

EFFET DES PESTICIDES MCPA ET IMIDACLOPRIDE SUR LA RÉGULATION DES VOIES DE
SIGNALISATION DU RÉCEPTEUR À LA DIOXINE (AHR) ET AU RÉCEPTEUR AUX ANDROGÈNES (AR)

par

Ines Benassou

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Mai 2016

Le 24 Mai 2016

*le jury a accepté le mémoire de Madame Ines Benassou
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Luc Gaudreau
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Pierre-Étienne Jacques
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Peter Moffett
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Avec l'ère industrielle sont venus les polluants environnementaux. Ils sont de plus en plus pointés du doigt pour une variété d'effets indésirables en particulier pour leur potentiel à affecter la santé humaine. Les pesticides font partie de ces polluants et leurs usages ne font que croître depuis une vingtaine d'années. Ces produits qui servent à améliorer la production agricole en éliminant les pestes qui ravagent les récoltes sont souvent peu étudiés à long terme avant d'être homologués.

L'effet perturbateur au niveau cellulaire et les effets à long terme de ces pesticides sont peu connus. Pour ce projet de maîtrise, nous avons observé l'effet de deux pesticides, l'imidaclopride et l'acide 2-méthyl-4-chlorophenoxyacetic (MCPA), sur les voies de signalisation du récepteur à la dioxine (AhR) et du récepteur aux androgènes (AR). L'imidaclopride est un insecticide de la famille des néonicotinoïdes, une classe de plus en plus utilisée. Ce pesticide est surtout connu pour être en lien avec le déclin des colonies d'abeilles depuis une décennie. Le MCPA est un des herbicides les plus utilisés au Québec, il est persistant et souvent retrouvé dans les eaux de la province.

Nous avons traité des cellules du cancer du sein et des cellules du cancer de la prostate avec ces pesticides et nous avons vérifié si leur présence perturbait les deux voies de signalisation cellulaire à l'étude.

Le récepteur AhR est un facteur de transcription activé par un ligand. Le TCDD, une dioxine, est le meilleur ligand exogène connu à ce jour de ce récepteur. Par contre, ses ligands naturels, des dérivés du tryptophane ou des facteurs de virulence de bactéries, l'activent de façon beaucoup moins forte. Lors de l'activation de la voie AhR, les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont transcrits et codent pour des enzymes du cytochrome P450 qui transforment les ligands en produits plus facilement éliminables. Dans un contexte où de l'œstradiol (E2) est présent dans les cellules, il y a une interaction croisée entre

le récepteur à l'œstrogène (ER) et le récepteur AhR, qui fait en sorte que l'expression de *CYP1A1* est réprimée. Cela se traduit en un ratio d'enzyme CYP1A1 à CYP1B1 différent qui pourrait augmenter la possibilité d'une accumulation de métabolites génotoxiques. En effet, CYP1B1 hydroxyle le ligand d'AhR mais aussi l'œstradiol en 4-hydroxyœstradiol (4-OHE), dont l'accumulation peut amener des mutations dans l'ADN alors que l'enzyme CYP1A1 l'hydroxyle en 2-hydroxyœstradiol (2-OHE), qui n'as aucun effet néfaste répertorié sur la cellule.

Dans les cellules du cancer du sein, le MCPA appliqué en champs induisait fortement l'expression de *CYP1B1* comparable à l'échantillon traité au témoin positif (TCDD), alors que *CYP1A1* l'était que très légèrement par rapport au témoin non-traité. Au niveau protéique, CYP1A1 n'était qu'exprimée dans le témoin positif (TCDD) et ce, en quantité moindre lorsqu'il y avait présence d'œstradiol. CYP1B1 était fortement exprimée dans l'échantillon de TCDD, ce qui était attendu, mais aussi dans tous les échantillons traités au MCPA de NuFarm. Ces effets ne sont pas notés avec l'ingrédient actif du MCPA. La présence d'un ou plusieurs autres produits ajoutés dans le MCPA de la compagnie NuFarm en combinaison avec l'ingrédient actif pourrait activer la voie de signalisation d'AhR et causer ce déséquilibre dans l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. Nos résultats indiquent que plusieurs concentrations de l'ingrédient actif de l'imidaclopride ne perturbe pas les voies cellulaires d'AhR ni AR, alors que, le MCPA perturbe ces deux voies cellulaires. Par contre, c'est seulement celui produit par la compagnie NuFarm qui est utilisé en champs. Cette formulation appliquée en terrain agricole inclut l'ingrédient actif ainsi que les antigels, les surfactants et les adjuvants qui permettent au produit d'être plus efficace. L'ingrédient actif du MCPA seul n'affectait pas les deux voies.

Le récepteur aux androgènes (AR) est aussi un facteur de transcription qui se lie à l'ADN afin de réguler l'expression des gènes et il est particulièrement important pour le développement et le maintien du phénotype masculin. Depuis une vingtaine d'années, des problèmes de baisse de libido et de fertilité s'accroissent dans notre société et semblent être reliés à la baisse de testostérone des hommes (Travison

et al. 2007). Cette molécule est d'ailleurs un des deux ligands du récepteur AR, le deuxième étant la 5-dihydrotestostérone (DHT). Le facteur environnemental plutôt que le mode de vie semble être un facteur déterminant dans l'étude qui portait sur ce déclin. Les pesticides ont déjà été soupçonnés pour avoir un potentiel anti-androgénique, mais aucune étude ne fait un lien de causalité direct. Dans le projet de maîtrise présenté dans ce document, l'expression des gènes marqueurs *PSA* (antigène spécifique de la prostate) et *PCA3* (antigène du cancer de la prostate) a été quantifiée pour savoir si les pesticides ont un effet perturbateur sur la voie du récepteur AR.

Dans les cellules du cancer de la prostate, l'expression de *PSA* et *PCA3* était semblable au non-traité dans l'échantillon traité au MCPA (NuFarm), et ce, même après l'ajout de DHT, qui active l'expression de ces deux gènes. Cette fois-ci, l'ingrédient actif seul faisait en sorte que les deux gènes marqueurs étaient moins exprimés lors de l'ajout de la DHT, par rapport au témoin. Il semblerait que l'ingrédient actif est à la base de ce changement d'expression de nos gènes marqueurs. Donc, le MCPA pourrait avoir un effet anti-androgénique dans les cellules du cancer de la prostate. Donc, le MCPA est un pesticide qui affecte les voies de signalisation cellulaires AhR et AR. Il est particulier de noter que le pesticide appliqué en champ perturbe nettement plus les voies cellulaires. Il sera important de continuer à étudier les effets des pesticides sur l'homme au niveau cellulaire et de comprendre comment ils pourraient contribuer au développement du cancer.

Mots clés : pesticides, cancer, MCPA, imidaclopride, récepteur AhR, récepteur AR.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier tout d'abord mon directeur de recherche, Luc Gaudreau, pour ses conseils et encouragements tout au long de ma maîtrise. J'aimerais remercier aussi les membres de mon laboratoire Benoit Guillemette, Sandra Bergeron, Myriam Fauteux, particulièrement Jean-François Millau, Joannie Connell, Anahita Lashgari et Kathy Doyon pour leurs conseils, leur support et les discussions. Je remercie aussi mes conseillers, Pierre-Étienne Jacques et Peter Moffett pour leur contribution. J'aimerais souligner la contribution des organismes subventionnaires, soit l'Université de Sherbrooke et la Société de recherche sur le cancer. Enfin, je remercie mes parents Mounira et Mohamed et mon frère Liès, pour le support, l'encouragement et l'amour qu'ils m'ont donné afin que je puisse compléter cette maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	IV
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	VIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	X
LISTE DES FIGURES	XIII
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Les pesticides	1
1.1.1. Les catégories et les classes chimiques des pesticides	1
1.1.2. Le MCPA.....	4
1.1.3. L'imidaclopride.....	5
1.2. Le récepteur AhR.....	6
1.2.1. Le gène et le récepteur d'AhR	7
1.2.2. Les ligands naturels d'AhR.....	8
1.2.3. La signalisation du récepteur AhR.....	10
1.2.4. Les interactions croisées du récepteur AhR avec le récepteur ER.....	11
1.2.5. Les gènes codant pour les enzymes du cytochrome P450	13
1.3. Le récepteur aux androgènes.....	15
1.3.1. Le gène et le récepteur AR.....	17
1.3.2. La signalisation du récepteur AR.....	18
1.3.3. Le récepteur aux androgènes et le cancer de la prostate	20
1.4. Hypothèse.....	21
CHAPITRE 2.....	23
MATÉRIEL ET MÉTHODE	23
2.1. Réactifs et produits chimiques	23
2.2. Essais de croissance de levure (spot test).....	23
2.3. Culture cellulaire et traitements.....	23
2.4. Isolation de l'ARN et PCR avec transcriptase inverse	24
2.5. PCR en temps réel quantitatif.....	24
2.6. Immunobuvardage de type Western	24
CHAPITRE 3.....	26
RÉSULTATS	26
3.1. Tests de croissance de levures exposées aux pesticides.....	26
3.2. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement d'imidaclopride	28
3.3. Expression des gènes cible de la voie du récepteur AR suite au traitement d'imidaclopride	32
3.4. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA.....	34
3.5. Expression des enzymes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA.....	38

3.6. Expression des gènes cible du récepteur ER suite au traitement au MCPA	41
3.7. Expression des gènes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA.....	45
3.8. Expression des enzymes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA.....	50
CHAPITRE 4.....	52
DISCUSSION.....	52
4.1. Tests de croissance de levures exposées aux pesticides.....	52
4.2. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement d'imidaclopride .	53
4.3. Expression des gènes cible du récepteur AR suite au traitement d'imidaclopride ...	54
4.4. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA.....	55
4.5. Expression des enzymes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA.....	56
4.6. Expression des gènes cible du récepteur ER suite au traitement au MCPA	57
4.7. Expression des gènes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA.....	58
4.8. Expression des enzymes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA.....	59
CHAPITRE 5.....	61
CONCLUSION	61
ANNEXE.....	63
BIBLIOGRAPHIE	68

