



AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Faculté de Pharmacie
27 boulevard Jean Moulin
13005 Marseille



Ecole doctorale Science de l'environnement

Spécialité : Environnement et Santé

Laboratoire d'accueil :

IMBE UMR 7263 AMU/CNRS/IRD 237

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Environnement et Santé

Présentée par :
Catherine BELLJARDO

**ETUDE COMPAREE DE LA CYTOGENOTOXICITE DU
CADMIUM, DU NICKEL ET DE L'ALUMINIUM SUR LE
FIBROBLASTE CUTANE HUMAIN**

Soutenue le 05 septembre 2018 devant le jury composé de :

Jean-Luc DECOUT	Professeur à l'UGA (Grenoble)	Rapporteur
Bénédicte PRELOT	Chargée de recherche au CNRS (Montpellier)	Rapporteur
Carole DI GIORGIO	Maître de Conférences à AMU (Marseille)	Invitée
David BERGE-LEFRANC	Maître de Conférences à AMU (Marseille)	Co-directeur de thèse
Philippe GALLICE	Professeur à AMU (Marseille)	Directeur de thèse

Résumé :

Les métaux sont des éléments chimiques ubiquitaires, naturellement présents dans notre environnement et utilisés dans de nombreux secteurs d'activité tels que, l'aérospatial, la cosmétologie ou l'industrie pharmaceutique. De nombreux travaux montrent qu'ils sont susceptibles d'être à l'origine de pathologies diverses et variées. Toutefois, la diversité et les modalités des études réalisées rendent difficiles la comparaison de leurs effets et mécanisme d'action. Dans ce contexte, ce travail concerne l'étude de la cyto-génotoxicité du cadmium, du nickel et de l'aluminium, sur un même modèle cellulaire, le fibroblaste cutané humain.

Leur cytotoxicité est évaluée d'une part, en étudiant leur effet sur la bioénergétique cellulaire par microcalorimétrie et d'autre part, leur effet sur la viabilité cellulaire est mesuré par des techniques colorimétriques conventionnelles.

Leur génotoxicité est déterminée par des techniques spécifiques que sont le test des comètes et des micronoyaux. De plus, une approche de leur interaction avec l'ADN est réalisée par microcalorimétrie.

Les résultats montrent que la cytotoxicité du cadmium est supérieure à celle du nickel, elle-même supérieure à celle de l'aluminium. Seuls le cadmium et le nickel sont génotoxiques à pH 7, principalement en induisant un effet aneugène. Leur interaction avec le matériel génétique est de type électrostatique anti-coopérative avec les groupements phosphate de l'ADN. Si l'aluminium, à pH 7, n'exerce pas d'effet génotoxique, son interaction avec l'ADN à pH acide, est comparable à celle du cadmium et du nickel. Ce résultat singulier lié à la valeur du pH, suggère l'importance de la prise en compte de la spéciation des métaux pour l'étude de leurs effets aussi bien in vitro, qu'in vivo.

Mots clés : métaux, cytogénotoxicité, aluminium, cadmium, nickel, bioénergétique

Abstract:

Metals are ubiquitous chemical elements naturally present in our environment and used in many fields, like aerospace, cosmetology or pharmaceutical industries. Many works show that metals are involved in diverse diseases. However, the way these studies are led, make the comparison of their effects and mechanism of action delicate. In this context, this work studies the cyto-genotoxicity of cadmium, nickel and aluminum on a single cellular model: normal human dermal fibroblasts.

Cytotoxicity is first evaluated by the cell bioenergetics study thanks to microcalorimetry techniques, and then the effect on cell viability is measured by conventional colorimetric techniques.

Genotoxicity is evaluated by specific techniques which are comet and micronuclei assays. Furthermore, thermodynamic properties of the interaction between metals and DNA are determined thanks to microcalorimetry measures.

Results show that cadmium cytotoxicity is higher than nickel's, itself higher than aluminum's. Cadmium and nickel are the only ones genotoxic, they mostly induce aneugenic effects. They present an electrostatic anti-cooperative interaction with DNA phosphate groups. If, at pH 7, aluminum does not induce genotoxicity, his interaction is comparable to cadmium and nickel at acidic pH. This unusual result, related to pH value, highlights the importance of the speciation determination when metal effects are studied, as well in vitro as in vivo.

Key words: metals, cytogenotoxicity, aluminum, cadmium, nickel, bioenergetics

Remerciements

Je tiens à remercier le **Dr Bénédicte Prélot** et le **Pr Jean-Luc Decout** pour m'avoir fait l'honneur de rapporter ce travail, pour leurs critiques et réflexions constructives ayant permis de parachever ce manuscrit.

Je remercie aussi le **Dr Carole Di Giorgio**, non seulement pour avoir accepté de faire partie de ce jury, mais également pour le partage de son expertise pratique et théorique, notamment en génotoxicité.

La culture cellulaire nécessaire à la réalisation de ce travail s'est déroulée au sein d'une autre équipe de recherche dont j'aimerais remercier les membres. Particulièrement le **Pr Diane Braguer**, qui m'a cordialement ouvert les portes de son service. Également les docteurs **Manon Carré**, **Marie-Anne Estève** et **Florian Corréard** ainsi que **Marie-Pierre Montero** qui d'une part, m'ont appris à réaliser ces cultures et, d'autre part, les ont entretenues lorsque mes fonctions hospitalières me retenaient.

J'ai eu la chance de mener à bien ce doctorat au laboratoire de physique-chimie de la faculté de pharmacie, au sein d'une équipe attentive et chaleureuse que je tiens tout particulièrement à remercier. **Florence**, **Jeannine** et **Mireille**, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Bien entendu ce travail n'aurait pas été possible sans mon directeur de thèse, le **Pr Philippe Gallice** et mon co-directeur, le **Dr David Bergé-Lefranc**. Je souhaite à tous les doctorants d'avoir la chance d'être encadrés par des enseignants aussi bienveillants et disponibles. Ils m'ont transmis leur savoir, m'ont soutenu, poussé à donner le meilleur de moi-même et ces années furent pour moi, bien plus que des études, l'opportunité d'un véritable épanouissement.

Enfin, un grand merci à mes proches, surtout à mes parents et mon conjoint, pour leur soutien indéfectible et qui par ma faute, ne regardent plus leurs marmites de la même façon...

LISTE DES ABREVIATIONS **5**

INTRODUCTION **6**

I- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET TOXICOLOGIE DES METAUX **9**

I.1 PROPRIETES **10**

I.1.1 CADMIUM 10

I.1.2 NICKEL 11

I.1.3 ALUMINIUM 12

I.2 TOXICOCINETIQUE **15**

I.2.1 ABSORPTION 15

I.2.1.1 Cadmium 15

I.2.1.2 Nickel 16

I.2.1.3 Aluminium 16

I.2.2 DISTRIBUTION ET ELIMINATION 18

I.2.2.1 Cadmium 18

I.2.2.2 Nickel 19

I.2.2.3 Aluminium 20

I.3 TOXICOLOGIE **22**

I.3.1 PHYSIOPATHOLOGIE 22

I.3.1.1 Cadmium 22

I.3.1.2 Nickel 24

I.3.1.3 Aluminium 27

I.3.2 TOXICITE CELLULAIRE 29

I.3.2.1 Cadmium 29

I.3.2.2 Nickel 31

I.3.2.3 Aluminium	32
II- CHOIX DU MODELE CELLULAIRE	35
II.1 MATERIEL	37
II.2 TRAITEMENT DES NHDF	37
III- METAUX ET BIOENERGETIQUE CELLULAIRE	40
III.1 RAPPELS DE BIOENERGETIQUE CELLULAIRE	41
III.1.1 GLYCOLYSE	41
III.1.2 CYCLE DE KREBS	42
III.1.3 RESPIRATION CELLULAIRE	43
III.2 MATERIEL ET METHODE	45
III.2.1 MICROCALORIMETRIE	45
III.2.1.1 Principe	45
III.2.1.2 Protocole de mesure	46
III.2.2 OXYMETRIE	48
III.2.2.1 Principe	48
III.2.2.2 Protocole de mesure	49
<i>a. Préparation de l'électrode de Clark</i>	49
<i>b. Calibration de l'électrode</i>	49
<i>c. La mesure</i>	50
III.3 RESULTATS ET DISCUSSION	52
III.3.1 MICROCALORIMETRIE	52
III.3.2 OXYMETRIE	53
III.3.3 ETUDE DU METABOLISME CELLULAIRE APRES 24H D'EXPOSITION	55

IV- METAUX ET CYTOTOXICITE **58**

IV.1 PRINCIPE DU TEST AU MTT ET AU CRISTAL VIOLET	59
IV.1.1 LE TEST AU MTT	59
IV.1.2 LE TEST AU CRISTAL VIOLET	60
IV.2 MATERIEL ET METHODE	61
IV.2.1 PROTOCOLE DU TEST AU MTT	61
IV.2.2 PROTOCOLE DU TEST AU CRISTAL VIOLET	62
IV.3 RESULTATS ET DISCUSSION	63

V- METAUX ET GENOTOXICITE **71**

V.1 MATERIEL ET METHODE	72
V.1.1 TEST DES COMETES	72
V.1.1.1 Principe	72
V.1.1.2 Protocole opératoire	73
<i>a. Détermination des concentrations maximales</i>	73
<i>b. Test des comètes</i>	74
V.1.2 MICRONOYAUX	76
V.1.2.1 Principe	76
V.1.2.2 Protocole opératoire	77
<i>a. Protocole des cellules CHO</i>	78
<i>b. Protocole des cellules NHDF</i>	79
<i>c. Dénombrement des micronoyaux</i>	79
V.2 RESULTATS ET DISCUSSION	80
V.2.1 TEST DES COMETES	80
V.2.2 TEST DES MICRONOYAUX	81

V.2.2.1 Cellules CHO	81
V.2.2.2 Cellules NHDF	83
<u>VI- MESURE DE L'INTERACTION METAL/ADN</u>	86
VI.1 PRINCIPE	87
VI.2 LA MESURE	88
VI.3 RESULTATS ET DISCUSSION	90
<u>VII- EFFETS DES ROS SUR LE METABOLISME DES NHDF</u>	95
VII.1 PRINCIPE	96
VII.2 PROTOCOLE	96
VII.3 RESULTATS ET DISCUSSION	97
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	100
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	103
<u>ANNEXES</u>	122

Liste des abréviations

BET : Bromure d'ETHidium

CBPI : Cytokinesis-Block Proliferation Index

CHO : Chinese Hamster Ovary cells

EFSA : European Food Safety Authority

DMSO : DiMéthyl SulfOxide

IARC : International Agency for Research on Cancer

LMP : Low Melting Point

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MES : acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique

MT : Métallo Thionines

NHDF : Normal Human Dermal Fibroblast

NMP : Normal Melting Point

OMS : Organisme Mondial de la Santé

ROS : Reactive Oxygen Species

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC : Poids Corporel

PNSE : Plan National Santé-Environnement

PRSE : Plan Régional Santé-Environnement

PTFE : Poly Tetra Fluoro Ethylene

RPM : Revolution Per Minute

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TRIS : Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane

Introduction

En son temps, Hippocrate disait déjà que « *pour approfondir la médecine, il faut considérer d'abord les saisons, connaître la qualité des eaux, des vents, étudier les divers états du sol et le genre de vie des habitants* ». Le lien entre l'environnement d'un individu et sa santé n'est *a priori* pas nouveau. Pourtant, paradoxalement, depuis l'antiquité la qualité de l'environnement humain s'est détériorée avec l'amélioration de sa qualité de vie. Cette dégradation environnementale s'est traduite principalement par un manque d'hygiène ayant pour conséquence la survenue d'épidémies. L'insalubrité des villes a pu conduire par exemple, aux grandes épidémies de pestes dont le bacille *Yersinia pestis* est transmis à l'homme par la puce du rat. De même, d'un point de vue individuel, le manque d'hygiène corporel a pu être responsable d'épidémies de typhus (jusqu'à 60% de mortalité sans traitement) transmis par les poux de corps contaminés par le bacille *Rickettsia prowazekii*.

De nos jours, dans les pays industrialisés, le rôle de l'environnement sur la santé impacte un domaine plus étendu et revêt un caractère plus insidieux. En effet, si les germes pathogènes sont toujours concernés, le rôle de composés chimiques utilisés et éliminés de façon inappropriés, sont de plus en plus à prendre en considération. C'est pourquoi, les autorités ont pris conscience du besoin d'encadrer certaines activités polluantes afin d'en limiter leurs impacts, tant au niveau national qu'international, à la fin du XX^{ème} siècle. Pour la première fois, en 1989, les ministères de la santé et de l'environnement de tous les pays membre de l'union européenne se sont rencontrés à Frankfurt-am-Main. Il est notamment ressorti de ce sommet, la création d'un centre européen de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dédié à la santé environnementale, ainsi que la signature par tous les pays membre d'une charte européenne de la santé et l'environnement.

En France, il faut attendre 2004 pour voir la création du premier plan national santé-environnement (PNSE) où une liste d'actions générales est publiée dans le but d'« *atteindre une qualité de l'environnement qui ne met pas en péril ni influence négativement la santé des personnes* » (1). Charge à chaque région d'élaborer son propre plan régional santé-environnement (PRSE) en prenant en compte les actions dictées par le PNSE tout en les adaptant à ses contraintes territoriales.

Le PNSE 3 est actuellement en cours depuis 2015, il regroupe plus d'une centaine d'actions couvrant un large spectre de polluants telles que l'exposition au radon, aux moisissures ou encore aux perturbateurs endocriniens. Parmi elles, cinq actions sont particulièrement dédiées à la prévention des risques liés aux métaux lourds. Ces derniers

sont effectivement connus pour leurs effets délétères sur la santé dont certains sont notamment à l'origine de cancers.

Dans ce contexte, ce travail qui s'inscrit dans le PNSE, s'intéresse à trois métaux : le cadmium, le nickel et l'aluminium. Le cadmium, dont la toxicité est largement documentée, a été inclus dans cette étude en tant que métal de référence. Les deux autres sont très présents dans l'environnement quotidien et si, nombre de leurs effets sur la santé sont connus, beaucoup restent encore à établir. En effet, le nickel est très présent dans des objets communs tels que les fermetures éclair, les bijoux ou les amalgames dentaires... Il est notamment responsable de dermatite de contact dans la population générale et est classé comme agent cancérigène en cas d'exposition au long cours. Quant à l'aluminium, il est suspecté de prendre part dans la genèse de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou le cancer du sein, mais les études le concernant restent controversées. Celui-ci est aussi très présent, aussi bien dans les ustensiles de cuisine que dans certains médicaments ou produits cosmétiques ; son devenir dans les organismes est pourtant méconnu.

Toutes ces raisons nous ont donc incitées à entreprendre ce travail dont l'objectif est de mener une étude comparée de l'effet de ces trois métaux sur des cellules vivantes.

Aussi, pour ces trois métaux, sont tout d'abord rappelées leurs propriétés physico-chimiques ainsi qu'une revue de leur toxicité. Puis le modèle cellulaire de l'étude est présenté.

Ensuite, l'étude de leur effet sur la bioénergétique et la cytotoxicité est développée.

Enfin, un focus particulier sur leur génotoxicité a été réalisé et fait l'objet de la dernière partie de ce travail.

I- Propriétés physico- chimiques et toxicologie des métaux

I.1 Propriétés

Ce travail s'intéresse à trois métaux. Cette seule caractéristique partagée ne saurait faire d'eux des éléments au comportement identique. Ils offrent au contraire une palette d'utilisation diverse et des sources d'exposition variées. Sans être exhaustive, cette première partie propose un bilan physico-chimique de chacun d'entre eux, de leur utilisation ainsi que des sources et des seuils maximum d'exposition pour l'homme.

I.1.1 Cadmium

Si la toxicité du Cadmium est connue depuis les années 50 (2) (3), l'exposition à ce métal n'est pas encore totalement maîtrisée puisque l'on retrouve régulièrement dans la presse des cas d'intoxication. Par exemple, en 2013 des travailleurs d'une usine confectionnant des batteries dans la ville Narsac, en Charente, se sont retrouvés exposés à des taux de cadmium très supérieurs aux normes légales (4). En 2016 encore, des taux sanguins de cadmium supérieurs à la normale sont retrouvés chez des riverains des anciennes mines d'Alès (5). Ces expositions chroniques suscitent l'inquiétude car elles peuvent aboutir au développement de certaines pathologies à plus ou moins long terme (voir détails en I.3).

Considéré comme un métal lourd avec une masse atomique de $A = 112$ et une masse volumique de $8,69 \text{ g.cm}^{-3}$ (25°C), le cadmium est dénué d'intérêt biologique et ne présente qu'un effet toxique tant pour l'homme que pour l'environnement (6).

A l'état naturel, il se trouve dans la croûte terrestre, mélangé au zinc dont il est extrait en tant que sous-produit. Il est également présent dans des minerais de plomb et de cuivre, ainsi que dans des phosphates naturels. Il est le plus fréquemment rencontré sous un degré d'oxydation +II (Cd^{2+}) notamment lorsqu'il est dissous dans l'eau. Ce cation s'associe facilement avec des anions pour former des sels de propriétés physiques et chimiques différentes (bromure de cadmium, fluorure de cadmium, iodure de cadmium...). A l'état solide, bien que très peu volatil, il est présent dans l'atmosphère sous forme de poussière de faible granulométrie ou de fumée d'oxyde de cadmium.

Son utilisation dans l'industrie est variée (7), depuis la confection d'accumulateurs (batterie Ni-Cd), jusque dans les pigments de plastique ou de céramique en passant par les réacteurs nucléaires pour ses propriétés d'absorbant neutronique.

L'exposition humaine au cadmium est majoritairement alimentaire puisqu'il se concentre dans les végétaux à feuillages verts tels que les épinards, les salades ou les choux, mais aussi les céréales et les tubercules, notamment les pommes de terre (8) (9) (10). Une intoxication chronique chez les fumeurs est à noter puisqu'une cigarette apporte en moyenne 2 µg de cadmium (11). L'European Food Safety Authority (EFSA) recommande une dose d'exposition hebdomadaire maximale de 2.5 µg/kg de poids corporel (12).

La contamination par l'eau de boisson reste rare en France. En effet, les teneurs en cadmium sont contrôlées lors du traitement de l'eau et doivent être inférieures à 5 µg/L (13). Cependant, la problématique de la pollution de l'eau par le cadmium est bien réelle. On retrouve par exemple, une source émettrice située dans l'Aveyron qui est capable d'impacter 500 km de rivière et de fleuve jusqu'à l'embouchure de la Garonne et les zones ostréicoles de Marennes-Oléron (14) (15).

I.1.2 Nickel

Le nickel est un métal de transition, de masse atomique $A = 58$ et de masse volumique $8,902 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (25 °C), lui permettant d'entrer dans la catégorie des métaux lourds. Si la biologie humaine n'implique pas le nickel dans son fonctionnement et qu'il est généralement toxique chez les mammifères, c'est un élément trace essentiel chez les champignons et les micro-organismes.

En milieu aqueux (pH 5-9) il se retrouve dissous à un degré d'oxydation +II sous la forme d'un complexe hexavalent $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ou minoritairement complexé avec d'autres ligands en fonction du sel mis en solution : HCO_3^- , Cl^- , OH^- , NH_3 , SO_4^{2-} , PO_4^{1-} etc.

Le nickel représente 80 à 90 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de la croûte terrestre et est extrait de deux types de minerais : les latérites¹ et les sulfures.

Son faible coût, de l'ordre de 10 \$/kg associé à des propriétés de résistance à la corrosion en font un métal très utilisé dans de nombreux domaines. Il entre par exemple dans la composition de turboréacteurs sous la forme de superalliage, dans la composition d'accumulateurs nickel-cadmium, dans nos pièces de 1 et 2 € sous forme de laiton de

¹ La **latérite** (du latin *later*, brique) est une roche rouge ou brune, qui se forme par altération des roches sous les climats tropicaux. Elle est riche en hydroxyde de fer et/ou en hydroxyde d'aluminium et recouvre 33% des continents.

nickel et de cupronickel. Les bijoux fantaisie, les fermetures éclair, les boutons de pantalon et autres ustensiles de cuisines en contiennent également. Il est largement employé en bijouterie où, seul ou associé à d'autres métaux, il permet de nuancer la couleur de l'or donnant ainsi naissance à de « l'or rose » ou de « l'or blanc ».

Chez l'homme, l'exposition au nickel est principalement alimentaire. Le chocolat, les fruits secs ainsi que les céréales en sont les sources principales. Au-delà du type de culture, un sol riche en nickel donnera des récoltes plus riches et donc une contamination plus importante. Bien que cette source d'exposition reste difficile à quantifier, les ustensiles de cuisines ainsi que la plomberie (tuyaux, raccords, robinets) contenant du nickel, contribuent également à augmenter l'apport journalier (16). Ainsi, le taux d'exposition journalier moyen par adulte est de 94 µg, et varie de 74 à 231 µg (17). Ces données incluent l'apport en eau, les normes françaises imposent un maximum de 20 µg/L de nickel.

En outre, le nickel est relargué dans l'atmosphère par deux sources : naturelle et anthropogénique. 30000 tonnes de nickel sont émises chaque année de façon naturelles (volcans, poussières portées par le vent...) et 1,4 à 1,8 fois plus sont émis par l'activité humaine sous forme d'aérosol (18). La combustion d'énergie fossile représente à elle seule 62% de ces émissions (19). Pour ces raisons, l'inhalation quotidienne de nickel en milieu urbain est comprise entre 0,2 et 1 µg et moindre en milieu rural : 0,1 à 0,4 µg/j (20). Le tabac contribue également à une intoxication par inhalation puisque la fumée d'une cigarette apporte en moyenne, de 0,04 à 0,58 µg de nickel (21).

I.1.3 Aluminium

L'aluminium est le métal le plus abondant de la croûte terrestre (8,3%) avec une masse atomique de $A = 27$ et une masse volumique de $2,70 \text{ g.cm}^{-3}$ (25°C).

L'aluminium se retrouve rarement à l'état isolé dans son état naturel. Son minéral principal est la bauxite dans laquelle il se trouve sous forme d'alumine hydraté mélangé à de l'oxyde de fer.

L'aluminium ne se solubilise sous forme d' Al^{3+} en milieu aqueux qu'à pH acide. Sa limite de solubilité à pH 7 est de l'ordre de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A pH 7 il s'hydroxyle avec l'eau et forme de nombreux complexes tels que : $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ et $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ (Figure 1). En milieu organique plus complexe, de par sa nature trivalente il possède des propriétés électro-attractrices qui font qu'il se lie facilement à des électro-donneurs tels que l'oxygène, les citrates, les phosphates, l'acide lactique ou les catécholamines.

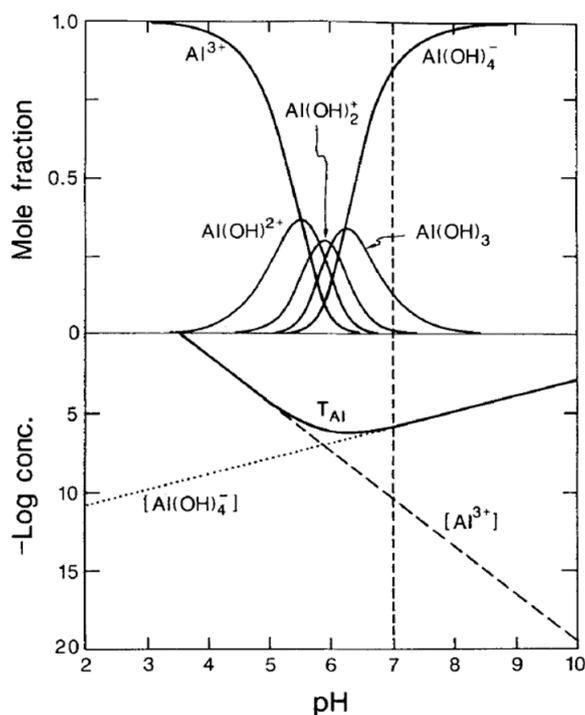


Figure 1 : Diagramme de prédominance des complexes monomoléculaires de l'aluminium en milieu aqueux, à pH 7 (208)

Il est utilisé dans des secteurs variés tels que la construction (fenêtres, portes), les transports (voitures, avions), les emballages (canettes, boîtes de conserves), l'électricité (câbles), la pharmacie (adjuvant dans les vaccins, antiacides), les ustensiles de cuisines (couverts, casseroles), la cosmétique (anti transpirants, colorant), l'alimentation (colorant alimentaire E173) ...

L'exposition journalière majoritaire est alimentaire, l'EFSA l'estime entre 0,2 et 1,5 mg.kg^{-1} de poids corporel (pc) par semaine pour un adulte de 60 kg en Europe et de 0,4 mg.kg^{-1} pc par semaine en France (22). La dose hebdomadaire tolérable est fixée par l'EFSA à 1 mg.kg^{-1} pc. Il est cependant difficile de quantifier l'exposition journalière réelle puisque certaines stations de traitement de l'eau utilisent des sels d'aluminium qui lient les particules en suspension afin de former des flocons qui s'agglomèrent et se

déposent sous l'effet de la gravité. S'y associent l'aluminium potentiellement libéré par les ustensiles de cuisines et les médicaments (ex : antiacides, vaccins).

Si ses propriétés physico-chimiques en font un élément devenu indispensable dans de nombreux domaines, son innocuité est encore débattue et de nombreuses questions restent en suspens. A-t-il un rôle dans les pathologies neuro dégénératives ? Dans certains types de cancers ? Qu'elle est son implication dans la myofasciite à macrophage post-vaccinale ?

En résumé, les principales propriétés physico-chimiques de ces trois métaux sont rassemblées dans le tableau 1 ci-dessous où l'on remarque qu'à dose massique équivalente, le cadmium est plus toxique que le nickel, lui-même plus toxique que l'aluminium.

Tableau 1: Comparaison des principales propriétés physico-chimiques des métaux étudiés

	Cadmium	Nickel	Aluminium
Masse atomique	112	58	27
Masse volumique à 25°C (g.cm⁻³)	8,69	8,902	2,70
Degré d'oxydation en solution aqueuse	+II	+II	+III
Exposition principale	Alimentaire	Alimentaire	Alimentaire
Biologiquement utile à l'homme	Non	Non	Inconnu
Dose maximale d'exposition hebdomadaire	2.5 µg/kg pc ^a	19.6 µg/kg pc ^b	1 mg/kg pc ^c
Valeurs de référence dans le sang (sérum)	0,4-1 µg/L ^a	0,05-1,08 µg/L ^b	< 10 µg/L ^c

^a (13)^b (23)^c (24)

I.2 Toxicocinétique

Les corps étrangers mis au contact d'un organisme vivant peuvent être soit absorbés par cet organisme, soit non absorbés et être directement éliminés. Comme nous l'avons vu précédemment, chacun des métaux étudiés est susceptible d'être mis au contact de l'homme de différentes façons : par voie orale, cutanée, pulmonaire... Dans tous les cas, toute ou partie de la dose apportée va être absorbée puis transportée dans le sang, distribuée à travers l'organisme, stockée et enfin éliminée. Toutefois le cadmium, le nickel et l'aluminium sont des métaux, présentant des propriétés physico-chimiques différentes qui vont influencer leur devenir dans l'organisme à chacune de ces étapes. Ce chapitre traite donc des spécificités de chacun d'entre eux.

I.2.1 Absorption

I.2.1.1 Cadmium

L'apport principal en cadmium à l'organisme est la nourriture, de l'ordre de 8 à 25 $\mu\text{g/j}$ (25) (26) et sa biodisponibilité² est faible, entre 3 et 5% (27) (28). Elle est fortement influencée par le bol alimentaire, notamment s'il est riche en graisse ou en protéines (27). Une autre influence majeure est la sidérémie de la personne, une carence en fer entraînant une augmentation de l'absorption du cadmium. La transferrine, protéine responsable du transport du fer dans l'organisme, n'étant pas saturée en fer lors d'une anémie par exemple, le cadmium peut se fixer sur les sites inoccupés par le fer. Ainsi chez les femmes, plus souvent carencées, l'absorption peut augmenter jusqu'à 10% et une concentration supérieure dans le sang et les urines est alors fréquemment retrouvée (29) (30) (31) (32) (33).

Bien que les sels de cadmium soient très peu volatils, l'absorption par les voies respiratoires est fréquente notamment dans certaines atmosphères de travail où ils peuvent se retrouver sous la forme de fines particules. En fonction de leur diamètre, ces dernières vont se déposer en haut de l'arbre bronchique pour les plus grosses ($> 10 \mu\text{m}$) et jusque dans les voies aériennes fines et les alvéoles pulmonaires pour les plus petites ($< 0,1 \mu\text{m}$).

² La *biodisponibilité* est l'aptitude d'un élément à être absorbé et assimilé par les organismes vivants.

Environ 5% des particules les plus grosses restent fixées au niveau de l'arbre bronchique supérieur et sont potentiellement avalées. En revanche, près de 50% des particules fines restent dans la partie inférieure et la totalité d'entre elles peuvent être absorbées dans le sang (34) (35). Du fait de l'existence d'une absorption par voie respiratoire, les fumeurs sont plus exposés au cadmium et les concentrations urinaires et sanguines en cadmium sont plus élevées que chez les non-fumeurs, même après plusieurs années d'arrêt (36) (37).

L'absorption par voie cutanée est anecdotique, de l'ordre de 0,2 à 0,8% (34).

1.2.1.2 Nickel

La principale voie d'apport en nickel est également la voie orale à travers l'alimentation. Sa biodisponibilité est fortement influencée par les conditions d'administration. Ainsi, du nickel dissout dans un verre d'eau bu à jeun présente une biodisponibilité d'environ 27%, contre 1 à 2% lors de l'administration au cours d'un repas solide (38) (39). Le bol alimentaire influence son absorption car le nickel se lie facilement à des acides aminés ou des vitamines, ce qui peut limiter son absorption. Le pic plasmatique est atteint 1h30 à 3h après l'ingestion (40).

L'inhalation représente une voie minoritaire d'apport dans la population générale mais existe chez les travailleurs au contact de vapeurs de nickel. Leur exposition est différente selon le type de nickel : nickel métal, oxydes de nickel, sels de nickel. Au plus le composé de nickel est soluble au plus il sera absorbé et sera susceptible d'exercer un effet toxique (41).

L'absorption par voie cutanée est possible bien que mineure, elle dépend de la nature du composé de nickel (le nickel carbonyle et les sels solubles comme les chlorures et les sulfates étant les mieux absorbés), et augmente avec la sudation, les solvants, les détergents et les huiles qui favorisent la solubilisation du nickel contenu dans certains alliages (42).

1.2.1.3 Aluminium

L'aluminium est absorbé par différentes voies : orale, pulmonaire, intra-nasale, transdermique ou parentérale (cas particulier de personnes hospitalisées).

La biodisponibilité par voie orale varie de 0,1 à 0,3% en fonction du bol alimentaire. En effet, un milieu acide (jus d'orange) ou la présence de petits acides organiques (citrates, lactates) augmentent l'absorption de l'aluminium. En revanche, la présence de café, vin ou céréales la diminue (43) (44) (45). L'absorption a lieu au niveau de l'intestin grêle, par passage paracellulaire (entre deux cellules adjacentes) ou transcellulaire (phagocytose, transporteurs ioniques, diffusion passive). Le passage dans le sang est assez lent.

L'inhalation peut avoir lieu dans certains milieux professionnels où des ouvriers peuvent être exposés à des fumées d'aluminium (majoritairement sous forme d'oxydes). Dans ce cas, l'absorption pulmonaire est rapide et de l'ordre de 1,5 à 2% (46). L'INERIS (institut national de l'environnement industriel et des risques) a fixé un seuil maximal d'exposition en milieu de travail de 5 mg.m^{-3} (24).

Au moment de l'inhalation les fumées d'aluminium sont susceptibles d'emprunter la voie intra-nasale qui correspond à la migration du toxique le long des neurones olfactifs jusqu'au cerveau. Cette voie reste toutefois minoritaire, on peut également parler de distribution trans-synaptique (47).

Concernant la voie cutanée, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM et ancienne AFSSAPS), a publié en 2011 un rapport évaluant le risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques. Les principales conclusions sont qu'un anti transpirant contenant 20% de chlorhydrate d'aluminium (soit 5% en aluminium) testé sur une peau saine et une peau lésée, est 36 fois plus absorbé par la peau lésée (0,5% *versus* 18%). L'ANSM recommande donc aux industriels de limiter la concentration d'aluminium dans ce type de produit à 0,6%, et aux consommateurs d'éviter leur utilisation sur peau lésée, c'est à dire après le rasage et l'épilation (48).

Concernant l'exposition par voie parentérale, aucune législation en Europe ne limite la concentration en aluminium dans les solutés injectables. Aux USA en revanche, un taux maximal est de $25 \text{ }\mu\text{g/L}$ dans les solutés de nutrition parentérale de plus de 100 mL, sur la base d'une exposition quotidienne inférieure à $5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ est fixé (49). Cependant, une étude française réalisée par les hospices civils de Lyon estime que près de la moitié des solutés de nutrition parentérale commercialisés dépassent cette recommandation, ils exposent les patients traités au long cours ainsi que les nouveaux nés, à une accumulation aluminique pouvant avoir des conséquences graves sur la santé (50).

1.2.2 Distribution et Elimination

1.2.2.1 *Cadmium*

Le cadmium, comme la plupart des métaux, ne circule pas librement dans le sang, il a besoin d'un transporteur qui le disséminera dans l'organisme. Le cadmium se lie principalement à trois protéines sanguines majeures : l'hémoglobine, l'albumine et les métallothionines. L'équipe de Rani et al. (34) a proposé un schéma de distribution du cadmium au sein de l'organisme. Après son absorption, le cadmium se lierait à l'albumine, une protéine majeure du flux sanguin, qui représente en effet à elle seule 60% des protéines circulantes. Il s'agit d'une protéine de transport à laquelle on retrouve liés d'autres éléments endogènes et exogènes tels que les hormones thyroïdiennes, les acides gras, certains médicaments ou ions (Ca^{2+}) (51). Le complexe cadmium albumine ainsi formé serait transporté à travers l'organisme jusqu'au foie où il serait détruit. Le cadmium ainsi libéré pourrait alors stimuler la transcription des gènes codant pour les métallothionines (MT), protéines riches en cystéine, un acide aminé présentant des groupements thiols pour lesquels les métaux ont une forte affinité. Leur synthèse a directement lieu sous l'effet de la concentration en métal, le cadmium agit sur le gène *MT1* responsable de leur synthèse ou via le stress oxydatif qu'il engendre. Le cadmium pourrait ainsi former un nouveau complexe avec une MT et être à nouveau transporté par la circulation sanguine (52) (53). Ce nouveau complexe arriverait ensuite jusqu'aux reins (54) où dans un premier temps, il serait filtré par le glomérule et dissocié. Le cadmium libre serait alors réabsorbé par les cellules du tubule proximal au niveau du cortex rénal où il s'accumulerait et serait en mesure d'exercer son effet toxique. La toxicité rénale à ce niveau n'est pas due au complexe MT-Cd mais à la forme ionique du cadmium Cd^{2+} (55).

Le cadmium s'accumule dans les organismes. Si une fois absorbé il est rapidement éliminé de la circulation sanguine (2 à 3 mois), il reste très longtemps (décennies) principalement stockés dans les reins (1/3 de la charge corporelle totale) et le foie (1/6 de la charge corporelle totale) (56) (57) (58). Il est retrouvé dans d'autres organes dont les os, le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et les glandes salivaires. L'accumulation du cadmium au niveau rénal fait que son élimination quotidienne dans les urines est très faible, de l'ordre de 0,005 à 0,01% de la charge corporelle totale (6). Celle-ci ne reflète

pas les concentrations réellement présentes dans le corps. En effet, le cadmium est excrété principalement dans les fèces lorsqu'il n'est pas absorbé, puis à minima dans les urines et les phanères.

Considérant la distribution particulière de ce métal, deux types de demi-vie sont utilisées pour quantifier l'élimination du cadmium. Dans un premier cas, une demi-vie sanguine est définie et se décompose en deux phases : une élimination rapide de l'ordre de 2 à 4 mois (58), suivi d'une phase lente due à l'accumulation du cadmium dans les organes et donc à un relargage lent de plus de 10 ans (31).

Dans un second cas, il est question d'une demi-vie biologique qui prend en compte les paramètres d'accumulation de ce métal et est de l'ordre de 10 à 30 ans (31) (35).

Dans tous les cas le cadmium est un métal ubiquitaire qui nécessite la présence de protéines de transport pour être disséminé dans l'organisme. Il s'accumule facilement dans les organes, notamment dans les reins pour lesquels il semble avoir un tropisme particulier. Cette faculté d'accumulation en fait un métal difficile à doser dans le sang et les urines, ces concentrations ne pouvant être représentatives d'une intoxication au long cours.

1.2.2.2 Nickel

Le nickel en tant que métal a également besoin d'être lié à des protéines de transports pour pouvoir être distribué dans l'organisme. Ainsi, dans le sang, il peut se retrouver complexé avec différentes protéines : l'albumine, l' α_2 -macroglobuline ou encore la L-histidine (59). Une fois complexé à l'albumine, un complexe ternaire peut se former avec la L-histidine. L'avantage de cette configuration est que la liaison nickel/albumine se rompt permettant au nickel de ne rester lié qu'à la L-histidine. Ce complexe, contrairement au précédent, est suffisamment petit pour permettre au nickel de franchir les membranes cellulaires et d'entrer dans les cellules (60).

Le nickel se distribue dans de nombreux organes avec une préférence pour les reins, les poumons et le foie. Il se retrouve également au niveau des glandes surrénales, de la glande thyroïde, du cœur, de la rate, du cerveau et du pancréas. Il passe également le placenta et se fixe dans les tissus fœtaux (39) (61).

L'excrétion du nickel a lieu majoritairement dans les urines durant les 9 premières heures suivant l'ingestion. Le nickel non absorbé est éliminé dans les fèces. Le nickel se retrouve également en faible quantité dans la sueur, la bile et le lait maternel.

Sa demi-vie d'élimination, bien plus courte que celle du cadmium, est estimée entre 28 et 60h. Cependant, cette demi-vie a priori courte n'exclue pas l'existence d'une accumulation du métal sous forme insoluble dans les tissus impliquant, *de facto*, des demi-vies bien plus longues qui ne sont pas quantifiées à l'heure actuelle (61) (39). L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) estime que l'élimination est bi-phasique avec une première phase de 1 à 2 jours environ, et une seconde phase de plusieurs mois (62).

1.2.2.3 Aluminium

Dans le sang, 90% de l'aluminium est transporté par la transferrine et 10% par de petites molécules telles que des nucléotides ou des acides. 50% de l'aluminium absorbé est stocké dans le squelette et 25% dans les poumons (63). Le quart restant se répartit principalement entre la rate, le foie, le cerveau, le cœur, les muscles et la thyroïde (45). De telle sorte que la concentration tissulaire est 100 à 300 fois supérieure à la concentration plasmatique (64).

Une fois complexé à la transferrine, l'aluminium entre dans les cellules par endocytose via les récepteurs spécifiques de la transferrine. C'est ainsi qu'il passe la barrière hémato-encéphalique et atteint le cerveau, une cible importante du fait de sa faible clairance³ (65) (66). Cette capacité de pénétration et de stockage dans le cerveau induit une longue demi-vie d'élimination pour cet organe, d'environ 7 ans (67).

Comme le cadmium et le nickel, l'aluminium s'accumule dans l'organisme au cours du temps. Avec l'âge la concentration dans le cerveau, le squelette et le plasma augmente. Sa demi-vie tri-phasique en est la parfaite illustration. La majeure partie de l'aluminium est éliminée dans les urines (90-95%) en 7h, une seconde phase de décroissance

³ La *clairance* est la capacité d'un tissu ou d'un organe à éliminer une substance. Elle reflète le fonctionnement de l'organe et correspond au rapport entre le débit d'élimination de cette substance et sa concentration dans le sang.

commence et dure quelques semaines (62). Enfin la dernière phase dure plusieurs mois à plusieurs années (68).

