurre de sésame, tahini	30ml	3 mg
Palourdes en conserve	100g	3 mg
Poulet, viande brune	100g	3 mg
Champignons shiitakes	10 champignons (36g)	3 mg
Légumineuses	250ml	2-3 mg
Graines de citrouille et de courge	60ml	2-3 mg

Tableau 5.1 : Sources alimentaires de Zn (Santé Canada, 1979)

La biodisponibilité orale du Zn varie entre 10 et 80% selon la solubilité du composé de Zn, l'état nutritionnel ainsi que la présence de composés qui peuvent augmenter (acides aminés, acide picolinique) ou diminuer (calcium, phosphore, fibres, phytates) l'absorption du Zn (Salgueiro et al., 2000; Sandstead et Smith, 1996; Turnlund et al., 1991). Il est recommandé d'avoir un apport journalier de Zn de 15 mg.

L'absorption du Zn chez l'enfant n'est pas aussi bien régulée que chez l'adulte, ce qui augmente les risques de toxicité malgré la demande élevée en Zn durant l'enfance (Caulfield *et al.*, 1998). Chez l'adulte, l'homéostasie du Zn est atteinte grâce à un équilibre entre l'absorption intestinale et l'excrétion (King, Shames et Woodhouse, 2000).

5.2 Absorption du Zn

L'absorption de Zn est inversement reliée à la consommation par la diète; la capacité d'absorption intestinale est élevée lorsque le niveau de consommation de Zn est faible. Durant les périodes de fortes consommations, l'efficacité d'absorption diminue, car moins de transporteurs sont exprimés aux membranes cellulaires, mais la quantité totale de Zn absorbé augmente. L'intestin grêle est le site majeur d'absorption et d'excrétion du Zn. Un apport alimentaire inadéquat, des conditions qui diminuent l'absorption du Zn ou augmentent l'excrétion intestinale ou urinaire peuvent causer rapidement une déficience en Zn étant donnée la disponibilité limitée du stock de Zn échangeable dans le corps (Semrad, 1999). Le pool de zinc facilement disponible, situé surtout dans le sang, ne constitue qu'une petite réserve. Au total le sang ne contient que 2.5% du Zn dans l'organisme (10 mmol en équilibre avec le plasma) (Hambidge *et al.*, 2010). Le stock échangeable est la somme de toutes les réserves échangeables de Zn dans le sang et le plasma dans les 48-72 h et joue un rôle critique dans les processus biologiques dépendants du Zn. La taille de ce stock dépend directement de l'apport nutritionnel de Zn, de l'efficacité d'absorption et de l'excrétion de Zn endogène (Krebs *et al.*, 2003). De plus, les MT sont des protéines cytoplasmiques, riches en cystéines qui lient le Zn intracellulaire avec une grande affinité et peuvent donc fournir un pool de Zn lorsque les conditions sont limitantes (Andrews et Geiser, 1999; Dalton *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2002 ; Nath *et al.*, 1988 ; Suzuki *et al.*, 2005). Chez les animaux et les humains, la concentration circulante de Zn dépend directement de l'absorption de Zn provenant de l'alimentation. Un apport alimentaire déficient en Zn pendant quelques heures diminue la concentration de Zn au niveau du plasma et si la déficience diététique dure quelques jours, il est possible d'observer une diminution de la concentration en Zn dans les organes (Reeves, Briske-Anderson et Johnson, 2001). Pour maintenir une concentration en Zn optimale, il faut tenir compte d'un apport alimentaire suffisant en Zn ainsi que d'un taux d'absorption intestinale adéquat (Reeves, Briske-Anderson et Johnson, 2001).

Le Zn est un ion hydrophile qui possède une forme métallique (Zn^0) et un état d'oxydation (+2). Le Zn^{2+} , hautement chargé, ne peut pas traverser les membranes cellulaires par diffusion passive (Yu, Kirschke et Huang, 2007), et pour cela, il existe des mécanismes de transport spécifiques. Le transport de Zn peut se faire à travers des pores, surtout pour les substances liposolubles et les électrolytes, ou par des canaux ioniques qui permettent le passage d'ions spécifiques selon le gradient électrochimique. Le transport peut se faire via des transporteurs ou perméases. Ces protéines transmembranaires lient de manière spécifique la molécule à transporter, changent de conformation et libèrent la molécule à transporter de l'autre côté de la membrane. Si le transport spécifique suit le gradient de concentration, il est passif (diffusion médiée ou facilitée). Si par contre, il est contraire au gradient de concentration, ou génère ce gradient, il est actif et dépense (directement ou indirectement) de l'énergie.

L'absorption orale du Zn se fait majoritairement au niveau de l'intestin proximal par diffusion facilitée impliquant des transporteurs membranaires (Ford, 2004). Des études menées sur la lignée cellulaire intestinale Caco-2 montrent que le transport de Zn a des composantes saturables et non-saturables (Raffaniello et Wapnir, 1991). Un apport important en Zn diminue le nombre et/ou l'affinité des transporteurs de Zn (Reeves, Briske-Anderson et Johnson, 2001). Le mécanisme d'absorption intestinale est donc un processus modulé par les besoins de l'organisme impliquant des protéines spécifiques (Reeves, Briske-Anderson et Johnson, 2001). La fine régulation de l'homéostasie du Zn est une caractéristique fondamentale pour la survie cellulaire, puisque un excès de Zn, tout comme une déficience, est incompatible avec les fonctions cellulaires (Zemann *et al.*, 2011).

5.3 Transporteurs de Zn

L'homéostasie du Zn est régulée principalement par son transport intestinal via des protéines (King *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 1991) et trois familles de transporteurs de Zn ont été identifiées comme participant à la régulation de l'homéostasie du Zn : ZRT, IRT comme les protéines (ZIP) et la famille des « cation diffusion facilitator » (CDF). Les SLC30 (ZnT) et les SLC39 (ZIP) sont des protéines transmembranaires ayant des rôles distincts dans l'homéostasie cellulaire du Zn (Liuzzi et Cousins, 2004).

5.4 La famille des ZIP

La famille des transporteurs ZIP est constituée de 14 membres. Ils ont la fonction d'augmenter la concentration de Zn cytoplasmique en favorisant son entrée dans la cellule ou permettant son relargage hors des compartiments intracellulaires vers le cytoplasme (Matsuura *et al.*, 2009; Shen, Qin et Guo, 2008).

ZIP1 et 3 sont exprimés à la membrane plasmique et sont responsables de l'entrée de Zn dans la cellule (Desouky *et al.*, 2002; Gaither et Eide, 2001 ; Jou *et al.*, 2010). ZIP1 est aussi localisé sur des vacuoles intracellulaires dans les cellules épithéliales. En cas de déficience en Zn extracellulaire, il pourrait aussi avoir un rôle dans la régulation des niveaux cytoplasmiques de Zn en favorisant le transfert de Zn stocké dans des compartiments intracellulaires vers le cytoplasme (Milon *et al.*, 2001). La surexpression de ZIP1 et ZIP3 se traduit par une augmentation de l'accumulation de Zn dans plusieurs lignées cellulaires (Franklin *et al.*, 2005 ; Franklin *et al.*, 2003). ZIP1 et ZIP3 jouent un rôle dans la distribution et la rétention tissulaires du Zn alors que ZIP4 et ZIP5 jouent un rôle clé dans l'acquisition du Zn venant de la diète (Yu, Kirschke et Huang, 2007).

ZIP4 est localisé à la membrane apicale des entérocytes et il est le principal régulateur de l'import (influx) de Zn intestinal. Des mutations sur le gène codant pour ce transporteur sont associées à une acrodermatite entéropathique (AE), ce qui indique le rôle important de ce gène dans le transport intestinal de Zn (Ford, 2004). Les patients souffrent en général d'une maladie de peau et d'infections fréquentes (Kury *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002). Les enfants atteints de l'AE ont des concentrations faibles en Zn dans le sérum à cause de la mutation du transporteur de Zn intestinal SLC39A4/ZIP4. Dans des conditions de déficience en Zn, des retards de croissance osseuse et une augmentation de la fragilité de la peau sont couramment observés (Hambidge et Krebs, 2007; Prasad, Halsted et Nadimi, 1961). A ce jour, ZIP4 est le seul membre de la super famille des ZIP chez les mammifères qui a été montré comme essentiel, et il jouerait un rôle fondamentale dans l'adaptation à la déficience au Zn (Weaver *et al.*, 2010). Des études récentes suggèrent que ZIP4 est régulé à de multiples niveaux en réponse au changement dans la disponibilité du Zn. Par ailleurs, chez la souris, l'abondance de protéines ZIP4 à la membrane plasmique des entérocytes diminue rapidement lorsqu'une déficience en Zn est comblée par la diète (Dufner-Beattie *et al.*,

2003 ; Mao *et al.*, 2007). L'apport en Zn stimule l'endocytose de ZIP4 ce qui diminue l'accumulation de Zn par ZIP4 suggérant un processus contrôlé par l'influx de Zn lui-même (Kim *et al.*, 2004). Ceci a été confirmé *in vitro* dans les cellules HEK293 transfectées (Kim *et al.*, 2004). De plus, cette étude a montré un niveau supplémentaire de régulation de ZIP4 impliquant la dégradation des protéines médiée par l'ubiquitination. En effet, ZIP4 serait dégradé en présence de hauts niveaux de Zn (10-20 μM) comparativement à ceux nécessaires pour l'endocytose (1 μM). Plusieurs analyses ont démontré que l'endocytose de ZIP4 est un pré-requis pour la dégradation de ZIP4 par les voies protéasomales et lysosomales.

ZIP7 et ZIP13 ont été identifiés comme étant importants pour l'homéostasie du Zn dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (Matsuura *et al.*, 2009). La protéine ZIP8, encodée par le gène *SLC39A8*, a été identifiée comme étant responsable de différentes intensités de toxicité testiculaire du Cd. Les chercheurs de cette étude ont exprimé un acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) rétroviral stable de ZIP8 dans des fibroblastes de fœtus de souris afin d'exprimer ZIP8. L'étude a montré qu'une surexpression de ZIP8 augmente respectivement 10 et 30 fois l'accumulation de Cd et la sensibilité cellulaire. Inversement, une étude a montré que la suppression de l'expression de ZIP8 par un *small interfering* RNA (siRNA) diminue le transport de Cd (Fujishiro *et al.*, 2009). Le transport est optimal à pH 7.5 et est indépendant des gradients de K^+ , de Na^+ ou d'ions chlorure (Cl^-), mais dépendant du bicarbonate (HCO_3^-) (He *et al.*, 2006). Le Mn est le plus puissant inhibiteur du transport de Cd via ZIP8. Il est possible que Mn soit un substrat physiologique de ZIP8. ZIP8 est localisé au côté apical et serait un symport $\text{Mn}^{2+}/\text{HCO}_3^-$, où le gradient entrant de HCO_3^- à travers la membrane est une force permettant le transport de Mn^{2+} (He *et al.*, 2009). Le Cd^{2+} pourrait être transporté par mimétisme ionique avec le Mn^{2+} . La famille des ZIP se retrouve à plusieurs niveaux phylogénétiques et l'expression de ces protéines est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel pour maintenir un apport constant en Zn (Guerinot, 2000).

5.5 La famille des ZnT

La famille des transporteurs ZnT, composée de 10 membres, permet de réduire la concentration cytoplasmique de Zn en favorisant l'export (efflux) du Zn en dehors de la cellule ou en le séquestrant dans des compartiments subcellulaires lorsqu'il est abondant (Yu, Kirschke et Huang, 2007). ZnT1, exprimé ubiquitairement, est un

membre de la famille des CDF, et il est localisé à la membrane apicale et basolatérale de l'intestin et est responsable de l'efflux de Zn provenant du cytosol (He *et al.*, 2006 ; Jou *et al.*, 2009 ; Liuzzi et Cousins, 2004). Son absence dans les cellules mutantes se remarque par une augmentation de la sensibilité à la toxicité du Zn (Palmiter, 2004; Palmiter et Findley, 1995). ZnT1 et MT seraient responsables du maintien de l'homéostasie du Zn en cas de hautes concentrations en Zn (Zemann *et al.*, 2011). L'expression de ZnT1 ainsi que de MT est régulée par le Zn par le biais du facteur de transcription qui répond aux métaux (MTF-1) (Langmade *et al.*, 2000; Radtke *et al.*, 1993). Dans les cellules transfectées pour surexprimer ZnT1, l'efflux de Zn est accru et la concentration intracellulaire de Zn chute, ce qui suggère que ZnT1 empêche une accumulation excessive en Zn au niveau-intracellulaire, offrant une protection cellulaire à la toxicité du Zn (Palmiter et Findley, 1995). ZnT1 est le seul transporteur qui soit directement impliqué dans le transport du Zn cytoplasmique vers l'extérieur de la cellule. Par conséquent, on s'attendrait à ce que ZnT1 transfère le Zn intracellulaire, préalablement transporté à la membrane apicale à partir de la diète, à travers la membrane basolatérale des entérocytes jusqu'à la circulation sanguine (Yu, Kirschke et Huang, 2007). ZnT1 est fortement exprimé dans le duodénum mais beaucoup moins au niveau du jéjunum et de l'iléon et il est localisé à la membrane basolatérale des entérocytes dans le duodénum (Yu, Kirschke et Huang, 2007). ZnT1 est plus faiblement exprimé dans les cellules épithéliales de la crypte qu'au niveau des villosités du duodénum, ce qui suggèrent une expression variable le long de l'axe crypte-villosité et donc en fonction du stade de différenciation entérocytaire (Yu, Kirschke et Huang, 2007). Le transport de Zn au niveau de la membrane basolatérale est régulé par différents transporteurs de Zn dont l'expression est aussi modulée selon les besoins et les apports en Zn. Les ZnT et ZIP sont assez sélectifs au Zn, mais ils pourraient aussi transporter le Fe et le Mn et certains métaux non-essentiels (He *et al.*, 2009). ZnT2 est localisé dans les compartiments intracellulaires et séquestre le Zn dans des vésicules intracellulaires pour le stockage (Liuzzi et Cousins, 2004 ; Palmiter, Cole et Findley, 1996 ; Palmiter et Huang, 2004). L'ensemble des ZnT 2-8 sont localisés dans la région périnucléaire ou dans les compartiments vésiculaires de la cellule (Yu, Kirschke et Huang, 2007). Les transporteurs ZnT sont fortement exprimés dans l'intestin, ce qui permet de présumer un rôle important dans la distribution du Zn pour l'organisme (Semrad, 1999).

Les ZnT4 à 7 participent à l'homéostasie du Zn en promouvant les voies de sécrétion du Zn dans la circulation sanguine pour le chargement des enzymes dépendantes du Zn comme l'ALP (Matsuura *et al.*, 2009). Chez la souris, ZnT7 est fortement exprimé dans le foie et l'intestin grêle et modérément au niveau des poumons, du cerveau, de la rate et des reins. Une analyse par immunofluorescence a montré que ZnT7 est localisé dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules cytoplasmiques (Kirschke et Huang, 2003). L'étude suggère que ZnT7 facilite le transport du Zn du cytoplasme vers l'appareil de Golgi (Kirschke et Huang, 2003). Un nouveau transporteur hZTL1 (variant de SLC30A5) aurait possiblement un rôle dans le transport du Zn provenant de la diète à travers la membrane apicale des entérocytes (Condomina *et al.*, 2002). Exprimé dans les ovocytes, hZTL1 module le transport de Zn^{2+} . Ce transport est inhibé à pH 5.5, tandis qu'il est optimal à 7.5 (Ford, 2004).

