



**HAL**  
open science

# Étude par spectroscopie RMN du carbone 13 de la toxicité métabolique du cadmium dans les tubules rénaux proximaux murins et humains

Hassan Faiz

► **To cite this version:**

Hassan Faiz. Étude par spectroscopie RMN du carbone 13 de la toxicité métabolique du cadmium dans les tubules rénaux proximaux murins et humains. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10048 . tel-00843866

**HAL Id: tel-00843866**

**<https://theses.hal.science/tel-00843866>**

Submitted on 12 Jul 2013

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

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

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le

21 mars 2011

par

**Mr. FAIZ Hassan**

**Etude par spectroscopie RMN du carbone 13 de la toxicité  
métabolique du cadmium dans les tubules rénaux proximaux  
murins et humains**

**Directeur de thèse : Pr BAVEREL Gabriel**

**JURY : Mr le Professeur CHERRAH Yahia  
Mr le Professeur CAMBAR Jean  
Mr le Professeur MARTIN Ambroise  
Mr le Professeur BAVEREL Gabriel**

**Rapporteur  
Rapporteur  
Membre du Jury  
Directeur de thèse**

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

---

## **RESUME**

Dans le cadre de l'évaluation de la néphrotoxicité métabolique du cadmium, nous avons étudié l'effet du chlorure de cadmium (CdCl<sub>2</sub>) sur la néoglucogénèse dans les tubules rénaux proximaux murins et humains. Les expériences de dose-effets in vitro montrent que le CdCl<sub>2</sub> inhibe l'utilisation de lactate et la production de glucose de façon dose-dépendante. En outre, le CdCl<sub>2</sub> induit une diminution importante des concentrations cellulaires de l'ATP et des principaux composés contenant des groupements thiols tels que les coenzymes A et le glutathion réduit. Les mesures enzymatiques et de spectroscopie RMN du carbone 13, montrent que le CdCl<sub>2</sub> produit dans les tubules rénaux murins et humains respectivement aux concentrations de 10 et 100 µM, une inhibition des flux à travers la lactate déshydrogénase et l'ensemble de la voie de la néoglucogénèse. Nos résultats sont en faveur d'une action inhibitrice directe du cadmium sur les enzymes intervenant dans la voie de la néoglucogénèse. Toutefois, la baisse intracellulaire en ATP, coenzymes A et glutathion, aurait un effet potentialisateur de cette inhibition. Ainsi, cette étude fournit une base biochimique pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires des tubulopathies proximales survenant chez l'homme suite à une exposition chronique au cadmium.

---

## **TITRE en anglais**

<sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy Study of the Metabolic Toxicity of Cadmium in Isolated Mouse and Human Renal Proximal Tubules

---

## **ABSTRACT**

As part of the assessment of metabolism nephrotoxicity of cadmium, we have studied the effect of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) on gluconeogenesis in isolated mouse and human renal proximal tubules. The dose-response experiments in vitro have shown that CdCl<sub>2</sub> inhibits the use of lactate and glucose production in a dose-dependent fashion. Besides, the CdCl<sub>2</sub> induced a significant decrease in cellular concentrations of ATP and the main compounds containing thiol groups such as coenzyme A and reduced glutathione. The enzymatic steps and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy showed that CdCl<sub>2</sub> produced in mouse and human kidney tubules respectively at concentrations of 10 and 100 µM, an inhibition of fluxes through lactate dehydrogenase and the entire gluconeogenic pathway. Our results are in favor of a direct inhibitory action of cadmium on enzymes involved in the gluconeogenic pathway. However, the decrease in intracellular ATP, glutathione and coenzyme A, would have a potentiating effect of this inhibition. Therefore, this study provides a biochemical basis for better understanding the cellular mechanisms of proximal tubular nephropathy occurring in humans following chronic exposure to cadmium.

---

**MOTS-CLES : Néphrotoxicité, cadmium, métabolisme, lactate, homme, souris, néoglucogénèse.**

---

**KEY-WORDS** : Nephrotoxicity, cadmium, metabolism, lactate, human, mouse, gluconeogenesis

---

**DISCIPLINE : Toxicologie - Biochimie – Métabolisme**

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire INSERM U820 : Métabolomique et Maladies Métaboliques

Faculté de Médecine R.T.H. Laennec, 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08

---

## Remerciements

Je dédie cette thèse à ma bien-aimée et future épouse Soukaina EL CADI.

Je dédie cette thèse aux membres de ma famille et à tous mes amis.

A mon Professeur Gabriel BAVEREL,

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire avec beaucoup de bonté et de générosité. Grâce à votre confiance et votre soutien, j'ai pu finaliser ce travail malgré les difficultés. Merci du fond du cœur G.B (Gabriel le Bienveillant).

A mon Maître Bernard FERRIER,

Tu mets tout ton cœur pour encadrer tes étudiants et les former à devenir de bons chercheurs. J'ai eu la chance d'être parmi eux et j'ai appris beaucoup de toi. Tu as été tout le temps gentil et sympathique avec moi et cela m'a beaucoup touché. Je tiens à t'exprimer toute mon estime et ma gratitude.

A mon Professeur Yahia CHERRAH,

Lors de mes études de pharmacie, vous m'avez enseigné la pharmacologie et vous avez été le directeur de ma thèse. Je garde de vous une image admirable d'un professeur honnête et exemplaire. Je suis très heureux et honoré que vous soyez parmi les membres du jury de ma thèse et vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

A monsieur le Professeur Jean CAMBAR,

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. J'espère que vous avez trouvé ce travail utile et intéressant. Grâce à vos critiques ce travail est davantage valorisé.

A monsieur le Professeur Ambroise MARTIN,

Merci sincèrement d'avoir accepté de vous associer au jury de ma thèse et de juger ce travail qui, je l'espère, vous aura intéressé.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Agnès Conjard-Duplany pour avoir contribué à ma formation et pour son aide précieuse à l'élaboration de ce travail.

Je remercie du fond du cœur Mireille Martin pour sa gentillesse et sa générosité et Monsieur Guy Martin pour son assistance à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Laurence Dubourg, directrice de notre unité INSERM U 820, pour son soutien, sa sympathie et son amabilité.

Enfin je remercie chaleureusement tous les membres de l'unité INSERM U820 pour leur gentillesse et leur disponibilité. J'avais beaucoup de plaisir à rencontrer au sein de cette unité les étudiants, Sophie Bodin, Maha El Hage, Assaad Eid, Burhan Knouzy, ainsi que d'autres...

# Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>II. Rappels bibliographiques</b> .....	<b>6</b>
<b>II.1. Données générales sur le cadmium</b> .....	<b>6</b>
II.1.a. Propriétés physico-chimiques et méthodes de quantification .....	6
II.1.b. Utilisations .....	7
II.1.c. Sources d'exposition et de contamination chez l'homme .....	8
<b>II.2. Métabolisme et toxicité du cadmium chez l'homme</b> .....	<b>9</b>
II.2.a. Toxicocinétique du cadmium.....	9
i. Rôle des métallothionéines .....	10
ii. Rôle du glutathion .....	11
II.2.b. Effets toxiques du cadmium chez l'homme .....	12
i. Intoxication aiguë .....	12
ii. Intoxication chronique .....	13
iii. Effets cancérigènes.....	14
iv. Caractère génotoxique .....	14
v. Effets sur la reproduction et le développement.....	15
II.2.c. Valeurs sanitaires et environnementales .....	15
i. Valeurs utilisées en milieu de travail .....	15
ii. Valeurs utilisées pour la population générale .....	16
<b>II.3. Métabolisme rénal des nutriments chez l'homme</b> .....	<b>16</b>
II.3.a. Métabolisme des substrats au niveau des segments du néphron : hétérogénéité métabolique du rein humain .....	16
II.3.b. Néoglucogenèse rénale : nature, régulation et dysrégulations.....	18
<b>III. Matériels et méthodes</b> .....	<b>20</b>
<b>III.1. Préparation des tubules rénaux</b> .....	<b>20</b>
<b>III.2. Conditions d'incubation des tubules rénaux</b> .....	<b>20</b>
III.2.a. Etude dose-effet .....	20
III.2.b. Etude de spectroscopie RMN du carbone 13 .....	22
<b>III.3. Dosages des métabolites</b> .....	<b>25</b>
<b>III.4. Technique de spectroscopie RMN du carbone 13</b> .....	<b>26</b>
III.4.a. Principe .....	26
III.4.b. Conditions de mesure .....	26
III.4.c. Quantification des données RMN.....	29
III.4.d. Calcul des flux enzymatiques .....	30
<b>III.5. Mesure des activités enzymatiques</b> .....	<b>32</b>
<b>III.6. Dosage des protéines et détermination du poids sec des tubules</b> .....	<b>32</b>
<b>III.7. Dosage du cadmium dans les reins</b> .....	<b>32</b>
<b>III.8. Expression des résultats et analyse statistique</b> .....	<b>33</b>
<b>III.9. Réactifs</b> .....	<b>33</b>
<b>IV. Résultats</b> .....	<b>34</b>

<b>IV.1. Etude dose-effet du cadmium sur le métabolisme rénal du lactate dans les tubules rénaux proximaux murins et humains .....</b>	<b>34</b>
IV.1.a. Effet du cadmium sur le métabolisme énergétique .....	34
IV.1.b. Effet du cadmium sur les dérivés CoA .....	35
IV.1.c. Effet du cadmium sur la concentration du glutathion .....	35
<b>IV.2. Etude par spectroscopie RMN des effets du cadmium sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux murins et humains .....</b>	<b>38</b>
<b>IV.3. Etude par spectroscopie RMN du métabolisme du lactate dans des tubules rénaux proximaux de souris traitées par du cadmium .....</b>	<b>46</b>
<b>IV.4. Dosage du cadmium accumulé dans le tissu rénal .....</b>	<b>51</b>
<b>V. Discussion .....</b>	<b>52</b>
<b>VI. Annexes .....</b>	<b>64</b>
VI.1. Annexe I .....	64
VI.2. Annexe II .....	70
VI.3. Annexe III .....	76
<b>VII. Bibliographie .....</b>	<b>82</b>
<b>VIII. Publications et Communications:.....</b>	<b>91</b>

## **I. Introduction**

Il est bien établi que le cadmium exerce sa néphrotoxicité au niveau du tubule rénal proximal. Toutefois, le mécanisme de cette toxicité rénale n'est pas totalement élucidé.

Afin de mieux comprendre ce mécanisme de toxicité rénale, nous avons étudié les interactions possibles du cadmium avec le métabolisme du tubule rénal proximal. Ce dernier est le seul segment du néphron capable de synthétiser du glucose car il possède les enzymes clés de la néoglucogenèse. Étant donné l'importance du lactate comme substrat physiologique du rein humain et murin *in vivo*, nous avons mené dans un premier temps une étude dose-effet *in vitro* pour caractériser les effets du cadmium sur le métabolisme rénal du lactate dans les tubules rénaux proximaux murins ou humains. Nous avons utilisé dans un second temps la technique de spectroscopie RMN du carbone 13, afin d'identifier et de quantifier les flux des enzymes intervenant dans ce métabolisme. Dans un troisième temps, nous avons voulu savoir si les effets métaboliques observés *in vitro* se manifestent aussi *in vivo* chez des souris exposées de façon chronique au chlorure de cadmium. Pour ce faire, nous avons étudié les effets du cadmium sur la néoglucogenèse rénale à partir du lactate en utilisant des tubules proximaux obtenus à partir de reins de souris qui avaient bu pendant 4 semaines de l'eau contenant du chlorure de cadmium à la concentration de 600mg/l. Par ailleurs, nous avons dosé le cadmium dans les tissus rénaux murins et humains pour pouvoir établir une corrélation entre son accumulation tissulaire et les effets métaboliques observés d'une part et, d'autre part, comparer la sensibilité du rein humain et du rein de souris vis à vis du cadmium.

## **II. Rappels bibliographiques**

### **II.1. Données générales sur le cadmium**

#### **II.1.a. Propriétés physico-chimiques et méthodes de quantification**

Le cadmium est un corps simple de symbole Cd et de numéro atomique 48, sa masse molaire est de 112,41 g/mol. Le cadmium appartient au groupe IIb de la classification périodique, comme le plomb et le mercure.

Le cadmium est un métal blanc-bleuâtre, très malléable et très ductile, de densité 8,64 ; de point de fusion 321°C et de point d'ébullition 765°C. Malgré une tension de vapeur faible, il émet des vapeurs bien au dessous de son point d'ébullition (dans l'air, la vapeur de cadmium se transforme rapidement en oxyde) [1].

Le cadmium dans l'environnement n'est presque jamais trouvé à l'état métallique, mais dans son état d'oxydation de +II. Les principaux composés du cadmium sont l'oxyde de cadmium, le chlorure de cadmium, le sulfure de cadmium. Le cadmium se combine très facilement



avec le soufre minéral et organique. Le chlorure de cadmium qui se présente sous forme de cristaux incolores, est très soluble dans l'eau.

Les méthodes communément utilisées pour le dosage du cadmium sont :

- La spectrométrie d'absorption atomique avec flamme (F-AAS)
- La spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation électrothermique (GF-AAS)

Ces deux méthodes fonctionnent sur le même principe de détection (absorption de la lumière émise par une lampe « cadmium »). La différence entre les 2 méthodes se situant au niveau de l'atomisation, la flamme ne permettant pas une atomisation optimale pour atteindre des limites de détection faibles.

- La spectrométrie d'émission atomique couplée à une torche à plasma (ICP-AES) :

Cette méthode fonctionne sur le principe inverse de la précédente en termes de détection, il s'agit d'obtenir un spectre caractéristique des raies du cadmium suite à une atomisation qui a lieu dans un plasma d'argon. L'intensité de ces raies est proportionnelle à la quantité d'atomes présents en solution.

- La spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS) :

Cette méthode permet l'introduction de l'échantillon dans un plasma d'argon, il est ainsi ionisé et les ions sont séparés dans le spectromètre de masse en fonction du rapport masse/charge ( $m/z$ ). Les rapports  $m/z$  sont caractéristiques de l'élément.

- Les méthodes électrochimiques (polarographie et voltamétrie) :

Le principe de base de ces méthodes est le changement de potentiels électrochimiques formés quand les électrons sont transférés d'un métal à l'autre.

- L'analyse par activation de neutrons :

Le cadmium possède de nombreux isotopes stables. L'irradiation avec des neutrons produit de nouveaux isotopes radioactifs qui peuvent être mesurés quantitativement sur la base de leur énergie spécifique et de leur demi-vie. Cette méthode, de même que la méthode XRF (fluorescence atomique générée par les rayons X) [2] peuvent être utilisées pour la quantification du cadmium rénal et hépatique in vivo.

### **II.1.b. Utilisations**

Le cadmium métal et ses composés minéraux sont utilisés dans une large variété de matériaux et procédés industriels :

- Revêtement anticorrosion des métaux (acier, fonte, alliages de cuivre, aluminium...).
- Constituants de nombreux matériels électriques : batteries alcalines, cellules photo-électriques, semi-conducteurs...

- Constituants de nombreux alliages : à bas point de fusion (fusibles, extincteurs automatiques...); antifriction (roulement à billes spéciaux; à haute conductibilité (câbles électriques); modérateurs de neutrons (barres pour réacteurs nucléaires).
- Stabilisants pour plastiques (PVC)
- Pigments pour peintures, plastiques, verres et céramiques.
- Substances luminescentes pour télévision.

### **II.1.c. Sources d'exposition et de contamination chez l'homme**

Le cadmium est largement distribué dans la croûte terrestre à des concentrations moyennes de 0,1 mg/kg. Les roches sédimentaires et les phosphates marins contiennent souvent des concentrations très élevées de l'ordre de 15 mg/kg. La contamination des eaux et des sols peut provenir de l'eau de drainage des mines, de la mobilisation du cadmium à partir des sédiments, des décharges industrielles, des engrais phosphatés.

Le cadmium atmosphérique provient, en plus de l'activité volcanique, en grande partie des déchets industriels atmosphériques (industries métallurgiques, la combustion du charbon et du bois, l'incinération d'ordures ménagères, la fabrication des engrais phosphatés, la fabrication de ciments). L'air ambiant contient en moyenne des quantités de 1 à 5 ng/m<sup>3</sup> dans les milieux ruraux, 5 à 15 ng/m<sup>3</sup> dans les zones urbaines et 15 à 50 ng/m<sup>3</sup> dans les zones industrielles. Les retombées atmosphériques de cadmium entraînent la contamination des sols. La quantité de cadmium fixée par les plantes est proportionnelle à la quantité de cadmium dans le sol, cette fixation est plus importante dans les sols à pH acide. De plus, le transfert de cadmium du sol vers les plantes est plus important que celui du mercure ou du plomb. Par conséquent, il pénètre plus facilement que ces derniers dans la chaîne alimentaire.

La plupart des aliments contiennent des traces de cadmium, en particulier, les grains de céréales, les champignons, les abats (foie, rein), les crustacés (1 µg/g de poids frais). Des concentrations allant jusqu'à 8 µg/g ont été mesurées dans les huitres. L'homme consomme quotidiennement une quantité de cadmium pouvant aller de 1,4 jusqu'à 12,4 µg.

L'eau de boisson contient généralement peu de cadmium (la teneur est estimée à moins de 1 µg/l).

La fumée de cigarette contient du cadmium et constitue une source importante de contamination chez le fumeur. Le tabac est une plante qui accumule naturellement de hautes concentrations de cadmium. Chaque cigarette contient 0,5 à 1 µg de cadmium [3]. Approximativement 10 % de l'oxyde de cadmium produit et inhalé, lorsqu'une personne fume, sont piégés dans les poumons et 30 à 40 % vont passer dans la circulation systémique. Les fumeurs possèdent 4 à 5 fois plus de cadmium dans le sang et 2 à 3 fois plus dans les reins que les non-fumeurs [2, 4-5].

## **II.2. Métabolisme et toxicité du cadmium chez l'homme**

Bien que n'appartenant pas aux métaux essentiels à l'homme, la présence du cadmium dans l'organisme n'est pas négligeable.

Au Japon, au milieu des années 50, la consommation de riz contaminé par le cadmium était à l'origine de la maladie d'Itai-Itai. Pour la première fois, il a été montré qu'une pollution au cadmium pouvait avoir des conséquences sur la santé de l'Homme.

Les effets les plus manifestes furent des atteintes rénales (incluant des dysfonctionnements tubulaires et glomérulaires), des déficiences immunitaires, des atteintes osseuses (ostéomalacie et ostéoporose), des lumbagos et des déformations du squelette. Cette contamination au cadmium était causée par les rejets d'une mine de cadmium en amont de la rivière affectant de ce fait la santé des populations humaines vivant dans cette zone [6].

### **II.2.a. Toxicocinétique du cadmium**

Les deux principales voies d'absorption sont l'inhalation et l'ingestion. Par voie pulmonaire, une fraction du cadmium se dépose le long du tractus respiratoire en fonction de la taille des particules. Puis selon l'hydrosolubilité, les sels les plus solubles : chlorures et oxydes sont absorbés à environ 90-100% et les sulfures sont absorbés à hauteur de 10%. Cette absorption peut se poursuivre pendant plusieurs semaines même après une inhalation unique.

Par voie digestive, l'absorption est d'environ 5%. Le taux d'absorption du cadmium est directement lié à la forme chimique. Ce taux d'absorption peut être augmenté lors de carences alimentaires en calcium, en fer, en zinc, en cuivre ou en protéines. La protéine DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) joue un rôle prépondérant dans l'absorption de cadmium [7-8]. Cette protéine est fortement exprimée, au niveau intestinal, lors d'une déficience en fer ou d'une hémochromatose [9-10]. L'absorption du cadmium chez le jeune enfant est 20 fois plus importante que chez l'adulte [10-12].

Le cadmium est transporté dans le sang en étant fixé à l'albumine, à l'hémoglobine ou aux métallothionéines. Les lymphocytes peuvent aussi fixer de grandes quantités de cadmium [5].

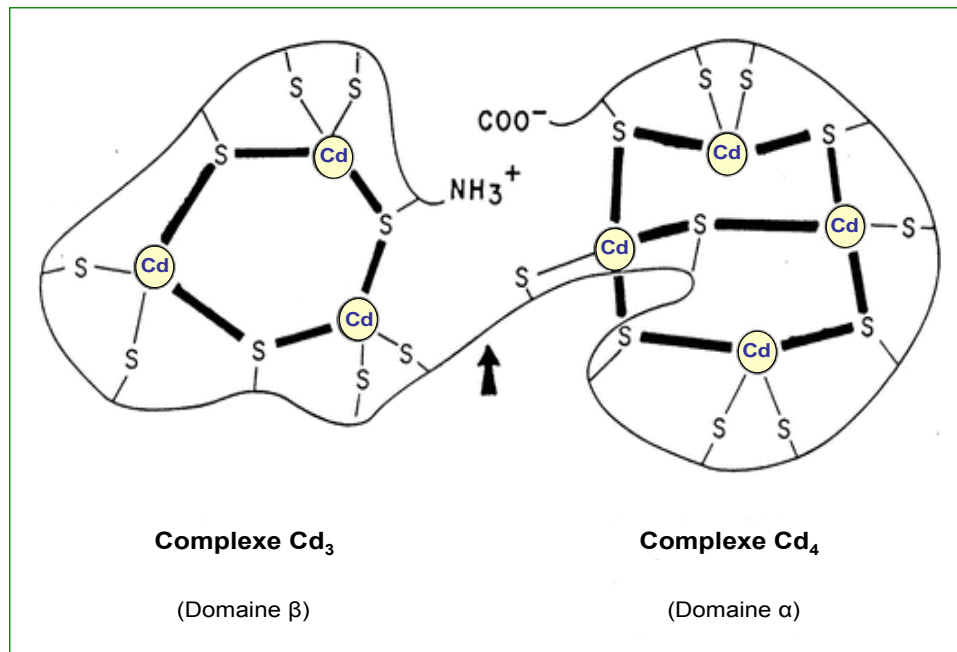
Le cadmium se concentre principalement dans le foie et les reins (entre 50% et 70% de la charge totale) [13-14]. Il est également retrouvé dans le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et les glandes salivaires. Dans les différents tissus, le cadmium se fixe sélectivement sur les métallothionéines. Le cadmium possède une demi-vie de l'ordre de 20 à 30 ans dans le rein, de 4,7 à 9,7 ans dans le foie et de un à plusieurs mois dans le sang [15].

Le cadmium est excrété dans les fèces, les urines et les phanères. Chez l'homme, l'excrétion urinaire du cadmium est faible et augmente avec l'âge. Elle est plus importante chez les fumeurs [3]. Le cadmium urinaire est principalement lié à la métallothionéine et au glutathion car ces complexes peuvent facilement être filtrés par le glomérule. Le cadmium

excrété par les voies biliaires est majoritairement réabsorbé au niveau du tube digestif, le reste est éliminé dans les fèces.

### i. Rôle des métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines de bas poids moléculaire (6000 à 7000 Da), elles contiennent de nombreux résidus cystéine et possèdent deux domaines  $\alpha$  et  $\beta$ , le premier peut lier 4 ions métalliques divalents et le second peut en lier 3 (voir figure 1), [16-17].



**Figure 1 :** Schéma de la liaison cadmium et métallothionéine [18]

L'homme possède quatre familles d'isoformes (MT-1, 2, 3 et 4), dont la synthèse est sous le contrôle de plusieurs gènes. Cette synthèse est stimulée par les glucocorticoïdes et certains métaux comme le zinc, le cuivre, le cadmium et le mercure [19].

Les métallothionéines régulent les concentrations intracellulaires de certains métaux essentiels pour l'organisme, tels que le cuivre et le zinc. Elles participent notamment à l'accumulation du zinc dans la mitochondrie [20-22]. Les organes dans lesquels les métallothionéines sont particulièrement abondantes sont le foie, le rein, l'intestin et le pancréas. Le cadmium est un fort inducteur de métallothionéines au niveau du rein contrairement au zinc [23]. Les métallothionéines jouent un rôle important dans le transport, le métabolisme et la toxicité du cadmium [24]. En effet la source majeure du cadmium rénal en cas d'intoxication chronique proviendrait du foie par la voie sanguine sous forme liée à ces protéines [25-28].

L'utilisation de lignée de souris transgéniques ne synthétisant pas de métallothionéines (MT-/-), a permis de mettre en évidence leur rôle dans la protection contre la toxicité des métaux. En effet, ces souris présentent une néphropathie plus précoce que les souris sauvages [18, 29-30].

La dégradation des métallothionéines varie en fonction de la nature de l'ion métallique qu'elles séquestrent ; la demi-vie du complexe Cd-MT est de 80 heures alors qu'elle n'est que de 20 heures pour le zinc [31].

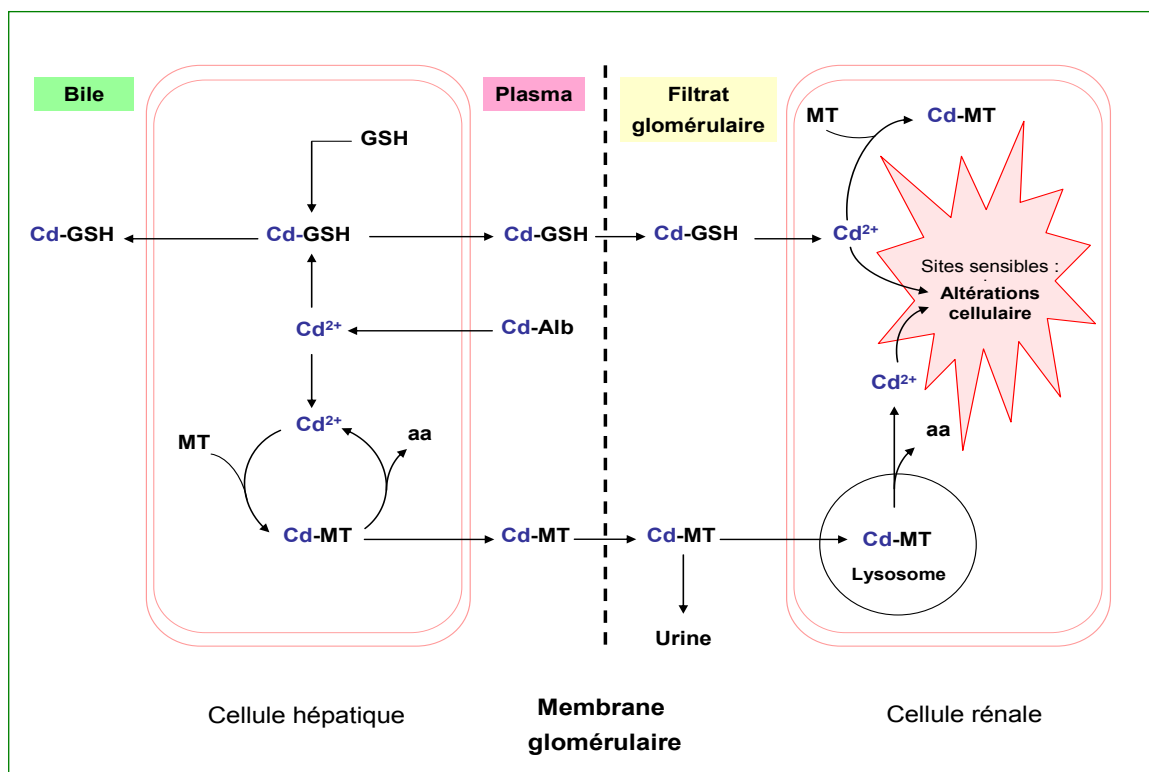
Le passage du cadmium à l'intérieur des cellules se fait en deux temps : en un premier temps le cadmium se fixe sur des sites à la surface des cellules, dans un second temps, il passe à l'intérieur des cellules où il se fixe sur des composants intracellulaires [32-36].

Le passage du complexe Cd-MT à l'intérieur des cellules se fait soit par endocytose, soit par un mécanisme actif  $\text{Na}^+$  dépendant [37-39].

Les ions  $\text{Cd}^{2+}$  intracellulaires libérés par la dégradation lysosomale du complexe Cd-MT, seraient responsables de la néphrotoxicité. Le cadmium est redistribué dans le cytosol où il est lié à des protéines de haut poids moléculaire. Bien que les reins soient capables de synthétiser la métallothionéine, cette synthèse est plus lente que celle du foie [40-42].

## ii. Rôle du glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide contenant une cystéine qui est capable de lier sur son groupement thiol un ion métallique pour former un conjugué. Ce peptide d'un poids moléculaire de 307,3 g/mol est synthétisé par le foie où il se trouve en grande quantité [43]. Comme la métallothionéine, le GSH forme un conjugué  $\text{CdGSH}_2$  intracellulaire afin de chélater les ions  $\text{Cd}^{2+}$  toxiques. Une faible proportion des conjugués  $\text{CdGSH}_2$  est éliminée dans la bile pour terminer dans les fèces. La partie qui n'est pas excrétée par la voie biliaire est libérée dans la circulation sanguine lors du renouvellement des hépatocytes puis réabsorbée par le tubule proximal après la dégradation du GSH par la glutamyltranspeptidase liée à la membrane plasmique apicale des cellules du tubule proximal [44-45] (voir figure 2, page suivante). Le  $\text{Cd}^{2+}$  peut alors être absorbé comme un ion libre au travers de transporteurs pas connus au niveau apical des cellules du tubule rénal.



**Figure 2** : Formes transportées du Cadmium dans le compartiment sanguin [18]  
(aa : acides aminés ; Alb : albumine ; Cd : cadmium ; GSH : glutathion ; MT : métallothionéine).

## II.2.b. Effets toxiques du cadmium chez l'homme

### i. Intoxication aiguë

L'ingestion accidentelle de sels minéraux de cadmium est rapidement suivie de troubles digestifs intenses : nausées, vomissements importants, douleurs abdominales, diarrhées ; l'effet émétisant puissant peut-être observé après une dose unique de 10 mg de cadmium. Ces premiers symptômes sont souvent accompagnés de crampes musculaires et d'une hyper-salivation. A doses élevées, les pertes digestives sont responsables d'une hypovolémie, de troubles hydroélectrolytiques et de troubles hémodynamiques qui, associés à un effet toxique direct du cadmium sur les tubules rénaux, conduisent à une insuffisance rénale. Une cytolyse hépatique modérée est parfois observée. Aux doses massives, la mort peut survenir en quelques heures, dans un tableau de collapsus cardiovasculaire avec acidose métabolique intense [46].

Par voie respiratoire, une intoxication aiguë peut être provoquée par une brève exposition à une forte concentration de vapeurs passée inaperçue des travailleurs (pas d'odeur marquée ni d'effet irritant immédiat), par exemple lors du soudage ou du découpage d'un métal cadmié. Après une période asymptomatique de 4 à 10 h, apparaissent des signes d'irritation intense des voies respiratoires (toux, douleurs thoraciques, dyspnée), des signes digestifs

(nausées, vomissements), accompagnés de frissons, de fièvre, de céphalées, de courbatures et d'une hyperleucocytose. Le tableau peut s'aggraver rapidement vers un œdème aigu pulmonaire sévère susceptible d'entraîner la mort de l'intoxiqué. Dans le cas des morts rapides (1 à 3 jours après l'exposition), l'autopsie montre seulement les signes de l'œdème pulmonaire ; dans les cas plus tardifs (3 à 10 jours après l'exposition), on observe une pneumonie interstitielle proliférative, des signes d'hépto- et de néphro-toxicité, d'artériosclérose coronaire et des infarctus. D'après les cas rapportés, on estime que la mort peut-être provoquée par des expositions de 10 min à 150-300 mg Cd/m<sup>3</sup>, 1 h à 40-50 mg Cd/m<sup>3</sup> ou 8 h à 5 mg Cd/m<sup>3</sup>. A concentration en cadmium égale, les fumées d'oxyde sont plus nocives que les poussières respirables de métal [1, 5].