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

2-OHE	2-hydroxyœstradiol
4-OHE	4-hydroxyœstradiol
2,4,5-T	2,4,5-trichlorophenoxyacétique
2,4-D	Acide dichlorophénoxyactéique
β HLH	Facteur de transcription de la famille hélice-loupe-hélice basique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF-1	Fonction d'activation 1 de la région du domaine N-terminal de AR
AhR	Récepteur aux aryls hydrocarbonés ou récepteur aux dioxines
AhRR	Répresseur d'AhR
AIA	Acide indolacétique
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
AR	Récepteur aux androgènes
ARA70	Activateur du récepteur aux androgènes 70
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Translocateur nucléaire d'AhR
ATP	Adénosine triphosphate
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
<i>CYP</i>	Cytochrome P450
<i>CYP1</i>	Cytochrome P450, famille 1
CYP1A1	Cytochrome P450, famille 1, sous-famille A, polypeptide 1
CYP1B1	Cytochrome P450, famille 1, sous-famille B, polypeptide 1
CBP	Protéine liant CREB
DDT	Dichlorodipényltrichloroéthane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DHT	Dihydrotestostérone
DIM	3,3'-diindolylmethane
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DRE	Élément de réponse aux dioxines viii
E2	17 β -œstradiol
ER/ER α	Récepteur aux œstrogènes/ Récepteur aux œstrogènes α
ETOH	Éthanol
FICZ	Formylindolo(3,2-b)carbazole
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
HAH	Hydrocarbures aromatiques halogénés
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hsp90	« Heat shock protein » de 90 kDa

I3C	Indole-3carbinol
ICZ	Indolo[3,2-b]carbazole
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KLK	Kallicréine 3
Kyr	Kynurénine
LNCaP	Lignée cellulaire du cancer de la prostate avec mutation au récepteur AR
MCF-7	Lignée cellulaire du cancer du sein
MCPA	Acide (4-chloro-2-méthylphénoxy)acétique
METOH	Méthanol
NFκB	Facteur nucléaire Kappa-B
p23	Prostaglandine E synthase 3
PAS	Domaine d'une protéine de type Per-Arnt-Sim
pb	Paire de bases
PCA3	Antigène du cancer de la prostate 3
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PKA	Protéine kinase A
pRB	Protéine du rétinoblastome
PSA	Antigène spécifique de la prostate
P-TEFb	Facteur d'élongation transcription positif
q-RT-PCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel
ROMs	Intermédiaires oxygénés réactifs
RNA-Seq	Séquençage global des ARN
Rpm	Rotations par minute
RT-PCR	Transcriptase inverse suivie d'un PCR
SIA	Syndrome d'insensibilité aux androgènes
SRC	Coactivateur de récepteur stéroïdien 1
SRY	Région sexe-déterminante Y
T	Testostérone
T47D	Lignée cellulaire du cancer du sein
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TP	Température de la pièce (~21 °C)
UV	Ultraviolet
VCaP	Lignée cellulaire du cancer de la prostate
XRE	Élément de réponse aux xénobiotiques

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les amorces utilisées pour les essais d'expression des gènes en q-RT-PCR.....	25
Tableau 2 : Les anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western pour les essais semi-quantitatifs de détection de protéines	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les ventes de pesticides sont à la hausse à l'échelle mondiale.	2
Figure 2: Les structures chimiques de MCPA (a) et de l'imidaclopride (b).	5
Figure 3: AhR affecte plusieurs voies de signalisation et de réponses selon le contexte.	7
Figure 4 : Le gène AhR. (GeneCards AhR 2016)	7
Figure 5 : Les domaines fonctionnels d'AhR. (Modifiée de Stockinger <i>et al.</i> 2014)	8
Figure 6: Les différents dérivés de tryptophane activent AhR.	9
Figure 7: La voie de signalisation du récepteur AhR.	10
Figure 8 : Les mécanismes potentiels de l'interaction croisée entre AhR et ER α	12
Figure 7: La modulation de la signalisation d'ER et d'AhR due à leur interaction croisée.	13
Figure 8: Modèle proposé pour l'initiation du cancer du sein par des polluants et des pesticides. (Modifiée de l'Héritier <i>et al.</i> 2014)	15
Figure 9: Le gène AR.	17
Figure 10: La voie de signalisation cellulaire du récepteur aux androgènes.	19
Figure 11: Test de PCA3 afin de dépister le cancer de la prostate.	21
Figure 12: Spot tests de levures.	26
Figure 13 : Spot tests de levures ayant des défauts dans leur réponse aux dommages de l'ADN.	27
Figure 14 : Expression du gène <i>CYP1A1</i> dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M ou 200 μ M d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol.	28
Figure 15: Expression du gène <i>CYP1B1</i> dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M ou 200 μ M d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol.	29
Figure 16: Expression du gène <i>CYP1A1</i> dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M ou 200 μ M d'imidaclopride en présence d'imidaclopride ou absence d'œstradiol.	30
Figure 17: Expression du gène <i>CYP1B1</i> dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M ou 200 μ M d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol.	31
Figure 18 : Expression du gène <i>PCA3</i> dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M ou 200 μ M d'imidaclopride en présence ou absence de DHT.	32
Figure 19: Expression du gène <i>PSA</i> dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 2 μ M, 20 μ M ou 200 μ M en présence ou absence de DHT.	33
Figure 20: Expression du gène <i>CYP1A1</i> dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.	34

Figure 21: Expression du gène <i>CYP1B1</i> dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	35
Figure 22: Expression du gène <i>CYP1A1</i> dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	36
Figure 23: Expression du gène <i>CYP1B1</i> dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	37
Figure 24: A. Immunobuvardage de type Western dans les cellules MCF-7.....	39
Figure 25: Immunobuvardage de type Western dans les cellules T47D.....	40
Figure 26: Expression du gène <i>GREB1</i> dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	42
Figure 27: Expression du gène <i>TFF1</i> dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	43
Figure 28: Expression du gène <i>GREB1</i> dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	44
Figure 29: Expression du gène <i>TFF1</i> dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.....	45
Figure 30: Expression du gène <i>PCA3</i> dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.....	46
Figure 31: Expression du gène <i>PSA</i> dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.....	47
Figure 32: Expression du gène <i>PCA3</i> dans des cellules du cancer de la prostate VCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.....	48
Figure 33: Expression du gène <i>PSA</i> dans des cellules du cancer de la prostate VCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.....	49
Figure 34: Immunobuvardage de type Western dans les cellules LNCaP.....	50
Figure 35: Figure 3 de Marques <i>et al.</i> 2014.....	64
Figure 36 : Figure supplémentaire 1 de Marques <i>et al.</i> 2014.....	65
Figure 37 : Figure supplémentaire 3 de Marques <i>et al.</i> 2014.....	66
Figure 38: Figure supplémentaire 6 de Marques <i>et al.</i> 2014.....	67

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Les pesticides

Un pesticide est défini comme « un produit conçu pour détruire des organismes considérés indésirables ou nuisibles » (MDDELCC, 2014). Au niveau fédéral au Canada, ils sont plutôt nommés des *produits antiparasitaires* et définis comme « produit, substance ou organisme — notamment ceux résultant de la biotechnologie — constitué d'un principe actif ainsi que des produits de formulation et de contaminants et fabriqué, présenté, distribué ou utilisé comme moyen de lutte direct ou indirect contre les parasites par destruction, attraction ou répulsion, ou encore par atténuation ou prévention de leurs effets nuisibles, nocifs ou gênants » (Gouvernement du Canada, 2002). Les pesticides en général contiennent un ou plusieurs ingrédients actifs, c'est-à-dire un agent chimique à la propriété antiparasitaire, ainsi que des produits de formulation comme des solvants, des antigels et des surfactants qui améliorent l'efficacité du pesticide. Cette gamme de produits est utilisée partout dans le monde afin d'augmenter la productivité agricole. Il y a une hausse par rapport de leur utilisation depuis les années 80, et ce de façon mondiale comme montré en figure 1 (Grullón et Stokstad, 2013). Au Québec, l'usage est majoritairement agricole (70%), mais il demeure que 20% est pour usage domestique pour l'entretien des pelouses et l'extermination d'insectes par exemple. Les 10% restants couvrent les huiles essentielles repoussant les parasites et insectes entre autres (MDDELCC, 2012).

1.1.1. Les catégories et les classes chimiques des pesticides

Plusieurs catégories de pesticides sont homologuées au Canada et utilisées régulièrement. On peut les séparer en plusieurs catégories selon leurs usages : herbicides contre les mauvaises

herbes, insecticides contre les insectes ravageurs et fongicides contre les champignons nuisibles.

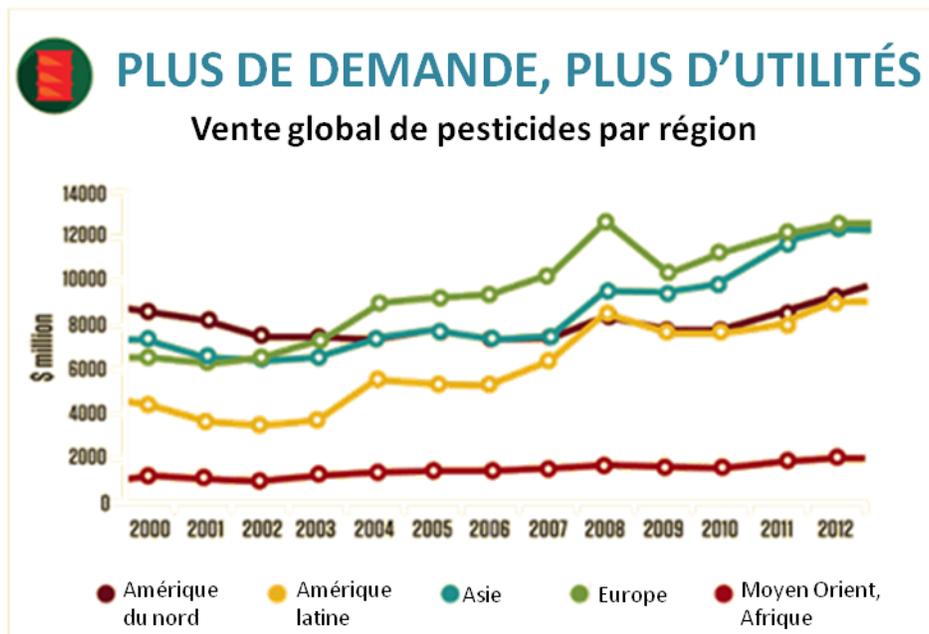


Figure 1: Les ventes de pesticides sont à la hausse à l'échelle mondiale.
(Modifiée de Grullón et Stoukstad, 2013)