Le rôle des transporteurs ZnT dans le métabolisme osseux ainsi que la croissance commence à être mieux compris. En effet, une étude a montré que la répression du gène ZnT5 mène à de l'ostéopénie chez la souris, avec diminution du volume osseux, de la différenciation et de l'activité ostéoblastique (Tang *et al.*, 2006). Les transporteurs de la famille des ZIP, largement distribués dans de nombreux tissus, ont certainement un rôle dans le transport de Zn dans les cellules ostéoprogénitrices et ostéoblastiques. De plus, ZIP1 est exprimé ubiquitairement y compris dans la moelle osseuse. Il a donc été proposé comme étant le transporteur de Zn majeur pour de nombreux tissus (Tang *et al.*, 2006).

Le transporteur de métal divalent (DMT1/DCT1), qui est localisé à la membrane apicale des entérocytes, joue un rôle dans l'absorption du fer par les entérocytes. Il est principalement un transporteur de fer, avec une faible affinité pour les autres métaux comme le Zn (Fleming *et al.*, 1997 ; Gunshin *et al.*, 1997). Cette protéine est responsable du transport apical de Fe^{2+} en symport avec un proton (H^+). DCT1 est l'isoforme murin le plus proche de NRAMP-2 chez l'homme. L'expression de NRAMP-2/DCT1 a été étudiée chez la souris ainsi que dans les cellules Caco-2 et TC7 (un clone de la lignée Caco-2) (Canonne-Hergaux *et al.*, 2001 ; Elisma et Jumarie, 2001). L'existence d'autres isoformes (DCT2 et DCT3) a été suggérée, elles pourraient participer à l'absorption intestinale du Zn (Condomina *et al.*, 2002). Il y aurait donc probablement plus d'un transporteur impliqué dans l'absorption du Zn au niveau de l'intestin grêle chez le rat. De plus, l'absorption intestinale de Zn peut être inhibée par la présence de cuivre (Condomina *et al.*, 2002).

CHAPITRE VI

OBJECTIF ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Notre objectif de recherche est de déterminer l'implication de transporteurs de Zn dans l'absorption intestinale du Cd et dans son accumulation dans les cellules ostéoblastiques en utilisant les lignées cellulaires humaines Caco-2 (entérocytes) comme modèle de voie d'absorption et MG63 (ostéoblastes) comme modèle de tissu cible. L'utilisation de ces deux modèles permettra aussi de faire une comparaison entre des cellules épithéliales et des cellules non-épithéliales.

6.1 Hypothèses

Le Cd étant un métal cationique divalent non-essentiel (Cd^{2+}), l'existence de transporteurs membranaires spécifiquement dédiés à l'absorption du Cd est peu probable. Il est possible que le Cd puisse emprunter, par mimétisme ionique, des mécanismes de transport destinés aux éléments essentiels. Ceci a été montré dans les cellules intestinales Caco-2, avec NRAMP2 qui transporte le Fe (Elisma et Jumarie, 2001) et dans les cellules testiculaires avec le transporteur ZIP8 qui transporte le Zn (Fujishiro *et al.*, 2009). Maintenant, l'implication de ZIP8 dans le transport intestinal et ostéoblastique doit être caractérisé. Par ailleurs, il a été montré que ZnT1 est plus faiblement exprimé dans les cellules intestinales de la crypte (indifférenciées) que dans les villosités (différenciées) (figure 6.1) (Yu, Kirschke et Huang, 2007).

Nous émettons donc les hypothèses suivantes:

- 1) Selon leur niveau d'expression, certains systèmes de transport de Zn pourraient contribuer significativement au transport de Cd dans les entérocytes et les ostéoblastes humains
- 2) La contribution respective de ces transporteurs au transport intestinal de Cd varierait avec l'état de différenciation entérocytaire.

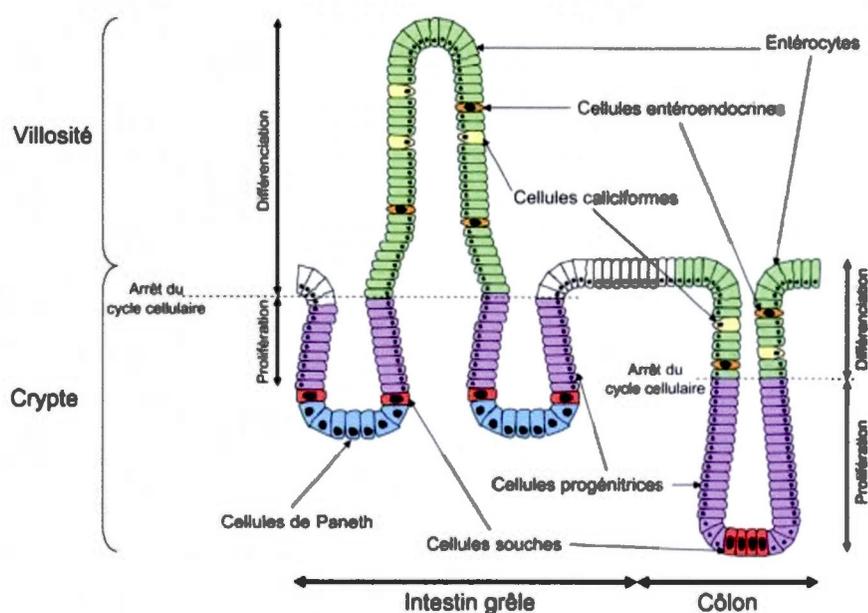


Figure 6.1 : Structure de l'épithélium intestinal (Figure adaptée de Sancho *et al.*, 2004). L'intestin grêle et le côlon sont recouverts d'un épithélium formé de cellules polarisées et de cellules prolifératives localisées à la base des cryptes. Au fur et à mesure que les cellules migrent vers la partie apicale, elles se différencient pour former les entérocytes et les cellules sécrétrices (cellules caliciformes, cellules entéroendocrines). L'intestin grêle se caractérise par sa structure en villosités et la présence de cellules de Paneth. Le côlon présente une surface plane et les cellules de Paneth sont absentes.

6.2 Choix des transporteurs de Zn étudiés

Selon la littérature, ZIP1 et 4, localisés au niveau de la membrane apicale des entérocytes, seraient importants pour l'absorption intestinale du Zn. Ils sont donc des candidats pertinents dans le cadre de cette étude. De plus, le transporteur hZTL1 serait aussi localisé sur la membrane apicale (Cragg *et al.*, 2002). Nous avons donc étudié son rôle dans le transport de Cd. Le projet portait aussi sur ZIP8 puisque son expression dans les cellules conduit à une augmentation du transport du Cd (Fujishiro *et al.*, 2009).

À partir de techniques de biologie moléculaire telles que l'extraction d'ARN, la transcription inverse (RT) et la polymérisation en chaîne (PCR), il est possible de vérifier l'expression des gènes ZIP1, 4, 8 et hZTL1 dans chaque lignée étudiée. Parallèlement, nous avons étudié le transport de ^{109}Cd sous différentes conditions expérimentales pour obtenir des indices sur la participation de ces transporteurs de Zn dans l'accumulation cellulaire de Cd.

6.3 Modèles cellulaires

6.3.1 La lignée cellulaire Caco-2

Les cellules Caco-2 dérivent d'un adénocarcinome colorectal humain et sont utilisées comme modèle entérocytaire *in vitro*, puisque ces cellules sont capables de se différencier spontanément en des cellules matures ayant les caractéristiques des entérocytes (Pinto *et al.*, 1983). Il a été montré que les cellules Caco-2 différenciées (J21) ont une tolérance plus élevée au Cd et au Fe que les cellules Caco-2 indifférenciées (J7) (Cardin, Mantha et Jumarie, 2009 ; Zodl *et al.*, 2004). Les cultures comprennent une phase de prolifération exponentielle avant confluence, durant laquelle les cellules sont indifférenciées, et une phase de différenciation qui débute spontanément à confluence (généralement atteinte au jour 7). Les cultures miment donc ce qui se passe *in vivo* le long de l'axe crypte-villosité lors du renouvellement de l'épithélium intestinal (Meunier *et al.*, 1995). À 21 jours de culture, les cellules Caco-2 forment une monocouche polarisée, possèdent de nombreuses microvillosités sur la membrane apicale et des jonctions serrées bien développées (figure 6.2). De plus, les cellules Caco-2 expriment des hydrolases, des aminopeptidases ainsi que la γ -glutamyltranspeptidase au niveau des microvillosités (Meunier *et al.*, 1995). Les cellules Caco-2 matures sont aptes à faire du transport transépithélial, ce qui se manifeste par le développement de dômes lorsque cultivées sur Pétris (Simon-Assmann *et al.*, 2007). L'accumulation d'eau, entraînée par la force osmotique, sous la membrane basolatérale, soulève la monocouche et témoigne d'un bon état de différenciation quant aux fonctions de transport. Il est donc intéressant d'étudier comment varie l'expression de différents transporteurs de Zn en fonction de l'état de différenciation et de corrélérer ces variations avec celles du transport de Cd lui-même.

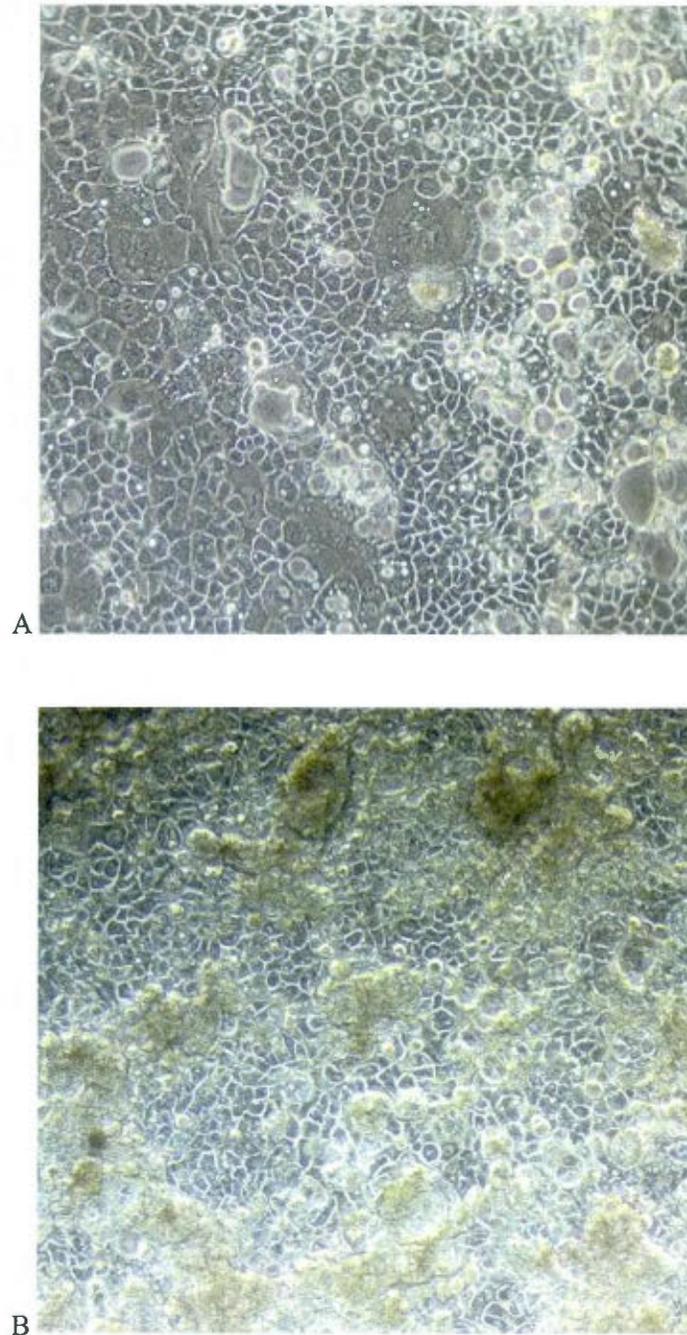


Figure 6.2: Culture de cellules Caco-2 A) indifférenciées (J7) et B) différenciée (J21) (grossissement: 10 X)

6.3.2 La lignée cellulaire MG63

La lignée cellulaire MG63 provient d'un ostéosarcome d'un jeune homme caucasien de 14 ans (Billiau *et al.*, 1977). Les cellules MG63 sont considérées comme

étant des ostéoblastes immatures (pré-ostéoblastes) bien qu'elles expriment un certain nombre de marqueurs phénotypiques propres aux ostéoblastes comme la synthèse de l'ostéoïde, quoique cette synthèse soit désordonnée et relativement faible (Levesque *et al.*, 2008). Des résultats préliminaires ont été obtenus sur l'accumulation et la cytotoxicité du Cd sur la lignée MG63 ainsi que sur la lignée murine MC3T3. Bien que la lignée MC3T3 ait une différenciation supérieure à celle de la lignée MG63, nous avons choisi pour notre étude la lignée humaine MG63 en vue de comparer avec la lignée intestinale Caco-2, aussi humaine. Mentionnons que MG63 n'est pas la seule lignée humaine de type ostéoblastique. En effet, il aurait été possible de sélectionner la lignée SaOS-2 ou U2OS mais dans le premier cas, la prolifération est plus faible que pour les cellules MG63, et dans le deuxième cas, le modèle est peu caractérisé et beaucoup moins utilisé que la lignée MG63. De plus, la sensibilité des cellules au Cd est plus importante avec les cellules MG63 plutôt qu'avec les cellules SaOS-2 et U2OS (résultats non publiés). Ceci constituant un argument de plus pour choisir les cellules MG63 comme modèle d'étude.

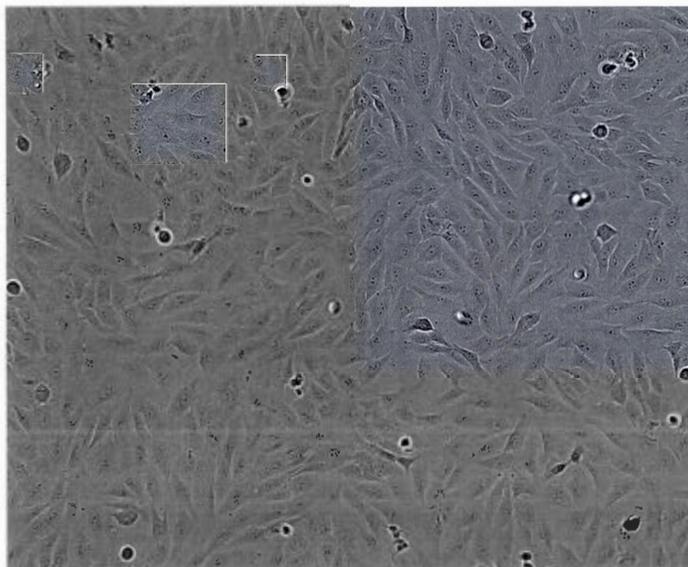


Figure 6.3: Cellules MG63 après 7 jours de culture (grossissement: 10 X)

CHAPITRE VII

MATÉRIEL ET MÉTHODES

7.1 Culture cellulaire

Lignée cellulaire Caco-2.

La lignée cellulaire Caco-2 (obtenue par le Dr. A. Zweibaum, Pinto et al., 1983) a été utilisée entre les passages 200 et 225. Les stocks de culture ont été maintenus sur des flasks de plastique de 75-cm² (Corning Inc.) ensemencés à une densité de 1×10^6 cellules/flask dans du milieu Dulbecco's modified Eagle essential minimum (DMEM) (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) contenant 25 mM de glucose avec un ajout de 15% de sérum fœtal bovin (FBS) inactivé (56°C pendant 30 min) (PAA Inc., Montreal, QC, Canada), 0.1 mM d'acides aminés non essentiels et 50 U/ml-50 µg/ml de pénicilline-streptomycine (GibcoBRL). Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37°C et le milieu a été changé tous les deux jours. Les cultures ont été repiquées toutes les semaines par trypsinisation (0.05% trypsine-0.53 mM EDTA).