## ii. Intoxication chronique

L'intoxication chronique professionnelle a été décrite essentiellement chez des sujets exposés à des fumées d'oxyde ou à des poussières respirables de cadmium ou de ses composés.

Le cadmium est un toxique cumulatif : l'élimination très lente du produit explique l'évolution progressive des manifestations pathologiques, même après l'arrêt de l'exposition.

**Manifestations rénales :** Le rein est le principal organe cible. Le signe le plus précoce de l'intoxication au cadmium est un dysfonctionnement des tubules proximaux. Classiquement, une élimination accrue des protéines de faible poids moléculaire est observée : bêta-2 microglobuline [47-48], protéine de liaison du rétinol (RBP), protéine de liaison de la vitamine D, lysosyme, ribonucléase, alpha-1-microglobuline. Cette protéinurie peut s'accompagner de glycosurie, d'aminocidurie, d'une fuite de calcium et de phosphate [5, 49-58]. Cette tubulopathie proximale peut évoluer vers une insuffisance rénale irréversible.

Lors d'expositions professionnelles, l'arrêt de l'exposition au cadmium ne semble pas permettre une diminution de la protéinurie [49, 51, 59-60].

Il est admis que l'absorption quotidienne de cadmium susceptible d'altérer la fonction rénale est de l'ordre de 10 à 15 µg [5].

Par ingestion, les LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level, soit le niveau d'exposition le plus bas produisant un effet néfaste) induisant un dysfonctionnement rénal correspondent à une consommation quotidienne de 140 à 260 µg de cadmium pendant toute une vie (soit environ 14 à 26 µg Cd/ kg/ semaine). Ces valeurs ont été établies pour une population de japonais exposée au cadmium lors de la consommation de riz contaminé.

Une étude transversale pratiquée sur 1699 individus de la population générale exposée à des doses élevées de cadmium en milieu urbain et rural a cherché à identifier les effets du cadmium sur des paramètres de l'excrétion urinaire (protéine de liaison du rétinol, N-acétyl bêta-D-glucosaminidase, bêta-2 microglobuline, acides aminés et calcium) [58, 61]. Une bonne corrélation a été mise en évidence entre l'exposition au cadmium et l'élévation de ces

paramètres. Ces résultats sont confortés par ceux d'une autre étude pratiquée sur 1021 individus exposés professionnellement ou via l'environnement [62]. De ces études il apparaît que les effets rénaux liés à l'exposition au cadmium par ingestion sont observés pour une charge corporelle de cadmium correspondant à l'élimination urinaire de 1 à 2 µg de cadmium par gramme de créatinine.

**Troubles respiratoires :** essentiellement liés aux effets irritants des particules de cadmium. Ils correspondent à une diminution de la capacité respiratoire, de l'odorat, la survenue de rhinite, de bronchite et d'emphysème [49, 63].

L'altération de la fonction pulmonaire (généralement syndrome obstructif modéré) ne survient qu'après plusieurs années d'exposition. Une fibrose progressive des voies respiratoires profondes et la rupture des parois alvéolaires conduisent à l'emphysème [46, 64].

**Atteintes du squelette :** liées à une interférence du cadmium avec le métabolisme phosphocalcique. A l'examen radiologique, on découvre des fissurations osseuses symétriques souvent localisées au col du fémur, connues sous le nom de stries de Looser-Milkman. Ces lésions osseuses peuvent être reproduites chez l'animal exposé chroniquement au cadmium. Cette atteinte osseuse est en partie d'origine rénale, liée à une excrétion excessive du calcium et du phosphate [65], à une diminution de la réabsorption de vitamine D [66] et à un défaut de conversion de la 25(OH)D en 1,25(OH)D<sub>2</sub> [67].

Les pertes phosphocalciques causent une décalcification (ostéomalacie) et une fragilité du squelette (ostéoporose), accompagnées de douleurs osseuses intenses. Les femmes enceintes ou allaitantes sont atteintes plus précocement en raison des besoins accrus en calcium [4, 58, 68-71].

**Autres manifestations :** certaines constituent davantage des signes d'exposition ou d'imprégnation ; c'est le cas de la "dent jaune cadmique" (coloration jaunâtre du collet et de l'émail des dents) [46], de certains troubles digestifs (perte d'appétit, nausées), de signes d'irritation chronique des voies aériennes supérieures (laryngite, rhinite).

### iii. Effets cancérigènes

Différentes études réalisées en milieu professionnel, et correspondant à des expositions par inhalation, ont montré une augmentation significative de la mortalité par cancer pulmonaire [72]. En milieu professionnel, différentes études de cohortes ont clairement mis en évidence un lien entre l'exposition au cadmium et la survenue de cancers pulmonaire et prostatique malgré la taille souvent réduite des cohortes étudiées [73].

### iv. Caractère génotoxique

Le cadmium élémentaire, le chlorure de cadmium, l'oxyde de cadmium et le sulfure de cadmium ont été classés par l'Union Européenne en catégorie 3 « Substances préoccupantes



pour l'homme en raison d'effets mutagènes » (JOCE, 2004). Le sulfate de cadmium a été classé par l'Union Européenne en catégorie 2 « Substance devant-être assimilée à des substances mutagènes pour l'homme » (JOCE, 2004).

#### **v. Effets sur la reproduction et le développement**

Les rares études ayant cherché à identifier un effet du cadmium sur la fonction de reproduction chez l'homme n'ont pas montré de diminution de la fertilité [74], ni d'effet sur la fonction endocrine (testostérone, hormone lutéine (LH), hormone de stimulation des follicules (FSH)) [75]. Une étude portant sur 106 femmes exposées professionnellement au cadmium au cours de leur grossesse a mis en évidence une réduction du poids des enfants à la naissance, des signes de rachitisme et un retard du développement dentaire [76]. Un des mécanismes vraisemblablement impliqué dans la toxicité du cadmium pendant la grossesse semble être la perturbation de l'homéostasie du fer et du zinc entraînant une diminution de la concentration de ces oligoéléments dans le placenta des fœtus [77]. Cette déficience semble être corrélée avec le faible poids des nouveau-nés exposés au cadmium pendant leur développement intra-utérin [78]. D'autres atteintes comme des troubles du développement du système nerveux ou des troubles de la régulation hormonale sont aussi associées à l'exposition au cadmium du fœtus et du nouveau-né. Cependant, il existe peu de données sur les effets d'une exposition au cadmium chez l'enfant après la naissance.

### **II.2.c. Valeurs sanitaires et environnementales**

#### **i. Valeurs utilisées en milieu de travail**

Notes documentaires INRS ND 2098 (2004) "Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France" et ND 2190-191-03 "Indices biologiques d'exposition".

- Air :

- VME : Valeur maximale d'exposition (Cadmium et composés) : 0,05 mg/m<sup>3</sup>

- VLE Valeur limite d'exposition (oxyde de cadmium) : 0,05 mg/m<sup>3</sup>

- Indices biologiques d'exposition : cadmium et composés inorganiques

- Sang : 5 µg/l

- Urines : 5 µg/g de créatinine

Les concentrations sanguine et urinaire de cadmium ne reflètent pas le niveau de contamination de l'organisme mais peuvent renseigner sur une éventuelle exposition [79]. En effet, seulement 0,005 à 0,01 % de la charge totale de l'organisme en cadmium est excrétée quotidiennement [3]. Des troubles rénaux précoces ont été observés chez la souris, sans pour autant que des variations de concentrations urinaires de cadmium aient été mesurées [80]. Il a été montré que des dommages tubulaires peuvent survenir pour des concentrations urinaires de cadmium de 1 à 2 µg/g de créatinine [58, 61-62, 81].

## ii. Valeurs utilisées pour la population générale

- Qualité des eaux de consommation :

Teneur en cadmium : 3 µg/l (OMS : Directives de qualité pour l'eau de boisson - 2004)

- Qualité de l'air :

Concentration en cadmium inorganique : 5 ng/m<sup>3</sup> (OMS : Directives de qualité pour l'air - 2000).

- Qualité des aliments :

La dose maximale admissible de cadmium dans l'alimentation, connue sous le nom de dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP), est fixée à 7 µg de cadmium par kilogramme de poids corporel par semaine par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Se basant sur des études expérimentales et épidémiologiques, cette valeur a été déterminée afin que la concentration supposée de cadmium dans le rein ne dépasse pas le seuil critique de 200 µg/g [82] au delà duquel, pensait-on, des troubles rénaux pouvaient survenir. Cependant, d'autres études expérimentales, en particulier sur la souris, ont montré que des dysfonctions tubulaires rénales peuvent apparaître pour des valeurs de cadmium comprises entre 10 et 200 µg Cd/g de rein, ce qui laisse à penser que la DHTP devrait être revue à la baisse [80, 83].

## II.3. Métabolisme rénal des nutriments chez l'homme

### II.3.a. Métabolisme des substrats au niveau des segments du néphron : hétérogénéité métabolique du rein humain

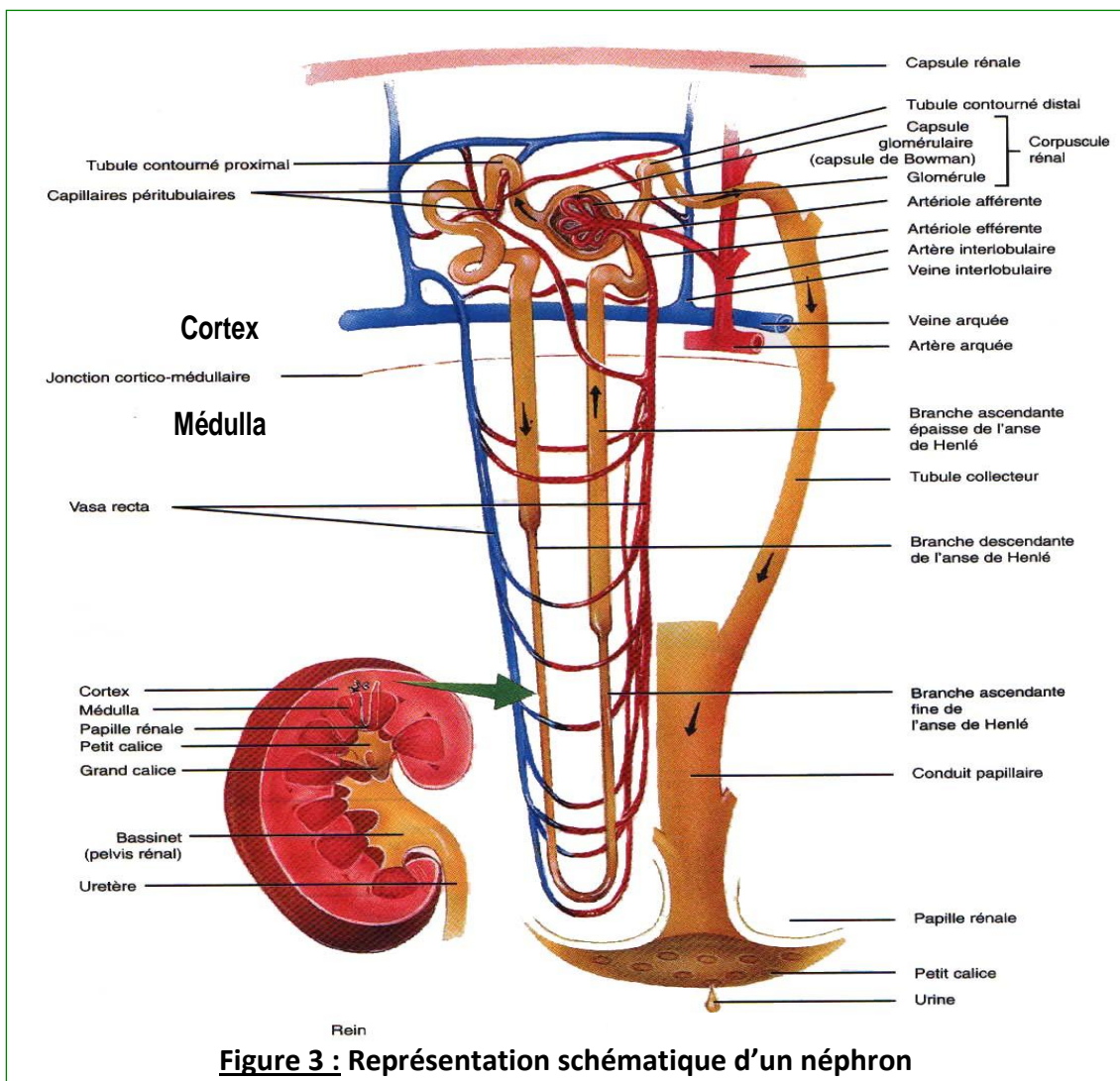
Très schématiquement, le rein est constitué du cortex (70-75 % du poids de l'organe) et de la médullaire qui est subdivisée en médullaire externe et médullaire interne. Environ 90 % du débit sanguin rénal irrigue le cortex qui est très largement pourvu en oxygène et qui est le siège d'une pO<sub>2</sub> élevée, essentiellement en raison de l'intense activité de synthèse d'ATP nécessaire à la réabsorption de la majorité des solutés minéraux et organiques filtrés par les glomérules. Le débit sanguin et la fourniture d'oxygène à la médullaire externe peuvent rapidement devenir limitant et le métabolisme de cette zone rénale, normalement aérobie, peut devenir anaérobie. La pauvreté en mitochondries et la faible pO<sub>2</sub> de la médullaire interne suggèrent que tous les segments de néphron situés dans cette zone ont recours à la glycolyse anaérobie pour leurs besoins énergétiques. L'osmolalité, qui croît progressivement le long de l'axe corticomédullaire est un facteur influençant le métabolisme énergétique médullaire. La figure 3 (page suivante), montre de façon schématique les relations existant entre les différents segments du néphron, l'unité fonctionnelle du rein, et les différentes zones du rein.

Puisque les réserves énergétiques rénales sous forme de glycogène, de phosphocréatine et de lipides neutres sont très faibles, les reins doivent extraire et dégrader des substrats circulants pour couvrir leurs besoins énergétiques. On peut identifier et quantifier les

principaux substrats captés et libérés par les reins humains in vivo en mesurant leur clairance rénale, le débit sanguin rénal et les différences de concentrations entre artère et veine de ces substances non marquées ou marquées par des isotopes ( $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ). Les reins peuvent utiliser une grande variété de substrats en fonction de leur disponibilité. Les principales sources potentielles d'énergie sont le glucose, le lactate, les acides gras libres, les corps cétoniques, le citrate et la glutamine [84].

Sur des modèles d'incubation de tubules proximaux humains ou de tranches de cortex rénal humain coupées avec précision, on a pu montrer que le lactate et le pyruvate étaient des précurseurs de glucose et d'alanine et des sources d'énergie potentielles [85-86]. Grâce à ces mêmes modèles expérimentaux, on a établi que glutamine, glutamate et alanine étaient aussi des précurseurs de glucose et des sources d'énergies potentielles, ainsi que des précurseurs des ions ammonium nécessaires au maintien de l'équilibre acido-basique systémique [87-90].

La distribution de l'activité des enzymes oxydatives est parallèle à la densité des mitochondries et à l'activité Na-K-ATPase, considérée comme la principale enzyme responsable de la réabsorption du Na au niveau de la membrane basolatérale des cellules rénales.



Par exemple, les activités les plus élevées des enzymes du cycle de Krebs, de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et de la dégradation des corps cétoniques se localisent dans la branche large ascendante de l'anse de Henle, le tubule contourné distal et le tubule proximal. Les enzymes clés de la glycolyse (hexokinase, phosphofructokinase et pyruvate kinase) sont plus actives dans tous les segments distaux du néphron et beaucoup moins actives dans le tubule proximal qui est le seul segment contenant la glycérol kinase et les enzymes clés de la néoglucogénèse (pyruvate carboxylase, phosphoénolpyruvate carboxykinase, fructose bisphosphatase et glucose-6-phosphatase ; voir figure 4) [91-92]. La lactate déshydrogénase, une enzyme commune à la glycolyse et la néoglucogénèse, a une activité importante dans tous les segments du néphron. L'activité glutaminase, qui est responsable de l'étape initiale d'utilisation de la glutamine dans la voie de l'ammoniogénèse, est active dans les tubules corticaux humains [89, 93], alors que le rein humain est dépourvu de glutamine synthétase, qui est responsable de la synthèse de glutamine à partir de glutamate et d'ammoniac [94]. Le rein n'est pas considéré comme un site de synthèse d'acides gras car l'activité citrate lyase y est très faible.

### **II.3.b. Néoglucogénèse rénale : nature, régulation et dysrégulations**

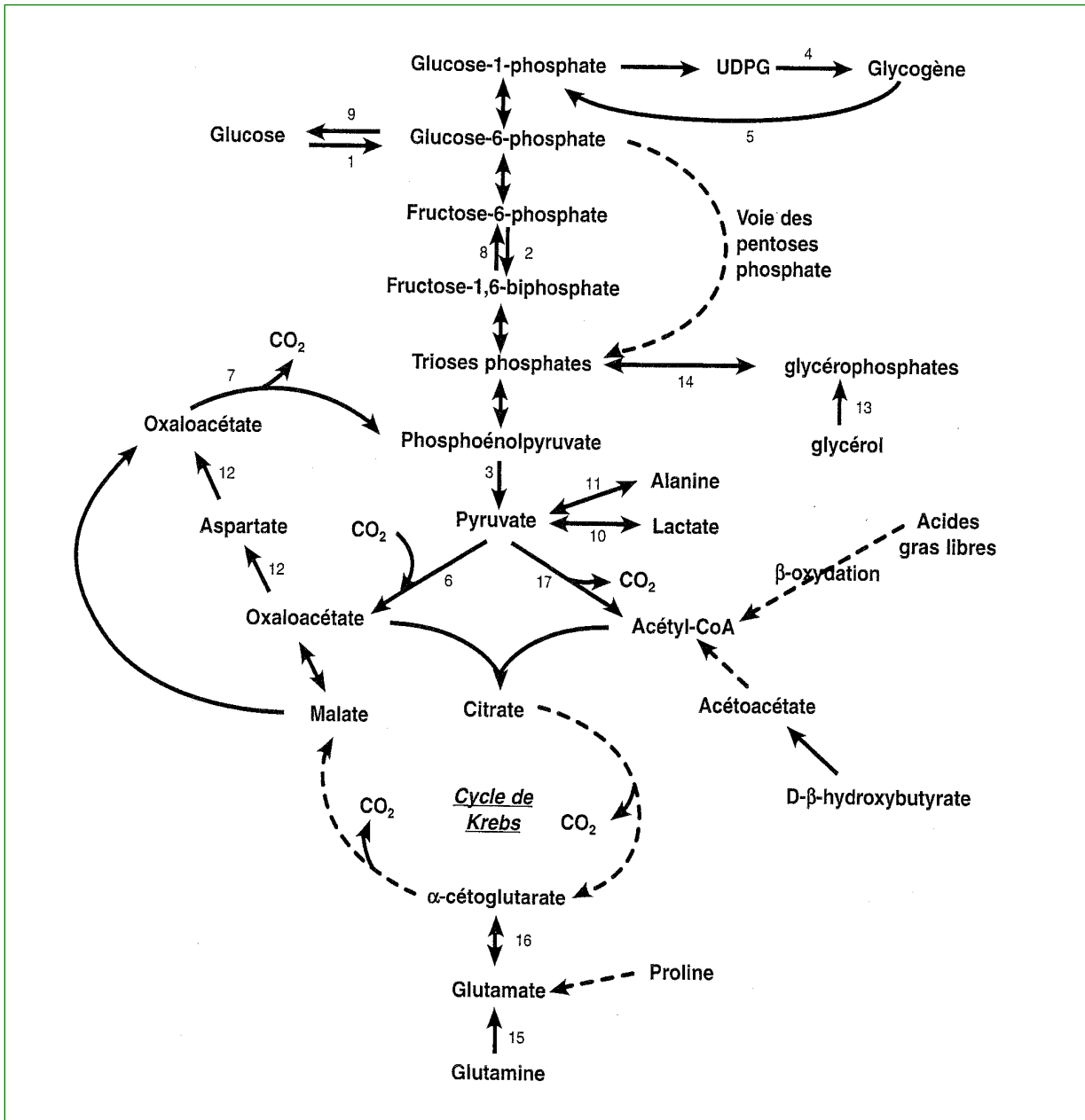
La combinaison des mesures de différences artérioveineuses rénales avec des techniques isotopiques a permis la démonstration de l'existence concomitante d'une production et d'une consommation de glucose. La production rénale de glucose pourrait suivant les circonstances se situer entre 0 % et 28 % de la production totale de glucose par l'organisme [95-96]. Cette production est due exclusivement à la néoglucogénèse rénale (voir figure 4, page suivante) car les réserves de glycogène dans le rein sont infimes. Chez des sujets à jeun depuis 12-14 heures, il a été calculé que le lactate, le glycérol, la glutamine et l'alanine représentent respectivement 55 %, 17 %, 13 % et 4 % de cette néoglucogénèse rénale [97]. Lors d'une hypoglycémie, les valeurs correspondantes sont respectivement 40 %, 10 %, 20 % et 0 % [98]. Ces résultats soulignent l'importance dominante du lactate comme précurseur néoglucogénique rénal [99-100].

L'adrénaline serait un puissant stimulant de la néoglucogénèse rénale ; après trois heures de perfusion de cette catécholamine, la néoglucogénèse rénale peut représenter 40 % de la production totale de glucose de l'organisme (néoglucogénèse hépatique et rénale + glycogénolyse hépatique) [101-102]. A l'inverse, la perfusion d'insuline avec maintien d'une glycémie normale par perfusion de glucose inhibe la néoglucogénèse rénale [103-104]. En revanche, le glucagon est sans effet sur la production rénale de glucose [105].

Le jeûne stimule la néoglucogénèse rénale ; 20 à 25 % de la néoglucogénèse systémique seraient dus à la néoglucogénèse rénale après 60 heures de jeûne [106]. Dans le rein de souris, des études in vitro ont montré que le jeûne augmentait l'activité de la glucose-6-phosphatase, de la fructose bisphosphatase et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase

[107], la transcription du gène codant cette dernière enzyme étant accrue comme dans l'acidose métabolique [108].

Le diabète de type 2 chez des patients à jeun depuis 12-14 heures conduit à une importante augmentation de la production rénale de glucose par rapport aux sujets normaux dans la même situation nutritionnelle [109-110]. L'existence d'une telle stimulation chez l'homme est renforcée par l'observation récente du même phénomène in vitro à l'aide d'un modèle animal de diabète de type 2 [111].



**Figure 4 : Schéma simplifié des voies métaboliques de la néoglucogénèse rénale [84]**

**Enzymes clés :**

1: hexokinase, 2: phosphofruktokinase, 3: pyruvate kinase, 4: glycogène synthase, 5: glycogène phosphorylase, 6: pyruvate carboxylase, 7: phosphoénolpyruvate carboxykinase, 8: fructose 1,6-bisphosphatase, 9: glucose-6-phosphatase, 10: lactate déshydrogénase, 11: alanine aminotransférase, 12: aspartate aminotransférase, 13: glycérokinase, 14: glycérophosphate déshydrogénase, 15: glutaminase, 16: glutamate déshydrogénase, 17: pyruvate déshydrogénase.

---: étapes enzymatiques non représentées

### **III. Matériels et méthodes**

#### **III.1. Préparation des tubules rénaux**

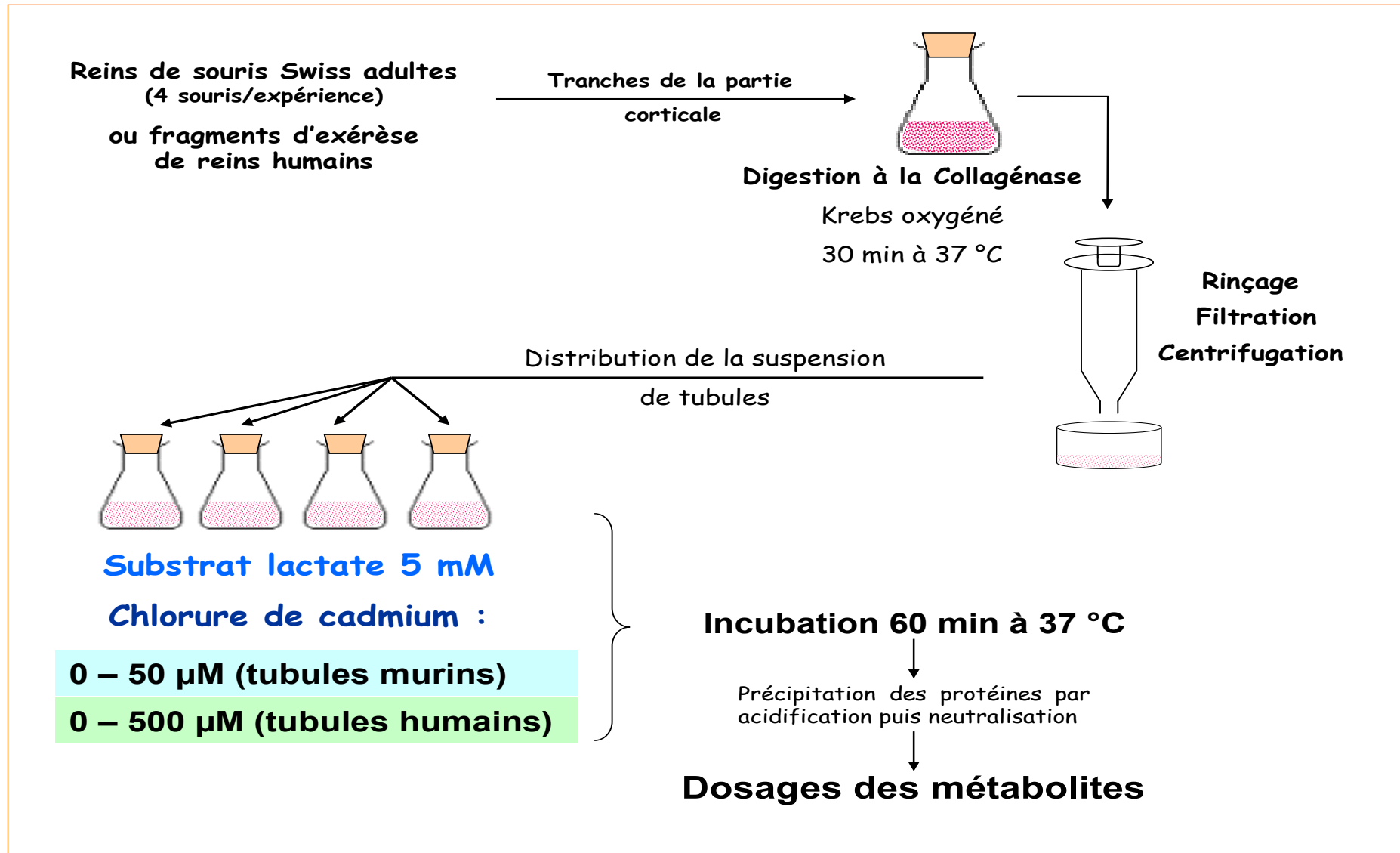
Nous avons utilisé des souris Swiss femelles (commandées chez Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les deux reins sont immédiatement prélevés et plongés dans une solution oxygénée de Krebs-Henseleit. Les reins sont ensuite décapsulés et coupés en deux moitiés par une section longitudinale. La zone médullaire de chaque rein est enlevée à l'aide de ciseaux courbes. Grâce à l'utilisation d'un microtome Stadie-Riggs, le cortex rénal est découpé en fines tranches, puis digéré par la collagénase par incubation à 37°C pendant 30 minutes dans une solution de collagénase A à la concentration de 1 mg/ml afin de dissocier les tubules. La suspension obtenue est filtrée sur tamis pour séparer les fragments non digérés, puis rincée plusieurs fois pour éliminer la collagénase et les débris cellulaires [107].

Les tubules rénaux proximaux humains sont préparés de façon sensiblement équivalente à partir de tissu rénal humain prélevé sur la partie saine de pièces de néphrectomies réalisées chez des patients pour une tumeur rénale [86]. Ces pièces opératoires sont rapidement mises dans une solution oxygénée de Krebs-Henseleit. Au laboratoire les fragments du cortex rénal sont débarrassés de la graisse et de la capsule péri-rénale ainsi que des portions de médullaire si nécessaire. La concentration de la collagénase est de 2 mg/ml.

#### **III.2. Conditions d'incubation des tubules rénaux**

##### **III.2.a. Etude dose-effet**

La suspension tubulaire obtenue est répartie dans des fioles contenant comme substrat du lactate 5 mM dans le milieu de Krebs-Henseleit, en absence ou en présence de CdCl<sub>2</sub> à des concentrations croissantes allant de 0 à 50 µM pour les tubules de souris et de 0 à 500 µM pour les tubules humains. Les fioles sont oxygénées par un mélange O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%), pour préserver l'efficacité métabolique des tubules rénaux et incubées pendant 60 minutes à 37°C dans un bain-marie oscillant à 70 cycles par minute (voir figure 5, page suivante).



**Figure 5 :** Conditions d'incubations des tubules rénaux proximaux murins et humains pour l'étude dose-effet du cadmium sur le métabolisme rénal du lactate.

A la fin de l'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de l'acide perchlorique (4% final) ce qui bloque le métabolisme par précipitation des protéines et permet la libération du contenu cellulaire dans les milieux d'incubation. Pour chaque expérience, on prépare des temps zéro, où l'acide perchlorique est introduit avant la suspension de tubules afin de précipiter les protéines immédiatement dès leur introduction dans la fiole. Chaque condition d'incubation est réalisée en double exemplaire. Après élimination des protéines par centrifugation (2000g pendant 5 min à 4°C), le contenu de chaque fiole est neutralisé par une solution de KOH 20%-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%. Le précipité de perchlorate de potassium formé est éliminé par centrifugation et le surnageant est prélevé pour effectuer les différents dosages.

Pour chaque expérience, la quantité de tubules déposée dans les fioles est déterminée par mesure du poids sec des tubules.

La composition du Tampon de Krebs-Henseleit est la suivante : NaCl 120 mM ; KCl 4,8 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM.