Il est intéressant de noter que les répulsifs d'animaux, les algicides et les produits nettoyants et antimicrobiens sont aussi considérés comme des pesticides (Gouvernement du Canada, 2000). Ces pesticides peuvent être systémiques, c'est-à-dire qu'ils sont absorbés par l'organisme ciblé et vont se retrouver présents partout. La majorité des produits de lutte antiparasitaire sont non systémiques. Ces derniers sont plutôt des produits de contacts qui agissent lors de l'interaction directe avec un parasite. Nous pouvons classer les pesticides selon leur groupe chimique. Les organochlorés ont été un des premiers groupes à être utilisés comme pesticides. Ces composés organiques possèdent au moins un atome de chlore comme le célèbre dichlorodipényltrichloroéthane (DDT). Surtout utilisés comme insecticides et acaricides, leur usage s'est vu fortement restreint à cause de leur persistance, leur bioaccumulation, mais surtout à cause des effets secondaires liés au système de reproduction ainsi qu'au système nerveux, endocrinien et immunitaire chez l'homme. Les organophosphorés sont un autre groupe chimique qui est encore utilisé. Ces composés organiques contenant au moins un

atome de phosphore ont des usages similaires aux organochlorés étant aussi des insecticides et des acaricides. Bien qu'ils soient non persistants, leur manque de sélectivité ainsi que leur toxicité élevée pour l'homme font que ces pesticides sont dangereux. Malheureusement, ils sont toujours légaux au Canada, mais leur utilisation est à la baisse (Parlement du Canada, 2000). Depuis quelques années, des pesticides plus sélectifs ont pris les devants, comme les herbicides phénoxy et les néonicotinoïdes. Les herbicides phénoxy, comme le 2,4-D, sont très efficaces et éliminent seulement les mauvaises herbes dicotylédones, tel le trèfle, dans les pâturages et les champs de céréales (Syme et Wansbrough 1998) Cette sorte de pesticide ressemble à un facteur de croissance, l'acide indolacétique (AIA), chez ces plantes et force une pousse incontrôlable qui mène à leur mort. Grâce à cette spécificité, ils sont connus pour leur efficacité et ils sont utilisés souvent en combinaison avec d'autres herbicides du même type (Santé Canada, 2010). Ce sont des acides appliqués généralement en forme d'esters ou de sels, sauf l'acide 2,4,5-trichlorophenoxyacétique (2,4,5-T) qui est un constituant de l'Agent Orange. Celui-ci qui a été banni dans la majorité des pays due à une contamination au 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD), une dioxine extrêmement toxique, les pesticides de cette famille chimiques sont peu connus comme étant nocifs pour la santé humaine (Ritter *et al.* 2013).

Une autre catégorie de pesticides nommés les néonicotinoïdes, dérivés de la nicotine, a commencé, depuis 1994, à prendre les devants comme insecticides efficaces et spécifiques. Cette gamme de produit affecte le système nerveux central des insectes suceurs, plus spécifiquement les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. Les insectes, une fois exposés au produit, sont hyper-stimulés et meurent. Leur utilisation depuis leur découverte est en constante augmentation grâce à leur efficacité et spécificité contre les insectes, leur non-nocivité aux humains, ainsi qu'à leur potentiel systémique (Santé Canada, 2014). Malheureusement, les néonicotinoïdes sont célèbres, car ils sont pointés du doigt pour le récent syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles. Quelques papiers montrent que ces pesticides pourraient être la cause de la désorientation des abeilles qui mène au déclin de leurs colonies, et ce, même au Québec (Boily *et al.* 2013). Cela est d'ailleurs la cause du moratoire pour leur utilisation dans certains pays européens, dont la France, l'Allemagne et l'Italie

(Watts 2011). Cinq pesticides de cette catégorie sont utilisés au Canada, et leur application est variée, comme en enrobage de semences par exemple. Ces pesticides sont détectés dans l'eau des rivières partout au Québec (Giroux 2015). Comme les récepteurs nerveux touchés chez les insectes aquatiques sont les mêmes que ceux des insectes ciblés (Alexander *et al.* 2007), les néonicotinoïdes peuvent aussi avoir un effet néfaste sur eux. Selon l'article de Van der Sluijs et ses collègues, les invertébrés aquatiques seraient les plus perturbés par ces pesticides et plusieurs chercheurs ont démontré ces effets sur les macroinvertébrés benthiques (Van der Sluijs *et al.* 2014).

1.1.2. Le MCPA

L'acide (4-chloro-2-méthylphénoxy)acétique (MCPA) est un herbicide à base d'acide phénoxyacétique (Fig. 2a). Au Canada, il est utilisé sur les terres agricoles, les pelouses, ainsi qu'en foresterie et sur les sites industriels. Il figure parmi les 10 pesticides les plus vendus au Canada et il est utilisé dans tout le pays, surtout dans les provinces des Prairies. Le MCPA existe en plusieurs formes, soit en acide libre, en sels et en esters. Toutes ces formes libèrent l'acide qui est la matière active de l'herbicide. Selon l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire (ARLA), une concentration maximale acceptable de 0,1 mg/L (100 µg/L) est établie pour le MCPA dans l'eau potable selon les effets de ce composé sur la santé. Santé Canada a déterminé que le MCPA ne peut encore être classé pour sa cancérogénicité chez les humains, car peu d'études concluantes ont été effectuées sur les humains ou sur les animaux. Par ailleurs, peu de données existent par rapport à l'exposition des humains à ce pesticide. D'après ces données, on ne s'attend pas à ce que l'eau potable constitue une voie d'exposition importante. De faibles concentrations de MCPA ont été mesurées dans des sources d'eau potable dans de nombreuses provinces canadiennes, incluant au Québec (Giroux 2015). Il peut arriver en effet que le MCPA se retrouve dans l'eau à la suite du déversement de résidus de réservoirs ou par suite du lavage de pièces d'équipement. Le MCPA n'est pas persistant dans l'eau ou dans le sol en raison de la biodégradation en conditions aérobiques. Cependant, dans les milieux pauvres en oxygène, comme les eaux souterraines, ou pendant les périodes de froid

et de faible luminosité, la dégradation du MCPA par biodégradation ou photodécomposition est plutôt limitée (Santé Canada, 2010)

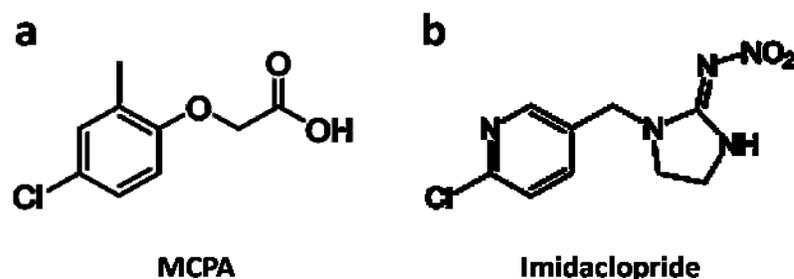


Figure 2: Les structures chimiques de MCPA (a) et de l'imidaclopride (b). (Images du site Sigma-Aldrich).

1.1.3. L'imidaclopride

Parmi la famille des néonicotinoïdes, on peut retrouver l'imidaclopride (Fig. 2b) qui est le premier à avoir été homologué. Ce produit est absorbé par les plantes et transféré de façon systémique à l'intérieur de celles-ci, de cette façon lorsque l'insecte y touche ou l'ingère, ils y sont exposés. Diverses préparations commerciales contenant de l'imidaclopride sont actuellement homologuées au Canada pour supprimer les insectes nuisibles sur le gazon, sur diverses cultures et même sur des animaux de compagnie. Ce pesticide est appliqué de plusieurs façons : pulvérisations foliaires, traitements de semences et applications au sol de produit. Selon le rapport de Giroux et ses collègues, l'enrobage de semences, qui est un traitement systémique, fait en sorte que l'imidaclopride est détecté dans plusieurs rivières au Québec (Giroux, 2015). De plus, leur utilisation année après année ainsi que leur longue demi-vie dans le sol fait en sorte qu'il y a une accumulation dans le sol (Goulson, 2013), qui favorise leur transport vers les eaux de surface et l'eau souterraine (Giroux et Sarrasin, 2011). Cet ingrédient actif est toxique par voie orale chez les rats, mais aucune étude ne montre qu'il peut causer le cancer ou modifier le matériel génétique chez les animaux. Comme les autres membres de la famille des néonicotinoïdes, l'imidaclopride est soupçonné comme étant la cause du syndrome de déclin de colonies d'abeilles (Whitehorn *et al.* 2012). De plus, il est particulier de noter que l'imidaclopride semble avoir des effets synergiques avec d'autres

insecticides, comme le chlorpyrifos sur les insectes et pourrait donc être un plus grand danger pour les organismes exposés (Gill *et al.* 2012 , Leblanc *et al.* 2012).

1.2. Le récepteur AhR

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) a été étudié intensivement pendant des années particulièrement en lien avec ses ligands xénobiotiques (Mandal *et al.* 2005). Une molécule xénobiotique est une substance qui est étrangère à l'organisme vivant. La majorité des recherches faites sur AhR ont été centrées sur sa liaison au TCDD et son implication dans la signalisation du récepteur, d'où son nom alternatif: récepteur à la dioxine. Ce polluant extrêmement toxique pour les êtres humains, ainsi que pour d'autres organismes, était un produit secondaire de la synthèse d'herbicides. Le récepteur AhR appartient à la famille des facteurs de transcription de type Per-Arnt-Sim (β HLH PAS), qui est impliquée dans la détection de changements environnementaux, comme le rythme circadien (Gu *et al.* 2000). Le récepteur a été conservé depuis les invertébrés, et son activité est contrôlée précisément, insinuant son importance pour les organismes (Frericks *et al.* 2007, Hahn *et al.* 1997). Les études sur l'exposition des petits rongeurs au TCDD ont amené les chercheurs à comprendre qu'il avait un impact sur le système immunitaire médié par la voie AhR (Holsapple *et al.* 1991). De plus, ce récepteur est important pour le développement du foie et dans la reproduction féminine (Baba *et al.* 2005, Schmidt *et al.* 1996). Il semblerait aussi qu'AhR a des fonctions indépendantes à sa liaison à l'ADN, comme son rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Fig. 3) (Barhoover *et al.* 2010). En effet, AhR peut interagir avec le facteur de transcription $\kappa\beta$, la protéine du rétinoblastome (pRB) et le récepteur aux œstrogènes α (ER α), ce qui mène respectivement à la croissance cellulaire, une régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Currier *et al.* 2005, Ohtake *et al.* 2003, Puga *et al.* 2000).