En résumé, l'étude des données de toxicocinétique montre que ces métaux ont en commun une absorption rapide et la nécessité d'un transporteur pour circuler dans le sang afin d'être distribués à travers l'organisme. De plus, leurs principaux transporteurs sont des protéines courantes, présentes en grande quantité dans le sang comme l'albumine ou la transferrine. Ils semblent tous les trois s'accumuler dans le corps au cours du temps et présenter un tropisme d'organe. Cette faculté de bioaccumulation rend leur élimination, principalement urinaire, multiphasique et lente. Leur dosage sérique n'est alors pas représentatif de l'exposition d'un individu soumis à une exposition chronique. Les principales observations toxicocinétiques de ces trois métaux sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Comparaison de la toxicocinétique des métaux étudiés

	Cadmium	Nickel	Aluminium
Biodisponibilité per os	3 – 5%	1 – 2%	0,1 – 0,3%
Protéines de transport	Albumine, Métallothionines	Albumine, L-histidine	Transferrine, petites molécules
Bioaccumulation	Reins, Foie, Os	Reins, Foie, Poumons	Os, Poumons
Elimination urinaire	Bi phasique : 1 ^{er} : 2 – 4mois 2 nd : 10 – 30 ans	Bi phasique : 1 ^{er} : 1 – 2 jours 2 nd : mois	Tri phasique : 1 ^{er} : 7h environ 2 nd : semaines 3 ^{ème} : années

I.3 Toxicologie

Si les mécanismes d'action à l'origine de leurs effets sur la physiologie humaine ne sont pas encore pleinement définis, les symptômes qu'ils engendrent ont été étudiés et répertoriés. Dans un premier temps, nous exposerons la physiopathologie connue de chacun de ces métaux. Puis, dans un second temps, nous entrerons un peu plus dans les détails de leur action en nous intéressant à leur impact au niveau cellulaire.

I.3.1 Physiopathologie

I.3.1.1 Cadmium

L'exposition au cadmium est généralement d'ordre chronique, cependant quelques intoxications aiguës peuvent avoir lieu, notamment dans des zones de travail. Dans ce cas, la plupart des intoxications surviennent à la suite d'une inhalation de vapeurs de cadmium pouvant conduire au décès en 3 jours. Cette exposition est responsable dans un premier temps d'une irritation pulmonaire se manifestant par une toux puis une dyspnée pouvant évoluer vers une cyanose puis un œdème aigu du poumon. L'exposition pendant 8 heures consécutives au cadmium dans une atmosphère confinée est considérée comme dangereuse au-delà de 1 mg.m^{-3} et létale à partir de 5 mg.m^{-3} . Ainsi, règlementairement, la valeur limite d'exposition (VLE) déterminée pour les employés susceptibles d'être en contact avec l'élément toxique pendant 8h est définie à $0,05 \text{ mg.m}^{-3}$. La population générale elle, doit être exposée à moins de 5 ng.m^{-3} de cadmium (69) (13).

Quelques cas de suicide par ingestion de cadmium ont été recensés. On retrouve notamment le cas d'un jeune homme de 23 ans qui ingéra 5 g d'iodure de cadmium dilué dans de l'eau. Il fut admis quelques heures plus tard à l'hôpital de Lodz (Pologne) avec des symptômes de gastro-entérite hémorragique ainsi que des signes biologiques de dysfonctionnement rénal et hépatique. S'en suivirent le lendemain, des troubles du rythme cardiaque, une hyperthermie (42°C) et des désordres respiratoires. Le décès survint au bout de 7 jours. L'autopsie révéla une nécrose multi organes, touchant notamment le foie, les reins et le tractus digestif (70). Une dose massive de cadmium est donc responsable d'une atteinte multi-organique conduisant au décès.

Lors d'une exposition chronique, quelle que soit la voie de contamination, la cible principale du cadmium est le rein. Une altération de la fonction rénale apparaît, puis une insuffisance rénale. Une étude menée par Järup en 2002 (71) sur 1700 sujets confirme des données préexistantes indiquant qu'une excrétion de cadmium supérieure à 2-3 µg de cadmium par gramme de créatinine est corrélée à un dysfonctionnement tubulaire dans 10% des cas (72) (73) (74). Si on s'intéresse de plus près à l'action du cadmium, il est à l'origine dans un premier temps d'une dégénérescence des cellules rénales puis d'une inflammation interstitielle aboutissant à une fibrose rénale responsable de l'insuffisance de l'organe.

Après de longues années d'exposition d'autres effets s'associent à la néphropathie, notamment une altération du squelette avec une déminéralisation. Une ostéomalacie (défaut de minéralisation primaire de la matrice osseuse) puis une ostéoporose se déclarent. En effet, la vitamine D ou calcitriol, indispensable à la minéralisation osseuse est synthétisée en partie au niveau rénal (figure 2). En cas de lésions des cellules rénales, la synthèse de vitamine D est freinée puis stoppée et une carence nécessitant une supplémentation en vitamine D synthétique s'installe. Sans traitement, une ostéoporose peut se développer. Certaines études évoquent une action directe du cadmium sur les ostéoclastes, qui stimulent la résorption osseuse, ainsi que sur les ostéoblastes responsables de la synthèse du tissu osseux, en induisant leur apoptose (75) (76) (77).

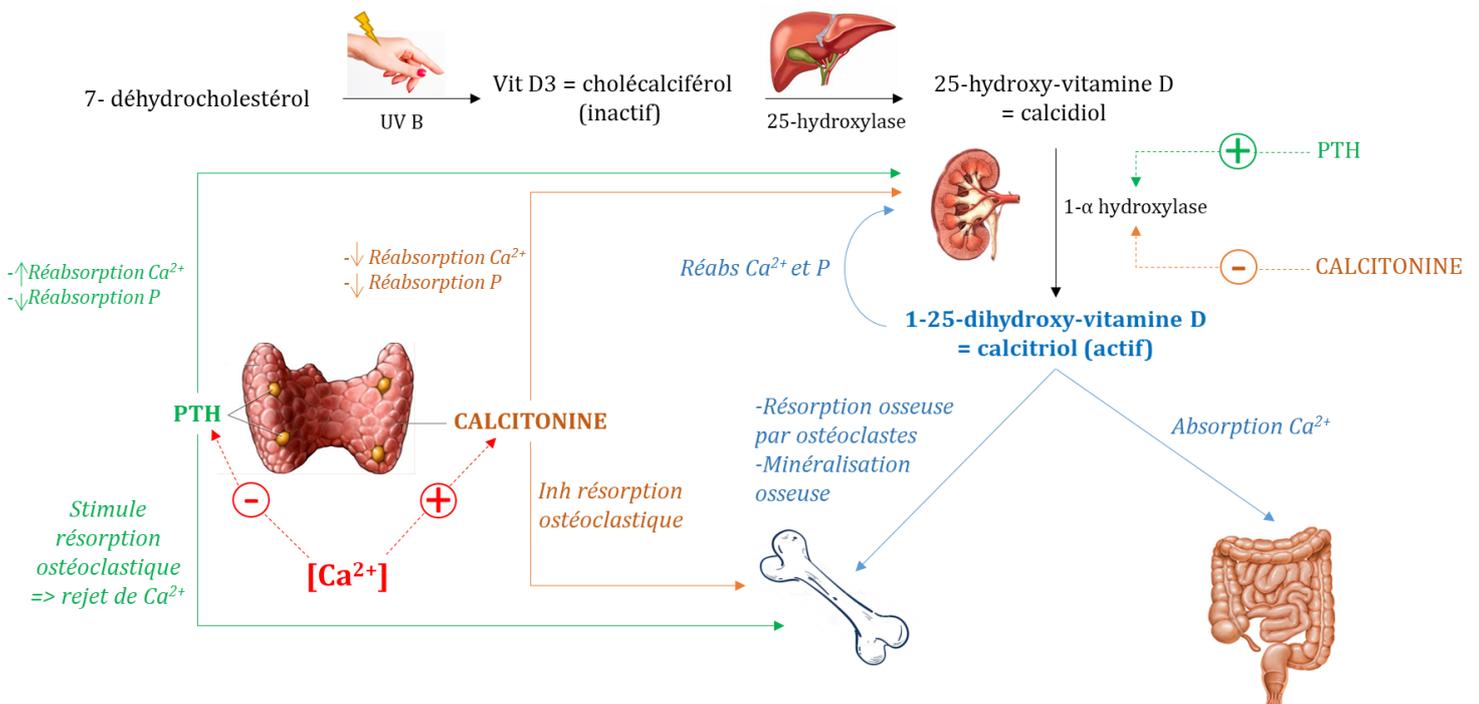


Figure 2: Schéma de la régulation phosphocalcique

En outre, lors d'une exposition chronique aux vapeurs de cadmium, des troubles pulmonaires pouvant être à l'origine d'un cancer du poumon sont observés. Dans un premier temps les signes cliniques sont plutôt discrets, à type de rhinite, de toux ou d'une altération de l'odorat puis ils s'amplifient, passant de la bronchite chronique à l'emphysème⁴. Dans les conditions d'exposition professionnelle au cadmium, l'altération de la fonction respiratoire peut ne survenir qu'après 20 ans d'exposition (74).

L'International Agency for Research on Cancer (IARC) a classé le cadmium et ses dérivés en tant que cancérigènes pour l'homme (groupe 1) sur la base de différentes études animales et humaines montrant l'effet carcinogène de ce métal sur les poumons (78) (79). La plupart des études conduites sur des êtres humains le sont sur des ouvriers exposés à des vapeurs de cadmium. Une corrélation entre l'exposition au cadmium et le développement d'un cancer du poumon a clairement été établie (80). Si de nombreuses études montrent l'existence d'un lien entre cadmium et cancer de la prostate, toutes ne mettent pas en lumière une corrélation statistiquement significative (81) (82). Il en est de même pour les cancers du rein ou de la vessie (83) (84).

Le cadmium est un métal particulièrement toxique dont les effets dus à une exposition chronique sont insidieux et extrêmement délétères pour les personnes exposées. Ceci implique la nécessité d'un contrôle strict des atmosphères de travail ainsi qu'un suivi médical régulier des personnes en contact.

1.3.1.2 Nickel

Si les intoxications chroniques sont plus fréquentes, quelques cas d'intoxications aiguës aux sels de nickel ont été recensés chez l'homme (85) (86) (87). Dans ces cas, les doses ingérées étaient toutes supérieures à 7 mg.kg⁻¹ pc et induisaient des effets bénins et réversibles tels que : des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, céphalées, vertiges, palpitations, plus ou moins associés à une augmentation transitoire de certains paramètres biologiques (bilirubine sérique, albumine urinaire, l'hématocrite...).

⁴ L'*emphysème* pulmonaire correspond à une destruction des parois alvéolaires, et par conséquent à une distension des alvéoles. L'air qu'elles contiennent ne peut donc plus être totalement expiré et une dyspnée s'installe.

Contrairement à une exposition aiguë, la chronicité n'est pas anodine. On retrouve, quelle que soit la voie d'exposition, une altération de la fonction rénale qui se traduit par une décroissance de la fonction glomérulaire et une hyperalbuminurie (88) (89) (90). D'autres études mettent en évidence une hépatotoxicité avec une modification du poids du foie, une hypertrophie cellulaire, une congestion vasculaire, une dégénérescence des hépatocytes révélée par une augmentation des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT) ... (91) (92).

Depuis 1990, le nickel et ses composés sont classés par l'IARC dans le groupe 1 « cancérogène pour l'homme » (93) (16). En effet, une exposition au long court par voie inhalée peut induire un cancer des poumons, des fosses nasales et des sinus de la face. Certains composés sont incriminés avec force de preuve, notamment les chlorures et sulfates de nickel, et plus généralement les composés solubles mais aussi les oxydes et les sulfides de nickel (94) (95) (96). Ainsi, les valeurs limite d'exposition professionnelles (VLEP) sont de : $0,005 \text{ mg.m}^{-3}$ pour les particules respirées, c'est-à-dire inférieures $10 \mu\text{m}$ de diamètre, et de $0,01 \text{ mg.m}^{-3}$ pour les particules inhalées inférieures à $100 \mu\text{m}$ de diamètre. En l'état des connaissances actuelles, la voie orale ne semble pas être une voie d'exposition ayant pour conséquence le développement d'un cancer.

Une autre voie d'exposition fréquente au nickel est la voie cutanée. Effectivement, ce métal entre dans la composition de différents alliages utilisés pour la confection de certaines pièces de vêtements ou de joaillerie. Cette omniprésence du nickel en fait l'allergène de contact le plus fréquent en Europe, la prévalence de la dermatite de contact qu'il induit variant de 10 à 15 % chez les femmes et de 2 à 5 % chez les hommes dans la population générale (97). La dermatite de contact induite par le nickel a été décrite la première fois dans les années 30 (98). Depuis, la sensibilisation au nickel n'a cessé de croître parallèlement à son utilisation comme illustré par la figure 3 issue de la North American Contact Dermatitis Group.

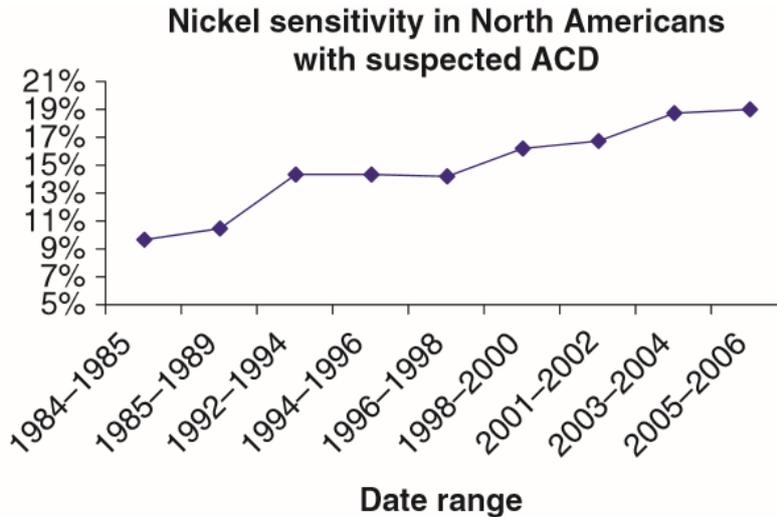


Figure 3 : Taux de patch test positifs pour une dermatite de contact allergique (ACD) effectués sur des patients de la North American Contact Dermatitis Group. Donnée de Schram et Warshaw (2007)

La dermatite de contact allergique est le type d'allergie au nickel le plus retrouvé. Elle fait suite à une hypersensibilité de type IV aussi nommée hypersensibilité retardée ou réaction cellulaire. Les manifestations cutanées n'apparaissent que 24 à 48h après contact. Les personnes très sensibilisées au nickel sont susceptibles de déclarer un eczéma de contact ou de voir leurs lésions s'étendre lorsqu'elles ingèrent du nickel.

Aussi, afin de limiter l'apparition de nouveaux cas de sensibilisation au nickel, l'Union Européenne interdit la commercialisation de : « *tous les assemblages de tiges qui sont introduites dans les oreilles percées et dans les autres parties percées du corps humain, à moins que le taux de libération de nickel de ces assemblages de tiges ne soit inférieur à 0,2 µg/cm²/sem (limite de migration) ; dans les articles destinés à entrer en contact direct et prolongé avec la peau, tels que :*

- boucles d'oreilles,
- colliers, bracelets et chaînes, bracelets de cheville et bagues,
- boîtiers, bracelets et fermoirs de montre,
- boutons à rivets, boucles, rivets, fermetures éclair et marques de métal, lorsqu'ils sont utilisés dans des vêtements, si le taux de libération du nickel qui se dégage des parties de

ces articles entrant en contact direct et prolongé avec la peau est supérieur à 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sem}$ » (99)



Figure 4: Exemple de lésions cutanées induites par une hypersensibilité au nickel (boucle de ceinture et montre) (205) (206)

Un autre aspect de l'effet du nickel a été étudié chez l'animal principalement, il s'agit d'études de reprotoxicité. Exposés à des sels de nickel solubles (chlorure ou sulfate) per os, les mâles présentent une diminution de la mobilité des spermatozoïdes, une diminution de leur synthèse ainsi que des anomalies morphologiques (100) (101). Une reprotoxicité à type de fœtotoxicité, embryotoxicité et un effet tératogène sont également rencontrés chez la femelle (102). De plus, une augmentation de l'incidence de la mortalité néonatale dans la première génération et des nouveau-nés de faible poids dans les générations suivantes sont également décrits. Chez l'homme, il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée démontrant un impact des sels de nickel sur la reproduction ou le développement embryonnaire (103) (104). Ils ne sont pas considérés comme reprotoxiques chez l'être humain (105).

1.3.1.3 Aluminium

L'exposition à l'aluminium concerne d'une part la population générale et d'autre part une population plus fragile, celle des insuffisants rénaux. C'est par ailleurs chez cette dernière que la toxicité de l'aluminium a pour la première fois été mise en évidence.

Dans les années 70 et 80, l'aluminium posait un problème aux cliniciens responsables des dialyses. En effet, à cette époque la concentration en sels d'aluminium dans l'eau de dialyse n'était pas contrôlée. Or, au cours du traitement, les sels d'aluminium du bain de dialyse passent dans le sang et contribuent à augmenter le taux d'aluminium sanguin. Son élimination étant majoritairement urinaire, le métal s'accumule au cours des séances de dialyse chez un insuffisant rénal et peut induire une « encéphalopathie du dialysé ». Ceci

se traduit par une altération de la parole, une confusion mentale, des myoclonies⁵ allant jusqu'à des convulsions, ainsi qu'une démence (106). Généralement cet état abouti au décès. Il est cependant à noter que des cas fatals d'encéphalopathie du dialysé sont apparus chez des patients insuffisants rénaux chroniques non dialysés (107).

De manière générale, une grande fraction de l'aluminium absorbé est stockée dans le squelette et perturbe le renouvellement tissulaire. L'aluminium a un effet antiprolifératif sur les ostéoblastes, cellules responsables du modelage osseux, ce qui peut entraîner à terme, chez les personnes fortement exposées (> 60 µg d'Al/L de sang) une ostéomalacie (108)(109).

En se fixant à la transferrine, protéine responsable du transport du fer dans le sang, l'aluminium entre en compétition avec le fer circulant et diminue le nombre d'ions transportés par cette dernière. La conséquence de cette carence factice en fer est une anémie microcytaire, qui se retrouve chez les patients dialysés mais aussi dans la population générale fortement exposée (110).

Au-delà des personnes dialysées, l'exposition à l'aluminium de la population générale peut conduire à une toxicité neurologique. Des cas d'expositions ponctuelles ou chroniques en attestent. L'exposition chronique d'ouvriers italiens à de la poussière d'aluminium a été reliée à un déficit intellectuel, une perte de contrôle musculaire, des tremblements ainsi qu'une dégénérescence spinocérébelleuse (111). Selon certains auteurs, l'injection de vaccins contenant de l'aluminium pourrait, chez certaines personnes, être à l'origine d'une myofasciite à macrophages qui, outre une fatigue et des douleurs musculo-articulaires, entraîne un déficit cognitif affectant la mémoire auditive et visuelle, les capacités de planification et d'attention (112). L'impact de l'aluminium sur la genèse de pathologies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson n'est pas établi et reste sujet à controverse (113) (114). Il est toutefois retrouvé à des concentrations supérieures aux témoins dans le cerveau de personnes présentant ces types de pathologies (115)(116).

Son implication directe dans le cancer du sein n'a pas été démontrée, cependant des dosages effectués chez des patientes ayant subi une mastectomie indiquent que les tissus présentant la plus forte concentration en aluminium se situent dans la région latérale du

⁵ Les *myoclonies* sont des contractions de faible amplitude, involontaires, incontrôlables et brutales d'un ou plusieurs muscles.

sein, proche de l'aisselle (117). Il a de plus été établi que l'absorption cutanée de l'aluminium par une peau lésée est de 18% (cf. p17, §I.2.1.3). Cependant l'aluminium n'est généralement pas classé comme agent cancérigène par l'IARC.

I.3.2 Toxicité cellulaire

I.3.2.1 Cadmium

L'effet du cadmium sur les cellules s'exerce à différents niveaux, il affecte notamment le cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ou encore induit l'apoptose (mort cellulaire). De plus, en tant que cation divalent le cadmium peut se substituer à d'autres cations physiologiquement indispensables tels que le cuivre, le fer, le calcium ou le zinc. Le cadmium peut ainsi utiliser les transporteurs de ces cations pour entrer dans les cellules ou se distribuer dans l'organisme (118).

En tant que cation divalent, le cadmium a une constante d'affinité proche de celle du zinc au niveau de protéines présentant des domaines à doigt de zinc. Ces dernières sont impliquées dans la régulation de l'expression des nombreux gènes en se fixant dans le grand sillon de l'ADN. Le remplacement d'un atome de zinc par un atome de cadmium modifie la structure de ces protéines et impacte indirectement la régulation de la transcription dont elles sont responsables (119).

De la même façon, une compétition peut avoir lieu entre le cadmium et le fer, ou le cuivre, au niveau de leur site de liaison sur diverses protéines cytoplasmiques ou membranaires. Ainsi, la concentration en fer et en cuivre libre augmente ce qui engendre, *via* la réaction de Fenton, un stress oxydatif (120) (figure 5). Donc si le cadmium n'est pas directement responsable de la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) car il n'est pas un agent oxydo-réducteur, il n'en demeure pas moins un responsable indirect. La conséquence de l'augmentation des concentrations en ROS dans la cellule est la saturation des protéines responsables des défenses anti-oxydantes telles que la catalase, la super oxyde dismutase (SOD) ou le glutathion (GSH). Ceci conduit la cellule à un état de stress oxydatif dont l'extrême finalité peut être l'apoptose (53) (79) (121). Ce processus oxydatif serait à l'origine de la toxicité induite par les métaux lourds d'une manière générale (122).

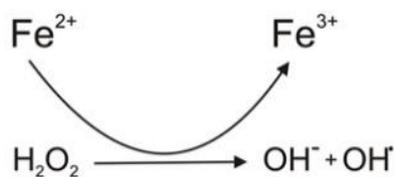


Figure 5: Réaction de Fenton.

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec les électrons apportés par le fer pour former l'ion hydroxyde et le radical libre hydroxyle (OH[•])

Il est à noter que la plupart des états de stress induisent la synthèse de HSP (heat shock protein). Il s'agit de protéines dites « chaperonnes » parce qu'elles sont responsables du maintien fonctionnel d'autres protéines. Lorsqu'elles sont retrouvées en grande quantité cela est synonyme d'adaptation cellulaire et de survie, ce phénomène est retrouvé en cas d'intoxication au cadmium (123). Quand la survie devient critique, ce sont elles qui sont responsables du déclenchement de l'apoptose (124).

Au niveau du noyau, le cadmium serait indirectement responsable de coupures simple brin de l'ADN et d'échanges de chromatides (125) (126) (123). Le mécanisme d'action de ces effets n'est pas connu précisément. Cependant, de nombreux auteurs avancent l'hypothèse de l'implication des ROS (122) en tant qu'acteurs de la coupure. Une autre hypothèse avancée est la perturbation engendrée par le cadmium sur les protéines à domaines en doigts de zinc impliquées dans la réparation de l'ADN (127). Une action directe du cadmium qui casserait le squelette phosphodiester de l'ADN est généralement exclue (128).

L'addition de ces effets induit une instabilité génomique pouvant conduire à l'expression de proto-oncogènes transmissibles à la génération suivante par les cellules échappant à l'apoptose. D'autant plus que, comme l'illustre la figure 6, peu de voies conduisent à la mort cellulaire, les effets délétères causés par le cadmium semblent, dans la majorité des cas, être transmis à la génération suivante.

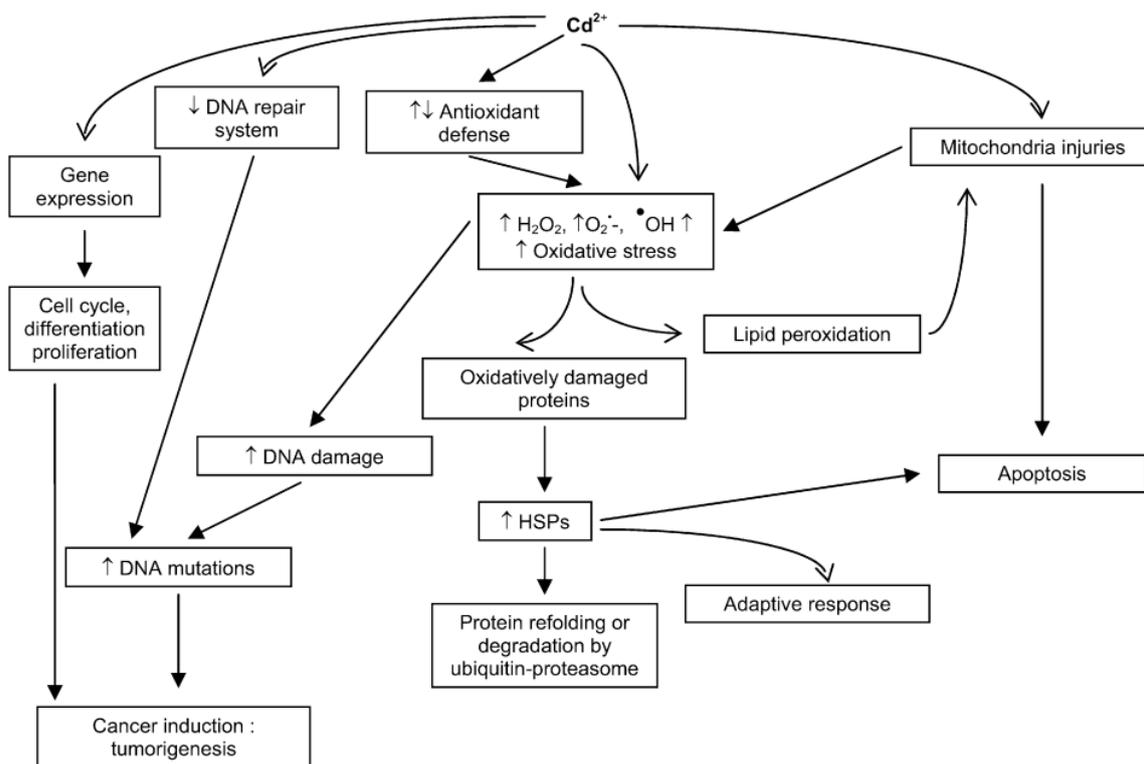


Figure 6: Schéma général des conséquences biologiques d'une intoxication cellulaire au cadmium. Proposé par Bertin, G et Averbek, D (123)

1.3.2.2 Nickel

L'entrée dans les cellules se fait par phagocytose lorsque les composés sont insolubles, ou par transport ionique (transport métallique 1 et canaux calciques) et par diffusion membranaire en présence de composés solubles (129) (130). Le chlorure de nickel, soluble, va diffuser jusqu'au noyau (130).

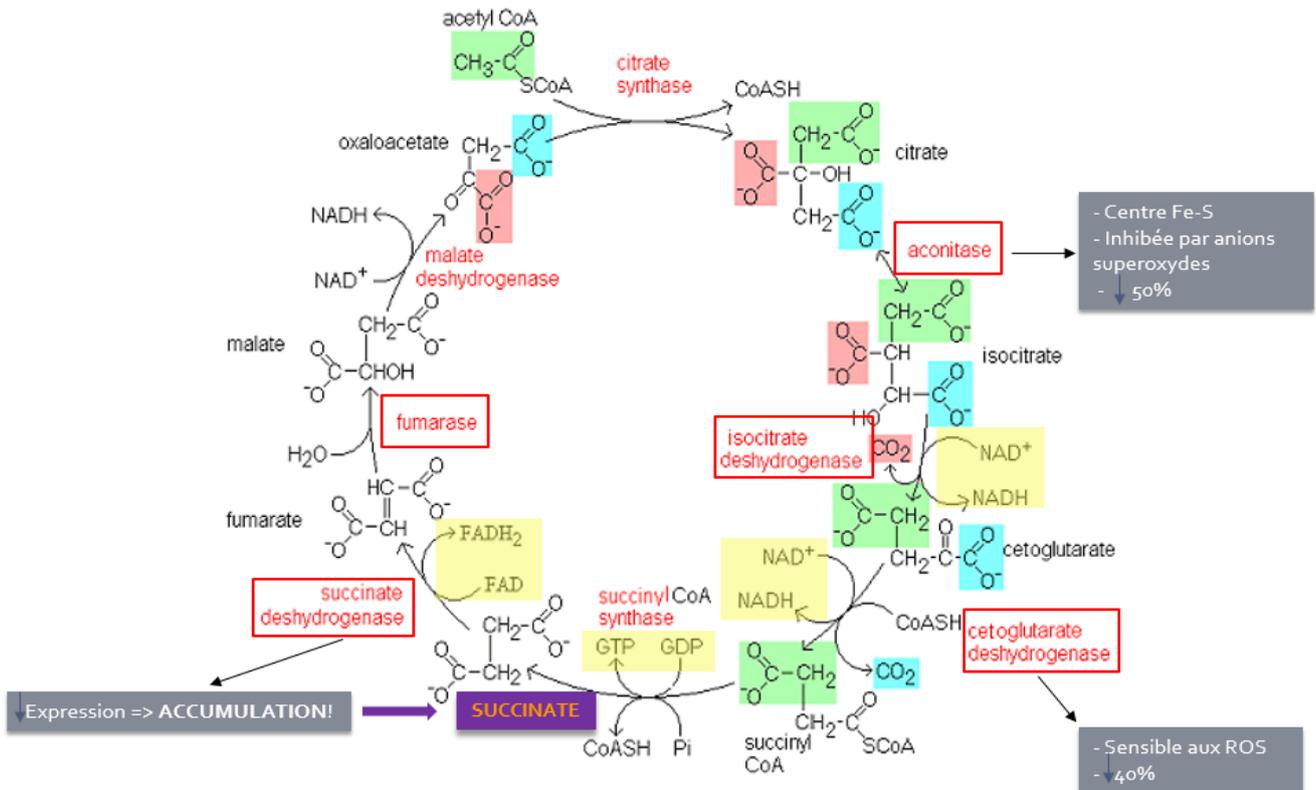
Bien que le nickel et ses composés ne soient pas mutagènes chez les bactéries et très peu sur les cellules animales selon les tests standards, ils sont indirectement responsables de dommages sur l'ADN. Tout comme le cadmium, ils semblent agir par l'intermédiaire de ROS donnant lieu à des cassures du génome, des aberrations chromosomiques, des échanges de chromatides sœurs et inhibent les processus de réparation de l'ADN (131) (16). Leurs actions dépassent l'atteinte génétique pour impacter l'épigénétique⁶, donc la modulation de l'expression génique, en induisant l'hyper méthylation de portion d'ADN (132).

⁶ L'*épigénétique* ne s'intéresse pas à la façon dont les gènes sont construits physiquement, mais à la façon dont ils sont exprimés. Elle se traduit par l'action d'enzymes qui vont, par exemple méthyler l'ADN ou des protéines de structures comme les histones. Ces gènes vont alors être plus ou moins accessibles aux complexes protéiques responsables de leur traduction, ce qui entraîne une modulation de leur expression.

I.3.2.3 Aluminium

Comme le cadmium, l'aluminium est responsable de l'augmentation de la concentration en fer circulant (compétition au niveau de la liaison sur la transferrine) à l'origine de la synthèse de ROS via la réaction de Fenton (figure 5, §I.3.2.1). En plus des ROS conventionnels, s'ajoute l'effet d'un complexe métal-superoxyde super oxydant AlO_2^{2+} ayant des propriétés oxydantes très importantes (133) (134). Le stress oxydatif induit par ces ROS/complexe-métal-superoxyde super oxydant est mis en évidence, in vitro, par la présence de malonaldéhyde et de lipides hydro peroxydes dans le milieu cellulaire. In vivo, il est mis en évidence par l'effet antioxydant de la vitamine E qui diminue les dommages oxydatifs chez des animaux exposés à de l'aluminium (135) (136). L'aluminium est également responsable de la diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes naturelles : la super oxyde dismutase (SOD) et la catalase (137).

L'aluminium mais surtout les ROS synthétisés, vont diminuer l'activité des enzymes du cycle de Krebs⁷ et ainsi altérer la respiration cellulaire (figure 7) (138).



⁷Le *cycle de Krebs* est un cycle biologique qui se déroule dans toutes les cellules de l'organisme ainsi que chez les bactéries, au niveau des mitochondries. Il a pour objectif la production de l'énergie cellulaire : l'ATP. Son principal substrat est le glucose mais les lipides ainsi que les protéines peuvent également être utilisés en fonction des circonstances physiologiques.

Concernant la génotoxicité induite par l'aluminium, les résultats sont contradictoires. En effet, un certain nombre de travaux montrent qu'il y aurait un effet aneugène⁸ et clastogène⁹ (micro noyaux positifs ; polyploïdie¹⁰), que l'aluminium serait responsable d'aberrations chromosomiques et d'échanges de chromatides sœurs (139) (140) (141) (142) (143). D'autres études en revanche ne retrouvent pas d'effets génotoxiques (144) (145).

En résumé, lorsqu'un certain seuil d'exposition est atteint, le nickel, le cadmium et l'aluminium sont à l'origine de pathologies. Ces trois métaux possèdent un tropisme d'organe qui correspond le plus souvent à une zone d'accumulation. La chronicité de l'exposition avant l'apparition des premiers symptômes prend alors tout son sens. Ils sont impliqués dans l'altération du génome et pour deux d'entre eux, dans les processus de cancérogénèse.

Le tableau 3 donne un bilan général de leur action physiopathologique au niveau des organes et du génome.

Tableau 3: Bilan de la toxicité des métaux étudiés

	Cadmium	Nickel	Aluminium
Conséquence d'une exposition chronique	- Troubles de la fonction rénale - Troubles osseux - Troubles de la fonction hépatique	- Troubles de la fonction rénale - Dermatite de contact - Troubles hépatiques	- Troubles neurologiques - Troubles osseux
Groupe IARC	1	1	Aucun
Type de cancer	Pulmonaire	Pulmonaire Fosses nasales Sinus de la face	Aucun
Synthèse indirecte de ROS	Oui	Oui	Oui
Génotoxicité	- Inhibition de la réparation de l'ADN - Echange de chromatides sœur - Coupures simple brin	- Inhibition de la réparation de l'ADN - Echange de chromatides sœur - Aberrations chromosomiques	- Inhibition de la réparation de l'ADN - Echange de chromatides sœur - Aberrations chromosomiques - Aneugène - Clastogène

⁸ Un agent **aneugène** provoque des anomalies du nombre de chromosome dans la cellule.

⁹ Un agent **clastogène** provoque des cassures de chromosomes.

¹⁰ La **polyploïdie** est le fait, chez un être vivant, de posséder un patrimoine chromosomique au moins égal au double de la normale

Au-delà de leur classification le nickel, le cadmium et l'aluminium présentent quelques points communs quant à leur comportement au niveau de l'organisme. Tout d'abord, ils sont tous les trois faiblement absorbés par voie orale et ont besoin de se lier à une protéine de transport pour être distribués à travers l'organisme. Ils ne sont pas métabolisés au sens propre puisqu'ils ne subissent aucune modification physico-chimique dans leur structure. Ils sont éliminés presque exclusivement par voie urinaire de façon multiphasique car ils ont la propriété de s'accumuler dans l'organisme au cours du temps. Cette bioaccumulation a lieu au niveau de différents organes, notamment les poumons et les reins, faisant de ces organes les premières cibles de leurs actions délétères.

À la suite d'une exposition aiguë ou chronique, leurs conséquences pathologiques sont pour la plupart connues, de même que leur responsabilité dans la genèse de certains cancers. L'aluminium est parmi ces trois métaux celui qui laisse en suspens le plus de questionnement quant à son effet physiopathologique. Des propositions visant à expliquer leur mécanisme d'action au niveau cellulaire existent mais aucun consensus ne semble avoir été trouvé hormis leur implication dans l'amplification du processus oxydatif.

II- Choix du modèle cellulaire

L'objectif de ce travail étant de comparer les effets délétères du cadmium, du nickel et de l'aluminium au niveau cellulaire, il nous a semblé judicieux d'utiliser un modèle cellulaire unique pour réaliser cette étude. Le choix de ce modèle a donc été primordial.

Il existe deux grands types de cellules cultivables : les lignées cellulaires et les cultures primaires. Les lignées cellulaires sont des cellules clonales, c'est-à-dire des cellules génétiquement modifiées afin de les rendre immortelles. Ceci permet de les cultiver plusieurs mois, de les rendre plus résistantes aux conditions de culture mais présente l'inconvénient de les éloigner de la réalité physiologique du tissu dont elles sont originaires.

L'avantage des cellules issues de cultures primaires est qu'elles ne sont pas génétiquement modifiées. Bien que présentant l'inconvénient d'être plus fragiles durant la culture, elles conservent une morphologie, un comportement et une activité proche des conditions *in vivo*.

En outre, la peau étant le premier rempart entre un individu et son environnement, l'utilisation de cellules constituant le matériel majoritaire du derme a semblé un critère de choix pour étudier la toxicité potentielle des métaux.

En considérant ces différents paramètres, c'est en toute logique que le modèle cellulaire choisi pour cette étude est une culture primaire de fibroblaste cutané humain ou NHDF pour Normal Human Dermal Fibroblast (figure 8).

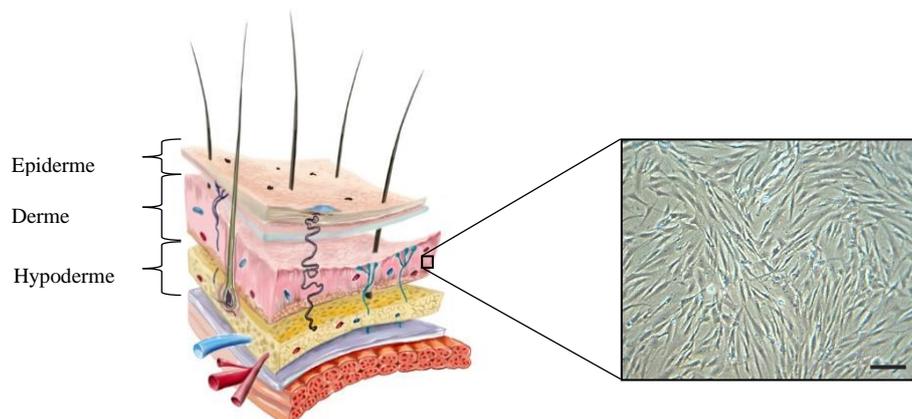


Figure 8: A gauche, dessin d'une coupe transversale de peau humaine. A droite, vue au microscope optique de NHDF en culture (barre d'échelle = 200µm) (209)

II.1 Matériel

La culture des NHDF s'effectue dans des flacons pour culture cellulaire de différentes tailles nommés T25 ou T75 (25 cm² et 75 cm²) dont le fond est recouvert d'une matrice extracellulaire (MEC) qui permet l'adhérence et la constitution du tissu cellulaire. Les cellules sont immergées dans un milieu de nutrition spécifique (FBM-2, Lonza[®]) contenant les nutriments nécessaires à leur croissance (glucose, r-human fibroblast growth factor-B, sérum de veau fœtal, insuline) ainsi que des antifongiques (amphotéricine B) et des antibiotiques (gentamicine) visant à limiter les contaminations fongiques et bactériennes. Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C sous atmosphère contrôlée apportant 5 % de CO₂.

Le laboratoire Lonza[®] a fourni tous les NHDF de l'étude. Le phénotype utilisé est celui d'une femme caucasienne âgée de 30 à 40 ans. Différents lots de NHDF ont été utilisés au cours de ce travail.

II.2 Traitement des NHDF

A la réception d'une ampoule de NHDF du fournisseur Lonza[®], celle-ci est mise en culture dans un flacon T25 (T25) puis, une fois la confluence atteinte, son contenu est divisé en deux dans deux nouveaux T75. L'objectif étant d'obtenir un maximum de cellules à partir d'une nouvelle ampoule, une fois la confluence atteinte un T75 est immédiatement congelé et le contenu du second est à nouveau divisé en trois nouveaux T75. L'un d'entre eux sera conservé pour un usage immédiat et les deux autres seront congelés selon le protocole suivant :

Dans un premier temps, les cellules sont rincées avec 5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline), puis 3 mL d'une solution de trypsine-EDTA (à 0,05 %, Gibco) sont introduits et laissés incuber pendant trois minutes dans l'étuve à 37°C. La trypsine rompt les protéines d'adhérence à la MEC et permet le décollement du tissu cellulaire. Son action est inhibée en ajoutant au moins quatre fois son volume de FBM-2. Les cellules ainsi décollées sont centrifugées 5 minutes à 1200 rpm, le surnageant est aspiré et le culot cellulaire est suspendu avec du milieu de congélation comprenant 45% de milieu cellulaire, 45% de sérum fœtal de veau (SVF) et 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui évite la formation

de cristaux de glace pendant la congélation. 1 mL de cette solution est introduit dans un cryotube. Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte de congélation permettant de diminuer la température d'un degré par minute, dans un congélateur à -80°C pendant au moins 2h. Enfin, les tubes sont transférés dans un container d'azote liquide à -180°C.