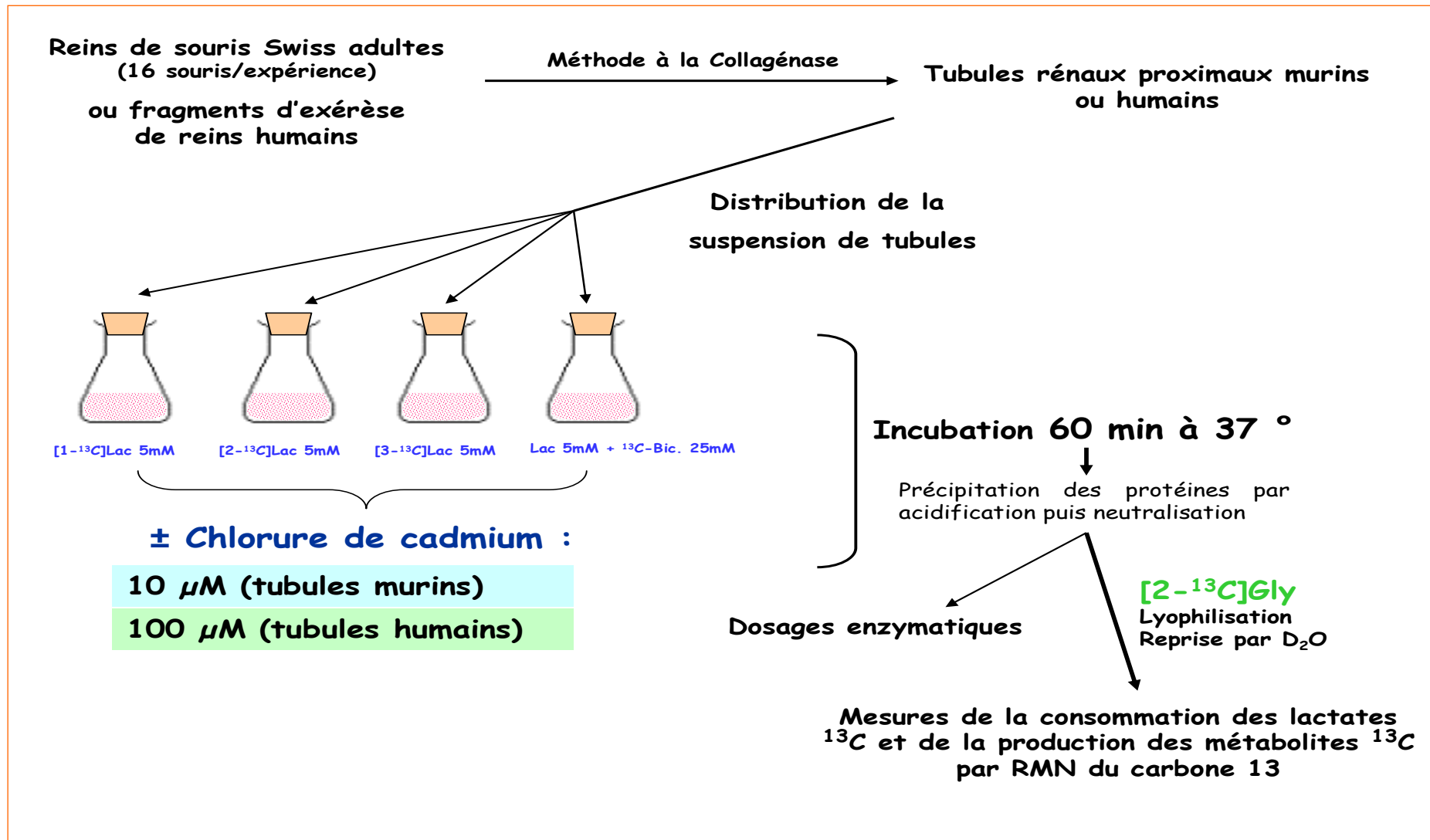
### **III.2.b. Etude de spectroscopie RMN du carbone 13**

Les tubules rénaux proximaux murins et humains sont incubés, dans ce cas, pendant 60 minutes dans du tampon Krebs-Henseleit oxygéné contenant, pour une même expérience et dans différentes fioles, soit du [1-<sup>13</sup>C], du [2-<sup>13</sup>C], ou du [3-<sup>13</sup>C]lactate 5 mM, soit du lactate 5 mM non marqué avec du <sup>13</sup>C-bicarbonate 25 mM, en absence ou en présence de CdCl<sub>2</sub> à la concentration de 10 µM pour les tubules de souris et 100 µM pour les tubules humains (voir figure 6, page suivante).

Les tubules rénaux provenant de souris auxquelles nous avons administrées du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines de traitement, sont incubés sans ajout de CdCl<sub>2</sub> in vitro (voir figure 7, page 24).

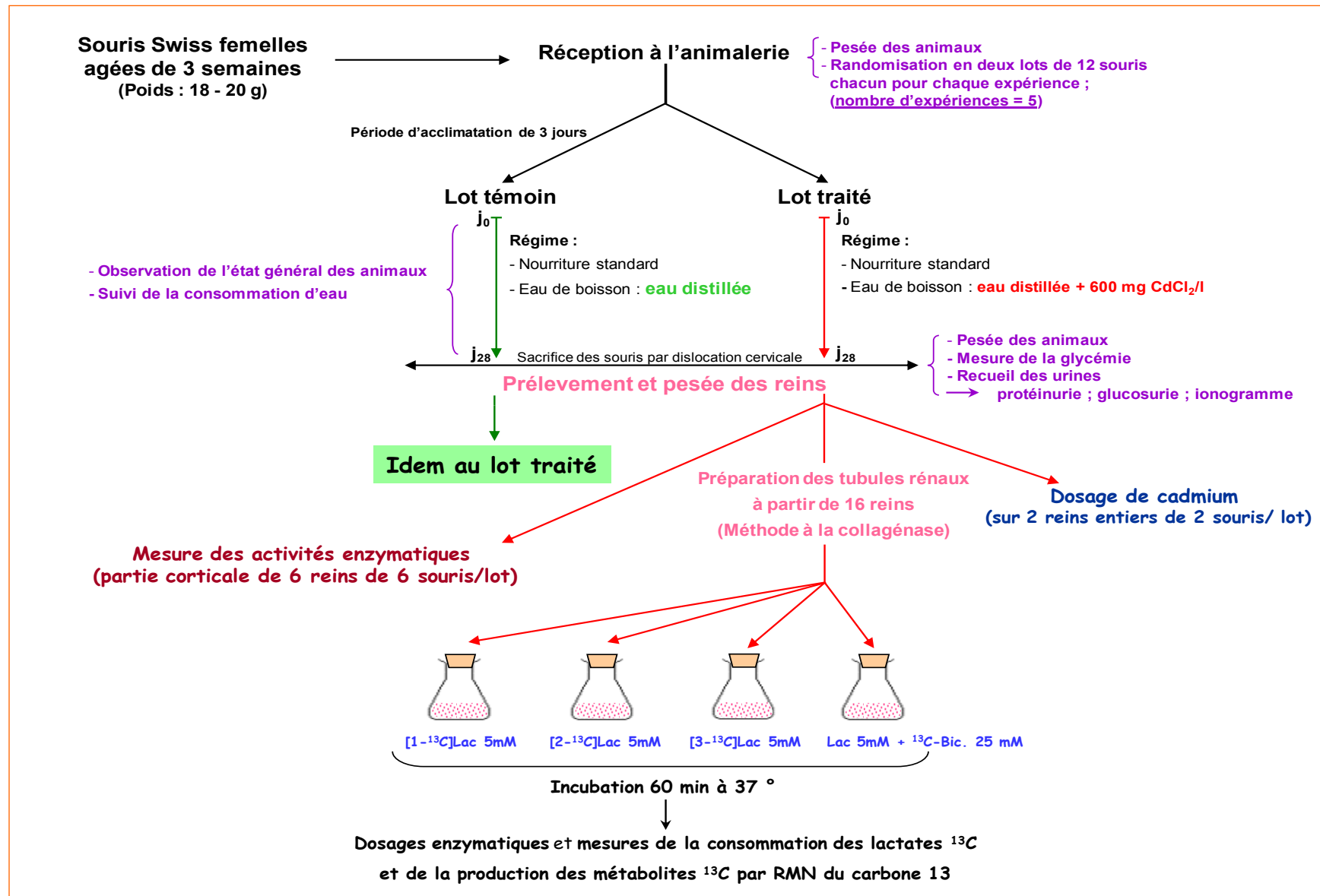
L'arrêt de l'incubation se fait aussi par l'addition d'acide perchlorique. Les débris cellulaires sont éliminés sous forme de culot par centrifugation (2000g pendant 5min) et les surnageants sont neutralisés par la solution de KOH 20%-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%. La [2-<sup>13</sup>C]glycine est ensuite ajoutée comme étalon interne. Ces milieux sont alors lyophilisés puis repris par D<sub>2</sub>O (eau deutérée) et centrifugés (2000g pendant 5 min) pour éliminer le culot de sels puis les surnageants sont récupérés dans des tubes RMN.





**Figure 6 :** Conditions d'incubations des tubules rénaux proximaux murins et humains pour l'étude par spectroscopie RMN des effets du cadmium sur le métabolisme rénal du lactate.

**Bic :** bicarbonate ; **Lac :** lactate ; **Gly :** glycine ; **D<sub>2</sub>O :** eau deutérée ; **RMN :** Résonance Magnétique Nucléaire, **<sup>13</sup>C :** carbone 13.



**Figure 7: Protocole expérimental pour l'étude par spectroscopie RMN des effets du cadmium sur le métabolisme rénal du lactate dans des tubules rénaux proximaux provenant de souris ayant reçu du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines.**

**Bic** : bicarbonate ; **Lac** : lactate ; **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire, <sup>13</sup>C : carbone 13.

### III.3. Dosages des métabolites

- **Le lactate, le glucose, l'alanine, le citrate, l' $\alpha$ -cétoglutarate, le glutamate, la glutamine et le malate** sont dosés par des méthodes enzymatiques.

Le principe de ces dosages consiste à mesurer l'apparition ou la disparition des couples de coenzymes NAD/NADH ou NADP/NADPH. Les variations de concentration du coenzyme sont proportionnelles aux métabolites dosés. Lorsque la prise d'essai d'échantillon à doser permet de générer une variation de la quantité de coenzyme supérieure ou égale à 15 nanomoles, les dosages sont effectués au spectrophotomètre lecteur de plaque SpectraMAX (Molecular devices, England). Lorsque la prise d'essai génère moins de 10 nanomoles de coenzyme, les dosages sont effectués au spectrofluorimètre lecteur de plaque FLUOstar (BMG Labtech SARL, France). Pour les dosages effectués au spectrofluorimètre, une gamme étalon des métabolites à doser est traitée (acidification, neutralisation) exactement comme la suspension tubulaire. Les méthodes employées sont une adaptation pour spectrophotomètre lecteur de plaques ou spectrofluorimètre lecteur de plaque des méthodes décrites par Passonneau et Lowry [112].

- **Coenzyme A et Acétyl-CoA**

Les dérivés coenzymes A (CoA-SH et acétyl-CoA) sont déterminés selon la méthode proposée par Michal et Bergmeyer [113]. Le CoA-SH en présence d'acétylphosphate et de phosphotransacétylase est transformé en acétyl-CoA. Ce dernier en présence de la citrate synthase régénère du CoA-SH grâce à l'oxaloacétate. La vitesse d'utilisation de ce composé et donc la vitesse d'oxydation du malate sous l'action de la malate déshydrogénase est proportionnelle à la quantité de CoA-SH + acétyl-CoA présente dans l'échantillon. L'ajout du N-Ethyl maleimide (NEM), agent complexant les Coenzymes A réduits, permet de doser spécifiquement l'acétyl-CoA.

- **Glutathion réduit/ Glutathion oxydé**

La concentration de glutathion total (glutathion réduit (GSH) + glutathion oxydé (GSSG)) est mesurée par la méthode enzymatique de Griffith [114-115]. Le glutathion réduit réagit non enzymatiquement avec le DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) et conduit à la formation de GSSG et du TNB (2-nitro 5-thiobenzoic acid ; dérivé coloré du DTNB). Le GSSG formé est réduit enzymatiquement par action de la glutathion réductase en présence de NADPH. Cette réaction de recyclage du GSH permet le dosage de quantités très faibles de glutathion total. La vitesse de formation du TNB est suivie au spectrophotomètre à 405 nm. L'addition du 2-vinylpyridine au milieu permet, en se liant au GSH, de doser sélectivement le GSSG.

### III.4. Technique de spectroscopie RMN du carbone 13

#### III.4.a. Principe

Cette technique est fondée sur le magnétisme intrinsèque des noyaux atomiques. Ces noyaux se comportent alors comme des dipôles magnétiques ou des barreaux aimantés microscopiques. Le carbone 13, dont l'enrichissement naturel est de 1,1 %, est l'un des noyaux les plus utilisés en RMN.

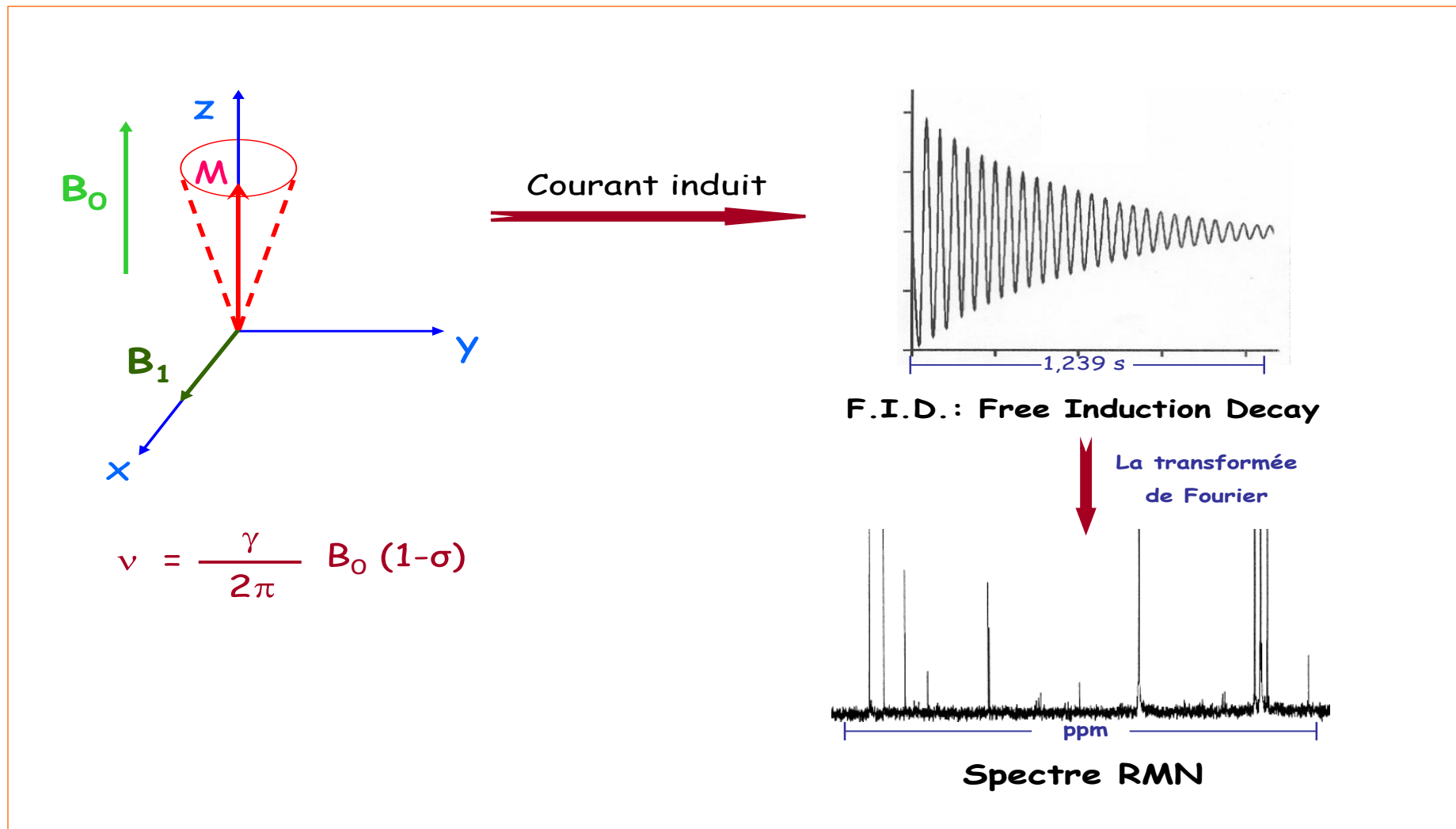
Les échantillons dont on veut étudier le métabolisme du substrat enrichi au  $^{13}\text{C}$  sur un de ses carbones, sont soumis à l'action de deux champs magnétiques (voir figure 8, page 28). Dans un premier temps, les noyaux atomiques sont placés dans un champ magnétique intense et constant  $B_0$  (exprimé en Tesla). Les noyaux de carbone 13 dont le spin est  $\frac{1}{2}$  s'orientent dans la direction du champ principal  $B_0$ , soit dans le même sens, soit dans le sens opposé, correspondant respectivement au niveau d'énergie bas et élevé. A l'état d'équilibre, le vecteur magnétique résultant de l'ensemble des noyaux est orienté dans le même sens que  $B_0$ . Ensuite, une antenne émettrice permet d'appliquer un champ magnétique secondaire  $B_1$  oscillant à la fréquence d'excitation du noyau étudié (fréquence exprimée en mégahertz). Il en résulte un état excité pour lequel la répartition d'énergie entre les deux niveaux d'énergie indiqués précédemment devient en faveur du niveau à énergie élevée. A la fin de l'impulsion d'excitation, les noyaux qui avaient basculé vers l'état d'énergie élevée retournent à leur niveau d'énergie initial en restituant l'énergie qu'ils avaient absorbée. Ceci induit un signal électrique dans l'antenne réceptrice. Ce signal qui décroît librement en fonction du temps est appelé FID (Free Induction Decay ou Décroissance de Précession Libre). La transformée de Fourier, opération mathématique, va permettre de transformer ce signal FID, obtenu en fonction du temps, en un signal exprimé en fonction de la fréquence qui correspond au spectre RMN constitué d'un ensemble de pics. Chaque carbone marqué du substrat et de chacun des produits accumulés est représenté par un pic qui peut être identifié grâce à sa position sur le spectre et dont la surface est proportionnelle à la quantité du métabolite considéré. Ainsi pour chaque carbone marqué du substrat, la spectroscopie RMN permet de suivre, en une seule mesure, son devenir sans recourir à des techniques de séparations des carbones individuels des produits accumulés.

Un modèle mathématique permet de convertir les résultats expérimentaux obtenus par spectroscopie RMN et par dosages enzymatiques en flux enzymatiques.

#### III.4.b. Conditions de mesure

Les mesures ont été effectuées sur un appareil Bruker AM-500 WB. Ce spectromètre est équipé d'un aimant vertical de 11,75 Tesla et d'une sonde multi-noyaux large bande pour des tubes de 5 mm et thermostatée à  $8 \pm 0,5$  °C. L'homogénéité du champ magnétique est ajustée en utilisant le lock du deutérium. Les conditions de mesure de  $^{13}\text{C}$  ont été choisies afin de permettre la meilleure quantification possible des métabolites. Tout le volume utile

de la bobine de détection était rempli par l'échantillon. Les mesures de  $^{13}\text{C}$  ont été effectuées avec un temps de répétition entre chaque impulsion égal au moins à cinq fois le plus long temps de relaxation des carbones présents dans l'échantillon à mesurer soit 50 ou 80 secondes selon l'absence ou la présence de carbones marqués porteurs d'une fonction acide carboxylique. Ainsi l'acquisition a été faite pendant 6h ou 9h (pour 420 scans). Les mesures ont été effectuées à 125,75 MHz, avec une largeur spectrale de 25000 Hz et un angle de basculement de  $90^\circ$  [116-118].



**Figure 8 : Schéma du principe de la spectroscopie RMN**

$B_0$  : champ magnétique principal uniforme ;  $B_1$  : champ magnétique secondaire oscillant ;  $M$  : vecteur magnétique résultant ;  $\nu$  : fréquence de résonance ;  $\gamma$  : rapport gyromagnétique ;  $\sigma$  : effet d'écran

### III.4.c. Quantification des données RMN

Sur le spectre RMN, les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (parties par million) par rapport à la fréquence de résonance du tétraméthylsilane en utilisant comme référence interne la [2-<sup>13</sup>C] glycine dont le déplacement chimique est de 42,7 ppm. Les attributions des pics ont été effectuées par référence aux déplacements chimiques donnés dans la littérature [119-120]. L'identification définitive est confirmée par ajout de produit pur dans l'échantillon étudié si une augmentation significative du ou des pics du produit étudié est observée.

Le spectre obtenu pour chaque échantillon permet d'identifier quels sont les différents produits marqués et sur quels carbones est porté le marquage. Dans nos conditions de mesure, la surface de chaque pic est proportionnelle à la quantité du produit <sup>13</sup>C correspondant. De plus, connaissant la quantité (en μmoles) de standard interne ajouté, ainsi que la surface du pic correspondant, nous obtenons un facteur de conversion (μmoles/surface du pic) qui nous permet de quantifier les produits marqués accumulés.

Pour chaque quantité de produit <sup>13</sup>C mesurée, la quantité réellement mise en jeu (Q), a été obtenue en tenant compte de l'abondance naturelle selon la formule :

$$Q = (L_m - I_m) / (A_S - a_S)$$

Où  $L_m$  est la quantité de métabolite <sup>13</sup>C mesurée.

$I_m$  est la quantité de <sup>13</sup>C liée à l'abondance naturelle, obtenue en multipliant par 1,1% la quantité déterminée enzymatiquement du métabolite considéré.

$A_S$  est l'abondance totale en <sup>13</sup>C du carbone enrichi du substrat.

$a_S$  est l'abondance naturelle en <sup>13</sup>C correspondante.

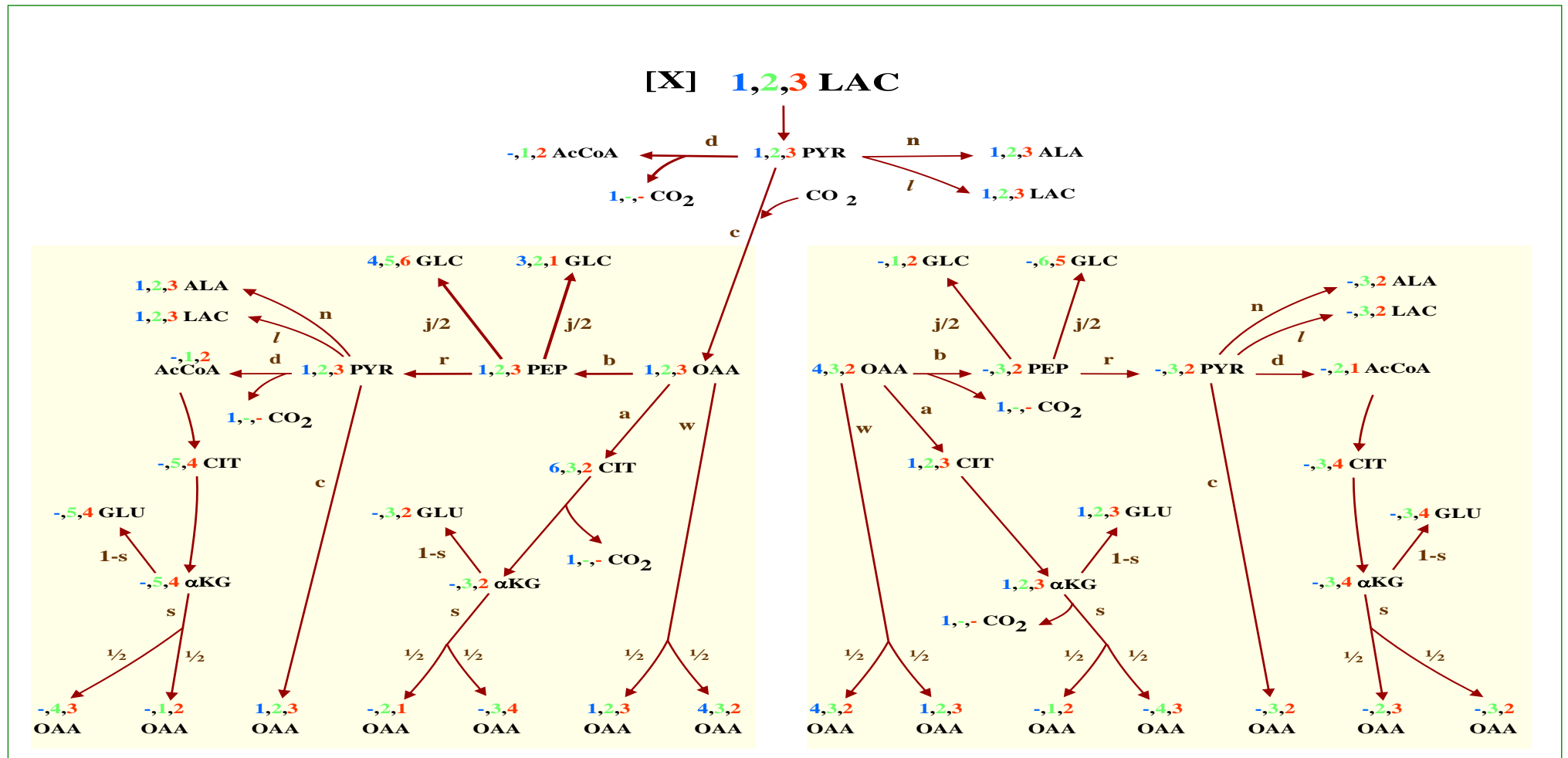
#### III.4.d. Calcul des flux enzymatiques

Le flux d'une enzyme correspond à la quantité par unité de temps (exprimé dans notre cas en  $\mu\text{moles/g poids sec/h}$ ) du métabolite utilisé ou formé selon qu'il est substrat ou produit de la réaction catalysée par l'enzyme considérée. Les flux des principales enzymes qui participent au métabolisme du lactate ont été quantifiés en combinant les résultats des dosages enzymatiques à ceux obtenus par spectroscopie RMN avec un modèle mathématique. Ce modèle mathématique a été élaboré selon les principes présentés dans différentes publications du laboratoire [121-122]. Il tient compte du devenir individuel des carbones du lactate et des proportions de conversion des métabolites à chaque étape enzymatique (voir figure 9, page suivante). Chaque enzyme ou groupe d'enzymes est affecté d'une lettre minuscule correspondant à la proportion de métabolite(s), substrat(s) de l'enzyme ou du groupe d'enzymes considéré, qui est transformée en un ou plusieurs autres métabolites au cours de la réaction.

La quantité théorique de n'importe quel métabolite intermédiaire formé ou de n'importe quel produit accumulé au cours du métabolisme du substrat, le lactate, pourra être calculée en multipliant la quantité théorique de lactate consommé, [X], par les proportions successives associées aux différentes réactions enzymatiques impliquées dans sa synthèse à partir de lactate.

La résolution du système d'équations obtenu pour l'ensemble des produits marqués accumulés nous permet de calculer chacune des proportions, puis convertir les quantités théoriques des métabolites formés qui ne s'accumulent que partiellement ou pas du tout en quantités exprimées en  $\mu\text{moles}$  et finalement d'obtenir les flux correspondant en  $\mu\text{moles/g de poids sec/h}$ .





**Figure 9 : Devenir des carbones 1, 2 et 3 du lactate marqué au carbone 13 au cours de son métabolisme**

Ce schéma présente le devenir des carbones 1,2 et 3 du lactate en indiquant à gauche du nom de chaque métabolite et en position 1,2 et 3 le numéro d'emplacement occupé par les carbones du métabolite considéré venant respectivement du C-1, C-2 et C-3 du lactate ; un trait indique que le carbone correspondant du lactate a été perdu sous forme de CO<sub>2</sub> au cours de la synthèse du métabolite considéré. Une lettre ou le chiffre ½ indique la proportion de métabolite transformé à chaque étape enzymatique. Ce schéma présente le résultat d'un tour complet des cycles de Krebs, (OAA→PEP→PYR→OAA), (OAA→PEP→PYR→AcCoA→CIT→OAA) et de l'équilibration (OAA→MAL→FUM→OAA). Sur ce schéma, la partie gauche montre le devenir des carbones 1,2 et 3 de l'oxaloacétate alors que la partie droite montre le devenir des carbones 4,3 et 2 de l'oxaloacétate. (ALA : alanine ; AcCoA : acétyl-CoA ; CIT : citrate ; FUM : fumarate ; GLC : glucose ; GLU : glutamate ; LAC : lactate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacétate ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PYR : pyruvate ; αKG : α-cétoglutarate ; [X] : quantité théorique de lactate consommé).

### **III.5. Mesure des activités enzymatiques**

Les mesures des activités enzymatiques de la lactate déshydrogénase (LDH), phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose 1,6-bisphosphatase (F 1,6-Pase) et glucose-6-phosphatase (G6Pase) sont effectuées selon les méthodes publiées par Passonneau et Lowry [112]. L'activité pyruvate carboxylase (PC) est mesurée selon la méthode Berndt [123].

Les mesures de ces activités enzymatiques sont effectuées à partir des fragments rénaux corticaux. Ces fragments rénaux sont broyés avec l'Ultra-Turrax® à 15 000 tours/min dans un tampon phosphate 20 mM pH 7 ; EDTA 0,5 mM ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 mM ; albumine bovine sérique 0,02% (w/v) et glycérol 25% (v/v). L'homogénat est utilisé pur ou dilué, selon l'activité enzymatique à mesurer. Dans chaque mesure d'activité on utilise une gamme de standards traitée de la même manière que les échantillons.

### **III.6. Dosage des protéines et détermination du poids sec des tubules**

Le dosage des protéines est effectué par une méthode à l'acide bicinchoninique [124] ; méthode colorimétrique qui utilise le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin. Le poids sec des tubules ajoutés dans chaque Erlenmeyer est déterminé par pesée dans chaque expérience. Pour cela, un millilitre de suspension de tubules et un millilitre de Krebs-Henseleit sont mis chacun dans un bécher préalablement taré. Les deux béchers sont ensuite placés à 95°C pendant 24 heures. Après refroidissement dans un dessiccateur, les béchers sont pesés. Le poids sec de tubules contenus dans un millilitre de suspension correspond alors à la différence entre le poids sec des tubules + Krebs et le poids sec du Krebs seul.

### **III.7. Dosage du cadmium dans les reins**

Les concentrations de Cd dans les tubules rénaux proximaux incubés in vitro en présence de CdCl<sub>2</sub> ou dans les reins de souris exposées in vivo au CdCl<sub>2</sub>, ont été mesurées par ICP-MS (spectrométrie de masse couplée à la torche à plasma), à l'aide d'un spectromètre Thermo Elemental X7 ICP-MS.

Le tissu rénal, préalablement séché, est digéré dans l'acide nitrique concentré (70% HNO<sub>3</sub>). La concentration de cadmium est déterminée dans une dilution appropriée de ce concentré nitrique contenant de l'indium 115 comme étalon interne. La sensibilité de l'analyse pour le cadmium est de 0,2 ng/ml.

### III.8. Expression des résultats et analyse statistique

L'utilisation du substrat et la production des métabolites ont été calculées par différence entre la quantité de substrat ou de métabolite présent dans le tissu et le milieu réactionnel avant et après incubation.

Les valeurs obtenues sont ramenées en nanomoles ou  $\mu$ moles de substrat utilisé ou de produit formé par gramme de tissu sec, contenu dans chaque fiole, pour une heure.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne  $\pm$  SEM de quatre ou cinq expériences différentes. Chaque condition expérimentale a été réalisée en double ou en quadruple.

Pour l'étude dose-effet, un test d'analyse de variance (ANOVA) est appliqué pour comparer les résultats obtenus aux différentes doses de cadmium. La significativité des différences est mesurée par le test de Student-Newman-Keuls. Le seuil de significativité est fixé à  $p$  inférieur à 0,05.