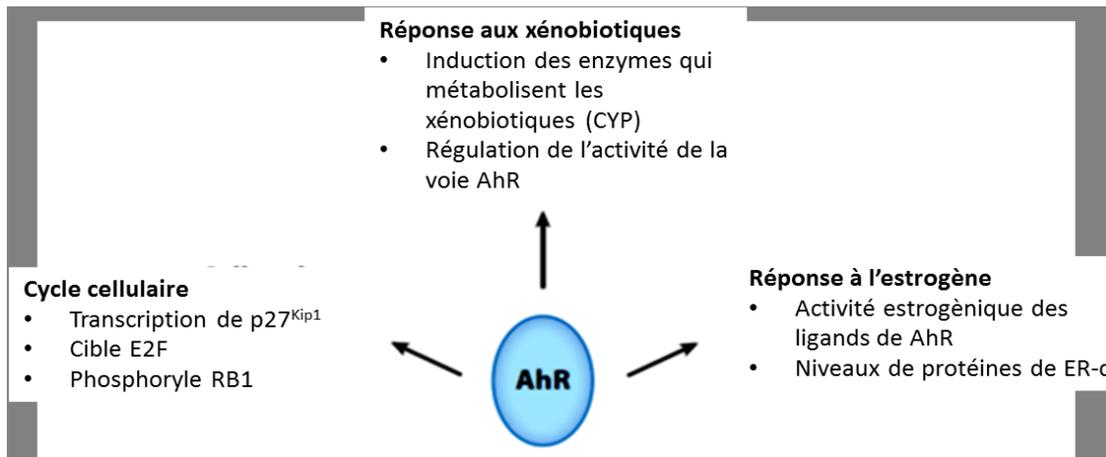


Figure 3: AhR affecte plusieurs voies de signalisation et de réponses selon le contexte. (Modifiée de Stockinger *et al.* 2014)

1.2.1. Le gène et le récepteur d'AhR

Le gène du récepteur AhR se trouve sur le chromosome 7, à la position 7p21.1 (figure 4) et il est d'une longueur de 47531 bases. Le gène code pour la protéine du même nom d'une taille de 848 acides aminés et d'un poids moléculaire de 96147kDa.

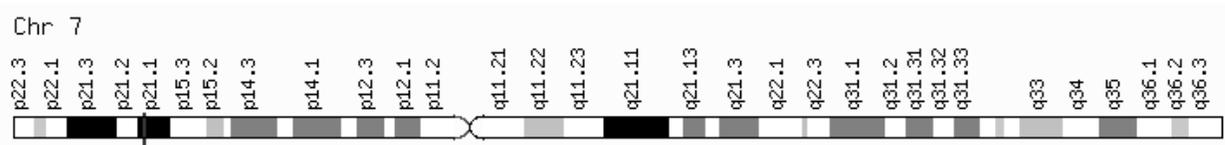


Figure 4 : Le gène AhR. (GeneCards AhR 2016)

On peut voir dans la figure 5 les cinq domaines fonctionnels du récepteur AhR (GeneCards AhR 2016). Du côté N-terminal de la protéine, on note la présence de deux domaines PAS (PER-ARNT-SIM) qui sont composés de trois protéines : la protéine pour le rythme circadien, le translocateur d'AhR et la « single-minded protein » qui est importante durant le développement et pour la différenciation cellulaire entre autres (Stockinger et al. 2014, GeneCards SIM1 2016, UniProt SIM1 2016). Ce sont des domaines clé pour les interactions protéine-protéine et pour la liaison du ligand. On remarque aussi le domaine de liaison à l'ADN dans l'hélice-boucle-hélice, mais aussi le domaine de dimérisation. Finalement, le

domaine d'activation transcriptionnelle se trouve dans la portion riche en glutamine (Q-rich) du côté C-terminal.

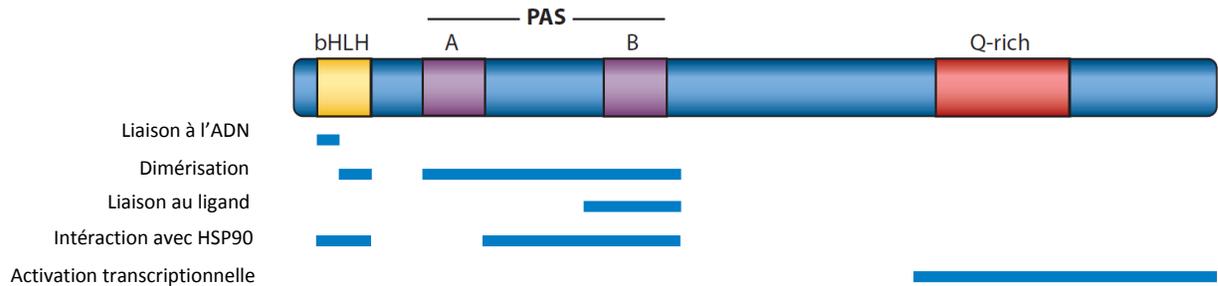


Figure 5 : Les domaines fonctionnels d’AhR. (Modifiée de Stockinger *et al.* 2014)

1.2.2. Les ligands naturels d’AhR

Il est important de noter qu’AhR a aussi des ligands naturels. L’activation de ce récepteur est généralement nettement plus faible lorsqu’un ligand endogène est lié à AhR que lorsqu’il est activé par un ligand exogène. Le tryptophane est un acide aminé essentiel et un précurseur de plusieurs composantes vitales dans le corps humain. Sa dégradation génère des métabolites comme la kynurénine (Kyr). Récemment des études ont montré que ces derniers étaient des agonistes du récepteur AhR (Nguyen et Bradfield 2008). La kynurénine est produite en grandes quantités dans les cellules tumorales du cerveau et elle est aussi associée à la réponse médiée par AhR de suppression de la réponse anti-tumorale et de progression maligne (Mezrich *et al.* 2010). Les indoles sont aussi des ligands naturels d’AhR. Ce sont des produits secondaires du métabolisme du tryptophane par des bactéries. Ils peuvent aussi être dérivés de l’alimentation. L’indole-3-carbinol (I3C) est présent dans les légumes crucifères (brassicacées), comme le chou et le brocoli. Ce composé est dégradé par l’acide de l’estomac (Fig. 6a) en indolo-[3,2-b]carbazole (ICZ) et en 3,3-diindolométhane (DIM). L’exposition à la lumière visible ou aux UV (Fig. 6b) du tryptophane résulte en 6-formylindolo(3,2-b)carbazole (FICZ). Ce dernier active AhR à des concentrations extrêmement faibles, aussi peu que quelques picomolaires, et se compare au TCDD en matière d’activation du récepteur (Shertzer et Senft 2000, Wincent *et al.* 2009, Rannug *et al.* 1987). Contrairement aux polluants environnementaux, les ligands naturels ou endogènes d’AhR sont d’excellents substrats pour

les enzymes produites via ce récepteur. Les polluants métabolisés peuvent interagir avec d'autres molécules présentes et ont des demi-vies plus longues, gardant AhR activé plus longtemps (Bergander *et al.* 2004, Ito *et al.* 2007). Il est important de noter que les mécanismes biologiques initiés par la liaison à AhR par des ligands endogènes ou issus de notre alimentation sont très peu compris. Certaines études ont montré qu'ils pourraient avoir un rôle dans le contrôle immunitaire. Des bactéries de notre microbiome intestinal peuvent dégrader le tryptophane dont le dérivé généré se lie à AhR afin de promouvoir une résistance de l'hôte aux pathogènes (Kundu et Pettersson 2014). Des études avaient déjà montré son implication dans la différenciation de cellules T, mais plus récemment, une étude a montré que des facteurs de virulences de bactérie activaient AhR de façon dose-dépendante et enclenchaient une réponse immunitaire (Moura-Alves *et al.* 2014).

a Les indoles issues de notre alimentation pouvant activer AhR



b Métabolisme du tryptophane

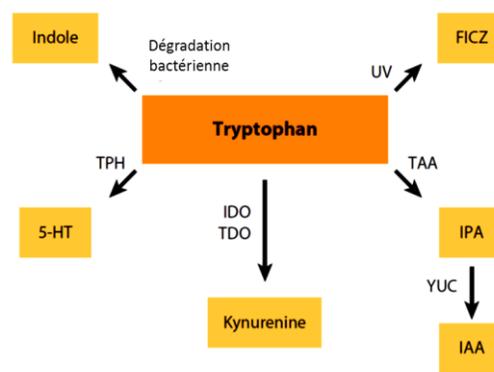


Figure 6: Les différents dérivés de tryptophane activent AhR.
(Modifiée de Stockinger *et al.* 2014)

1.2.3. La signalisation du récepteur AhR

Lorsqu'il n'y a pas de ligand, AhR est présent dans le cytoplasme sous forme de complexe inactif lié à des chaperonnes et à des filaments d'actine (Fig. 7). L'association d'AhR à la chaperonne «heat shock protein» 90 (HSP90) et la Prostaglandine E synthase 3 (p23), une co-chaperonne, se fait à son domaine de liaison à l'ADN et à son domaine de liaison à son ligand (Meyer *et al.* 1999, Grenert *et al.* 1997). Il semblerait que la machinerie de HSP90 soit impliquée non seulement dans le maintien du complexe inactif avant la liaison au ligand, mais aussi à maintenir le récepteur dans une conformation qui favorise une forte liaison à ce dernier (Pongratz *et al.* 1992).

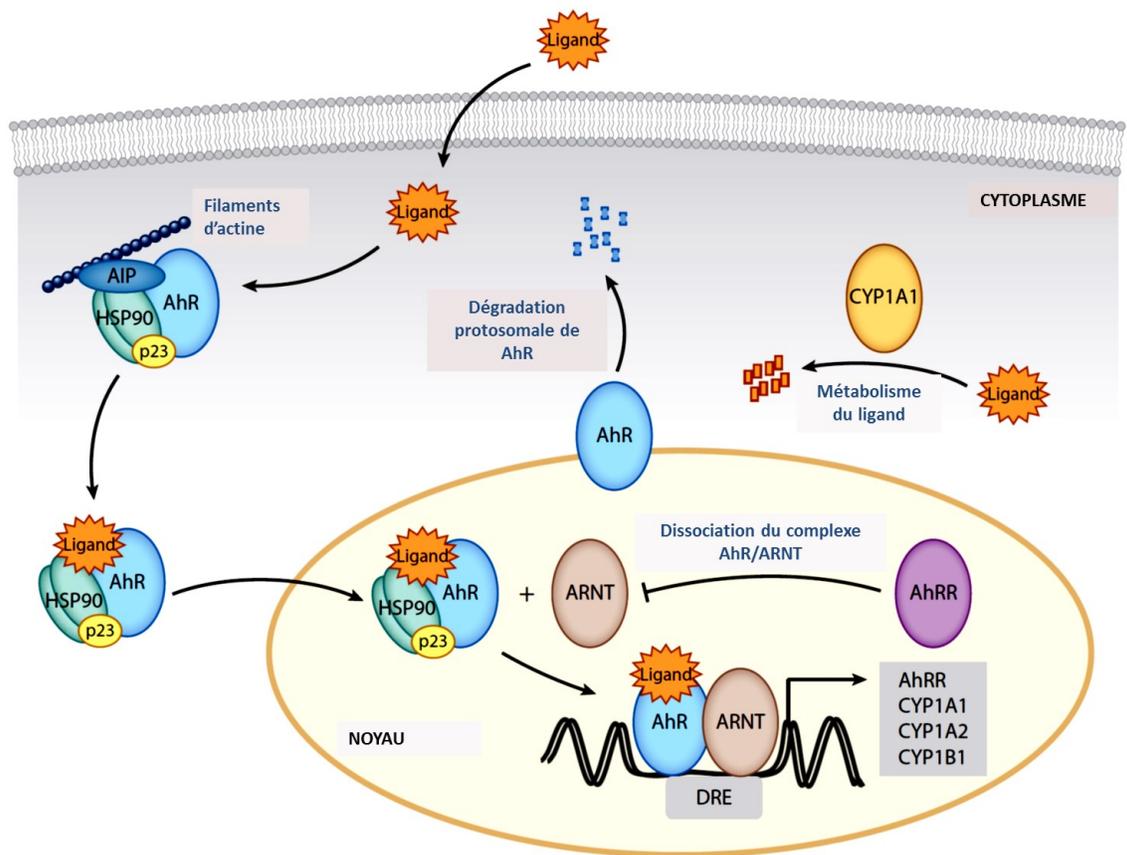


Figure 7: La voie de signalisation du récepteur AhR.
(Modifiée de Stockinger *et al.* 2014)