Lorsqu'une nouvelle ampoule de NHDF est nécessaire il suffit alors de décongeler un cryotube selon le protocole suivant :

Dès que l'ampoule contenant les cellules est sortie du container à azote, elle est maintenue dans un bain marie à 37°C. Quand les cellules sont en fin de décongélation, il faut les récupérer avec du milieu de culture FBM-2 puis centrifuger la suspension 5 minutes à 1200 rpm afin de séparer les cellules du DMSO toxique à température ambiante. Le surnageant est aspiré puis le culot est suspendu avec du milieu contenant 50 % de FBM-2 et 50 % de SVF. Un T25 estensemencé, et le milieu de culture est changé à J1 par du FBM-2 seul. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont rincées avec 2,5 mL de PBS, 1 mL d'une solution de trypsine-EDTA est introduit et le flacon est laissé incubé trois minutes dans l'étuve à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée en ajoutant au moins quatre fois son volume de FBM-2. Le contenu du T25 peut alors être transféré dans deux T75 qui sont complétés avec du FBM-2 jusqu'à 10 mL.

En routine, les NHDF sont cultivés dans des T75. Tous les trois jours le milieu de culture est renouvelé afin de maintenir une concentration en nutriment adéquate. Pour cela, il faut aspirer le surnageant avec une pipette reliée à une trompe à vide puis introduire 10 mL de FBM-2.

Les NHDF doublent leur nombre en 48h, au bout de 5 à 7 jours le flacon de culture est saturé en cellules. Il faut alors diviser leur nombre entre 3 ou 4 nouveaux flacons T75 en suivant le protocole ci-dessous :

Les cellules sont rincées avec 5 mL de PBS, puis 3 mL d'une solution de trypsine-EDTA sont introduits et le flacon est incubé trois minutes dans l'étuve à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée en ajoutant au moins quatre fois son volume de FBM-2. 1/4 ou 1/3 du volume total de la suspension cellulaire obtenue sont transférés dans de nouveaux flacons qui sont complétés à 10 mL avec du FBM-2. Cette opération ne peut être réalisée que huit fois, au-delà les NHDF présentent des effets de vieillissement (division plus lente, moins bonne résistance aux variations de température, lyse précoce...) et

l'interprétation des résultats devient délicate. Il convient alors de répéter le cycle en décongelant un nouveau cryotube.

III- Métaux et Bioénergétique cellulaire

Le premier volet de cette étude est axé sur l'analyse de l'effet des métaux sélectionnés sur la bioénergétique des fibroblastes. Ceci consiste en l'analyse des flux d'énergie mis en jeu au cours de la vie cellulaire.

Dans un premier temps nous ferons un rappel rapide des voies métaboliques impliquées dans la bioénergétique cellulaire.

Dans un second temps, nous présenterons les techniques utilisées afin de mesurer l'énergie thermique dissipée par des cellules vivantes ; depuis le catabolisme du glucose jusqu'à la respiration cellulaire. Nous verrons que des techniques comme la microcalorimétrie ou l'oxymétrie permettent d'obtenir des informations sur ces voies métaboliques.

Enfin, la dernière partie sera consacrée à la présentation des résultats obtenus suivi d'une discussion.

III.1 Rappels de bioénergétique cellulaire

Cette première partie a pour objectif le bref rappel des tenants et aboutissants des principales voies métaboliques impliquées dans la synthèse d'énergie au sein des cellules eucaryotes saines.

III.1.1 Glycolyse

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas est une voie métabolique qui correspond au catabolisme du glucose. Il s'agit de la première étape du processus de production d'énergie dans les cellules humaines¹¹. Celle-ci a lieu dans le cytosol où, à travers 10 étapes mettant en jeu différentes réactions enzymatiques, les molécules de glucose sont transformées en pyruvate (figure 9). Le pyruvate obtenu pénètre alors dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA qui est utilisé dans le cycle de Krebs, voie métabolique intermédiaire entre la glycolyse et la respiration cellulaire.

¹¹ Notons qu'en situation de stress, lorsque l'apport en glucose est insuffisant comme par exemple lors d'un jeûne prolongé, d'autres voies métaboliques n'impliquant pas le glucose entrent en action afin de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire.

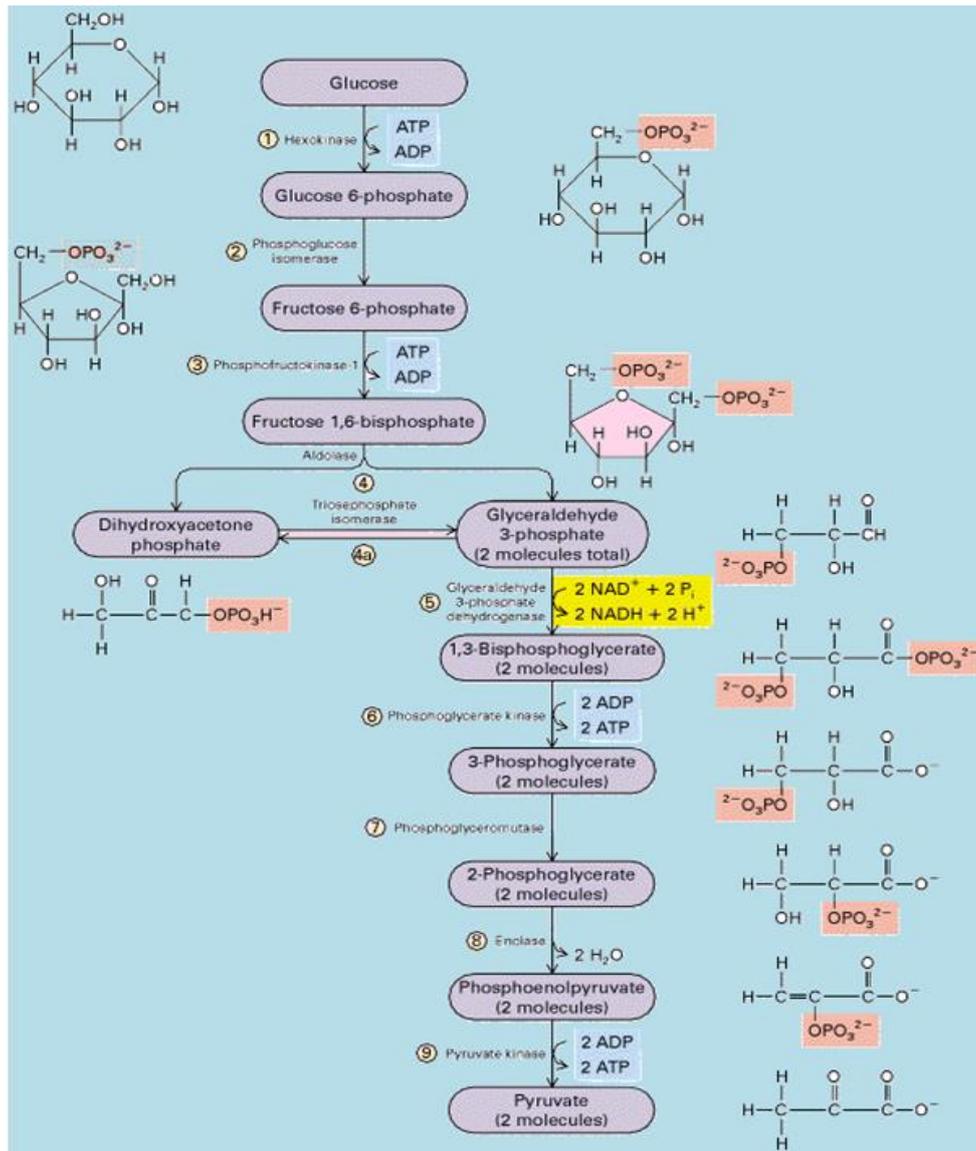


Figure 9 : Schéma de la voie d'Emden-Meyerhof-Parnas (204)

III.1.2 Cycle de Krebs

Il s'agit d'une étape clé permettant, en outre, la synthèse de NADH₂ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide), des co-enzymes indispensables à la chaîne respiratoire. Elles servent en effet de substrats permettant d'aboutir à la synthèse d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) au niveau de cette chaîne.

Le terme « cycle » est approprié à cette voie métabolique puisqu'une succession de réactions conduit à l'utilisation du dernier composé produit comme substrat du premier, l'acétyl-CoA (figure 10).

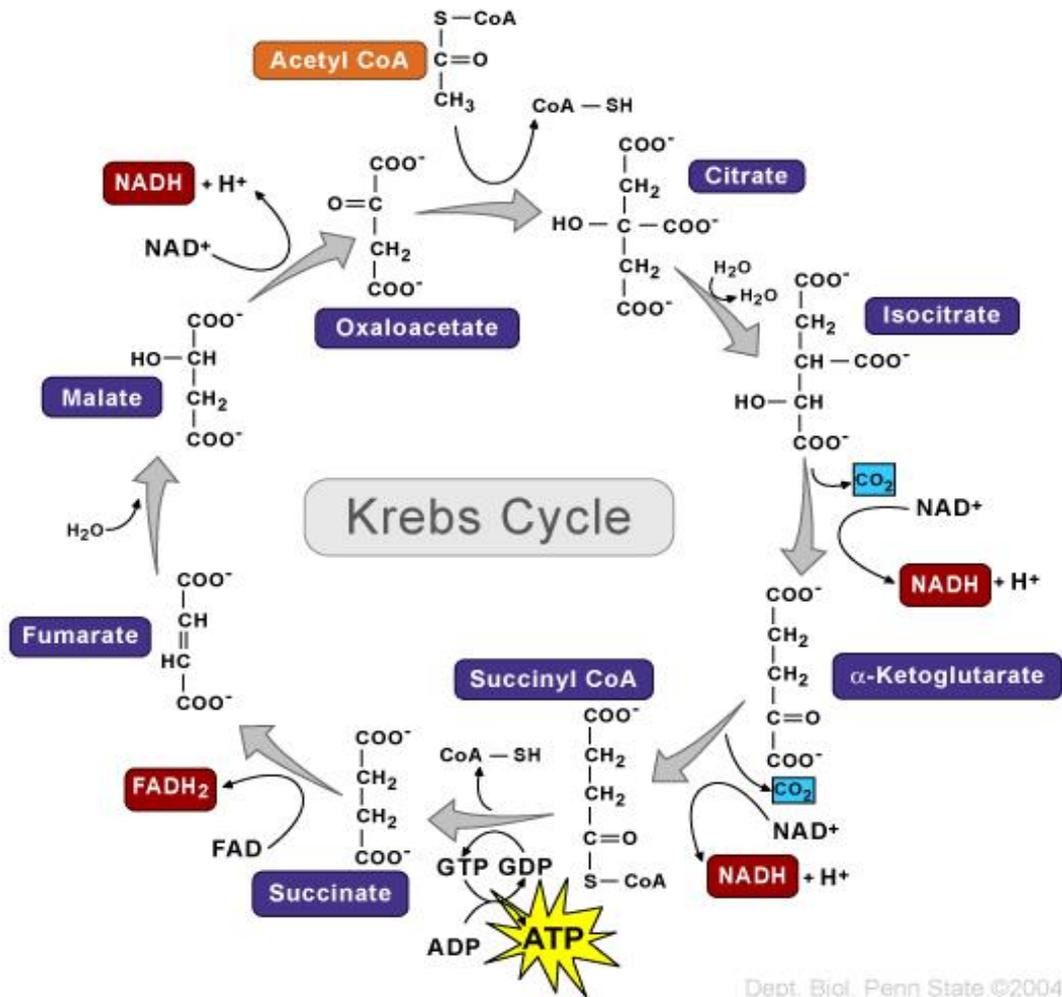


Figure 10 : Schéma du cycle de Krebs

III.1.3 Respiration cellulaire

Tout comme le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire est une voie métabolique qui se déroule dans la mitochondrie. Elle donne lieu à des mouvements d'ions et d'électrons complexes permettant d'aboutir à la synthèse d'ATP (figure 11).

Les NADH_2 et FADH_2 produits au cours du cycle de Krebs sont utilisés par les complexes I et II de la chaîne respiratoire où ils sont déshydrogénés ce qui entraîne la libération d'électrons. Ces derniers circulent à travers les complexes I et IV de la chaîne. Leur mouvement engendre des différences de potentiels au niveau des différents complexes qui permettent ainsi le transit d'ions hydrogènes de l'espace intramembranaire vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Ce flux unilatéral de protons aboutit à la

constitution d'un gradient de concentration d'ions hydrogènes dans l'espace intermembranaire.

Les électrons qui arrivent au niveau du complexe IV sont utilisés lors de la réaction entre l'oxygène respiré et les protons présents dans le milieu pour former de l'eau. Sans oxygène, les électrons s'accumuleraient et la chaîne respiratoire serait bloquée.

Le dernier complexe (V) est nommé ATP synthase. Il s'agit d'un complexe protéique enzymatique capable de changer de conformation sous l'effet du passage de protons. En effet, lorsque les protons sont en concentration suffisante dans l'espace intermembranaire, ils transitent par le complexe V vers l'espace intramembranaire. La force motrice ainsi apportée par les protons en transit ainsi que l'ATP synthase, permettent la synthèse d'une molécule d'ATP à partir d'un phosphate inorganique et d'une molécule d'ADP.

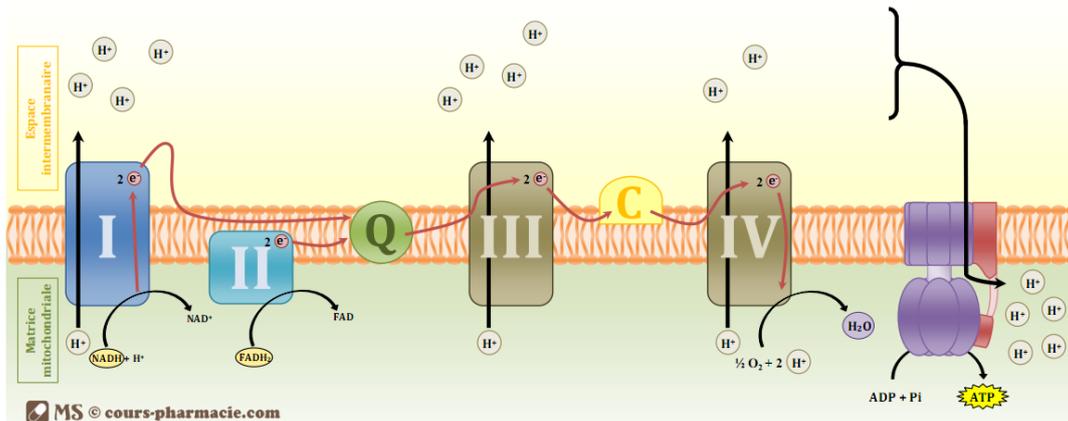
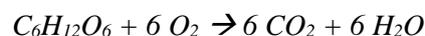


Figure 11: Schéma de la chaîne respiratoire

L'ATP est un nucléotide qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions biochimiques régissant le métabolisme cellulaire, de la division à la mort de la cellule.

L'ensemble du processus depuis la glycolyse jusqu'à la chaîne respiratoire correspond à la bioénergétique cellulaire. D'un point de vue thermodynamique il peut se traduire principalement par l'équation de combustion du glucose, ci-dessous, en considérant comme point de départ le glucose et l'oxygène respiré et aboutissant à la formation d'eau et de dioxyde de carbone.



III.2 Matériel et Méthode

III.2.1 Microcalorimétrie

III.2.1.1 *Principe*

Tout organisme vivant est constamment le siège de réactions métaboliques lui permettant de maintenir son homéostasie. Cette activité permanente se traduit notamment par une production de chaleur. A l'échelle d'une cellule, la chaleur mesurable par microcalorimétrie correspond essentiellement au catabolisme du glucose (146). De ce fait, la microcalorimétrie est un outil adapté à la mesure de cette production, reflet de la bioénergétique cellulaire (147) (148). Cette technique présente en outre l'avantage de ne pas modifier l'environnement chimique du système étudié.

Le microcalorimètre utilisé au cours de ce travail est un microcalorimètre diatherme passif (ThermoMetric® 2277 Thermal Activity Monitor, à 37°C) capable de mesurer un débit thermique, entre un système et le thermostat qui l'entoure, de l'ordre du micro watt. Comme illustré en figure 12, il comprend deux cellules cylindriques en acier inoxydable, une de mesure et une de référence. Ces cellules sont entourées de thermocouples en série montés en opposition permettant de maintenir un flux thermique ($\frac{dQ}{dt}$) constant en annulant toutes les perturbations d'origine extérieures. Le signal thermique est mesuré en continu grâce au logiciel Digitam 4.1 software (Thermometric, Sweden).

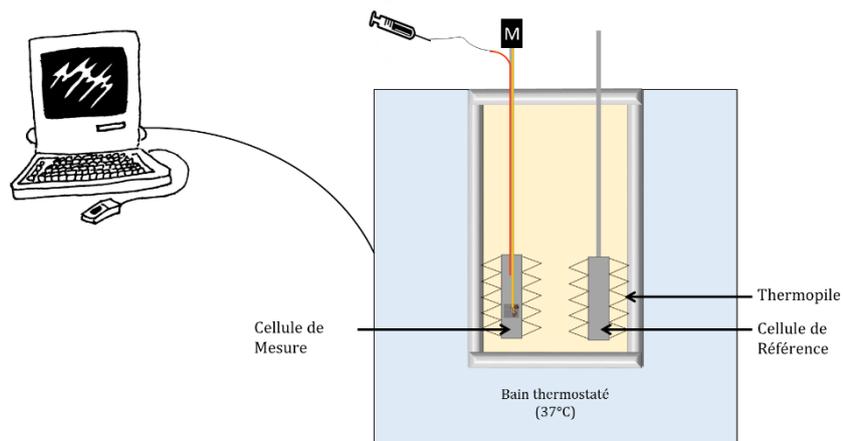


Figure 12 : Schéma d'un microcalorimètre diatherme passif de type Tian-Calvet

III.2.1.2 Protocole de mesure

Le microcalorimètre est étalonné par effet Joules avant chaque manipulation suivant un protocole préinstallé dans le logiciel.

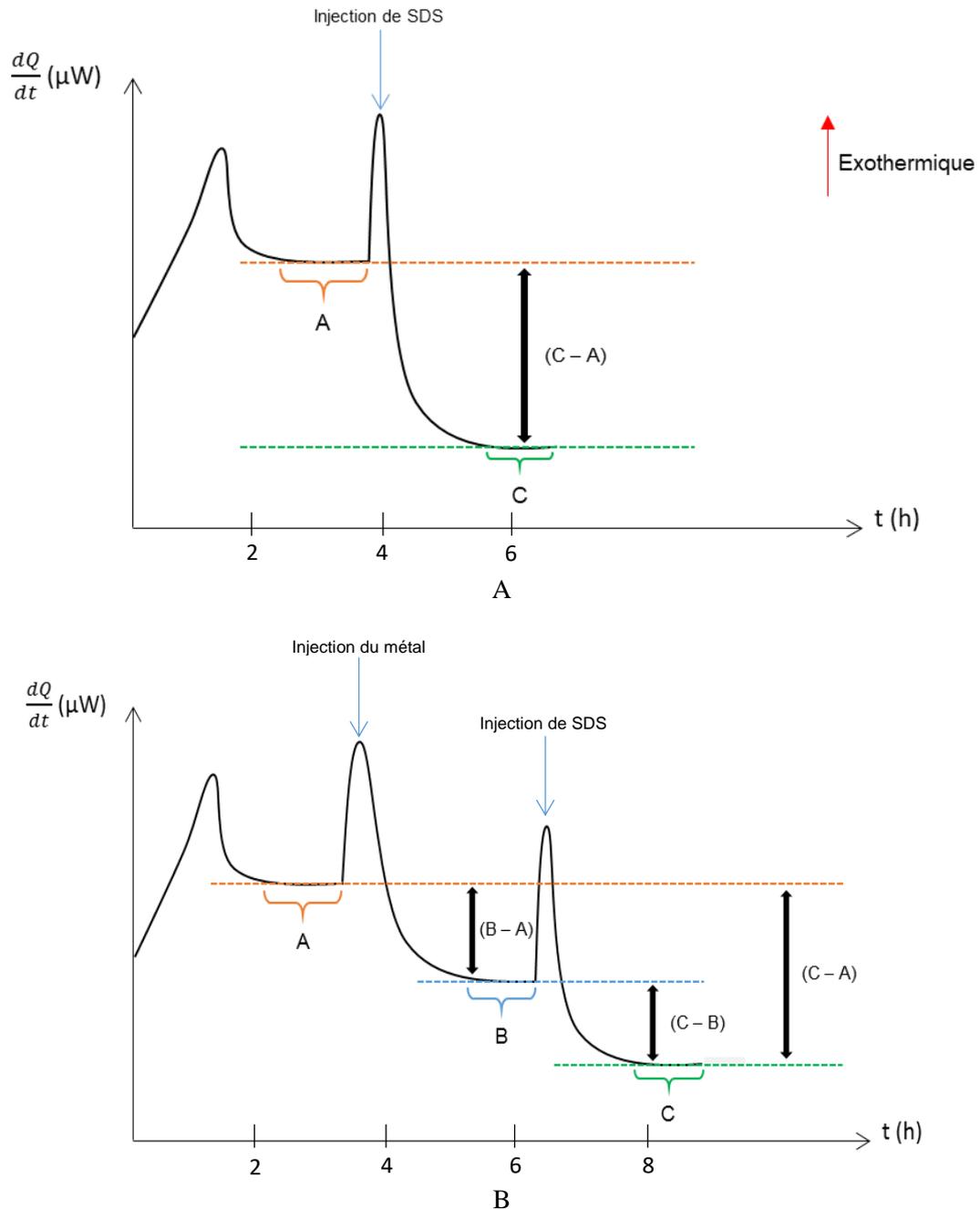
Les NHDF en suspension dans leur milieu de culture (1.10^6 NHDF/1 mL FBM-2) sont introduits dans la cellule de mesure (900 μ L) et un volume équivalent de FBM-2 est introduit dans la cellule de référence. L'homogénéité de la suspension de fibroblastes est assurée par une agitation mécanique continue à l'aide d'une hélice en métal noble, à 60 rotations par minute et le signal thermique est enregistré en continu.

Comme illustré sur la figure 13A, lorsque la valeur du flux thermique est constante (A), 50 μ L d'une solution aqueuse de SDS à 10% sont injectés dans la cellule de mesure à l'aide d'une seringue automatique (en rouge sur la figure 12) afin de lyser les membranes cellulaires. Dans ces conditions, le flux thermique décroît jusqu'à une nouvelle stabilité (C). L'écart entre les deux flux ainsi mesurés (C-A) correspond à la thermogénèse des fibroblastes.

Pour évaluer l'effet du métal, le même protocole est appliqué à la différence près que, lorsque la première stabilité du flux est atteinte (plateau A), le métal en solution aqueuse, à la concentration appropriée, est injecté. Le flux thermique varie à nouveau et un nouvel état d'équilibre du flux est atteint (figure 13B, plateau B). Enfin, du SDS est ajouté dans les mêmes conditions jusqu'à l'obtention d'un flux constant (plateau C). Conformément à la figure 13B, la différence entre les plateaux A et B correspond à l'effet du métal sur la thermogénèse des fibroblastes. L'effet inhibiteur du métal peut alors être calculé en mesurant ces écarts. (C-A) et (C-B) correspondent respectivement à la puissance émise par des fibroblastes sains et des fibroblastes affectés. Il est alors possible de définir un effet inhibiteur (I, en %) pour chaque concentration en métal testée, tel que :

$$I = 100 \times \frac{(B - A)}{(C - A)}$$

Selon le protocole, différentes concentrations de métal ont été étudiées dans des gammes de 0 à 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour le cadmium et le nickel et de 0 à 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'aluminium. La gamme de concentration relative à l'aluminium est restreinte en raison de la limite de solubilité (40 μM) de ce métal en milieu aqueux, à pH 7. Pour chaque concentration, cinq expériences indépendantes ont été réalisées.



*Figure 13 : Thermogrammes type.
En A mesure de la thermogénèse basale de fibroblastes en suspension.
En B mesure de l'inhibition de la thermogénèse de fibroblastes.*

III.2.2 Oxymétrie

III.2.2.1 Principe

La mesure en temps réel de la concentration en dioxygène (O_2) dissout dans un milieu liquide est réalisée dans un oxymètre (Oxygraph Hansatech Instruments Ltd) grâce à une méthode polarographique mettant en jeu une électrode de type Clark (figure 14). Cette dernière est constituée d'une cathode en platine et d'une anode de large surface en argent plongeant dans une solution d'électrolytes (KCl). L'ensemble électrode – électrolyte est séparé du milieu étudié par une membrane PTFE (poly tétra fluoro éthylène, aussi connu sous le nom de Teflon[®]) perméable à l'oxygène dissout mais imperméable à l'eau et aux ions.

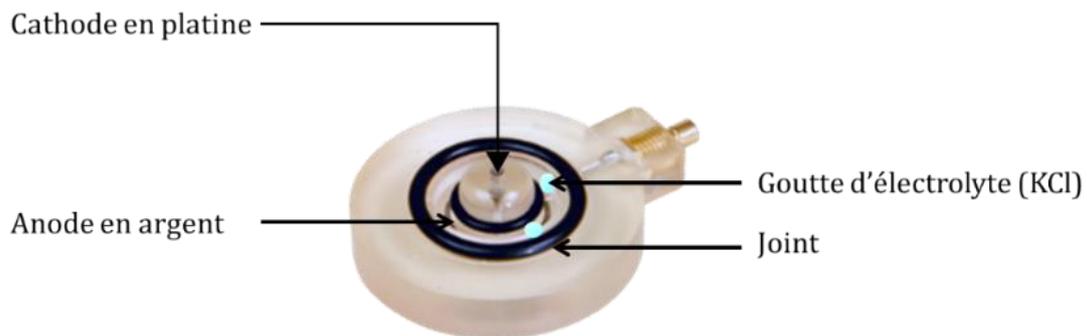


Figure 14: Schéma d'une électrode de Clark

Une tension de polarisation de 700 mV est appliquée entre les deux électrodes. Sous son action, l'oxygène dissout diffuse à travers la membrane et subit une réduction en captant les électrons fournis au niveau de l'anode (figure 15). Le courant ainsi créé est proportionnel à la concentration en O_2 .

Il est alors possible de mesurer en continu la consommation en O_2 par les cellules en suspension dans leur milieu. En effet, l'ajout d'un métal va perturber leur respiration et leur consommation en O_2 va être modifiée. L'intensité de la respiration cellulaire est directement corrélée à la concentration en O_2 dissout.

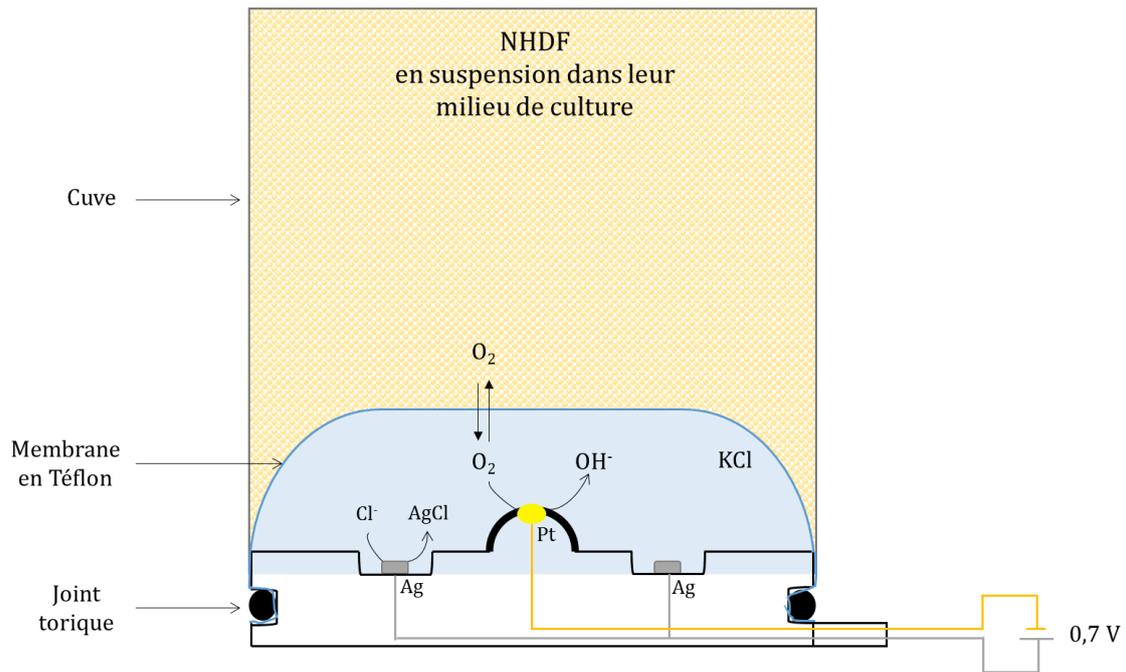


Figure 15: Coupe transversale d'une électrode de Clark montée sur l'oxymètre

III.2.2.2 Protocole de mesure

a. Préparation de l'électrode de Clark

L'électrode servant à la mesure est préparée selon les étapes successives suivantes :

- Quelques microlitres d'une solution de chlorure de potassium (KCl) saturée à 50% sont déposés sur l'électrode.
- Puis cette dernière est recouverte d'une membrane de papier agissant comme un buvard qui permet la création d'un pont ionique en maintenant un film continu et uniforme de la solution d'électrolyte à la surface de l'électrode.
- Enfin, l'électrode est recouverte d'une membrane de PTFE qui est fixée au moyen d'un joint torique adapté.

b. Calibration de l'électrode

La réponse de l'électrode étant linéaire, sa calibration nécessite deux points.

Le premier point est obtenu en mettant l'électrode en contact avec de l'eau distillée dans un système hermétiquement clos à 37°C et à pression atmosphérique. Dans ces

conditions, la mesure de la concentration en oxygène dissous dans l'eau distillée doit être comprise entre 210 et 230 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (149).

Le second point correspond au zéro. Pour cela le système est ouvert et de l'azote est mis à barboter dans la chambre de mesure jusqu'à ce qu'une concentration tendant vers 0 mol.L^{-1} d' O_2 soit atteinte. L'appareil est alors prêt pour utilisation.

c. La mesure

Une fois l'électrode calibrée, la concentration en oxygène et sa variation au cours du temps est enregistrée en continu à l'aide du logiciel Oxygraph Plus V1.01.

Les NHDF en suspension dans le milieu de culture FBM-2 sont introduits dans la chambre de mesure thermostatée à 37°C et hermétiquement close, à raison de $700 \cdot 10^3$ cellules dans 700 μL de milieu. L'homogénéité de la suspension est assurée par une agitation magnétique à 30 rpm.

Les NHDF sont introduits (en A, figure 16), une pente décroissante S_i correspondant à leur consommation normale en O_2 est obtenue jusqu'à l'épuisement du O_2 dissous. Si une solution de métal est injectée (B) avant l'épuisement de O_2 , une modification de la respiration cellulaire se traduit par une nouvelle pente S_m .

L'effet du métal sur la respiration cellulaire qui peut être inhibiteur ou inducteur, est déterminé par mesure des pentes S_i et S_m et est calculé selon l'équation ci-dessous :

$$I = 100 \times \left| \frac{S_i - S_m}{S_i} \right|$$

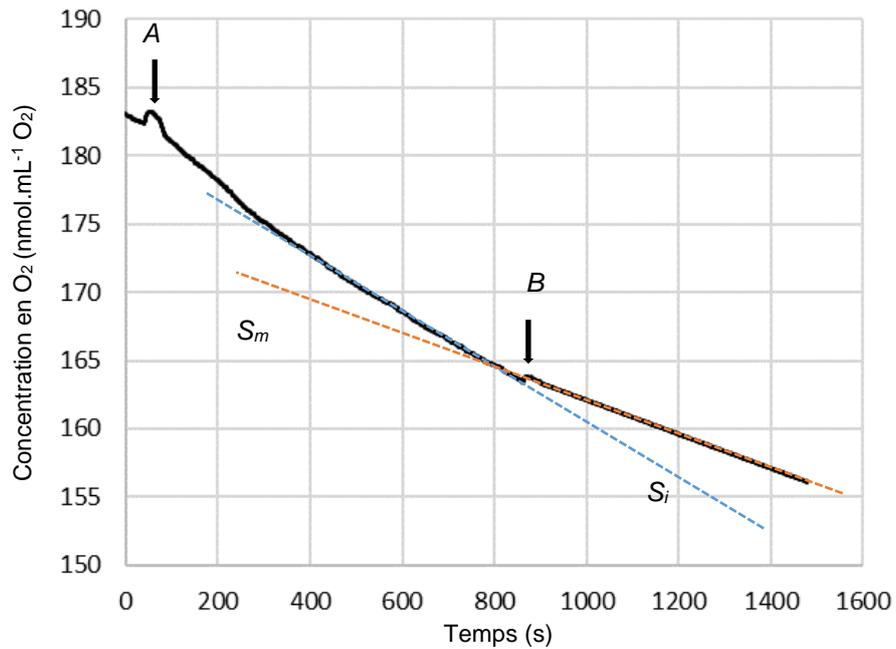


Figure 16: Oxygraphe. Le point A correspond à l'introduction des NHDF dans l'appareil et le point B à l'injection d'une concentration en métal. S_m et S_i sont respectivement les pentes des droites suivant les injections A et B.

On remarque sur la figure 16 que la concentration initiale en O_2 dissous est inférieure à la concentration en oxygène dissous dans l'eau distillée. En effet, les NHDF en suspension sont introduits dans le dispositif avec leur milieu de culture dans lequel ils ont déjà consommé une partie de l'oxygène dissous.

L'effet des métaux sur la respiration cellulaire a ainsi été étudié dans une gamme de concentrations de 0 à $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour le cadmium, de 0 à $14 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour le nickel et de 0 à $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'aluminium. Pour chaque concentration, en fonction de la répétabilité des résultats, les mesures ont fait l'objet respectivement de $n = 3, 6$ et 7 mesures indépendantes.

III.3 Résultats et Discussion

III.3.1 Microcalorimétrie

La chaleur produite par une cellule, ou thermogénèse, dépend de la nature tissulaire dont elle est issue. Un érythrocyte, dépourvu de mitochondrie, ne dégagera pas la même chaleur qu'un neurone, gros consommateur de glucose. Ainsi, la mesure du flux thermique rapportée dans la littérature est très disparate et varie entre 1,2 et 134 pW.cell⁻¹ (150) (151). Comme attendu, le flux thermique moyen émis par des NHDF en suspension est compris dans cet intervalle (152).

Aux concentrations étudiées, le nickel et l'aluminium ne perturbent pas la thermogénèse des fibroblastes. Au contraire, le cadmium, comme illustré en figure 17, exerce un effet inhibiteur dose dépendant.

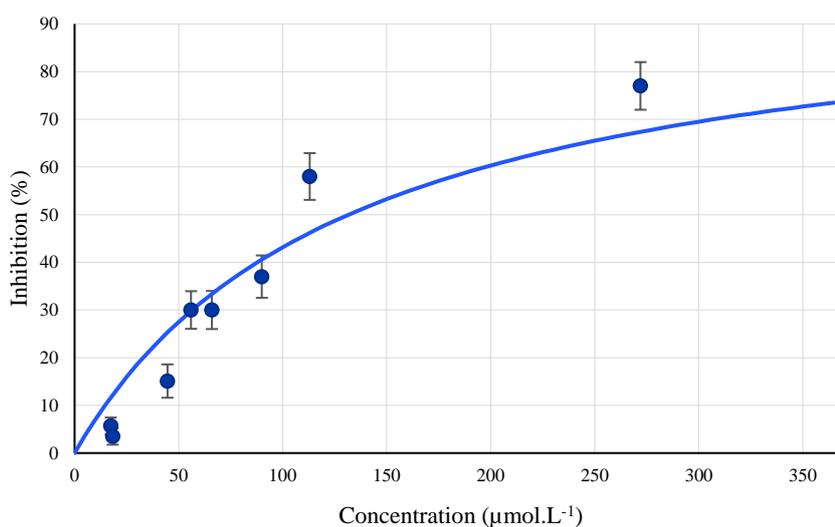


Figure 17 : Effet du cadmium sur la thermogénèse des NHDF.
Les points représentent la moyenne de cinq mesures indépendantes et les barres d'erreur correspondent à l'erreur type de la moyenne.

L'analyse des points expérimentaux obtenus est réalisée par régression non linéaire selon l'équation de Hill qui présente l'avantage de donner une information sur la coopérativité de la réaction (153) :

$$I = \frac{[m]^n}{[IC_{50}]^n + [m]^n}$$

où I est le coefficient d'inhibition exprimé en %, m la concentration en métal en mol.L⁻¹, IC_{50} la concentration inhibitrice à 50% de l'effet (en mol.L⁻¹) et n la constante de Hill qui décrit le degré de coopérativité entre le métal et sa cible.

Avec une constante de Hill $n = 1,00 \pm 0,02$, ces résultats indiquent qu'il n'y a pas d'effet coopératif impliqué dans l'effet du cadmium sur la thermogénèse. Ils permettent de plus d'établir une valeur d' IC_{50} pour ce métal dans nos conditions expérimentales : IC_{50} calculée de $138 \pm 18 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Ainsi, le cadmium est responsable d'une altération du catabolisme du glucose. Ce résultat est conforté par Maskow et Paufler (146), qui rapportent que la thermogénèse cellulaire est liée au catabolisme du glucose, principale source d'énergie de la cellule. En revanche, dans nos conditions expérimentales, l'aluminium et le nickel ne semblent pas exercer d'effet à ce niveau.

III.3.2 Oxymétrie

La respiration des NHDF, mesurée par la consommation du O₂ en temps réel, met en évidence une inhibition dose dépendante de cette respiration et ce, pour les trois métaux (figure 18). L'analyse des points expérimentaux obtenus pour chacun, montre que l'inhibition de la respiration est dose dépendante et fini par tendre vers 100% d'inhibition.

L'analyse de ces résultats par régression non linéaire selon l'équation de Hill telle que décrite précédemment, permet de déterminer les IC_{50} de chaque métal. Ces IC_{50} sont de $2,8.10^{-6} \pm 3.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ pour le cadmium, $1,4.10^{-6} \pm 5.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ pour l'aluminium et $3,1. 10^{-3} \pm 6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ pour le nickel. Dans tous les cas $n = 0,99 \pm 0,03$.

Ces résultats montrent clairement que la toxicité au niveau de la respiration cellulaire est analogue pour le cadmium et l'aluminium tandis que pour le nickel celle-ci est beaucoup moins marquée.

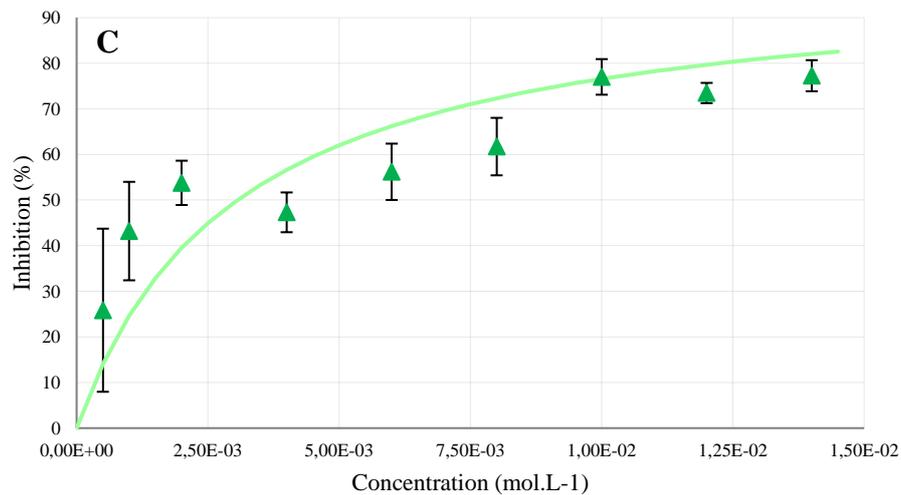
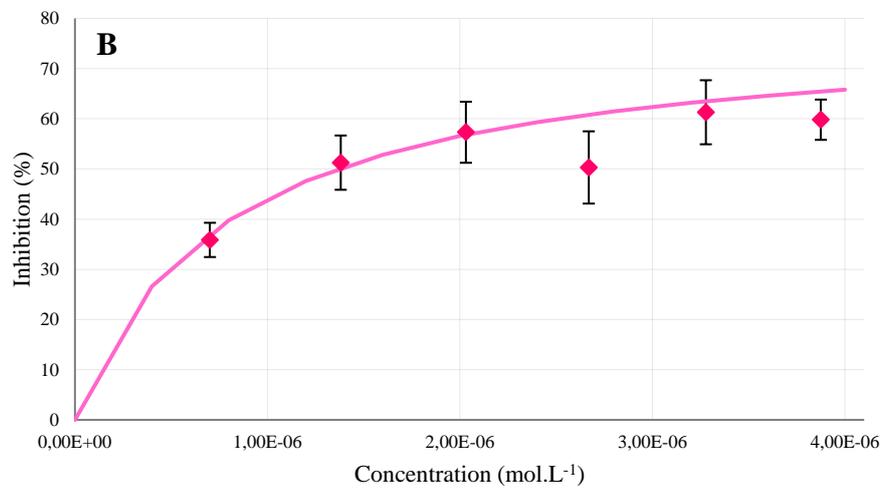
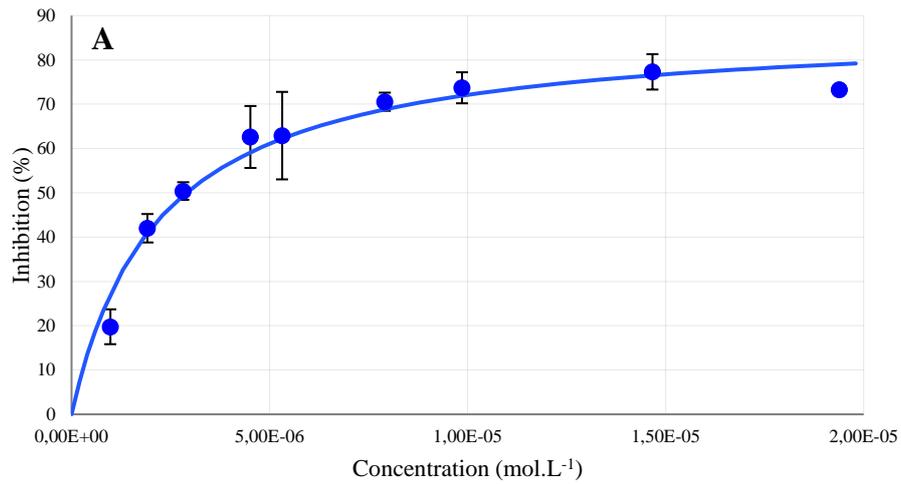


Figure 18 : Effet du cadmium (A), du nickel (B) et de l'aluminium (C) sur la respiration cellulaire. Les points représentent la moyenne de trois (A), six (B) et sept (C) mesures indépendantes et les barres d'erreur correspondent à l'erreur type de la moyenne. Les courbes correspondent à la régression non linéaire des données basée sur l'équation de Hill

III.3.3 Etude du métabolisme cellulaire après 24h d'exposition

Etant donné que l'effet observé sur la respiration cellulaire est obtenu de façon immédiate en introduisant le métal durant la respiration basale des cellules, nous avons voulu étudier si un temps d'exposition préalable aux métaux pouvait ou non influencer leur toxicité.