Pour l'étude RMN, les flux enzymatiques ont été calculés en combinant les résultats des dosages enzymatiques à ceux obtenus par spectroscopie RMN avec un modèle mathématique du métabolisme du lactate adapté d'un modèle du métabolisme de l'alanine. Ces flux sont exprimés en micromoles de métabolite utilisé ou produit par heure et par gramme de poids sec. Les résultats sont analysés par le test  $t$  de Student. Le seuil de significativité est fixé à  $p$  inférieur à 0,05.

### III.9. Réactifs

Les enzymes, coenzymes et le L-lactate ont été commandés chez Roche, Meylan, France ; le chlorure de cadmium et le 2-Vinylpyridine ont été achetés chez Fluka ; le DTNB, l'acide 2 thiobarbiturique et le N-Ethylmaleimide proviennent de chez Sigma.

La L-[2- $^{13}$ C]glycine, les L-[1- $^{13}$ C]-, L-[2- $^{13}$ C]-, L-[3- $^{13}$ C]lactates et  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  proviennent de chez Euriso-top, Saint-Aubin, France.

## **IV. Résultats**

### **IV.1. Etude dose-effet du cadmium sur le métabolisme rénal du lactate dans les tubules rénaux proximaux murins et humains**

Nous avons étudié les effets de concentrations croissantes de chlorure de cadmium sur des suspensions de tubules proximaux murins ou humains incubés en présence de lactate 5mM comme substrat en absence ou en présence de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) à des concentrations allant de 1 à 50  $\mu\text{M}$  pour les tubules de souris et de 10 à 500  $\mu\text{M}$  pour les tubules humains. Le choix de ces concentrations a été fait à partir d'expériences préliminaires utilisant des gammes larges de concentrations de  $\text{CdCl}_2$ . Ces tubules produisent du glucose à partir du lactate de manière linéaire au cours du temps pendant au moins 60 minutes (données non présentées).

#### **IV.1.a. Effet du cadmium sur le métabolisme énergétique**

L'effet du cadmium sur le métabolisme énergétique est évalué par la mesure de la néoglucogenèse à partir du lactate et la concentration cellulaire en ATP.

La consommation de lactate par les tubules rénaux de souris diminue progressivement en fonction des concentrations de cadmium (figure 10a, page 36); cette baisse de consommation est significative à partir de 20  $\mu\text{M}$  de cadmium. En parallèle à cette baisse de consommation de lactate, la synthèse de glucose est inhibée de façon significative à partir de 5  $\mu\text{M}$  de cadmium (figure 10a) et à la concentration de cadmium de 10  $\mu\text{M}$ , on observe une inhibition voisine de 60 %.

Pour les tubules rénaux humains, on note aussi une diminution progressive de la consommation de lactate en fonction des concentrations de cadmium (figure 11a, page 37). L'inhibition de la synthèse de glucose est significative à partir de 50  $\mu\text{M}$  de cadmium (figure 11a) et à la concentration de cadmium de 100  $\mu\text{M}$ , la production de glucose est inhibée de presque 60 %.

Le cadmium induit une déplétion importante de la concentration intracellulaire d'ATP. Cette diminution est significative à partir de 10  $\mu\text{M}$  dans les tubules rénaux de souris et dépasse 70% à la concentration de 50  $\mu\text{M}$  de cadmium (figure 10b, page 36).

Dans les tubules rénaux humains, cette déplétion est significative à partir de 100  $\mu\text{M}$  et dépasse 60 % à la concentration de 500  $\mu\text{M}$  de cadmium (figure 11b, page 37).

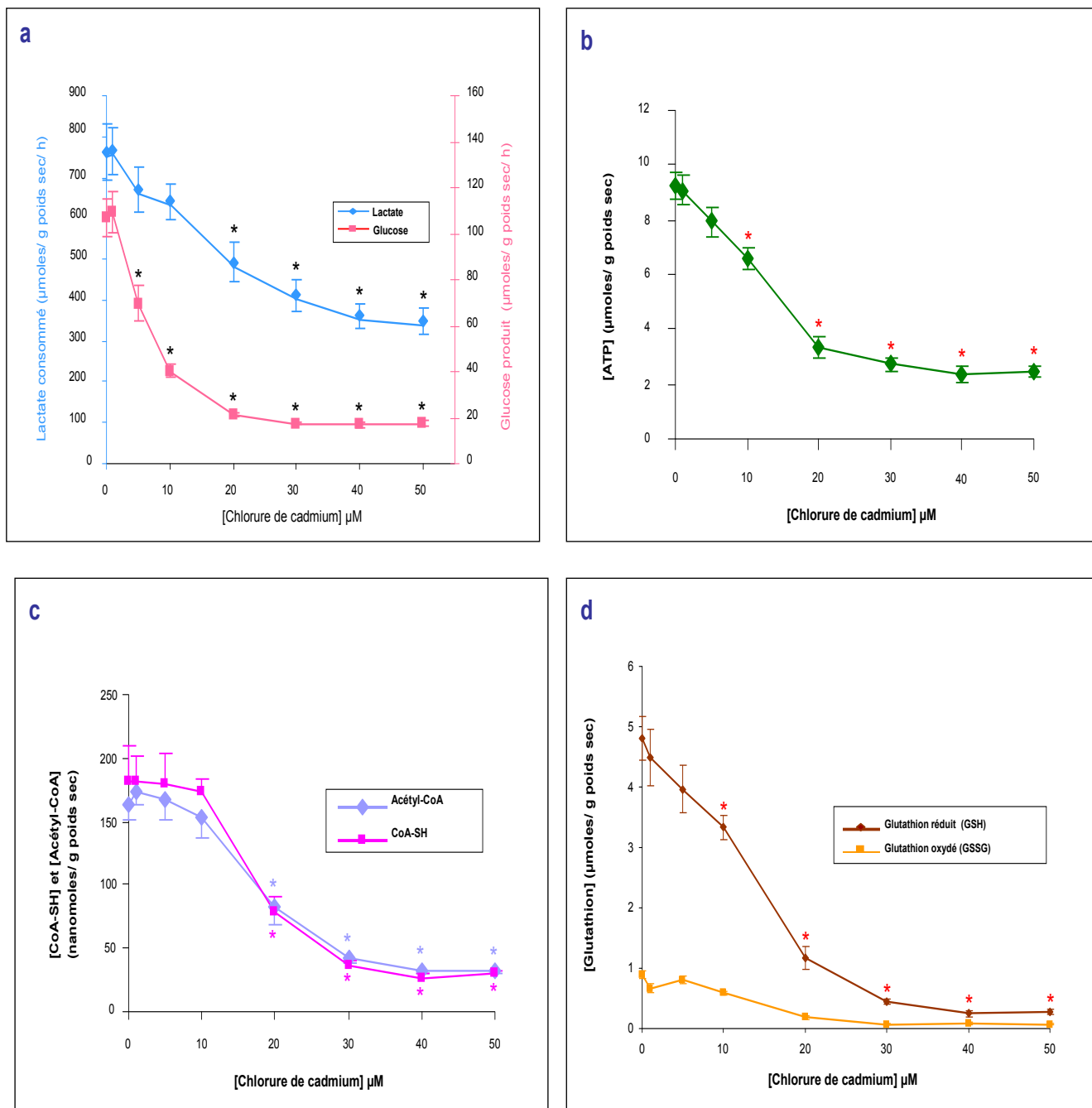
#### **IV.1.b. Effet du cadmium sur les dérivés CoA**

On note pour les tubules proximaux de rein de souris, une diminution importante des concentrations tubulaires des CoA-SH et de l'acétyl-CoA en fonction des concentrations de cadmium dans le milieu d'incubation. En présence de 20  $\mu\text{M}$  de cadmium, cette diminution est de 56 % et de 50 %, respectivement pour les CoA-SH et acétyl-CoA (figure 10c, page 36). Pour les tubules rénaux humains, la diminution des concentrations de CoA-SH et de l'acétyl-CoA est significative à partir de la concentration de 100  $\mu\text{M}$  de cadmium. En présence de 500  $\mu\text{M}$  de cadmium, cette diminution est de 65 % et de 59 %, respectivement pour les CoA-SH et acétyl-CoA (figure 11c, page 37).

#### **IV.1.c. Effet du cadmium sur la concentration du glutathion**

Les concentrations de glutathion réduit et de glutathion oxydé sont utilisées comme marqueurs du stress oxydatif. Le cadmium induit une déplétion dose-dépendante du glutathion intracellulaire, principalement de la forme réduite, dans les tubules rénaux murins (figure 10d, page 36), et humains (figure 11d, page 37).

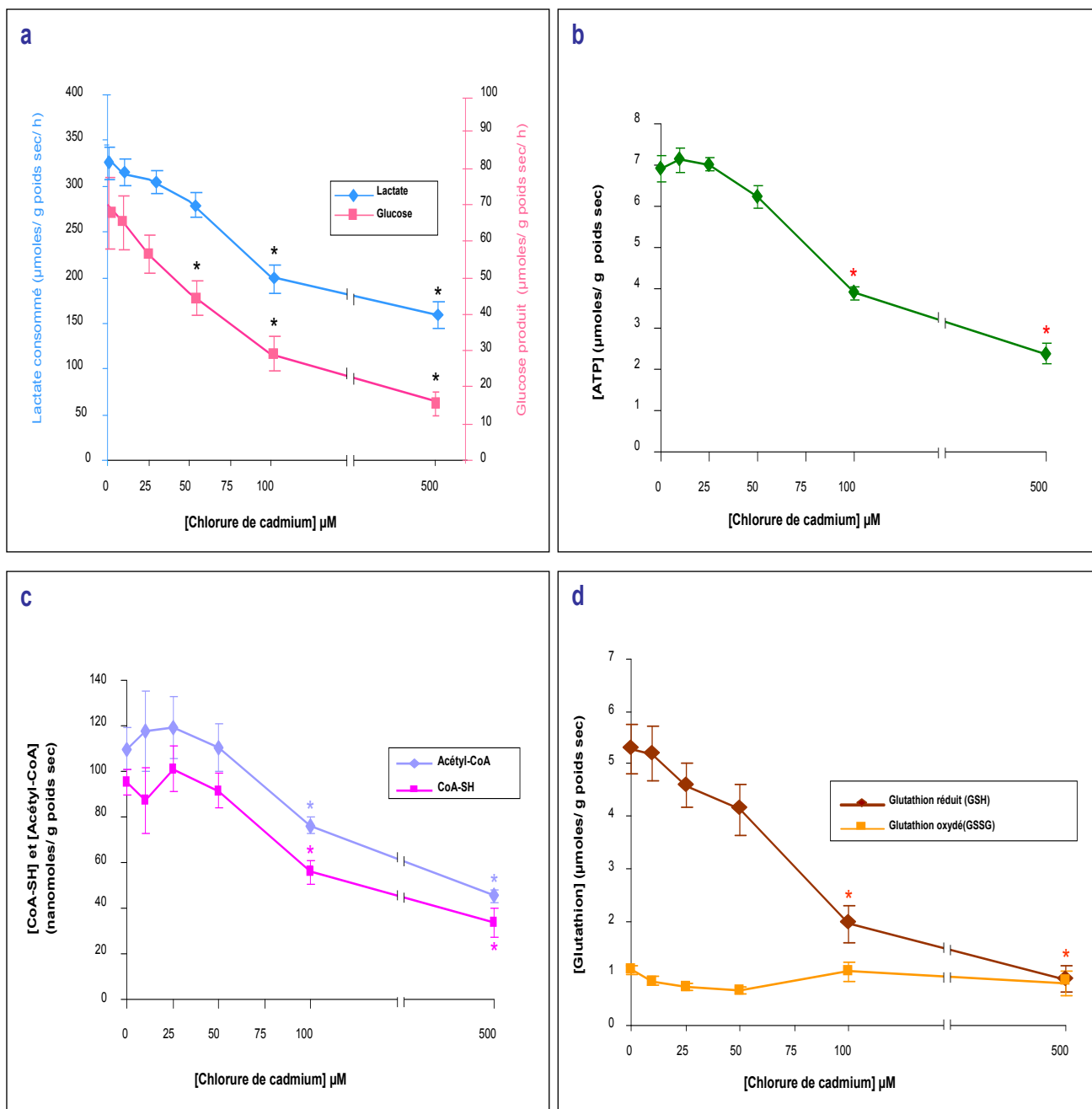
En résumé, des changements biochimiques significatifs sont observés suite à l'exposition des fragments tubulaires rénaux murins et humains au  $\text{CdCl}_2$ , notamment la baisse de la concentration cellulaire de l'ATP, du glutathion réduit, du CoA-SH et de l'acétyl-CoA. Toutefois, il semblerait que la baisse de la production de glucose précède le changement des autres paramètres métaboliques aux intervalles de concentrations utilisés.



**Figure 10 :** Effets de concentrations croissantes de chlorure de cadmium dans les tubules rénaux proximaux de souris sur : (a) la consommation de lactate et la production de glucose, (b) la concentration cellulaire d'ATP, (c) des coenzymes A et (d) du glutathion.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne  $\pm$  SEM de quatre expériences différentes.

Un test d'analyse de variance (ANOVA) est appliqué pour comparer les résultats obtenus aux différentes doses de cadmium. La significativité des différences est mesurée par le test de Student-Newman-Keuls. Le seuil de significativité est fixé à : \*  $p$  inférieur à 0,05.



**Figure 11** : Effets de concentrations croissantes de chlorure de cadmium dans les tubules rénaux proximaux humains sur : (a) la consommation de lactate et la production de glucose, (b) la concentration cellulaire d'ATP, (c) des coenzymes A et (d) du glutathion

Les résultats sont exprimés comme la moyenne  $\pm$  SEM de quatre expériences différentes.

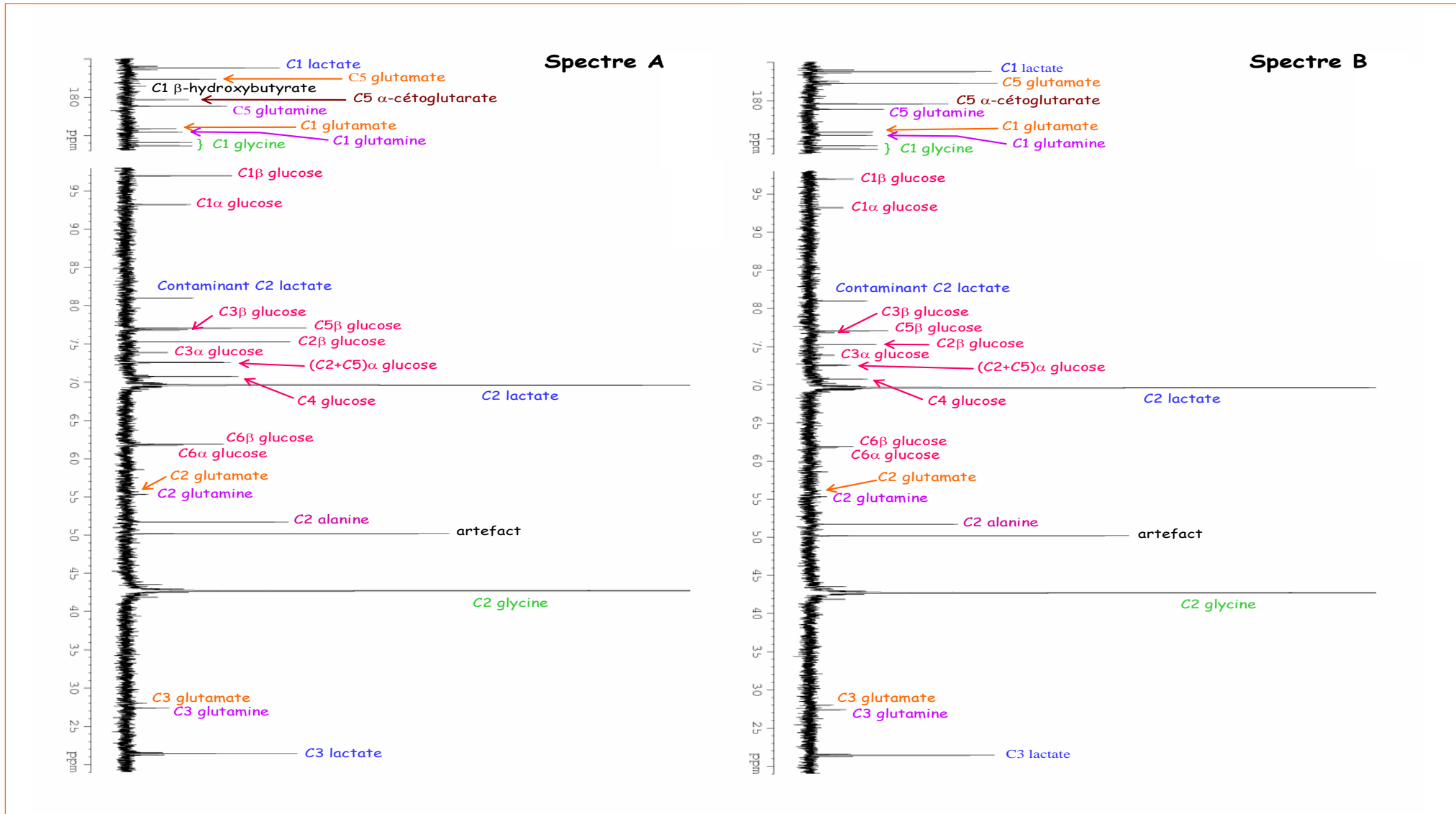
Un test d'analyse de variance (ANOVA) est appliqué pour comparer les résultats obtenus aux différentes doses de cadmium. La significativité des différences est mesurée par le test de Student-Newman-Keuls. Le seuil de significativité est fixé à : \*  $p$  inférieur à 0,05.

## **IV.2. Etude par spectroscopie RMN des effets du cadmium sur le métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux murins et humains**

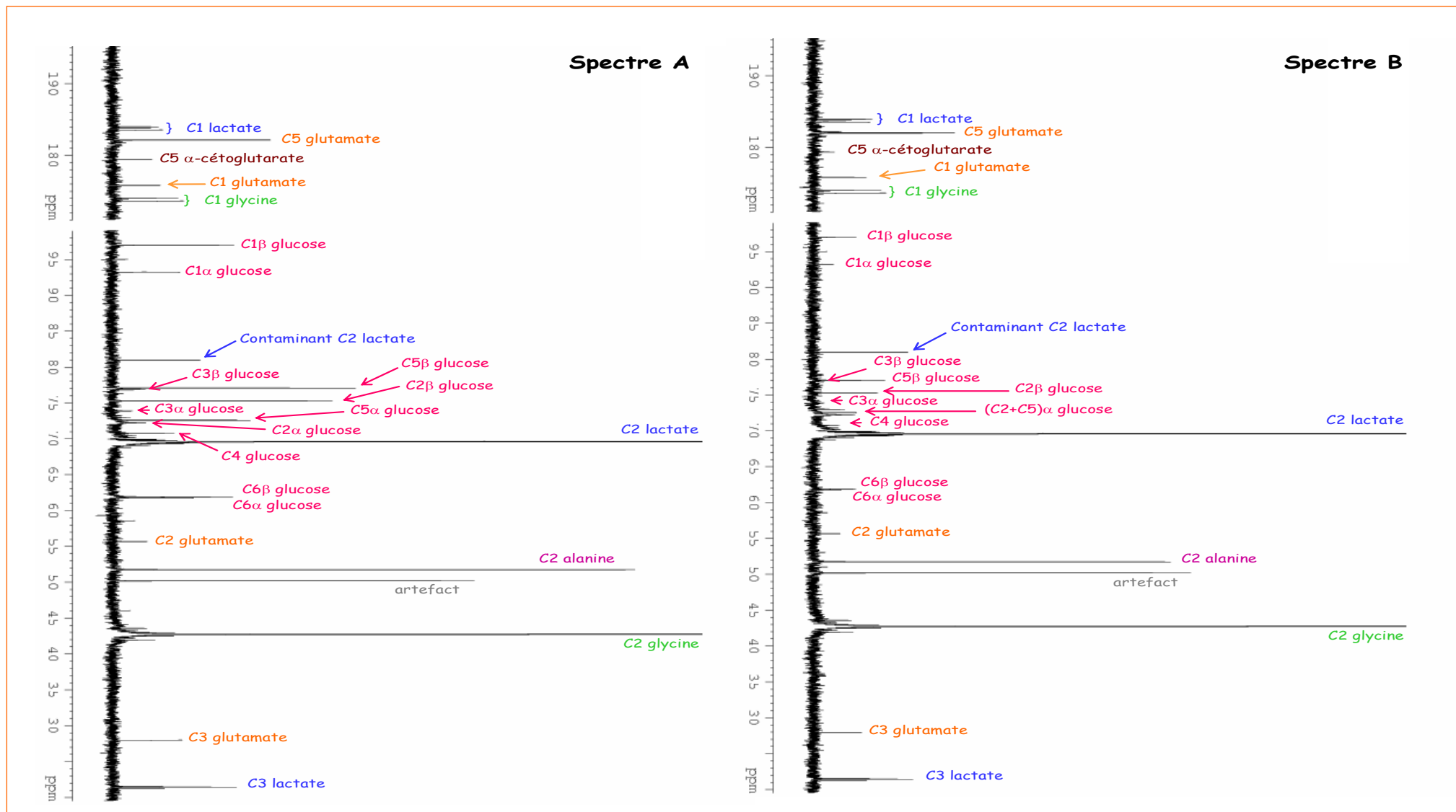
Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail montrent clairement que le cadmium altère le métabolisme rénal du lactate et inhibe la néoglucogenèse à partir de ce substrat. Afin d'approfondir notre connaissance de l'interaction du cadmium avec ce métabolisme, nous avons entrepris une étude à l'aide de la spectroscopie RMN du carbone 13. Les tubules rénaux proximaux murins ou humains sont incubés, dans ce cas, pendant 60 minutes dans du tampon Krebs-Henseleit oxygéné contenant soit du [1-<sup>13</sup>C], ou du [2-<sup>13</sup>C], ou du [3-<sup>13</sup>C]lactate 5 mM, soit du lactate 5 mM non marqué avec du [<sup>13</sup>C] bicarbonate 25 mM, en absence ou en présence de CdCl<sub>2</sub>. Comme nous avons vu précédemment, le CdCl<sub>2</sub> inhibe de façon dose-dépendante la néoglucogenèse à partir du lactate 5 mM avec une concentration inhibitrice 50 (C.I. 50) proche de 10 μM pour les tubules rénaux proximaux murins et de 100 μM pour les tubules humains; ces C.I. 50 (approximatives) ont été retenues pour cette étude. A la fin de l'incubation, la consommation des [<sup>13</sup>C]lactates et la production des [<sup>13</sup>C]métabolites ont été mesurées par des techniques enzymatiques et de spectroscopie RMN du carbone 13.

Pour l'ensemble des spectres obtenus dans les différentes conditions, nous avons identifié les différents produits marqués et les carbones sur lesquels portait le marquage. Presque tous les produits marqués ont été déterminés enzymatiquement. L'utilisation d'un standard interne, la [2-<sup>13</sup>C]glycine, a permis de quantifier les différentes espèces marquées de chacun des produits accumulés après correction par l'abondance naturelle, comme indiqué dans le chapitre III « Matériels et Méthodes ». Les résultats de ces mesures sont groupés dans l'annexe I (tableaux 1-5, p. 64-68 pour la souris) et l'annexe II (tableaux 1-5, p. 70-74 pour l'homme). A titre d'exemple, les figures 12 et 13 (pages 39 et 40) montrent les spectres obtenus en absence (spectre A) et en présence (spectre B) de CdCl<sub>2</sub> avec le [2-<sup>13</sup>C]lactate comme substrat respectivement pour les tubules rénaux murins et humains. La comparaison de ces spectres pour les deux conditions expérimentales (absence et présence de CdCl<sub>2</sub>), montre que tous les carbones du glucose sont marqués et que le cadmium inhibe fortement leur synthèse. On note aussi une resynthèse de lactate marqué sur les carbones 1 et 3 à partir du [2-<sup>13</sup>C]lactate. La synthèse de la glutamine marquée est observée exclusivement dans les tubules rénaux de souris car le rein de souris possède, contrairement à celui de l'homme, la glutamine synthétase.





**Figure 12 :** Métabolisme du [2-<sup>13</sup>C]lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris en absence (spectre A) et en présence (spectre B) de 10 μM de chlorure de cadmium.



**Figure 13** : Métabolisme du [2-<sup>13</sup>C]lactate dans les tubules rénaux proximaux humains en absence (spectre A) et en présence (spectre B) de 100 μM de chlorure de cadmium.

A partir des [2-<sup>13</sup>C]- et [3-<sup>13</sup>C]lactates comme substrats, le glucose formé est marqué sur tous ses carbones. Ce marquage est équivalent en C1 et C6, C2 et C5 et C3 et C4. En effet, le [2-<sup>13</sup>C]- et [3-<sup>13</sup>C]lactate sont les précurseurs respectifs du [2-<sup>13</sup>C]- et [3-<sup>13</sup>C]pyruvate. Le pyruvate marqué sur le carbone 2 peut donner par la voie de la pyruvate carboxylase de l'oxaloacétate marqué sur le carbone 2 qui sera décarboxylé pour conduire à la synthèse de phosphoénolpyruvate marqué soit sur le carbone 2 soit, du fait de l'équilibration partielle oxaloacétate/malate/fumarate, sur le carbone 3 car le fumarate est une molécule symétrique. De la même façon le pyruvate marqué sur le carbone 3 peut conduire à la synthèse de phosphoénolpyruvate marqué soit sur le carbone 2, soit sur le carbone 3. Deux molécules de phosphoénolpyruvate pourront se combiner pour former une molécule de glucose marquée de façon équivalente sur les carbones 2 et 5, et sur les carbones 1 et 6 (voir figure 9, page 31). Le phosphoénolpyruvate par l'action de la pyruvate kinase peut également donner du pyruvate marqué de la même manière. Avec le même profil de marquage, le pyruvate pourra s'accumuler sous forme d'alanine ou de lactate respectivement via l'alanine aminotransférase ou via la lactate déshydrogénase. Ce pyruvate a également la possibilité d'entrer dans le cycle de Krebs, soit sous forme d'acétyl-coenzyme A, en perdant son carbone 1 sous forme de CO<sub>2</sub>, par la voie de la pyruvate déshydrogénase, soit sous forme d'oxaloacétate obtenu par fixation, via la pyruvate carboxylase, d'un carbone provenant du CO<sub>2</sub>. Oxaloacétate et acétyl-CoA peuvent se condenser en quantités équimolaires pour former du citrate sous l'action de la citrate synthase. Le citrate conduit à la formation d'α-cétoglutarate dont une partie quitte le cycle de Krebs pour former du glutamate puis, chez la souris, de la glutamine.

Le glucose marqué sur les carbones 3 ou 4, dont le précurseur est l'oxaloacétate marqué sur le carbone 1, peut être obtenu par la voie de la pyruvate carboxylase mais aussi par la voie de la pyruvate déshydrogénase et du cycle des acides tricarboxyliques (voir figure 9, page 31). A partir du [1-<sup>13</sup>C]lactate, le glucose est marqué exclusivement sur les carbones 3 et/ou 4. Le marquage sur ces carbones caractérise le passage du [1-<sup>13</sup>C]lactate au niveau de la pyruvate carboxylase. Le passage par la pyruvate déshydrogénase conduit à la perte du marquage sous forme de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>. Le glutamate et la glutamine marqués sur le carbone 1 proviennent de l'OAA marqué sur le carbone 4 obtenu à la suite de l'équilibration oxaloacétate/malate/fumarate (voir figure 9, page 31).

A partir de lactate non marqué plus bicarbonate marqué, du glucose marqué dans les mêmes proportions mais exclusivement sur les carbones 3 et/ou 4 est accumulé. Ces marquages sur le glucose sont le résultat de l'équilibration oxaloacétate/malate/fumarate et de l'activité de la pyruvate carboxylase. Lors de la fixation du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> sur le pyruvate par la pyruvate carboxylase, il y a formation d'OAA marqué sur son carbone 4. Cet OAA peut former directement du PEP ou continuer dans le cycle de Krebs en formant du citrate. Dans les deux cas le marquage est perdu sous forme de CO<sub>2</sub> et ne se retrouve donc pas dans le glucose.

Mais une partie de cet oxaloacétate peut également aller s'équilibrer avec le fumarate pour redonner de l'OAA dont une molécule sur deux est marquée sur le carbone 1. Finalement beaucoup moins de 50 % de l'OAA total formé a son Carbone 1 qui provient du CO<sub>2</sub> parce que l'équilibration ne concerne pas tout l'OAA. Du [1-<sup>13</sup>C]lactate peut également être formé à partir de [1-<sup>13</sup>C]PEP via le [1-<sup>13</sup>C]pyruvate.

A noter que comparés au [1-<sup>13</sup>C]lactate ou lactate plus [<sup>13</sup>C]bicarbonate, les [2-<sup>13</sup>C]- et [3-<sup>13</sup>C]lactates nous fournissent plus d'informations pour le calcul des flux enzymatiques car ces marquages sont plus difficilement éliminés sous forme de CO<sub>2</sub>. De ce fait, ils sont retrouvés en plus grande quantité et sur un plus grand nombre de carbones dans les produits finaux du métabolisme. L'incorporation du [<sup>13</sup>C]CO<sub>2</sub> reflète l'activité de la pyruvate carboxylase. L'utilisation de ces différents marquages a pour but d'obtenir suffisamment de données expérimentales pour avoir une vision globale du devenir métabolique des différents carbones du lactate et pouvoir calculer les flux métaboliques.