Une fois que le ligand est lié à AhR, le récepteur va se déplacer dans le noyau, et se dissocier de son complexe (Fig. 7). AhR s'associe alors à son translocateur nucléaire ARNT afin de pouvoir s'attacher à l'ADN, via son domaine de liaison à l'ADN, à l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) qui est aussi connu comme l'élément de réponse à la dioxine (DRE). ARNT est une protéine nucléaire constitutivement présente et elle ne peut pas séparer le complexe HSP90 et AhR. Elle est le facteur de transcription qui se lie aux régions génomiques contenant le motif de liaison (XRE/DRE) et qui régule l'expression de gènes voisins par sa région C-terminale (Fukunaga *et al.* 1995). Il n'est pas clair comment ARNT et cette hétérodimerisation est absolument nécessaire pour la fonction d'AhR comme facteur de transcription, ni s'il y a d'autres facteurs de transcription avec lesquels AhR pourrait interagir. Le récepteur peut directement contrôler l'activité transcriptionnelle de ses gènes cibles en interagissant avec des unités du complexe «positive transcription elongation factor b» (P-TEFb), qui est un facteur d'élongation. Il interagit aussi avec le complexe médiateur, qui est requis pour réguler l'expression de la majorité des transcrits de l'ARN polymérase II (Tian *et al.* 2003, Wang *et al.* 2004). De cette façon, la transcription des gènes cibles comme *AhRR*, *CYP1A1* et *CYP1B1* peut débiter (Stockinger *et al.* 2014).

De plus, AhR peut affecter la structure de la chromatine proche de son site de liaison en interagissant avec le complexe «SWItch/Sucrose Non-Fermentable» (SWI/SNF) de remodelage de l'ADN (Okino et Whitlock Jr. 1995, Wang et Hankinson 2002). Le récepteur peut affecter l'acétylation ainsi que la méthylation des histones en interférant avec des co-activateurs comme le complexe «steroid receptor coactivator-1», SRC-1, ou en déplaçant des complexes responsables pour déacetyler les histones (Beischlag *et al.* 2002). Enfin, la signalisation du récepteur AhR est régulée au niveau de la dégradation protéasomale, son métabolisme par CYP1A1 et la séparation du complexe AhR/ARNT par AhRR.

1.2.4. Les interactions croisées du récepteur AhR avec le récepteur ER

Le récepteur AhR a la particularité d'avoir des interactions croisées avec le récepteur à l'œstrogène alpha (ER α). Lorsque le récepteur ER est inactivé, on peut voir une action œstrogénique des ligands du récepteur AhR activé (Matthews *et al.* 2005). Il est important de

comprendre que le récepteur ER α est aussi un facteur de transcription ligand-activé qui participe à la prolifération cellulaire en réponse à ses ligands qui sont évidemment des hormones, telle l'œstrogène (E2) (Dubik *et al.* 1987). Son activation se fait aussi par certaines kinases, certains facteurs de transcription et d'autres récepteurs stéroïdiens (Kato *et al.* 1995; Kousteni *et al.* 2001). Lorsqu'AhR est en hétérodimère avec ARNT, il active non seulement l'expression de ces gènes cibles, comme *CYP1A1* et *CYP1B1*, mais il va inhiber l'expression de gènes induits par E2 (Safe et Wormke 2003). Lorsqu'il n'y a d'œstradiol dans la cellule, et qu'AhR est activé, le récepteur ER α est réprimé. Le récepteur AhR activé semble donc pouvoir réguler ER à ses propres gènes et suggère qu'il peut réguler les réponses estrogéniques.

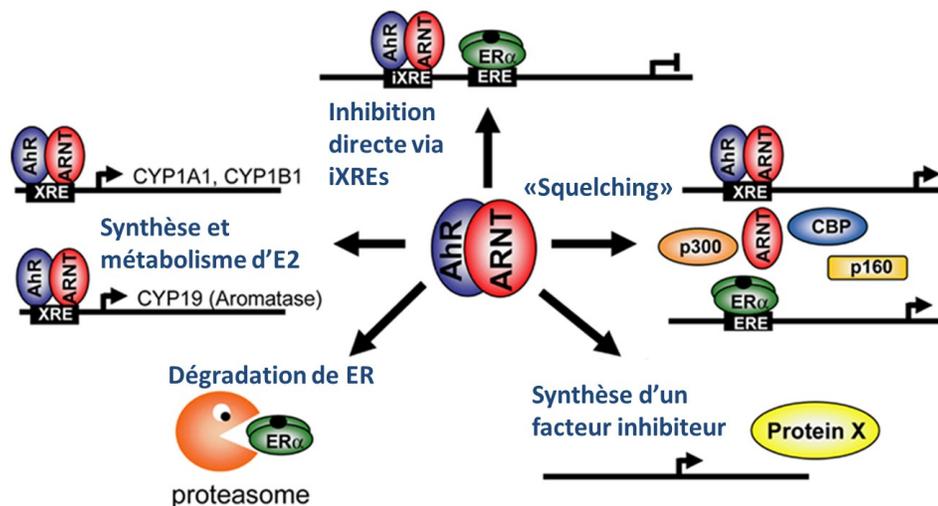


Figure 8 : Les mécanismes potentiels de l'interaction croisée entre AhR et ER α .

L'inhibition directe par le complexe AhR/ARNT qui se lie aux éléments d'inhibition de réponse aux xénobiotiques (iXREs) présents dans les gènes cibles d'ER, le «squelching» ou étouffement des coactivateurs ou la synthèse d'une protéine inhibitrice encore inconnue est des mécanismes possibles. Il est possible que ce soit aussi une dégradation accrue d'ER par le protéosome ou le changement dans la synthèse et le métabolisme de l'œstrogène par l'expression plus forte de *CYP1A1*, *CYP1B1* et l'aromatase *CYP19*. (Modifiée de Matthews et Gustafsson 2006).

Cette interaction protéine/protéine directe fait en sorte qu'on peut voir une répression de certains gènes cibles d'AhR comme *CYP1A1*, mais pas *CYP1B1*. La modulation de la

signalisation des récepteur ER et AhR par leur interaction due à la dioxine ou à un autre ligand est montrée sur la figure 8. L'association d'ER avec AhR activé peut être vue de deux manières : soit AhR activé éloigne ER α de ses propres gènes cibles aux gènes cibles d'AhR causant une inhibition de la réponse estrogénique, soit ER α module la transcription AhR-dépendante (Matthews et Gustafsson 2006).

Donc, selon la publication en 2005 de Matthews et ses collègues, AhR peut réguler le niveau de protéines et les réponses estrogéniques (Matthews *et al.* 2015). Plusieurs mécanismes montrés à la figure 9 pourraient expliquer cette interaction croisée entre les deux récepteurs.

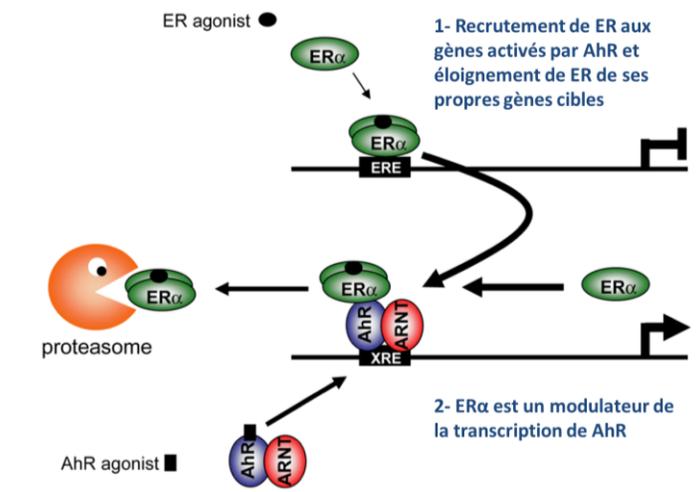


Figure 9: La modulation de la signalisation d'ER et d'AhR due à leur interaction croisée. (Modifiée de Matthews et Gustafsson 2006)

1.2.5. Les gènes codant pour les enzymes du cytochrome P450

Les enzymes CYP font partie de la famille des enzymes du cytochrome P450, un nom temporaire à cause d'un sommet à 450nm (Omura et Sato 1962). Ces enzymes étaient surtout connues pour leur présence dans le foie ainsi que leur métabolisme de drogues et de produits xénobiotiques. On sait maintenant qu'elles ont beaucoup plus de fonctions, dont la synthèse de cholestérol, de bile et de vitamine D3 (Nebert et Russell 2002).

Ce sont des enzymes clés pour le métabolisme de produit en un produit plus soluble dans l'eau et donc plus facile à éliminer (Williams 1971). Elles intègrent un atome d'oxygène au substrat,

pour en faire un produit oxygéné une fois relâché. Cependant, il demeure que certains intermédiaires sont instables alors que d'autres restent réactifs. On les appelle des intermédiaires oxygénés réactifs ou ROMs. Ceux-ci peuvent être génotoxiques et causer des mutations en se liant de façon covalente à des acides nucléiques ou à des protéines (Fortini *et al.* 2003). D'ailleurs, cela pourrait contribuer à la carcinogénèse, particulièrement lorsque les molécules réactives sont dérivées de produits chimiques exogènes, comme des pesticides.