Pour cela, les cellules ont été incubées au contact des métaux durant 24h à une concentration unique de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$, puis la thermogénèse et la respiration des NHDF ont été mesurées en parallèle.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Résultats de la mesure de la thermogénèse et de la respiration de NHDF exposés 24h à $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ au nickel et à l'aluminium. n = nombre de mesures indépendantes.

Données mesurées	Ni	Al	Témoins
Thermogénèse (pW.cellule ⁻¹)	25 ± 2	25 ± 3	15 ± 5
Consommation en O₂ (nmol O ₂ s ⁻¹ .10 ⁻⁶ cellule)	$0,064 \pm 0,010$	$0,088 \pm 0,012$	$0,032 \pm 0,002$
	$n = 5$	$n = 8$	$n = 10$

Le cadmium n'apparaît pas dans ce tableau car après 24h de contact, les cellules ne permettent pas de réaliser les mesures.

Les témoins présentent une consommation moyenne en O₂ mesurée de $0,032.10^{-9} \pm 0,002.10^{-9}$ mol O₂.s⁻¹.10⁻⁶ cellule. En considérant l'enthalpie de combustion du glucose ($\Delta H^{\circ}c(\text{Glc})$) égale à -468 kJ.mol^{-1} d'O₂, la puissance thermique (p) d'une cellule peut être calculée selon la relation :

$$p = \frac{dO_2}{dt} \times |\Delta H^{\circ}c(\text{Glc})|$$

La puissance thermique théorique de $14,98 \text{ pW.cellule}^{-1}$ ainsi calculée correspond à la thermogénèse moyenne des témoins. Cette puissance thermique, au-delà de sa valeur, reflète parfaitement le couplage existant entre le catabolisme du glucose et la respiration ayant lieu au sein de la cellule.

On observe une augmentation de la respiration cellulaire de l'ordre de 175% avec l'aluminium et de 100% avec le nickel. De même que pour la thermogénèse qui présente une augmentation d'environ 10 pW.cellule⁻¹ par rapport au témoin.

Toutefois, si l'on tient compte uniquement de l'augmentation de la respiration cellulaire, la thermogénèse théorique mesurée devrait être de 30,0 pW.cellule⁻¹ pour le nickel et de 41,2 pW.cellule⁻¹ pour l'aluminium, ce qui n'est pas le cas.

Il ressort donc du contact prolongé entre le nickel et l'aluminium avec les NHDF, une forte augmentation de la respiration cellulaire et une augmentation de la thermogénèse sans atteindre les valeurs théoriques estimées. Cette augmentation serait donc partielle. Nos résultats montrent alors un découplage entre la respiration cellulaire et le catabolisme du glucose.

Il est possible d'émettre l'hypothèse que l'O₂ consommé n'est pas exclusivement utilisé pour réaliser la respiration cellulaire. L'augmentation partielle de la thermogénèse suggère que le catabolisme du glucose n'est plus l'unique voie métabolique active. Il est ainsi possible de penser qu'une synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) permettant de répondre à de nombreux stress cellulaires se soit mise en place. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'en conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent de la chaîne respiratoire et réagissent directement avec l'oxygène dissous pour donner naissance à des ROS (154). De plus, les métaux peuvent agir comme catalyseurs dans la formation de certains ROS tel que le radical hydroxyle.

Ce chapitre a permis de comparer l'effet des trois espèces métalliques sur la bioénergétique cellulaire après différents temps d'exposition.

L'exposition des NHDF pendant un temps court à du cadmium conduit à une inhibition du métabolisme du glucose et de la respiration cellulaire dose dépendante. Le nickel et l'aluminium n'ont un effet, aux doses testées, que sur la respiration cellulaire qu'ils inhibent également. L'effet du cadmium et de l'aluminium sur la respiration cellulaire est assez similaire.

Après 24h d'exposition à une dose fixe en métal on note pour le nickel et l'aluminium, une augmentation de la thermogénèse et de la respiration cellulaire par rapport au témoin. Le lien thermodynamique existant entre ces deux paramètres est perdu, on parle alors de découplage entre le catabolisme du glucose et la respiration cellulaire. Celui-ci suggère l'activation d'autres voies métaboliques afin de lutter pour survivre face à un perturbateur.

IV- Métaux et Cytotoxicité

Les résultats de l'étude de bioénergétique ayant montrés un effet perturbateur sur le métabolisme cellulaire, nous avons voulu, d'une manière générale, déterminer si ces métaux exerçaient un effet sur la viabilité des NHDF. Dans cet objectif nous avons mené notre étude à l'aide de colorants classiquement utilisés que sont le MTT et le cristal violet. Avant d'exposer nos résultats de viabilité cellulaire, nous faisons dans un premier temps un rappel sur l'utilisation de ces deux tests colorimétriques.

IV.1 Principe du test au MTT et au cristal violet

IV.1.1 Le test au MTT

Le MTT ou 3-4,5diméthylthiazol-2,5diphényl tétrazolium bromide, est un colorant métabolisé par les cellules, utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire. Il s'agit d'un sel de tétrazolium de couleur jaune-orangée qui, après 4h de contact à 37°C est réduit en sels de formazan insolubles de couleur bleu-violette (figure 19). Afin de révéler une couleur homogène, les sels sont dissous avec un solvant organique polaire tel que le DMSO. L'intensité de la coloration alors obtenue, exprimée en absorbance, est directement proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement actives.

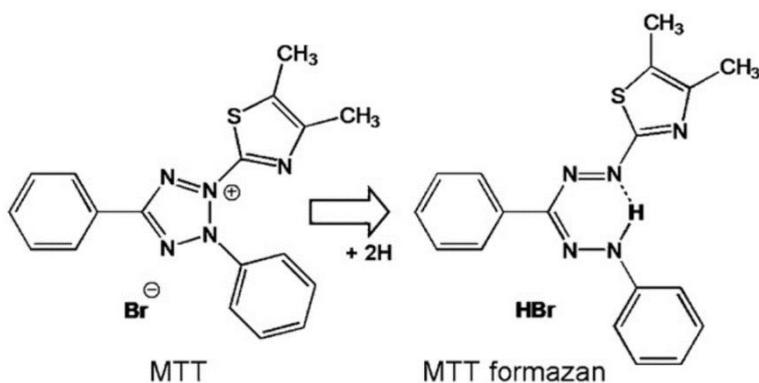


Figure 19: Réduction du MTT en Formazan

Développé par Tim Mosmann en 1983 (155), ce test de viabilité cellulaire a permis de réduire le temps de traitement des échantillons, de s'affranchir d'éléments radioactifs tels que la [³H] thymidine et d'autoriser une approche qualitative rapide puisque la coloration apparaît en quelques secondes après l'ajout du solvant. Dans un premier temps, en considérant les travaux de Slater (1963) sur les sels de tétrazolium (156), il a été admis

que la réduction du MTT en formazan avait lieu au niveau des complexes II (coenzyme Q) et III (cytochrome c) de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le MTT mettait donc en lumière l'état de la respiration cellulaire et donnait une information sur la mécanistique de l'agent testé. Cependant, dès le début des années 90 cette théorie est mise en défaut par plusieurs auteurs (157) (158) (159), tel que Liu qui démontre que les sels de MTT ne sont pas réduits par des mitochondries isolées en présence de poison des complexes II et III de la chaîne respiratoire, mais le sont, dans les mêmes conditions, par des cellules entières. De plus, il a été mis en évidence que les sels de formazan formés ne se concentrent pas dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique mais auraient pour site final de stockage des gouttelettes lipidiques (160). La réaction aurait donc lieu en présence de réducteurs non mitochondriaux, de nombreux réactifs ont été mis en évidence au cours d'études successives tels que l'acide ascorbique, la cystéine, l' α -tocophérol, le glutathion, l'acide dihydrolipoïque etc (159) (160) (121) (161) (162) (163). Néanmoins, la principale source de réduction du MTT a lieu dans le cytosol par le coenzyme NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) produit par la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Dans ce cas, le test au MTT pourrait être considéré comme une méthode très indirecte pour tester l'activité mitochondriale.

En conclusion, le MTT est un réactif permettant de mesurer directement la viabilité cellulaire à travers son activité métabolique générale mais non spécifiquement son activité mitochondriale.

IV.1.2 Le test au cristal violet

Le cristal violet, aussi appelé violet de Gentiane (figure 20), était à l'origine utilisé en bactériologie en tant que colorant de Gram. A présent, ses propriétés de fixation sur les membranes bactériennes ont été détournées de leur usage initial vers les cellules eucaryotes (164). Le violet de gentiane n'est effectivement pas spécifique du peptidoglycane mais se fixe également sur les membranes cellulaires (165).

coloration développée. Les témoins sont considérés comme présentant une viabilité de 100% et la viabilité de chaque puit est calculée selon la relation suivante :

$$V = \frac{100 \times A_{ech}}{A_t}$$

Avec V la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage, A_{ech} l'absorbance de l'échantillon et A_t l'absorbance moyenne des témoins.

IV.2.2 Protocole du test au cristal violet

Dans un premier temps, la solution de cristal violet est préparée à partir d'une poudre de violet de gentiane. La poudre de violet de gentiane à 0,1% (poids/volume) est dissoute dans un mélange de 80% d'eau et 20% de méthanol. La solution est filtrée et conservée à température ambiante à l'abri de la lumière.

Les NHDF sontensemencés sur une plaque de 96 puits à raison de 3000 cellules et 150 μL de milieu par puit. Les NHDF sont laissés pendant 2h, 24h ou 72h au contact du métal à une concentration de $2 \cdot 10^{-6}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de cadmium, de $1 \cdot 10^{-5}$ à $2,5 \cdot 10^{-3}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de nickel et de $1 \cdot 10^{-5}$ à $3 \cdot 10^{-2}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ d'aluminium. Le milieu est ensuite éliminé, puis du glutaraldéhyde à 1% (50 μL /puits) est introduit afin de fixer les cellules au fond des puits. Un temps de pose de 10 minutes à température ambiante est nécessaire avant d'éliminer le glutaraldéhyde et de rincer les puits au PBS. La solution de cristal violet est introduite à raison de 50 μL /puit et un nouveau temps de pose de 10 minutes à température ambiante est nécessaire. A nouveau, le surnageant est aspiré et les puits sont rincés trois fois avec du PBS. Enfin, 50 μL de DMSO sont introduits dans chaque puit afin de solubiliser les cristaux de cristal violet. La lecture est réalisée en spectrophotométrie multiscan (Labsystems Multiskan RC) à une longueur d'onde de 600 nm et le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé selon la même relation que celle utilisée pour le MTT.

IV.3 Résultats et Discussion

Les résultats obtenus après un test au MTT sont représentés par la figure 21, ci-dessous, après 72h de contact avec chacun des métaux.

Nos points expérimentaux montrent qu'en particulier pour le cadmium et l'aluminium, la viabilité cellulaire est supérieure au témoin pour les concentrations les plus faibles étudiées : entre 105 et 110% pour le cadmium à 5.10^{-6} et 1.10^{-5} mol.L⁻¹ ; entre 105 et 145% pour l'aluminium de 1.10^{-4} à $2,5.10^{-3}$ mol.L⁻¹. Dans une moindre mesure le nickel présente cet effet avec une seule concentration expérimentale supérieure à 100% de viabilité à 5.10^{-6} mol.L⁻¹. Ensuite, une diminution progressive de la viabilité cellulaire s'observe lorsque les concentrations augmentent.

Dans le cas du cristal violet (figure 22), on observe également cet effet en présence d'aluminium où entre 1.10^{-5} à 1.10^{-2} mol.L⁻¹ la viabilité cellulaire varie entre 101% et 134%. Ici encore, la viabilité des NHDF diminue en fonction de la concentration en métal.

En toxicologie il est fréquent de rencontrer un phénomène de stimulation de la croissance cellulaire après l'apport d'une substance exogène à faible dose alors que la même substance utilisée à dose plus élevée entrainera une décroissance de la viabilité cellulaire. Il s'agit du phénomène d'hormésis. Observé par Schulz en 1888 ce phénomène deviendra la règle Arndt-Schulz disant qu'une substance qui inhibe un processus biologique à dose sub létale est capable de le stimuler à dose plus faible (167). Cette loi servira de fondement à l'homéopathie qui supporte l'idée que le pouvoir d'une drogue croit avec sa dilution (168).

Il a depuis été mis en évidence que l'hormésis observé est une réponse au stress cellulaire induit par une faible concentration d'élément toxique. En effet, ce phénomène est corrélé à la synthèse de protéines de stress cellulaire telles que la Hsp 70 (heat shock protein 70) et la métallo thionine (169).

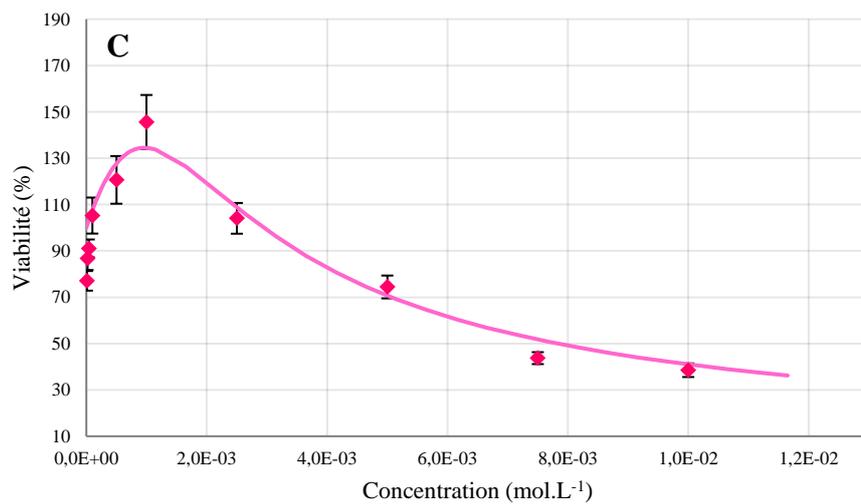
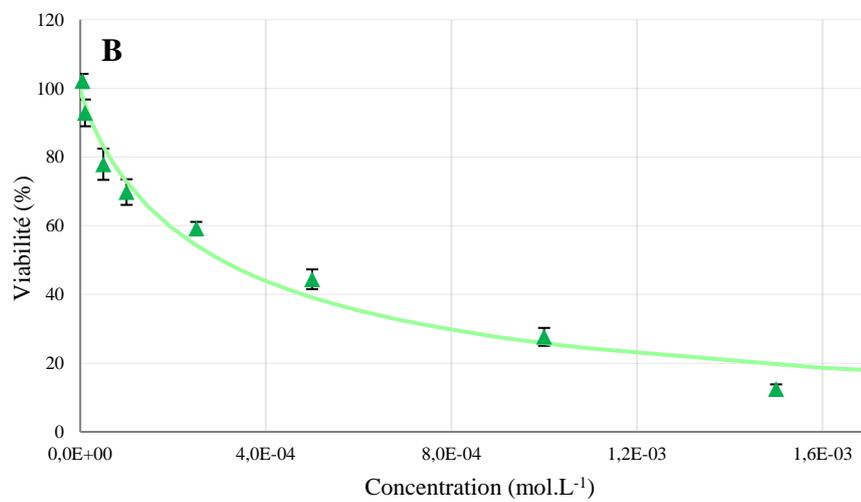
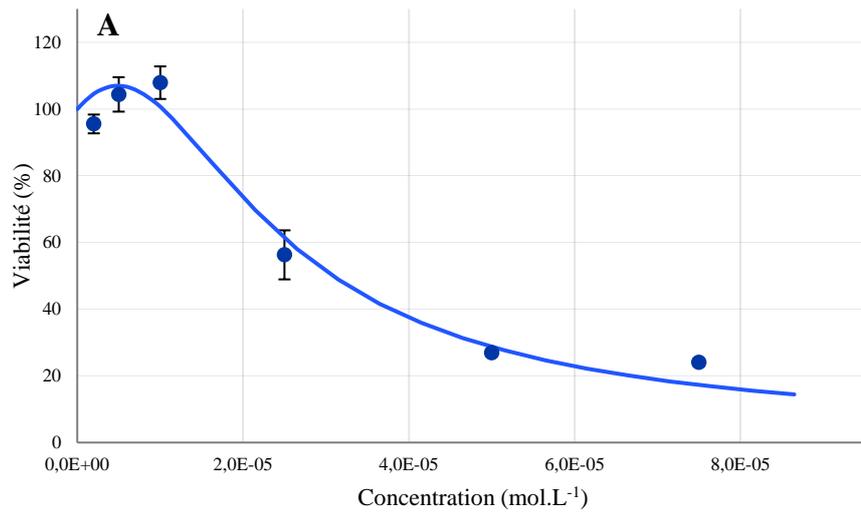


Figure 21 : Courbes effet-dose du cadmium (A), du nickel (B) et de l'aluminium (C) après 72h d'exposition, obtenues avec un test au MTT. Les barres correspondent à l'erreur type de la moyenne. Les courbes sont le résultat de la régression non linéaire d'Ewijk et Hoekstra.

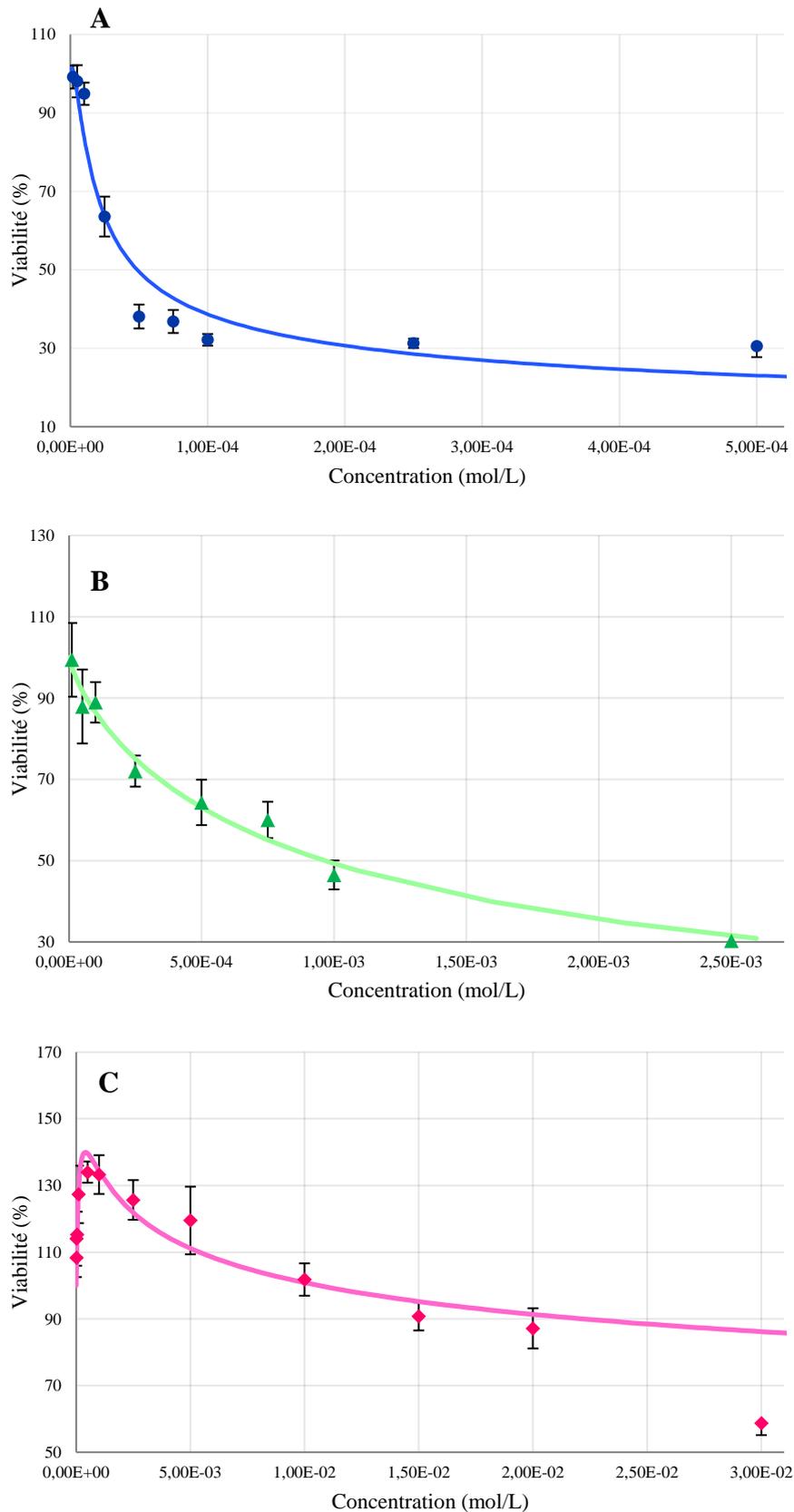


Figure 22 : Courbes effet-dose du cadmium (A), du nickel (B) et de l'aluminium (C) après 72h d'exposition, obtenues avec un test au cristal violet. Les barres correspondent à l'erreur type de la moyenne. Les courbes sont le résultat de la régression non linéaire d'Ewijk et Hoekstra.

De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que les métaux étaient doués d'un tel effet. L'analyse de nos données expérimentales a été réalisée selon le modèle mathématique d'Ewijk et Hoekstra utilisé antérieurement pour étudier la croissance de biomasse (170). Ce modèle est représenté par l'équation ci-dessous :

$$v (\%) = 100 \left[\frac{1 + f \cdot C}{1 + (1 + 2 \cdot f \cdot IC_{50}) \left(\frac{C}{IC_{50}} \right)^b} \right]$$

où : v est la viabilité cellulaire théorique exprimée en %, C est la concentration en métal (mol.L^{-1}), IC_{50} est la concentration inhibitrice à 50% de l'effet (mol.L^{-1}), f est le paramètre de l'hormésis et b le facteur de décroissance.

Les résultats obtenus représentés par les courbes des figures 21 et 22 nous ont permis de déterminer l' IC_{50} , le paramètre d'hormésis et le facteur de décroissance. Ces valeurs sont répertoriées dans le tableau 5 suivant :

Tableau 5 : Paramètres du modèle d'Ewijk et Hoekstra pour le MTT et le cristal violet

	MTT				Cristal violet			
	IC_{50} (mol.L^{-1})	f	b	R^2	IC_{50} (mol.L^{-1})	f	b	R^2
Cadmium	$3,08 \cdot 10^{-5}$ \pm $2,00 \cdot 10^{-9}$	27788 \pm 12	2,05 \pm $2 \cdot 10^{-4}$	1,00	$4,87 \cdot 10^{-5}$ \pm $6,02 \cdot 10^{-6}$	67544 \pm 25690	1,34 \pm $6,9 \cdot 10^{-2}$	0,95
Nickel	$3,03 \cdot 10^{-4}$ \pm $5,90 \cdot 10^{-5}$	0	0,88 \pm 0,15	0,98	$9,66 \cdot 10^{-4}$ \pm $9,39 \cdot 10^{-5}$	0	1,27 \pm $1,9 \cdot 10^{-2}$	0,96
Aluminium	$7,80 \cdot 10^{-3}$ \pm $9,78 \cdot 10^{-4}$	812 \pm 320	1,79 \pm 0,15	0,92	$3,49 \cdot 10^{-2}$ \pm $1,21 \cdot 10^{-2}$	7833 \pm 173	1,14 \pm 0,32	0,66

Les valeurs des IC_{50} pour chacun des métaux sont très différentes les unes des autres et montrent que le cadmium présente un effet plus cytotoxique que le nickel et l'aluminium. Toutefois il est à noter que dans le cas de l'aluminium pour le cristal violet, la valeur de l' IC_{50} $34,9 \cdot 10^{-3} \pm 12,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ est à considérer avec circonspection puisque l'erreur est presque égale à la moitié de sa valeur.

Le facteur f , appelé paramètre de l'hormésis, impose la partie croissante de la courbe aux faibles concentrations. Le facteur b traduit la décroissance la courbe aux concentrations plus élevées et peut être assimilé à la puissance du toxique. Une comparaison directe de la valeur de ces deux paramètres ne peut être réalisée que si le domaine de concentration de chaque métal est identique, ce qui n'est pas le cas dans cette étude.

Pour un même métal, l'IC₅₀ mesurée avec le MTT est inférieure à celle mesurée avec le cristal violet. Ceci laisse à penser que la cellule conserve une membrane intacte alors que son activité métabolique est fortement réduite. Dans le cas du cadmium cette différence est minime ($3,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ avec le MTT contre $6,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ avec le cristal violet), ce qui implique une altération tant morphologique que métabolique de la part du cadmium. Cet effet est confirmé par l'observation en microscopie optique illustré par la figure 23, où l'altération des membranes augmente avec la concentration.

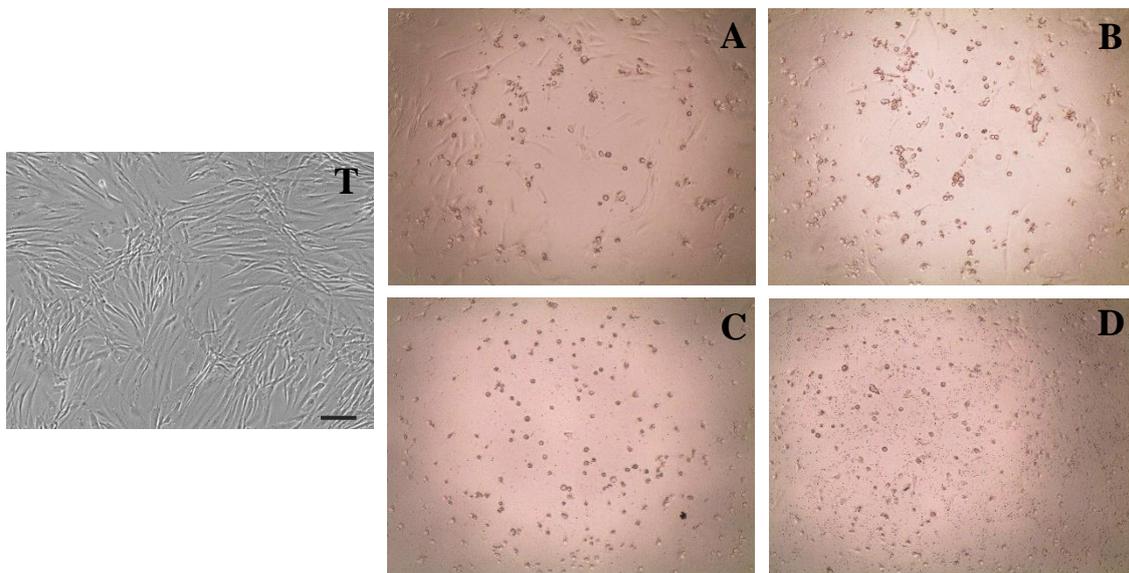


Figure 23 : NHDF observés en microscopie optique après 72h d'exposition à différentes concentrations en cadmium (barre d'échelle = 200μm).

T : NHDF témoins non exposés. A : 10μM. B : 25 μM. C : 50 μM. D : 250 μM.

On remarque que même à faibles concentrations, le cadmium entraîne une altération de la morphologie des NHDF. Cet effet s'accroît avec la concentration en métal puisque dans un premier temps, les cellules perdent leur adhérence, le tissu constitué de cellules longilignes disparaît progressivement au profit de cellules rondes, libres (figure 23 A, B, C). Puis, à forte concentration, les NHDF sont lysés (figure 23D).

Relation concentration – temps d'exposition

Lors de notre étude sur la bioénergétique et la respiration cellulaire nous avons observé que l'effet était différent lorsque les cellules étaient incubées durant 24h en présence de métal et lorsqu'elles ne l'étaient pas. Nous avons alors étudié l'effet des métaux en fonction du temps d'incubation à 2h, 24h et 72h, en utilisant une concentration unique correspondant à l'IC₅₀ mesurée par un test au MTT, pour les comparer.

Les résultats obtenus, reportés dans le tableau suivant, montrent qu'effectivement la viabilité cellulaire décroît en fonction du temps d'incubation.

Tableau 6 : Evolution des IC₅₀ en fonction du temps d'exposition

		2h	24h	72h
IC ₅₀ (mol.L ⁻¹)	Cadmium	$1,03.10^{-3} \pm 1,50.10^{-4}$	$3,42.10^{-5} \pm 7,08.10^{-6}$	$3,08.10^{-5} \pm 2,00.10^{-9}$
	Nickel	$5,04.10^{-2} \pm 6,03.10^{-3}$	$2,53.10^{-3} \pm 2,28.10^{-4}$	$3,03.10^{-4} \pm 5,90.10^{-5}$
	Aluminium	$4,21.10^{-2} \pm 3,72.10^{-3}$	$1,56.10^{-2} \pm 1,41.10^{-3}$	$7,80.10^{-3} \pm 9,78.10^{-4}$

Ces résultats montrent clairement que la cytotoxicité dépend à la fois de la concentration et du temps d'exposition.

Dans ces conditions, pour tenir compte de ces deux paramètres, nous avons émis l'hypothèse de l'applicabilité du modèle de Ten Berge issu de celui de Haber. Selon ce modèle il est possible de définir si la sensibilité d'un individu à un toxique gazeux est principalement due à la concentration ou au temps d'exposition (171). Ce modèle est représenté par la relation suivante :

$$C^n \times t = K$$

où C est la concentration du toxique, t le temps d'exposition, K une constante et n un paramètre chimique supérieur à 0 tel que, si $n > 1$ alors la toxicité d'un élément est marquée plus largement par sa concentration que par le temps d'exposition. A l'inverse, si $n < 1$ la durée d'exposition est un déterminant plus important de la toxicité que la concentration.

L'équation ci-dessus peut s'écrire sous la forme :

$$\ln(C) = \frac{\ln(K)}{n} - \frac{1}{n} \ln(t)$$

Ce modèle appliqué à nos résultats expérimentaux a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure 24. Dans les trois cas – cadmium, nickel et aluminium – nous obtenons des régressions linéaires significatives pour lesquelles la valeur du coefficient directeur correspond à $\frac{1}{n}$. Les valeurs du modèle utilisé sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Paramètres du modèle de Ten berge

	K	n
Cadmium	$3,52 \cdot 10^{-3}$	0,956
Nickel	$2,11 \cdot 10^{-1}$	0,720
Aluminium	$1,79 \cdot 10^{-3}$	2,19

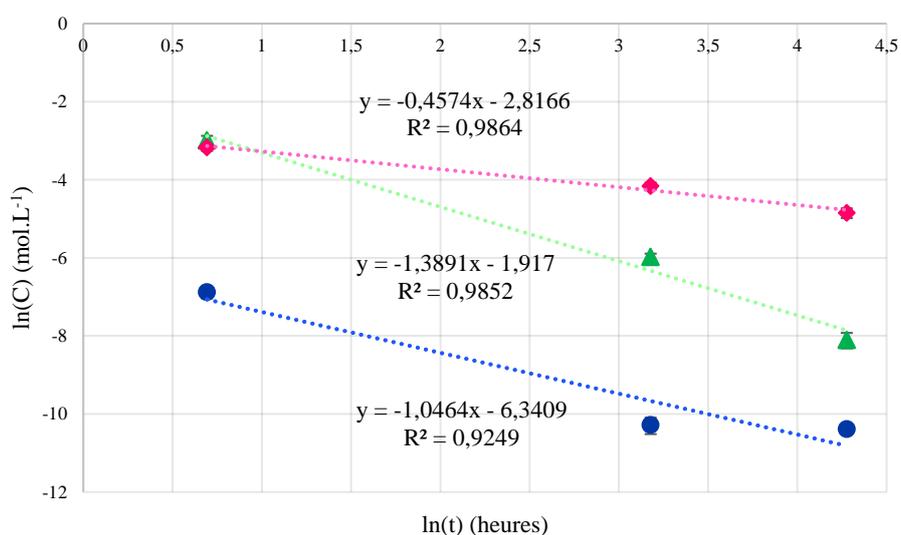


Figure 24 : Evolution des IC_{50} au cours du temps. Les points bleus représentent les IC_{50} du cadmium, en verts les IC_{50} du nickel et en roses les IC_{50} de l'aluminium. Les droites sont le résultat des régressions linéaires de Ten Berge.

Ces résultats nous permettent de montrer qu'en milieu condensé le modèle de Ten Berge établi pour des produits gazeux est applicable.

En outre, les valeurs de n obtenues nous permettent de montrer que pour le cadmium la concentration aurait autant d'effet que le temps d'exposition. Que le temps d'exposition au nickel aurait plus d'effet que sa concentration et enfin que la concentration en aluminium aurait un impact supérieur au temps d'exposition.

Dans ce chapitre, l'étude a porté sur la mesure de la viabilité cellulaire après différents temps de contact avec les métaux. L'effet cytotoxique des métaux est mesuré après 72h d'exposition à des doses croissantes par l'intermédiaire de deux tests colorimétriques permettant d'explorer d'une part, le métabolisme cellulaire et d'autre part, l'intégrité membranaire des cellules. Les résultats obtenus présentent la particularité de mimer un effet hormésis aux faibles concentrations qui a nécessité l'utilisation d'un modèle original pour traiter nos données. Il ressort pour chacun des tests que les trois métaux présentent un effet toxique différent traduit par des IC_{50} différentes permettant de classer leur effet selon : cadmium plus toxique que le nickel, plus toxique que l'aluminium. A ce stade, le cadmium se démarque à nouveau en affichant des IC_{50} proches avec le test au MTT et celui au cristal violet, illustrant un impact tant membranaire que métabolique. Ceci n'est pas le cas des deux autres métaux dont les IC_{50} différentes mesurées par les deux tests, mettent en avant un effet uniquement métabolique.

Les réponses cellulaires semblent influencées par les temps d'exposition. Une illustration de ce phénomène est la similarité des IC_{50} observées entre le cadmium et l'aluminium lors des mesures d'oxymétrie réalisées en temps réel. Or une différence d'un facteur 100 entre leurs IC_{50} s'observe après 72h d'incubation avec chaque métal. L'utilisation de la loi d'Haber-Ten Berge, qui relie le temps d'exposition et la concentration en métal, est une approche originale généralement réservée aux toxiques gazeux. Nous remarquons pourtant que son utilisation sur des toxiques condensés permet de tirer des conclusions.

V- Métaux et Génotoxicité

Dans les précédentes parties nous avons étudié l'effet cytotoxique des métaux en mesurant leurs effets sur la bioénergétique et sur la viabilité cellulaire.

Le nickel et le cadmium sont connus pour être cancérigènes, pour rappel ils sont classés dans le groupe 1 par l'IARC, un doute subsiste pour l'aluminium. Aussi nous avons souhaité poursuivre cette étude en nous intéressant à leur potentiel génotoxique.

Pour cela, nous avons mis en œuvre des méthodes spécifiques telles que le test des comètes et des micronoyaux. Nous avons ensuite réalisé une étude complémentaire dans le but d'approcher leur mécanisme d'action, en étudiant leur interaction avec l'ADN.

C'est pourquoi, dans un premier temps nous présenterons nos résultats relatifs à la génotoxicité, puis dans un second temps, ceux de l'interaction avec l'ADN.

V.1 Matériel et Méthode

V.1.1 Test des comètes

V.1.1.1 Principe

Mis au point par Östling et Johanson (1972) qui lui donnèrent son nom, ce test permet de quantifier le nombre de cassures double brin de l'ADN. Singh et al. (1973) lui apportèrent les modifications nécessaires à la détection de cassures simple brin et des sites alcali-labiles, par dénaturation en milieu alcalin (pH > 13).

Un agent génotoxique peut-être à l'origine de cassures de l'ADN que ce soit de façon directe ou indirecte en empêchant la réparation de l'hélice. Les fragments d'ADN chargés négativement restent emprisonnés dans le noyau cellulaire jusqu'à ce qu'une lyse soit opérée au cours du test des comètes. Le matériel génétique est alors exposé à son environnement constitué d'un gel d'agarose à fines mailles immergé dans un bain d'électrophorèse. Sous l'action du champ électrique engendré lors de l'électrophorèse, l'ADN cassé contenu dans les noyaux cellulaires migre facilement à travers le gel d'agarose alors que l'ADN intact reste figé, incapable de se mouvoir à travers les fines mailles du gel. Lorsque l'électrophorèse est arrêtée, les lames servant de support aux échantillons sont colorées et observées au microscope à fluorescence. On y voit alors des cellules non altérées par l'élément génotoxique, l'ADN intact est resté aggloméré et n'a

pas migré lors de l'électrophorèse : ces cellules sont rondes (figure 25A). Mais on observe également des cellules ayant subi l'action du toxique, elles vont présenter une tête ronde comme dans le cas précédent suivie d'une traine de matière qui contient les fragments d'ADN ayant migrés vers l'anode sous l'action du champ électrique (figure 25B).

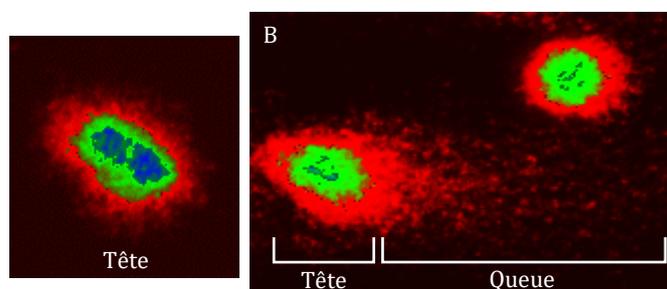


Figure 25: Illustration d'une comète constituée d'une cellule saine en A et d'une cellule lésée en B avec sa queue de fragments d'ADN (MF x250)

V.1.1.2 Protocole opératoire

a. Détermination des concentrations maximales

Suite à l'« *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* » tenu en 1999, un panel d'experts a publié un guide pour la réalisation consensuelle du test des comètes (174). Il y est mentionné que lors de la réalisation du test, « il convient d'exclure les conditions pouvant conduire à des résultats positifs ne reflétant pas la génotoxicité mais étant le produit d'un dommage de l'ADN associé au phénomène de cytotoxicité ». Pour cela les experts conseillent d'éviter les concentrations induisant une diminution de plus de 30% de la viabilité cellulaire. C'est pourquoi nous avons déterminé la viabilité cellulaire des NHDF après 2h d'exposition par un test au MTT et, grâce modèle d'Ewijk-Hoekstra tel que décrit précédemment, nous avons calculé les concentrations inhibitrices à 70% (IC₇₀). Les résultats ainsi obtenus nous ont permis de déterminer les concentrations maximales pouvant être mises en jeu pour réaliser ce test des comètes. Pour le cadmium, cette concentration est de 5.10^{-4} mol.L⁻¹, pour le nickel 5.10^{-2} mol.L⁻¹ et pour l'aluminium 1.10^{-2} mol.L⁻¹.

b. Test des comètes

La réalisation de ce test se déroule en trois étapes principales : J-1, J et J+1.