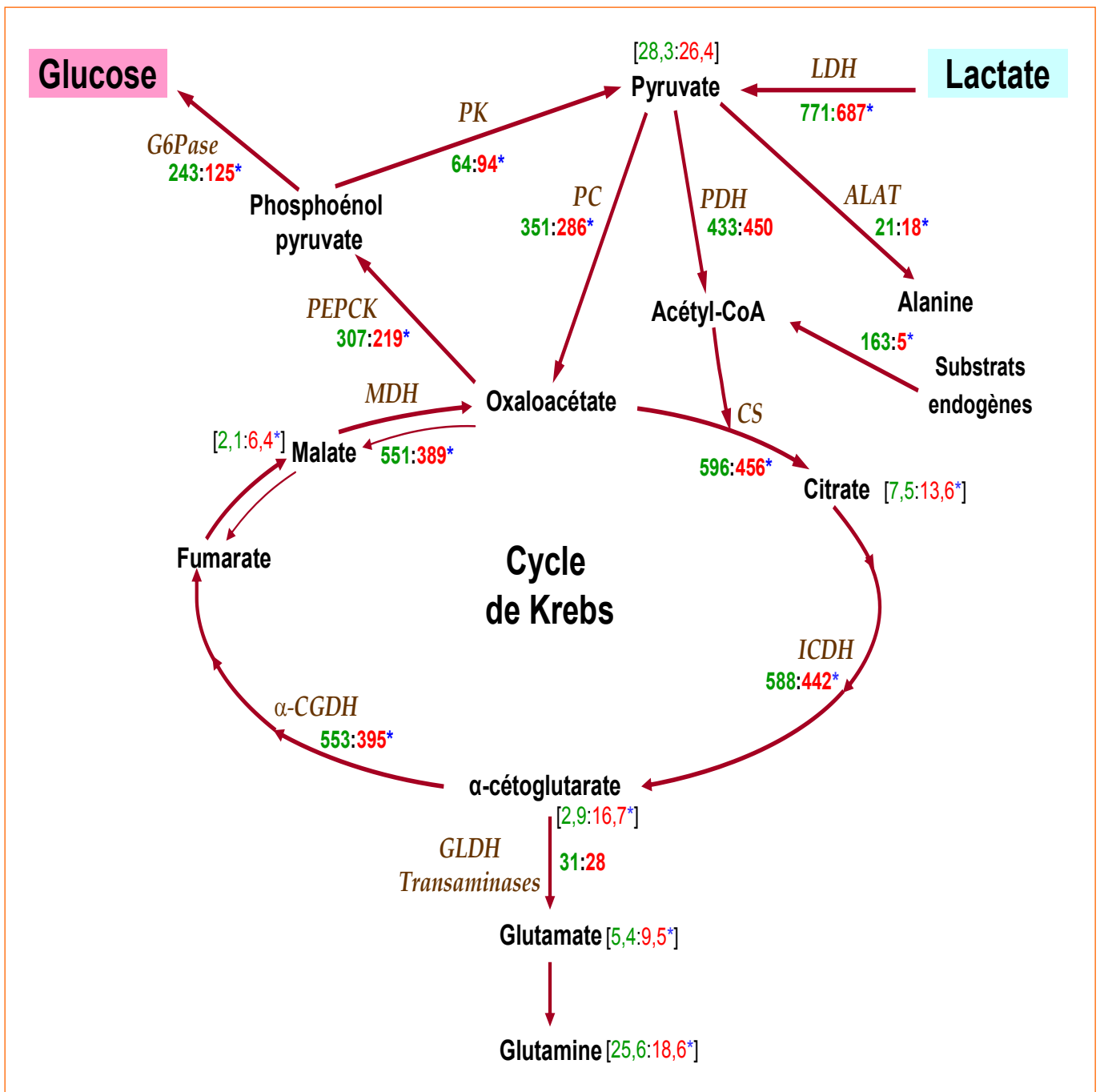
La combinaison des résultats des dosages enzymatiques à ceux obtenus par RMN avec un modèle mathématique du métabolisme du lactate (dérivé d'un modèle développé pour le métabolisme de l'alanine [88]) nous a, en effet, permis d'identifier les principales enzymes intervenant dans ce métabolisme et de quantifier leurs flux.

Nous montrons que le cadmium, aussi bien pour les tubules murins et humains, inhibe le flux de la lactate déshydrogénase (qui initie l'utilisation du lactate), de l'alanine aminotransférase (avec baisse de la synthèse d'alanine), de la pyruvate carboxylase (qui catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate) et celui des autres enzymes de la néoglucogenèse, notamment, la phosphoénolpyruvate carboxykinase et la glucose-6-phosphatase (voir figures 14 et 15, pages 44 et 45). Pour les tubules de souris, le flux de la pyruvate déshydrogénase n'est pas modifié alors que ceux du cycle des acides tricarboxyliques sont fortement inhibés avec accumulation de citrate, d'α-cétoglutarate, de glutamate et de malate. Le flux de la pyruvate kinase est par contre augmenté. En revanche, pour les tubules humains, les flux de la pyruvate déshydrogénase et ceux de l'ensemble du cycle des acides tricarboxyliques ne sont pas modifiés.

Nous constatons que ces variations de flux, sous l'effet du cadmium, se produisent simultanément avec une baisse de la concentration cellulaire d'ATP alors que le glutathion total, l'acétyl-CoA et CoA-SH restent inchangés dans les tubules rénaux de souris (voir tableau 1 de l'annexe I, page 64) et une baisse à la fois des concentrations cellulaires d'ATP, de glutathion total, d'acétyl-CoA et de coenzyme A dans les tubules rénaux humains (voir tableau 1 de l'annexe II, page 70).

Par ailleurs, on n'observe pas de modifications significatives des balances carbonées <sup>12</sup>C et <sup>13</sup>C (voir tableaux 1-4, pages 64-67, de l'annexe I pour la souris et tableaux 1-4, pages 70-73 de l'annexe II pour l'homme). La balance <sup>12</sup>C correspond à la différence entre la quantité de lactate consommée et la somme des différents produits carbonés accumulés à savoir le glucose, l'alanine, le pyruvate, le citrate, l'α-cétoglutarate, le glutamate, le malate et la

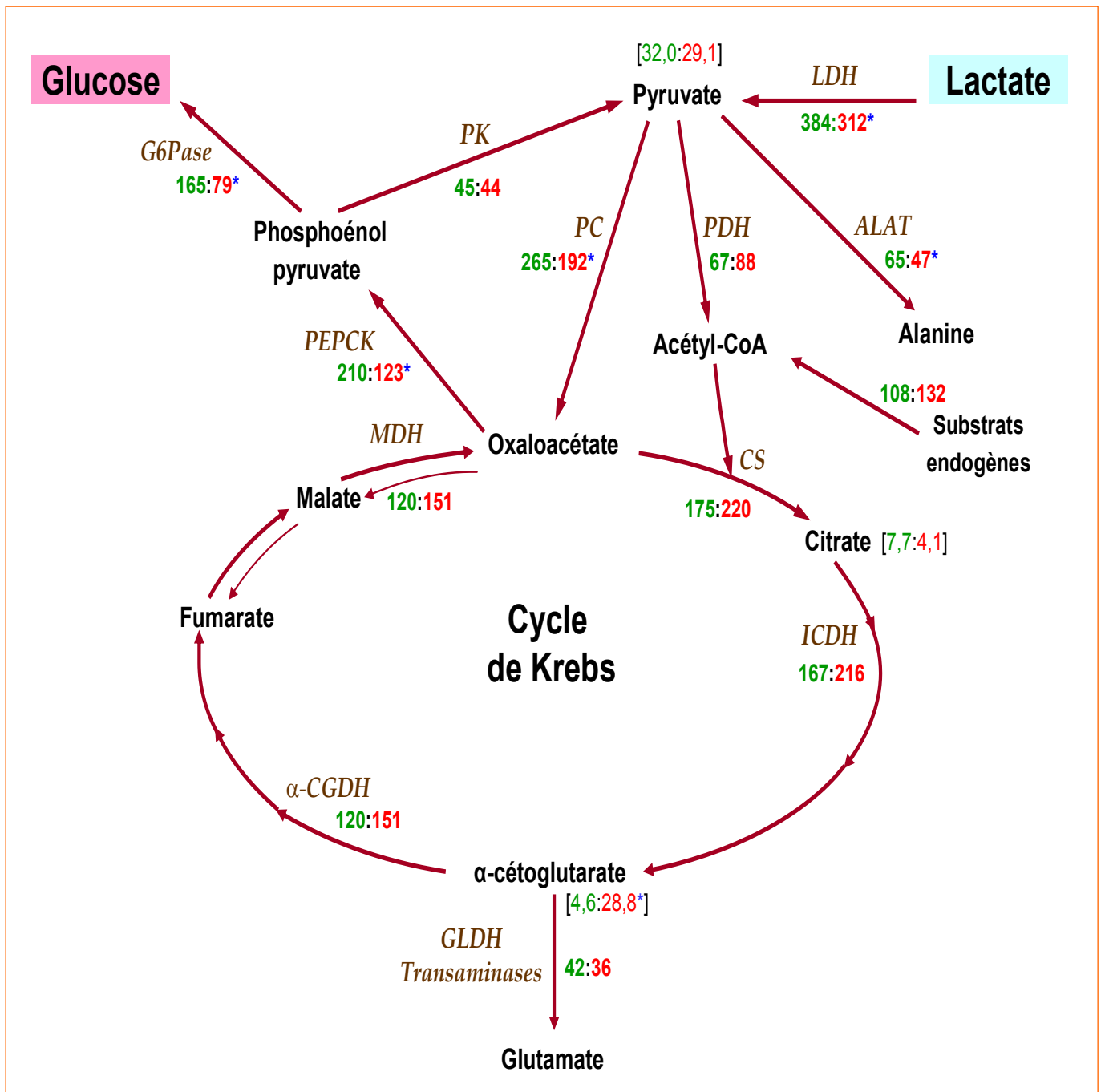
glutamine (chez la souris). De même, la balance  $^{13}\text{C}$  correspond à la différence entre la quantité de lactate marqué consommée et la somme des différents produits marqués accumulés. Ces deux balances reflètent la quantité de carbones 12 ou 13 perdue par oxydation sous forme de  $\text{CO}_2$  ou  $^{13}\text{CO}_2$ . Nos résultats montrent que la baisse de production de glucose n'est pas liée à une augmentation de l'oxydation du substrat. En effet, le rapport des flux de la pyruvate carboxylase et de la pyruvate déshydrogénase ne diminue pas de façon significative malgré la baisse du flux de la pyruvate carboxylase.



**Figure 14 :** Effets du cadmium 10 μM sur les flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris (voir annexe I, tableau 6, page 69)

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de  $36,8 \pm 1,4$  mg pour chaque condition d'incubation. Les flux sont exprimés en μmoles/g poids sec/h. Les valeurs en vert représentent les flux en absence de CdCl<sub>2</sub> et celles en rouge, les flux en présence de CdCl<sub>2</sub> 10 μM. Les valeurs entre crochets représentent les métabolites accumulés en μmoles/g poids sec/h en absence (en vert) et en présence (en rouge) de CdCl<sub>2</sub>. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test t de Student pour données paires (\* p < 0,05).

LDH : lactate déshydrogénase ; PC : pyruvate carboxylase ; PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; G6Pase : glucose-6-phosphatase ; PK : pyruvate kinase ; ALAT : alanine aminotransférase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; CS : citrate synthase ; ICDH : isocitrate déshydrogénase ; α-CGDH : α-cétoglutarate déshydrogénase ; MDH : malate déshydrogénase.



**Figure 15 :** Effets du cadmium 100  $\mu$ M sur les flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux humains (voir annexe II, tableau 6, page 75)

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de  $42,2 \pm 2,1$  mg pour chaque condition d'incubation. Les flux sont exprimés en  $\mu$ moles/g poids sec/h. Les valeurs en vert représentent les flux en absence de  $\text{CdCl}_2$  et celles en rouge, les flux en présence de  $\text{CdCl}_2$  100 $\mu$ M. Les valeurs entre crochets représentent les métabolites accumulés en  $\mu$ moles/g poids sec/h en absence (en vert) et en présence (en rouge) de  $\text{CdCl}_2$ . L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de  $\text{CdCl}_2$ , est faite avec le test t de Student pour données paires (\*  $p < 0,05$ ).

LDH : lactate déshydrogénase ; PC : pyruvate carboxylase ; PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; G6Pase : glucose-6-phosphatase ; PK : pyruvate kinase ; ALAT : alanine aminotransférase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; CS : citrate synthase ; ICDH : isocitrate déshydrogénase ;  $\alpha$ -CGDH :  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase ; MDH : malate déshydrogénase

### **IV.3. Etude par spectroscopie RMN du métabolisme du lactate dans des tubules rénaux proximaux de souris traitées par du cadmium**

Nous avons cherché à savoir si l'administration chronique in vivo de chlorure de cadmium chez la souris était susceptible d'induire les mêmes effets métaboliques rénaux que ceux observés in vitro. Nous avons pour cela utilisé des souris Swiss femelles jeunes ayant absorbé pendant 4 semaines de l'eau de boisson contenant du CdCl<sub>2</sub> à la concentration de 600 mg/l. Les reins provenant de ces souris et de souris témoins non traitées au CdCl<sub>2</sub> ont servi à la préparation de tubules utilisés pour mesurer la production de glucose à partir de substrats lactates marqués au carbone 13.

Le bilan de santé des animaux durant la période de traitement est normal, aucune mortalité ne s'est produite. Cependant, une baisse significative de 30 % à 40 % de la consommation journalière d'eau est constatée pour les souris traitées. Nous n'avons pas pu, par contre, évaluer l'effet du traitement sur la consommation de nourriture. Au bout des 4 semaines de traitement, on note une diminution du poids moyen des souris traitées par rapport aux souris témoins alors que le poids des reins est resté comparable entre ces deux groupes. Les mesures de la glycémie n'ont pas montré de variations significatives liées au traitement (voir tableau 1, page 47).

L'ionogramme urinaire (voir tableau 2, page 48), révèle chez les souris traitées, une légère glycosurie, protéinurie et phosphaturie, de même qu'une augmentation de la concentration d'urée. La nature de la protéinurie n'a pas été déterminée ; il s'agit, très probablement, d'une protéinurie de bas poids moléculaire. L'augmentation de la valeur de ces paramètres, évoque une néphropathie débutante due à l'exposition au cadmium.

Parmi les activités enzymatiques que nous avons mesurées dans les fragments corticaux rénaux (voir tableau 3, page 49), nos résultats montrent que seule l'activité PEPCK est inhibée chez le groupe traité.

Les résultats des mesures de la consommation des [<sup>13</sup>C]lactates et la production des [<sup>13</sup>C]métabolites sont regroupés dans l'annexe III (tableaux 1-5, pages 76-80).

Nos calculs des flux enzymatiques montrent que le cadmium inhibe le flux de la lactate déshydrogénase, de la pyruvate carboxylase, de la phosphoénolpyruvate carboxykinase et de la glucose-6-phosphatase. Le flux de la pyruvate kinase est, par contre, augmenté. Le flux de la pyruvate déshydrogénase ainsi que ceux du cycle des acides tricarboxyliques ne sont pas diminués de façon significative bien que les accumulations de citrate, d' $\alpha$ -cétoglutarate, de malate et de la glutamine soient augmentées (voir figure 16, page 50).

Ces variations de flux se produisent sans aucune variation des concentrations cellulaires d'ATP, de glutathion, d'acétyl-CoA et de coenzyme A (voir annexe III, tableau 1, page 76).



Par ailleurs, on n'observe pas de modifications significatives des balances carbonées  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  et le rapport des flux de la pyruvate carboxylase et de la pyruvate déshydrogénase ne varie pas de façon significative. La baisse de production de glucose n'est donc pas liée à une augmentation de l'oxydation du lactate.

**Tableau 1 : Effets sur le poids, la glycémie et la consommation d'eau du  $\text{CdCl}_2$  administré à des souris Swiss femelles à 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines**

Groupe	Poids de souris (g)	Poids des reins (mg)	Glycémie mmoles/l	Consommation d'eau ml/jour/souris	Cd ingéré $\mu\text{g/g}$ de poids de souris/jour
Témoin	27,4 $\pm$ 0,5	318 $\pm$ 10	8,65 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,4	-
Traité	25,5 $\pm$ 0,5*	307 $\pm$ 13	8,67 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,4*	36,2 $\pm$ 6,5

**Le poids initial moyen des souris est de 19,5  $\pm$  0,3 g**

Les valeurs sont exprimés comme la moyenne  $\pm$  SEM ; n = 12 ; \* : p < 0,05

Masse molaire du Cd : 112,41 g/mol - Masse molaire du  $\text{CdCl}_2$  : 183,3 g/mol.

**Tableau 2 : Ionogramme urinaire de souris Swiss femelles traitées par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines**

	<b>Souris témoins</b>	<b>Souris traitées</b>
<b>Na</b> (mmol/mmol créatinine)	31,9 ± 6,0	31,5 ± 7,8
<b>K</b> (mmol/mmol créatinine)	44,2 ± 2,2	51,5 ± 5,3
<b>Cl</b> (mmol/mmol créatinine)	38,8 ± 4,6	36,4 ± 6,2
<b>Mg</b> (mmol/mmol créatinine)	6,9 ± 0,9	7,3 ± 0,3
<b>Ca</b> (mmol/mmol créatinine)	0,43 ± 0,02	0,41 ± 0,02
<b>P</b> (mmol/mmol créatinine)	6,3 ± 0,5	14,5 ± 2,4*
<b>Urée</b> (mmol/mmol créatinine)	295 ± 32	746 ± 85*
<b>Acide urique</b> (mmol/mmol créatinine)	0,35 ± 0,03	0,34 ± 0,02
<b>Glucose</b> (mmol/mmol créatinine)	0,39 ± 0,07	0,70 ± 0,10*
<b>Protéines</b> (g/mmol créatinine)	0,18 ± 0,05	1,15 ± 0,20*
<b>Osmolalité</b> (mosm/Kg)	2140 ± 183	2259 ± 265

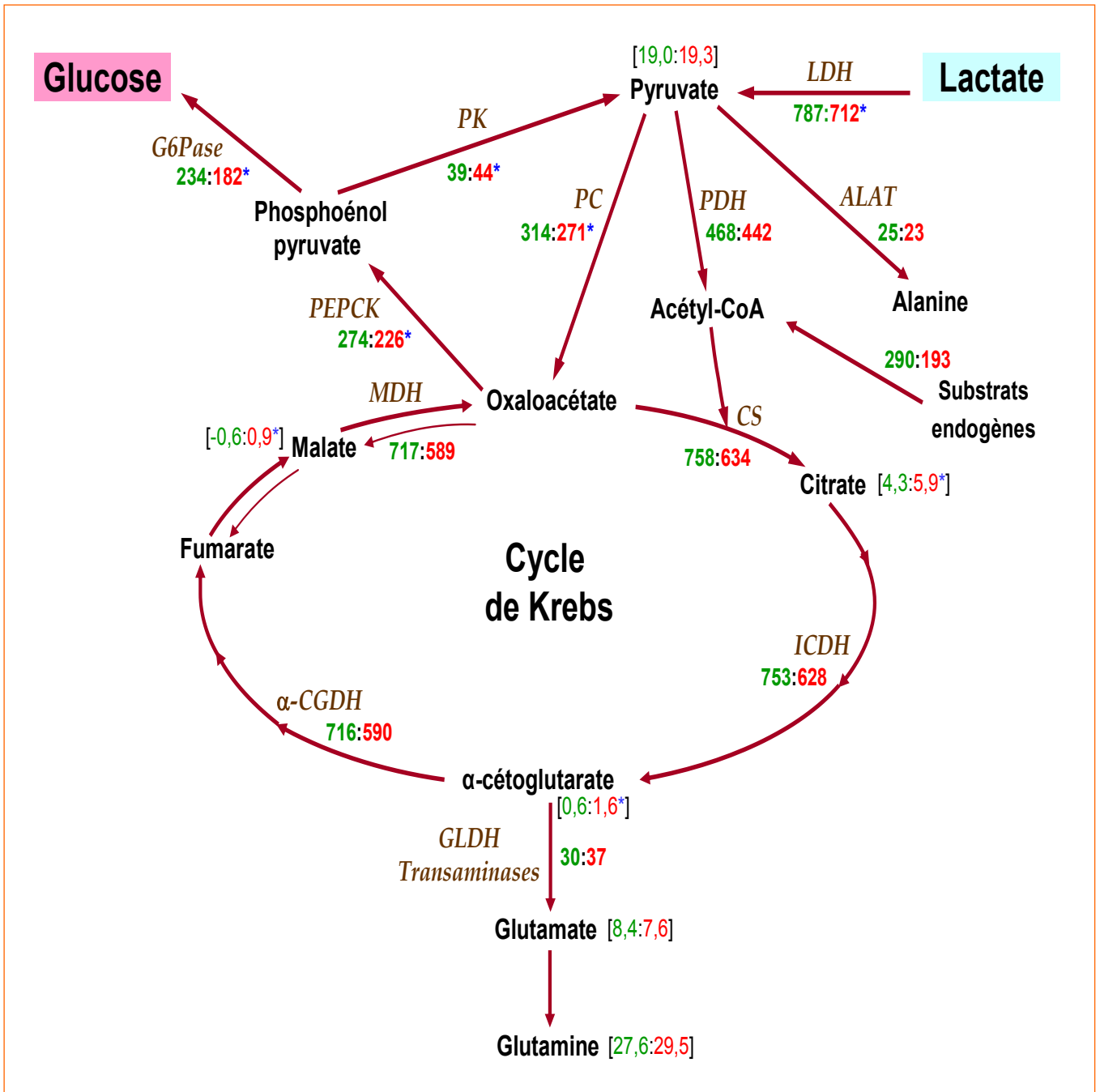
Les valeurs sont exprimés comme la moyenne ± SEM ; n = 4 ; \* : p < 0,05.

**Tableau 3 : Mesure des activités enzymatiques de la néoglucogénèse chez des souris Swiss femelles traitées par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines**

Activités enzymatiques dans le cortex rénal	Souris témoins	Souris traitées
<b>LDH</b> (mmoles/h/g prot.)	<b>85,4 ± 1,9</b>	<b>86,4 ± 1,5</b>
<b>PC</b> (mmoles/h/g prot.)	<b>2,6 ± 0,1</b>	<b>2,8 ± 0,1</b>
<b>PEPCK</b> (μmoles/h/g prot.)	<b>251 ± 14</b>	<b>171 ± 12 *</b>
<b>F 1,6-Pase</b> (mmoles/h/g prot.)	<b>4,8 ± 0,1</b>	<b>5,1 ± 0,1</b>
<b>G6Pase</b> (mmoles/h/g prot.)	<b>6,2 ± 0,2</b>	<b>5,8 ± 0,2</b>

Les valeurs sont exprimés comme la moyenne ± SEM ; n = 12 ; \* : p < 0,05.

**LDH** : lactate déshydrogénase ; **PC** : pyruvate carboxylase ; **PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; **F 1,6-Pase** : fructose-1,6-bisphosphatase ; **G6Pase** : glucose-6-phosphatase.



**Figure 16 :** Variations des flux enzymatiques au cours du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées par du CdCl<sub>2</sub> 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines (voir annexe III, tableau 6, page 81).

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Les flux sont exprimés en µmoles/g poids sec/h. Les valeurs en vert correspondent aux flux des souris témoins et celles en rouge, aux flux des souris traitées in vivo par du CdCl<sub>2</sub> 600 mg/l dans l'eau de boisson. Les valeurs entre crochets représentent les métabolites accumulés en µmoles/g poids sec/h chez les souris témoins (en vert) et les souris traitées (en rouge). L'analyse statistique entre les 2 conditions est faite avec le test t de Student pour données non paires (\* p < 0,05).

LDH : lactate déshydrogénase ; PC : pyruvate carboxylase ; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; G6Pase : glucose-6-phosphatase ; PK : pyruvate kinase ; ALAT : alanine aminotransférase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; CS : citrate synthase ; ICDH : isocitrate déshydrogénase ; α-CGDH : α-cétoglutarate déshydrogénase ; MDH : malate déshydrogénase

#### IV.4. Dosage du cadmium accumulé dans le tissu rénal

Les résultats des dosages du cadmium dans les tubules rénaux incubés in vitro en présence de CdCl<sub>2</sub> aux concentrations de 10 et 50 µM pour les tubules de souris, 100 et 500 µM pour les tubules humains, montrent que le cadmium s'accumule de façon importante dans les tubules rénaux et que cette accumulation est proportionnelle à sa concentration dans le milieu d'incubation (voir tableau 4). On peut aussi déduire de ces résultats que les tubules humains sont capables d'accumuler des quantités beaucoup plus importantes de cadmium (plus du double) que les tubules de souris dans les mêmes conditions d'exposition.

Le dosage de cadmium dans les reins entiers de souris ayant absorbé du CdCl<sub>2</sub> via l'eau de boisson confirme que le cadmium absorbé par voie orale s'accumule dans les reins. Au bout des 4 semaines d'exposition, la quantité de cadmium par gramme de poids sec de rein est presque égale à la moitié de la quantité qui s'est accumulée in vitro par gramme de poids sec de tubules incubés pendant 1 heure en présence de 10 µM de CdCl<sub>2</sub>.

**Tableau 4 : Dosage du cadmium dans les tubules rénaux proximaux murins et humains traités in vitro et dans les reins de souris traitées in vivo par le CdCl<sub>2</sub>**

Conditions expérimentales	Doses d'expositions	Dosage de cadmium dans le tissu rénal (mg/g de poids sec)	Concentrations du cadmium dans le tissu rénal (mM)
Tubules de souris incubés pendant 1 h en présence de CdCl <sub>2</sub>	0 µM	0,0003 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0002
	10 µM	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,03
	50 µM	0,88 ± 0,06	1,5 ± 0,1
Tubules humains incubés pendant 1 h en présence de CdCl <sub>2</sub>	0 µM	0,0003 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0002
	100 µM	3,8 ± 0,6	6,4 ± 1,0
	500 µM	19,5 ± 2,7	32,9 ± 4,5
Reins de souris traitées in vivo par CdCl <sub>2</sub> dans l'eau de boisson pendant 4 semaines	0 (Groupe control)	0,0001 ± 0,0001 (reins entiers)	0,0002 ± 0,0002
	600 mg/l (Groupe traité)	0,09 ± 0,01 (reins entiers)	0,15 ± 0,02

Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM ; (n = 10)

Rapport poids frais/ poids sec égal à 5,28 [86].

Masse molaire du Cd : 112,41 g/mol

## V. Discussion

Pour étudier la toxicité métabolique rénale du cadmium, nous avons choisi comme modèle cellulaire des fragments de tubules rénaux proximaux murins et humains. Des travaux menés par autoradiographie chez des rongeurs intoxiqués au  $^{109}\text{Cd}$  lié à la métallothionéine, ont montré que, dans le rein, la majorité du cadmium est accumulée dans le cortex, principalement dans les tubules proximaux [125-126]. Par ailleurs, seules les cellules tubulaires proximales sont capables de synthétiser du glucose car elles possèdent les enzymes clés de la néoglucogenèse [127]. En pratique, les tubules rénaux sont incubés pendant 60 minutes dans du tampon de Krebs-Henseleit contenant comme substrat néoglucogénique le lactate, froid ou marqué au carbone 13, en absence ou en présence de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) à différentes concentrations. Le lactate est un substrat physiologique du rein humain *in vivo* [95]. Le modèle de tubules proximaux rénaux isolés présente l'avantage de nous permettre de travailler avec des cellules rénales fraîches dont le métabolisme est conservé pendant toute la durée de l'étude. En effet, des expériences préliminaires nous ont permis de vérifier qu'ils produisent du glucose à partir du lactate de manière linéaire au cours du temps pendant au moins 60 minutes (données non présentées). De même, la concentration d'ATP, marqueur de la viabilité cellulaire, reste stable au cours de l'incubation. La durée d'incubation étant relativement courte, les tubules peuvent être incubés dans une solution de Krebs-Henseleit qui permet de mesurer de façon précise la consommation de substrat et les différents produits du métabolisme. Il n'y a pas d'interférence avec le milieu d'incubation. Ce modèle de tubules rénaux isolés présente aussi l'avantage de nous permettre d'étudier l'interaction du cadmium avec le métabolisme rénal tout en éliminant l'influence des autres organes et des signaux neuro-hormonaux sur ce métabolisme. De plus, ce modèle donne la possibilité de travailler avec du tissu rénal humain.

Nous n'avons pas choisi d'utiliser des lignées de cellules tubulaires rénales en culture car bien qu'elles soient très utilisées pour les études de néphrotoxicité [128-129], il n'existe pas de lignée cellulaire capable de synthétiser du glucose.

Dans les conditions physico-chimiques du milieu d'incubation (pH 7,4 ; osmolarité voisine de 300 mosmoles/l), le  $\text{CdCl}_2$  libère des ions  $\text{Cd}^{2+}$ . Le cadmium sous forme d'ion bivalent pénètre par diffusion simple dans les cellules tubulaires proximales rénales aussi bien du côté luminal que basolatéral [34-35, 37, 130]. De nombreuses études soulignent que, en plus de cette diffusion passive, le captage de  $\text{Cd}^{2+}$  est réalisé grâce à de nombreux systèmes de transport à modalités très différentes [44, 131-133]. Le rayon ionique du cadmium, très voisin de celui du calcium, fait de lui un compétiteur potentiel très important du calcium et d'autres cations bivalents tels que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  [132, 134-135].

Les concentrations du cadmium que nous avons mesurées dans les tubules rénaux proximaux murins incubés pendant une heure avec des concentrations de CdCl<sub>2</sub> de 10 et 50 µM sont respectivement de 0,29 ± 0,03 mM et 1,5 ± 0,1 mM et celles dans les tubules rénaux proximaux humains incubés avec 100 et 500 µM sont de 6,4 ± 1,0 mM et 32,9 ± 4,5 mM. Ces mesures attestent que le cadmium s'accumule de façon importante dans les cellules tubulaires rénales. Cette accumulation est proportionnelle à la concentration de cadmium dans le milieu d'incubation et elle est 2 fois plus importante dans les tubules rénaux proximaux humains que dans ceux de souris.

La concentration de cadmium dans les reins entiers de souris auxquelles nous avons administrées du CdCl<sub>2</sub> 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines est de 0,15 ± 0,02 mM. Sachant que la concentration de cadmium dans le cortex serait doublement ou triplement supérieure à celle de la médullaire et que le volume du cortex représente environ 70 à 75 % du volume total du rein, on peut calculer en multipliant la concentration de cadmium dans le rein entier par un facteur de 1,25 [126, 136] que la concentration du Cd dans les tubules proximaux de ces souris est de l'ordre 0,18 ± 0,03 mM. Cette valeur correspond à la concentration que nous aurions obtenue in vitro en présence de CdCl<sub>2</sub> à une concentration voisine de 5 µM. Ce constat nous permettra de comparer de façon pertinente les effets métaboliques du cadmium dans les tubules rénaux de souris traités in vitro et in vivo par ce métal.

Pour les tubules rénaux murins et humains incubés in vitro en présence de concentrations croissantes de CdCl<sub>2</sub>, on note que le cadmium inhibe de façon dose-dépendante la néoglucogenèse à partir du lactate avec une C.I.50 approximative de 10 µM pour les tubules rénaux proximaux murins et 100 µM pour les tubules humains.

De même dans les expériences menées avec les souris traitées in vivo par le CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson, la néoglucogenèse à partir du lactate est inhibée in vitro (la diminution est de 22%, c'est-à-dire une baisse qui correspondrait à une concentration de CdCl<sub>2</sub> de moins de 5 µM dans l'étude dose-effet in vitro). On peut avancer d'ores et déjà qu'il existe une bonne corrélation entre les accumulations de cadmium dans le tissu rénal, mesurées in vitro et in vivo chez la souris, et l'effet sur la néoglucogenèse.

La baisse de la consommation de lactate observée in vitro et dans une moindre mesure en « ex-vivo » chez la souris, résulterait à la fois de l'inhibition de la néoglucogenèse (par rétrocontrôle négatif) et de l'altération du métabolisme énergétique. Toutefois, un effet direct du cadmium sur les transporteurs des acides monocarboxyliques, sensibles aux réactifs thiols [137-138], reste envisageable.

L'étude par spectroscopie RMN du carbone 13 nous a permis de suivre le devenir de chaque carbone marqué du substrat utilisé, d'identifier grâce à une seule mesure l'ensemble des métabolites marqués qui se sont accumulés, sans recours à des techniques de séparation comme dans le cas des méthodes utilisant le carbone 14 comme traceur et finalement, elle

nous a permis de calculer le flux de chacune des principales enzymes impliquées dans le métabolisme étudié. De même, nous avons pu, grâce à cette technique, mesurer une resynthèse de [ $^{12}\text{C}$ ]- et de [ $^{13}\text{C}$ ]lactates, ce qui permet d'accéder à la valeur réelle de consommation du substrat, valeur qui est sous estimée lorsqu'on mesure enzymatiquement une différence nette entre la quantité de lactate présente au départ et à la fin de l'expérience.