Un grand nombre de polluants environnementaux pénètrent les cellules passivement, à cause de leur hydrophobicité, mais certains se lient à des récepteurs endogènes comme AhR. Les enzymes CYP1A1 et CYP1B1 sont des gènes cibles de ce récepteur, lorsqu'il est activé et qu'il agit comme facteur de transcription (Nebert et Dalton 2006). Ces deux enzymes ont pour substrat les hydrocarbures aromatiques halogénés qui activent AhR. Par contre, ils sont beaucoup moins efficacement métabolisés et ont une durée de vie qui peut s'étendre à des mois (Miniero *et al.* 2001, Shimada *et al.* 2004). Les CYP avec l'allèle *1 (comme CYP1A1) est considéré le phénotype le plus efficace métaboliquement. Les trois allèles CYP1A1 sont régulés par le récepteur AhR (Ingelman-Sundberg 2004).

La présence de plusieurs toxines environnementales va mener à une forte activation du récepteur AhR qui réprime les gènes cibles du récepteur à l'œstrogène. En présence d'œstradiol, cette situation cause l'augmentation du métabolisme de l'œstradiol (E2) et amène une situation où l'E2 peut être changé en 2-hydroxyœstradiol ou 4-hydroxyœstradiol par les enzymes CYP1A1 et CYP1B1 respectivement (Cribb *et al.* 2006). Le 4-hydroxyœstradiol est connu pour sa capacité à faire des adduits d'ADN et causer des mutations génétiques. Ce mécanisme peut donc favoriser le développement de cancers endocriniens. Le 2-OHE par contre n'a aucun effet néfaste connu sur la cellule, et peut même dans certains cas ralentir le cycle cellulaire (Tsuchiya *et al.* 2005, Martucci et Fishman 1993, L'Héritier *et al.* 2014). Pour résumer, un ratio favorisant le métabolisme de produits xénobiotiques par l'enzyme CYP1A1 au détriment de l'enzyme CYP1B1 est nettement plus favorable (Fig. 10). D'ailleurs, un haut ratio de CYP1B1/CYP1A1 est utilisé comme un marqueur pour certains types de cancers, comme celui cancer du sein (Liehr et Ricci 1996, Coumol *et al.* 2001). L'interaction croisée entre les deux facteurs de transcription pourrait être une couche de plus de protection contre

les effets néfastes potentiels des polluants qui s’y lient. Par contre, comme nous pouvons observer, cette interaction croisée favorise certaines réactions chimiques lorsqu’il y a une exposition à une vaste gamme de produits chimiques mélangés (Nebert et Dalton 2006).

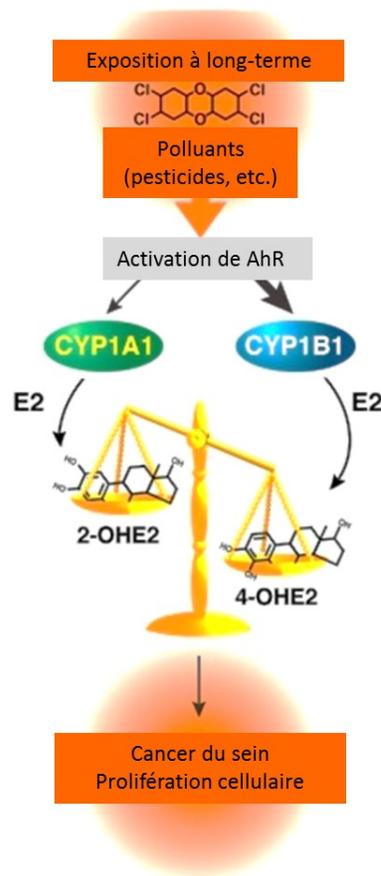


Figure 10: Modèle proposé pour l’initiation du cancer du sein par des polluants et des pesticides. (Modifiée de l’Héritier *et al.* 2014)

1.3. Le récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes (AR) a un rôle critique chez l’homme. Ce récepteur nucléaire régule la transcription des gènes via sa translocation au noyau et sa liaison aux éléments de réponses aux androgènes, en recrutant d’autres facteurs de transcription. Les récepteurs aux androgènes sont présents dans plusieurs tissus du corps, les organes sexuels, des tissus musculaires ainsi que dans le système nerveux central (Chang *et al.* 1995).

AR fait partie de la famille des récepteurs nucléaires d'hormones. Ses ligands sont l'hormone testostérone ainsi que son dérivé la dihydrotestostérone (DHT). Les androgènes sont produits par les cellules de Leydig dans les testicules, sous le contrôle de l'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse. La DHT est le produit de la testostérone métabolisée par l'enzyme 5- α -réductase, et elle est nécessaire pour la croissance et la survie des cellules prostatiques. Les androgènes sont des hormones importantes pour l'expression du phénotype mâle. Ils jouent un rôle dans la différenciation sexuelle, dans le développement et le contrôle des caractéristiques mâles secondaires ainsi que dans le maintien de la spermatogenèse (Hu *et al.* 2012).

La présence de ce récepteur dans plusieurs types de cellules fait en sorte que l'activité des gènes cible androgéniques est régulée de façon plus spécifique, car le ligand varie selon le tissu. La DHT active beaucoup plus le récepteur AR que la testostérone. Par exemple, dans le canal de Wolff, la testostérone se lie plus à AR que la DHT et va réguler les caractéristiques primaires masculines, alors que la dihydrotestostérone est le ligand principal dans les follicules capillaires, le sinus et le tubercule urogénital et régule plutôt les caractéristiques secondaires sexuelles mâles. Chez les femmes, le récepteur aux androgènes est essentiel pour la fertilité, car il contrôle le développement et le bon fonctionnement des follicules ovariens. En plus de ses fonctions reliées à la maturation sexuelle, le récepteur est important pour le maintien du squelette, la régulation du désir sexuel et de la poussée des poils (NIH Genetics Home Reference, Androgen Receptor).

Le récepteur aux androgènes fait partie de la famille des récepteurs hormonaux stéroïdiens, dont fait partie le récepteur de l'œstrogène (ER). Ce récepteur est un facteur de transcription ligand-dépendant qui régule l'expression de gènes spécifiques. Lorsque ses ligands naturels, la DHT ou la testostérone, s'y lient, ces gènes sont transcrits et cela mène à l'initiation et la différenciation des caractères sexuels mâles. Cette maturité sexuelle ne peut être atteinte sans androgènes et/ou sans récepteur aux androgènes fonctionnel. Par ailleurs, une perte de fonction complète d'AR cause le syndrome d'insensibilité aux androgènes ou SIA. Ce syndrome est associé avec une différenciation sexuelle problématique, due au mauvais fonctionnement ou à l'absence de ce récepteur. Une variété de symptômes sont associés à ce

syndrome allant d'hommes ayant des organes génitaux féminins, mais sans utérus à une absence de spermatozoïdes dans le sperme (Brinkmann, 2001).

1.3.1. Le gène et le récepteur AR

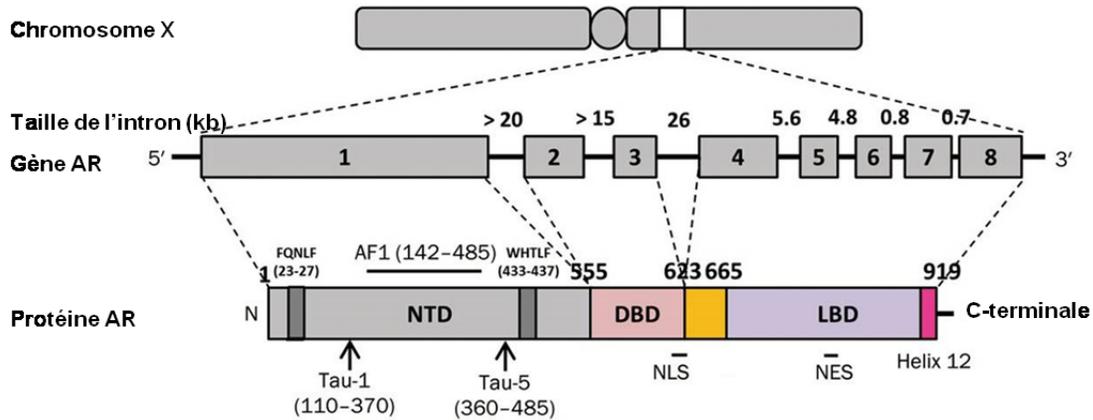


Figure 11: Le gène AR.

Le gène codant pour le récepteur aux androgènes se retrouve sur le chromosome X. Il contient 8 exons et code pour une protéine (le récepteur) consistant de trois domaines principaux: domaine N-terminal (NTD), domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison au ligand (LBD) (Modifiée de Tan *et al.* 2015).

Le gène codant pour le récepteur AR se situe sur le chromosome X au locus Xq11-Xq12. La protéine AR possède trois domaines fonctionnels principaux (Fig. 11) : le domaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine C-terminal de liaison au ligand (LBD). Le LBD est connecté au DBD par une région charnière flexible (Tan *et al.* 2015). La région NTD est très importante, car elle est requise pour une activité transcriptionnelle complète, tout particulièrement la partie avec la fonction d'activation 1 (AF-1) qui est constitutivement active. L'activité du récepteur AR est modulée par plusieurs facteurs de transcription comme le «androgen receptor activator» 70 (ARA70) (Lonergan et Tindall, 2011).