Etape J-1 :

Les supports accueillant les échantillons cellulaires sont préparés. Il s'agit de lames de microscope en verre recouvertes d'une fine couche d'agarose normal melting point (NMP) à 1,8% (dans du PBS sans ions Ca^{2+} ni Mg^{2+} , ces conditions sont identiques pour toutes les solutions d'agarose préparées). Ces lames doivent sécher 24h à température ambiante.

Une plaque de 24 puits contenant 100 000 NHDF et 1 mL de milieu par puits estensemencée puis laissée incuber 24h.

Etape J :

Les puits contenant les NHDF sont rincés au PBS puis les concentrations croissantes des métaux à tester sont introduites. Deux puits par concentration sont analysés.

Quatre puits sont réservés aux témoins positifs et négatifs. Deux puits serviront de contrôles négatifs et ne contiendront que du milieu cellulaire. Deux autres puits contiendront de la mitomycine C ($0,05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), un agent génotoxique servant de témoin positif. L'incubation est de 2h à 37°C .

Au bout de 2h, le surnageant de chaque puit est aspiré, le lit de NHDF est décollé avec quelques millilitres de trypsine puis le contenu de chaque puits est transféré dans des tubes Eppendorf® une fois la trypsine neutralisée. Les tubes sont alors centrifugés à 2500 rpm pendant 3 minutes.

En parallèle, les lames de microscope sèches sont recouvertes d'une nouvelle couche de de NMP à 0,8 % et laissées pour solidification au réfrigérateur pendant 5 minutes.

En fin de centrifugation, le surnageant est aspiré puis les culots cellulaires sont suspendus dans $75 \mu\text{L}$ d'agarose low melting point (LMP) à 0,5 %.

$75 \mu\text{L}$ de chaque tube sont déposés sur une lame de microscope.

Les lames sont ensuite recouvertes par 75 μL d'agarose LMP, puis laissées sécher à l'air libre quelques minutes. Les cellules sont maintenant emprisonnées dans le gel d'agarose.

La prochaine étape vise à lyser les membranes cellulaires et nucléaires. Pour cela, les lames sont placées pendant 90 minutes à 4°C à l'obscurité, dans une solution de lyse à pH 10 composée de NaCl à 2,5 mol.L⁻¹, d'EDTA à 100 mmol.L⁻¹, de Tris à 10 mmol.L⁻¹, de N-lauroylsarcosine à 1 %, de triton X100 à 1% et de DMSO à 10%.

Après cette étape de lyse, les lames sont immergées dans une cuve d'électrophorèse horizontale (FISHER, type 3) contenant un tampon d'électrophorèse (1 mmol.L⁻¹ EDTA, 300 mmol.L⁻¹ NaOH, pH > 13) visant à dénaturer l'ADN, pendant 20 min à 25°C.

L'électrophorèse est ensuite réalisée pendant encore 20 min (25 V, 300 mA).

Les lames sont rincées 3 fois pendant 5 min avec du tampon Tris (0,4 mol.L⁻¹, pH 7,5), puis déshydratées par trempage dans une solution de méthanol et séchées pendant 12 h à température ambiante.

Etape J+1 :

Chaque lame est colorée avec 50 μL d'une solution de bromure d'éthidium (BET à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) qui se lie à l'ADN et émet ainsi un signal phosphorescent sous lumière UV.

L'observation des lames est réalisée par microscopie à fluorescence (OLYMPUS BH2-RFL) avec un grossissement de 250. Le microscope est muni d'un objectif à immersion Apo/Dplan x 20 UV et est relié à une caméra CDD Cohue de haute sensibilité (0,02 lux). Une carte graphique Matrox Meteor II connecte la caméra à l'ordinateur et permet d'obtenir des images en pseudo-couleurs, en fonction de la quantité d'ADN contenue dans les noyaux.

100 cellules sont observées sur chaque lame. Le logiciel Fenestra Komet (Kinetics Imaging, UK) permet de sélectionner une cellule, c'est-à-dire la tête de la comète et sa traîne lorsqu'elle est présente. Grâce à cette capture le logiciel est capable de calculer 35 paramètres différents dont l'Olive Tail Moment (OTM) qui est le produit du pourcentage d'ADN réparti dans la queue de la comète par la distance entre les barycentres de la tête et de la queue de la comète (175) :

$$\text{OTM} = \% \text{ ADN dans la queue} \times \text{distance entre les barycentres (unités arbitraires)}$$

Traitement des données :

Il a été démontré par Bauer et *al.* que les OTM suivent une distribution statistique selon la fonction χ^2 , avec un profil asymétrique à faibles doses et une distribution tendant vers une loi normale de forme gaussienne pour les fortes doses (176). Ainsi, pour chaque lame, il faut déterminer 40 classes d'OTM entre la valeur maximale et la valeur minimale des OTM calculés. Le témoin positif est utilisé pour calibrer les réponses. Les fréquences normalisées de distribution des OTM sont ensuite calculées par rapport aux classes du témoin.

Les fréquences normalisées obtenues sont traitées par régression non linéaire réalisée au moyen du logiciel TableCurve 2D. La fonction permettant de réaliser cette régression est de la forme :

$$P(\chi^2) = \frac{(\chi^2)^{\frac{n}{2}-1} \times e^{-\frac{1}{2}\chi^2}}{2^{\frac{n}{2}} \times \Gamma\left(\frac{n}{2}\right)}$$

avec $\Gamma\left(\frac{n}{2}\right)$ la fonction gamma :

$$\Gamma\left(\frac{n}{2}\right) = \int_0^{\infty} e^{-t} \times t^{\frac{n}{2}-1} dt$$

où t représente les OTM dont l'intégration permet de déterminer le degré de liberté n , paramètre dont la valeur permet d'évaluer le taux de cassures de l'ADN.

V.1.2 Micronoyaux

Bien que le test des comètes permette de mettre en évidence l'impact d'un élément chimique sur l'intégrité du génome, il ne permet pas toutefois de préciser si les dommages induits seront réparés par la cellule. Le test des micronoyaux est de ce fait un complément pertinent pour évaluer les taux de mutations chromosomiques résultant des dommages à l'ADN détectés par le test des comètes.

V.1.2.1 *Principe*

Le test des micronoyaux, introduit par Boller et Schmid en 1970 (177), est un test de mutagenèse simple à réaliser qui permet de mesurer des mutations chromosomiques de type aneugènes et clastogènes.

Les cellules somatiques eucaryotes se divisent au cours de différentes étapes constituant la mitose¹². Lorsqu'une substance chimique interfère avec l'ADN ou avec les mécanismes mis en jeu lors de la division cellulaire, des chromosomes ou des morceaux de chromosomes peuvent être perdus pendant la division cellulaire. Ces pertes sont alors regroupées au sein d'entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphase¹³ : ce sont les micronoyaux (figure 26). Si un chromosome entier se détache du fuseau mitotique, on parle d'effet aneugène, si seul un ou plusieurs fragments sont rompus il s'agit d'un effet clastogène.

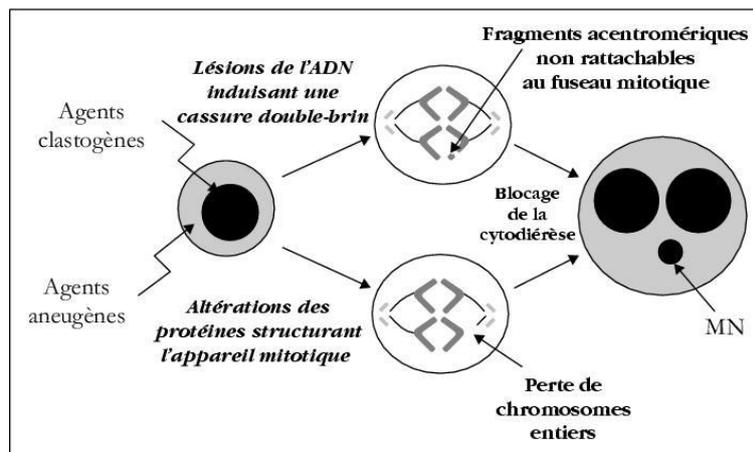


Figure 26 : Illustration de la formation de micronoyaux selon Larmarcovai et al. (203)

La présence de micronoyaux en fin de mitose signifie que le patrimoine génétique cellulaire a été altéré par un agent génotoxique et que les anomalies génétiques sont transmises à la génération suivante.

V.1.2.2 Protocole opératoire

Comme pour le test des comètes, le temps d'exposition au métal est de deux heures et les concentrations déterminées en fonction du pourcentage de viabilité cellulaire après deux heures d'exposition.

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary cells) étant considérées comme des cellules de référence de ce test alors que les NHDF ne le sont pas (178), il nous a semblé pertinent

¹² La *mitose* est un processus au cours duquel une cellule mère se divise et donne naissance à deux cellules filles. Grâce à ce mécanisme la reproduction d'un organisme unicellulaire est possible (200).

¹³ L'*interphase* est l'intervalle, de durée variable, séparant deux mitoses.

d'étudier dans un premier temps l'effet des métaux sur les CHO, puis de poursuivre cette étude sur les NHDF, moyennant une adaptation de protocole.

a. Protocole des cellules CHO

A J1, les cellules sont incubées 24h à 37°C avec 5% de CO₂, dans des chambres de culture de type Lab-tek à raison de 100 000 cellules par puit et 0,5 mL de milieu cellulaire McCoy's 5A.

A J2, les concentrations croissantes en métaux sont ajoutées en duplicata. Les solutions de métaux sont préparées dans du milieu de culture et 0,5 mL sont introduits dans chaque puits. Comme pour le test des comètes, deux puits servant de témoins négatifs contiennent uniquement du milieu de culture et deux autres contiennent un témoin positif de mitomycine C (0,05 µg.mL⁻¹).

Après deux heures d'incubation, les puits sont rincés avec du PBS puis remplis avec du milieu de culture supplémenté avec de la cytochalasine B (3 µg.mL⁻¹), un agent bloquant la cytotérière qui correspond à l'étape d'individualisation des cellules filles par le partage en deux parties du cytoplasme parental. Ceci se traduit par la présence de cellules binucléées observables en microscopie à immersion (figure 27).

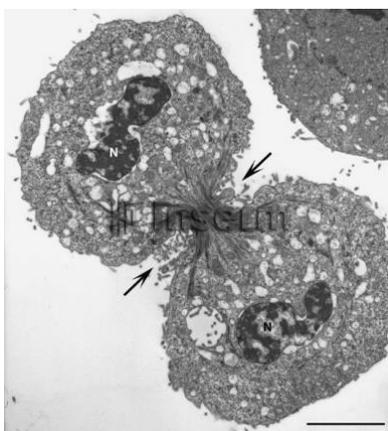


Figure 27 : Exemple d'un kératinocyte en fin de cytotérière. Barre d'échelle = 10 µm. Image provenant de la base d'image Inserm (référence 20129).

A J3, après 21h d'incubation, les CHO sont rincées avec du PBS, puis figées à l'aide de 0,5 mL de méthanol. Enfin, les lames sont colorées pendant 20 minutes avec 10% de Giemsa pour révéler les chromosomes.

b. Protocole des cellules NHDF

En raison de la multiplication plus lente et de la taille plus importante des NHDF, le protocole mis en œuvre pour les CHO a été adapté de la façon suivante :

A J1, les NHDF sontensemencés 24h à 37°C sous 5% de CO₂ dans des boîtes de type Lab-tek à raison de 50 000 cellules par puit et 0,5mL de FBM-2.

A J2, les concentrations croissantes en métaux (en duplicata) et la mitomycine C (0,05 µg.mL⁻¹) pour témoin positif, sont ajoutés.

A J3, les puits sont rincés au PBS et 0,5 mL de FBM-2 contenant de la cytochalasine B (3 µg.mL⁻¹) sont ajoutés. Cette fois-ci, la cytochalasine B reste en contact pendant 48h.

A J5 les cellules sont figées à l'aide de 0,5 mL de méthanol et la coloration des lames au Giemsa (10% pendant 20 min) est réalisée.

c. Dénombrement des micronoyaux

Le dénombrement des micronoyaux nécessite un nombre suffisant de cellules observables en cytodièrese. A cet effet, un index de prolifération, ou en anglais le Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI), est calculé pour chaque condition sur 500 cellules observées en microscopie à immersion (x1000), selon la relation suivante :

$$CBPI = \frac{Mono + 2Bi + 3Multi}{500}$$

avec *Mono* le nombre de cellules mononucléées, *Bi* le nombre de cellules binucléées et *Multi* le nombre de cellules multinucléées.

Seules les valeurs de CBPI supérieures à 1,5 correspondant à une prolifération de plus de 50% sont considérées. Les valeurs inférieures sont rejetées car indicatrices d'une toxicité trop importante.

Dans ces conditions, le taux de micronoyaux obtenu est comparé à celui du témoin négatif par un test du χ^2 . Le résultat est considéré comme positif si au moins une de ces concentrations induit une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules micro-nucléées par rapport au témoin négatif.

V.2 Résultats et Discussion

V.2.1 Test des comètes

Les résultats sont présentés dans la figure 28 ci-dessous :

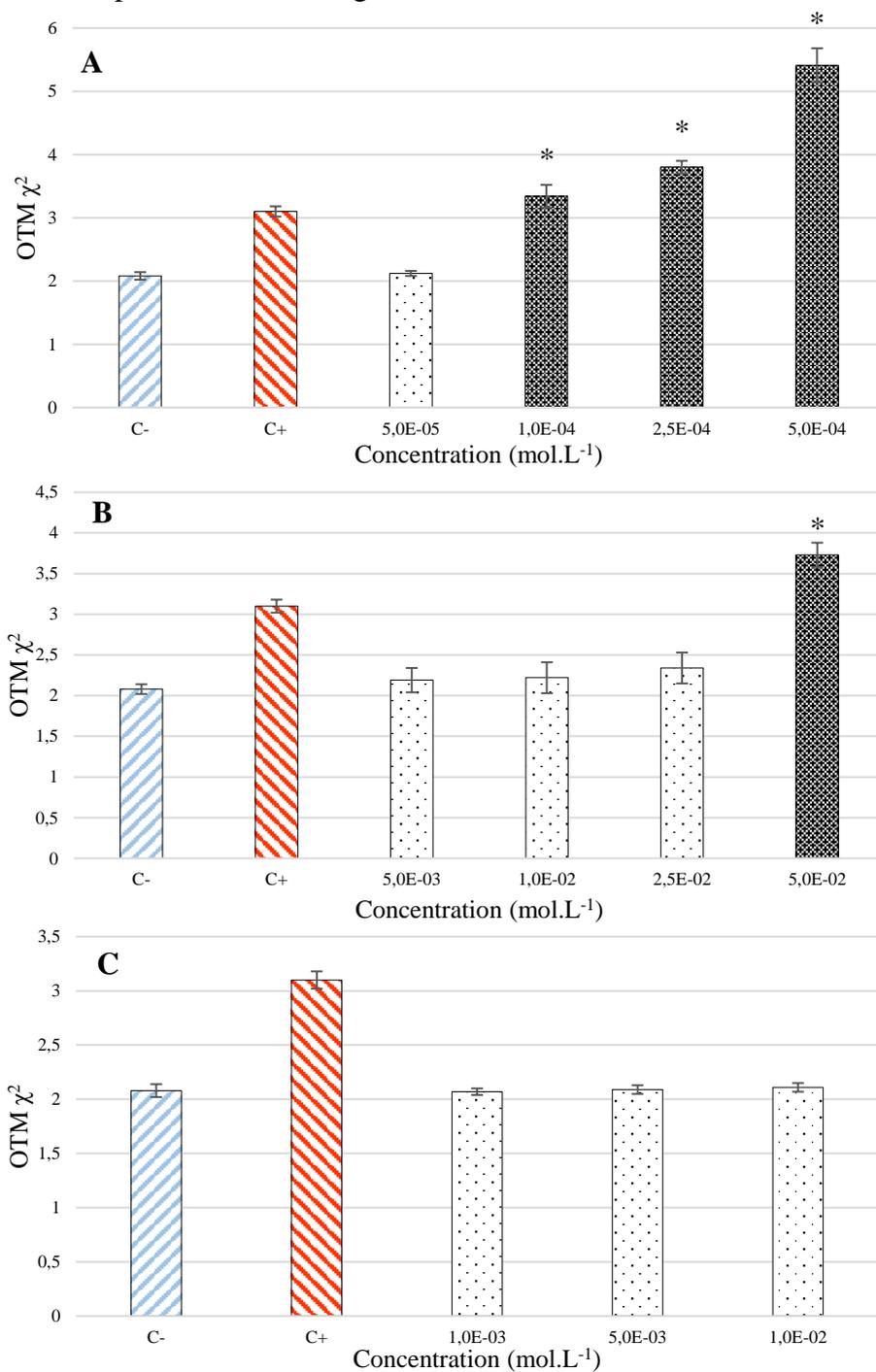


Figure 28 : Effet du cadmium (A), du nickel (B) et de l'aluminium (C) sur l'ADN. Les deux premières barres sont les témoins négatifs (en bleu) et positifs (en rouge). Les résultats significatifs sont représentés par les barres noires surmontées d'une étoile (* $p < 0,001$)

Le cadmium est le métal qui induit le plus de dommages avec l'apparition d'un nombre significatif de comètes dès $1,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (figure 28A).

Le nickel ne présente pas d'effet particulier excepté pour un essai à $5,00 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, une concentration trop élevée pour être pertinente et dont l'effet observé est susceptible de relever de la cytotoxicité (figure 28B).

Si l'on considère que le nickel est à l'origine de cassures de l'ADN, il n'agit pas avec la même intensité que le cadmium. En effet, le cadmium induit des cassures de l'ADN à des concentrations bien inférieures à celles du nickel laissant sous-entendre une action plus délétère de sa part ($1,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ pour le cadmium *versus* $5,00 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ pour le nickel).

En ce qui concerne l'aluminium, nos résultats montrent qu'il n'exerce aucun effet. Ce qui est en accord avec nombre d'études antérieures (144) (145). Toutefois, d'autres auteurs rapportent que l'aluminium est génotoxique (139) (140) (141) (142) (143). Cette controverse peut s'expliquer par les conditions de réalisation des études puisqu'en effet, la spéciation de l'aluminium diffère par exemple selon la valeur du pH. Rappelons qu'à pH 7 la forme dominante à plus de 95% est le complexe $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ (179) (180) (181). Cela marque l'intérêt de préciser, lors des études, l'espèce métallique pouvant être responsable de l'effet observé (182).

V.2.2 Test des micronoyaux

V.2.2.1 *Cellules CHO*

Les résultats sont présentés dans la figure 29 ci-après :

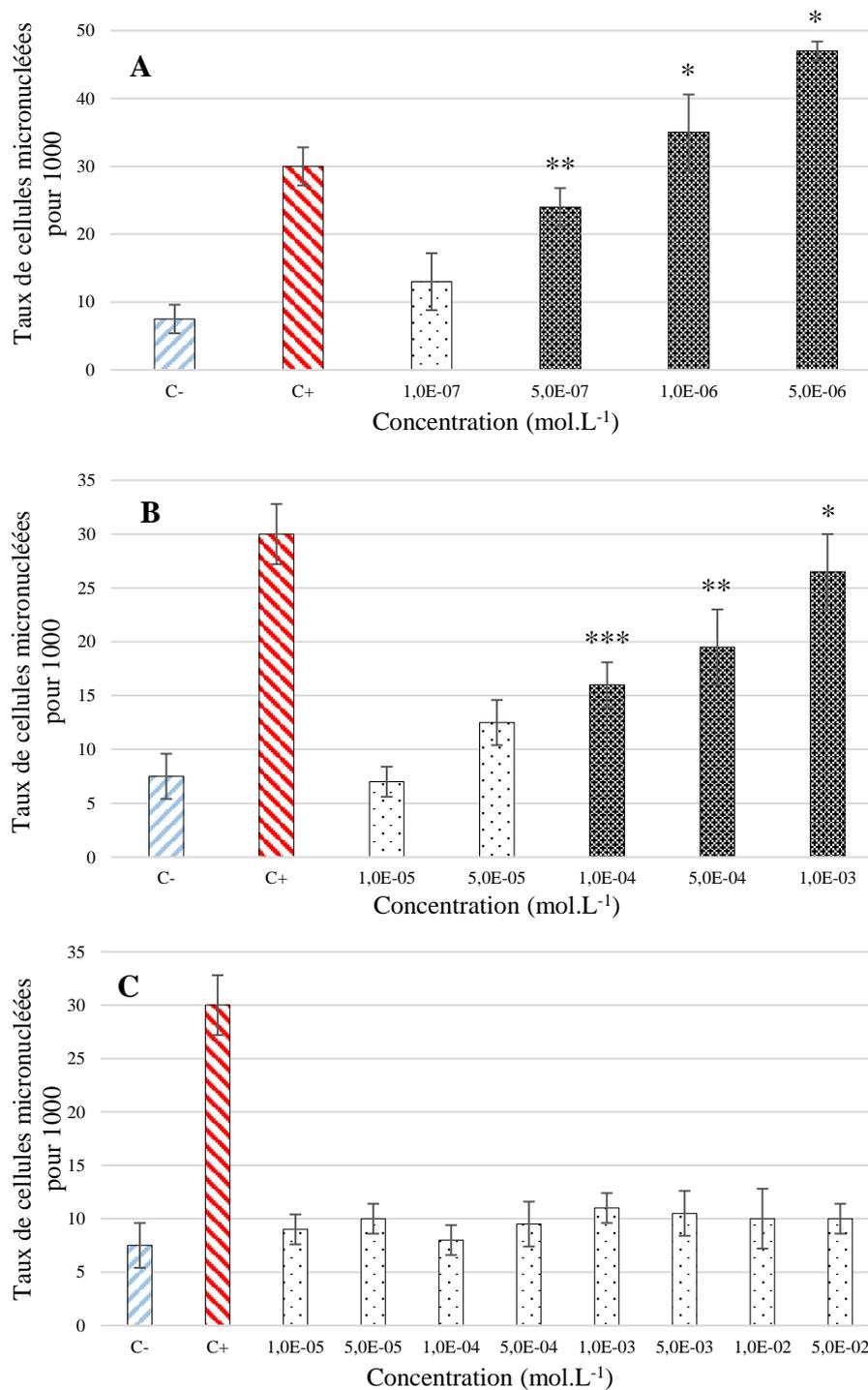


Figure 29 : Effet mutagène du cadmium (A), du nickel (B) et de l'aluminium (C) sur des cellules CHO. Les deux premières barres sont les témoins négatif (en bleu) et positif (en rouge). Les résultats significatifs sont représentés par les barres noires (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,05$) surmontées d'une ou plusieurs étoiles

Comme on peut l'observer, ces résultats sont globalement analogues à ceux des comètes. Ainsi, le cadmium et le nickel induisent une formation significative de micronoyaux alors que l'aluminium est sans effet.

Ces résultats montrant un potentiel mutagène sur les cellules de référence, tout au moins pour le cadmium et le nickel, nous avons donc étudié cette mutagénicité sur les NHDF.

V.2.2.2 Cellules NHDF

Nos résultats, illustrés par la figure 30, montrent clairement que le cadmium et le nickel sont doués d'un effet mutagène. Il est cependant à noter que les concentrations nécessaires pour obtenir un même effet sont supérieures dans le cas des NHDF par rapport aux CHO. Cette différence de comportement peut s'expliquer par la différence de types cellulaires mis en jeu.

L'effet du cadmium est plus marqué que celui du nickel puisque les concentrations en cadmium sont moindres pour observer un effet génotoxique significatif.

Si l'on compare les concentrations auxquelles apparaissent les premières cassures de l'ADN mises en évidence par le test des comètes (figure 28) on peut constater que celles-ci sont de l'ordre de 100 fois supérieures à celles provoquant la formation de micronoyaux (figure 30). Cette constatation a priori paradoxale, peut s'expliquer par les tests mis en œuvre pour cette étude. En effet, le test des comètes met en évidence un effet génotoxique immédiat, c'est-à-dire une interaction directe entre l'agent génotoxique et l'ADN, alors que le test des micronoyaux met en évidence des lésions aussi bien aneugènes que clastogènes, ainsi que des défauts dans l'efficacité des systèmes de réparation. Dans ce contexte, il est possible de penser que le cadmium et le nickel pourraient exercer un effet principalement aneugène, suivi d'un effet clastogène à forte concentration. Notre hypothèse d'un effet principalement aneugène permet de penser que ces métaux pourraient agir sur les différents éléments structuraux et fonctionnels de la cellule liés au métabolisme de l'ADN (183) (127). Toutefois, cette hypothèse ne permet pas d'exclure la possibilité d'une interaction entre le métal et l'ADN. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier *in vitro* cette interaction.

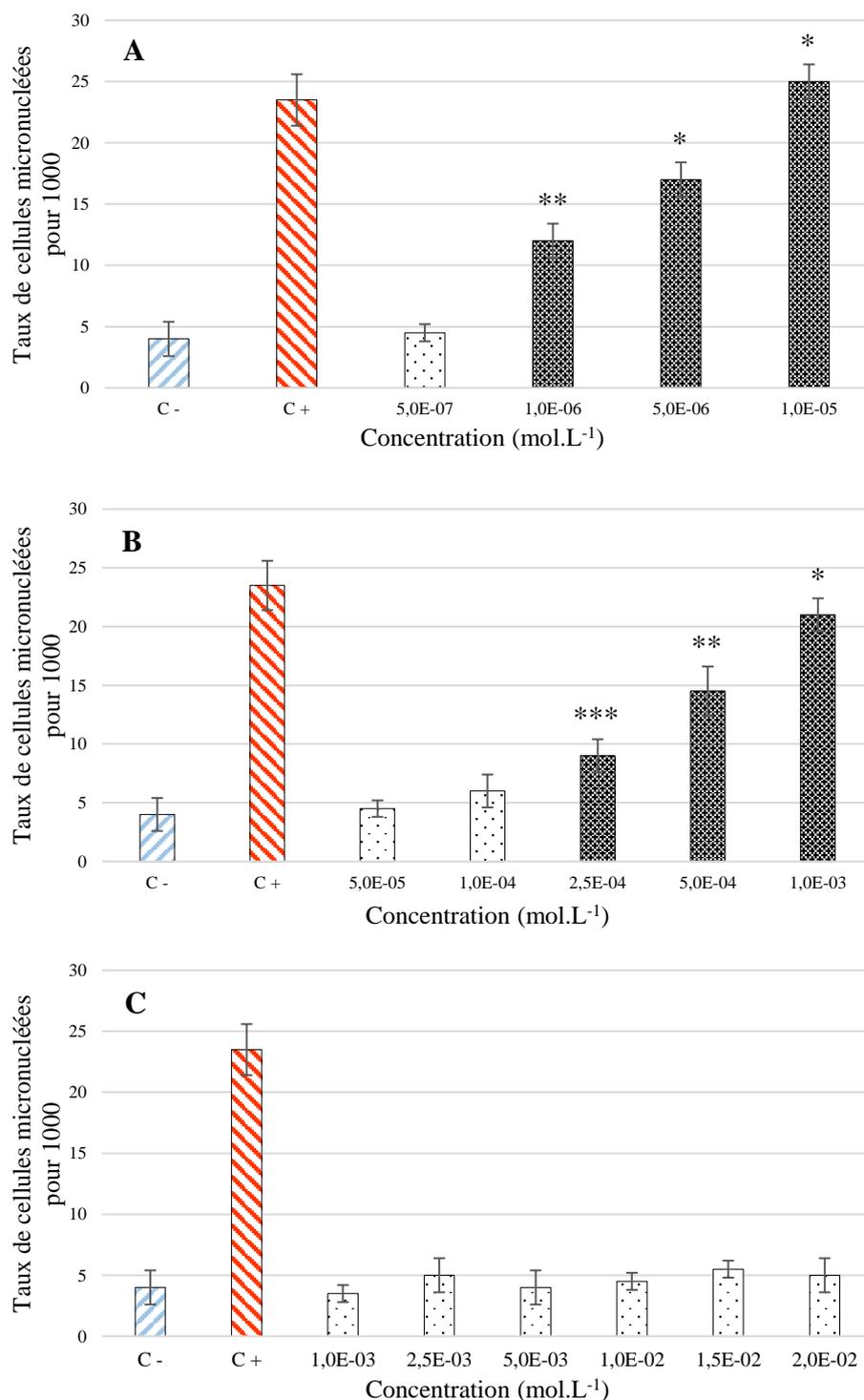


Figure 30 : Impact mutagène du cadmium (A), du nickel (B) et de l'aluminium (C) sur des NHDF. Les deux premières barres sont les témoins négatif (en bleu) et positif (en rouge). Les résultats significatifs sont représentés par les barres noires (* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,05$) surmontées d'une ou plusieurs étoiles

Après avoir étudié l'effet cytotoxique du cadmium, du nickel et de l'aluminium dans la première partie de ce travail, ce chapitre ouvre une seconde partie de l'étude axée sur leur effet génotoxique.

Seuls le cadmium et le nickel présentent un effet génotoxique, ce qui est en lien avec leur effet cancérigène entériné par l'IARC.

Ils sont tous deux à l'origine de la production de comètes et de micronoyaux. Cependant, les concentrations responsables de l'effet varient d'un facteur 100 entre ces deux tests ce qui permet de penser qu'ils sont principalement responsables d'un effet aneugène plus que clastogène. Leur action serait donc plutôt centrée sur les éléments structuraux et fonctionnels liés au métabolisme de l'ADN que sur l'ADN en lui-même. Bien qu'étant peu probable, ces résultats ne permettent pas d'exclure une action directe de ces métaux sur l'ADN, c'est pourquoi le prochain chapitre aura pour objectif d'analyser l'interaction entre les métaux et la molécule d'ADN.

VI- Mesure de l'interaction métal/ADN

VI.1 Principe

L'étude de l'interaction entre un métal et l'ADN est réalisée avec un microcalorimètre isotherme actif (ITC200 instrument ; Microcal[®], Northampton, USA) aussi appelé microcalorimètre Tian-Calvet à compensation, dont nous rappelons ici le principe.

Cette technique, outre sa précision permet de déterminer la constante de liaison (K_A), la stœchiométrie (n), et les paramètres thermodynamiques, que sont l'enthalpie (ΔH°) et l'entropie (ΔS°) de la réaction (184) (185).

Comme dans le cas d'un microcalorimètre diatherme passif, l'ITC présente deux chambres, une de référence et une de mesure, au contact d'une thermopile (figure 31). La différence entre un microcalorimètre diatherme passif et un microcalorimètre diatherme actif tient du fait que la chambre de mesure sera maintenue, par effet Pelletier, à la même température que la chambre de référence tout au long de la réaction. C'est la puissance nécessaire au maintien d'un différentiel de température nul qui sera utilisée pour déterminer les échanges thermiques générés.

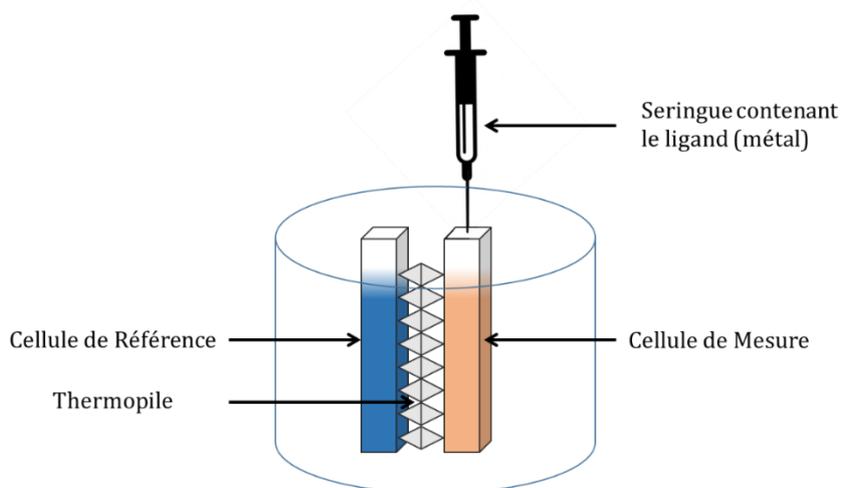


Figure 31: Schéma d'un microcalorimètre diatherme actif de type ITC200

VI.2 La mesure

La solution d'ADN est obtenue en dissolvant de l'ADN de sperme de saumon (Sigma-Aldrich®) dans une solution de tampon TRIS ($5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ pour pH 7) ou MES ($5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ pour pH 4) de façon à obtenir une concentration finale de $2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹.

Les solutions de métal sont obtenues par dissolution de sels de chlorure de cadmium, de nickel ou d'aluminium, dans le même tampon que celui utilisé pour préparer la solution d'ADN. Les concentrations sont de $8 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ pour l'aluminium et de $1 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ pour le cadmium et le nickel. Leur pH est ajusté aux mêmes valeurs que celui de la solution d'ADN à l'aide de soude ou d'acide chlorhydrique concentrés.

La solution d'ADN (200µL) est introduite dans la cellule de mesure de l'ITC 200 thermostatée à 37°C. Des aliquots de solutions de métal de 1,3 µL sont injectés toutes les 90 secondes dans la cellule de mesure au moyen d'une seringue automatique. Un total de 30 injections est réalisé de manière à saturer l'ADN.

Chaque injection se traduit par une variation de chaleur compensée par la thermopile correspondant à la formation du complexe enregistré sous la forme d'un thermogramme (figure 32A). Si la réaction de complexation est exothermique, la puissance est utilisée pour refroidir la chambre de mesure, ce qui se traduit par un signal négatif sur le thermogramme. A contrario, si la réaction est endothermique, la puissance apportée sert à augmenter la température et le signal obtenu sera positif.

L'intégration des pics du thermogramme grâce au logiciel de traitement de données Origin®, conduit à l'isotherme d'interaction (figure 32B) représentant la variation d'enthalpie en fonction du rapport molaire métal/ADN. Cet isotherme permet de déterminer les paramètres de la réaction que sont, rappelons-le, l'enthalpie (ΔH°) et l'entropie (ΔS°) de la réaction ainsi que la constante d'affinité (K_A) et la stœchiométrie (n).

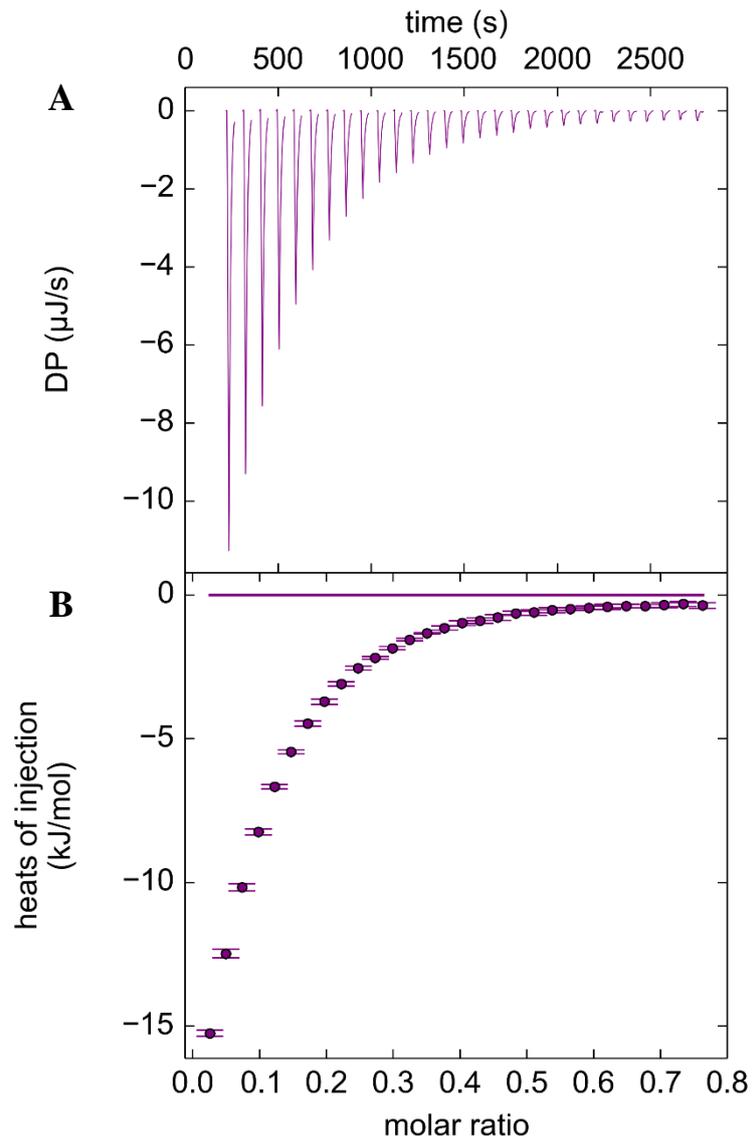


Figure 32: A titre d'exemple, Thermogramme (A) et Isotherme d'interaction (B) de l'interaction entre le nickel et l'ADN en présence de NaCl à 10 mmol.L^{-1} .

VI.3 Résultats et Discussion

Les résultats obtenus, dont un exemple est illustré par la figure 32, nous ont amenés à considérer des études d'interaction antérieures (186). D'après elles, les cations métalliques interagissent avec les groupements phosphate de l'ADN mettant en jeu des liaisons électrostatiques avec une stoechiométrie fractionnaire. En outre, lors de cette interaction il est constaté une apparente coopérativité négative entre les ligands et les récepteurs, appelée entropie de résistance à la saturation. La liaison du métal aux groupements phosphates a pour effet de diminuer la densité de charges négatives disponibles entraînant une progressive diminution de l'affinité. Dans ce contexte, les thermogrammes que nous avons obtenus ont été analysés selon le modèle de McGhee von Hippel (187).

Dans ce modèle, l'ADN est considéré comme un réseau monodimensionnel dans lequel les phosphates jouent un rôle de sites de liaison. Chaque cation métallique lié bloque l'accès à un nombre L de phosphate reflète de la taille et de la charge de ce cation.

Ainsi, la saturation de l'ADN par les cations est définie selon la relation :

$$\theta = \frac{[M^{L+}]_b}{[P^-]_t}$$

où $[M^{L+}]_b$ représente la concentration en cations liés (mol.L^{-1}), $[P^-]_t$ la concentration totale en groupement phosphates de l'ADN (mol.L^{-1}) et avec $0 \leq \theta \leq \frac{n}{L}$.

θ et K_A sont déterminés par itération à partir de l'équation suivante :

$$([M^{L+}]_t - \theta \cdot [P^-]_t) \cdot (n - L \cdot \theta)^L - \frac{\theta \cdot (n - \theta \cdot (L - 1))^{(L-1)}}{K_A} = 0$$

où $[M^{L+}]_t$ représente la concentration en cations totale (mol.L^{-1}), K_A la constante d'affinité, L le nombre de phosphate et n la stoechiométrie avec $n = 1$ correspondant à la charge négative d'un groupement phosphate.

La chaleur pour chaque injection est calculée selon :

$$q_i = \frac{\partial \theta}{\partial A} \Delta H^\circ$$

Avec A le rapport $\frac{[M^{L+}]_t}{[P^-]_t}$

Le traitement de nos données expérimentales par régression non linéaire selon l'algorithme de Levenberg-Marquardt permet ainsi de déterminer les valeurs de L , K_A et ΔH° . L'entropie ΔS° est calculée classiquement selon :

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ + R \cdot T \cdot \ln K_A}{T}$$

où T est la température en Kelvin et R la constante universelle des gaz parfaits ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

Le traitement de nos valeurs expérimentales selon le modèle de McGhee von Hippel conduit aux résultats présentés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction à 37°C, (pH = 7 dans tampon TRIS ou pH = 4 dans tampon MES) avec une concentration en NaCl de 0.150 mol.L⁻¹ et n = 1

Métal	pH	L	K _A (L.mol ⁻¹)	ΔH°(kJ.mol ⁻¹)	ΔS°(J.K ⁻¹ mol ⁻¹)	R ²
Cd ²⁺	7	6,7 ± 0,4	57 ± 4	-24,4 ± 1,2	33,5 ± 11,5	0,993
Ni ²⁺	7	6,5 ± 0,2	26 ± 3	-20,3 ± 0,9	27,0 ± 9,1	0,999
Al ³⁺	7	NL	NL	NL	NL	NL
Al ³⁺	4	3,4 ± 0,1	2021 ± 57	8,4 ± 0,4	63,3 ± 33,6	0,999

NL = non lié

Le cadmium et le nickel, à pH 7, montrent une faible affinité pour les groupements phosphates de l'ADN. Toutefois celle du cadmium est supérieure. Ceci peut s'expliquer par la plus faible solubilité des complexes Cd₃(PO₄)₂ formés comparativement aux complexes Ni₃(PO₄)₂, différence de comportement déjà été observée dans d'autres études (188). Les variations négatives d'enthalpies obtenues, sont en faveur d'une liaison de type électrostatique. De même, les variation d'entropies sont en faveur de la formation de complexes.