Lignée cellulaire MG63.

Les cellules MG63 ont été achetées chez "American Type Culture Collection" (ATCC, Rockville, MD, USA). Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM/Ham's F12, sans phénol (DMEM/F12; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) contenant 10% de FBS, 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) et 50 U/ml-50 µg/ml de pénicilline-streptomycine (GibcoBRL).

7.2 Mesure du transport transépithélial et de l'accumulation cellulaire du Cd

Pour l'ensemble des expériences, les cellules MG63 et Caco-2 ont respectivement été ensemencées à la densité de 1500 et 11 520 cellules/cm² sur des Pétris de 35 mm de diamètre (Sarsted). Le transport du Cd dans les cellules Caco-2 et MG63 en monocouche a été mesuré à température pièce sur des cellules de 7 et 21 jours (Caco-2) et de 7 jours (MG63) dans un milieu de transport chloré (Cl⁻) ou nitraté (NO₃⁻) contenant: 137 mM de NaCl(NaNO₃), 5.9 de mM KCl(KNO₃), 2.5 de mM CaCl₂((CaNO₃)₂), 1.2 de mM MgSO₄, 4 mM de D-glucose et 10 de mM HEPES, ajusté à un pH de 5.5, 7.5 ou 8.5. La complexation du Cd par le Cl⁻ étant beaucoup plus importante qu'avec le NO₃⁻, 14% de Cd se retrouve sous forme libre (Cd²⁺) dans le milieu chloré, comparativement à 80%

dans le milieu nitré. Avant l'exposition au ^{109}Cd , le milieu de culture a été retiré et les cellules en monocouche ont été rincées trois fois avec 2 ml de milieu de transport. Le transport a débuté par l'ajout d'1 ml de milieu de transport contenant 0.5 μM de ^{109}Cd sous forme de CdCl_2 (activité spécifique 0.3 $\mu\text{Ci/nmol}$, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany). Les mesures ont été faites à trois pH (5.5, 7.5, 8.5) et avec quatre conditions différentes, en absence (Ctrl, ^{109}Cd uniquement), ou en présence de 100 μM de Cd froid, utilisé comme inhibiteur compétitif, de Mn, ou de Zn. L'exposition de 3 min au ^{109}Cd a été arrêtée par 3 rinçages avec 2 ml de tampon stop froid contenant 2 mM EDTA (sans Ca ni Mg) pour capter et enlever le traceur de la surface externe des membranes des cellules. Les cellules ont été lysées par ajout de 500 μl d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1N et des aliquots de 300 μl ont été utilisés pour déterminer la radioactivité avec un compteur gamma (Cobra II, Canberra Packard Canada). Les résultats sont exprimés en pmol de ^{109}Cd par mg de protéine.

7.3 Localisation par immunofluorescence

La localisation de ZIP4 a été faite par immunofluorescence. Les cellules ont été ensemencées dans un lab-tek de 8 puits et maintenues en culture pendant 1 semaine (Caco-2 J7 et MG63) et 3 semaines (Caco-2 J21). Les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon phosphate (PBS) contenant 136.8 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 8.1 mM de Na_2HPO_4 , 4.5 mM de KH_2PO_4 , 0.9 mM de CaCl_2 , et 0.5 mM de MgCl_2 puis fixées avec du paraformaldehyde 4% pendant 10 minutes à température pièce. Après trois lavages au PBS, les cellules ont été incubées avec du Triton X-100 0.2% pendant 2 minutes. Les cellules MG63 ont été marquées pendant 2 minutes au PKH67 alors que les cellules Caco-2 (J7, J21) ont été marquées durant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées dans une solution de blocage de PBS contenant 5% d'albumine sérique bovine (BSA) pendant 1 heure à 37°C, puis incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre ZIP4 (1:1000, Invitrogen) pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, les cellules Caco-2 (J7 et J21) ont été incubées avec l'anticorps secondaire IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa 568 (Invitrogen, 1:1000 BSA 1%). Les cellules MG63 ont été incubées avec l'anticorps secondaire IgG de lapin couplé au fluorochrome Rhodamine (Invitrogen, 1:1000 BSA). Après trois lavages avec du PBS, les cellules ont été visualisées avec un microscope confocal à fluorescence.

7.4 Quantification des protéines

Le contenu en protéines a été quantifié selon la méthode de Bradford (1976) avec le réactif BioRad (Mississauga, Ontario, Canada) en utilisant le BSA (0-100 µg) comme étalon. Des aliquots de 50 µl de chaque échantillon dilué ont été placés dans une microplaque de 96 puits et l'absorbance a été lue à 595 nm avec un spectrophotomètre Tecan Spectra Fluor Plus.

7.5 Réaction en chaîne par transcriptase-inverse et la polymérase

L'ARN total des cellules a été extrait au TRIzol (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La réaction de transcription inverse (RT) a été faite à l'aide du kit Omniscript RT (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) en présence d'hexamères. L'amplification par PCR a été faite à l'aide du kit PCR core *Taq* (Qiagen) avec les amorces spécifiques pour l'actine (sens 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'; antisens 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3'), ZIP1 (sens CTGGGAGAAAGCTCCGGGAA-ACC; antisens TTCCTCCAGAGGTGACGGCCC), ZIP4 (sens GCACCTGTGAGGACGCTCGG; antisens AGGGCTCAGTTGGGCCAGG), ZIP8 (sens TGTGAGGATCGGCCAAGCAC; antisens GTGGAGGGCATCGCAGAGCG), hZTL1 (sens ACAGCCATTGCCTTCTTAGG; antisens CGTTTAGCTCCACCAACGTC). L'amplification s'est déroulée suivant un programme de 40 cycles avec une incubation de 1 min à 94 °C (dénaturation), 30 s à 58 °C (appariement) et 1 min à 72 °C (élongation). Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% avec une révélation au bromure d'éthidium. Des analyses densitométriques des produits PCR ont été effectuées et les résultats sont exprimés relativement aux niveaux d'expression de l'actine.

7.6 Analyses statistiques

Les manipulations de transport ont été faites en 5 répliques sur minimalement 3 cultures indépendantes. Les analyses d'ARNm par RT-PCR ont été faites 1 fois par culture et minimalement sur 3 cultures indépendantes pour chaque lignée cellulaire. Selon le cas, les résultats de transport obtenus en différentes conditions expérimentales ont été analysés par un test t de Student ou une analyse de variance (ANOVA). Un test de Dunnett a permis de comparer plusieurs conditions à la condition contrôle alors qu'un test de Tukey-Kramer a servi pour comparer chaque conditions entre elles. La différence significative a été fixée à $p \leq 0.05$.

DEUXIEME PARTIE

PRESENTATION DES RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE VIII

RESULTATS ET DISCUSSION

8.1 Profils d'expression géniques des transporteurs de Zn dans les lignées à l'étude

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression des ZIP à l'étude dans les deux lignées cellulaires utilisées. La figure 8.1A est une photo de gel d'électrophorèse obtenue après avoir fait migrer les séquences d'ADN correspondant aux gènes ZIP1, ZIP4, ZIP8 et hZTL1 dans les cellules MG63 amplifiées par PCR. Par la suite, une analyse de l'intensité des bandes a été faite par densitométrie et les valeurs ont été normalisées sur celle obtenue pour l'actine (gène de référence). Les résultats obtenus sont compilés dans la figure 8.1B. L'ADN amplifié des gènes ZIP1, ZIP4 et hZTL1 apparaît sous la forme de bandes dont la taille correspond à la taille attendue selon les séquences inscrites dans GenBank. En outre, les bandes confirment que les cellules expriment ces gènes. Celles-ci ont presque été toujours visualisées après migration sur gel (tableau 8.1). Seul ZIP8 n'a été visualisé que dans 60% des échantillons. La lignée MG63 exprime donc les ZIP à l'étude. Il n'y a aucune autre étude à ce jour qui montre l'expression des ZIP dans la lignée cellulaire MG63 mais l'expression de ZIP1 a déjà été montrée dans les ostéoblastes murins MC3T3 (Yamaguchi et al, 2008). Les ostéoblastes de souris expriment hZTL1 (ZnT5) (Inoue *et al.*, 2002).

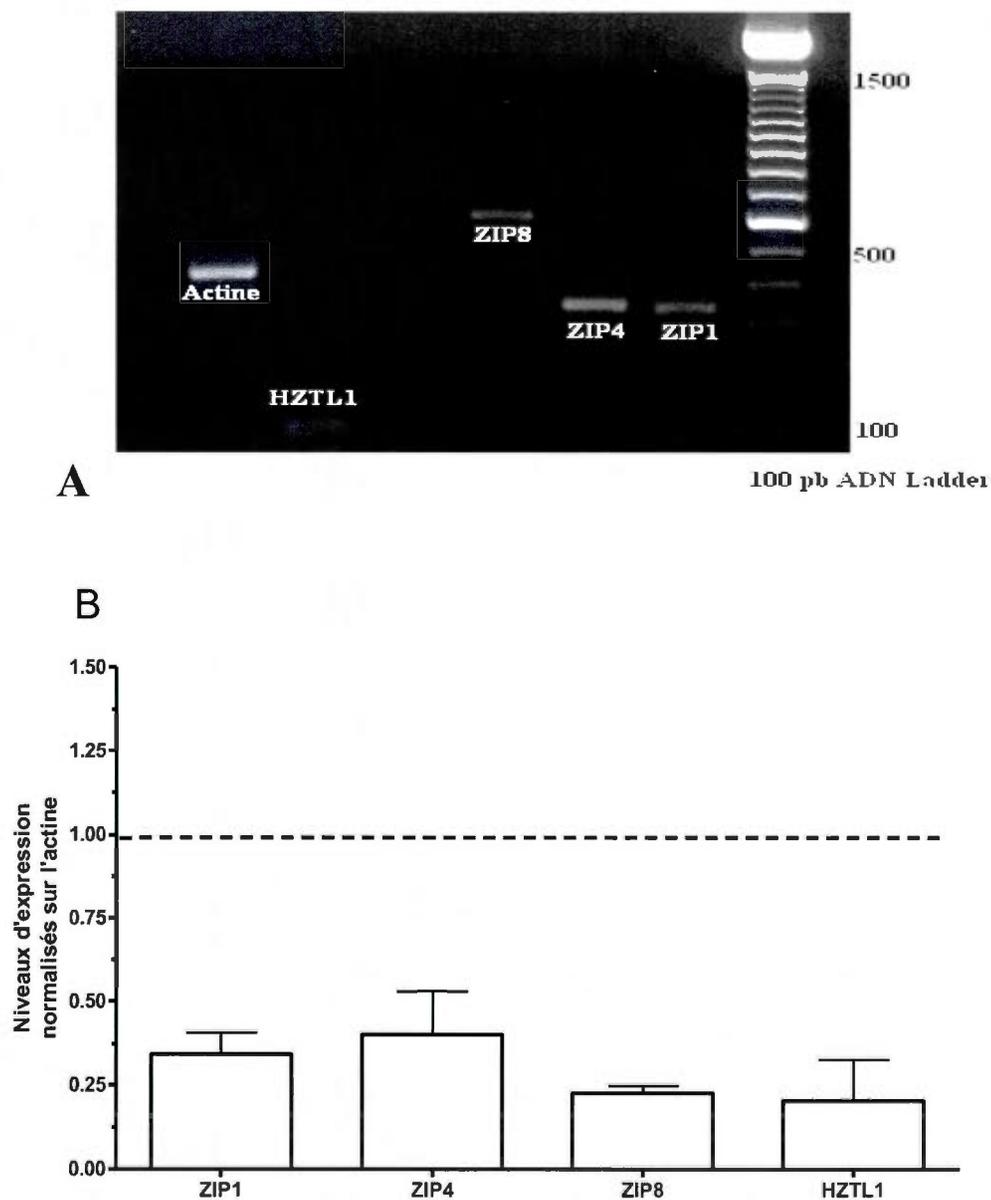


Figure 8.1: Expression génique des transporteurs de Zn dans les cellules MG63. Les cellules ont été cultivées pendant 1 semaine. A) Les bandes du standard de tailles d'amplicons ont un incrément de 100 pb. Tailles attendues : 130 pb (hZTL1), 350 pb (ZIP1, ZIP4), 435 pb (Actine), 606 pb (ZIP8). B) Analyses densitométriques normalisées sur l'expression de l'actine. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types obtenues de 8 à 12 cultures indépendantes.

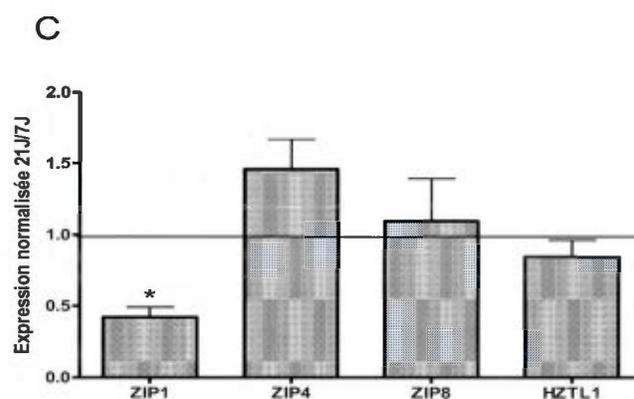
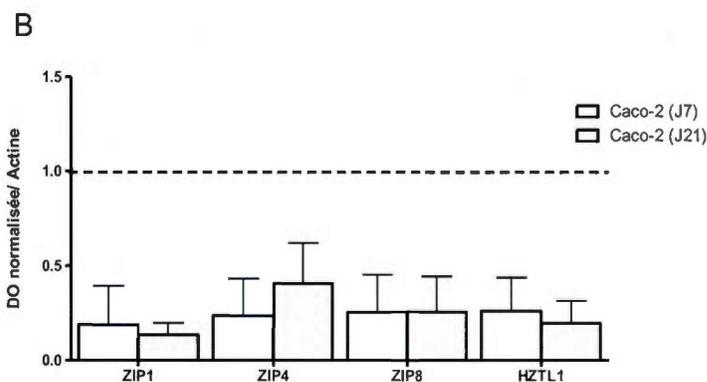
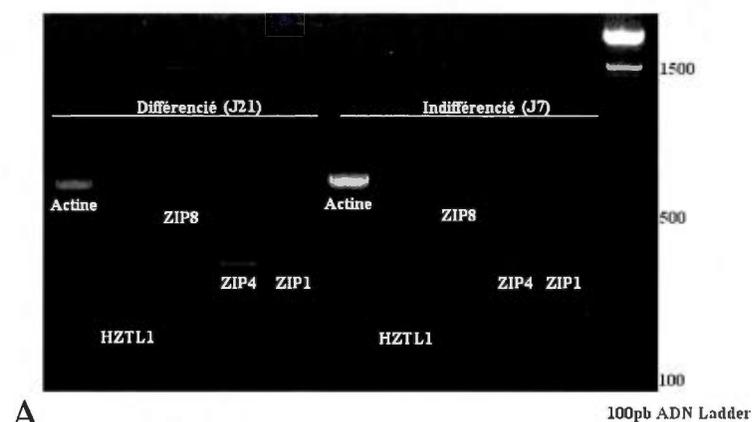


Figure 8.2: ARNm de ZIP1, ZIP4, ZIP8 et hZTL1 dans les cellules Caco-2. Les cellules ont été cultivées pendant 1 semaine (J7) et 3 semaines (J21). A) Les bandes du standard de tailles d'amplicons ont un incrément de 100 pb. Tailles attendues : 130 pb (hZTL1), 350 pb (ZIP1, ZIP4), 606 pb (ZIP8), 650 pb (actine). B) Analyses densitométriques normalisées l'expression de l'actine. C) Niveaux d'expression obtenus au jour 21 normalisés sur ceux du jour 7. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types obtenues de 8 à 10 cultures indépendantes. * Différence significative ($p < 0.05$) comparativement aux niveaux d'expression des autres gènes.