Il est important de mentionner que nous avons utilisé dans l'étude de spectroscopie RMN une concentration de lactate de 5mM, qui est beaucoup plus élevée que la concentration physiologique de cet acide monocarboxylique qui est de 1 à 2 mM. Nous avons choisi d'utiliser une concentration plus élevée de lactate ainsi qu'une grande quantité de tubules rénaux pour chacune des expériences, de sorte qu'il soit possible de mesurer de façon fiable l'utilisation du substrat et d'obtenir suffisamment de métabolites formés pour remédier au manque de sensibilité de la technique RMN du carbone 13. Par ailleurs et afin de s'assurer que le profil de « toxicité métabolique » est semblable pour ces deux concentrations de lactate 1 mM et 5 mM, nous avons aussi réalisé une étude de doses-effets du cadmium en présence de lactate 1 mM (résultats non montrés) pour les tubules rénaux humains et murins. Les résultats sont similaires à ceux obtenus en présence de lactate 5 mM.

Les profils de marquage de glucose synthétisé à partir de [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]-, [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]- et [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]lactates ainsi que du lactate plus [ $^{13}\text{C}$ ]bicarbonate indiquent que la néoglucogenèse fait intervenir non seulement le passage des carbones par la voie de la pyruvate carboxylase et de l'équilibration de l'oxaloacétate avec le fumarate mais aussi la voie de la pyruvate déshydrogénase et de l'ensemble du cycle des acides tricarboxyliques.

Le  $\text{CdCl}_2$  inhibe in vitro dans les tubules murins et humains, respectivement aux concentrations de 10 et 100  $\mu\text{M}$ , le flux de la lactate déshydrogénase (qui initie l'utilisation du lactate), de la pyruvate carboxylase (qui catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate) et celui des autres enzymes de la néoglucogenèse, notamment, la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la fructose-1,6-bisphosphatase et la glucose-6-phosphatase. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude doses-effets qui montrent que le cadmium induit une baisse de l'utilisation de lactate et de la production de glucose. Il est important de souligner que la baisse du flux de la pyruvate carboxylase n'est pas associée à une augmentation de celui de la pyruvate déshydrogénase et donc la diminution de la synthèse de glucose n'est pas due à l'augmentation de l'oxydation du substrat lactate. Pour les tubules de souris, les flux des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques sont inhibés avec accumulation de citrate, d' $\alpha$ -cétoglutarate, de glutamate et de malate. Ce ralentissement du cycle de Krebs est probablement lié à la baisse de l'oxydation mitochondriale. Le flux de la pyruvate kinase est, par contre, augmenté. En revanche, pour les tubules humains, les flux de l'ensemble des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques et de la pyruvate kinase ne sont pas modifiés significativement.



L'accumulation de l' $\alpha$ -cétoglutarate observée peut être due à l'inhibition de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase suite à la séquestration des coenzymes A, cofacteurs de cette enzyme, par le cadmium. Cette accumulation de l' $\alpha$ -cétoglutarate, comme celle du citrate et du malate peut être due aussi à l'inhibition des déshydrogénases, enzymes NAD-dépendantes, opérant dans le cycle de Krebs.

L'inhibition de la production d'alanine dans les tubules murins et humains incubés in vitro en présence de CdCl<sub>2</sub> et du flux à travers l'alanine aminotransférase ne peut s'expliquer par une diminution de l'accumulation cellulaire de glutamate et de pyruvate, les substrats de cette enzyme, mais plutôt par l'augmentation de la concentration cellulaire de l' $\alpha$ -cétoglutarate, un produit de la réaction de l'alanine aminotransférase dans le sens de la formation de l'alanine.

Pour les tubules provenant de souris traitées in vivo par le cadmium, on note aussi que les flux de la voie de la néoglucogenèse sont inhibés, alors que ceux de la pyruvate déshydrogénase et du cycle des acides tricarboxyliques ne sont pas diminués de façon significative bien que les accumulations de citrate, d' $\alpha$ -cétoglutarate et de malate soient augmentées.

La baisse intracellulaire en ATP à la fois dans les tubules rénaux murins et humains incubés in vitro en présence de cadmium, soulève la question du mécanisme de cet effet. On sait que l'ATP dont le rein a besoin, provient pour 95% du métabolisme oxydatif [139]; la mitochondrie joue donc un rôle primordial pour le maintien des processus nécessitant de l'énergie au sein du rein. La production d'ATP au niveau de la mitochondrie dépend d'un gradient électrochimique de protons généré par le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire. Ce gradient électrochimique est maintenu par l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons. La mitochondrie est décrite comme une cible de la toxicité du cadmium [140-141]. La capacité du Cd d'interagir avec des groupements thiols spécifiques des protéines de la membrane mitochondriale a été largement rapportée comme principal mécanisme de la toxicité mitochondriale de ce métal [140-142]. Cette interaction favorise le passage du cadmium à l'intérieur de la mitochondrie via un canal calcique. A l'intérieur de la mitochondrie, le cadmium est capable d'interagir avec les groupements thiols des protéines, notamment ceux de l'adénine nucléotide translocase [142-143], et d'induire l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (PTPM) [143], complexe multi-protéiques située au niveau de la membrane mitochondriale interne. L'ouverture de ce pore augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale interne à l'eau et aux petits solutés. Cela entraîne le gonflement de la matrice mitochondriale, la rupture de la membrane mitochondriale externe avec la dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération du cytochrome c, des procaspases mitochondriales et du facteur inducteur de l'apoptose [141, 143-144]. La transition

de la perméabilité mitochondriale est modulée par l'état d'oxydoréduction des groupements thiols mitochondriaux [145-146].

La baisse de production d'ATP dans les tubules rénaux proximaux humains à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , serait liée à un effet découplant de la phosphorylation oxydative par le cadmium, du fait de l'absence d'inhibition des flux à travers la plupart des enzymes NADH-dépendantes (à l'exception de la lactate déshydrogénase) impliquées dans le métabolisme du lactate telles que la pyruvate déshydrogénase et les déshydrogénases opérant dans le cycle de Krebs alors que la concentration d'ATP est réduite. Si tel est le cas, la diminution de l'utilisation de lactate par la lactate déshydrogénase, ne résulte pas de l'inhibition de la réoxydation du NADH dans les mitochondries, mais est plutôt secondaire à l'inhibition de la voie de la néoglucogenèse. Ce découplage de la chaîne respiratoire serait potentialisé par un état de stress oxydatif provoqué par la forte baisse de la concentration cellulaire de glutathion réduit induite par le cadmium [147]. Dans les tubules proximaux murins in vitro, à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , la baisse de production d'ATP serait liée non seulement à un effet découplant de la phosphorylation oxydative, mais aussi à son inhibition, du moins partiel, ce qui explique le ralentissement du cycle des acides tricarboxyliques et l'accumulation de certains métabolites comme le citrate, l' $\alpha$ -cétoglutarate et le malate. Par contre, dans les tubules rénaux provenant de souris traitées in vivo par le cadmium la concentration cellulaire d'ATP reste inchangée, ce qui indique que les effets toxiques mitochondriaux sont minimes par rapport à ceux observés in vitro malgré un certain ralentissement du cycle des acides carboxyliques caractérisé par une légère accumulation de citrate, de l' $\alpha$ -cétoglutarate et de malate.

Nous venons de voir que le cadmium découple la respiration mitochondriale dans les cellules tubulaires rénales humaines, alors qu'il l'inhibe dans celles de souris. Cependant, ces effets ne sont pas contradictoires et peuvent avoir un même mécanisme de toxicité. En effet, des études ont mis en évidence que le Cd, selon sa concentration et la durée d'exposition, peut induire au niveau mitochondrial deux séquences d'effets qui se succèdent dans le temps [141]. La première séquence comprend la transition de la perméabilité mitochondriale, la stimulation de la respiration de base, suivie de la chute de la production d'ATP. La seconde séquence comprend l'inhibition de la respiration de base, la mobilisation de fer et la peroxydation des lipides membranaires de la mitochondrie. L'inhibition de la respiration peut s'expliquer comme suit : interaction du Cd avec des groupements thiols des protéines spécifiques de la chaîne respiratoire induisant des changements de leurs conformations, libération du cytochrome c, qui normalement participe au transfert d'électrons entre les complexes de la chaîne respiratoire, due à la transition de la perméabilité mitochondriale, et/ou la mobilisation de fer à partir des protéines de la chaîne respiratoire contenant ce métal.

La réduction de la synthèse de la glutamine (qui n'existe pas dans les tubules de l'homme) dans les tubules souris peut être attribuée à la baisse de la concentration cellulaire de l'ATP, car la glutamine synthétase est une enzyme ATP-dépendante.

Enfin, la baisse intracellulaire de l'ATP pourrait, en partie, être à l'origine de l'inhibition de la néoglucogenèse à partir du lactate, sachant que ce processus consomme de l'énergie, mais en partie seulement, puisque la production du glucose est aussi inhibée, ex vivo chez la souris, alors que la concentration d'ATP est inchangée.

Une fois dans le milieu intracellulaire, du fait de son affinité pour les groupements thiols, le  $Cd^{2+}$  se lie à des petites molécules (telles que les acides aminés soufrés, les coenzymes A et acétyl-CoA), des peptides comme le glutathion ou des protéines comme les métallothionéines [18, 44].

Le cadmium cause, in vitro, une diminution importante et dose dépendante des concentrations cellulaires des coenzymes A et de l'acétyl-CoA à la fois dans les tubules rénaux murins et humains. Il est évident que, en plus de la baisse de la concentration cellulaire de l'ATP, la baisse de l'acétyl-CoA peut contribuer à la réduction du flux de la pyruvate carboxylase parce que ce dernier métabolite est un cofacteur de cette enzyme. Il est intéressant de noter que, bien qu'aucune baisse significative d'acétyl-CoA n'ait été constatée dans les tubules de souris incubés avec 10  $\mu M$  de  $CdCl_2$  ou provenant de souris traitées in vivo par le cadmium, le flux de la pyruvate carboxylase est diminué.

Nous avons par ailleurs fait une étude dose-effet du cadmium sur la synthèse de glucose dans les tubules rénaux proximaux de souris à partir de la glutamine 0,75 mM comme substrat (résultats non présentés). La glutamine entre dans le cycle de Krebs sous forme d' $\alpha$ -cétoglutarate et sera convertie en oxaloacétate. Il faut rappeler que la synthèse de glucose à partir de la glutamine ne fait pas intervenir la pyruvate carboxylase et ne nécessite pas d'énergie. Malgré cela, nous avons observé une inhibition de la néoglucogenèse mais à des concentrations de cadmium plus élevées que celles utilisées avec le lactate. La C.I 50 approximative (concentration inhibitrice 50) est de 25  $\mu M$  de cadmium. Cela montre que la néoglucogenèse est inhibée même en contournant la voie de la pyruvate carboxylase. L'interaction directe du cadmium avec la PEPCK et les autres enzymes de la néoglucogenèse est probablement à l'origine de cette inhibition, alors que la baisse des concentrations de l'ATP et de l'acétyl-CoA, jouerait un rôle potentialisateur de cet effet.

La baisse du flux de la PEPCK cytosolique peut résulter également de la diminution de la concentration cytosolique de l'oxaloacétate, substrat de cette enzyme, probablement due à l'élévation du rapport  $NADH/NAD^+$  [148].

Le cadmium pourrait aussi interférer au niveau nucléaire en réprimant certains gènes impliqués dans la néoglucogenèse, notamment celui de la PEPCK. Du fait de la courte période d'incubation des tubules rénaux in vitro, cette interaction avec le génome ne

pourrait se mesurer que dans les cellules tubulaires rénales des souris traitées in vivo par le cadmium. Afin de savoir si le mécanisme de régulation de l'activité PEPCK passe par la modification de son expression, il serait intéressant de mesurer l'expression des ARN messagers de la PEPCK dans le cortex des souris traitées in vivo.

La diminution importante et dose dépendante des concentrations cellulaires du glutathion réduit (GSH) à la fois dans les tubules rénaux murins et humains atteste aussi de la grande affinité du cadmium pour les groupements thiols. Le GSH constitue plus de 90 % du pool intracellulaire de groupements thiols non protéiques. Il participe au maintien des groupements thiols réduits au niveau des protéines, enzymes et acides aminés intracellulaires et protège ainsi les cellules contre les altérations oxydatives [149-151]. Le GSH joue un rôle important dans les réactions de détoxification en tant qu'agent nucléophile et en tant que substrat pour les enzymes glutathion-peroxydase et glutathion-S-transférase. Le rapport GSH/ GSSG est un indicateur de l'état redox cellulaire, il régule l'activité de plusieurs enzymes de la glycolyse et de la néoglucogenèse [152] et c'est aussi un déterminant important de la fonction mitochondriale et de la viabilité cellulaire [153].

Le cadmium cause une baisse importante du glutathion réduit et du rapport GSH/ GSSG, sans variation substantielle du GSSG. Cette diminution serait due à la formation, grâce à la forte affinité du cadmium pour le glutathion, d'un complexe GSH-Cd-GSH très stable [154]. Elle pourrait résulter aussi, mais dans une moindre mesure, de la glutathionylation des protéines suite au stress oxydatif (formation de liaisons disulfures entre glutathion et les cystéines de certaines protéines ; réaction catalysée par les thioltransférases ou les thiorédoxines) [155-156] ou de la baisse de la synthèse du glutathion, catalysée par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase, réactions qui requièrent de l'ATP [157].

La chute du rapport GSH/ GSSG dans les tubules rénaux murins et humains, générerait au niveau cellulaire un état de stress oxydatif qui peut, moduler par le biais de radicaux libres les activités kinases et phosphatases, qui agissent sur les facteurs de transcription [158], altérer la fonction mitochondriale et l'activité d'une ou de plusieurs enzymes de la néoglucogenèse. A titre d'exemple, le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, impliqué dans la transcription de la PEPCK, semble particulièrement sensible au stress oxydatif [159-160].

L'autre molécule riche en cystéines qui protège les cellules contre la toxicité des métaux lourds est la métallothionéine. Puisque l'induction de sa biosynthèse est relativement lente, le rôle de défense contre la toxicité du cadmium serait considérable surtout en cas de toxicité chronique.

Il est concevable que si la concentration de cadmium dans les cellules rénales, après une exposition aiguë ou chronique, dépasse la capacité de protection intracellulaire constituée par les métallothionéines et le glutathion, le cadmium libre pourra interagir avec les organites cellulaires et perturber des processus biochimiques.

Nous avons pu montrer que l'administration chronique in vivo de chlorure de cadmium chez la souris était susceptible d'induire aussi une inhibition de la néoglucogenèse rénale. Nous avons préféré utiliser la souris comme modèle expérimental par rapport au rat en raison, entre autres, de l'existence de modèles Knock-out (KO) très intéressants pour des études ultérieures (comme par exemple la souris KO PEPCK). Comme l'ingestion est la voie d'exposition la plus importante chez l'homme, nous avons privilégié ce mode d'administration pour les souris.

Nous avons choisi d'utiliser dans ces expériences des souris Swiss jeunes âgées de 3 semaines car des études ont montré que les souris nouveau-nées et jeunes assimilent plus facilement le cadmium que les souris adultes et que, 2 semaines après ingestion, les jeunes souris fixent 10 % de la charge en cadmium alors que cette fixation n'est que de 1 % chez des souris adultes [161].

La baisse significative de la consommation journalière d'eau constatée chez les souris traitées dès la première semaine du traitement serait attribuée à la modification des caractères organoleptiques de l'eau de boisson après ajout du  $\text{CdCl}_2$ . En effet, l'étude de Thijssen [80], dans laquelle des souris ont été exposées en chronique à des concentrations croissantes de  $\text{CdCl}_2$  allant de 1 à 100 mg/l dans l'eau de boisson contenant du sucrose à 2 %, montre que la consommation d'eau reste inchangée. Nous n'avons pas voulu rajouter du sucrose ou autres édulcorants dans l'eau de boisson car ils auraient pu interférer avec le métabolisme glucidique. La baisse de gain de poids des souris traitées par rapport aux souris témoins résulterait de la diminution de la consommation d'eau plutôt que d'une éventuelle toxicité organique du cadmium.

En dépit de l'inhibition de la néoglucogenèse dans les tubules rénaux isolés in vitro ou en « ex-vivo », le cadmium ne modifie pas, in vivo, la glycémie des souris témoins et traitées. Cela peut-être dû à l'activation de la glycogénolyse hépatique en rapport ou non avec l'inhibition de la néoglucogenèse rénale ou à l'inhibition directe de la glycogénogenèse. Il serait intéressant de chercher si le cadmium induit une baisse de la glycémie chez des souris diabétiques.

L'action néphrotoxique du cadmium in vivo peut-être détectée par un examen histopathologique des reins, mais aussi en se basant sur de nombreux marqueurs urinaires qui reflètent l'intégrité du tubule proximal ou l'interférence du cadmium avec la fonction glomérulaire. L'ionogramme urinaire révèle chez les souris traitées, une légère glycosurie, une protéinurie et une phosphaturie, de même qu'une augmentation de la concentration d'urée. L'augmentation de la valeur de ces paramètres évoque une néphropathie débutante due à l'exposition au cadmium et indique que ce métal agit de façon différentielle sur plusieurs transporteurs au niveau du tubule rénal proximal. Soulignons qu'une atteinte tubulaire proximale grave générerait une glycosurie, aminoacidurie, hypercalciurie et une perte excessive d'ions, ce qui n'est pas le cas.

Le contenu rénal du cadmium est un marqueur fiable de l'exposition chronique, tandis que la concentration dans le sang ou les urines est un indicateur d'une exposition aiguë [80]. Sa concentration dans le cortex rénal augmente avec l'âge en raison de l'absence d'un processus biochimique actif de son élimination couplé à sa réabsorption. C'est pour cette raison nous nous sommes limités à doser le cadmium dans le tissu rénal afin d'établir le lien entre son accumulation et le développement des altérations rénales. La concentration rénale de Cd chez les souris après 4 semaines de traitement est voisine de  $90 \pm 10 \mu\text{g/g}$  de poids sec, soit environ  $21 \pm 2,4 \mu\text{g/g}$  de poids frais de tissu cortical rénal (en utilisant un rapport poids frais/ poids sec égal à 5,28 [86]). Dans l'étude de Thijssen [80], cette concentration est de  $56 \pm 6 \mu\text{g/g}$  dans le cortex rénal après une exposition de 23 semaines à 100 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{l}$  d'eau de boisson contenant 2% de sucre. Cela montre que même si nous avons réalisé une étude de toxicité « sub-chronique » en utilisant une concentration de  $\text{CdCl}_2$  élevée de 600 mg/ l et une durée d'exposition courte de 4 semaines, elle peut être comparable à une étude de toxicité chronique à des concentrations relativement basses, voire des concentrations environnementale réelles [83].

Les concentrations cellulaires en ATP, coenzymes A et glutathion ne diminuent pas dans les tubules rénaux provenant de souris exposées au Cd. Ces résultats sont analogues à ceux trouvés in vitro à une concentration voisine de 5  $\mu\text{M}$  à laquelle on observe uniquement une inhibition de la néoglucogenèse. Encore, il ne faut pas omettre que des mécanismes défensifs et adaptatifs seront sollicités in vivo, notamment par la stimulation de la synthèse de métallothionéines et de glutathion au niveau rénal et surtout hépatique, ce qui va relativement atténuer la toxicité du cadmium. Ces résultats confirment encore que l'inhibition de la néoglucogenèse rénale par le cadmium n'est pas la conséquence directe d'une baisse énergétique ou d'un état de stress oxydatif au niveau cellulaire.

Les flux enzymatiques déterminés par la technique de spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$  reflètent bien le fonctionnement des enzymes dans la cellule viable. Ces flux enzymatiques sont naturellement sujets à un processus régulateur ou de rétrocontrôle qui s'établit entre les différentes enzymes intervenant dans une voie métabolique donnée. Par exemple, la baisse du flux de la pyruvate carboxylase peut être la conséquence de la baisse d'autres flux en amont ou en aval de cet enzyme, notamment celui de la PEPCK. La détermination des activités enzymatiques dans les fragments corticaux rénaux des souris traitées et des souris témoins (LDH, PC, PEPCK, F-1,6-Pase et G-6-Pase), nous permet d'accéder à une partie des mécanismes pouvant être en jeu à plus long terme dans les modifications de flux. Le traitement par le Cd inhibe l'activité PEPCK dans le cortex des souris traitées, ce qui suggère une modification de l'expression de cette enzyme (protéine et/ou ARNm). Il faut garder à l'esprit que les activités enzymatiques sont déterminées en présence d'un excès de substrat et de cofacteurs. Il est évident que dans ces conditions, les interactions éventuelles qui pourraient exister in vivo entre le cadmium et ces cofacteurs, n'existent plus pendant la mesure de l'activité enzymatique in vitro.

Enfin, il est important de soulever la question de la pertinence clinique des résultats de notre étude chez l'homme. La concentration de cadmium dans le cortex rénal représente la source la plus importante pour l'évaluation de l'exposition de la population à ce métal [162]. Une question particulièrement importante est de savoir le niveau de dose à partir duquel le cadmium donne lieu aux premiers effets toxiques rénaux chez l'homme.

Selon l'OMS, la concentration critique d'une substance potentiellement toxique, pour une cellule ou un organe, est la concentration à partir de laquelle des changements fonctionnels ou lésionnels, réversibles ou non, apparaissent dans la cellule ou l'organe. Sur la base de données épidémiologique, l'OMS a conclu que la concentration critique de cadmium dans le cortex rénal qui cause des lésions rénales chez 10% de la population est de 150 à 200 µg/g. Des publications récentes montrent que des dommages tubulaires peuvent apparaître à des concentrations de Cd inférieures à celles prévues [163-164], mais le niveau au-dessus duquel les premiers effets se produisent est inconnu et les effets à des niveaux d'exposition relativement faibles, ne sont pas bien établis.

Nos résultats montrent que les tubules proximaux humains incubés pendant 60 min en présence de 100 µM de CdCl<sub>2</sub> contiennent, en utilisant un rapport poids frais/ poids sec égal à 5,28 [86], 720 ± 114 µg de Cd par gramme de poids frais. A rappeler qu'à cette concentration, nous avons pu constater des altérations métaboliques majeures. La concentration de cadmium mesurée en post-mortem dans le cortex rénal de certains habitants du bassin de la rivière Jinzu au Japon où sévit la maladie d'Itai-Itai, peut atteindre 71,1 ± 1,7 µg/ g chez les hommes et 83,9 ± 2,2 µg/ g (de poids frais) chez les femmes [165-166]. Il est surprenant de noter que ces concentrations ne représentent que le dixième de celles que nous avons mesurées in vitro. L'étude in vivo chez les souris exposées chroniquement au CdCl<sub>2</sub>, prouve que des altérations rénales précoces surviennent à des niveaux d'accumulations de cadmium relativement faibles de l'ordre de 20 µg/ g de cortex rénal. Nous pouvons considérer cette valeur de 20 µg/ g de cortex rénal comme étant la concentration rénale critique de cadmium chez la souris. Tenant compte de ces données, la limite critique inférieure de 200 µg/ g de rein établie par l'OMS, semble être très surestimée. De même, nos résultats ainsi que ceux d'autres études [83], suggèrent que la concentration critique de cadmium dans le cortex rénal de 50 µg/ g, considérée comme sans danger pour la population générale, devrait être fixée à un niveau inférieur. Nous estimons qu'une concentration rénale seuil de 0,2 µg/ g de cortex rénal, déduite en appliquant un facteur de sécurité de 100 à celle trouvée chez les souris, serait acceptable chez l'homme.

Par ailleurs, il s'avère important pour la santé publique de déterminer le taux maximal de cadmium auquel une personne peut être exposée sans risque de développer de lésions rénales. Mais définir un seuil limite ou une consommation maximale autorisée de cadmium est difficile parce que les effets sur la santé humaine n'apparaissent qu'après une longue période d'exposition [167]. La DHTP ou dose hebdomadaire tolérable provisoire pour le

cadmium a été fixée à 7 µg/ kg de poids corporel, ce qui correspond à 70 µg/ jour pour une personne qui pèse 70 kg [166]. La DHTP pour un contaminant est généralement déterminée à partir du niveau causant le plus faible effet nocif observé (LOAEL) chez l'espèce la plus sensible, auquel on applique un facteur d'incertitude de 100 [83]. Un modèle de toxicocinétique prédit que le niveau de cadmium dans le cortex rénal de 50 µg/ g de poids humide pourrait être atteint suite à l'apport en cadmium de 1 µg/ kg de poids corporel/ jour pendant plus de 50 ans [58]. Cela fait valoir que le niveau actuel de sécurité sur la consommation n'offre pas une protection suffisante de la santé et qu'il devrait être abaissé. En effet, des études récentes [166, 168], montrent que l'ingestion estimée de 25-30 µg/ jour peut produire des effets nocifs rénaux chez environ 1% de la population adulte lorsque la variabilité de l'absorption et la sensibilité aux effets indésirables chez les membres de la population sont prises en compte dans l'analyse. Afin de revoir ce seuil limite ou cette consommation maximale autorisée de cadmium, nous souhaitons mener une étude de toxicité chronique chez la souris en prolongeant la durée d'exposition à 2 ans, ce qui représente les deux tiers de la vie de l'animal, tout en diminuant la concentration de CdCl<sub>2</sub> dans l'eau de boisson à 10mg, 5 mg voire 1 mg/l. Nous estimons que la souris représente le modèle de choix pour une telle étude. Effectivement, en se basant sur les valeurs des DL 50 (INERIS – Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques – Version N° 2-3- Février 2005), la souris est l'espèce la plus sensible parmi tous les modèles animaux de laboratoire. L'inhibition de la néoglucogenèse rénale, même si elle ne peut être prise comme un marqueur de toxicité, peut-être considérée comme le plus faible effet nocif observé ou un marqueur précoce d'altération métabolique.

En conclusion, le cadmium est un inhibiteur puissant de la néoglucogenèse rénale à partir du lactate à la fois dans les tubules rénaux murins et humains exposés in vitro à ce métal. Nous avons pu reproduire cet effet métabolique dans des tubules rénaux prélevés chez des souris exposées in vivo au cadmium.

Nos résultats sont en faveur d'une action inhibitrice directe du cadmium sur les enzymes intervenant dans la voie de la néoglucogenèse notamment la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Toutefois la baisse intracellulaire en ATP, coenzymes A et glutathion, induite par le cadmium, aurait un effet potentialisateur de cette inhibition de la néoglucogenèse. Les cellules tubulaires proximales rénales humaines et murines présentent, suite à l'exposition au cadmium, le même « profil » de toxicité métabolique. Par conséquent, il semble justifié d'utiliser le modèle murin pour prédire et comprendre les mécanismes des effets rénaux du cadmium chez l'homme. L'inhibition de la néoglucogenèse rénale, même si elle ne correspond pas à un effet toxique en elle même, peut-être considérée comme un marqueur précoce d'altération métabolique. La plus grande résistance des cellules rénales humaines à l'effet toxique du cadmium par rapport à celles de souris, peut-être expliqué par le fait qu'elles auraient une plus grande capacité à séquestrer le cadmium, notamment par le



biais de la metallothionéine et autres groupements thiols, et à lutter contre le stress oxydatif.

L'étude de la nature de l'interaction entre le  $\text{Cd}^{2+}$  et les enzymes de la néoglucogenèse, en particulier la phosphoénolpyruvate carboxykinase, peut nous aider à mieux comprendre le mécanisme de cette inhibition et peut ouvrir de nouvelles perspectives dans le développement de nouvelles molécules capables d'inhiber la néoglucogenèse rénale tout en étant de moindre toxicité et donc susceptible d'être utilisées dans un but thérapeutique (traitement du diabète de type II chez l'homme).

Du fait qu'il n'existe pas d'agents chélateurs efficaces sur le plan thérapeutique pour réduire l'accumulation de Cd dans l'organisme humain ou améliorer son excrétion, la prévention constitue la meilleure stratégie pour minimiser les risques que représente le cadmium pour la santé humaine. Cette prévention consisterait à veiller au respect de la législation internationale fixant les limites maximales de Cd dans les produits agricoles, l'eau de boisson et l'air, et aussi à lutter contre la pollution atmosphérique et environnementale.

## VI. Annexes

### VI.1. Annexe I

**Tableau 1 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 10µM sur le métabolisme du L-lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris**  
**Résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites utilisées (-) ou accumulées								
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	α-KG	Glutamate	Glutamine	Citrate	Malate
Lactate 5 mM	-770,8 ± 33,4	121,7 ± 7,0	21,2 ± 0,8	28,3 ± 2,5	2,9 ± 0,5	5,4 ± 1,0	25,6 ± 4,8	7,5 ± 0,9	2,1 ± 0,2
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	-687,2 ± 25,2*	62,6 ± 7,4*	18,4 ± 1,6	26,4 ± 1,2	16,7 ± 3,8*	9,5 ± 0,9*	18,6 ± 3,9*	13,6 ± 1,2*	6,4 ± 0,6*

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites mesurées					
	ATP	GSH	CoA total	AcCoA	CoA-SH	Balance <sup>12</sup> C
Lactate 5 mM	8,08 ± 0,33	6,08 ± 0,30	0,279 ± 0,025	0,139 ± 0,014	0,140 ± 0,011	361,7 ± 31,9
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	5,98 ± 0,26*	5,26 ± 0,33	0,284 ± 0,032	0,145 ± 0,016	0,139 ± 0,016	373,5 ± 26,6

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 36,8 ± 1,4 mg pour chaque condition d'incubation. Le lactate présent au temps 0 est 51,51 ± 0,43 µmoles/fiole. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences réalisées en quadruple. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05). Les mesures de la consommation des lactates <sup>13</sup>C et de la production des métabolites <sup>13</sup>C par RMN du carbone 13, sont reportées dans les tableaux 2 à 6. **α-KG** : α-cétoglutarate, **ATP** : adénosine triphosphate, **GSH** : glutathion réduit, **AcCoA** : acétyl-coenzyme A, **CoA-SH** : coenzyme A, **CoA total** : AcCoA + CoA-SH.