En ce qui concerne l'aluminium, à ce même pH, aucune liaison n'a pu être mise en évidence. Ce résultat est en bon accord avec les observations de Wu et al (189). En raison de la prédominance de l'aluminium sous la forme [Al(OH)₄]⁻ à pH 7 et Al³⁺ en milieu

acide, l'interaction a été menée pour ce métal, à pH 4. Dans ce cas, nos résultats montrent que l'aluminium interagit avec l'ADN ce qui prouve que seule la forme Al^{3+} interfère.

Afin de comparer plus finement l'interaction de ces métaux avec l'ADN, une étude complémentaire a été menée à différentes concentrations en NaCl (0 à $1,5 \cdot 10^{-1}$ mol.L⁻¹) à pH 7 pour le cadmium et le nickel et à pH 4 pour l'aluminium.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 33 représentant la variation du logarithme népérien de la constante d'affinité en fonction du logarithme népérien de la concentration en NaCl. Ils montrent que la constante d'affinité diminue linéairement en fonction de l'augmentation de la concentration en NaCl. Ce phénomène caractérise la liaison de type électrostatique de l'interaction (190) (191).

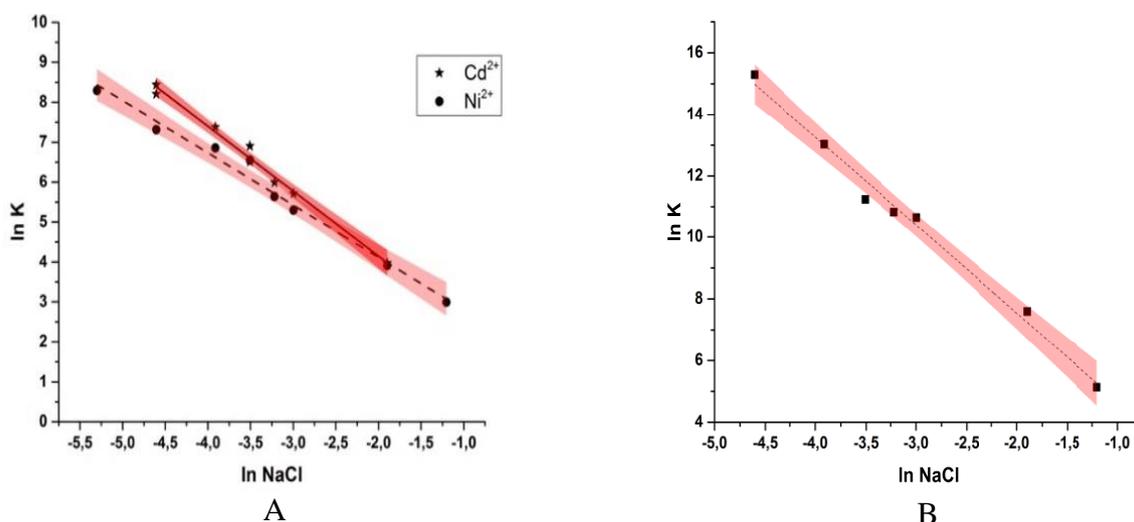


Figure 33 : Variation de la constante d'affinité de la liaison métal/groupements phosphate de l'ADN en fonction de la force ionique. Les droites solides ou en pointillés représentent le modèle linéaire de l'interaction : Cd^{2+} et Ni^{2+} sur la figure A (pH 7) et Al^{3+} sur la figure B (pH 4)

Dans le cas de l'aluminium, la valeur du coefficient directeur de la droite égal à $2,86 \pm 0,13$ (figure 33B) indique que la liaison anion-aluminium nécessite le déplacement de 2,86 charges positives.

En revanche, les quantités de charges déplacées dans le cas du cadmium et du nickel sont respectivement de $1,63 \pm 0,07$ et $1,38 \pm 0,07$. Le nombre de charge supérieur pour le cadmium confirme la plus forte affinité de ce cation par rapport au nickel. Ces valeurs sont dans la même gamme que celles observées lors d'une liaison entre l'ADN et des

espèces cationiques, c'est-à-dire $0,88.z$ (où z représente la valence du ligand) (192) (193) (194).

Enfin, dans le cas du cadmium, lorsque la concentration en NaCl est inférieure à 5.10^{-3} mol.L⁻¹, une condensation et une agrégation de l'ADN semble se produire. Ce phénomène peut être expliqué par la saturation des charges négatives des phosphates par le cation Cd²⁺ (195). Ainsi, afin de confirmer cette hypothèse, l'interaction cadmium-ADN a été réalisée avec une concentration inférieure à 5.10^{-3} mol.L⁻¹. Les résultats obtenus, illustrés par la figure 34, montrent que pour un ratio molaire Cd²⁺/ADN-P < 0,2, les chaleurs pour chaque injections sont exothermiques, ce qui est représentatif de l'interaction. Pour un ratio supérieur à 0,2, les chaleurs obtenues sont endothermiques. Ce phénomène thermique qui s'annule, dans nos conditions expérimentales, pour un ratio égal à 0,2, caractérise la condensation de l'ADN. Cette valeur a déjà été observée lors d'étude d'électrophorèse mentionnant une stœchiométrie de Cd²⁺/ADN de 1/5 (soit 0,2) (196). Dans le cas du nickel (résultats non rapportés), ce phénomène ne s'observe pas. Ceci peut-être dû à la moindre interaction de ce métal par rapport au cadmium, tel que nous l'avons démontré. En outre, cette absence d'interaction est en bon accord avec une étude en spectroscopie UV (197).

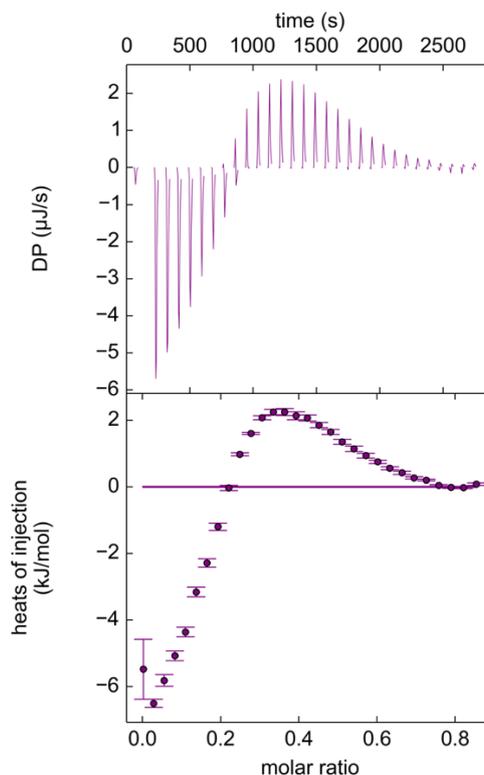


Figure 34 : Courbe de titration isotherme de Cd²⁺ se liant à l'ADN à 37°C à pH 7 avec une concentration en NaCl inférieures à 5.10^{-3} mol.L⁻¹. La courbe du haut représente le flux thermique en fonction du temps, celle du bas, la chaleur en fonction du ratio molaire Cd²⁺/ADN-P (201)

En résumé, nos résultats obtenus par microcalorimétrie montrent que seuls les ions cadmium et le nickel à pH 7, interagissent avec l'ADN. Les liaisons impliquées sont de types électrostatiques avec des affinités différentes que l'on peut rapprocher des résultats de notre étude de génotoxicité. En effet, le métal le plus génotoxique (cadmium) présente la plus forte affinité. Le nickel, moins génotoxique, a une affinité moindre et l'aluminium non génotoxique, n'interagit pas avec l'ADN.

La nature électrostatique de l'interaction d'une part, et le phénomène de condensation observé avec le cadmium d'autre part, laissent à penser que les métaux pourraient être la cause d'un déséquilibre structural de l'ADN permettant à d'autres éléments tels que les ROS de l'oxyder (202).

Par ailleurs, Filipic (199) a pu démontrer que le cadmium engendre un déséquilibre oxydatif responsable de dommages sur l'ADN. Il altérerait la réparation de l'ADN en se fixant sur des protéines clés possédant des domaines en doigts de zinc riches en cystéines, et perturberait le cycle cellulaire en bloquant les cellules dans une phase ou encore en bloquerait l'entrée en apoptose. Pour toutes ces raisons nous avons recherché le rôle des ROS sur les NHDF. Pour cela nous avons utilisé un piègeur de ROS, la N-AcétylCystéine (NAC) couplé à une coloration au cristal violet afin de comparer la viabilité des NHDF en présence et en l'absence de ROS.

VII- Effets des ROS sur le métabolisme des cellules NHDF

VII.1 Principe

La N-Acétylcystéine ou NAC est un acide aminé synthétique qui possède un groupement thiol susceptible de s'oxyder (formation d'un dimère) en présence de donneurs d'électrons tels que des radicaux libres (figure 35). La NAC peut donc agir directement avec les ROS du milieu mais elle sert également de précurseur de la cystéine et du glutathion, un antioxydant intracellulaire naturel dont elle augmente la synthèse (198).

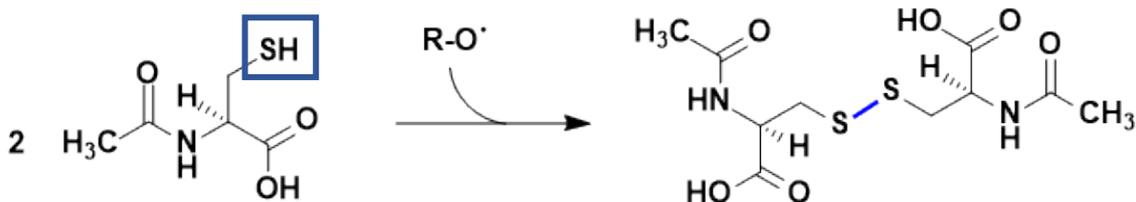


Figure 35 : Réaction d'oxydation de la N-acétylcystéine. Encadré en bleu, le groupement thiol

La NAC est donc apte à piéger les ROS. Pour cette raison, en considérant que les métaux entraînent la formation de ROS responsables d'une diminution de la viabilité cellulaire, l'ajout de NAC a pour effet de neutraliser les ROS ainsi produits et de restaurer la viabilité cellulaire.

VII.2 Protocole

Chaque métal est étudié de la façon suivante : une plaque de 96 puits contenant 3000 NHDF par puit recouverts de 150 μL de milieu FBM-2 est préparée. Les concentrations en métal sont : $2 \cdot 10^{-6}$ à $1 \cdot 10^{-3}$ mol.L^{-1} pour le cadmium, $1 \cdot 10^{-5}$ à $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L^{-1} pour le nickel et de $1 \cdot 10^{-5}$ à $4 \cdot 10^{-2}$ mol.L^{-1} pour l'aluminium. Une même concentration est ajoutée dans 6 puits différents ; 3 puits en absence de NAC et 3 puits supplémentés d'une solution aqueuse de NAC à $5 \cdot 10^{-3}$ mol.L^{-1} . Enfin, 6 puits sont supplémentés avec la solution de NAC seule, le reste des puits servent de témoins. Après 72h d'incubation à 37°C et 5% de CO_2 , la viabilité cellulaire est déterminée par un test au cristal violet (voir détails du test partie cytotoxicité). Pour le cadmium, 5 expériences indépendantes ont été conduites, pour le nickel et l'aluminium 4.

Les moyennes des viabilités cellulaires entre les NHDF seuls en présence et en absence de NAC sont comparées. De même que les moyennes des viabilités cellulaires en

présence de métaux, avec et sans NAC, sont comparées. Ces différences de moyennes sont évaluées par un test de Student unilatéral avec une significativité de $p < 0,05$, les deux hypothèses suivantes sont posées :

- H_0 : l'hypothèse nulle, il n'y a pas de différence significative entre la viabilité cellulaire en présence de NAC et celle en absence de NAC.

- H_1 : il existe une différence significative entre la viabilité cellulaire en présence de NAC et celle en absence de NAC.

Si l'hypothèse H_1 est acceptée alors la NAC a un effet statistiquement significatif sur la viabilité cellulaire.

VII.3 Résultats et discussion

Nos résultats ne montrent aucune différence significative de viabilité cellulaire lorsque les NHDF sont en présence de NAC.

Aucune différence significative n'est observée avec l'aluminium en présence et en l'absence de NAC.

Les résultats du cadmium, présentés en figure 36, montrent qu'à faible concentration $2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹, la présence de NAC n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que les faibles concentrations en cadmium sont insuffisantes pour induire une production de ROS pouvant altérer cette viabilité. Pour des concentrations plus élevées, $2,5 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, la présence de NAC a pour effet de restaurer significativement la viabilité cellulaire. Ce résultat est en bon accord avec ceux de Filipic (199) et permet de conclure à l'implication du cadmium dans la production de ROS. Enfin, pour des concentrations supérieures à $5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ la NAC n'a pas d'effet bénéfique, probablement en raison d'une production de ROS plus importante et pour laquelle le rôle protecteur de la NAC n'est plus suffisant.

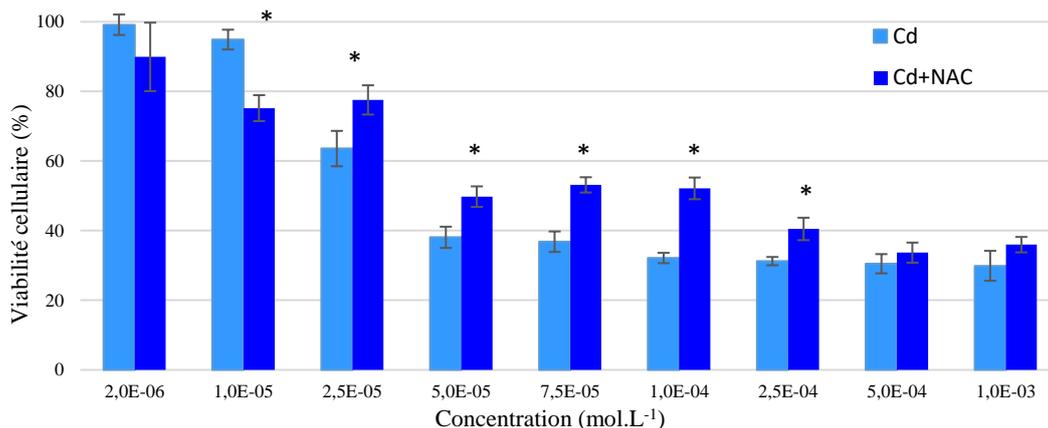


Figure 36 : Diagramme de viabilité cellulaire après 72h d'exposition des NHDF au cadmium avec et sans NAC (n=5) * $p < 0,05$. Les barres correspondent à l'erreur type de la moyenne.

En ce qui concerne le nickel, comme illustré en figure 37, les résultats obtenus sont paradoxaux. En effet, en absence de NAC la viabilité cellulaire diminue lorsque la concentration en métal augmente. En présence de NAC il apparait non seulement que la viabilité n'est pas restaurée comme on pourrait s'y attendre, mais en plus, la viabilité diminue de façon plus importante qu'en présence de nickel seul.

Ceci permet de déduire que les ROS ne sont probablement pas impliqués dans l'effet du nickel et laissent à penser que la NAC agit en synergie avec ce métal.

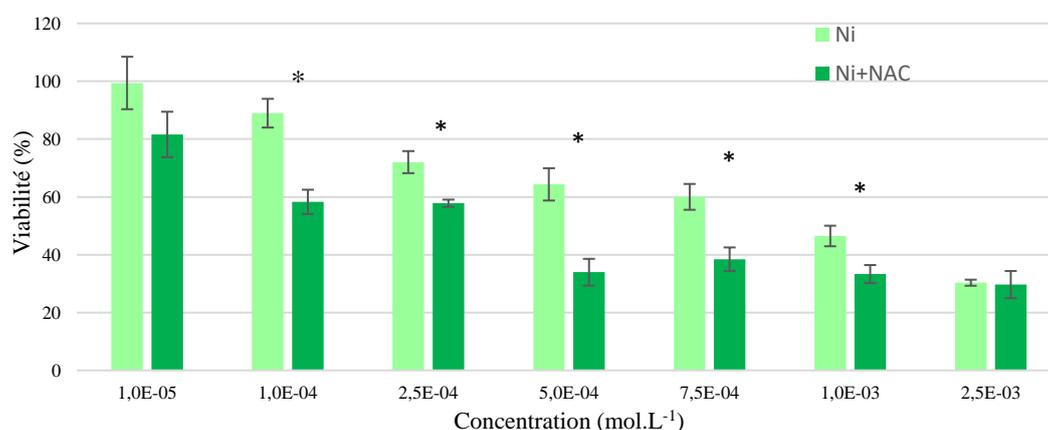


Figure 37 : Diagramme de viabilité cellulaire après 72h d'exposition des NHDF au nickel avec et sans NAC (n=4) * $p < 0,05$. Les barres correspondent à l'erreur type de la moyenne.

Ces résultats montrent que le nickel et l'aluminium, à la différence du cadmium, exercent un effet délétère sur les NHDF selon un mécanisme d'action différent qui reste à élucider.

La viabilité cellulaire mesurée en présence et en l'absence de NAC après exposition à différents métaux montre des résultats différents.

En effet, comme attendu l'association de NAC à du cadmium conduit à une augmentation de la viabilité cellulaire, ce qui n'est pas le cas de l'aluminium et du nickel. Si la présence de NAC avec de l'aluminium ne conduit à aucune modification, l'association avec le nickel conduit elle à une surprenante altération de la viabilité cellulaire.

Ces résultats permettent de conclure que les ROS sont impliqués dans le mécanisme d'action du cadmium mais pas dans celui de l'aluminium.

Conclusion générale et Perspectives

Au cours de ce travail, une étude comparative du cadmium, du nickel et de l'aluminium, sur un modèle cellulaire commun, a été réalisée en mettant en œuvre des méthodologies transversales et complémentaires aussi bien physico-chimiques que biologiques.

Le cadmium, métal de référence de ce travail, est plus toxique que le nickel et l'aluminium. Il altère la bioénergétique des fibroblastes en inhibant le métabolisme du glucose et la respiration cellulaire. Sa cytotoxicité s'exerce aussi bien par une altération du métabolisme que de la membrane cellulaire. En outre, sur ce modèle, son effet paraît autant dépendant de sa concentration que de la durée d'exposition.

Conformément à son effet cancérigène nous avons montré que son effet est principalement aneugène et, à forte concentration, clastogène. L'approche du mécanisme d'action montre qu'il interagit avec les groupements phosphate de l'ADN et peut entraîner une condensation de ce dernier.

La toxicité du nickel apparaît comme intermédiaire sur les NHDF. A la différence du cadmium, ce métal ne perturbe pas le métabolisme du glucose alors qu'il inhibe la respiration cellulaire. De plus, nous avons montré l'induction d'un découplage entre cette respiration et le métabolisme du glucose qui apparaît temps dépendant. La cytotoxicité est imputée à une altération du métabolisme cellulaire, et cet effet est plutôt dû au temps d'exposition qu'à sa concentration. Comme le cadmium, le nickel induit un effet aneugène et dans une moindre mesure, clastogène. Toutefois ces effets sont révélés à des concentrations plus élevées. Il interagit également avec les groupements phosphate de l'ADN sans toutefois entraîner une condensation.

Le métal le moins toxique de notre étude est l'aluminium. Même s'il altère la bioénergétique cellulaire, sa cytotoxicité est beaucoup moins marquée que celle induite par le nickel et le cadmium. Il ne semble pas exercer d'effet génotoxique et n'interagit pas avec l'ADN ou ses groupements phosphates à pH 7.

Notre étude montre qu'au niveau cellulaire les trois métaux ont pour point commun d'altérer la bioénergétique cellulaire dans des domaines de concentration différents. De même, leur cytotoxicité diffère par leur puissance d'action caractérisée par des IC₅₀ différentes. En outre, il apparaît clairement que leur mécanisme d'action n'est pas nécessairement le même puisque leur effet est soit concentration dépendante, soit temps dépendant, soit les deux à la fois. Concernant la génotoxicité, seuls le cadmium et le

nickel exercent un effet à ce niveau, et là encore ils diffèrent par les concentrations mises en jeu.

Enfin, le faible effet observé pour l'aluminium, voire l'absence d'effet, permet à notre étude de soulever la question de la prise en compte de la spéciation des métaux. En effet, à pH physiologique il faut considérer que l'aluminium est très majoritairement sous forme $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ alors que le cadmium et le nickel sont sous formes ioniques. Il est donc possible que l'apparente innocuité de l'aluminium puisse être reliée à cette espèce complexée majoritaire. Même pour les espèces cationiques Cd^{2+} et Ni^{2+} il est possible de se demander si elles agissent directement sur leur cible ou si leur effet est par exemple, lié à la formation d'un complexe avec des espèces chimiques intracellulaires.

Il apparaît ainsi que la compréhension plus précise du mécanisme d'action des métaux constitue un challenge impliquant l'étude de leur spéciation au niveau intracellulaire.

Bibliographie

1. Sixième programme d'action pour l'environnement. Union Européenne. 2001.
2. Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning; a clinical and experimental study. Friberg, L. 1-124, s.l.: Acta Med Scand Suppl, 1950, Vol. 240.
3. Proteinuria and emphysema among workers exposed to cadmium and nickel dust in a storage battery plant. Friberg, L. [éd.] J. Wright and Sons. London: s.n., 194. Proceeding of the IXth International Congress of Industrial Medicine. pp. 641 - 644.
4. El Azzouzi, R. A Nersac en Charente, le combat des «contaminés du cadmium». Mediapart. 2013.
5. Barral, A L. Pollution à l'arsenic dans le Gard : des parents de jeunes enfants portent plainte. France Info. [En ligne] 25 Février 2016. [Citation : 08 Juin 2016.] <http://www.franceinfo.fr/actu/justice/article/saint-felix-de-pallieres-des-habitants-contamines-portent-plainte-769511>.
6. Cadmium & its adverse effects on human health. Bernard, A. 2008, Indian J Med Res, Vol. 128, pp. 1549-1559.
7. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioral disorders in children: A systematic review and meta-analysis. Rodríguez-Barranco, M, et al. 2013, Sci Total Environ, Vol. 554-555, pp. 562–577.
8. Miquel, G. RAPPORT sur LES EFFETS DES MÉTAUX LOURDS SUR L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTÉ. Senat.fr. [En ligne] 06 Avril 2001. [Citation : 08 Juin 2016.] <http://www.senat.fr/rap/100-261/100-2611.pdf>.
9. Cadmium Toxicity. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). [En ligne] 12 Mai 2008. [Citation : 08 Juin 2016.] <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cadmium/docs/cadmium.pdf>.
10. Cadmium in Blood and Urine—Impact of Sex, Age, Dietary Intake, Iron Status, and Former Smoking—Association of Renal Effects. Olsson, I M, et al. 2002, Environ Health Persp, Vol. 112, pp. 1185-1190.
11. VLEP, Mission permanente. Evaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail Cadmium et ses composés. Anses.fr. [En ligne] 12 Décembre 2013. [Citation : 12 Juin 2016.]

https://www.anses.fr/fr/system/files/VLEP_ConsultationAval_cadmium_2007sa0425.pdf.

12. Cadmium in food. Alexander, J, et al. 2009, The EFSA journal, Vol. 980, pp. 1-139.

13. Bisson, M et Houeix, N. Cadmium et ses dérivés. INE RIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. [En ligne] 04 07 2014.

[Citation : 12 06 2016.]

[https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=](https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjh-)

[bXz7KLNahUEuhoKHQctACYQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ineris.fr%2Fsubstances%2Ffr%2Fsubstance%2FgetDocument%2F2725&usg=AFQjCNHotHcVc3pvwh-Y9JqLeq1I6MOtIg&sig2=9NrWWa](https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjh-bXz7KLNahUEuhoKHQctACYQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ineris.fr%2Fsubstances%2Ffr%2Fsubstance%2FgetDocument%2F2725&usg=AFQjCNHotHcVc3pvwh-Y9JqLeq1I6MOtIg&sig2=9NrWWa).

14. Agence de l'eau Adour-Garonne. Le cadmium dans le bassin Adour-Garonne. Etablissement public du ministère du développement durable. 2015.

15. La pollution au cadmium diminue dans la rivière Lot. Portail santé et environnement Aquitaine Limousin Poitou-Charentes. [En ligne] 30 01 2015. [Citation : 26 09 2016.]

<http://www.santeenvironnement-aquitaine.fr/eaux/la-pollution-au-cadmium-diminue-dans-la-riviere-lot/>.

16. IARC. Nickel and nickel compounds. Monographs 100 C. World Health Organization, Lyon. [En ligne] 2012. [Citation : 20 08 2016.]

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C.pdf>.

17. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Fiche 12 : Evaluation des risques sanitaires liés au dépassement de la limite de qualité du nickel dans les eaux destinées à la consommation humaine. [En ligne] 2005.

[Citation : 20 08 2016.] <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2004sa0068Ft.pdf>.

18. Toxicological Profile for Nickel. ATSDR. 2005, Atlanta, GA: US Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

19. Seasonal variations in nickel and vanadium in Mont Blanc snow and ice dated from the 1960s and 1990s. Barbante C, Boutron C, Moreau A-L. 2002, J Environ Monit, Vol. 4, pp. 960–966.

20. Environmental nickel pathways to man. Bennett, B G. 1984, IARC, Vol. 53, pp. 487-495.

21. Nickel and nickel compounds. IARC. 1990, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 49, pp. 257-445.
22. Annex of the opinion on safety of aluminum from dietary intake-scientific opinion of the panel on food additives, flavorings, processing aides and food contact materials. 2008, Annexe to the EFSA journal, Vol. 754, pp. 1-34.
23. Nickel et ses dérivés. INERIS. 2006, I N E R I S - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
24. INERIS. Aluminium et ses dérivés. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. 2005. INERIS –DRC-02-25590-02DF41.doc.
25. Risk assessment of cadmium exposure in Fort Resolution, Northwest Territories, Canada. Kim, C, Chan, H M et Receveur, O. 1998, Food Addit Contam, Vol. 15, pp. 307-317.
26. Protective effect of dietary chitosan on cadmium accumulation in rats. Nutrition research and practice. Kim, M Y, et al. 2016, Nutrition research and practice, Vol. 10, pp. 19 - 25.
27. A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. Sarkar, A, Ravindran, G et Krishnamurthy, V. 2013, Int J Biotech, Vol. 3, pp. 17-36.
28. Cadmium carcinogenesis. Waalkes, M P. 2003, Mutat Res, Vol. 533, pp. 107-20.
29. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. Berglund, M, et al. 1994, Environ Health Perspect, Vol. 102, pp. 1058–1066.
30. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. Flanagan, P R, McLellan, J S et Haist, J. 1978, GASTROENTEROLOGY, Vol. 74, pp. 841 - 846.
31. Current status of cadmium as an environmental health problem. Järup, L et Åkesson, A. TOXICOL APPL PHARM, Vol. 238, pp. 201 - 208.
32. Renal effects of cadmium body burden of the general population. Buchet, J P, Lauwerys, R et Roels, H. 1990, LANCET, Vol. 336, pp. 699-702.

33. Determination of cadmium in urine by extraction and flameless atomic-absorption spectrophotometry Comparison of urine from smokers and non-smokers of different sex and age. Jawaid, M, Lind, B et Elinder, C G. 1983, *Talanta*, Vol. 30, pp. 509 - 513.
34. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. Rani, A, et al. 2014, *Int J Environ Heal R*, Vol. 24, pp. 378-399.
35. Nordberg, G F, Fowler, B A et Nordberg, M. *Handbook on the toxicology of metals*. 3ème. s.l.: Elsevier Inc, 2007.
36. Impact of environmental cadmium pollution on cadmium exposure and body burden. Sartor, F A, Rondia, D J et Claeys, F D. 1992, *ARCH ENVIRON HEALTH*, Vol. 47, pp. 347 - 353.
37. Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring. Vahter, M, Friberg, L et Lind, B. 1982, *J AM COLL TOXICOL*, Vol. 1, pp. 117-117.
38. Bioavailability of nickel in man - effects of foods and chemically-defined dietary constituents on the absorption of inorganic nickel. Solomons, N W, et al. 1982, *J Nutr*, Vol. 112, pp. 39–50.
39. Nickel absorption and kinetics in human volunteers. Sunderman, F W, et al. 1989, *P Soc Exp Biol Med*, Vol. 191, pp. 5–11.
40. Absorption and retention of nickel from drinking water in relation to food intake and nickel sensitivity. Nielsen, G D, et al. 1999, *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 154, pp. 67-75.
41. Nickel et ses oxydes. INRS. 2009, *Fiche Toxicologique*, Vol. 68.
42. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Denkhaus, E et Salnikow, K. 2002, *Crc Cr Revoncol-Hem*, Vol. 42, pp. 35–56.
43. Bioavailability of Al in alum-treated drinking water. Stauber, J L, Florence, T M et Davies, C M. 1999, *J Am Water Works Ass*, Vol. 91, pp. 84-93.
44. Bioavailability of Al from drinking water: Co-exposure with food and beverages. Walton, J, Hams, G et Wilcox, D. 1994, *Urban Water Research Association of Australia*, Vol. 83, pp. 35-38.
45. Aluminum exposure and metabolism. Greger, J L et Sutherland, J E. 1997, *CRC Cr Rev Cl Lab Sc*, Vol. 35, pp. 439-474.

46. Serum and urinary Aluminum levels of workers in the Aluminum industry. Gitelman, H J, et al. 1995, *Ann Occup Hyg*, Vol. 39, pp. 181-191.
47. Quantitative particle-induced X-ray emission imaging of rat olfactory epithelium applied to the permeability of rat epithelium to inhaled aluminum. Divine, K K, et al. 1999, *Chem Res Toxicol*, Vol. 12, pp. 575–581.
48. ANSM. Evaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques. [En ligne] 11 2011. [Citation : 27 08 2016.] <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Evaluation-du-risque-lie-a-l-utilisation-de-l-aluminium-dans-les-produits-cosmetiques-Point-d-information>.
49. Aluminum in large and small volume parenteral used in total parenteral nutrition. Administration, US Food and Drug. 2013, Code of Federal Regulation, Vol. 4.
50. Contenants et contaminants en nutrition parentérale : l'aluminium, un revenant ? Ait Ichou, M, et al. 2013, *Nutr Clin Metab*, Vol. 27, pp. 200-204.
51. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel and calcium. Scott, B J et Bradwell, A R. 1983, *Clin Chem*, Vol. 29, pp. 629-633.
52. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Curtis, D, Klaassen, J L et Choudhuri, S. 1999, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Vol. 39, pp. 267-269.
53. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. Flora, SJS, Mittal, M et Mehta, A. 2008, *Indian J Med Res*, Vol. 128, pp. 501-523.
54. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. Jin, T, Lu, J et Nordberg, M. 1998, *Neurotoxicology*, Vol. 19, pp. 529-535.
55. Metallothionein protection of cadmium toxicity. Klaassen, C D, Liu, J et Diwan, B A. 2009, *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 238, pp. 215-220.
56. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. Berglund, M, et al. 1994, *Environ Health Perspect*, Vol. 102, pp. 1058–1066.
57. The German Environmental Survey 1990/92 (GerES II): primary predictors of blood cadmium levels in adults. Hoffmann, K, Krause, C et Seifert, B. 2001, *Arch Environ Health*, Vol. 56, pp. 374–379.

58. Cadmium metabolism in man. Welinder, H, Skerfving, S et Henriksen, O. 1977, *Br J Ind Med*, Vol. 34, pp. 221–228.
59. Nickel (II) transport in human blood serum. Studies of nickel (II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine. Glennon, J D et Sarkar, B. 1982, *Biochem J*, Vol. 203, pp. 15-23.
60. Nickel metabolism. Sarkar, B. 1984, IARC Scientific Publications, pp. 367–384.
61. Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile. Rezuze, W N, Knight, J A et Sunderman, F W. 1987, *Am J Ind Med*, Vol. 11, pp. 419–426.
62. Base de données Biotox. INRS. [En ligne] [Citation : 21 08 2016.] http://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox/dosage.html?refINRS=Dosage_46.
63. Equilibrium constants for the binding of aluminum to human serum transferrin. Harris, W R et Sheldon, J. 1990, *Inorganic Chemistry*, Vol. 29, pp. 119-124.
64. Metabolism and possible health effects of aluminum. Ganrot, P. 1986, *Environ Health Perspect*, Vol. 65, pp. 363-441.
65. Aluminum uptake by neuroblastoma cells. Shi, B et Haug, A. 1990, *J Neurochem*, Vol. 55, pp. 551-558.
66. Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. Yokel, R A. 2002, *Environ Health Persp*, Vol. 110, pp. 699-704.
67. Aluminum toxicokinetics: An updated minireview. Yokel, R A et McNamara, P J. 2001, *Pharmacol Toxicol*, Vol. 88, pp. 159-167.
68. Human metabolism of aluminium-26 and gallium-67 injected as citrates. Priest, N D, et al. 1995, *Hum Exp Toxicol*, Vol. 14, pp. 287-293.
69. INRS. Valeur limite d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France. 2012. p. 32. ED 984.
70. Binding of cadmium on metallothionein in man: an analysis of a fatal poisoning by cadmium iodide. Wisniewska-Knypl, J M, Jablonska, J et Myslak, Z. 1971, *Arch Toxicol*, Vol. 28, pp. 46 - 55.
71. Cadmium overload and toxicity. Järup, L. 2002, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 17, pp. 35-39.

72. Beta 2-microglobulinuria among workers previously exposed to cadmium: follow-up and dose-response analyses. Elinder, C G, et al. 1985, *Am J Ind Med*, Vol. 8, pp. 553-564.
73. Dose-response relations between urinary cadmium and tubular proteinuria in cadmium-exposed workers. Jarup, L et Elinder, C G. 1994, *Am J Ind Med*, Vol. 26, pp. 759-769.
74. Lauwerys, R R. *Cadmium*. Paris: Masson, 1990.
75. Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. Regunathan, A, et al. 2003, *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 191, pp. 272-293.
76. Effects of sub-toxic Cadmium concentrations on bone gene expression program: results of an in vitro study. Bodo, M, et al. 2010, *Toxicol In Vitro*, Vol. 6, pp. 1670-1680.
77. Cadmium induces apoptosis in the osteoblast-like cell line, Saos-2. Coonse, K G, et al. 2007, *J Toxicol Environ Health Part A*, Vol. 70, pp. 575-581.
78. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC. 1993, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 58.
79. Cadmium-induced Cancers in Animals and in Humans. Huff, J, et al. 2007, *Int J Occup Environ Health*, Vol. 13, pp. 202–212.
80. Lung cancer mortality in a cohort of workers employed at a cadmium recovery plant in the United States: An analysis with detailed job histories. Sorahan, T et Lancashire, R J. 1997, *Occup Environ Med*, Vol. 54, pp. 194-201.
81. Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. Elghany, L A, et al. 1990, *Epidemiology*, Vol. 1, pp. 107-115.
82. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. Verougstraete, V. 2003, *Jpn J Tox Eenv Health*, Vol. 3, pp. 227-256.
83. Association of cadmium with renal cancer. Kolonel, L N. 1976, *Cancer*, Vol. 37, pp. 1782–1787.

84. Occupational risk factors for bladder cancer: results from a case-control study in Montreal, Quebec, Canada. Siemiatycki, J, et al. 1994, *Am J Epidemiol*, Vol. 140, pp. 1061–1080.
85. Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. Haber, L T, et al. 2000, *Regul Toxicol Pharmacol*, Vol. 31, pp. 231-241.
86. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution. Sunderman, F W, et al. 1988, *Am J Ind Med*, Vol. 14, pp. 257-266.
87. Acute nickel intoxication by dialysis. Webster, J D, et al. 1980, *Ann Intern Med*, Vol. 92, pp. 631-633.
88. Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds. Vyskocil, A, et al. 1994, *Hum Exp Toxicol*, Vol. 13, pp. 257-261.
89. Chronic nephrotoxicity of soluble nickel in rats. Vyskocil, C, Viau, C et Cizkova, M. 1994, *Hum Exp Toxicol*, Vol. 13, pp. 689-693.
90. Evaluation of tissues disposition, myelopoetic and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. Dieter, M P, et al. 1988, *J Toxicol Environ Health*, Vol. 24, pp. 356-372.
91. Hepatic toxicity of nickel chloride in mice. Gathwan, K H, Al-Karkhi, I H T et Al-Mulla, E A J. 2013, *Research on Chemical Intermediates*, Vol. 39, pp. 2537–2542.
92. Ineffectiveness of nickel in augmenting the hepatotoxicity in protein deficient rats. Sidhu , P, et al. 20, 2005, *Nutricion Hospitalaria*, pp. 378–385.
93. Report of the International Committee on nickel carcinogenesis in man. Man, International Committee on Nickel Carcinogenesis in. 1990, *Scand J Work Environ Health*, Vol. 6, pp. 1–82.
94. Exposure to nickel compounds and smoking in relation to incidence of lung and nasal cancer among nickel refinery workers. Andersen, A, et al. 1996, *Occup Environ Med*, Vol. 53, pp. 708–713.
95. Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers 1953–2000. Grimsrud, T K, et al. 2003, *J Environ Monit*, Vol. 5, pp. 190–197.
96. Persisting risk of nickel related lung cancer and nasal cancer among Clydach refiners. Grimsrud, T K et Peto, J. 63, 2006, *Occup Environ Med*, pp. 365–366.

97. Crepy, M N. Dermatoses professionnelles allergiques aux métaux - Première partis : allergie de contact au nickel. Document pour le médecin du travail, INRS. 2010. 121.
98. Überempfindlichkeit gegen Hartgeld. Rothman, S. 1930, *Dermatol Wochenschr*, Vol. 2, pp. 98–99.
99. COMMISSION REGULATION. Official journal of the European Union. 2009. 552/2009.
100. Quantitative histological analysis of the mouse testis after the long-term administration of nickel in feed. Toman, R, et al. 2012, *J Environ Sci Heal A*, Vol. 47, pp. 1272–1279.
101. Seminal toxicity of nickel sulfate in mice. Pandey, R et Singh , S P. 2001, *Biol Trace Elem Res*, Vol. 82, pp. 211–215.
102. The acute toxicity and teratogenicity of nickel in pregnant rats. Mas, A, Holt, D et Webb, M. 1985, *Toxicology*, Vol. 35, pp. 47–57.
103. Genital malformations in newborns of female nickel refinery workers. Vaktskjold, A, et al. 2006, *Scand J Work Env Hea*, Vol. 32, pp. 41–50.
104. Spontaneous abortions among nickel-exposed female refinery workers. Vaktskjold, A, et al. 2008, *Int J Environ Heal R*, Vol. 18, pp. 99–115.
105. European Union Risk Assessment Report: Nickel and nickel compounds. EU RAR (European Union Risk Assessment Report). 2008.
106. Human Diseases Related to Aluminum Overload. Crisponi, G, et al. 2011, *Monatsh Chem*, Vol. 14, pp. 331–340.
107. A fatal case of aluminum encephalopathy in a patient with severe chronic renal failure not on dialysis. Zatta, P, et al. 2004, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 19, pp. 292-2931.
108. VALUE OF SERUM ALUMINUM MONITORING IN DIALYSIS PATIENTS. D’Haese, P C, et al. 1990, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 37, pp. 186-186.
109. TRANSFERRIN ENHANCES THE ANTI-PROLIFERATIVE ACTIONS OF ALUMINUM IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS. Kasai, K. 1990, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 37, pp. 449 - 449.

110. Aluminum-induced, reversible microcytic anemia in chronic renal failure: clinical and experimental studies. Touam, M, et al. 1983, Clin Nephrol, Vol. 19, pp. 295-298.
111. Neurotoxic effects of aluminum among foundry workers and Alzheimer's disease. Polizzi, S, et al. Neurotoxicology, Vol. 23, pp. 761-774.
112. Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. Couette, M, et al. 2009, J Inorg Biochem, Vol. 103, pp. 1571–1578.
113. Akiyama, H, et al. 2012, Neuropathology, Vol. 32, pp. 390-397.
114. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. Pratico, D, et al. 16, 2002, FASEB J, pp. 1138–1140.
115. Exley, C, et al. 2012, J. Alzheimer's Dis, Vol. 31, pp. 725-730.
116. Transition metal abnormalities in progressive dementias. Akatsu, H, et al. 2012, Biometals, Vol. 25, pp. 337-350.
117. Aluminum in human breast tissue. Exley, C, et al. 2007, J Inorg Biochem, Vol. 101, pp. 1344–1346.
118. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. M, Moulis J. 2010, Biometals, Vol. 23, pp. 877–896.
119. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. Witkiewicz-Kucharczyk, A et Bal, W. 2006, Toxicol Lett, Vol. 162, pp. 29–42.
120. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. Casalino, E, Sblano, C et Landriscina, C. 1997, Arch Biochem Biophys, Vol. 346, pp. 171-179.
121. Glutathione, ascorbate and cellular protection. Meister, A. 1994, Cancer res, Vol. 54, pp. 1969-75.
122. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. Ercal, N, Gurer-Orhan, H et Aykin-Burns, N. 2001, Curr Top Med Chem, Vol. 1, pp. 529-539.

123. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Bertin, G et Averbeck, D. 88, 2006, *Biochimie*, pp. 1549–1559.
124. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1 and staurosporine-induced cell death. Mehlen, P, Schulze-Osthoff, K et Arrigo, A O. 271, 1996, *J. Biol. Chem*, pp. 16510–16514.
125. A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells. Mourón, S A, et al. 2004, *Mutat Res*, Vol. 568, pp. 221-231.
126. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. Misra, R R, Smith, G T et Waalkes, M P. 126, 1998, *Toxicology*, pp. 103-114.
127. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. Dally, H et Hartwig, A. 1997, *Carcinogenesis*, Vol. 18, pp. 1021–1026.
128. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA–metal interaction? Valverde, M, Trejo, C et Rojas, E. 16, 2001, *Mutagenesis*, pp. 265–270.
129. Toxicological review of soluble nickel salts. TERA. 1999, *Toxicology Excellence for Risk Assessment*.
130. Fluorescent tracking of nickel ions in human cultured cells. Ke, Q, Davidson, T et Kluz, T. 219, 2007, *Toxicol Appl Pharmacol*, pp. 18–23.
131. Toxicogenomic effect of nickel and beyond. Yao, Y et Costa, M. 2014, *Arch Toxicol*, Vol. 88, pp. 1645–1650.
132. Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16 (Ink4a) and activation of MAP kinase. Govindarajan, B, et al. 2002, *Mol Med*, Vol. 8, pp. 1-8.
133. Aluminum (III) facilitates the oxidation of NADH by the superoxide anion. Kong, S, Liochev, S et Fridovic, I. 1992, *Free Radic Biol Med*, Vol. 13, pp. 79–81.
134. The pro-oxidant activity of aluminum. Exley, C. 2004, *Free Radical Bio Med*, Vol. 34, pp. 380 – 387.

135. Aluminum administration is associated with enhanced hepatic oxidant stress that may be offset by dietary vitamin E in the rat. Abubakar, M G, Taylor, A et Ferns, G A A. 84, 2003, *Int J Exp Pathol*, pp. 49 – 54.
136. Vitamin E protects the brain against oxidative injury stimulated by excessive aluminum intake. El-Fattah, A A, et al. 1998, *Biochem Mol Biol Int*, Vol. 46, pp. 1175 – 1180.
137. Oxidative damage following chronic aluminum exposure in adult and pup rat brains. Nehru, B et Anand, P. 2005, *J Trace Elem Med Bio*, Vol. 19, pp. 203–208.
138. Aluminum toxicity elicits a dysfunctional TCA cycle and succinate accumulation in hepatocytes. Mailloux, R J, Hamel, R et Appanna, V D. 2006, *J Biochem Mol Toxic*, Vol. 4, pp. 198 - 208.
139. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. Kopac, I, et al. 2002, *J Oral Rehabil*, Vol. 29, pp. 98–104.
140. Mutagenic activity in waste from an aluminum products factory in Salmonella/microsome assay. Varella, S D, et al. 2004, *Toxicol In Vitro*, Vol. 18, pp. 895–900.
141. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. Lima, P D L, et al. 2007, *Food chem toxicol*, Vol. 45, pp. 1154–1159.
142. Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. Migliore, L, et al. 1999, *Environ Mol Mutagen*, Vol. 34, pp. 279-284.
143. Aluminum induced micronuclei and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. Banasik, A, et al. 2005, *Environ Toxicol*, Vol. 4, pp. 402 - 406.
144. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. Willhite, C C, et al. 2014, *Crit Rev Toxicol*, Vol. 44, pp. 1–80.
145. No evidence of DNA damage by co-exposure to extremely low frequency magnetic fields and aluminum on neuroblastoma cell lines. Villarini, M, et al. 2017, *Mutat Res Gen Tox En*, Vol. 823, pp. 11-21.

146. What does calorimetry and thermodynamics of living cells tell us? Maskow, T et Paufler, S. 2014, *Methods*, Vol. 76, pp. 3-10.
147. Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures. Böttcher, H et Furst, P. 1997, *Baillere Clin Endocrinol*, Vol. 11, pp. 739-52.
148. Energy metabolism of non-transformed and benzyrene-transformed 3T3 cells: a microcalorimetric study. Gebreselassie, D et Schon, A. 1993, *Bioenergetics*, Vol. 1143, pp. 211-214.
149. The solubility of oxygen in pure water and sea-water. Truesdale, G A, Downing, A L et Lowden, G F. 1955, *J Appl Chem*, Vol. 5, pp. 53-62.
150. Heat evolution of cultured human keratinocytes. Reichert, U et Schaaschmidt, B. 1986, *Experientia*, Vol. 42, pp. 173–174.
151. Clinical Physiology: Microcalorimetric Measurements of Heat Production in Whole Blood and Blood Cells of Normal Persons. Bandmann, U, Monti, M et Wadso, I. 1975, *Scan J Clin Lab Invest*, Vol. 42, pp. 121-127.
152. Microcalorimetry as a tool for Cr (VI) toxicity evaluation of human dermal fibroblasts. Liu, W, et al. 2007, *J Therm Anal Calorim*, Vol. 89, pp. 21–24.
153. Algebraic potential of the Hill equation as an alternative tool for plotting dose (or time) effects relationships in toxicology: a theoretical study. Bounias, M. 1989, *Fundam. Clin. Pharmacol*, Vol. 3, pp. 1-9.
154. Le stress oxidant. Haleng, J, et al. 2007, *Rev Med Liege*, Vol. 62, pp. 628-638.
155. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Mosmann, T. 1983, *J. Immunol. Methods*, Vol. 65, pp. 55-63.
156. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. Slater, T. F, Sawyer, B et Straeuli, U. 1963, *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 77, pp. 383-393.
157. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MU reduction. S, Berridge M. et Tan, A. N. 1995, *Arch. Biochem. Biophys*, Vol. 303, pp. 474-482.

158. The intracellular component of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by β -amyloid peptides. Shearman, M. S, Hawtin, S. R et Taylor, V. J. 1995, *J. Neurochem*, Vol. 65, pp. 218-227.
159. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*. Liu, Y. 1997, *J. Neurochem*, Vol. 69, pp. 581-593.
160. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Stockert, J. C. 2012, *Acta. Histochem*, Vol. 114, pp. 785-796.
161. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Moini, H, Packer, L et Saris, NE. 2002, *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 182, pp. 84-90.
162. Oxidants and antioxidants revisited: new concepts of oxidative stress. Packer, L et Cadenas, E. 2007, *Free Radic Res*, Vol. 41, pp. 951-952.
163. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Winterbourn, CC et Hampton, MB. 2008, *Free Radic Med*, Vol. 45, pp. 549-561.
164. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtiter plates and its application to injection drugs. Saotome, K, Morita, H et Umeda, M. 1989, *Toxic. in Vitro*, Vol. 3, pp. p.317 - 321.
165. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Ishiyama, M, et al. 1996, *Biol. Pharm. Bull*, Vol. 19, pp. 1518-1520.
166. Cell Density and Solvent Are Critical Parameters Affecting. Gasque, K. C. 2014, *Braz Arch Biol Techn*, Vol. 57, pp. 381 - 385.
167. Hormesis- The stimulation of growth by low levels of inhibitors. Stebbing, A R. 1982, *The Science of the Total Environment*, Vol. 22, pp. 213 - 234.
168. Wheeler, C E. *Introduction to the Principles and Practice of Homeopathy*. Bradford: Health Science Press, 1948.
169. Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. Damelin, L H, et al. 2000, *Human & Experimental Toxicology*, Vol. 19, pp. 420-430.

170. Calculation of the EC50 and its confidence interval when subtoxic stimulus is present. Van Ewijk, P H et Hoekstra, J A. 1993, *Ecotoxicology and environmental safety*, Vol. 25, pp. 25 - 32.
171. Concentration-time mortality response relationship of irritant and systematically acting vapors and gases. ten Berge, F W, Zwart, A et Appelman, L M. 1986, *J HAZARD MATER*, Vol. 301 - 309, p. 13.
172. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and biophysical research communications. Ostling, O et Johanson, K J. 1984, *Biochem Bioph Res Co*, Vol. 123, pp. 291 - 298.
173. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Singh, N P, McCoy, M T et Tice, R R. 1988, *Exp Cell Res*, Vol. 175, pp. 184-191.
174. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Testing. Tice, R R, et al. 2000, *Environ Mol Mutagen*, Vol. 35, pp. 206 –221.
175. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Olive, P L, Banath, J P et Durand, R E. *Radiat Res*, Vol. 122, pp. 86-94.
176. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a Gaussian distribution. Bauer, E. 1998, *Mutat Res*, Vol. 398, pp. 101 - 110.
177. Chemical mutagenesis in mammal. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with Trenimon. Boller, K et Schmid, W. 1970, *Humangenetik*, Vol. 11, pp. 35-54.
178. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test III. Using CHO cells. Aardema, M J, et al. 2006, *Mutat Res*, Vol. 607, pp. 61-87.
179. Nordstrom, D A et Wesolowski, H M. *The Environmental Chemistry of Aluminum - Aqueous equilibrium data for mononuclear aluminum species (Chap 2)*. [Éd.] Garrison Sposito. Boca Raton FL: CRC Press, 1989.
180. Aluminum Speciation and equilibria in aqueous solutions: III. Potentiometric determination of the first hydrolysis constant of aluminum (III) in sodium chloride solutions to 125°C. Palmer, D A et Wesolowski, D J. 1993, *Geochim Cosmochim Acta*, Vol. 57, pp. 2929-2938.

181. Aluminum Speciation and equilibria in aqueous solution: I. The solubility of gibbsite in the system Na-K-Cl-OH-Al(OH)₄ from 0 to 100°C. Wesolowski, D J. 1992, *Geochim Cosmochim Acta*, Vol. 56, pp. 1065-1092.
182. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. Morita, T, et al. 1992, *Mutat Res*, Vol. 268, pp. 297–305.
183. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. Hartwig, A et Schwerdtle, T. 2002, *Toxicol Lett*, Vol. 127, pp. 47–54.
184. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. Wiseman, T, et al. 1989, *Anal. Biochem*, Vol. 179, pp. 131-137.
185. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. Freyer, MW et Lewis, EA. 2008, *Methods Cell Biol*, Vol. 84, pp. 79-113.
186. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. McGhee, J et von Hippel, P. 1974, *J Mol Biol*, Vol. 86, pp. 469-489.
187. Ligand binding to one-dimensional lattice-like macromolecules: analysis of the McGhee-von Hippel theory implemented in isothermal titration calorimetry. Velazquez-Campoy, A. 2006, *Anal Biochem*, Vol. 348, pp. 94-104.
188. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. Eichhorn, G L et Shin, Y A. 26, 1968, *J. Am. Chem. Soc*, Vol. 90, pp. 7323-7328.
189. Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: implications for the biological function of aluminum. Wu, J, et al. 2005, *J. Inorg. Biochem*, Vol. 99, pp. 1145-1154.
190. Limiting laws and counter-ion condensation in polyelectrolyte solutions. Colligative properties. Mannin, G S. 1969, *J. Chem. Phys*, Vol. 51, pp. 924-933.
191. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of nucleotides. Manning, G S. 1978, *Q. Rev. Biophys*, Vol. 11, pp. 179-246.

192. A Theoretical Assessment of the Oligolysine Model for ionic Interactions in Protein-DNA Complexes. Fenley, M O, Russo, C et Manning, G S. 2011, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 115, pp. 9864-9872.
193. Revzin, A. *The Biology of Nonspecific DNA-Protein Interactions*. Boston: Ads CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 2000.
194. Cation binding linked to a sequence-specific CAP-DNA interaction. Stickle, D F et Fried, M G. 2007, *Biophys. Chem*, Vol. 126, pp. 106-166.
195. Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: roles of electrostatics and hydrophobicity. Matulis, D, Rouzina, I et Bloomfield, V A. 2002, *J. Am. Chem. Soc*, Vol. 124, pp. 7331-7342.
196. Extracting stoichiometry, thermodynamics and kinetics for the interaction of DNA with cadmium ion by capillary electrophoresis on-line coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. Li, Y, et al. 2008, *Electrophoresis*, Vol. 29, pp. 1173-1179.
197. Interaction of bivalent copper, nickel, manganese ions with native DNA and its monomers. Sorokin, A V, et al. 1996, *J. Inorg. Biochem*, Vol. 63, pp. 79-86.
198. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. Halasi, M, et al. 2013, *Biochem J*, Vol. 454, pp. 201–208.
199. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. Filipic, M. 2012, *Mutat Res*, Vol. 733, pp. 69-77.
200. Mitose (division cellulaire). [En ligne] Vulgaris Medical. <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/mitose-division-cellulaire>.
201. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. Keller, S, et al. 2012, *Anal. Chem*, Vol. 84, pp. 5066–5073.
202. Oxidation in the nucleotide pool, the DNA damage response and cellular senescence: Defective bricks build a defective house. Rai, P. 2010, *Mutat Res*, Vol. 703, pp. 71-81.
203. Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles. Larmarcovai, G, Botta, A et Orsière, T. 2007, *B Cancer*, Vol. 94, pp. 381-388.

204. Université Ferhat Abbas -Sétif. [En ligne] [Citation : 26 03 2018.] <http://cte.univ-setif.dz/coursenligne/haichournora/glycolyse.html>.
205. Science et avenir. L'allergie au nickel mieux comprise. [En ligne] [Citation : 10 05 2018.] https://www.sciencesetavenir.fr/sante/l-allergie-au-nickel-mieux-comprise_25416.
206. Silver in Paris. Les bijoux et l'allergie. [En ligne] [Citation : 10 05 2018.] <https://blog.silverinparis.com/expertise/tout-savoir-sur-l-argent/bijoux-allergie>.
207. Nickel hypersensitivity: a clinical review and call to action. Schram, S E, Warshaw, E M et Laumann, A. 2010, Int J Dermatol, Vol. 49, pp. 115–125.
208. Fe³⁺ and Al³⁺ hydrolysis equilibria. Martin, R B. 1991b, J Inorg Biochem, Vol. 44, pp. 141-147.
209. Le Figaro santé. Structures et rôles de la peau. [En ligne] [Citation : 18 05 2018.] <http://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/beaute/structures-roles-peau/quoi-peau-est-elle-composee>.

Annexes

Effect of Ni(II), Cd(II) and Al(III) on human fibroblast bioenergetics, a preliminary comparative study

Catherine Belliardo¹ · Philippe Gallice¹ · Florence Chaspoul¹ · Florian Corréard² · David Bergé-Lefranc¹

Received: 16 July 2015 / Accepted: 20 January 2016
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2016

Abstract Exposure to Ni, Cd or Al leads to different health issues depending on the dose and the exposure frequency. Their mechanism of action is poorly known, but as metals, they may have some points in common. The aim of this work was to compare the impact on cell bioenergetic of these metals using a common cell model: a normal human dermal fibroblast (NHDF) in primary culture. To study cell bioenergetics which “concerns energy conservation and conversion processes in a living cell” as defined by Demirel and Sandler, two technics are combined: oximetry and microcalorimetry. The heat flow measured by microcalorimetry reflects cell metabolism and more generally glucose catabolism (the only nutriment brought to the NHDF). Cell respiration is measured by oximetry and shows the impact on the mitochondria, the energy factory of the cell. Without incubation, Cd inhibits thermogenesis and cell respiration, Ni has no effect, and Al inhibits cell respiration but not thermogenesis. After 24 h of contact at 40 μ M, NHDF died with Cd but seemed over-activated with Al and Ni (thermogenesis and cell respiration increased).

Keywords Human fibroblasts · Bioenergy · Thermogenesis · Cell respiration · Microcalorimetry · Metals

✉ Catherine Belliardo
catherine.belliardo@etu.univ-amu.fr

¹ IMBE UMR 7263 CNRS IRD 237, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 13385 Marseille, France

² INSERM, CRO2, UMR S911, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 13385 Marseille, France

Introduction

Metal exposure has become more and more recognized as a source of pathology and has become a global public health issue throughout the world. The presence of these potentially toxic components in their natural state in our environment leads to different means of contamination. One of the most known is ingestion by drinking water or eating food [1]. This observation led legal authorities to put it under surveillance and ask for regular investigations [2, 3]. Thanks to these measures, scientists can now determine the exposure rate of the population and are able to estimate the acceptable doses of exposure for each metal.

While the mechanism of action remains poorly known, their effects on the human body are well documented [4]. Constant exposure to metals such as nickel (Ni), cadmium (Cd) or aluminum (Al) can lead to an accumulation in the organism and is responsible for chronic pathologies, even if the level of exposure is relatively low. Thus, for Cd whose target organ is the kidney, this well-known phenomenon leads to tubular and glomerular dysfunction and then to renal insufficiency accompanied by bone disorders [5, 6]. Considered as responsible for professional diseases since 1973, cadmium has been classified in group 1 carcinogenic agent by the IARC [7]. In the same way, Ni, which we handle daily when we use coins, jewels or zippers, is now recognized as one of the most allergenic metals [8]. Moreover, besides leading to contact dermatitis, this metal is also classified as a potentially carcinogenic substance for humans by the IARC [9] and a chronic exposure to nickel is registered as a risk factor for lung cancer in the professional illness table. Finally, Al, found in cooking recipients, water, cosmetics or drugs such as vaccines, is said to be responsible for dialysis encephalopathy, osteoporosis and osteomalacia [10]. It accumulates in bones and the

brain bringing about memory and learning disorders but also inducing neurodegenerative pathologies [11–13].

Many studies have been carried out on different cellular types [14, 15], in particular cell lineage such as human osteoblast-like (osteosarcoma) cell line MG-63 or HCT-116 cells from human colorectal carcinoma. Very different study techniques were implemented, so in this context, it was difficult to fully understand the mechanism of action of these metals. That is why making a comparative study of them on a human cell culture such as dermal fibroblast seemed relevant. According to previous reports, we chose to start this work by the analysis of cell bioenergetics [16] using microcalorimetry [17–19] and oximetry methods [20], which allow the measurement of the energy flow inside the cells. The energy is stocked in the cells in the form of ATP; cell bioenergy is therefore represented by the production and consumption of this molecule.

Materials and methods

Reagents

The metal powders used were of high purity (99.9 %): Cadmium chloride, Cd(II), and nickel chloride hexahydrate, Ni(II), were from Aldrich[®], and aluminum chloride anhydrous crystallized, Al(III), was from Fluka[®] analytical.

Primary normal human dermal fibroblasts (NHDF) were purchased from Lonza[®]. Fibroblast basal medium-2 (FBM-2) supplemented with a growth kit containing 10 mL of fetal bovine serum, 0.5 mL of insulin, 0.5 mL of gentamicin sulfate amphotericin-B (GA-1000) and 0.5 mL of r-human fibroblast growth factor-B were also from Lonza[®]. During the harvest, NHDF were treated by trypsin–EDTA (1×) 0,05 % purchased from Gibco[®].

Sodium dodecylsulfate (SDS) in aqueous solution (at 10 %) came from Sigma-Aldrich[®].

Cell culture

Fibroblasts were routinely cultured in culture medium (FBM-2) in sterile boxes for cell culture with an area of 75 cm² (T75) and maintained at 37 °C and 5 % CO₂. When cells were at confluence, FBM-2 was discarded and cells were treated with the trypsin solution for 2 min at 37 °C. The cell suspension obtained was diluted in FBM-2 and introduced into new T75 boxes. NHDF were then used for all experiments between passages 5 and 8.

For the experiments, after trypsin treatment, the cell suspension was transferred into a Falcon tube and centrifuged for 5 min at 1600 rpm. The pellet was suspended in 5 mL of FBM-2, and an aliquot of this suspension was made in order to use the *Beckman coulter Z2 particle count*

and size analyzer to determine the number of cells. Finally, the suspension was diluted with the culture medium in order to obtain 1 million cells per milliliter.

Thermal analysis

Cell thermogenesis was measured with a microcalorimeter diatherm passive *ThermoMetric[®] 2277 thermal activity monitor*, at 37 °C. The microcalorimeter was frequently dynamically calibrated in the course of the study. Power–time curves were thus corrected automatically and registered with the Tian equation used in *Digitam 4.1* software (thermometric, Sweden). Identical volumes (900 μL) of the fibroblast suspension and pure medium culture were introduced in the measuring and in the reference chamber, respectively. Chambers were then gradually introduced into the device, and a mechanical and constant agitation at 60 rpm ensured the homogeneity of the suspension. Thermal power (P, watt) was continuously registered, and data acquisition was automatically made by *Digitam 4.1* software. The effect of the metal was evaluated by injection into the cell suspension of a concentrated metal aqueous solution using a programmable syringe pump (*Thermometric 612 Lund syringe pump 2*) in order to obtain final concentrations from 0 to 500 μM of Cd and Ni and from 0 to 2 μM of Al. To determine NHDF thermal power (thermogenesis), a volume of the SDS solution (70 μL) was injected to kill the cells (leading to the baseline of the experiment).

A typical curve is illustrated in Fig. 1. This can be described in three parts: First the heat flow leads to a constant power value (A) corresponding to the expenditure energy of the system. Second the heat peak is due to the dilution of the injected metal solution. After that, a stable power value is reached (B). At the end, after a new heat peak, due to the SDS dilution, a third power value plateau is observed (C).

Fibroblast thermogenesis was calculated by the difference between C and A, and the value obtained was divided

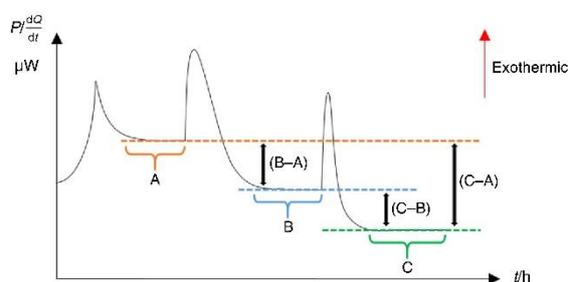


Fig. 1 For example, a typical power–time curve of NHDF. *a*, *b* and *c* steps correspond to the addition of NHDF, metal and SDS, respectively

by the number of cells contained in the measuring chamber in order to express cell thermogenesis as pW/cell. The effect of the metal was determined by the difference in the heat flow value plateau between *B* and *A*. The result was divided by the corresponding cell thermogenesis (*C* - *A*) for the purpose of expressing the effect as percentage of inhibition (*I* %) according to Eq (1):

$$I(\%) = \frac{B - A}{C - A} \times 100 \quad (1)$$

Oxygen uptake rate measurement

Cell oxygen consumption was monitored by a Clark-type polarographic oxygen electrode system called Oxygraph (Hansatech® Instrument Ltd), and data were processed by the software *Oxygraph Plus V1.01*. Electrode assembly was done as detailed by D.von Heimburg et al. [21]. Before taking the measurement, the electrode was calibrated based on Truesdale and Downing [22], who showed that dissolved oxygen in distilled water was between 210 and 230 nmol L⁻¹, at 37 °C and under atmospheric pressure, after degassing with N₂ until equilibrium was reached. Then, the fibroblast suspension (700 µL) was introduced in a closed measuring chamber at 37 °C with continuous stirring at 300 rpm. After 5 min, aliquots of concentrated metal solution were sequentially introduced (at intervals of 5 min) in order to obtain final concentrations from 0 to 500 µM of Cd and Ni and 0 to 5 µM of Al. As shown in Fig. 2, oxygen concentration variations were recorded and cell respiration was determined by measuring the slope of oxygen uptake against time. Cell respiration was thus expressed as nmol O₂/s/10⁶ cell. The effect of the metal was determined by the difference between the slope of oxygen uptake with (*S_m*) and without metal (*S_i*), and results

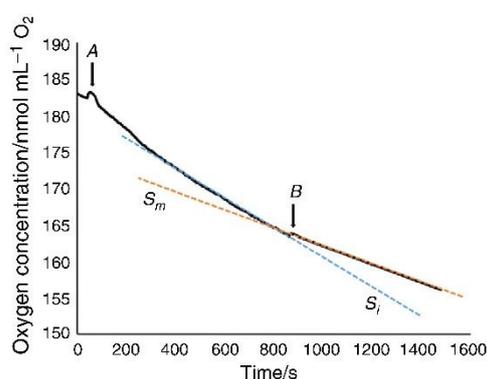


Fig. 2 For example, a typical oxygen concentration curve generated by NHDF suspension. Arrows *a* and *b* indicate the addition of cell suspension and metal, respectively. The slope of the curve after *a* and *b* measures the oxygen uptake with or without metal

were expressed as percentage of inhibition according to Eq. 2:

$$I(\%) = \frac{S_i - S_m}{S_i} \times 100 \quad (2)$$

Additional experiments

In a second set of experiments, fibroblasts were incubated with metal (40 µM final concentration) for 24 h. After that, thermogenesis was determined by the difference between plateau values observed before and after the addition of SDS. The value found was compared to the average fibroblast thermogenesis value of 15 ± 5 pW/cell reported by Liu [23]. For cell respiration, oxygen concentration was recorded and the value of oxygen uptake was compared to the average consumption of 10^6 fibroblasts in suspension, 0.032 ± 0.002 nmol O₂/s/10⁶ cell, as previously established [24].

Statistical analysis

Result comparison was made by Student's *t* test, and $p < 0.05$ was considered as significant.

Results and discussion

Thermal analysis

Among the metals studied in our experimental conditions, Cd alone altered fibroblast thermogenesis. As shown in Fig. 3, this inhibition was concentration dependant. To determine the inhibitory power of Cd, data were processed according to Eq (3):

$$I(\%) = \frac{[M]}{IC_{50} + [M]} \times 100 \quad (3)$$

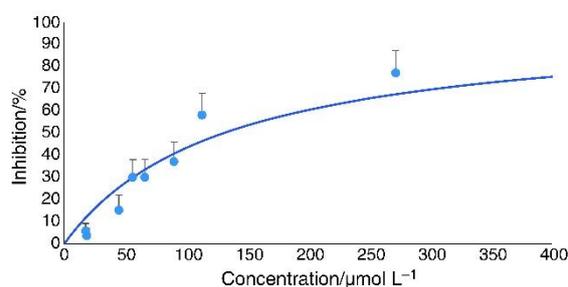


Fig. 3 Inhibition rate of heat release in the presence of different Cd concentrations. Circles represent the mean value of five independent experiments, and error bars represent the corresponding standard error. The solid line is the best fit obtained for the inhibition curve

where I was the inhibitory effect, $[M]$ metal concentration and IC_{50} molar concentration which inhibits half of thermogenesis.

The best fit obtained (using the least-square method) led to an IC_{50} of $132 \pm 18 \mu\text{M}$. This value was well supported by MTT assay, a biological cytotoxicity test ($IC_{50} = 189 \pm 44 \mu\text{M}$, data not shown).

As reported by Maskow and Paufler [25], cell thermogenesis is mainly due to glucose catabolism, the main source of cell energy [26, 27]. Results demonstrated that Cd induced an alteration of glucose utilization by fibroblasts, whereas Ni and Al appeared to have no effect.

Oxygen uptake rate

As was the case in thermal analysis, Ni had no effect on cell respiration contrary to Al and Cd, which inhibited fibroblast oxygen uptake. As illustrated in Fig. 4, both metals reduced cell respiration related to their concentration. To quantify this effect, the data were processed as described for thermogenesis using the cell inhibition equation. Thus, IC_{50} as 3.1 ± 0.3 and $2.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ were obtained for Cd and Al, respectively. These values, not statistically different, highlight that Cd and Al altered cell respiration and so the mitochondrial function. At this stage, it is impossible to differentiate any mechanism of action.

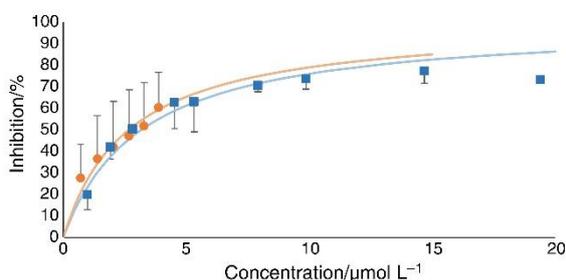


Fig. 4 Inhibition rate of oxygen uptake in the presence of different metal concentrations. Circles and squares represent the experimental values of Al and Cd, respectively. The solid lines represent the fit. Data are expressed as mean values \pm standard error of 10 independent experiments

Now, as previously reported, glucose catabolism can be coupled with oxygen uptake [24]. Indeed, let us recall that considering the enthalpy of glucose combustion $\Delta H^{\circ}c(\text{Glc}) = -468 \text{ kJ mol}^{-1}$ of O_2 [28]. The thermal value (p) can be expressed as: $p = \frac{d(\text{O}_2)}{dt} \times |\Delta H^{\circ}c(\text{Glc})|$. Considering an oxygen uptake of $\frac{d(\text{O}_2)}{dt} = 0.032 \pm 0.002 \text{ nmol O}_2/\text{s}/10^6$ cell, theoretical thermogenesis can be calculated as: $p = 0.032 \times 468 = 15 \text{ pW/cell}$.

In this condition, overall results lead to the assumption that each metal, Ni, Cd and Al, acts on the glucose catabolism and the mitochondrial function according to a specific mechanism of action. If the metals were inhibiting oxygen consumption, which is directly linked to glucose catabolism, cell respiration and cell thermogenesis would decrease proportionally and similar IC_{50} would be found, but this is not the case in this study. Indeed, Al thermogenesis is not affected in the concentration range used, and $IC_{50} = 2.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ for respiration. For Cd, $IC_{50} = 132 \pm 18$ and $3.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for thermogenesis and respiration, respectively. This strongly suggests that even if Cd and Al have possible toxic effects on glucose catabolism coupled with respiration, they may act by a specific pathway remaining to be elucidated.

To comfort this assertion, the effect of the metals was determined on thermogenesis and cell respiration after a previous incubation of 24 h. The results of this set of experiments are reported in Table 1. Ni, Cd and Al were used at the same concentration of $40 \mu\text{M}$ corresponding to the maximum of Al solubility, in our experimental conditions. Cd led to fibroblast death, and both Al and Ni increased thermogenesis and cell respiration by comparison with the control.

This original observation indicates that Al and Ni stimulate NHDF bioenergetics. Hence, the exposure time plays a role in cellular response. As found in other works [29–31], it is possible that metals, by stress effects, modify the global metabolism of fibroblasts. This phenomenon might reflect an adaptation of the cells to an aggressive agent as an attempt of survival. In this context, a new study might be designed to refine these findings.

Table 1 Heat released and oxygen uptake of NHDF exposed 24 h to Ni and Al

	Ni	Al	Literature data ^a
Thermogenesis pW/cell	25 ± 2	25 ± 3	15 ± 5
Oxygen uptake nmol $\text{O}_2/\text{s}/10^6$ cell	0.064 ± 0.010 $n = 5$	0.088 ± 0.012 $n = 8$	0.032 ± 0.002

Data are expressed as mean values \pm standard error of $n = 5$ and $n = 8$ independent experiments for Ni and Al, respectively

^a [18, 19]

Conclusions

Microcalorimetry and oximetry are suitable and effective tools to study human fibroblast bioenergetics and its alteration by toxic compounds such as Ni, Cd and Al, the object of the present work. In the concentration range used, Cd is the most toxic, acting both on glucose catabolism and cell respiration, whereas Al inhibits only respiration and Ni has no observed effects. Surprisingly, an extended contact induces a reverse effect leading to an increase in glucose metabolism and cell respiration. This original finding highlights the complexity of the mechanism involved. Moreover, it might emphasize a strong change for NHDF metabolism corresponding to the cell response to survive in hostile environments. Metabolomics studies are in progress to support this hypothesis. Finally, this preliminary study could be at the origin of a large research field taking into account the different factors and responses between cell cultures and a whole organism which would require confirmation by a number of experiments.

Acknowledgements We would like to thank Ms. Caroline Montet, translator, for her precious assistance in the correction of this article during the reviewing.

References

- Gerhardsson L, Oskarsson A, Skerfving S. Acid precipitation effects on trace elements and human health. *Sci Total Environ*. 1994;153:237–45.
- Miquel J. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. In: Office parlementaire des choix scientifiques et technologiques. 2001. <http://www.senat.fr/rap/100-261/100-2611.pdf>. Accessed 8 June 2015.
- Belgium rapporteur. Cadmium metal and cadmium oxide. European Union summary risk assessment report. 2008; 83.
- Romero A, Ramos E, de Los Rios C. A review of metal-catalyzed molecular damage: protection by melatonin. *J Pineal Res*. 2014;56:343–70.
- Jarup L, Berglund M, Elinder CG. Health effects of cadmium exposure a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*. 1998;24:240.
- Nair AR, Smeets K, Keunen E. Renal cells exposed to cadmium in vitro and in vivo: normalizing gene expression data. *J Appl Toxicol*. 2015;35:478–84.
- IARC Working Group. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monogr Eval. 1993;58:415.
- Schaumloffel D. Nickel species: analysis and toxic effects. *J Trace Elem Med Biol*. 2012;26:1–6.
- IARC monographs. 2015. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. Accessed 08 June 2015.
- Crisponi G, Nurchi VM, Faa G. Human diseases related to aluminium overload. *Monatsh Chem*. 2011;142:331–40.
- Becaria A, Campbell A, Bondy SC. Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health*. 2002;18:309–20.
- Julka D, Vasishta RK, Gill KD. Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rat. *Biol Trace Elem Res*. 1996;52:181–92.
- Lal B, Gupta A. Aluminum ingestion alters behaviour and some neurochemicals in rats. *Indian J Exp Biol*. 1993;31:30–5.
- Qiao Y, Ma L. Quantification of metal ion induced DNA damage with single cell array based assay. *Analyst*. 2013;138:5713–8.
- Oliveira H, Monteiro C, Pinho F. Cadmium-induced genotoxicity in human osteoblast-like cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ*. 2014;775:38–47.
- Demirel Y, Sandler SI. Thermodynamics and bioenergetics. *Biophys Chem*. 2002;97:87–111.
- Chen X, Feng W, Yu Y. Studies on the nongrowth metabolism of the different strains of tetrahymena cells by isothermal microcalorimetry. *J Therm Anal Calorim*. 2014;115:2145–9.
- Zhang Z, Qu Z, Han C, Gu X. Study on damage of pig renal cell induced by CdTe quantum dots and their toxicity to Wnt pathway by microcalorimetry. *J Therm Anal Calorim*. 2015;120:369–74.
- Martin L, Gonzalez-Coloma A, Burillo J, Palavra A, Urieta J, Mainar A. Microcalorimetric determination of the activity of supercritical extracts of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) over *Spodoptera littoralis*. *J Therm Anal Calorim*. 2013;111:1837–44.
- Domek MJ, Robbins JE, Anderson ME. Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper. *Rev Can Biol Exp*. 1987;33:57–62.
- von Heimburg D, Hemmrich K, Zachariah S. Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005;146:107–16.
- Truesdale GA. The solubility of oxygen in pure water and seawater. *Nature*. 1954;173:1236.
- Liu W, Chaspoul F, Lefranc DB. Microcalorimetry as a tool for Cr(VI) toxicity evaluation of human dermal fibroblasts. *J Therm Anal*. 2007;89:21–4.
- Liu W, Chaspoul F, Botta C. Bioenergetics and DNA alteration of normal human fibroblasts by hexavalent chromium. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;29:58–63.
- Maskow T, Paufler S. What does calorimetry and thermodynamics of living cells tell us? *Methods*. 2014;76:3–10.
- Böttcher H, Furst P. Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures. *Baillere Clin Endocrinol*. 1997;11:739–52.
- Gebreselassie D, Schon A. Energy metabolism of non-transformed and benzyrene-transformed 3T3 cells: a microcalorimetric study. *Bioenergetics*. 1993;1143:211–4.
- Gnaiger E, Kemp RB. Anaerobic metabolism in aerobic mammalian cells: information from the ratio of calorimetric heat flux and respirometric oxygen flux. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1016:328–32.
- Damelin L, Vokes S, Whitecutt JM. Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. *Hum Exp Toxicol*. 2000;19:420–30.
- Stebbing ARD. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ*. 1982;22:213–34.
- Roux DJ, Kempster PL, Truter E, van der Merve L. Effect of cadmium and copper on survival and reproduction of *Daphnia pulex*. *Water SA*. 1993;19:268–80.

Accepted Manuscript

Direct DNA interaction and genotoxic impact of three metals: cadmium, nickel and aluminum

Catherine Belliardo, Carole Di Giorgio, Florence Chaspoul, Philippe Gallice, David Bergé-Lefranc

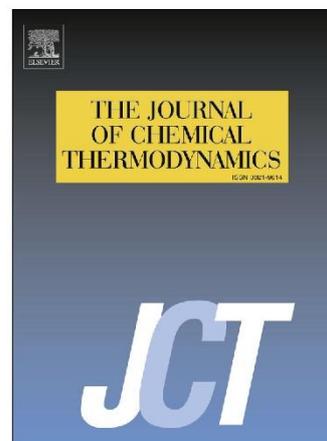
PII: S0021-9614(18)30348-3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.05.028>
Reference: YJCHT 5427

To appear in: *J. Chem. Thermodynamics*

Received Date: 3 November 2017
Revised Date: 26 April 2018
Accepted Date: 24 May 2018

Please cite this article as: C. Belliardo, C.D. Giorgio, F. Chaspoul, P. Gallice, D. Bergé-Lefranc, Direct DNA interaction and genotoxic impact of three metals: cadmium, nickel and aluminum, *J. Chem. Thermodynamics* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.05.028>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Direct DNA interaction and genotoxic impact of three metals: cadmium, nickel and aluminum

Catherine Belliardo, Carole Di Giorgio, Florence Chaspoul, Philippe Gallice, David Bergé-Lefranc

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université, UMR CNRS IRD Avignon Université, Campus Timone – Faculté de Pharmacie, 27, boulevard Jean-Moulin, F-13385 Marseille cedex 05, France; email : david.berge-lefranc@univ-amu.fr

Abstract

This study simultaneously investigates direct DNA interaction and genotoxic impact of three typical metals: aluminum, cadmium and nickel, which the high concentration in soils and which the industries use, result in a daily significant exposure to humans. The three of them are suspected to be involved in carcinogenesis which implies genomic lesions. We propose to first study their genotoxic impact in vivo on primary normal human dermal fibroblast (NHDF) cells with comet assay at pH 7 to measure DNA breaks occurrence. Then, to characterize the metal/DNA interaction by isothermal titration calorimetry (ITC).

Comet assay shows that Cd and Ni are genotoxic, they are responsible for DNA breaks starting from 1.10^{-4} mol.L⁻¹ and 5.10^{-2} mol.L⁻¹, respectively whereas Al has no effect (on DNA at pH7) as studied by ITC at pH 7. Cd and Ni present an electrostatic interaction with DNA phosphate groups. At high Cd concentration, a DNA condensation is observed by contrast. Al has no interaction with DNA phosphate groups, but at pH 4 the electrostatic interaction is strong and the same DNA condensation phenomenon is observed. Metal genotoxic effect seems linked to the electrostatic interaction on DNA phosphate groups. Genotoxic power evolves in parallel to DNA phosphate interaction strength as Cd > Ni > Al. If this study shows that metals ions do not directly break DNA, this binding could be a preferential site for damage due to reactive oxygen species.

Key words: aluminum; cadmium; nickel; isothermal titration calorimetry; genotoxicity; DNA binding

1. Introduction

This study examines three metal, aluminum, cadmium and nickel, which the high concentration in soils and which the industries use result in a daily significant exposure to humans. If toxicity of Cd and Ni is clearly established, it is not the case of Al whose effects are still controversial. Indeed, chronic exposure to Cd leads to tubular and glomerular dysfunction and then to renal insufficiency accompanied by bone disorders [1-3]. Since 1973, Cd is considered as responsible for professional diseases and has been classified in group 1 carcinogenic agent by the IARC [4]. In the same way, Ni, which we handle daily with coins, jewelry or zippers, is recognized as one of the most allergenic metals [5, 6]. Moreover, besides leading to contact dermatitis, this metal is also classified as a potentially carcinogenic substance for humans by the IARC [7] and a chronic exposure to nickel is registered as a risk factor for lung cancer in the professional illness table. Finally, Al is said to be responsible for dialysis encephalopathy, osteoporosis and osteomalacia [8]. It accumulates in bones and brain leading to memory and learning disorders, but also inducing neurodegenerative pathologies [9-11]. If its role in breast cancer has been mentioned [12, 13] but not clearly established, according to precautionary principle its action as a carcinogen cannot be totally invalidated. However, if the entire mechanism of action of these metals remains mostly unknown, their carcinogenesis abilities cannot be ignored. In this condition, it is relevant to consider their impact on the genome that, when altered, may lead to tumors. The aim of this study is to determine if these metals have an impact on the genome in physiological conditions. Then, if so, to quantify and model this impact. So, at first, the impact on Al, Cd and Ni on the genome was evaluated on human cells by comets assay. Secondly, the chemical interaction between metal ions and DNA was defined, using isothermal titration calorimetry (ITC), then the interaction was studied by the McGhee von Hippel model [14].