La lignée cellulaire Caco-2 exprime les ZIP étudiés quelque soit l'état de différenciation (figure 8.2 A,B). L'expression de plusieurs ZIP (ZIP1, ZIP4 et hZTL1) dans les cellules Caco-2 a été montrée par plusieurs études (Shen, Qin et Guo, 2008, Zemann *et al.*, 2011). L'expression de hZTL1 est aussi rapportée dans plusieurs études (Cragg *et al.*, 2002; Milon *et al.*, 2001; Valentine *et al.*, 2007). En revanche, l'expression de ZIP8 n'a pas été rapportée dans les cellules Caco-2 bien que des études montrent son expression dans des entérocytes de truites arc-en-ciel (Kwong et Niyogi, 2012) et dans le duodénum de rat (Girijashanker *et al.*, 2008).

La figure 8.2C représente les niveaux d'expression d'ARNm obtenus dans les cellules différenciées normalisés relativement aux niveaux d'expression dans les cellules indifférenciées. L'expression de ZIP1 diminue significativement lors de la différenciation des cellules Caco-2, tandis que l'expression de hZTL1 demeure stable. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Bedrine-Ferran *et al.*, 2004 ; Zemann *et al.*, 2011). L'expression de ZIP8 demeure stable également entre les deux stades, indifférenciés et différenciés. En revanche, les niveaux d'ARNm de ZIP4 augmentent significativement avec la différenciation entérocytaire. Notons que ZIP4 n'a pas toujours été détecté (Tableau 8.1), mais que la fréquence d'expression de ZIP4 augmente aussi avec l'état de différenciation. On l'observe dans 60% des cultures indifférenciées et dans 80% des cultures différenciées. La différenciation entérocytaire augmente donc le niveau d'expression de ZIP4 ainsi que l'uniformité de son expression au sein des cultures de cellules Caco-2 connues pour n'être pas toujours homogène en terme de niveau de différenciation.

Bien qu'il n'y ait pas d'études concernant la caractérisation des ZIP dans la lignée cellulaire MG63, de nombreux travaux démontrent l'expression de la plupart des ZIP à l'étude dans des espèces, des lignées cellulaires et organes variés. En effet, l'expression de hZTL1 (ZnT5) a été montrée dans l'étude d'Inoue et al, (2002). Les souris déficientes pour ce gène ont une croissance affaiblie et une densité osseuse diminuée due à une déficience dans la maturation des ostéoblastes en ostéocytes. Près de 60% des mâles sont morts subitement par bradychardie. Ces résultats suggèrent un rôle important de ZnT5 dans la maturation ostéoblastique mais aussi dans le maintien des cellules impliquées

dans la conduction du système cardiaque. ZnT5 a aussi été localisé dans la membrane plasmique des cellules K562 issues d'une leucémie érythrocytaire (Gaither et Eide, 2001). L'expression de ZIP8 a été montrée dans de nombreux organes notamment les poumons, les testicules (où les niveaux de ZIP8 sont les plus abondants), les reins, le cerveau et le duodénum. Notamment, l'étude de He et al. (2007) montre que ZIP8 est un transporteur exprimé sur la surface apicale des cellules rénales MDCK, épithéliales et polarisées. Une étude réalisée par Milon et al. (2001) compare, les différentes localisations de ZIP1 selon le type de cellules (adhérentes versus non-adhérentes). Par l'expression de protéines chimériques telles EGFP-HZIP1 et FLAG-HZIP1, ils ont remarqué dans la lignée cellulaire COS-7 une localisation intracellulaire au-niveau du RE. Gaither et Eide (2001) ont montré une localisation de ZIP1 à la membrane plasmique des cellules K562. De plus, ils ont localisé ZIP1 au-niveau intracellulaire dans les cellules cancéreuses de la prostate PC3.

En résumé, ZIP1 peut être aussi bien localisé à la membrane apicale qu'au niveau intracellulaire. Les trois autres transporteurs (ZIP4, ZIP8 et hZTL1) sont localisés majoritairement à la membrane apicale.

	MG63	Caco-7	Caco-21
ZIP1	9/9 (100%)	10/10 (100%)	9/10 (90%)
ZIP4	8/9 (88%)	6/10 (60%)	8/10 (80%)
ZIP8	8/12 (66%)	9/10 (90%)	10/10 (100%)
hZTL1	12/12 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)

Tableau 8.1: Fréquence d'observation de l'expression génique des transporteurs de Zn dans toutes les cultures indépendantes testées.

8.2 Transport de ^{109}Cd

Nous avons par la suite mesuré le transport de ^{109}Cd dans les cellules MG63 et Caco-2 (J7 et J21) selon plusieurs conditions de transport afin d'avoir des indices sur les transporteurs de Zn possiblement impliqués. La famille des ZIP comprend 14 membres qui présentent quelques caractéristiques différentes. ZIP8 serait inhibé à pH 5.5 et son

activité serait optimale à 7.5 et 8.5 (Wang *et al.*, 2012). L'accumulation du Cd a donc été mesurée à pH 5.5, 7.5 et 8.5. Enfin, puisque l'on s'intéresse aux transporteurs de Zn, on a voulu mesurer le pouvoir inhibiteur du Zn sur l'accumulation de Cd. La figure 8.3A montre une augmentation de l'accumulation de ^{109}Cd en condition Ctrl lorsque le pH augmente. Il est intéressant de constater que malgré cette augmentation, la contribution relative de la portion non-spécifique (mesurée en présence de Cd non radioactif) demeure inchangée (27% du transport total est non-spécifique). En effet, la condition dite "Cd" correspond à l'ajout de 100 μM de Cd froid, c'est-à-dire non-radioactif. Il est utilisé comme inhibiteur compétitif et sert à discriminer la portion spécifique de la portion non-spécifique du transport total. Le Cd est mis en excès et va saturer les transporteurs cellulaires responsables de l'influx. Par contre, la diffusion passive, qui n'implique pas de transport spécifique, n'est pas saturable. C'est cette valeur que l'on cherche à définir et que l'on appellera portion non-spécifique. La figure 8.3B montre les pourcentages d'accumulation moyens exprimés relativement à l'accumulation contrôle après analyse pairée. L'analyse pairée sert à faire ressortir une tendance qui pourrait ne pas être vue dans une analyse de moyennes brutes. Dans cette figure, il est clairement évident que le transport non spécifique (donc mesuré en présence de 100 μM de Cd non radioactif) contribue à 25% du transport total quelque soit le pH. On peut soustraire cette contribution du transport non spécifique du transport total pour mieux se rendre compte de l'effet du Mn et du Zn sur la portion spécifique (donc possiblement inhibée) du transport de ^{109}Cd . L'ajout de 100 μM de Mn n'a pas d'effet sur l'accumulation de ^{109}Cd quelque soit le pH (Figure 8.3A). Les pourcentages d'inhibition par le Zn augmentent avec l'élévation du pH. En effet, à pH 5.5, ils sont de 40% (pour le transport total) et de 68% (pour le transport spécifique), alors qu'à pH 7.5 ils sont de 58% (transport total) et de 84% (transport spécifique) et à pH 8.5 69% du transport total mais 100% du transport spécifique est inhibé par le Zn. Ces résultats sont en accord avec l'analyse pairée. Il est possible de conclure que le Zn inhibe beaucoup l'accumulation de Cd à pH 7.5 et 8.5, ce qui suggère l'implication de transporteurs ZIP.

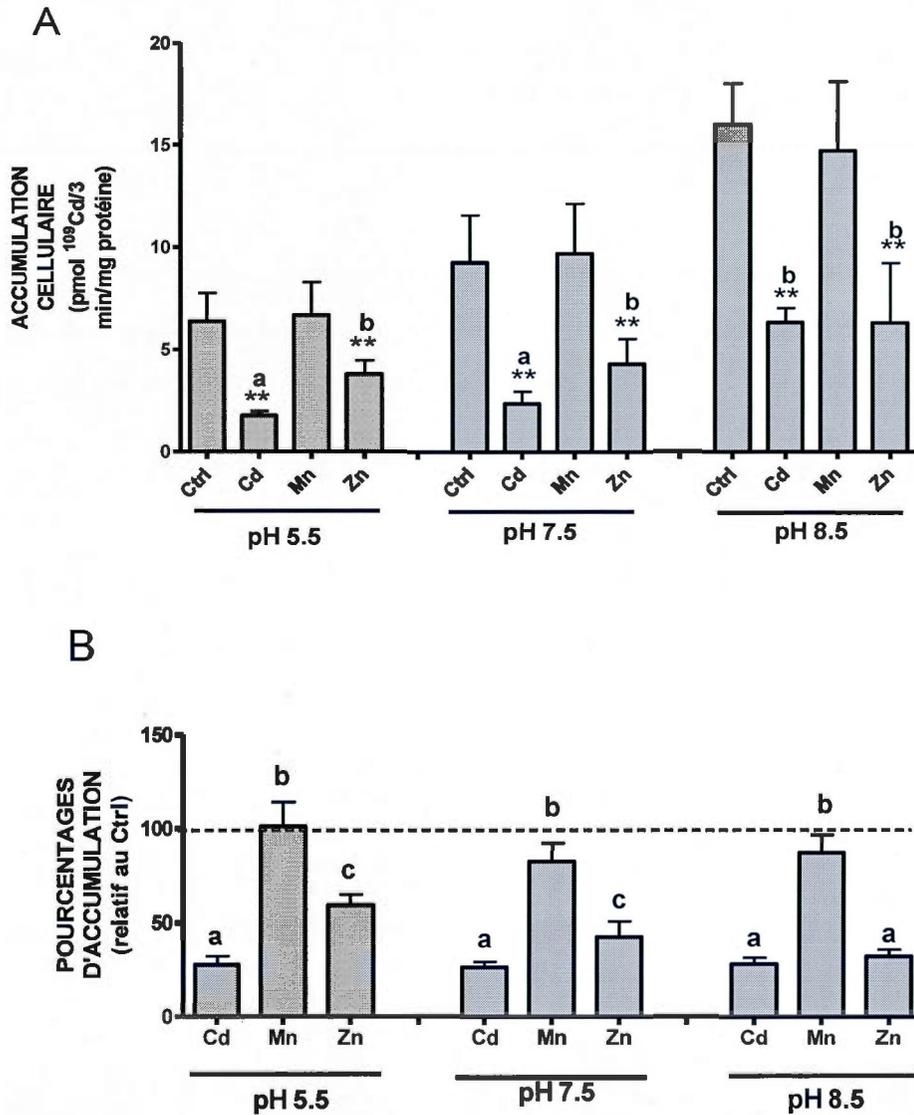


Figure 8.3: A) Accumulation (3 min) de $0.5 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd dans les cellules MG63 à pH 5.5, 7.4 et 8.5, en absence (Ctrl) ou en présence de $100 \mu\text{M}$ de Cd, de Mn ou de Zn. ** Différences significatives ($p < 0.05$) comparativement à la condition Ctrl au même pH. Les lettres différentes indiquent des résultats significativement différents. B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la situation Ctrl respective chaque pH. Les résultats sont les moyennes \pm écarts type évalués sur 3 à 6 cultures indépendantes.

Dans les cellules Caco-2 indifférenciées (J7), le Cd inhibe 55-65% le transport total du ^{109}Cd dont 55% du transport total est du transport spécifique (figure 8.4A). À pH 5.5, le Mn inhibe la portion spécifique du transport de ^{109}Cd de 70% alors que l'inhibition n'est que de 47% à pH 7.5 et 8.5 (figure 8.4A). La figure 8.4B présente une analyse pairée où il apparaît clairement que le pouvoir inhibiteur du Mn sur le transport de ^{109}Cd baisse avec l'élévation de pH. Inversement, l'inhibition par le Zn augmente avec l'augmentation du pH. En effet, le Zn inhibe le transport spécifique de ^{109}Cd de 63% à pH 5.5 et de 70% à pH 7.5 et 8.5 (figure 8.4A). L'inhibition croissante par le Zn avec l'augmentation du pH nous permet de suggérer l'implication des transporteurs de Zn puisqu'il a été montré que les ZIP sont inhibés à pH 5.5 et optimaux à pH 7.5 et 8.5. En revanche, il n'est pas possible de discriminer parmi les 14 membres de la famille des ZIP, le(s)quel(s) seraient impliqués dans le transport de Cd dans les cellules Caco-2 à l'état indifférencié.

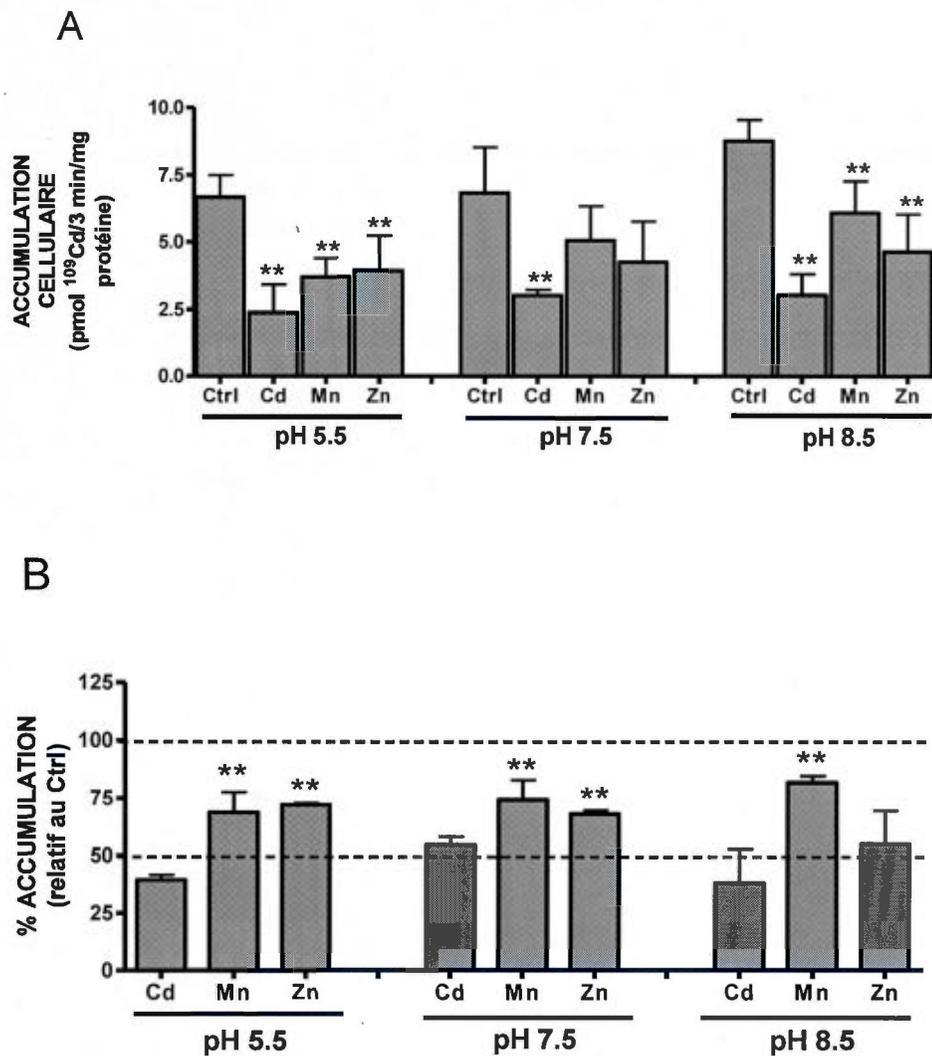


Figure 8.4: A) Accumulation (3 min) de $0.5 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J7) à pH 5.5, 7.4 et 8.5, en absence (Ctrl) ou en présence de $100 \mu\text{M}$ de Cd, de Mn ou de Zn. ** Différences significatives ($p < 0.05$) comparativement à la condition Ctrl. B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la condition Ctrl respective. ** Différences significatives ($p < 0.05$) comparativement à la condition Cd. Les résultats sont les moyennes \pm écarts type évalués sur 3 à 4 cultures indépendantes