**Tableau 2 : Effets du CdCl<sub>2</sub>, 10µM sur le métabolisme du [1-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées					<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)
	Lactate	Glucose		Alanine	Pyruvate	
	C-1	C-3	C-4	C-1	C-1	
Lactate 5 mM	-850,5 ± 39,9	16,1 ± 1,5	20,4 ± 2,0	20,4 ± 1,7	20,4 ± 7,4	79,7 ± 51,4
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	-782,5 ± 36,0*	5,9 ± 1,1*	7,8 ± 1,3*	17,6 ± 2,2*	15,0 ± 5,2	95,4 ± 36,9

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées			
	Glutamate	Glutamine	α-KG (calculé)	Balance <sup>13</sup> C
	C-1	C-1	C-1	
Lactate 5 mM	2,1 ± 0,8	3,9 ± 0,6	0,9 ± 0,1	767,3 ± 48,2
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	2,2 ± 0,3	3,5 ± 0,5	0,9 ± 0,1	731,6 ± 38,9

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 36,8 ± 1,4 mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 3 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 10µM sur le métabolisme du [2-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées											
Conditions expérimentales	Lactate			Alanine		Pyruvate		<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)			
	C-2	C-1	C-3	C-2	C-3	C-2	C-3				
<b>Lactate 5 mM</b>	-870,0 ± 51,6	12,2 ± 1,9	10,5 ± 1,5	19,6 ± 1,2	-	22,5 ± 3,0	-	98,8 ± 58,7			
<b>Lactate 5 mM + CdCl<sub>2</sub> 10 µM</b>	-792,1 ± 39,8	16,3 ± 0,4	11,4 ± 0,7	17,7 ± 2,0	-	21,1 ± 2,3	-	105,0 ± 50,6			
Conditions expérimentales	Glucose					Glutamate					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
<b>Lactate 5 mM</b>	27,4 ± 2,4	33,7 ± 3,6	22,4 ± 1,7	26,1 ± 4,0	34,4 ± 3,4	32,7 ± 1,3	3,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	2,0 ± 1,2	-	9,4 ± 0,2
<b>Lactate 5 mM + CdCl<sub>2</sub> 10 µM</b>	13,3 ± 2,3*	14,2 ± 1,7*	10,0 ± 0,7*	13,1 ± 0,5*	14,9 ± 1,5*	12,0 ± 2,5*	5,9 ± 0,5	0,5 ± 0,5	3,8 ± 0,5	-	20,0 ± 1,9*
Condition expérimentale	α-KG				Glutamine				Balance <sup>13</sup> C		
	C-1	C-2	C-3	C-5	C-1	C-2	C-3	C-5			
<b>Lactate 5 mM</b>	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3	4,2 ± 0,5	5,8 ± 0,5	7,4 ± 0,6	8,5 ± 1,1	17,4 ± 1,5	472,6 ± 90,4		
<b>Lactate 5 mM + CdCl<sub>2</sub> 10 µM</b>	1,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1*	1,3 ± 0,4	5,4 ± 0,7	5,5 ± 1,0	0,9 ± 1,1*	6,7 ± 0,7	14,5 ± 2,3	574,5 ± 39,7		

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 36,8 ± 1,4 mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05). Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 4 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 10µM sur le métabolisme du [3-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées										
Conditions expérimentales	Lactate			Alanine		Pyruvate		<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> Clac -ΔLac enz.)		
	C-3	C-1	C-2	C-2	C-3	C-2	C-3			
Lactate 5 mM	-785,4 ± 36,4	5,3 ± 0,7	26,5 ± 1,0	-	23,0 ± 1,4	-	26,6 ± 3,6	14,6 ± 37,2		
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	-711,7 ± 34,2*	9,5 ± 0,8*	32,6 ± 1,2*	-	19,9 ± 2,0*	-	23,7 ± 2,3	24,6 ± 32,5		
Conditions expérimentales	Glucose					Glutamate				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4
Lactate 5 mM	58,5 ± 6,6	54,0 ± 5,3	13,9 ± 3,9	15,3 ± 2,7	50,4 ± 4,8	35,3 ± 2,7	-	5,8 ± 0,4	1,6 ± 1,0	6,0 ± 2,3
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	23,0 ± 6,0*	18,4 ± 4,0*	4,4 ± 0,9*	5,3 ± 1,4*	18,4 ± 3,5*	26,7 ± 5,5	-	7,5 ± 0,7	5,3 ± 0,8*	10,5 ± 2,8
Conditions expérimentales	α-KG calculé			Glutamine			Balance <sup>13</sup> C			
	C-2	C-3	C-4	C-2	C-3	C-4				
Lactate 5 mM	2,4 ± 0,2	1,4 ± 0,3	3,2 ± 0,5	9,5 ± 1,0	7,8 ± 1,3	13,5 ± 1,1	396,1 ± 24,2			
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	2,6 ± 0,2	2,0 ± 0,4	3,7 ± 0,6	10,1 ± 2,3	7,6 ± 1,8	10,6 ± 3,0	438,8 ± 30,0			

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 36,8 ± 1,4 mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05). Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 5 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 10µM sur le métabolisme du lactate 5mM plus du bicarbonate marqué au <sup>13</sup>C dans les tubules rénaux proximaux de souris**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées						
Conditions expérimentales	Lactate		Alanine	Pyruvate	<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac - ΔLac enz.)	
	C-1		C-1	C-1		
Lactate 5 mM	6,2 ± 0,4		-	0,3 ± 0,1		-
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	7,7 ± 0,7		-	0,3 ± 0,1		-

Conditions expérimentales	Glucose		Glutamate	α-KG (calculé)	Glutamine	<sup>13</sup> C incorporé	Somme des <sup>13</sup> C inconnus
	C-3	C-4	C-1	C-1	C-1		
Lactate 5 mM	8,7 ± 0,9	9,6 ± 1,3	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,1	2,6 ± 0,5	27,0 ± 4,6	5,1 ± 3,0
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	4,06 ± 0,6*	4,9 ± 0,7*	2,3 ± 0,3	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,8	21,9 ± 1,4	8,0 ± 2,9

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 36,8 ± 1,4 mg pour chaque condition d'incubation. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 6 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 10µM sur les flux enzymatiques du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris**

Conditions expérimentales	<b>LDH</b> (flux net)	<b>PC</b> minimum	<b>PEPCK</b> (= G6Pase+PK) minimum	<b>G6Pase</b>	<b>PK</b> minimum	<b>ALAT</b>
Lactate 5 mM	770,7 ± 33,4	351,9 ± 11,2	307,0 ± 13,3	243,4 ± 13,9	63,6 ± 5,3	21,0 ± 1,4
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	687,2 ± 25,2*	286,2 ± 18,2*	219,5 ± 18,1*	125,2 ± 14,9*	94,3 ± 6,1*	18,4 ± 2,1*
Conditions expérimentales	<b>PDH</b>	<b>CS</b>	<b>ICDH</b>	<b>α-KGDH</b>	<b>MDH</b>	<u>PC minimum</u> PDH
Lactate 5 mM	433,2 ± 36,4	595,7 ± 52,4	588,2 ± 52,5	552,9 ± 51,3	550,9 ± 51,3	0,83 ± 0,09
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	450,4 ± 25,8	455,7 ± 22,6*	442,1 ± 23,4*	395,4 ± 23,5*	389,0 ± 24,1*	0,64 ± 0,06
Conditions expérimentales	Glx (accumulé via OAA)	Glx (accumulé via PDH)	AcCoA formé à partir de substrats endogènes			
Lactate 5 mM	32,4 ± 1,5	23,7 ± 1,9	162,5 ± 32,3			
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 10 µM	30,0 ± 3,7	29,2 ± 2,3*	5,2 ± 21,5(*)			

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 36,8 ± 1,4 mg pour chaque condition d'incubation. Les flux enzymatiques (en µmoles/g poids sec/h) sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05).

**LDH** : lactate déshydrogénase ; **PC** : pyruvate carboxylase ; **PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; **G6Pase** : Glucose-6-phosphatase ; **PK** : pyruvate kinase ; **ALAT** : alanine aminotransférase ; **PDH** : pyruvate déshydrogénase ; **CS** : citrate synthase ; **ICDH** : isocitrate déshydrogénase ; **α-CGDH** : α-cétoglutarate déshydrogénase ; **MDH** : malate déshydrogénase, **Glx** : glutamate + glutamine.

## VI.2. Annexe II

**Tableau 1 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 100µM sur le métabolisme du L-lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux humains**  
**Résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites**

Condition expérimentales	Quantités de métabolites utilisées (-) ou accumulées							
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	α-KG	Glutamate	Citrate	Malate
Lactate 5 mM	-383,7 ± 31,2	82,5 ± 7,9	65,2 ± 3,7	32,0 ± 1,8	4,7 ± 1,1	44,7 ± 1,7	7,7 ± 2,7± 0,1	0,7
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	-311,8 ± 16,5*	39,6 ± 5,0*	46,9 ± 1,1*	29,1 ± 1,8	28,8 ± 4,0*	43,7 ± 2,7	4,1 ± 1,5	0,5 ± 0,3

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites mesurées					
	ATP	GSH	CoA total	AcCoA	CoA-SH	Balance <sup>12</sup> C
Lactate 5 mM	5,71 ± 0,36	3,92 ± 0,19	0,149 ± 0,003	0,078 ± 0,003	0,072 ± 0,006	22 ,9 ± 28,3
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	3,79 ± 0,34*	1,59 ± 0,10*	0,088 ± 0,002*	0,055 ± 0,003*	0,033 ± 0,001*	11,7 ± 26,3

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Le poids sec est de 42,2 ± 2,1 mg pour chaque condition d'incubation. Le lactate présent au temps 0 est 51,0 ± 0,2 µmoles/fiole. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences réalisées en quadruple. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0.05)

Les mesures de la consommation des lactates <sup>13</sup>C et de la production des métabolites <sup>13</sup>C par RMN du carbone 13, sont reportées dans les tableaux 2 à 6.

α-KG : α-cétoglutarate, ATP : adénosine triphosphate, GSH : glutathion réduit, AcCoA : acétyl-coenzyme A, CoA-SH : coenzyme A, CoA total : AcCoA + CoA-SH.



**Tableau 2 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 100µM sur le métabolisme du [1-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux humains**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées						
Conditions expérimentales	Lactate	Glucose		Alanine	Pyruvate	<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> C1Lac -ΔLac enz.)
	C-1	C-3	C-4	C-1	C-1	
Lactate 5 mM	-430,5 ± 55,0	11,1 ± 2,1	12,6 ± 1,8	76,7 ± 15,4	34,0 ± 14,3	55,8 ± 26,8
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	-343,8 ± 9,4	3,2 ± 1,5*	3,8 ± 1,8*	47,8 ± 8,5*	23,8 ± 5,7	38,0 ± 15,6

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées			
Conditions expérimentales	Glutamate	α-KG	Balance <sup>13</sup> C
	C-1	C-1	
Lactate 5 mM	2,804 ± 0,590	0,312 ± 0,093	293,0 ± 26,1
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	2,177 ± 0,472	1,331 ± 0,223*	261,7 ± 12,4

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 42,2 ± 2,1 mg pour chaque condition d'incubation. Le lactate présent au temps 0 est 51,0 ± 0,2 µmoles/fiole. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 3 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 100µM sur le métabolisme du [2-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux humains**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées										
Conditions expérimentales	Lactate			Alanine		Pyruvate		<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)		
	C-2	C-1	C-3	C-2	C-3	C-2	C-3			
Lactate 5 mM	-401,1 ± 26,5	3,5 ± 1,6	5,5 ± 1,7	75,7 ± 16,1	-	36,1 ± 5,0	-	-		
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	-291,9 ± 23,3*	6,7 ± 1,4	4,4 ± 2,1	48,2 ± 8,1*	-	29,7 ± 4,5	-	-		
Conditions expérimentales	Glucose						Glutamate			
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-5
Lactate 5 mM	15,7 ± 3,6	20,6 ± 5,7	7,4 ± 1,6	10,7 ± 4,3	21,0 ± 6,5	18,3 ± 4,9	3,2 ± 0,5	8,0 ± 0,2	7,8 ± 0,6	16,4 ± 1,0
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	5,7 ± 2,1*	8,3 ± 2,5	0,0 ± 0,1*	2,6 ± 2,5*	8,8 ± 2,6	6,8 ± 3,9*	3,7 ± 0,3	6,3 ± 0,4*	7,0 ± 0,8	15,9 ± 1,7
Conditions expérimentales	α-KG calculé				Malate C-3	Somme <sup>13</sup> C inconnus	Balance <sup>13</sup> C			
	C-1	C-2	C-3	C-5						
Lactate 5 mM	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,5	-	34,6 ± 4,2	113 ± 18			
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	2,7 ± 0,8*	4,3 ± 0,9*	4,7 ± 0,9*	10,5 ± 1,5*	-	31,3 ± 3,4	122 ± 35			

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 42,2 ± 2,1 mg pour chaque condition d'incubation. Le lactate présent au temps 0 est 51,0 ± 0,2 µmoles/fiole. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 4 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 100µM sur le métabolisme du [3-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux humains**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées										
	Lactate			Alanine		Pyruvate		<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)			
	C-3	C-1	C-2	C-2	C-3	C-2	C-3				
<b>Lactate 5 mM</b>	-378,6 ± 30,1	2,0 ± 0,6	9,0 ± 2,9	-	76,2 ± 15,9	-	36,4 ± 4,9				-
<b>Lactate 5 mM + CdCl<sub>2</sub> 100µM</b>	-316,3 ± 8,6	1,7 ± 0,8	8,6 ± 0,9	-	51,5 ± 8,4*	-	31,5 ± 4,1				-
Conditions expérimentales	Glucose						Glutamate				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	
<b>Lactate 5 mM</b>	22,7 ± 4,6	21,1 ± 5,4	-	-	21,5 ± 5,6	22,7 ± 4,6	-	8,9 ± 0,8	8,0 ± 1,4	15,1 ± 1,4	
<b>Lactate 5 mM + CdCl<sub>2</sub> 100 µM</b>	9,4 ± 1,9*	7,3 ± 1,1*	-	-	8,3 ± 0,9*	11,8 ± 2,3*	-	8,7 ± 0,8	5,2 ± 0,7	16,1 ± 2,8	
Conditions expérimentales	α-KG				Somme <sup>13</sup> C inconnus		Balance <sup>13</sup> C				
	C-1	C-2	C-3	C-4							
<b>Lactate 5 mM</b>	-	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,4	1,7 ± 0,5			18,2 ± 7,4	113 ± 3			
<b>Lactate 5 mM + CdCl<sub>2</sub> 100 µM</b>	-	5,8 ± 1,1*	3,5 ± 0,8*	11,0 ± 3,1*			23,3 ± 7,9	113 ± 10			

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 42,2 ± 2,1 mg pour chaque condition d'incubation. Le lactate présent au temps 0 est 51,0 ± 0,2 µmoles/fiole. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05).

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 5 : Effets du CdCl<sub>2</sub> 100µM sur le métabolisme du lactate 5mM plus du bicarbonate marqué au <sup>13</sup>C dans les tubules rénaux proximaux humains**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées						
Conditions expérimentales	Lactate		Alanine	Pyruvate	<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)	
	C-1		C-1	C-1		
Lactate 5 mM	4,4 ± 1,2		1,0 ± 0,9	0,16 ± 0,04		-
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	5,2 ± 0,6		1,1 ± 1,1	0,17 ± 0,01		-
Conditions expérimentales	Glucose		Glutamate	α-KG calculé	<sup>13</sup> C incorporé	Somme <sup>13</sup> C inconnus
	C-3	C-4	C-1	C-1		
Lactate 5 mM	8,0 ± 2,4	8,0 ± 2,3	4,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1	26,2 ± 6,0	22,0 ± 10,8
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	4,9 ± 0,8	5,1 ± 0,8	3,6 ± 0,3	2,3 ± 0,3*	22,5 ± 1,8	9,0 ± 3,4

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 42,2 ± 2,1 mg pour chaque condition d'incubation. Le lactate présent au temps 0 est 51,0 ± 0,2 µmoles/fiole. Les résultats (en µmoles/g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0,05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 6 : Effets du CdCl<sub>2</sub>, 100µM sur les flux enzymatiques du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux humains**

Conditions expérimentales	<b>LDH</b> (flux net)	<b>PC</b>	<b>PEPCK</b> (= G6Pase+PK)	<b>G6Pase</b>	<b>PK</b>	<b>ALAT</b>
Lactate 5 mM	383,7 ± 31,2	264,5 ± 16,9	210,3 ± 15,1	165,0 ± 15,8	45,2 ± 11,5	65,2 ± 3,7
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	311,8 ± 16,3*	191,8 ± 8,6*	122,9 ± 11,1*	79,2 ± 10,0*	43,6 ± 7,1	46,9 ± 1,1*
Conditions expérimentales	<b>PDH</b>	<b>CS</b>	<b>ICDH</b>	<b>α-KGDH</b> = MDH	<b>MDH</b>	<b>PC</b> PDH
Lactate 5 mM	67,2 ± 26,9	174,7 ± 11,4	166,9 ± 8,9	120,4 ± 9,8	120,4 ± 9,8	7,41 ± 3,03
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	87,6 ± 20,3	219,8 ± 28,3	215,7 ± 27,3	150,9 ± 35,6	150,9 ± 35,6	3,10 ± 1,33
Conditions expérimentales	Glu (via PDH)	Glu (via OAA)	Glu+α-KG (via PDH)	Glu+α-KG (via OAA)	AcCoA formé à partir de substrats endogènes	
Lactate 5 mM	17,8 ± 2,3	41,9 ± 1,5	20,0 ± 9,6	46,5 ± 2,3	107,4 ± 35,4	
Lactate 5 mM + CdCl <sub>2</sub> 100 µM	18,4 ± 6,7	36,0 ± 5,9	32,7 ± 12,3	64,8 ± 9,4	132,2 ± 44,8	

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec est de 42,2 ± 2,1 mg pour chaque condition d'incubation. Les flux enzymatiques (en µmoles/g poids sec/h) sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 4 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données paires (\* p < 0.05). **LDH** : lactate déshydrogénase ; **PC** : pyruvate carboxylase ; **PEPCK** : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; **G6Pase** : Glucose-6-phosphatase ; **PK** : pyruvate kinase ; **ALAT** : alanine aminotransférase ; **PDH** : pyruvate déshydrogénase ; **CS** : citrate synthase ; **ICDH** : isocitrate déshydrogénase ; **α-KGDH** : α-cétoglutarate déshydrogénase ; **MDH** : malate déshydrogénase, **Glu** : glutamate, **α-KG** : α-cétoglutarate, **AcCoA** : acétyl-coenzyme A.

### VI.3. Annexe III

**Tableau 1 : Effets du cadmium sur le métabolisme du L-lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées in vivo par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson pendant 4 semaines**  
**Résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites utilisées (-) ou accumulées								
	Lactate	Glucose	Alanine	Pyruvate	α-KG	Glutamate	Glutamine	Citrate	Malate
<b>Lactate 5 mM</b>	-786,6	117,2	24,9	19,0	0,6	7,0	22,9	4,3	-0,6
<b>Souris témoins</b>	± 26,3	± 8,2	± 2,0	± 1,0	± 0,3	± 0,7	± 2,1	± 0,5	± 0,2
<b>Lactate 5 mM</b>	-711,8	91,2	23,3	19,3	1,6	7,6	29,5	5,9	0,9
<b>Souris traitées</b>	± 23,8*	± 3,9*	± 1,7	± 1,4	± 0,2*	± 1,2	± 1,0*	± 0,5*	± 0,2*

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites mesurées					
	ATP	GSH	CoA total	AcCoA	CoA-SH	Balance <sup>13</sup> C
<b>Lactate 5 mM</b>	10,50	7,54	0,330	0,146	0,185	439,3
<b>Souris témoins</b>	± 0,27	± 0,30	± 0,009	± 0,007	± 0,008	± 13,5
<b>Lactate 5 mM</b>	10,77	7,25	0,326	0,151	0,175	396,8
<b>Souris traitées</b>	± 0,11	± 0,31	± 0,010	± 0,006	± 0,006	± 15,6

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Le lactate présent au temps 0 est 51,51 ± 0,43 μmoles/fiole. Les résultats (en μmoles /g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 5 expériences réalisées en quadruple. L'analyse statistique entre les 2 conditions, absence et présence de CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données non paires (\* p < 0.05)

Les mesures de la consommation des lactates <sup>13</sup>C et de la production des métabolites <sup>13</sup>C par RMN du carbone 13, sont reportées dans les tableaux 2 à 6  
 α-KG : α-cétoglutarate, **ATP** : adénosine triphosphate, **GSH** : glutathion réduit, **AcCoA** : acétyl-coenzyme A, **CoA-SH** : coenzyme A, **CoA total** : AcCoA + CoA-SH.

**Tableau 2 : Effets du cadmium sur le métabolisme du [1-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées in vivo pendant 4 semaines par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées					<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)
	Lactate	Glucose		Alanine	Pyruvate	
	C-1	C-3	C-4	C-1	C-1	
<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	-825,7 ± 7,4	20,2 ± 2,8	24,1 ± 4,6	19,4 ± 1,6	10,7 ± 2,7	39,1 ± 10,3
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	-763,9 ± 17,1*	12,7 ± 0,5*	12,7 ± 3,4*	16,6 ± 1,2	9,3 ± 2,5	52,1 ± 6,2

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées			
	Glutamate	Glutamine	α-KG	Balance <sup>13</sup> C
	C-1	C-1	C-1	
<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	1,5 ± 0,2	3,7 ± 0,3	0,10 ± 0,04	746,5 ± 11,2
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	1,6 ± 0,4	4,0 ± 0,3	0,11 ± 0,05	707,4 ± 13,8

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Les résultats (en μmoles /g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 5 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, sans ou avec traitement au CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données non paires (\* p < 0.05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 3 : Effets du cadmium sur le métabolisme du [2-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées in vivo pendant 4 semaines par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées									
	Lactate			Alanine			Pyruvate		Citrate C-1+C-5	<sup>12</sup> C Lactate resynthésisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)
	C-2	C-1	C-3	C-1	C-2	C-3	C-2	C-3		
<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	-838,3 ± 16,6	10,1 ± 0,6	8,5 ± 1,7	0,4 ± 0,3	20,6 ± 1,5	0,1 ± 0,1	15,9 ± 1,2	-	-	51,7 ± 26,3
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	-771,9 ± 19,1*	12,9 ± 0,9*	8,3 ± 0,8	-	18,9 ± 1,5	-	15,8 ± 1,7	-	-	60,1 ± 24,2
Conditions expérimentales	Glucose						Glutamate			
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-5
<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	30,9 ± 2,8	37,1 ± 4,4	24,1 ± 1,2	28,0 ± 1,7	38,5 ± 3,6	32,3 ± 3,3	4,0 ± 0,6	3,0 ± 0,2	3,8 ± 0,4	5,9 ± 2,2
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	21,5 ± 1,4*	24,9 ± 1,5*	19,2 ± 1,7*	24,1 ± 1,3	26,0 ± 1,3*	23,5 ± 1,5*	3,2 ± 0,5	0,5 ± 0,5*	1,9 ± 0,5*	6,6 ± 1,7
Conditions expérimentales	α-KG				Glutamine				Balance <sup>13</sup> C	
	C-1	C-2	C-3	C-5	C-1	C-2	C-3	C-5		
<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	6,0 ± 0,7	6,0 ± 0,7	8,8 ± 0,4	16,5 ± 1,9	533,0 ± 17,5	
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1*	6,9 ± 0,2	7,6 ± 0,2	9,7 ± 0,5	19,1 ± 0,9	514,4 ± 19,6	

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Les résultats (en μmoles /g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 5 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, sans ou avec traitement au CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données non paires (\* p < 0.05). Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.



**Tableau 4 : Effets du cadmium sur le métabolisme du [3-<sup>13</sup>C]lactate 5mM dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées in vivo pendant 4 semaines par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson**

Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées										
Conditions expérimentales	Lactate			Alanine		Pyruvate		<sup>2</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> Clac -ΔLac enz.)		
	C-3	C-1	C-2	C-2	C-3	C-2	C-3			
<b>Lactate 5 mM</b>	-780,6	5,0	23,3	-	21,2	-	16,2			5,9
<b>Souris témoins</b>	± 16,5	± 0,5	± 1,4		± 1,7		± 1,0			± 19,6
<b>Lactate 5 mM</b>	-746,5	5,4	21,4		17,4	-	15,2			34,7
<b>Souris traitées</b>	± 47,6	± 1,3	± 1,9		± 1,3		± 2,2			± 54,7
Conditions expérimentales	Glucose					Glutamate				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4
<b>Lactate 5 mM</b>	67,2	56,6	17,6	18,2	58,3	49,2	1,4	5,5	5,2	6,3
<b>Souris témoins</b>	± 5,5	± 3,4	± 2,3	± 0,9	± 4,7	± 6,8	± 0,6	± 0,7	± 0,8	± 0,9
<b>Lactate 5 mM</b>	47,7	39,2	12,8	12,5	39,7	48,6	0,8	3,6	2,6	6,0
<b>Souris traitées</b>	± 4,3*	± 2,6*	± 1,6	± 1,2*	± 2,5*	± 4,2	± 0,6	± 0,4*	± 0,9*	± 1,3
Conditions expérimentales	α-KG calculé				Glutamine				Balance <sup>13</sup> C	
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-1	C-2	C-3	C-4		
<b>Lactate 5 mM</b>	0,09	0,4	0,3	0,4	3,2	12,5	12,7	16,2	368,3	
<b>Souris témoins</b>	± 0,04	± 0,2	± 0,2	± 0,2	± 0,4	± 0,9	± 1,6	± 2,2	± 9,5	
<b>Lactate 5 mM</b>	0,06	0,4	0,3	0,5	3,0	13,9	14,9	16,3	413,3	
<b>Souris traitées</b>	± 0,05	± 0,2	± 0,2	± 0,2	± 1,2	± 1,6	± 1,9	± 1,8	± 72,5	

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Les résultats (en μmoles /g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 5 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, sans ou avec traitement au CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données non paires (\* p < 0.05). Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 5 : Effets du cadmium sur le métabolisme du lactate 5mM plus du bicarbonate marqué au <sup>13</sup>C dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées in vivo pendant 4 semaines par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson**

Conditions expérimentales	Quantités de métabolites marqués utilisées (-) ou accumulées					<sup>12</sup> C Lactate resynthétisé (=Δ <sup>13</sup> CLac -ΔLac enz.)
	Lactate	Alanine	Pyruvate	Glucose		
	C-1	C-1	C-1	C-3	C-4	
<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	6,1 ± 0,5	-	0,36 ± 0,04	9,4 ± 1,2	10,7 ± 1,6	-
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	5,2 ± 0,9	-	0,25 ± 0,04	6,2 ± 0,9	7,0 ± 1,0	-

Conditions expérimentales	α-KG calculé	Glutamate	Glutamine	<sup>13</sup> C incorporé	Somme des <sup>13</sup> C inconnus
	C-1	C-1	C-1		
	<b>Lactate 5 mM Souris témoins</b>	0,07 ± 0,03	1,2 ± 0,1	2,5 ± 0,2	29,0 ± 2,7
<b>Lactate 5 mM Souris traitées</b>	0,07 ± 0,04	0,9 ± 0,4	2,7 ± 0,7	18,9 ± 2,8*	-

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Les résultats (en μmoles /g poids sec) pour les métabolites utilisés (-) ou produits formés sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 5 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, sans ou avec traitement au CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données non paires (\* p < 0.05)

Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**Tableau 6 : Effets du cadmium sur les flux enzymatiques du métabolisme du lactate dans les tubules rénaux proximaux de souris traitées in vivo pendant 4 semaines par du CdCl<sub>2</sub> à 600 mg/l dans l'eau de boisson**

Conditions expérimentales	<b>LDH</b> (flux net)	<b>PC</b> minimum	<b>PEPCK</b> (= G6Pase+PK) minimum	<b>G6Pase</b>	<b>PK</b> minimum	<b>ALAT</b>
Lactate 5 mM Souris témoins	786,6 ± 11,5	314,4 ± 17,6	± 273,7 20,1	234,3 ± 18,4	39,4 ± 3,3	24,9 ± 2,4
Lactate 5 mM Souris traitées	711,8 ± 14,8*	271,4 ± 5,6*	226,0 ± 6,8*	182,3 ± 5,6*	43,8 ± 2,9	23,3 ± 2,0
Conditions expérimentales	<b>PDH</b>	<b>CS</b>	<b>ICDH</b>	<b>αKGDH</b>	<b>MDH</b>	<u>PC minimum</u> PDH
Lactate 5 mM Souris témoins	467,6 ± 13,8	757,6 ± 85,9	753,3 ± 86,3	716,3 ± 87,3	716,9 ± 87,9	0,68 ± 0,06
Lactate 5 mM Souris traitées	441,6 ± 16,8	634,2 ± 30,7	628,3 ± 31,1	589,8 ± 30,7	588,8 ± 30,7	0,62 ± 0,03
Conditions expérimentales	Glx (accumulé via OAA)	Glx (accumulé via PDH)	AcCoA formé à partir de substrats endogènes			
Lactate 5 mM Souris témoins	36,4 ± 2,7	24,0 ± 3,3	289,9 ± 94,6			
Lactate 5 mM Souris traitées	36,9 ± 1,7	25,8 ± 1,6	192,6 ± 35,9			

Les tubules sont incubés pendant 1h comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes ». Le poids sec des tubules est de 46,1 ± 0,9 mg pour les souris témoins et de 46,7 ± 0,6 mg pour les souris traitées. Les flux enzymatiques (en µmoles/g poids sec/h) sont exprimés comme la moyenne ± SEM de 5 expériences. L'analyse statistique entre les 2 conditions, sans ou avec traitement au CdCl<sub>2</sub>, est faite avec le test de Student-Newman-Keuls pour données non paires (\* p < 0,05). Les résultats des dosages enzymatiques de l'utilisation de substrat et de la production de métabolites figurent sur le tableau 1.

**LDH** : lactate déshydrogénase ; **PC** : pyruvate carboxylase ; **PEPCK** : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; **G6Pase** : Glucose-6-phosphatase ; **PK** : pyruvate kinase ; **ALAT** : alanine aminotransférase ; **PDH** : pyruvate déshydrogénase ; **CS** : citrate synthase ; **ICDH** : isocitrate déshydrogénase ; **α-CGDH** : α-cétoglutarate déshydrogénase ; **MDH** : malate déshydrogénase, **Glx** : glutamate + glutamine.

## VII. Bibliographie

1. Who Task Group on Environmental Health Criteria for Cadmium., Friberg Lars, Elinder Carl-Gustaf, et al., *Cadmium*. Environmental health criteria., 1992, Geneva: World Health Organization. 280 p.
2. Nilsson U., Schutz A., Skerfving S., et al., Cadmium in kidneys in Swedes measured in vivo using X-ray fluorescence analysis. *Int Arch Occup Environ Health*, 1995. 67(6): p. 405-411.
3. Elinder C. G., Kjellstrom T., Lind B., et al., Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ Res*, 1983. 32(1): p. 220-227.
4. Jarup L., Berglund M., Elinder C. G., et al., Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*, 1998. 24 Suppl 1: p. 1-51.
5. Lauwerys Robert R., *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. 3. éd. ed. 1990, Paris: Masson. p.136-144.
6. Inaba T., Kobayashi E., Suwazono Y., et al., Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol Lett*, 2005. 159(2): p. 192-201.
7. Olivi L., Sisk J., and Bressler J., Involvement of DMT1 in uptake of Cd in MDCK cells: role of protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 281(3): p. C793-800.
8. Tallkvist J., Bowlus C. L., and Lonnerdal B., DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol Lett*, 2001. 122(2): p. 171-177.
9. Zoller H., Koch R. O., Theurl I., et al., Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology*, 2001. 120(6): p. 1412-1419.
10. Satarug S., Ujjin P., Vanavanitkun Y., et al., Influence of body iron store status and cigarette smoking on cadmium body burden of healthy Thai women and men. *Toxicol Lett*, 2004. 148(3): p. 177-185.
11. Kikuchi Y., Nomiyama T., Kumagai N., et al., Uptake of cadmium in meals from the digestive tract of young non-smoking Japanese female volunteers. *J Occup Health*, 2003. 45(1): p. 43-52.
12. Schumann K., Friebel P., Schmolke G., et al., State of Iron Repletion and Cadmium Tissue Accumulation as a Function of Growth in Young Rats After Oral Cadmium Exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1996. 1996(4): p. 483-487.
13. Kimura T., Itoh N., Min K. S., et al., Tissue accumulation of cadmium following oral administration to metallothionein-null mice. *Toxicol Lett*, 1998. 99(2): p. 85-90.
14. Liu Y., Liu J., and Klaassen C. D., Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. 175(3): p. 253-259.
15. Jarup L. and Akesson A., Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. 238(3): p. 201-208.
16. Henkel G. and Krebs B., Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features--structural aspects and biological implications. *Chem Rev*, 2004. 104(2): p. 801-824.
17. Vasak M., Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*, 2005. 19(1): p. 13-17.
18. Klaassen C. D., Liu J., and Choudhuri S., Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999. 39: p. 267-294.
19. Stennard F. A., Holloway A. F., Hamilton J., et al., Characterisation of six additional human metallothionein genes. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1218(3): p. 357-365.