2. Materials and methods

2.1 Reagents

The table 1 gather all the reagents used.

Chemical Name	Source	Initial Mole Fraction Purity	Purification Method	Final Mole Fraction Purity	Analysis Method
Cadmium chloride	Aldrich [®]	0.999	-	-	-
Nickel chloride	Aldrich [®]	0.999	-	-	-
Aluminum Chloride	Fluka [®] analytical	0.999	-	-	-
NHDF	Lonza [®]	-	-	-	-

Trypsine-EDTA	Gibco [*]	-	-	-	-
PBS	Sigma-Aldrich [*]	0.999	-	-	-
Sodium chloride	Sigma-Aldrich [*]	0.995	-	-	-
TRIS buffer	AppliChem of Biochemical Chemical Synthesis Services	0.995	-	-	-
MES buffer	Sigma-Aldrich [*]	0.995	-	-	-
DNA from salmon sperm	Sigma-Aldrich [*]	-	-	-	-
DMSO	Sigma-Aldrich [*]	0.997	-	-	-
L-lauroyl Sarcosinate	Sigma-Aldrich [*]	0.997	-	-	-
Agar-agar	Sigma-Aldrich [*]	-	-	-	-
Ethidium bromide	Sigma-Aldrich [*]	0.995	-	-	-
Methanol	Sigma-Aldrich [*]	0.998	-	-	-

Table 1: Sample table

The metal used were chlorides salts at high purity (99.9%): Cd (II) and Ni (II) were from Aldrich[®] and Al (III) from Fluka[®] analytical.

Primary normal human dermal fibroblasts (NHDF) were purchased from Lonza[®]. Fibroblast basal medium-2 (FBM-2) supplemented with a growth kit containing 10 mL of fetal bovine serum, 0.5 mL of insulin, 0.5 mL of gentamicin sulfate amphotericin-B (GA-1000), and 0.5 mL of r-human fibroblast growth factor-B were also from Lonza[®]. During the harvest, NHDF were treated by Trypsine-EDTA (1x) 0.05% purchased from Gibco[®].

Sodium chloride (NaCl) used in aqueous solution was from Sigma-Aldrich[®] and $\geq 99.5\%$ of purity.

The TRIS (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) and MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) buffers were from AppliChem of Biochemical Chemical Synthesis Services and from Sigma-Aldrich[®] and $\geq 99.5\%$ of purity (titration) respectively.

The DNA used in thermal analysis experiment was low molecule weight from salmon sperm from Sigma-Aldrich[®].

Low Melting Point and Normal Melting Point agars, L-lauroyl sarcosinate, dimethylsulfoxide, Triton X-100, ethidium bromide and methanol of analytical grade were from Sigma-Aldrich[®].

2.2 Cell culture

Fibroblasts were routinely cultured in culture medium (FBM-2) in sterile boxes for cell culture with an area of 75 cm² (T75) and maintained at 37°C and 5% CO₂. When cells were at confluence, FBM-2 was discarded and cells were treated with the trypsin solution during 2 minutes at 37°C. The cell suspension obtained was diluted in FBM-2 and introduced into new T75 boxes. NHDF were then used for all experiments between passages 5 and 8.

2.3 Comet assay

The comet assay performed was the alkaline comet assay as described by Singh [15]. NHDF were harvested, put in a 24 multi-wells plate to get 160 000 cells per well and incubated during 24 hours before treatment. At the end of the 2 hours exposure period with a concentration of Cd ranges between 50 and 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Ni from 5 to 50 mmol.L^{-1} and Al from 1 to 10 mmol.L^{-1} , cells were trypsinized with 0.05% trypsin-0.02% EDTA in PBS for 3–5 minutes at 37°C, and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. Following the trypsin/EDTA treatment, cells were mixed with PBS and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. During cell centrifugation, a first layer of 85 μl of 0.8% NMP agarose (in PBS) was deposited on microscope slides, previously coated with 2% NMP agarose (in PBS) and allowed to dry for 12 hours. Coverslips were placed over this layer and the agarose was left to harden during 5 minutes on ice. After centrifugation coverslips were removed, cell pellets were mixed with 75 μl of 0.5% LMP agarose (in PBS) and deposited onto the microscope slides. Two slides were prepared for each sample. Coverslips were placed over the cell layer and the agarose was left to harden during 5 minutes on ice. Then, coverslips were removed, and a third layer with 85 μl of 0.8% agarose (in PBS) was added over the cells. A coverslip was applied, and the agarose was allowed to solidify during 5 minutes on ice.

The slides were immersed in freshly prepared lysis solution (2.5 mol.L^{-1} NaCl, 100 mmol.L^{-1} Na_2 EDTA, 10 mmol.L^{-1} Tris (pH 10), 1% L-lauroyl sarcosinate, with 10% dimethylsulfoxide and 1% Triton X-100 added just before use) for 90 min at 4°C. After the lysis procedure, the slides were placed side-by-side in a horizontal gel electrophoresis tank, which was filled with fresh electrophoresis buffer (300 mmol.L^{-1} NaOH, 1 mmol.L^{-1} Na_2 EDTA pH >13). The slides remained in the buffer for 20 minutes at 25°C to allow DNA unwinding. Electrophoresis was then carried out in the same buffer for 20 minutes at 25 V and 300 mA. Following electrophoresis, the slides were washed three times for 5 minutes each with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5) to neutralize the alkali. Finally, the slides were rinsed with ultra-pure water, dehydrated in 100% methanol and dried for 12 hours at room temperature. Each slide was stained with 50 μl of 2 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide and covered with a coverslip.

The cells were examined at 250X Magnification using a BX53-RFL fluorescence microscope (Olympus Optical Co. Tokyo, Japan) equipped with a U-MWG2 dichroic mirror (band-pass filter, 510-550 nm; long-pass filter, 590 nm) and a UPLFLN 20x objective. Image analysis was performed using the Komet software (version 6.0 Andor Technology, Belfast, Northern Ireland). A total of 50 randomly selected cells were analyzed per slide using Fenestra Komet

6.0 image analysis software Andor Technology (Belfast, Northern Ireland). DNA damage was expressed as the Olive Tail Moment (OTM; arbitrary units); 100 OTM values were determined for each sample, 50 from each of two separate slides/sample. The 100 calculated OTM values by sample were distributed into 30 classes between the minimal and the maximal values: each class interval corresponded to 1.4 OTM arbitrary units. A non-linear regression analysis was performed on the OTM distribution frequencies by using a χ^2 function with Table Curve 2D software (version 5.0; Jandel Scientific Software, San Rafael, CA). The calculated degrees of freedom (n) for this function were quantitative measures of the DNA damage for a sample [16, 17]. The n was termed χ^2 OTM and was used as the sole parameter for assessing levels of DNA damage. The significance of the differences between χ^2 OTM values of control and treated cells was analysed using Student's t-test.

2.4 Calorimetry

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was performed on a Microcal ITC 200 instrument (Microcal, Northampton, United States) at 37°C unless otherwise specified in TRIS (5 mmol.L⁻¹ and pH = 7) or MES (5 mmol.L⁻¹ and pH = 4) buffer. Metal ions solutions, at 8 mmol.L⁻¹ for Al and 10 mmol.L⁻¹ for Cd and Ni, were obtained after metal dissolution in water with NaCl and buffer whose different NaCl concentrations were used to compare ionic strength effects. The metal ion solution was added sequentially after an initial injection of 0.1 μ L (not used in data fitting) [18] by adding 30 injections of 1.3 μ L at 90s of intervals. The measuring cell contained a DNA solution at the initial concentration of 2 mmol.L⁻¹ of phosphate groups, solubilized in the same buffer and at the same pH, as the metal ion solution. The apparatus has a 200 μ L sample cell volume. These concentrations (*a priori* high) were chosen to obtain the most accurate heat flow and do not change the parameters and the thermodynamics of the interaction. The reference power and the feedback gain were modified according to the thermal power of peaks. Each experiment was performed three times. Peaks were integrated and heats of dilution subtracted, yielding the heat values of each injections.

The binding between metal cations and phosphate groups of DNA were studied using McGhee von Hippel model [19]. DNA is considered as a mono-dimensional lattice with n sites *i.e.* phosphates. Each metal cation during the binding blocks the accessibility to L number of phosphates. Along the DNA saturation, the number of metal cations bound per

nucleotide is defined as:

$$\theta = \frac{[M^{L+}]}{[P^-]_t}$$

(1)

Here $[M^{L+}]$ and $[P^-]_t$ represent the concentration of metal cation bound and the total concentration of DNA phosphate groups, respectively. Considering the ionic interaction, the θ value is ranged between 0 and n/L . If infinite lattice is considered and end-effects disregarded, the theoretical isotherms of McGhee von Hippel [14] is obtained:

$$\frac{\theta}{[M^{L+}]_f} = K \cdot (n - L \cdot \theta) \cdot \left(\frac{n - L \cdot \theta}{n - (L-1) \cdot \theta} \right)^{(L-1)} \quad (2)$$

Here variables are defined as in (1), $[M^{L+}]_f$ is the free metal cation concentration, K is the binding constant and n is the number of repeating units per DNA (in our case the value is equal to 1 due to the consideration of DNA phosphate group concentration).

For $L > 1$, an apparent negative cooperation between ligands occurs during binding frequently called entropic resistance to saturation. In the ionic interaction, L can represent the size but also the charge of metal cation. The binding polynomial can be written as:

$$([M^{L+}]_t - \theta \cdot [P^-]_t) \cdot (n - L \cdot \theta)^L - \frac{\theta \cdot (n - \theta \cdot (L-1))^{(L-1)}}{K} = 0 \quad (3)$$

The polynomial obtained possesses only one root presenting physical meaning *i.e.* being superior to zero and lower than $1/L$.

The determination of the root was performed using a library of numerical routines from NAG (Numerical Algorithms Group, Inc) included in Origin 9.1. The NAG function c05tbc is a function which finds a non-linear system equations solution by a modification of the Powell hybrid method [20]. The iteration procedure was continued until both chi-square tolerance value and coefficient of determination values equal to 10^{-9} and 0.995 were respectively reached.

For each injection, considering the mass balance and the cell volume, the total concentration of each reactant in the cell is calculated. From these concentrations, the iteration process leads to the determination of L , K and θ . Finally, the heat effect for each injection q_i is calculated from:

$$q_i = \frac{\partial \theta}{\partial R} \cdot \Delta H^\circ \quad (4)$$

where R represent the ratio $[M^{L+}]_t / [P^-]_t$.

The use of Levenberg-Marquardt algorithm in a nonlinear curve fitting procedure allows the determination of L, K and ΔH° values from the experimental data.

3. Results

3.1 Comet assay

Comet assay was performed in order to measure the induction of DNA-strand breaks by metal ions.

As comet assay was significant by using metal ion concentrations lower than those inducing cytotoxicity, the value was determined by MTT assay at 2h. Then IC₅₀ was found equal to 1.10^{-3} M, 3.10^{-3} M and 4.10^{-3} M for Cd, Ni and Al respectively (data not shown).

Cadmium and nickel induced a significant increase of DNA-lesions, while aluminium did not exert genotoxic activity. Cadmium induced the most important DNA damage with a significant induction of comets at $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (fig.1). Nickel appeared far less active, with comets significantly present at 50 mmol.L^{-1} ($p < 0.001$) (fig.2), a concentration which is about 10^6 over blood concentration [21] (Ivanenko et al., 2012). Aluminium was not responsible of any damaging impact on DNA at concentrations tested (fig.3).

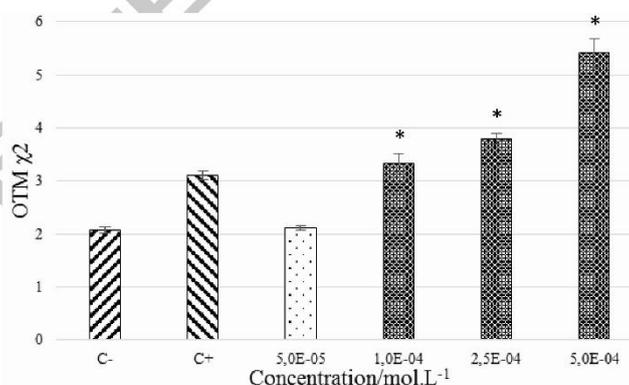


Figure 1: Cadmium impact on DNA. The first bar is the positive control. Significant assay are represented by the dark bars with stars ($p < 0.001$)

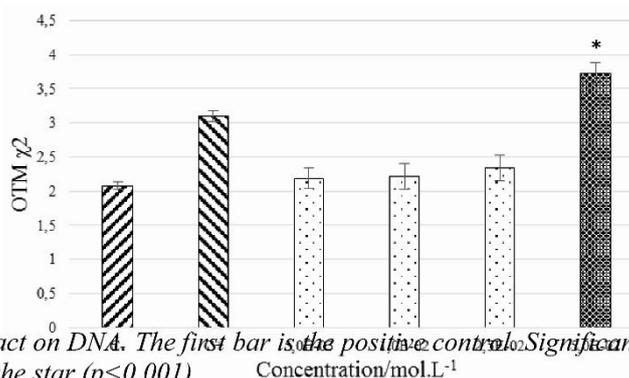


Figure 2: Nickel impact on DNA. The first bar is the positive control. Significant assay is represented by the dark bar with the star ($p < 0.001$)

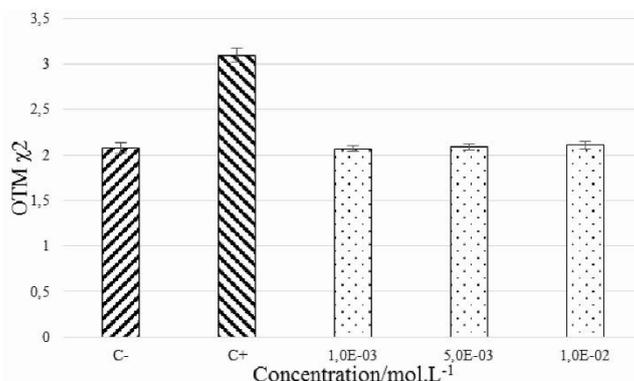


Figure 3: Aluminum impact on DNA. The first bar is the positive control. No significant result

The genotoxic impacts of cadmium and nickel confirmed previously published data [22, 23], while the absence of genotoxicity of aluminum was also demonstrated [24]. However, the strength of the toxic action that occurred is different. Indeed, cadmium acts at lower concentrations than nickel, 1.10^{-4} versus 5.10^{-2} mol.L⁻¹ respectively.

Over 4.10^{-5} mol.L⁻¹, at pH 7 and under physiological condition in aqueous medium at 0.15 mol.L⁻¹ NaCl, aluminum is not present as a free trivalent cation (Al^{3+}) but under different complexes as illustrated in (fig. 4) (only monomolecular complexes are considered) [25-27]. The lack of genotoxic effect may be explained considering that at pH equal to 7 the Al^{3+} specie is negligible and the major fraction (more than 95%) of aluminum is under $[Al(OH)_4]^{-}$ form.

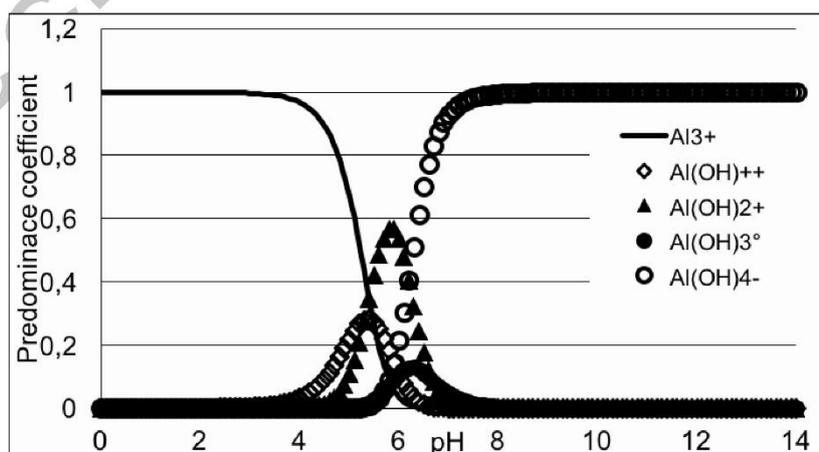


Figure 4: Species predominance diagram of aluminum 0.008 mol.L⁻¹ in water at NaCl concentration = 0.150 mol.L⁻¹

3.2 Isothermal titration calorimetry

At first, interaction between each metal ion and DNA are performed at constant ionic strength obtained with a NaCl solution (0.150 mol.L^{-1}) and pH 7 in order to mimic the physiological conditions, Al was tested also at pH 4. Results obtained for interactions are given in Table 2.

Table 2: Thermodynamic Parameters of Interaction at $37 \pm 0.02^\circ\text{C}$ and $1013 \pm 19 \text{ hPa}$, (pH = 7 in TRIS buffer or pH = 4 in MES buffer) and NaCl concentration of 0.150 mol.L^{-1}

Metal	pH	L	K/L.mol ⁻¹	$\Delta H^\circ/\text{kJ.mol}^{-1}$	R ²
Cd ²⁺	7	6.7 ± 0.4	57 ± 4	-24.4 ± 1.2	0.993
Ni ²⁺	7	6.5 ± 0.2	26 ± 3	-20.3 ± 0.9	0.999
Al ³⁺	7	NB ^a	NB	NB	NB
Al ³⁺	4	3.4 ± 0.1	2021 ± 57	8.4 ± 0.4	0.999

^aNB = not bound, L = size of phosphate sites involve during binding, ΔH° = binding enthalpy change, K = Affinity constant.

The non-specific electrostatic binding of the model is validated by the good values of the coefficient of determination (R²). The enthalpy driven of the process confirms that the binding is driven by an electrostatic interaction between the negative charge of the DNA phosphate groups and the positive charge of metal cation. The binding of metal cation on the phosphate groups decreases the charge density of DNA and then diminishes the affinity of Ni²⁺ and Cd²⁺ toward DNA. The interaction intensity evolves with metal ion concentration. Indeed, affinity is high at weak cation concentration and decreases when concentration increases (due to the DNA charge density diminution). This nature of the interaction excludes the validity for using a single independent site model and may lead to thermodynamic parameters without sense.

In these experimental conditions, divalent cations exhibit similar thermodynamic parameters with a binding constant and enthalpy slightly more favorable to Cd²⁺ than Ni²⁺. This stronger affinity of Cd²⁺ to phosphate groups, can be related to the weaker solubility of Cd₃(PO₄)₂ than Ni₃(PO₄)₂. Moreover, this difference of behavior on the affinity to DNA was observed in a previous study of the interaction between Cd²⁺ and Ni²⁺ on DNA helicity [28]. At pH 7, no binding can be observed with aluminum, which confirm Wu et al. [29] observations performed at pH = 6. As said above, in acid conditions aluminum is present under Al³⁺ specie, therefore interaction experiments were performed at pH = 4 in order to compare the

interaction of Al^{3+} to Cd^{2+} and Ni^{2+} (fig.5). This result clearly shows that from a chemical point of view, aluminum interacts with DNA only under cationic form. The interaction between Al^{3+} and DNA is largely entropy driven coupled with an unfavorable enthalpy. This calorimetric signature and the pH range of binding were already mentioned in a previous study using a single set of identical sites model [29]. This strong interaction of Al^{3+} with phosphates is well known and frequently met in biological systems contrary to the affinity variation during the binding [30, 31]. The electrostatic component of the interaction is in agreement with DFT quantum mechanical calculations describing the phosphate of DNA as strong chelators [32, 33].

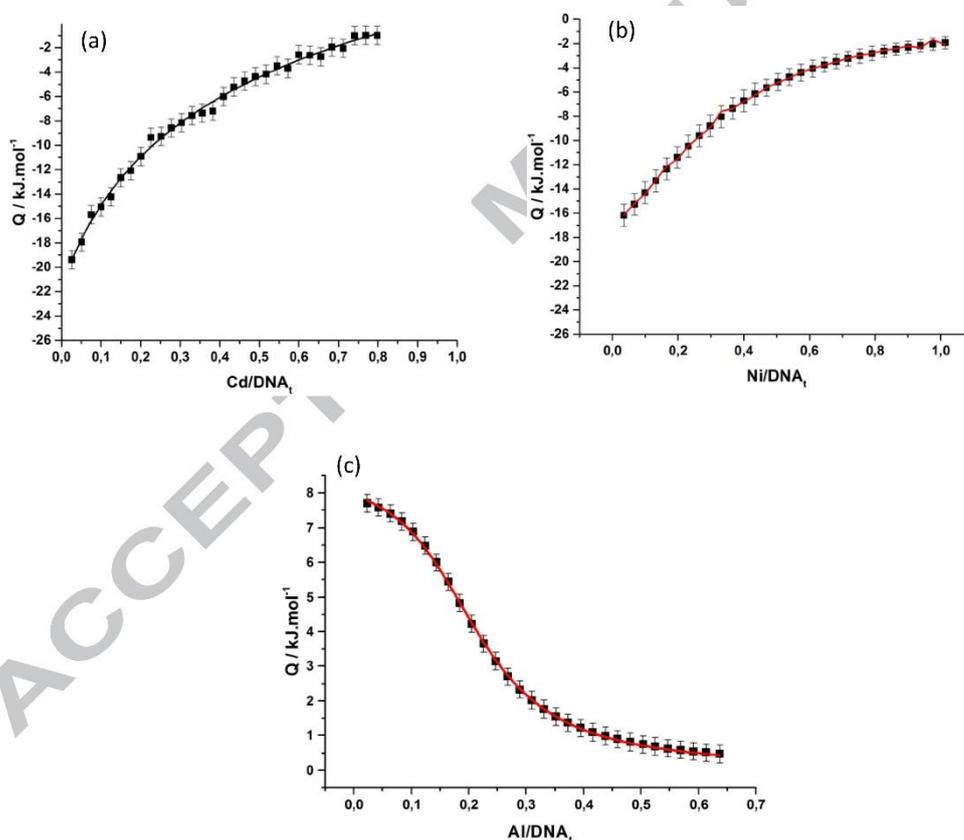


Figure 5: (a) Isothermal titration curves of Cd^{2+} , at 37°C at $0.150 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl in TRIS buffer at pH 7. (b) Isothermal titration curves of Ni^{2+} , at 37°C at $0.150 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl in TRIS buffer at pH 7. (c) Isothermal titration curves of Al^{3+} , at 37°C at $0.150 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl in MES buffer at pH 4. Error bars correspond to the mean standard error.

Ionic strength influence

As electrostatic interaction and binding constant are strongly dependent of the ionic strength, experiments are performed next at different NaCl concentrations [34, 35]. Indeed, the electrostatic component of the interaction depends on the salt concentration and on the non-electrostatic component, as described by the following equation [36]:

$$\ln(K) = \ln(K_{NE}) - n \cdot \ln[NaCl] \quad (5)$$

here K_{NE} represents the binding constant of the non-electrostatic component of the interaction, n is the number of counter-ions displaced from the phosphate groups of DNA and $[NaCl]$ is the salt concentration.

Ionic strength is then decreased by diminishing the NaCl concentrations at $pH = 7$ for Cd^{2+} and Ni^{2+} . In the Al^{3+} case, pH is fixed at 4 to isolate the trivalent specie aluminum. The affinity constant evolution versus the sodium chloride concentration is plotted in figure 6. The constant affinity at value weak ionic strength can only be measured on Ni^{2+} titration. Indeed, in the case of Cd^{2+} a condensation of DNA occurred. This behavior is often observed when a critical concentration of cation is reached. The DNA phosphate groups involve a charge density equal to $-0,4712 \text{ nC.m}^{-1}$ (two negative charges per 0.34 nm). When metal cation is added, the negative charges of DNA backbones are neutralized and lead to the condensation and aggregation of DNA (the phenomenon is easily observed due to the turbidity occurring in the sample cell) [37, 38]. This DNA condensation during Cd^{2+} titration can be observed in figure 7. Since a value of $Cd^{2+}/DNA-P$ about 0.2 is reached, a large endothermic peak appears due to DNA condensation. This behavior does not allow an usable fit of the titration curve. This value of 0.2 has already been observed in a previous electrophoresis study mentioning a Cd^{2+}/DNA stoichiometry of 1/5 i.e. 0.2 [39]. Once again this condensation process occurs only with Cd^{2+} , which confirms the strongest interaction of Cd^{2+} versus Ni^{2+} . This absence of transformations in Ni^{2+} interaction case is in accordance with UV spectroscopic investigations [40].

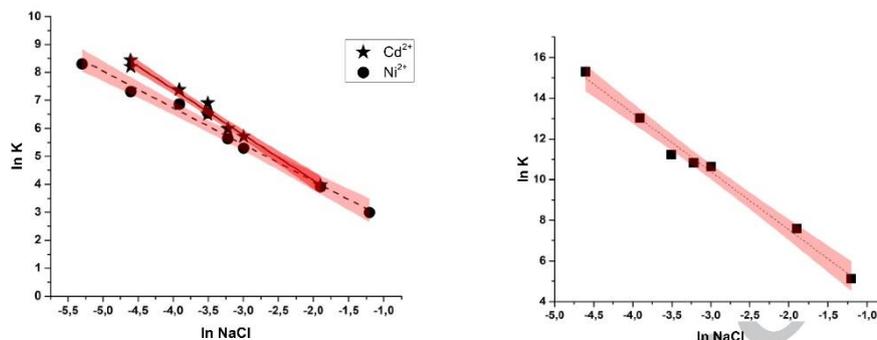


Figure 6: Dependence of the affinity constant on sodium chloride concentration. (a) Dashed and solid lines represent the linear fitting for Cd^{2+} and Ni^{2+} . (b) Dashed and solid lines represent the linear fitting for Al^{3+} . The shade bands around the linear fits represent the 0.95 level of confidence.

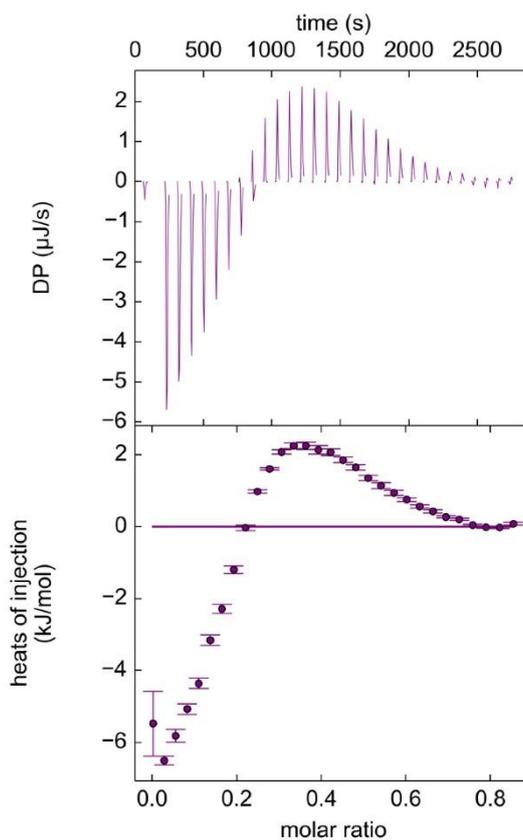


Figure 7: Isothermal titration curve of Cd^{2+} binding to DNA at 37°C in TRIS buffer at 5 mmol.L^{-1} with NaCl concentration lower than 5 mM . The upper curve shows the heat flow versus the time and the lower part shows the heat versus the $\text{Cd}^{2+}/\text{DNA-P}$ molar ratio [41].

Interaction mechanism

The natural logarithm plot of the affinity constant versus the natural logarithm of NaCl concentration exhibits a linear evolution associated with coefficients of determination (R^2) equal to 0.988, 0.983 and 0.989 for Ni^{2+} , Cd^{2+} (fig. 6.A) and Al^{3+} (fig. 6.B), respectively. This behavior is characteristic of the coulombic component governing the interaction. Indeed, Al^{3+} , Cd^{2+} and Ni^{2+} need to displace Na^+ to bind DNA phosphate groups. The increase of ionic strength involves a less favorable electrostatic entropy leading to a weaker binding. This is only watched at high NaCl concentrations [42]. In the Al^{3+} case, the slope value is equal to 2.86 ± 0.13 , leading to the displacement of 2.86 charges to bind one Al^{3+} ion. This displacement of counter-ions by aluminum is well known and can occur even with divalent counter-ions such as Mg^{2+} [43]. The amounts of counter-ions displaced by binding of Cd^{2+} and Ni^{2+} is equal to 1.63 ± 0.07 and 1.38 ± 0.07 respectively, which ascertain the strongest affinity of Cd^{2+} versus Ni^{2+} to DNA. These values of exchanged counter-ions are in the range of the ones observed during DNA and cationic ligand interaction, about 0.88 z (z represents the ligand valence) [44-46].

4. Discussion

Comet assay showed that cadmium and nickel had an impact on DNA while aluminum did not, at pH 7. These observations were congruent with thermal analysis results. Indeed, the most damaging metal cation was Cd^{2+} , according to comet assay, and it was also the strongest linked to DNA. Ni^{2+} had an intermediate effect in both experiments, and aluminum did not damage DNA in comet assay and was not linked to DNA phosphates. This may be explained by considering that at pH 7 aluminum is mainly present under $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ form. To obtain Al^{3+} the pH value must be lower than 4 but these acidic conditions are responsible for cytotoxicity, mutagenic and clastogenic effects on cells [47, 48]. In this condition, legitimate questions can be raised about studies which find genotoxic effects over $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ of Al^{3+} concentrations. If pH is kept at pH 7 (like in our study), Al^{3+} is no longer involved while other species, not entirely soluble, are present. According to comet results, no “tank effect” with aluminum appeared; undissolved aluminum amount did not impact DNA, there were no breaks. Over $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$, Al^{3+} should not be the specie tested.

According to these experiments, the genotoxicity of these metal ions seemed to be related to DNA phosphates: the strongest metal cation linked (Cd^{2+}) was also the most genotoxic. At the same time, the less bounded (aluminum) was the less toxic. However, these experiments

confirm that the genotoxic effect of Cd^{2+} and Ni^{2+} is indirect [49]. Indeed, despite the high energy value of the bond, no heat peaks of thermal events have been measured excluding the possibility of direct DNA break.

Metal ions are known to act indirectly by generating reactive oxygen species (ROS) [50-52] which are responsible for DNA base oxidation resulting in DNA breaks. Metal cation linked to DNA phosphate groups could modify DNA electric charge repartition and ease ROS access until bases. Furthermore, the condensation effect observed with Cd^{2+} means that this metal has an impact on DNA conformation which could lead, after too much tension, to DNA break.

5. Conclusions

Two metal ions are responsible for a genotoxic effect under physiological conditions: cadmium and nickel. These two, in the same condition, present an electrostatic interaction between the positive cation metal charge and the negatively charged DNA phosphate groups, influenced by ionic strength. It appears that the most genotoxic metal ion (cadmium) is also the most bound metal ion to phosphate groups. Its interaction is so strong that a DNA condensation happens when every negative phosphate charges are saturated at high metal cation concentration. Furthermore, the strength of the interaction is highlighted by the amounts of displaced counter-ions: 1.63 ± 0.07 and 1.38 ± 0.07 for Cd^{2+} and Ni^{2+} , respectively. Differences in genotoxicity of Cd and Ni may be due to the interaction of the metal ion with DNA. Indeed, Cd induces a stronger change on DNA electric field than Ni. This phenomenon might play a role by facilitating the effect of other active compounds such as ROS. For aluminum, the interaction with DNA is strong at pH 4 and not observed at pH 7. While at these pH values the main species of aluminum are Al^{3+} and $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ respectively, it shows that only Al^{3+} is able to strongly bind phosphate groups of DNA in the same way than as Cd^{2+} and Ni^{2+} .

These results are in accordance to say that more than the metal ion studied, his chemical speciation, highly influenced by pH, is very important. In this way, the intracellular pH role should be emphasized; indeed, a variation in pH range may induce a modification of the metal ion specie and so of its distribution and action.

'Conflicts of interest: none'

References

- [1] Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G, 1998. Health effects of cadmium exposure a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 24, 240-240.
- [2] Renugadevi, J., Milton Prabu, S., 2009. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology.* 256, 128-134.
- [3] Nair, A. R., Smeets, k., Keunen, E., 2015. Renal cells exposed to cadmium *in vitro* and *in vivo*: normalizing gene expression data. *J. Appl. Toxicol.* 35, 478-84.
- [4] Group, I. W, 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monogr Eval.* 58, 415.
- [5] Schaumloffel, D., 2012. Nickel species: analysis and toxic effects. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 26, 1-6.
- [6] Cavani, A, 2005. Breaking tolerance to nickel. *Toxicology.* 209, 119-121.
- [7] Agent classified by the IARC Monographs, volumes 1-118 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>, 2015. Consulted : October 2017
- [8] Crisponi, G., Nurchi, V. M., Faa, G, 2011. Human diseases related to alualuminium. *Monatsh. Chem.* 142, 331-40.
- [9] Becaria, A., Campbell, A., Bondy, S. C, 2002. Aluminum as a toxicant. *Toxicol. Ind. Health.* 18, 309-20.
- [10] Julka, D., Vasishta, R. K., Gill, K. D, 1996. Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rat. *Biol. Trace. Elem. Res.* 52, 181-92.
- [11] Lal, B., Gupta, A., 1993. Aluminum ingestion alters behaviour and some neurochemicals in rats. *J. Exp. Biol.* 138, 5713-8.
- [12] Bakir, A., Darbre, P. D, 2015. Effect of aluminium on migration of oestrogen unresponsive MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *J. Inorg. Biochem.* 152, 180-185.
- [13] Exley, C., Charles, L. M., Barr, L., Martin, C., Polwart, A., Darbre, P. D, 2007. Aluminium in human breast tissue. *J. Inorg. Biochem.* 107, 1344-1346.
- [14] McGhee, J., von Hippel, P., 1974. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* 86, 469-489.

- [15] Singh, E. G., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of NDA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- [16] Bauer, E., Recknagel, R. D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., Greulich, K. O, 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutat. Res.* 398, 101-110.
- [17] Jean, S., De M eo, M., Sabatier, A. S., Laget, M., Hubaud, J. C., Verrando, P., Dum enil, G, 2001. Evaluation of Sunscreen Protection in Human Melanocytes Exposed to UVA or UVB Irradiation Using the Alkaline Comet Assay. *Photochem. Photobiol.* 74, 417-423.
- [18] Mizoue, L. S., Tellinghuisen, J., 2004. The role of backlash in the “first injection anomaly” in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 326, 125-127.
- [19] Velazquez-Campoy, A., 2006. Ligand binding to one-dimensional lattice-like macromolecules: analysis of the McGhee-von Hippel theory implemented in isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 348, 94-104.
- [20] Roots of One or More Transcendental Equations. (s.d.). NAG Library Function Document `nag_zero_nonlin_eqns_1` (c05tbc). Consulted: October 2017, on <http://www.originlab.com/pdfs/nagcl09/manual/pdf/C05/c05tbc.pdf>
- [21] Ivanenko, N. B., Solovyev, N. D., Ivanenko, A. A., Ganeev, A. A, 2012. Application of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry with High-Frequency Modulation Polarization for the Direct Determination of Aluminum, Beryllium, Cadmium, Chromium, Mercury, Manganese, Nickel, Lead, and Thallium in Human Blood. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 299–308.
- [22] Oliveira, H., Monteiro, C., Pinho, F., Pinho, S., Miguel, J., Ferreira de Oliveira, P., Conceiçao, S., 2014. Cadmium-induced genotoxicity in human osteoblast-like cells. *Mutation Research.* 775–776, 38–47.
- [23] Dally, H., Hartwig, A, 1997. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 18, 1021–1026.
- [24] Willhite, C. C., Karyakina, N. A., Yokel, R. A., Yenugadhati, N., Wisniewski, T. M., Arnold, I. M., Krewski, D., 2014. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 1–80.
- [25] Nordstrom, D. A., Wesomay, H. M., 1989. *The Environmental Chemistry of Aluminum - Aqueous equilibrium data for mononuclear aluminum species (Chap 2).* (G. Sposito,  ed.) Boca Raton FL: CRC Press.

- [26] Palmer, D. A., Wesolowski, D. J., 1993. Aluminum Speciation and equilibria in aqueous solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 57, 2929-2938.
- [27] Wesolowski, D. J., 1992. Aluminum Speciation and equilibria in aqueous solution. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 56, 1065-1092.
- [28] Eichhorn, G. L., Shin, Y. A., 1968. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 7323-7328.
- [29] Wu, J., Du, F., Zhang, P., Khan, I. A., Chen, J., Li, Y., 2005. Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: implications for the biological function of aluminum. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1145-1154.
- [30] Kiss, T., Zatta, P., Corain, B., 1996. Interaction of aluminum (III) with phosphate-binding sites biological aspects and implications. *Coord. Chem. Rev.* 149, 329-346.
- [31] Mellor, J. W., 1924. *A comprehensive Treatise of Inorganic and Theoretical Chemistry* (Vol. 5). Green London: Eds Longmans.
- [32] Luque, N. B., Mujika, J. I., Rezabal, E., Ugalde, J., 2014. Mapping the affinity of aluminum (III) for biophosphates: interaction mode and binding affinity in 1:1 complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 20107-20119.
- [33] Mazzuca, D., Russo, N., Toscano, M., Grand, A., 2014. On the Interaction of Bare and Hydrated Aluminum Ion with Nucleic Acid Bases and Monophosphate Nucleotides. *J. Phys. Chem. B.* 110, 8815-8824.
- [34] Mannin, G. S., 1969. Limiting laws and counter-ion condensation in polyelectrolyte solutions. Colligative properties. *J. Chem. Phys.* 51, 924-933.
- [35] Manning, G. S., 1978. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of nucleotides. *Q. Rev. Biophys.* 11, 179-246.
- [36] Privalov, P. L., Dragan, A. I., Crane-Robinson, C., 2011. Interpreting protein/DNA interactions: distinguishing specific from non-specific and electrostatic from non-electrostatic components. *Nucleic. Acids. Res.* 39, 2483-2491.
- [37] Wilson, R. W., Bloomfield, V. A., 1979. Counterion-induced condensation of desoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry.* 18, 2192-2196.
- [38] Widom, J., Baldwin, R. L., 1998. Cation-induced toroidal condensation of DNA: studies with $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. *J. Mol. Biol.* 144, 431-453.
- [39] Li, Y., Xia, Y. L., Jiang, Y., Yan, X. P., 2008. Extracting stoichiometry, thermodynamics and kinetics for the interaction of DNA with cadmium ion by capillary

electrophoresis on-line coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Electrophoresis*. 29, 1173-1179.

[40] Sorokin, A. V., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Volchok, I. V., 1996. Interaction of bivalent copper, nickel, manganese ions with native DNA and its monomers. *J. Inorg. Biochem.* 63, 79-86.

[41] Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, C. A., Schuck, P., 2012. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. *Anal. Chem.* 5066–5073, 84.

[42] Matulis, D., Rouzina, I., Bloomfield, V. A., 2002. Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: roles of electrostatics and hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7331-7342.

[43] Martin, R. B., 1992. Aluminum speciation in biology, Novartis Foundation Symposium. (D. K. Birchall, Éd.)

[44] Fenley, M. O., Russo, C., Manning, G. S., 2011. A Theoretical Assessment of the Oligolysine Model for ionic Interactions in Protein-DNA Complexes. *J. Phys. Chem. B.* 115, 9864-9872.

[45] Stickle, D. F., & Fried, M. G., 2007. Cation binding linked to a sequence-specific CAP-DNA interaction. *Biophys. Chem.* 126, 106-166.

[46] Revzin, A., 2000. *The Biology of Nonspecific DNA-Protein Interactions*. Boston: Ads CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor.

[47] GÜNGÖR, N., Knaapen, A. M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G., Chiu, R. K., van Schooten, F. J., 2010. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*. 25, 149–154.

[48] Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., Okamura, K., 1992. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 268, 297–305.

[49] Beyersmann, D., Hartwig, A., 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 82, 493–512

[50] Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie.* 11, 1549-1559.

[51] Yao, Y., Costa, M., 2014. Toxicogenomic effect of nickel and beyond. *Arch Toxicol.* 88, 1645–1650.

[52] Kumara, V., Balb, A., Gill, K. D., 2009. Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology*. 264, 137–144.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Highlights

- Nickel, cadmium and aluminum are ubiquitous metals known to induce human diseases.
- Anti-cooperative interaction between Cd^{2+} , Ni^{2+} and Al^{3+} with DNA
- In physiological conditions, cadmium and nickel present an electrostatic interaction with DNA phosphate groups whereas aluminum does not.
- Metal genotoxicity grows concomitantly to the intensity of the interaction with DNA phosphate groups.