La figure 8.5 montre les résultats d'accumulation de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J21) différenciées. Le transport non spécifique contribue à 8% de l'accumulation totale de ^{109}Cd à pH 5.5 tandis qu'à pH 7.5 et 8.5, il est de 30-40%. Les fortes valeurs d'accumulation de ^{109}Cd lorsque le pH est de 5.5 nous permettent de suggérer l'implication de Nramp2 puisque ce transporteur de fer fonctionne de façon optimale à pH 5.5-6.0 (Picard *et al.*, 2000) et des études montrent qu'il est impliqué dans l'accumulation de Cd. SLC11A2, appelé Nramp2 ou DMT1, est un transporteur de métal divalent couplé aux protons qui transporte préférentiellement le Fe mais qui est impliqué dans l'accumulation de Cd à la membrane apicale des entérocytes (Bannon *et al.*, 2003 ; Elisma et Jumarie, 2001 ; He *et al.*, 2006). À pH 5.5, l'inhibition du transport spécifique par le Mn est de 34% alors qu'elle augmente à 63% avec l'élévation du pH à 7.5. Le Zn n'a aucun effet sur l'accumulation de Cd à pH 5.5 alors qu'on observe une inhibition du transport spécifique de 71% à pH 7.5 et de 50% à 8.5. La fluctuation des pourcentages d'inhibition en fonction du pH suggère l'implication de ZIP8 car il est inhibé à pH 5.5 mais optimal à pH 7.5 et 8.5. Bien que ZIP4 n'ait pas de caractéristiques qui permettent de le discriminer des autres ZIP, son rôle dans le transport de Zn dans les entérocytes a clairement été démontré (Dufner-Beattie *et al.*, 2003). Ces résultats n'excluent pas la participation de ZIP4 et de ZIP8 dans l'accumulation de Cd.

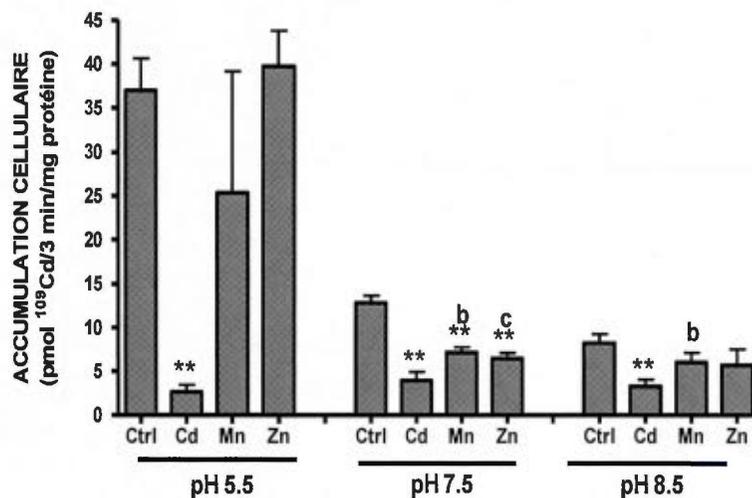


Figure 8.5: Niveaux d'accumulation (3 min) de 0.5 μM de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J21) à pH 5.5, 7.4 et 8.5, en absence (Ctrl) ou en présence de 100 μM de Cd, de Mn ou de Zn. **Différences significatives ($P < 0.05$) comparativement à la condition Ctrl. Les résultats aux lettres différentes sont significativement différents les uns des autres. Les résultats sont les moyennes \pm écarts type évalués sur 3 à 4 cultures indépendantes.

Comme le transporteur de ZIP8 serait un symport de $\text{Mn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$ ou de $\text{Zn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$ (Fujishiro *et al.*, 2009), nous avons donc étudié l'effet inhibiteur du Mn et du Zn sur le transport de ^{109}Cd en présence et en absence de HCO_3^- . L'accumulation de ^{109}Cd en condition Ctrl tend à augmenter lorsque 20 mM de HCO_3^- sont ajoutés au milieu d'incubation (figure 8.6A). Il est aussi intéressant de noter que le transport non spécifique augmente également ainsi que sa contribution (25% en absence de HCO_3^- , 51% en présence de HCO_3^-). Comme vu précédemment à la figure 8.3, le Mn à pH 7.4 n'inhibe pas l'entrée du ^{109}Cd dans la cellule. Par contre, les résultats obtenus suggèrent que l'ajout de HCO_3^- augmente le pouvoir inhibiteur du Mn. Les pourcentages d'inhibition passent de 18% du transport total et 44% du transport spécifique sans HCO_3^- , à 57% du transport total et 100% du transport spécifique en présence de HCO_3^- (figure 8.6B). L'ajout de HCO_3^- augmente l'inhibition par le Zn d'un facteur de 1.38, ce qui amène le pourcentage d'inhibition du transport par le Zn de 72% à 100% du transport spécifique. L'analyse pairée confirme cet effet du HCO_3^- sur l'inhibition par le Mn et le Zn (figure 8.6B).

En comparaison avec la littérature, l'étude d'He et al, (2006) montre que l'accumulation de Cd ou de Mn est stimulée dans un milieu riche en HCO_3^- . Pour cette raison, il a été suggéré que la fonction de ZIP8 est d'être un symporteur $\text{Mn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$. Le Cd serait capable de détourner ce symport à son avantage et ainsi rentrer dans la cellule en utilisant le gradient de HCO_3^- . Les résultats obtenus avec l'ajout de HCO_3^- sont en accord avec l'idée que ZIP8 puisse contribuer au transport de Cd dans les cellules MG63.

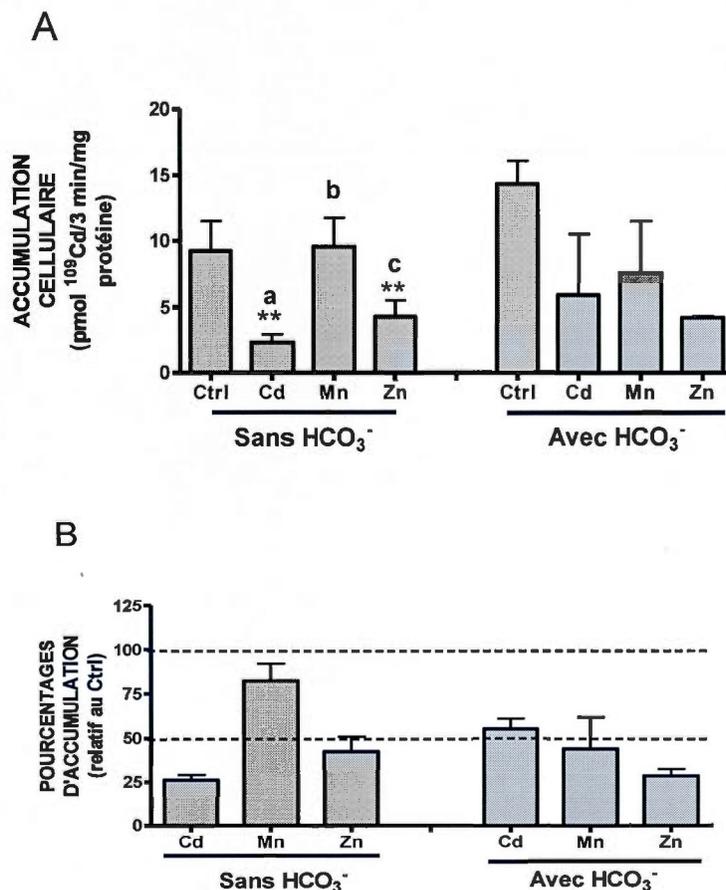


Figure 8.6: A) Accumulation (3 min) de 0.5 μM de ^{109}Cd dans les cellules MG63 à pH 7.4 en absence (Ctrl), en présence de 100 μM de Cd, de Mn ou de Zn avec ou sans 20 mM de HCO_3^- . ** Différences significatives ($p < 0.05$) comparativement à la condition Ctrl. Les lettres différentes indiquent des résultats significativement différents B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la situation Ctrl respective. Les résultats sont les moyennes \pm écarts type évalués sur 2 à 6 cultures indépendantes

Pour les autres ZIP étudiés (ZIP1, 4 et hZTL1), il n'y a pas de caractéristique spécifique qui permet de les discriminer. Il a été montré que ZIP1, suivant le type de cellule, peut avoir des localisations différentes (membrane plasmique, cytoplasme ou RE). Il serait peut-être impliqué dans le transport de Cd. Pour ce qui est de ZIP4, il est à ce jour décrit comme le transporteur principal de Zn des entérocytes. Localisé à la membrane apicale, son rôle est de transporter le Zn issu de la diète jusque dans la cellule

afin d'assurer l'homéostasie du Zn. Son importance a été prouvée chez des patients présentant une mutation dans le gène ZIP4 menant à une déficience majeure dans l'absorption du Zn (Ford, 2004).

L'impact de la spéciation sur le transport de métaux par les ZIP n'a jamais été étudié. La plupart des travaux sont menés avec des milieux contenant du chlorure alors qu'il semble acquis que les ZIP transportent des formes cationiques. Or le chlorure diminue grandement la présence d'ions libres pour certains métaux, dont le Cd. En effet, comme montré dans l'étude de Elisma et Jumarie (Elisma et Jumarie, 2001), les calculs faits avec le logiciel MINEQL⁺ ont révélé qu'en conditions chlorées (Cl₂), seulement 14% du métal total dissous est sous la forme Cd²⁺. En revanche, la complexation du Cd avec le NO₃⁻ est négligeable comparée à celle avec le chlorure et la proportion d'ion Cd²⁺ augmente à 80% lorsque le Cl⁻ est remplacé par le NO₃⁻ (Tableau 8.2). La spéciation du Mn et du Zn ne change pas selon que l'on soit en chlorure ou en nitrate, contrairement à celle du Cd.

Nous avons donc comparé les niveaux d'accumulation de ¹⁰⁹Cd selon la spéciation du Cd en milieu chloré ou nitraté (figure 8.7A). Il est intéressant de remarquer que l'accumulation totale (Ctrl) augmente significativement en milieu nitrate comparativement au milieu chlore. L'inhibition par le Cd froid est comparable entre les deux conditions de spéciation et quelque soit le jour de différenciation des cellules (50-55% du transport spécifique). L'ajout de Mn dans les cellules Caco-2 (J7) en milieu chloré inhibe l'accumulation totale de ¹⁰⁹Cd de 26% et le transport spécifique de 47%. En milieu nitraté, l'inhibition augmente à 29% du transport total et 57% du transport spécifique. Pour les cellules différenciées, on observe à la figure 8.7B une augmentation de l'inhibition par le Mn en milieu nitraté bien que la différence ne soit pas significative (de 50% à 63% du transport spécifique). L'inhibition par le Zn en milieu nitraté est plus faible qu'en milieu chloré. Ces résultats sont les mêmes quelque soit le jour de différenciation. Nous n'avons donc pas pu observer clairement un effet de la spéciation du Cd sur la compétition par le Zn et le Mn.

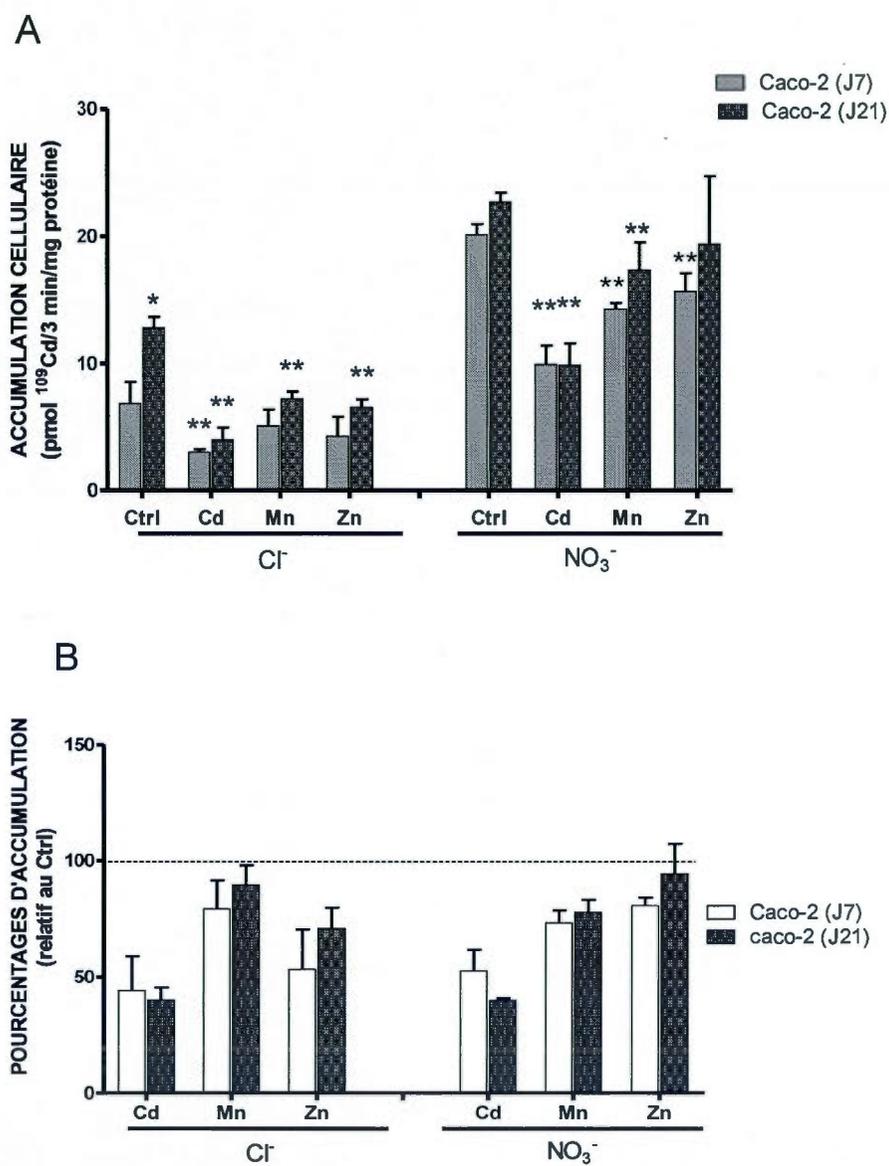


Figure 8.7: A) Niveaux d'accumulation (3 min) de $0.5 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd dans les cellules Caco-2 (J7, J21) dans un milieu chloré ou nitraté, en absence (Ctrl) ou en présence de $100 \mu\text{M}$ de Cd, de Mn ou de Zn. **Différences significatives ($p < 0.05$) comparativement à la condition Ctrl. B) Pourcentages d'accumulation exprimés relativement à la situation Ctrl respective. Les résultats sont les moyennes \pm écarts type évalués sur 2 à 4 cultures indépendantes.