1.3.2. La signalisation du récepteur AR

La signalisation d'AR est similaire à la signalisation mentionnée dans le chapitre sur le récepteur AhR. Comme on peut bien voir sur la figure 11, la testostérone pénètre dans la cellule et peut soit directement se lier au récepteur AR, soit être métabolisée par la 5- α -réductase en DHT et ensuite se lier à AR dans le cytoplasme. AR est associé aux chaperonnes HSP90 et HSP70 dans le cytoplasme lorsqu'il n'y a pas de ligand. Lorsqu'il y a présence de testostérone ou de DHT, AR se dissocie de ses chaperonnes et son ligand va s'y attacher, permettant sa translocation dans le noyau. Le récepteur aux androgènes se dimérise et s'accroche aux éléments de réponse aux androgènes (ARE) dans la région du promoteur des gènes cibles comme *PSA* et *PCA3*. Au promoteur, le récepteur pourra recruter la machinerie de transcription ainsi que les coactivateurs et les corégulateurs. (Tan *et al.* 2015) Une variété de protéines peut coactiver AR, comme p300 et CREB binding protein (CBP) grâce à leur activité d'acétyl-transférases. Le récepteur peut aussi interagir avec des facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire Kappa-B (NF κ B) et la région sexe-déterminante Y (SRY) afin de réguler différemment la réponse aux androgènes. Mis à part la voie classique du récepteur qui vient d'être décrite, AR peut se lier avec d'autres récepteurs de la même famille, comme le récepteur aux œstrogènes (ER) et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) pour former un hétérodimère. Cela a pour effet d'inhiber son activité transcriptionnelle. Sans être liés au récepteur aux androgènes, les androgènes peuvent aussi avoir des effets rapides non-génomiques en causant l'induction d'une cascade de signalisation avec des messagers secondaires conventionnels, tels que l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) et la protéine kinase A (PKA). Ils peuvent aussi phosphoryler les coactivateurs et les corégulateurs de AR (Sabioscience, AR signalling). Les gènes *PSA* et *PCA3* sont des marqueurs importants de la signalisation du récepteur AR. Ils sont fortement induits lorsque ce récepteur est activé, particulièrement dans les cellules du cancer de la prostate. Le gène *PSA* est aussi connu sur le nom de kallikréine 3 (*KLK3*) qui est une protéase à sérine (Gene Cards, 2015). Il code pour la protéine « antigène prostatique spécifique », qui sert à rendre le sperme plus fluide pour faciliter le déplacement des spermatozoïdes. Cette protéine est célèbre grâce au test de PSA qui aide à détecter le cancer de la prostate précoce ou chez les hommes ayant des antécédents

familiaux. Ce test quantifie la présence de cette protéine libre par rapport à celle liée. Si le niveau de PSA libre dans l'urine est plus grand que 4ng/mL, cela indique une anormalité et le patient doit subir une biopsie. Il est important de noter que ce test est mitigé, car il n'est pas extrêmement précis. En effet, environ un homme sur quatre ayant un niveau de PSA anormal est vraiment atteint du cancer de la prostate. Par ailleurs, les niveaux de *PSA* varient momentanément selon l'activité physique, une activité sexuelle récente ou s'il y a une infection de la prostate (Cancer de la Prostate Canada, 2015).

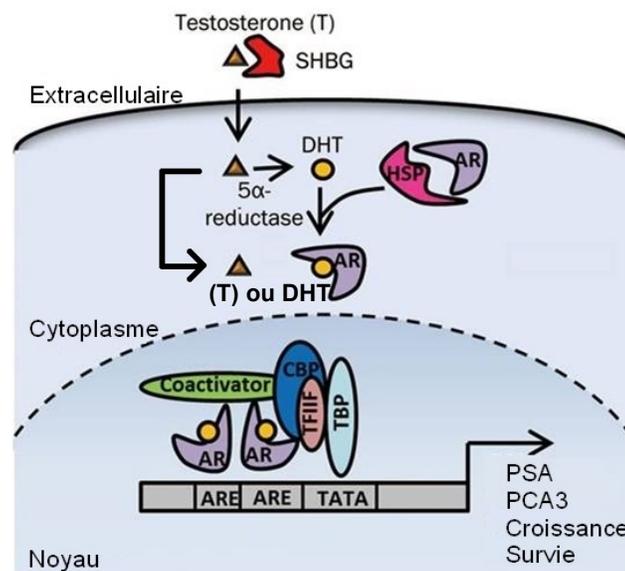


Figure 12: La voie de signalisation cellulaire du récepteur aux androgènes.

La testostérone peut lier directement AR dans le cytoplasme ou être métabolisée en dihydrotestostérone (DHT) pour lier le récepteur (Modifiée de Tan *et al.* 2015).

Le gène *PCA3* ou « antigène du cancer de la prostate 3 » exprime de l'ARN qui ne code pas pour une protéine, mais il est fortement exprimé lors d'un cancer de la prostate (Gene Cards, 2015). Il est utilisé surtout comme un biomarqueur, comme *PSA*. Il existe maintenant un test de *PCA3*, qui combine aussi le test *PSA* (Fig. 13). C'est est une grande avancée pour le diagnostic préliminaire du cancer de la prostate, car il minimise les cas de biopsie de la prostate n'étant pas nécessaires dus à un résultat faux-positif avec le test *PSA* (Prensner et Chinnaiyan, 2011).

1.3.3. Le récepteur aux androgènes et le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le plus commun chez les hommes au Canada. D'ailleurs, selon la Société du Cancer de la Prostate du Canada, un homme sur sept risque d'être diagnostiqué au courant de sa vie. Comme tout autre cancer, il s'agit d'une perte de contrôle de la croissance et de la division cellulaire, mais au niveau des cellules prostatiques. La prostate est une glande du système reproducteur masculin, qui produit des nutriments et le liquide facilitant le transport du sperme. Le rôle de AR dans le développement du cancer de la prostate a été la raison derrière l'engouement de la communauté scientifique à son égard, étant donné que les hommes y sont très susceptibles (Société du Cancer de la Prostate du Canada, 2015).

Il est important de noter que les cellules de la prostate sont positives pour le récepteur aux androgènes, car elles répondent à la testostérone pour leur croissance, que ce soit pour des cellules saines ou cancéreuses. Étant donné qu'il est un des principaux régulateurs avec les androgènes de la croissance cellulaire, il y a beaucoup de recherche par rapport à l'implication d'AR dans le développement du cancer de la prostate. Certaines mutations dans AR prédisposent certains hommes au cancer de la prostate. Lors du développement de ce cancer, des voies de signalisation dépendantes d'AR deviennent plus autonomes en répondant à des facteurs de transcription autres capables de réguler la progression du cycle cellulaire (Tan *et al.* 2015). Malgré cela, AR demeure le maître de la régulation du cancer de la prostate. Cela explique pourquoi une multitude de méthodes supprimant les androgènes sont utilisées pour traiter le cancer de la prostate. D'ailleurs, il y a plus de soixante-dix ans déjà, Dr. Huggings avait démontré qu'éliminer les testicules pour priver l'organisme d'androgènes amenait une régression du cancer de la prostate (Huggings *et al.* 1925).

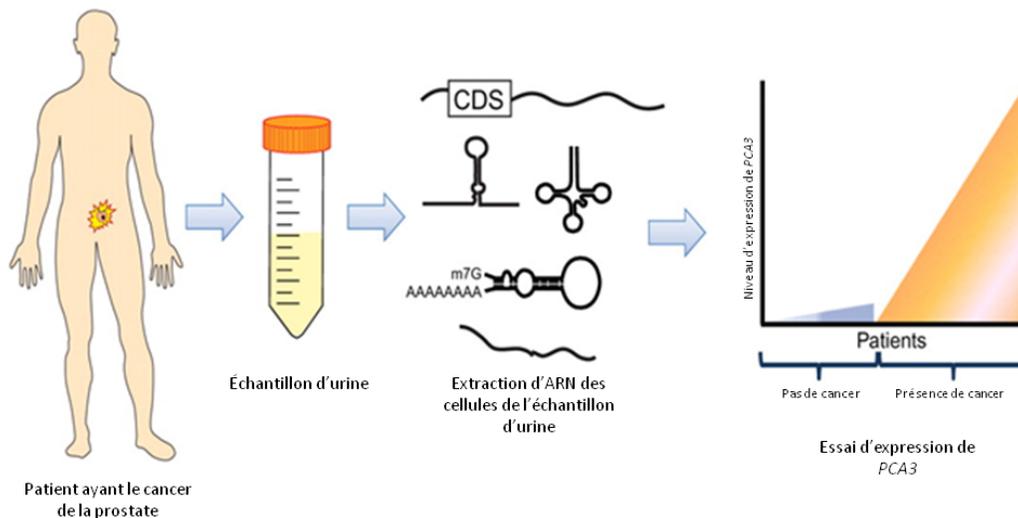


Figure 13: Test de PCA3 afin de dépister le cancer de la prostate.

Il s'agit d'un essai d'expression afin de quantifier l'expression de l'ARN messager de PCA3 dans l'urine (Modifiée de Prensner et Chinnaiyan, 2011).

1.4. Hypothèse

Les pesticides ont été pointés du doigt comme étant de potentiels perturbateurs endocriniens (Martenies et Perry 2013). Nous suspectons qu'une exposition environnementale à nos deux pesticides d'intérêt, le MCPA et l'imidaclopride, pourrait engendrer de telles perturbations sur l'être humain. Plusieurs études ont déjà été faites pour identifier l'effet d'autres pesticides sur l'humain, mais peu ont exploré les herbicides phénoxy et les néonicotinoïdes au niveau cellulaire. De plus, il est important de comprendre comment ces pesticides, présents dans notre environnement et fréquemment détectés dans l'eau du Québec, peuvent avoir un effet sur notre santé à long terme (Giroux 2015). Notre hypothèse est que l'exposition de cellules humaines à l'imidaclopride ou au MCPA résultera en une perturbation de la voie de signalisation du récepteur AhR et celle du récepteur AR. Nous allons donc exposer des cellules du cancer du sein ainsi que des cellules du cancer de la prostate à une variété de concentration de ces deux pesticides, afin de voir s'ils mènent à un dérèglement au niveau de ces deux voies de signalisation. Il faut rappeler l'importance du récepteur à la dioxine (AhR), car il est nécessaire pour le métabolisme des xénobiotiques, tels que les pesticides, en activant les gènes *CYP*, codant pour des enzymes détoxifiantes comme *CYP1A1* et *CYP1B1*. Cette étape est

importante à vérifier, car une perturbation de la voie de signalisation d'AhR pourrait résulter en un déséquilibre des enzymes exprimées. Une accumulation de métabolites génotoxiques pourrait en être la conséquence dans un contexte de cellules répondant à l'œstrogène (L'Héritier *et al.* 2014). Il sera donc pertinent de suivre l'expression génique des CYP afin de déduire si les pesticides peuvent déréguler AhR de façon à amener le déséquilibre mentionné plus haut.

Du côté du récepteur aux androgènes (AR), un dérèglement de cette voie signifierait des problèmes au niveau du développement de caractères masculins, ce qui serait évidemment néfaste. D'ailleurs, plusieurs études ont noté que certains pesticides peuvent imiter des hormones mâles ou causer des dommages aux testicules et mettre la santé des hommes en danger (Dohle *et al.* 2003). De plus, des problèmes liés au sperme ont déjà été associés à une exposition à certains pesticides. Dans ces cas, la qualité du sperme avait été affectée en se traduisant par une concentration plus faible de spermatozoïdes, par des problèmes de motilité de ces derniers ou par le volume total du sperme. Nous avons donc observé l'expression des gènes cibles du récepteur AR, *PSA* et *PCA3*, afin de vérifier s'il y a un effet au niveau cellulaire et moléculaire du MCPA ou de l'imidaclopride.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. Réactifs et produits chimiques

La 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) a été obtenue des Laboratoires Cerilliant Cambridge isotope (catalogue #ED-901-C). L'œstradiol (E2), l'imidaclopride (IMI), la dihydrotestostérone (DHT), le MCPA, le 4-hydroxyœstradiol (4OHE) et l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) ont été achetés de Sigma-Aldrich (catalogue #E2758, #37894, #D-073, #45555, #H4637 et #324817 respectivement). Le MCPA Amine 600 de la compagnie NuFarm a été obtenu à la ferme agricole.