20. Costello L. C., Guan Z., Franklin R. B., et al., Metallothionein can function as a chaperone for zinc uptake transport into prostate and liver mitochondria. *J Inorg Biochem*, 2004. 98(4): p. 664-666.
21. Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., et al., Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(4): p. 627-647.
22. Hunziker P. E., Kaur P., Wan M., et al., Primary structures of seven metallothioneins from rabbit tissue. *Biochem J*, 1995. 306 ( Pt 1): p. 265-270.
23. Tandon S. K., Singh S., Prasad S., et al., Hepatic and renal metallothionein induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food Chem Toxicol*, 2001. 39(6): p. 571-577.
24. Dudley R. E., Gammal L. M., and Klaassen C. D., Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985. 77(3): p. 414-426.
25. Chan H. M. and Cherian M. G., Mobilization of hepatic cadmium in pregnant rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993. 120(2): p. 308-314.
26. Chan H. M., Zhu L. F., Zhong R., et al., Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993. 123(1): p. 89-96.
27. Liu J., Liu Y., Michalska A. E., et al., Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996. 136(2): p. 260-268.
28. Jin T., Nordberg G. F., and Nordberg M., Influence of cadmium-metallothionein pretreatment on tolerance of rat kidney cortical cells to cadmium toxicity in vitro and in vivo. *Pharmacol Toxicol*, 1987. 60(5): p. 345-349.
29. Liu Y., Liu J., Habeebu S. S., et al., Metallothionein protects against the nephrotoxicity produced by chronic CdMT exposure. *Toxicol Sci*, 1999. 50(2): p. 221-227.
30. Liu J., Liu Y., Habeebu S. S., et al., Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl<sub>2</sub>-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci*, 1998. 46(1): p. 197-203.
31. Richards M. P., Characterization of the metal composition of metallothionein isoforms using reversed-phase high-performance liquid chromatography with atomic absorption spectrophotometric detection. *J Chromatogr*, 1989. 482(1): p. 87-97.
32. Prozialeck W. C. and Lamar P. C., Surface binding and uptake of cadmium (Cd<sup>2+</sup>) by LLC-PK1 cells on permeable membrane supports. *Arch Toxicol*, 1993. 67(2): p. 113-119.
33. Endo T. and Shaikh Z. A., Cadmium uptake by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells: influence of cell density and other metal ions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993. 121(2): p. 203-209.
34. Templeton D. M., Cadmium uptake by cells of renal origin. *J Biol Chem*, 1990. 265(35): p. 21764-21770.
35. Robinson M. K., Barfuss D. W., and Zalups R. K., Cadmium transport and toxicity in isolated perfused segments of the renal proximal tubule. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993. 121(1): p. 103-111.
36. Kinne R. K., Schutz H., and Kinne-Saffran E., The effect of cadmium chloride in vitro on sodium-glutamate cotransport in brush border membrane vesicles isolated from rabbit kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995. 135(2): p. 216-221.
37. Kimura O., Endo T., and Sakata M., Comparison of cadmium uptakes from apical and basolateral membranes of LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996. 137(2): p. 301-306.
38. Kimura O., Endo T., and Sakata M., Uptake of Cd-metallothionein into LLC-PK1 cells: a comparative study with CdCl<sub>2</sub>. *Biol Pharm Bull*, 1997. 20(2): p. 158-162.
39. Endo T., Kimura O., Sasaya M., et al., Na(+)- and energy-dependent transport of cadmium into LLC-PK1 cells. *Biol Pharm Bull*, 1995. 18(12): p. 1689-1693.

40. Dorian C., Gattone V. H., 2nd, and Klaassen C. D., Discrepancy between the nephrotoxic potencies of cadmium-metallothionein and cadmium chloride and the renal concentration of cadmium in the proximal convoluted tubules. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995. 130(1): p. 161-168.
41. Leffler P. E., Jin T., and Nordberg G. F., Nephrotoxic impact of multiple short-interval cadmium-metallothionein injections in the rat. *Toxicology*, 1996. 112(2): p. 151-156.
42. Vestergaard P. and Shaikh Z. A., The nephrotoxicity of intravenously administered cadmium-metallothionein: effect of dose, mode of administration, and preexisting renal cadmium burden. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994. 126(2): p. 240-247.
43. Zalups R. K. and Lash L. H., Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Environ Health*, 1994. 42(1): p. 1-44.
44. Zalups R. K. and Ahmad S., Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003. 186(3): p. 163-188.
45. Erfurt C., Roussa E., and Thevenod F., Apoptosis by Cd<sup>2+</sup> or CdMT in proximal tubule cells: different uptake routes and permissive role of endo/lysosomal CdMT uptake. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 285(6): p. C1367-1376.
46. Bismuth Chantal, *Toxicologie clinique*. 5e éd. ed. 2000, Paris: Médecine-Sciences Flammarion. xxi, 1092 p.
47. Guthrie C. J., Chettle D. R., Franklin D. M., et al., The use of multiple parameters to characterize cadmium-induced renal dysfunction resulting from occupational exposure. *Environ Res*, 1994. 65(1): p. 22-41.
48. Nordberg G. F., Jin T., Kong Q., et al., Biological monitoring of cadmium exposure and renal effects in a population group residing in a polluted area in China. *Sci Total Environ*, 1997. 199(1-2): p. 111-114.
49. Mason H. J., Davison A. G., Wright A. L., et al., Relations between liver cadmium, cumulative exposure, and renal function in cadmium alloy workers. *Br J Ind Med*, 1988. 45(12): p. 793-802.
50. Jarup L., Elinder C. G., and Spang G., Cumulative blood-cadmium and tubular proteinuria: a dose-response relationship. *Int Arch Occup Environ Health*, 1988. 60(3): p. 223-229.
51. Thun M. J., Osorio A. M., Schober S., et al., Nephropathy in cadmium workers: assessment of risk from airborne occupational exposure to cadmium. *Br J Ind Med*, 1989. 46(10): p. 689-697.
52. Chia K. S., Ong C. N., Ong H. Y., et al., Renal tubular function of workers exposed to low levels of cadmium. *Br J Ind Med*, 1989. 46(3): p. 165-170.
53. Bernard A. M., Roels H., Cardenas A., et al., Assessment of urinary protein 1 and transferrin as early markers of cadmium nephrotoxicity. *Br J Ind Med*, 1990. 47(8): p. 559-565.
54. Roels H. A., Lauwerys R. R., Bernard A. M., et al., Assessment of the filtration reserve capacity of the kidney in workers exposed to cadmium. *Br J Ind Med*, 1991. 48(6): p. 365-374.
55. Jakubowski M., Razniewska G., Halatek T., et al., Integrated index of occupational exposure to cadmium as a predictor of kidney dysfunction. *IARC Sci Publ*, 1992(118): p. 319-324.
56. Goyer R. A., Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol Lett*, 1989. 46(1-3): p. 153-162.
57. Leffler P., Jin T. Y., and Nordberg G. F., Cadmium-metallothionein-induced kidney dysfunction increases magnesium excretion in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990. 103(1): p. 180-184.
58. Buchet J. P., Lauwerys R., Roels H., et al., Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet*, 1990. 336(8717): p. 699-702.
59. Elinder C. G., Edling C., Lindberg E., et al., beta 2-Microglobulinuria among workers previously exposed to cadmium: follow-up and dose-response analyses. *Am J Ind Med*, 1985. 8(6): p. 553-564.

60. Mcdiarmid M. A., Freeman C. S., Grossman E. A., et al., Follow-up of biologic monitoring results in cadmium workers removed from exposure. *Am J Ind Med*, 1997. 32(3): p. 261-267.
61. Lauwerys R., Bernard A., Buchet J. P., et al., Does environmental exposure to cadmium represent a health risk? Conclusions from the Cadmibel study. *Acta Clin Belg*, 1991. 46(4): p. 219-225.
62. Jarup L., Hellstrom L., Alfven T., et al., Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med*, 2000. 57(10): p. 668-672.
63. Davison A. G., Fayers P. M., Taylor A. J., et al., Cadmium fume inhalation and emphysema. *Lancet*, 1988. 1(8587): p. 663-667.
64. Chan O. Y., Poh S. C., Lee H. S., et al., Respiratory function in cadmium battery workers--a follow-up study. *Ann Acad Med Singapore*, 1988. 17(2): p. 283-287.
65. Brzoska M. M. and Moniuszko-Jakoniuk J., Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure. *Toxicol Sci*, 2004. 82(2): p. 468-477.
66. Uchida M., Teranishi H., Aoshima K., et al., Elevated urinary levels of vitamin D-binding protein in the inhabitants of a cadmium polluted area, Jinzu River basin, Japan. *Tohoku J Exp Med*, 2007. 211(3): p. 269-274.
67. Nogawa K., Tsuritani I., Kido T., et al., Mechanism for bone disease found in inhabitants environmentally exposed to cadmium: decreased serum 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D level. *Int Arch Occup Environ Health*, 1987. 59(1): p. 21-30.
68. Kjellstrom T., Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Sci Publ*, 1992(118): p. 301-310.
69. Hayano M., Nogawa K., Kido T., et al., Dose-response relationship between urinary cadmium concentration and beta2-microglobulinuria using logistic regression analysis. *Arch Environ Health*, 1996. 51(2): p. 162-167.
70. Tsuritani I., Honda R., Ishizaki M., et al., Impairment of vitamin D metabolism due to environmental cadmium exposure, and possible relevance to sex-related differences in vulnerability to the bone damage. *J Toxicol Environ Health*, 1992. 37(4): p. 519-533.
71. Staessen J. A., Roels H. A., Emelianov D., et al., Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group. *Lancet*, 1999. 353(9159): p. 1140-1144.
72. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Working Group views and expert opinions, Lyon, 9-16 February 1993. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 1993. 58: p. 119-237.
73. Descotes Jacques, *Les urgences en toxicologie*. 1992, Paris: Maloine. p. 311-313.
74. Gennart J. P., Buchet J. P., Roels H., et al., Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese. *Am J Epidemiol*, 1992. 135(11): p. 1208-1219.
75. Mason H. J., Occupational cadmium exposure and testicular endocrine function. *Hum Exp Toxicol*, 1990. 9(2): p. 91-94.
76. Haguenoer J. M., *Toxicologie et hygiène industrielles*. 1981, Paris: Technique & documentation. v.
77. Kuhnert B. R., Kuhnert P. M., Lazebnik N., et al., The effect of maternal smoking on the relationship between maternal and fetal zinc status and infant birth weight. *J Am Coll Nutr*, 1988. 7(4): p. 309-316.
78. Kuhnert B. R., Kuhnert P. M., Debanne S., et al., The relationship between cadmium, zinc, and birth weight in pregnant women who smoke. *Am J Obstet Gynecol*, 1987. 157(5): p. 1247-1251.

79. Lauwerys R. R., Bernard A. M., Roels H. A., et al., Cadmium: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. *Clin Chem*, 1994. 40(7 Pt 2): p. 1391-1394.
80. Thijssen S., Maringwa J., Faes C., et al., Chronic exposure of mice to environmentally relevant, low doses of cadmium leads to early renal damage, not predicted by blood or urine cadmium levels. *Toxicology*, 2007. 229(1-2): p. 145-156.
81. Bernard A., Roels H., Buchet J. P., et al., Cadmium and health: the Belgian experience. *IARC Sci Publ*, 1992(118): p. 15-33.
82. Tohyama C., Sugihira N., and Saito H., Critical concentration of cadmium for renal toxicity in rats. *J Toxicol Environ Health*, 1987. 22(3): p. 255-259.
83. Satarug S. and Moore M. R., Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect*, 2004. 112(10): p. 1099-1103.
84. Cano N., Barnoud D., Schneider S. M., et al., eds. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 3<sup>ème</sup> édition ed. 2007, Springer-Verlag: Paris. 1189.
85. Dubourg L., Michoudet C., Cochat P., et al., Human kidney tubules detoxify chloroacetaldehyde, a presumed nephrotoxic metabolite of ifosfamide. *J Am Soc Nephrol*, 2001. 12(8): p. 1615-1623.
86. Baverel G., Bonnard M., and Pellet M., Lactate and pyruvate metabolism in isolated human kidney tubules. *FEBS Lett*, 1979. 101(2): p. 282-286.
87. Martin G., Durozard D., Besson J., et al., Effect of the antiepileptic drug sodium valproate on glutamine and glutamate metabolism in isolated human kidney tubules. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1033(3): p. 261-266.
88. Fouque D., Dugelay S., Martin G., et al., Alanine metabolism in isolated human kidney tubules--Use of a mathematical model. *Eur J Biochem*, 1996. 236(1): p. 128-137.
89. Conjard A., Martin M., Guitton J., et al., Gluconeogenesis from glutamine and lactate in the isolated human renal proximal tubule: longitudinal heterogeneity and lack of response to adrenaline. *Biochem J*, 2001. 360(Pt 2): p. 371-377.
90. Vittorelli A., Gauthier C., Michoudet C., et al., Characteristics of glutamine metabolism in human precision-cut kidney slices: a <sup>13</sup>C-NMR study. *Biochem J*, 2005. 387(Pt 3): p. 825-834.
91. Guder W. G. and Ross B. D., Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int*, 1984. 26(2): p. 101-111.
92. Schoolwerth A. C., Smith B. C., and Culpepper R. M., Renal gluconeogenesis. *Miner Electrolyte Metab*, 1988. 14(6): p. 347-361.
93. Philippson C., [Renal glutaminase I activities in experimental and human chronic pyelonephritis (author's transl)]. *Exp Pathol (Jena)*, 1975. 10(3-4): p. 115-121.
94. Lemieux G., Baverel G., Vinay P., et al., Glutamine synthetase and glutamyltransferase in the kidney of man, dog, and rat. *Am J Physiol*, 1976. 231(4): p. 1068-1073.
95. Meyer C., Stumvoll M., Dostou J., et al., Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 282(2): p. E428-434.
96. Meyer C., Dostou J. M., Welle S. L., et al., Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 282(2): p. E419-427.
97. Gerich J. E., Meyer C., Woerle H. J., et al., Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*, 2001. 24(2): p. 382-391.
98. Cersosimo E., Garlick P., and Ferretti J., Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. *Diabetes*, 2000. 49(7): p. 1186-1193.
99. Baverel G., Ferrier B., and Martin M., Fuel selection by the kidney: adaptation to starvation. *Proc Nutr Soc*, 1995. 54(1): p. 197-212.
100. Stumvoll M., Meyer C., Mitrakou A., et al., Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia*, 1997. 40(7): p. 749-757.



101. Stumvoll M., Meyer C., Perriello G., et al., Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am J Physiol*, 1998. 274(5 Pt 1): p. E817-826.
102. Meyer C., Stumvoll M., Welle S., et al., Relative importance of liver, kidney, and substrates in epinephrine-induced increased gluconeogenesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 285(4): p. E819-826.
103. Meyer C., Dostou J., Nadkarni V., et al., Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal, and hepatic substrate metabolism. *Am J Physiol*, 1998. 275(6 Pt 2): p. F915-921.
104. Cersosimo E., Garlick P., and Ferretti J., Abnormal glucose handling by the kidney in response to hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2001. 50(9): p. 2087-2093.
105. Stumvoll M., Meyer C., Kreider M., et al., Effects of glucagon on renal and hepatic glutamine gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Metabolism*, 1998. 47(10): p. 1227-1232.
106. Ekberg K., Landau B. R., Wajngot A., et al., Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, 1999. 48(2): p. 292-298.
107. Conjard A., Brun V., Martin M., et al., Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. *Biochem J*, 2002. 368(Pt 1): p. 301-308.
108. Schoolwerth Ac, Deboer Pa, Moorman Af, et al., Changes in mRNAs for enzymes of glutamine metabolism in kidney and liver during ammonium chloride acidosis. *Am J Physiol*, 1994. 267(36): p. F400-F406.
109. Woerle H. J., Meyer C., Popa E. M., et al., Renal compensation for impaired hepatic glucose release during hypoglycemia in type 2 diabetes: further evidence for hepatorenal reciprocity. *Diabetes*, 2003. 52(6): p. 1386-1392.
110. Meyer C., Woerle H. J., Dostou J. M., et al., Abnormal renal, hepatic, and muscle glucose metabolism following glucose ingestion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. 287(6): p. E1049-1056.
111. Eid A., Bodin S., Ferrier B., et al., Intrinsic gluconeogenesis is enhanced in renal proximal tubules of Zucker diabetic fatty rats. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(2): p. 398-405.
112. Passonneau Janet V. and Lowry Oliver H., *Enzymatic analysis : a practical guide*. Biological methods. 1993, Totowa, NJ: Humana Press. 403 p.
113. Michal G., Bergmeyer, H.U. (1985), *Coenzyme A, catalytic method with phosphate acetyltransferase*. Methods of enzymatic analysis, Bergmeyer HU edition, vol. VII. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, pp 169-177.
114. Griffith O.W., (1985), Glutathione and glutathione disulphide. In: Methods of enzymatic analysis, Bergmeyer HU edition, vol. VIII. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, pp 521-529.
115. Griffith O. W., Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, 1980. 106(1): p. 207-212.
116. Chauvin M. F., Megnin-Chanet F., Martin G., et al., The rabbit kidney tubule utilizes glucose for glutamine synthesis. A <sup>13</sup>C NMR study. *J Biol Chem*, 1994. 269(42): p. 26025-26033.
117. Chauvin M. F., Megnin-Chanet F., Martin G., et al., The rabbit kidney tubule simultaneously degrades and synthesizes glutamate. A <sup>13</sup>C NMR study. *J Biol Chem*, 1997. 272(8): p. 4705-4716.
118. Shaka A. J., Keeler, J., Frenkiel, T. And Freeman, R. (1983), An improved sequence for broadband decoupling: Waltz-16. *J. Magn. Reson.* 52, 335-338.
119. Howarth O. W., Lilley, D. M. J. (1978), Carbon-13-NMR of peptides and proteins. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 12, 1-40.
120. Canioni P., Alger J. R., and Shulman R. G., Natural abundance Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver and adipose tissue of the living rat. *Biochemistry*, 1983. 22(21): p. 4974-4980.

121. Martin G., Chauvin M. F., Dugelay S., et al., Non-steady state model applicable to NMR studies for calculating flux rates in glycolysis, gluconeogenesis, and citric acid cycle. *J Biol Chem*, 1994. 269(42): p. 26034-26039.
122. Martin G., Chauvin M. F., and Baverel G., Model applicable to NMR studies for calculating flux rates in five cycles involved in glutamate metabolism. *J Biol Chem*, 1997. 272(8): p. 4717-4728.
123. Berndt J., Messner B., Turkki T., et al., Optical assay of pyruvate carboxylase in crude liver homogenates. *Anal Biochem*, 1978. 86(1): p. 154-158.
124. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): p. 76-85.
125. Dorian C., Gattone V. H., 2nd, and Klaasen C. D., Renal cadmium deposition and injury as a result of accumulation of cadmium-metallothionein (CdMT) by the proximal convoluted tubules--A light microscopic autoradiography study with 109CdMT. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992. 114(2): p. 173-181.
126. Friberg L., Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect*, 1984. 54: p. 1-11.
127. Burch H. B., Narins R. G., Chu C., et al., Distribution along the rat nephron of three enzymes of gluconeogenesis in acidosis and starvation. *Am J Physiol*, 1978. 235(3): p. F246-253.
128. Gstraunthaler G., Steinmassl D., and Pfaller W., Renal cell cultures: a tool for studying tubular function and nephrotoxicity. *Toxicol Lett*, 1990. 53(1-2): p. 1-7.
129. Olabarrieta I., L'azou B., Yuric S., et al., In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol In Vitro*, 2001. 15(4-5): p. 511-517.
130. Felley-Bosco E. and Diezi J., Fate of cadmium in rat renal tubules: a micropuncture study. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1989. 98(2): p. 243-251.
131. Zalups R. K., Evidence for basolateral uptake of cadmium in the kidneys of rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. 164(1): p. 15-23.
132. Bridges C. C. and Zalups R. K., Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. 204(3): p. 274-308.
133. Wolff N. A., Abouhamed M., Verroust P. J., et al., Megalin-dependent internalization of cadmium-metallothionein and cytotoxicity in cultured renal proximal tubule cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 318(2): p. 782-791.
134. Barbier O., Jacquillet G., Tauc M., et al., Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol*, 2005. 99(4): p. p105-110.
135. Endo T., Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2002. 131(3): p. 223-229.
136. Svartengren M., Elinder C. G., Friberg L., et al., Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res*, 1986. 39(1): p. 1-7.
137. Halestrap A. P. and Price N. T., The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 1999. 343 Pt 2: p. 281-299.
138. Poole R. C. and Halestrap A. P., Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*, 1993. 264(4 Pt 1): p. C761-782.
139. Obatomi D. K. and Bach P. H., Atractyloside nephrotoxicity: in vitro studies with suspensions of rat renal fragments and precision-cut cortical slices. *In Vitro Mol Toxicol*, 2000. 13(1): p. 25-36.
140. Rikans L. E. and Yamano T., Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 2000. 14(2): p. 110-117.
141. Dorta D. J., Leite S., Demarco K. C., et al., A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem*, 2003. 97(3): p. 251-257.
142. Zazueta C., Sanchez C., Garcia N., et al., Possible involvement of the adenine nucleotide translocase in the activation of the permeability transition pore induced by cadmium. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. 32(10): p. 1093-1101.

143. Li M., Xia T., Jiang C. S., et al., Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis. *Toxicology*, 2003. 194(1-2): p. 19-33.
144. Thevenod F., Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol*, 2003. 93(4): p. p87-93.
145. Petronilli V., Costantini P., Scorrano L., et al., The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem*, 1994. 269(24): p. 16638-16642.
146. Kowaltowski A. J. and Vercesi A. E., Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1999. 26(3-4): p. 463-471.
147. Karmakar R., Roy S., and Chatterjee M., The effects of cadmium on the hepatic and renal levels of reduced glutathione, the activity of glutathione S-transferase and gamma glutamyl transpeptidase. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1999. 18(1): p. 29-35.
148. Owen M. R., Doran E., and Halestrap A. P., Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*, 2000. 348 Pt 3: p. 607-614.
149. Hultberg B., Andersson A., and Isaksson A., Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology*, 1998. 126(3): p. 203-212.
150. Prozialeck W. C. and Lamar P. C., Effects of glutathione depletion on the cytotoxic actions of cadmium in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995. 134(2): p. 285-295.
151. Meister A., Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 1988. 263(33): p. 17205-17208.
152. Gilbert H. F., Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol*, 1984. 107: p. 330-351.
153. Meister A., Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1271(1): p. 35-42.
154. Belcastro M., Marino T., Russo N., et al., The role of glutathione in cadmium ion detoxification: Coordination modes and binding properties - A density functional study. *J Inorg Biochem*, 2008.
155. Brigelius R., Muckel C., Akerboom T. P., et al., Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol*, 1983. 32(17): p. 2529-2534.
156. Rabenstein D. L. and Millis K. K., Nuclear magnetic resonance study of the thioltransferase-catalyzed glutathione/glutathione disulfide interchange reaction. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1249(1): p. 29-36.
157. Meister A., Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*, 1995. 251: p. 3-7.
158. Guyton K. Z., Liu Y., Gorospe M., et al., Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, 1996. 271(8): p. 4138-4142.
159. Hanson R. W. and Reshef L., Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem*, 1997. 66: p. 581-611.
160. Morel Y. and Barouki R., Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem*, 1998. 273(41): p. 26969-26976.
161. Engstrom B. and Nordberg G. F., Factors influencing absorption and retention of oral <sup>109</sup>Cd in mice: age, pretreatment and subsequent treatment with non-radioactive cadmium. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 1979. 45(4): p. 315-324.

162. Bem E. M., Orłowski C., Piotrowski J. K., et al., Cadmium, zinc, copper, and metallothionein levels in the kidney and liver of inhabitants of upper Silesia (Poland). *Int Arch Occup Environ Health*, 1993. 65(1): p. 57-63.
163. Brzoska M. M., Kamiński M., Supernak-Bobko D., et al., Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Arch Toxicol*, 2003. 77(6): p. 344-352.
164. Jarup L. and Alfvén T., Low level cadmium exposure, renal and bone effects--the OSCAR study. *Biometals*, 2004. 17(5): p. 505-509.
165. Uetani M., Kobayashi E., Suwazono Y., et al., Tissue cadmium (Cd) concentrations of people living in a Cd polluted area, Japan. *Biometals*, 2006. 19(5): p. 521-525.
166. Satarug S., Garrett S. H., Sens M. A., et al., Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect*. 118(2): p. 182-190.
167. Nogawa K., Honda R., Kido T., et al., A dose-response analysis of cadmium in the general environment with special reference to total cadmium intake limit. *Environ Res*, 1989. 48(1): p. 7-16.
168. Satarug S., Baker J. R., Urbenjapol S., et al., A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett*, 2003. 137(1-2): p. 65-83.

## VIII. Publications et Communications:

### Publications :

1. Renault S, **Faiz H**, Gadet R, Ferrier B, Martin G, Baverel G, Conjard-Duplany A.

Uranyl nitrate inhibits lactate gluconeogenesis in isolated human and mouse renal proximal tubules: a  $^{13}\text{C}$ -NMR study.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010 Jan 1; 242(1):9-17.

2. **Hassan Faiz**, Agnès Conjard-Duplany, Michelle Boghossian, Guy Martin, Gabriel Baverel, Bernard Ferrier.

Cadmium chloride inhibits lactate gluconeogenesis in isolated human renal proximal tubules: a cellular metabolomic approach with  $^{13}\text{C}$  NMR.

*Arch. Toxicol.* In press

3. Baverel, G, Renault, S, **Faiz, H**, El Hage, M, Gauthier, C, Duplany, A, Ferrier, B, Martin, G.

Protocols and applications of cellular metabolomics in safety studies using precision-cut tissue slices and carbon 13 NMR.

*Methods Mol Biol* 2011, 691: 205-225.

### Communications orales :

**H Faiz**, S Renault, B Ferrier, G Martin, R Nazaret, M Boghossian, M Martin, G Baverel, A Duplany-Conjard.

Cadmium inhibits lactate gluconeogenesis in human renal proximal tubules.

Takis Anagnostopoulos Symposium, June 26-27, 2008

Renal and Epithelial Physiology and Physiopathology

Faculté de Médecine Paris Descartes

## Communications par affiche :

1. **Hassan Faiz**, Sophie Renault, Bernard Ferrier, Guy Martin, Rémi Nazaret, Michelle Boghossian, Mireille Martin, Gabriel Baverel, Agnès Duplany-Conjard.

Cadmium inhibits lactate gluconeogenesis in human renal proximal tubules.

42nd Annual meeting of European Society for Pediatric Nephrology (ESPN), September 11-14, 2008, Lyon

Poster P222, In: Journal of the International Pediatric Nephrology Association

*Pediatric Nephrology*, Volume 23, Number 9, September 2008

2. **Hassan Faiz**, Sophie Renault, Bernard Ferrier, Guy Martin, Rémi Nazaret, Michelle Boghossian, Mireille Martin, Gabriel Baverel, Agnès Duplany-Conjard.

Effets du cadmium sur le métabolisme du lactate dans des tubules rénaux proximaux humains : étude par RMN du carbone 13.

10<sup>ème</sup> réunion commune de la Société de Néphrologie (SN) et de la Société Francophone de Dialyse, Novembre 26-29, 2008, Marrakech

Poster AR004, Néphrologie & Thérapeutique, Novembre 2008, Vol. 4, N° 6, p. 387-546

---

## **RESUME**

Dans le cadre de l'évaluation de la néphrotoxicité métabolique du cadmium, nous avons étudié l'effet du chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) sur la néoglucogénèse dans les tubules rénaux proximaux murins et humains. Les expériences de dose-effets in vitro montrent que le  $\text{CdCl}_2$  inhibe l'utilisation de lactate et la production de glucose de façon dose-dépendante. En outre, le  $\text{CdCl}_2$  induit une diminution importante des concentrations cellulaires de l'ATP et des principaux composés contenant des groupements thiols tels que les coenzymes A et le glutathion réduit. Les mesures enzymatiques et de spectroscopie RMN du carbone  $^{13}\text{C}$ , montrent que le  $\text{CdCl}_2$  produit dans les tubules rénaux murins et humains respectivement aux concentrations de 10 et 100  $\mu\text{M}$ , une inhibition des flux à travers la lactate déshydrogénase et l'ensemble de la voie de la néoglucogénèse. Nos résultats sont en faveur d'une action inhibitrice directe du cadmium sur les enzymes intervenant dans la voie de la néoglucogénèse. Toutefois, la baisse intracellulaire en ATP, coenzymes A et glutathion, aurait un effet potentialisateur de cette inhibition. Ainsi, cette étude fournit une base biochimique pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires des tubulopathies proximales survenant chez l'homme suite à une exposition chronique au cadmium.

---

## **TITRE en anglais**

$^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy Study of the Metabolic Toxicity of Cadmium in Isolated Mouse and Human Renal Proximal Tubules

---

## **ABSTRACT**

As part of the assessment of metabolism nephrotoxicity of cadmium, we have studied the effect of cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) on gluconeogenesis in isolated mouse and human renal proximal tubules. The dose-response experiments in vitro have shown that  $\text{CdCl}_2$  inhibits the use of lactate and glucose production in a dose-dependent fashion. Besides, the  $\text{CdCl}_2$  induced a significant decrease in cellular concentrations of ATP and the main compounds containing thiol groups such as coenzyme A and reduced glutathione. The enzymatic steps and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy showed that  $\text{CdCl}_2$  produced in mouse and human kidney tubules respectively at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$ , an inhibition of fluxes through lactate dehydrogenase and the entire gluconeogenic pathway. Our results are in favor of a direct inhibitory action of cadmium on enzymes involved in the gluconeogenic pathway. However, the decrease in intracellular ATP, glutathione and coenzyme A, would have a potentiating effect of this inhibition. Therefore, this study provides a biochemical basis for better understanding the cellular mechanisms of proximal tubular nephropathy occurring in humans following chronic exposure to cadmium.

---

**MOTS-CLES : Néphrotoxicité, cadmium, métabolisme, lactate, homme, souris, néoglucogénèse.**

---

**KEY-WORDS** : Nephrotoxicity, cadmium, metabolism, lactate, human, mouse, gluconeogenesis

---

**DISCIPLINE : Toxicologie - Biochimie – Métabolisme**

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire INSERM U820 : Métabolomique et Maladies Métaboliques

Faculté de Médecine R.T.H. Laennec, 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08

---