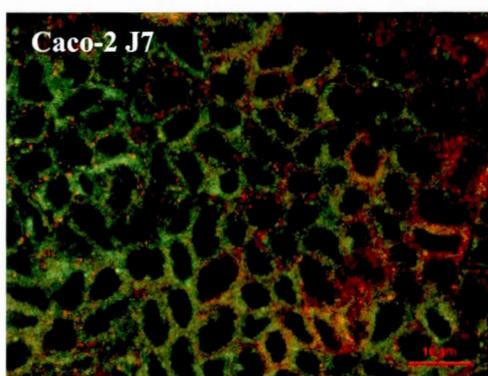
Medium	pH 7.5		pH 5.5	
	Species	% Total	Species	% Total
Chloride	CdCl^+	61.3	CdCl^+	62.4
	CdCl_2	20.7	CdCl_2	21.2
	Cd^{2+}	14	Cd^{2+}	14.3
	CdCl_3^-	1.9	CdCl_3^-	1.9
Nitrate	Cd^{2+}	80.4	Cd^{2+}	85.2
	CdNO_3^+	11.7	CdNO_3^+	12.4
	CdHCO_3^+	5.3	CdHCO_3^+	—
	CdSO_4	1.7	CdSO_4	1.8

Tableau 8.2: Spéciation du Cd dans le milieu de transport selon le pH (Elisma et Jumarie, 2001).

8.3 Localisation cellulaire de ZIP4

Étant donné que les niveaux d'ARNm de ZIP4 augmentent avec l'état de différenciation, on a cherché à vérifier au niveau de la protéine, si ces résultats se confirment. Dans la littérature, il a été montré que ZIP4 est localisé à la membrane apicale des entérocytes et des cellules Caco-2. En revanche, il n'y a pas d'étude qui ont été faites sur la lignée des cellules MG63. Il est donc question dans cette dernière partie d'étudier la localisation de ZIP4 dans les deux lignées cellulaires et selon la différenciation entérocytaire.

A



B

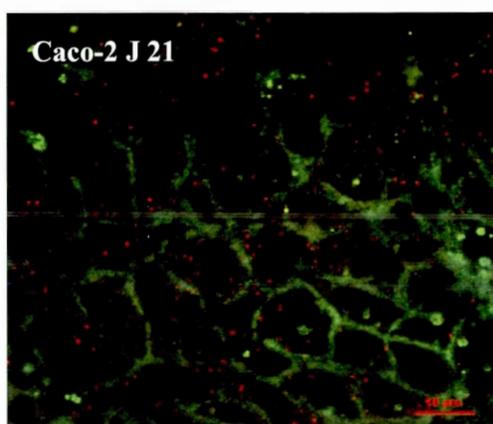


Figure 8.8: Détection de ZIP4 par immuofluorescence dans des cellules Caco-2 (J7 et J21). Les cellules Caco-2 A (J7) et B (J21) ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées au Triton 0.2%. Les membranes ont été marquées par du PKH67 (vert). Pour détecter ZIP4, les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire (anti-ZIP4) puis un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 568 (rouge). Les cellules ont été analysées par un microscope à fluorescence confocal. Les images superposées de ZIP4 et du PKH67 révèlent les zones de colocalisation.

Dans la figure 8.8, on observe que ZIP4 est majoritairement exprimé à la membrane des cellules Caco-2 (J7) indifférenciées. En effet, les zones orangées sont le résultat de la superposition de la fluorescence verte (membrane) avec la fluorescence rouge (ZIP4). Il est possible de voir que ZIP4 est exprimé à la membrane cellulaire mais aussi au niveau intracellulaire dans le cas des cellules Caco-2 (J21) différenciées. Comme vu précédemment, ZIP4 est le transporteur de Zn principal des entérocytes. Son rôle est de transporter le Zn extracellulaire issu de la diète vers le milieu intracellulaire.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM contenant 15% de FBS. Ce dernier contient tous les nutriments essentiels à la croissance des cellules, notamment du Zn. Les cellules sont donc exposées à des concentrations en Zn adéquates. Nos résultats d'ARNm montrent que ZIP4 est plus exprimé dans les cellules J21 que dans les cellules J7, c.a.d que son expression augmente avec la différenciation entérocytaire. Les niveaux d'ARNm augmentant au jour 21, si la transcription est complète, ZIP4 est abondant et une partie de ces protéines serait envoyée à la membrane, tandis qu'une autre partie resterait dans les compartiments intracellulaires sous forme de réserve. En revanche, ZIP4 serait dégradé en présence de hauts niveaux de Zn (10-20 μM) comparativement à ceux nécessaires pour l'endocytose (1 μM). Les niveaux de Zn apportés par l'ajout de FBS dans le milieu de culture sont d'environ 2.5 μM . Cette concentration permettrait l'endocytose de ZIP4 plutôt que sa dégradation.

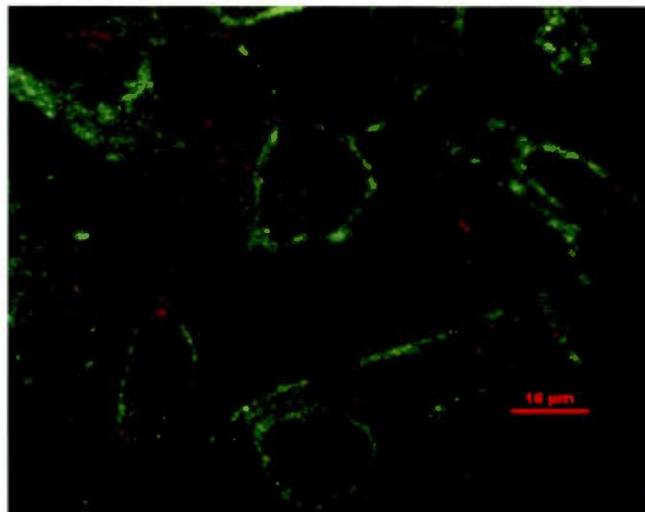


Figure 8.9: Détection de ZIP4 par immuofluorescence dans des cellules MG63. Les cellules MG63 ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées au Triton 0.2%. Les membranes ont été marquées par du PKH67 (vert). Pour détecter ZIP4, les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire (anti-ZIP4) puis un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Rhodamine (rouge). Les cellules ont été analysées par un microscope à fluorescence confocal. Les images superposées de ZIP4 et du PKH67 révèlent les zones de colocalisation.

Les cellules MG63 expriment ZIP4 au niveau intracellulaire (figure 8.9). Cette localisation diffère de celle observée dans les cellules Caco-2. Il est possible de suggérer un rôle différent de ZIP4. Sa localisation intracellulaire lui permettrait d'augmenter la concentration de Zn cytoplasmique en favorisant le relargage du Zn hors des compartiments intracellulaires vers le cytoplasme (Matsuura *et al.*, 2009 ; Shen, Qin et Guo, 2008).

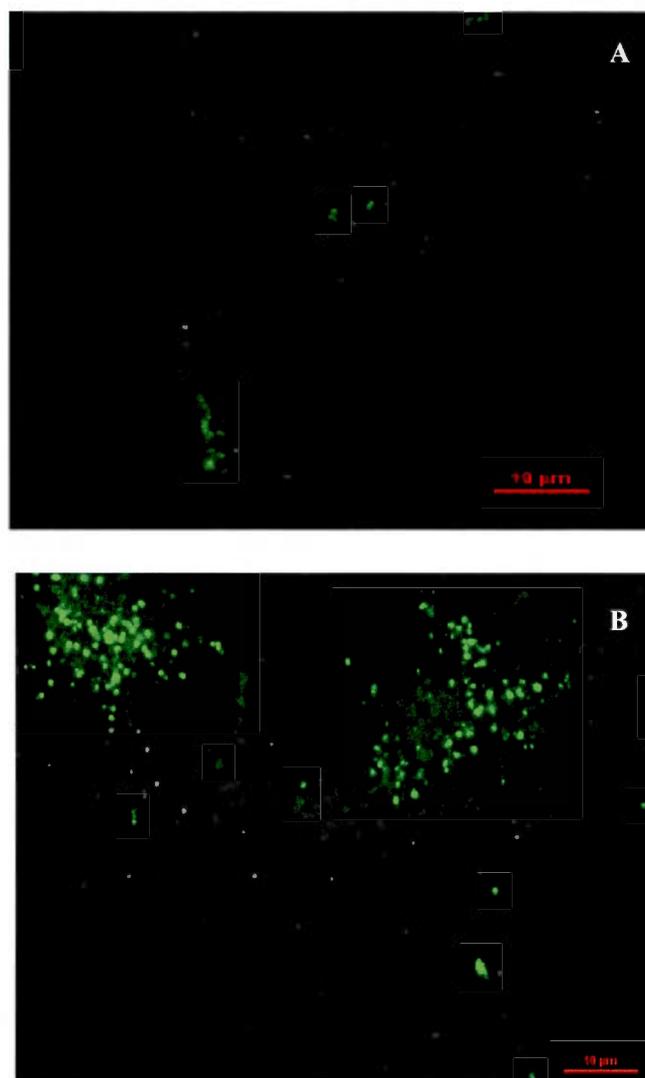


Figure 8.10: Détection de ZIP4 par immuofluorescence dans des cellules COS-7. Les cellules COS-7 ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées au Triton 0.2%. Les membranes ont été marquées par du PKH67 (vert). A) Pour détecter ZIP4, les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire (anti-ZIP4) puis un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Rhodamine (rouge). B) Pour vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire, les cellules ont été marquées uniquement avec de la Rhodamine (rouge), en l'absence de l'anticorps ZIP4. Les cellules ont été analysées par un microscope à fluorescence confocal. Les images superposées de ZIP4 et du PKH67 révèlent les zones de colocalisation.

Les cellules COS-7 sont des fibroblastes rénaux d'origine simiesque *Cercopithecus aethiops* et sont utilisés dans ce projet comme contrôle négatif pour

confirmer la spécificité de l'anticorps ZIP4. Dans la figure 8.10A, on observe une fluorescence faible rouge uniquement au-niveau du noyau. La figure 8.10B confirme la spécificité de l'anticorps secondaire (Rhodamine) puisque en absence de ZIP4 contre lequel il est dirigé, il n'y a aucune fluorescence rouge détectable. La fluorescence rouge observée dans la figure 8.10A serait due à un manque de spécificité de l'anticorps primaire ZIP4. En revanche, ces résultats ne remettent pas en question nos résultats dans les cellules Caco-2 et MG63 puisque le marquage est uniquement nucléaire et ceci n'a pas été observé dans les autres lignées auparavant. Dans les cellules COS-7, l'anticorps dirigé contre ZIP4 reconnaîtrait un épitope localisé dans le noyau non apparenté à ZIP4.

CONCLUSION

Le Cd est un métal lourd, cancérigène pour l'homme. La population est exposée au Cd par la nourriture contaminée (Mason, 1990). Le Cd est absorbé majoritairement dans l'organisme par l'épithélium intestinal, ce qui fait de ce dernier un organe cible du Cd. De plus, après la découverte de la maladie d'Itai-Itai, qui se traduit par de l'ostéomalacie et une néphrotoxicité aiguë, les reins et le tissu osseux ont été identifiés comme étant des organes cibles primaires du Cd (Suzuki *et al.*, 2004). C'est dans ce contexte que nous avons utilisé une lignée cellulaire humaine entérocytaire Caco-2 et une lignée cellulaire humaine ostéoblastique MG63. Le but principal de ce projet a été de mieux cerner l'implication des transporteurs de Zn (ZIP) dans l'accumulation du Cd.

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que les deux modèles cellulaires utilisés, Caco-2 et MG63 expriment les ZIP à l'étude (ZIP1, ZIP4, ZIP8 et hZTL1). De plus, dans les cellules Caco-2, on observe une diminution de l'expression de ZIP1 et une augmentation de l'expression de ZIP4 lors de la différenciation entérocytaire. Les mesures de transport de ^{109}Cd à trois pH (5.5, 7.5 et 8.5) en présence de Mn, de Zn ou de HCO_3^- ont permis de mieux discerner certains ZIP selon leurs propriétés fonctionnelles. En effet, il a été montré dans plusieurs études que ZIP8 serait un symporteur de $\text{Zn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$ ou $\text{Mn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$ (He *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que l'accumulation de Cd est inhibé par le Zn et le Mn et ce plus fortement en présence de HCO_3^- ce qui est en accord avec l'idée d'un symporteur $\text{Zn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$ ou $\text{Mn}^{2+}/(\text{HCO}_3^-)_2$ qui transporterait le Cd dans les cellules MG63. Dans les cellules Caco-2, les résultats n'ont pas été concluants. Bien que l'ajout de HCO_3^- stimule l'inhibition par le Mn, il n'augmente pas l'accumulation du ^{109}Cd en condition Ctrl. On constate qu'à pH 5.5 dans les cellules Caco-2 (J 21), il y a une perte totale de l'inhibition par le Zn et le Mn, tandis qu'à pH 7.5 et 8.5, l'inhibition est forte. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il a été montré que ZIP4 et ZIP8 sont inhibés à pH 5.5 mais optimaux à pH 7.5 et 8.5 (He *et al.*, 2006). Par ailleurs, il est possible de remarquer une inhibition par le Zn à pH 5.5 dans les cellules MG63 et Caco-2 (J7). Cette inhibition pourrait s'expliquer par le fait que les ZIP peuvent être partiellement fonctionnels à ce pH malgré que leur activité soit optimale à 7.5 et 8.5. Il serait possible aussi de suspecter l'implication de NRAMP2 qui est un transporteur de fer optimal à pH acide (Elisma et Jumarie, 2001; Picard *et al.*, 2000). Il a été montré dans plusieurs études qu'il pouvait transporter le Cd^{2+} . Bien que son

expression n'ait pas été démontrée dans les cellules MG63, elle l'a été dans les cellules Caco-2 (Elisma et Jumarie, 2001).

Pour la suite du projet, il aurait été possible de faire de l'immunolocalisation pour ZIP8, ZIP1 et hZTL1. Il serait intéressant de diminuer l'expression de ZIP4 et de ZIP8 par siRNA et de mesurer l'impact sur le transport de ^{109}Cd . Ainsi, on pourrait confirmer et préciser la réelle implication de ZIP4 et de ZIP8 dans l'accumulation de Cd.

Donc ce projet a permis de mieux caractériser la lignée cellulaire Caco-2 et MG63 dans l'expression de quelques membres de la famille des ZIP, et de suggérer l'implication de ZIP4 et de ZIP8 dans l'accumulation de Cd.

RÉFÉRENCES

- André, J-M., M. Catala, J-J. Morère, E. Escudier, G. Katsanis et J. Poirier. 2008. «Histologie : les tissus».
- Andrews, G. K., et J. Geiser. 1999. «Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency». *J Nutr*, vol. 129, no 9, p. 1643-1648.
- Angle, C. R., D. J. Thomas et S. A. Swanson. 1993. «Osteotoxicity of cadmium and lead in HOS TE 85 and ROS 17/2.8 cells: relation to metallothionein induction and mitochondrial binding». *Biometals*, vol. 6, no 3, p. 179-184.
- Bannon, D. I., R. Abounader, P. S. Lees et J. P. Bressler. 2003. «Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 284, no 1, p. C44-50.
- Becker, W. M., et W. G. Hoekstra. 1966. «Effect of vitamin D on 65Zn absorption, distribution and turnover in rats». *J Nutr*, vol. 90, no 3, p. 301-309.
- Bedrine-Ferran, H., N. Le Meur, I. Gicquel, M. Le Cunff, N. Soriano, I. Guisle, S. Mottier, A. Monnier, R. Teusan, P. Fergelot, J. Y. Le Gall, J. Leger et J. Mosser. 2004. «Transcriptome variations in human CaCo-2 cells: a model for enterocyte differentiation and its link to iron absorption». *Genomics*, vol. 83, no 5, p. 772-789.
- Berg, J. M., et Y. Shi. 1996. «The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc». *Science*, vol. 271, no 5252, p. 1081-1085.
- Bergman, B., et R. Soremark. 1968. «Autoradiographic studies on the distribution of zinc-65 in mice». *J Nutr*, vol. 94, no 1, p. 6-12.
- Bernard, A. 2008. «Cadmium & its adverse effects on human health». *Indian J Med Res*, vol. 128, no 4, p. 557-564.
- Bertolo, R. F., W. J. Bettger et S. A. Atkinson. 2001. «Calcium competes with zinc for a channel mechanism on the brush border membrane of piglet intestine». *J Nutr Biochem*, vol. 12, no 2, p. 66-72.

- Berzina, N., J. Markovs, S. Isajevs, M. Apsite et G. Smirnova. 2007. «Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: a biochemical and histological study after subchronic exposure». *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, vol. 101, no 1, p. 29-34
- Billiau, A., V. G. Edy, H. Heremans, J. Van Damme, J. Desmyter, J. A. Georgiades et P. De Somer. 1977. «Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63». *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 12, no 1, p. 11-15.
- Bird, A. J., S. Swierczek, W. Qiao, D. J. Eide et D. R. Winge. 2006. «Zinc metalloregulation of the zinc finger pair domain». *J Biol Chem*, vol. 281, no 35, p. 25326-25335.
- Boveri, M., P. Pazos, A. Gennari, J. Casado, T. Hartung et P. Prieto. 2004. «Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 cells after cadmium chloride treatment». *Arch Toxicol*, vol. 78, no 4, p. 201-206.
- Bradford, M. 1976. «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding». *Anal Biochem*. 72:248-254.
- Brignon, JM. , et L. Malherbe. 2005. «Cadmium et ses dérivés». *Rapport INERIS-DRC-MECO*.
- Canonne-Hergaux, F., J. E. Levy, M. D. Fleming, L. K. Montross, N. C. Andrews et P. Gros. 2001. «Expression of the DMT1 (NRAMP2/DCT1) iron transporter in mice with genetic iron overload disorders». *Blood*, vol. 97, no 4, p. 1138-1140.
- Cardin, G. B., M. Mantha et C. Jumarie. 2009. «Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms». *Biometals*, vol. 22, no 5, p. 753-769.
- Caulfield, L. E., N. Zavaleta, A. H. Shankar et M. Meriardi. 1998. «Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival». *Am J Clin Nutr*, vol. 68, no 2 Suppl, p. 499S-508S.
- Chalkley, S. R., J. Richmond et D. Barltrop. 1998. «Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium». *Occup Environ Med*, vol. 55, no 7, p. 446-452.
- Chevrier, G. 2002. «Les cellules et la biologie cellulaire».

- Clemens, S. 2006. «Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants». *Biochimie*, vol. 88, no 11, p. 1707-1719.
- Cole, T. B., H. J. Wenzel, K. E. Kafer, P. A. Schwartzkroin et R. D. Palmiter. 1999. «Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no 4, p. 1716-1721.
- Collier, I. E., S. M. Wilhelm, A. Z. Eisen, B. L. Marmer, G. A. Grant, J. L. Seltzer, A. Kronberger, C. S. He, E. A. Bauer et G. I. Goldberg. 1988. «H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen». *J Biol Chem*, vol. 263, no 14, p. 6579-6587.
- Condomina, J., T. Zornoza-Sabina, L. Granero et A. Polache. 2002. «Kinetics of zinc transport in vitro in rat small intestine and colon: interaction with copper». *Eur J Pharm Sci*, vol. 16, no 4-5, p. 289-295.
- Coonse, K. G., A. J. Coonts, E. V. Morrison et S. J. Heggland. 2007. «Cadmium induces apoptosis in the human osteoblast-like cell line Saos-2». *J Toxicol Environ Health A*, vol. 70, no 7, p. 575-581.
- Cragg, R. A., G. R. Christie, S. R. Phillips, R. M. Russi, S. Kury, J. C. Mathers, P. M. Taylor et D. Ford. 2002. «A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane». *J Biol Chem*, vol. 277, no 25, p. 22789-22797.
- Cragg, R. A., S. R. Phillips, J. M. Piper, J. S. Varma, F. C. Campbell, J. C. Mathers et D. Ford. 2005. «Homeostatic regulation of zinc transporters in the human small intestine by dietary zinc supplementation». *Gut*, vol. 54, no 4, p. 469-478.
- Dalton, T., K. Fu, R. D. Palmiter et G. K. Andrews. 1996. «Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency». *J Nutr*, vol. 126, no 4, p. 825-833.
- Desouky, M., R. Jugdaohsingh, C. R. McCrohan, K. N. White et J. J. Powell. 2002. «Aluminum-dependent regulation of intracellular silicon in the aquatic invertebrate *Lymnaea stagnalis*». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no 6, p. 3394-3399.

- Devergnas, S., F. Chimienti, N. Naud, A. Pennequin, Y. Coquerel, J. Chantegrel, A. Favier et M. Seve. 2004. «Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study». *Biochem Pharmacol*, vol. 68, no 4, p. 699-709.
- Dufner-Beattie, J., Y. M. Kuo, J. Gitschier et G. K. Andrews. 2004. «The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5». *J Biol Chem*, vol. 279, no 47, p. 49082-49090.
- Dufner-Beattie, J., F. Wang, Y. M. Kuo, J. Gitschier, D. Eide et G. K. Andrews. 2003. «The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice». *J Biol Chem*, vol. 278, no 35, p. 33474-33481.
- Duizer, E., A. J. Gilde, C. H. Versantvoort et J. P. Groten. 1999. «Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 155, no 2, p. 117-126.
- Elisma, F., et C. Jumarie. 2001. «Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 285, no 3, p. 662-668.
- Elmstahl, S., B. Gullberg, L. Janson, O. Johnell et B. Elmstahl. 1998. «Increased incidence of fractures in middle-aged and elderly men with low intakes of phosphorus and zinc». *Osteoporos Int*, vol. 8, no 4, p. 333-340.
- Feng, J., Z. Shi et Z. Ye. 2008. «Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells». *Biol Pharm Bull*, vol. 31, no 6, p. 1067-1070.
- Fleming, M. D., C. C. Trenor, 3rd, M. A. Su, D. Foernzler, D. R. Beier, W. F. Dietrich et N. C. Andrews. 1997. «Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene». *Nat Genet*, vol. 16, no 4, p. 383-386.
- Fogh, J., J. M. Fogh et T. Orfeo. 1977. «One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice». *J Natl Cancer Inst*, vol. 59, no 1, p. 221-226.

- Ford, D. 2004. «Intestinal and placental zinc transport pathways». *Proc Nutr Soc*, vol. 63, no 1, p. 21-29.
- Franklin, R. B., P. Feng, B. Milon, M. M. Desouki, K. K. Singh, A. Kajdacsy-Balla, O. Bagasra et L. C. Costello. 2005. «hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer». *Mol Cancer*, vol. 4, p. 32.
- Franklin, R. B., J. Ma, J. Zou, Z. Guan, B. I. Kukoyi, P. Feng et L. C. Costello. 2003. «Human ZIP1 is a major zinc uptake transporter for the accumulation of zinc in prostate cells». *J Inorg Biochem*, vol. 96, no 2-3, p. 435-442.
- Fujieda, M., N. Takao, M. Kiri, S. Mizuochi, H. Kaneki et H. Ide. 2001. «Age-dependent decline in bone nodule formation stimulating activity in rat serum is mainly due to the change in the corticosterone level». *J Cell Biochem*, vol. 81, no 3, p. 547-556.
- Fujishiro, H., S. Okugaki, K. Kubota, T. Fujiyama, H. Miyataka et S. Himeno. 2009. «The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells». *J Appl Toxicol*, vol. 29, no 5, p. 367-373.
- Fukada, T., N. Civic, T. Furuichi, S. Shimoda, K. Mishima, H. Higashiyama, Y. Idaira, Y. Asada, H. Kitamura, S. Yamasaki, S. Hojyo, M. Nakayama, O. Ohara, H. Koseki, H. G. Dos Santos, L. Bonafe, R. Ha-Vinh, A. Zankl, S. Unger, M. E. Kraenzlin, J. S. Beckmann, I. Saito, C. Rivolta, S. Ikegawa, A. Superti-Furga et T. Hirano. 2008. «The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways». *PLoS One*, vol. 3, no 11, p. e3642.
- Gaither, L. A., et D. J. Eide. 2001. «The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells». *J Biol Chem*, vol. 276, no 25, p. 22258-22264.
- Ganong, W. 2005. *Physiologie médicale*.
- Girijashanker, K., L. He, M. Soleimani, J. M. Reed, H. Li, Z. Liu, B. Wang, T. P. Dalton et D. W. Nebert. 2008. «Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter». *Mol Pharmacol*, vol. 73, no 5, p. 1413-1423.

- Gres, M. C., B. Julian, M. Bourrie, V. Meunier, C. Roques, M. Berger, X. Boulenc, Y. Berger et G. Fabre. 1998. «Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line». *Pharm Res*, vol. 15, no 5, p. 726-733.
- Guerinot, M. L. 2000. «The ZIP family of metal transporters». *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1465, no 1-2, p. 190-198.
- Gunshin, H., B. Mackenzie, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan et M. A. Hediger. 1997. «Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter». *Nature*, vol. 388, no 6641, p. 482-488.
- Hadley, K. B., S. M. Newman et J. R. Hunt. 2010. «Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats». *J Nutr Biochem*, vol. 21, no 4, p. 297-303.
- Hambidge, M., et N. F. Krebs. 2001. «Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements». *Annu Rev Nutr*, vol. 21, p. 429-452.
- Hambidge, M., et N. F. Krebs. 2007. «Zinc deficiency: a special challenge». *J Nutr*, vol. 137, no 4, p. 1101-1105.
- Hambidge, M., L. V. Miller, J. E. Westcott, X. Sheng et N. F. Krebs. 2010. «Zinc bioavailability and homeostasis». *American Society for Nutrition*, p. 1478S-1483S.
- Hashizume, M., et M. Yamaguchi. 1994. «Effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: Increases in alkaline phosphatase activity and protein concentration». *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 131, no 1, p. 19-24.
- He, L., K. Girijashanker, T. P. Dalton, J. Reed, H. Li, M. Soleimani et D. W. Nebert. 2006. «ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties». *Mol Pharmacol*, vol. 70, no 1, p. 171-180.

- He, L., B. Wang, E. B. Hay et D. W. Nebert. 2009. «Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 238, no 3, p. 250-257.
- Holloway, W. R., F. M. Collier, R. E. Herbst, J. M. Hodge et G. C. Nicholson. 1996. «Osteoblast-mediated effects of zinc on isolated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and enhancement of osteoclast number». *Bone*, vol. 19, no 2, p. 137-142. Nlm.
- Huang, L., C. P. Kirschke et J. Gitschier. 2002. «Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6». *J Biol Chem*, vol. 277, no 29, p. 26389-26395
- Huang, Z. L., J. Dufner-Beattie et G. K. Andrews. 2006. «Expression and regulation of SLC39A family zinc transporters in the developing mouse intestine». *Dev Biol*, vol. 295, no 2, p. 571-579.
- Hurley, L. S., J. Gowan et G. Milhaud. 1969. «Calcium metabolism in manganese-deficient and zinc-deficient rats». *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 130, no 3, p. 856-860.
- Hyun, T. H., E. Barrett-Connor et D. B. Milne. 2004. «Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study». *Am J Clin Nutr*, vol. 80, no 3, p. 715-721.
- Inoue, K., K. Matsuda, M. Itoh, H. Kawaguchi, H. Tomoike, T. Aoyagi, R. Nagai, M. Hori, Y. Nakamura et T. Tanaka. 2002a. «Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, *Znt5*». *Hum Mol Genet*, vol. 11, no 15, p. 1775-1784.
- Inoue, K., K. Matsuda, M. Itoh, H. Kawaguchi, H. Tomoike, T. Aoyagi, R. Nagai, M. Hori, Y. Nakamura et T. Tanaka. 2002b. «Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, *Znt5*». *Human Molecular Genetics*, vol. 11, no 15, p. 1775-1784.
- Iwami, K., et T. Moriyama. 1993. «Comparative effect of cadmium on osteoblastic cells and osteoclastic cells». *Arch Toxicol*, vol. 67, no 5, p. 352-357..

- Jackson, K. A., R. M. Helston, J. A. McKay, E. D. O'Neill, J. C. Mathers et D. Ford. 2007. «Splice variants of the human zinc transporter ZnT5 (SLC30A5) are differentially localized and regulated by zinc through transcription and mRNA stability». *J Biol Chem*, vol. 282, no 14, p. 10423-10431.
- Jarup, L. 2002. «Cadmium overload and toxicity». *Nephrol Dial Transplant*, vol. 17 Suppl 2, p. 35-39.
- Josse, R-G. . 2009. «La biologie de l'os et le rôle du mécanisme RANK/RANKL/OPG». *Health Plexus*.
- Jou, M. Y., A. G. Hall, A. F. Philipps, S. L. Kelleher et B. Lonnerdal. 2009. «Tissue-specific alterations in zinc transporter expression in intestine and liver reflect a threshold for homeostatic compensation during dietary zinc deficiency in weanling rats». *J Nutr*, vol. 139, no 5, p. 835-841.
- Jou, M. Y., A. F. Philipps, S. L. Kelleher et B. Lonnerdal. 2010. «Effects of zinc exposure on zinc transporter expression in human intestinal cells of varying maturity». *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, vol. 50, no 6, p. 587-595.
- Jumarie, C., P. G. Campbell, M. Houde et F. Denizeau. 1999. «Evidence for an intracellular barrier to cadmium transport through Caco-2 cell monolayers». *J Cell Physiol*, vol. 180, no 2, p. 285-297.
- Jumarie, C., C. Fortin, M. Houde, P. G. Campbell et F. Denizeau. 2001. «Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatins». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 170, no 1, p. 29-38.
- Kamioka, H., K. Sumitani, K. Tagami, Y. Miki, K. Terai, Y. Hakeda, M. Kumegawa et T. Kawata. 1994. «Divalent cations elevate cytosolic calcium of chick osteocytes». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 204, no 2, p. 519-524.
- Kim, B. E., F. Wang, J. Dufner-Beattie, G. K. Andrews, D. J. Eide et M. J. Petris. 2004. «Zn²⁺-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane». *J Biol Chem*, vol. 279, no 6, p. 4523-4530.
- King, J. C., D. M. Shames, N. M. Lowe, L. R. Woodhouse, B. Sutherland, S. A. Abrams, J. R. Turnlund et M. J. Jackson. 2001. «Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men». *Am J Clin Nutr*, vol. 74, no 1, p. 116-124.

- King, J. C., D. M. Shames et L. R. Woodhouse. 2000. «Zinc homeostasis in humans». *J Nutr*, vol. 130, no 5S Suppl, p. 1360S-1366S.
- Kirschke, C. P., et L. Huang. 2003. «ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus». *J Biol Chem*, vol. 278, no 6, p. 4096-4102.
- Krebs, N. F., et K. M. Hambidge. 1986. «Zinc requirements and zinc intakes of breast-fed infants». *Am J Clin Nutr*, vol. 43, no 2, p. 288-292.
- Krebs, N. F., K. M. Hambidge, J. E. Westcott, L. V. Miller, L. Sian, M. Bell et G. Grunwald. 2003. «Exchangeable zinc pool size in infants is related to key variables of zinc homeostasis». *J Nutr*, vol. 133, no 5 Suppl 1, p. 1498S-1501S.
- Kury, S., B. Dreno, S. Bezieau, S. Giraudet, M. Kharfi, R. Kamoun et J. P. Moisan. 2002. «Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica». *Nat Genet*, vol. 31, no 3, p. 239-240.
- Kwong, R. W., et S. Niyogi. 2012. «Cadmium transport in isolated enterocytes of freshwater rainbow trout: interactions with zinc and iron, effects of complexation with cysteine, and an ATPase-coupled efflux». *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, vol. 155, no 2, p. 238-246.
- Langmade, S. J., R. Ravindra, P. J. Daniels et G. K. Andrews. 2000. «The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene». *J Biol Chem*, vol. 275, no 44, p. 34803-34809.
- Lauwerys, R., Haufroid, V., Hoet, P., Lison, D (2007). Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Elsevier Masson: p. 1252
- Levesque, M., C. Martineau, C. Jumarie et R. Moreau. 2008. «Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 231, no 3, p. 308-317.
- Liuzzi, J. P., et R. J. Cousins. 2004. «Mammalian zinc transporters». *Annu Rev Nutr*, vol. 24, p. 151-172.
- Logothetis, CJ, et SH Lin. 2005. «Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone». *ScienceScape*.

- Long, G. J. 1997. «The effect of cadmium on cytosolic free calcium, protein kinase C, and collagen synthesis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 143, no 1, p. 189-195.
- Lutz, W., M. F. Burritt, D. E. Nixon, P. C. Kao et R. Kumar. 2000. «Zinc increases the activity of vitamin D-dependent promoters in osteoblasts». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 271, no 1, p. 1-7.
- MacDonald, R. S. 2000. «The role of zinc in growth and cell proliferation». *J Nutr*, vol. 130, no 5S Suppl, p. 1500S-1508S.
- Mackenzie, B., et M. D. Garrick. 2005. «Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 289, no 6, p. G981-986.
- Mackenzie, B., et M. A. Hediger. 2004. «SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1». *Pflugers Arch*, vol. 447, no 5, p. 571-579.
- Mackie, E. 2003. «Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture». *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, pp. 1301-1305
- Maia, S, et F Paycha. 2007. «Mécanismes de fixation des bisphosphonates-(99mTc) : matrice organique, minérale ou cellulaire ?». *Eurocancer*.
- Mantha, M., et C. Jumarie. 2010. «Cadmium-induced hormetic effect in differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation». *J Cell Physiol*, vol. 224, no 1, p. 250-261.
- Mao, X., B. E. Kim, F. Wang, D. J. Eide et M. J. Petris. 2007. «A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity». *J Biol Chem*, vol. 282, no 10, p. 6992-7000.
- Marieb, E. 2005. *Anatomie et physiologie humaine*, 3^{ème} édition française: Pearson Education, Ch.23 p932-936 p.
- Martin, P., M. C. Poggi, J. C. Chambard, K. E. Boulukos et P. Pognonec. 2006. «Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 350, no 3, p. 803-807.

- Mason, R.W. 1990. «Cadmium». *National Toxicology Group*.
- Matsui, T. 1995. «Zinc modulation of insulin-like growth factor's effect in osteoblastic MC3T3-E1 cells». *Peptides*, vol. 16, no 6, p. 1063-1068.
- Matsuura, W., T. Yamazaki, Y. Yamaguchi-Iwai, S. Masuda, M. Nagao, G. K. Andrews et T. Kambe. 2009. «SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells». *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 73, no 5, p. 1142-1148.
- McLaughlin, M. J., M. Whatmuff, M. Warne, D. Heemsbergen, G. Barry, M. Bell, D. Nash et D. Pritchard. 2006. «A Field Investigation of Solubility and Food Chain Accumulation of Biosolid-Cadmium Across Diverse Soil Types». *Environmental Chemistry*, vol. 3, no 6, p. 428-432.
- Meunier, P-J. 2005. *L'ostéoporose*.
- Meunier, V., M. Bourrie, Y. Berger et G. Fabre. 1995. «The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications». *Cell Biol Toxicol*, vol. 11, no 3-4, p. 187-194.
- Milon, B., D. Dhermy, D. Pountney, M. Bourgeois et C. Beaumont. 2001. «Differential subcellular localization of hZip1 in adherent and non-adherent cells». *FEBS Lett*, vol. 507, no 3, p. 241-246.
- Minkin, C. 1982. «Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function». *Calcif Tissue Int*, vol. 34, no 3, p. 285-290.
- Moonga, B. S., et D. W. Dempster. 1995. «Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro». *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 10, no 3, p. 453-457.
- Murgia, C., I. Vespignani, J. Cerase, F. Nobili et G. Perozzi. 1999. «Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells». *Am J Physiol*, vol. 277, no 6 Pt 1, p. G1231-1239.
- Nath, R., R. Kambadur, S. Gulati, V. K. Paliwal et M. Sharma. 1988. «Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins». *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 27, no 1, p. 41-85.

- Nordberg, G.F., Nogawa, K., Nordberg, M., Friberg, L.T. 2007. *Handbook of Toxicology of Metals*, 3ème édition, 445 à 480 p.
- Oner, G., B. Bhaumick et R. M. Bala. 1984. «Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats». *Endocrinology*, vol. 114, no 5, p. 1860-1863.
- Outten, C. E., et T. V. O'Halloran. 2001. «Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis». *Science*, vol. 292, no 5526, p. 2488-2492.
- Palmiter, R. D. 2004. «Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no 14, p. 4918-4923.
- Palmiter, R. D., T. B. Cole et S. D. Findley. 1996. «ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration». *EMBO J*, vol. 15, no 8, p. 1784-1791.
- Palmiter, R. D., et S. D. Findley. 1995. «Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc». *EMBO J*, vol. 14, no 4, p. 639-649.
- Palmiter, R. D., et L. Huang. 2004. «Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers». *Pflugers Arch*, vol. 447, no 5, p. 744-751.
- Perrot, S. 2002. *Rhumatologie*, 4 ème Édition.
- Picard, V., G. Govoni, N. Jabado et P. Gros. 2000. «Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool». *J Biol Chem*, vol. 275, no 46, p. 35738-35745.
- Pinilla-Tenas, J. J., B. K. Sparkman, A. Shawki, A. C. Illing, C. J. Mitchell, N. Zhao, J. P. Liuzzi, R. J. Cousins, M. D. Knutson et B. Mackenzie. 2011. «Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron». *Am J Physiol Cell Physiol*.

- Pinto, M., S. Robine-Leon, M-D. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assmann, K. Haffen, J. Fogh et A. Zweibaum. 1983. «Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCO2 in culture». *Biol Cell*, p. 323-330.
- Pocker, Y., et S. Sarkanen. 1978. «Carbonic anhydrase: structure catalytic versatility, and inhibition». *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, vol. 47, p. 149-274.
- Prasad, A. S., J. A. Halsted et M. Nadimi. 1961. «Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia». *Am J Med*, vol. 31, p. 532-546.
- Radtke, F., R. Heuchel, O. Georgiev, M. Hergersberg, M. Gariglio, Z. Dembic et W. Schaffner. 1993. «Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter». *EMBO J*, vol. 12, no 4, p. 1355-1362.
- Raffaniello, R. D., et R. A. Wapnir. 1991. «Zinc-induced metallothionein synthesis by Caco-2 cells». *Biochem Med Metab Biol*, vol. 45, no 1, p. 101-107.
- Reeves, P. G., M. Briske-Anderson et L. Johnson. 2001. «Pre-treatment of Caco-2 cells with zinc during the differentiation phase alters the kinetics of zinc uptake and transport(2)». *J Nutr Biochem*, vol. 12, no 12, p. 674-684.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J. (2000). «Zinc as an essential micronutrient: A review». *Nutrition Research* 20, 737-755.
- Sandstead, H. H. 1995. «Is zinc deficiency a public health problem?». *Nutrition*, vol. 11, no 1 Suppl, p. 87-92.
- Sandstead, H.H., Smith, J.C. (1996). «Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations». *Journal of Nutrition* 126, S2410-S2418.
- Santé Canada. 1979. «Rapport Santé de l'environnement et du milieu de travail : Le Zinc». En ligne.

- Satarug, S., S. H. Garrett, M. A. Sens et D. A. Sens. 2011. «Cadmium, environmental exposure, and health outcomes». *Cien Saude Colet*, vol. 16, no 5, p. 2587-2602.
- Semrad, C. E. 1999. «Zinc and intestinal function». *Curr Gastroenterol Rep*, vol. 1, no 5, p. 398-403.
- Shen, H., H. Qin et J. Guo. 2008. «Cooperation of metallothionein and zinc transporters for regulating zinc homeostasis in human intestinal Caco-2 cells». *Nutr Res*, vol. 28, no 6, p. 406-413.
- Simon-Assmann, P., N. Turck, M. Sidhoum-Jenny, G. Gradwohl et M. Kedinger. 2007. «In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation». *Cell Biol Toxicol*, vol. 23, no 4, p. 241-256.
- Smith, S. S., J. R. Reyes, K. S. Arbon, W. A. Harvey, L. M. Hunt et S. J. Hegglund. 2009. «Cadmium-induced decrease in RUNX2 mRNA expression and recovery by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in the human osteoblast-like cell line, Saos-2». *Toxicol In Vitro*, vol. 23, no 1, p. 60-66.
- Stevens, A., Lowe, J. . 1997. *Histologie humaine*, De Boeck Université, 416 pages p.
- Susi, F. R., P. Goldhaber et J. M. Jennings. 1966. «Histochemical and biochemical study of acid phosphatase in resorbing bone in culture». *Am J Physiol*, vol. 211, no 4, p. 959-962.
- Suzuki, N., M. Yamamoto, K. Watanabe, A. Kambegawa et A. Hattori. 2004. «Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism». *J Bone Miner Metab*, vol. 22, no 5, p. 439-446.
- Suzuki, T., K. Ishihara, H. Migaki, W. Matsuura, A. Kohda, K. Okumura, M. Nagao, Y. Yamaguchi-Iwai et T. Kambe. 2005. «Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no 1, p. 637-643.
- Takada, T., N. Suzuki, E. Ito-Kato, Y. Noguchi, M. Ito, M. Maeno et K. Otsuka. 2004. «Effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on the differentiation of C2C12 cells». *Life Sciences*, vol. 76, no 5, p. 509-520.

- Tang, Z., S. N. Sahu, M. A. Khadeer, G. Bai, R. B. Franklin et A. Gupta. 2006. «Overexpression of the ZIP1 zinc transporter induces an osteogenic phenotype in mesenchymal stem cells». *Bone*, vol. 38, no 2, p. 181-198.
- Taylor, C. M., J. R. Bacon, P. J. Aggett et I. Bremner. 1991. «Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men». *Am J Clin Nutr*, vol. 53, no 3, p. 755-763.
- Taylor, K. M., et R. I. Nicholson. 2003. «The LZT proteins; The LIV-1 subfamily of zinc transporters». *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1611, no 1-2, p. 16-30.
- Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Hudson, C.A., Betschart, A.A., Kretsch, M.J., Sauberlich, H.E. (1991). «A stable isotope study of zinc, copper and iron absorption and retention by young women fed vitamin B6-deficient diets». *American Journal of Clinical Nutrition* 54, 1059-1064.
- Valentine, R. A., K. A. Jackson, G. R. Christie, J. C. Mathers, P. M. Taylor et D. Ford. 2007. «ZnT5 variant B is a bidirectional zinc transporter and mediates zinc uptake in human intestinal Caco-2 cells». *J Biol Chem*, vol. 282, no 19, p. 14389-14393.
- Wang, C. Y., S. Jenkitkasemwong, S. Duarte, B. K. Sparkman, A. Shawki, B. Mackenzie et M. D. Knutson. 2012. «ZIP8 Is an Iron and Zinc Transporter Whose Cell-surface Expression Is Up-regulated by Cellular Iron Loading». *J Biol Chem*, vol. 287, no 41, p. 34032-34043.
- Wang, F., B. E. Kim, J. Dufner-Beattie, M. J. Petris, G. Andrews et D. J. Eide. 2004. «Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter». *Hum Mol Genet*, vol. 13, no 5, p. 563-571.
- Wang, K., B. Zhou, Y. M. Kuo, J. Zemansky et J. Gitschier. 2002. «A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica». *Am J Hum Genet*, vol. 71, no 1, p. 66-73.
- Weaver, B. P., J. Dufner-Beattie, T. Kambe et G. K. Andrews. 2007. «Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5)». *Biol Chem*, vol. 388, no 12, p. 1301-1312.

- Weaver, B. P., Y. Zhang, S. Hiscox, G. L. Guo, U. Apte, K. M. Taylor, C. T. Sheline, L. Wang et G. K. Andrews. 2010. «Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration». *PLoS One*, vol. 5, no 10.
- Wilson, A. K., E. A. Cerny, B. D. Smith, A. Wagh et M. H. Bhattacharyya. 1996. «Effects of cadmium on osteoclast formation and activity in vitro». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 140, no 2, p. 451-460.
- Wolfe, S. A., R. A. Grant et C. O. Pabo. 2003. «Structure of a designed dimeric zinc finger protein bound to DNA». *Biochemistry*, vol. 42, no 46, p. 13401-13409.
- Yamaguchi, M. 1995. « β -Alanyl-L-histidinato zinc and bone resorption». *General Pharmacology*, vol. 26, no 6, p. 1179-1183.
- Yamaguchi, M., et M. Fukagawa. 2005. «Role of zinc in regulation of protein tyrosine phosphatase activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells: zinc modulation of insulin-like growth factor-I's effect». *Calcif Tissue Int*, vol. 76, no 1, p. 32-38.
- Yamaji, S., J. Tennant, S. Tandy, M. Williams, S. K. Singh Srani et P. Sharp. 2001. «Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells». *FEBS Lett*, vol. 507, no 2, p. 137-141.
- Youyou, Nadir. . 2007. «Osteome osteoïde». *Faculté de médecine Annaba*.
- Yu, Y. Y., C. P. Kirschke et L. Huang. 2007. «Immunohistochemical analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the mouse gastrointestinal tract». *J Histochem Cytochem*, vol. 55, no 3, p. 223-234.
- Zeller, P 2011. «Cyanotoxines et barrière intestinale humaine: Étude comparée de l'absorption et de la toxicité de deux variants de microcystine sur le modèle cellulaire Caco-2». Spécialité biochimie - biologie moléculaire et cellulaire, Université de Bretagne, 256 p.
- Zemann, N., A. Zemann, P. Klein, I. Elmadfa et M. Huettinger. 2011. «Differentiation- and polarization-dependent zinc tolerance in Caco-2 cells». *Eur J Nutr*, vol. 50, no 5, p. 379-386.

Zodl, B., M. Sargazi, M. Zeiner, N. B. Roberts, I. Steffan, W. Marktl et C. Ekmekcioglu.
2004. «Toxicological effects of iron on intestinal cells». *Cell Biochem Funct*,
vol. 22, no 3, p. 143-147.