2.2. Essais de croissance de levure (spot test)

Les souches de levures utilisées étaient les suivantes : W303 (Sauvage), BY4741 (Sauvage), DGY13 (*htz.1Δ* de W303), 1703 (*htz.1Δ* de BY4741), HWY11 (*rad52Δ*), JPYAA4 (*mec1Δ sml1Δ*), HWYG19 (*rad53Δ sml1Δ*). Lorsque les cellules sont à 1 O.D., nous avons fait des dilutions en séries avec un facteur de 1/10. Ensuite, nous avons placé des gouttes de 2μL sur des pétri ayant du milieu YPD mélangé avec du AMPA (0.05mM, 0.5mM et 5mM), MCPA (20μM (Sigma) ou 4μM (Nufarm)), 4-OHE (10nM, 100nM et 1μM) ou de l'imidaclopride (4μM, 14μM). Nous avons laissé pousser 24h et observé la croissance des levures.

2.3. Culture cellulaire et traitements

Les MCF7, T47D, LNCaP et VCaP sont des lignées cellulaires de la American Type Culture Collection (ATCC) maintenues dans du milieu DMEM (Wisent) contenant du sérum fœtal bovin à 10% (FBS) et des antibiotiques. Pour toutes les expériences, les cellules ont poussé dans du milieu DMEM sans rouge phénol contenant du FBS avec du charbon activé à 10% et

des antibiotiques pour trois jours et traitées avec différentes combinaisons de produits. Pour les essais d'expression, nous avons traité les cellules pour 24h avec 10 nM TCDD, 0 ou 100 nM d'E2 (pour les cellules MCF7 et T47D) ou de DHT (LNCaP et VCaP), et plusieurs concentrations d'un des deux pesticides, MCPA (0,75mM; 1,5mM ou 3mM) ou imidaclopride (2µM, 20µM ou 200µM).

2.4. Isolation de l'ARN et PCR avec transcriptase inverse

Les cellules étaient dans des pétris de culture de 6 puits à une densité de 0.5×10^6 cellules par puit. Après 24h, les cellules étaient lavées deux fois au PBS et mises en milieu sans hormones pour deux jours. Ensuite, elles étaient incubées pour 24h avec le traitement aux pesticides en présence ou absence d'œstradiol pour les cellules du cancer du sein ou de dihydrotestostérone pour les cellules du cancer de la prostate. L'ARN total a été extrait avec EZ-10 DNA-Away RNA Mini-Prep Kit. L'ADN complémentaire a été synthétisé en utilisant la MMLV-RT (Enzymatics).

2.5. PCR en temps réel quantitatif

L'ADN synthétisé est dilué 1:8 et 5µM est utilisé par réaction. Le PCR quantitatif est fait avec un mélange de 2X mix avec du Vert SYBR, 2 mM de MgCl₂, et de la Taq polymérase maison. Nous utilisons les amorces pour le qPCR présentées dans le tableau 1 plus bas.

2.6. Immunobuvardage de type Western

Les cellules étaient lavées au PBS, rassemblées et resuspendues dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.2% SDS) pour les expériences d'immunobuvardage de type western avec des extraits complets cellulaires. Elles étaient ensuite passées à travers une aiguille 23G1. La lyse se faisait à 4°C pour une heure avec agitation continue, suivie d'une centrifugation à 14000 rotations par minute (rpm) pour récolter le lysat. Les anticorps utilisés sont présents dans le tableau 2.

Tableau 1 : Les amorces utilisées pour les essais d'expression des gènes en q-RT-PCR

Nom de l'amorce	Fwd 5'-3'	Rev 5'-3'
36B4	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	ATCTGCTGCATCTGCTTG
AhR	CAGATGCTTTGGTCTTTTATGC	GAAATTCAGCTCGGTCTTCG
CYP 1A1	TGAACCCCAGGGTACAGAGA	GGCCTCCATATAGGGCAGAT
CYP 1B1	AACGTACCGGCCACTATCAC	CCACGACCTGATCCAATTCT
GREB1	CGTTGGAAATGGAGACAAGC	CTCTGCCTGAAGGATGCTGT
TFF1	GTCCCCTGGTGCTTCTATCC	GCAGATCCCTGCAGAAGTGT
PSA	TGTGTGCTGGACGCTGGA	CACTGCCCCATGACGTGAT
PCA3	ATCGACGGCACTTTCTGAGT	GTGCTTCCTTCCTTTTGTGCTTCC

Tableau 2 : Les anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western pour les essais semi-quantitatifs de détection de protéines

Nom de l'anticorps	Provenance	# de catalogue	Anticorps secondaire
Actine (primaire)	Sigma Aldrich	A2066	anti-lapin
AR (primaire)	Santa Cruz Biotechnologies	sc-816	anti-lapin
AhR (primaire)	Santa Cruz Biotechnologies	sc-5579	anti-lapin
CYP 1A1 (primaire)	Santa Cruz Biotechnologies	sc-20772	anti-lapin
CYP 1B1 (primaire)	Santa Cruz Biotechnologies	sc-32882	anti-lapin
Anti-lapin (secondaire)	Sigma Aldrich	A0545	N/A

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1. Tests de croissance de levures exposées aux pesticides

Nous avons débuté par un test de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, sur un milieu riche (YPD) auquel nous avons ajouté différents agents afin de voir s'ils pouvaient altérer la croissance de levures sauvages ou mutées. Nous avons mélangé des pesticides, le MCPA ou l'imidaclopride, des dérivés de pesticides, comme l'AMPA, ainsi que des métabolites génotoxiques comme le 4-hydroxyœstradiol, un produit secondaire du métabolisme de l'E2.

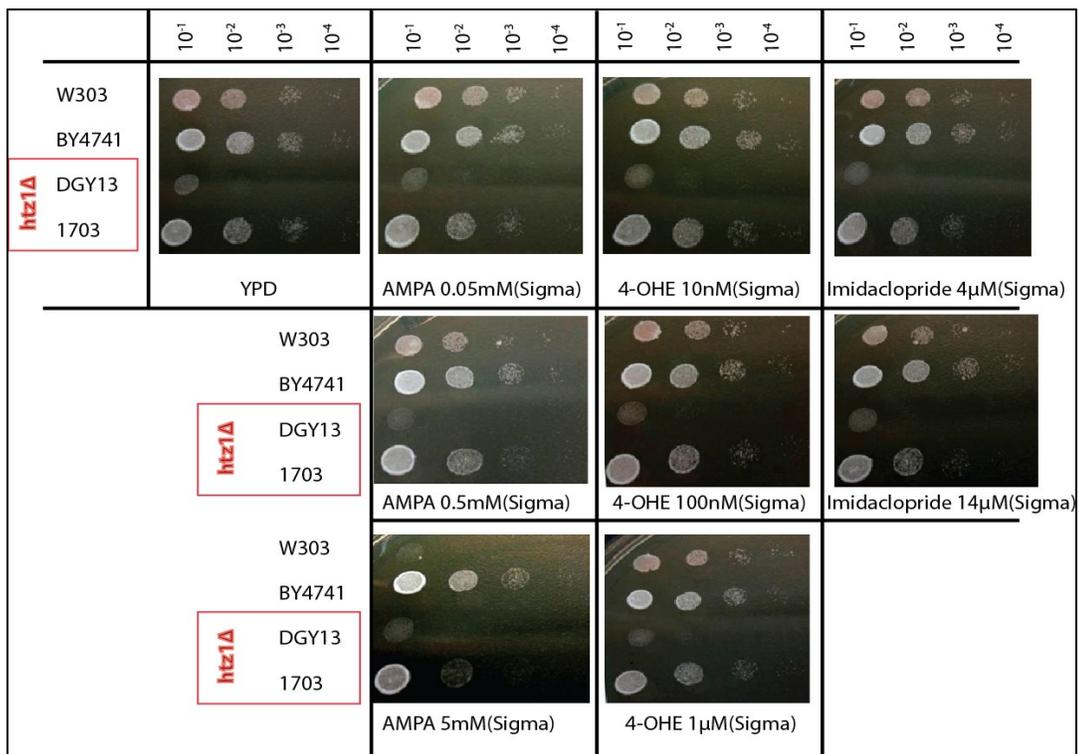


Figure 14: Spot tests de levures.

Exposition de deux souches de levures sauvages (W303 et BY4741) ainsi que leurs mutants h2a.z respectifs (DGY13 et 1703) à un pesticide (imidaclopride), un dérivé de pesticide (AMPA, dérivé du glyphosate) et un métabolite génotoxique (4-hydroxyœstradiol).

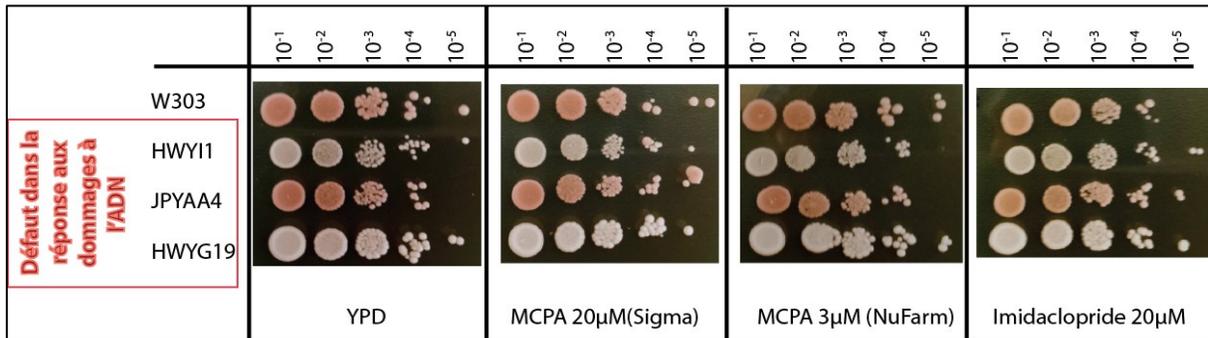


Figure 15 : Spot tests de levures ayant des défauts dans leur réponse aux dommages de l'ADN.

Exposition d'une souche sauvage de levure (W303), ainsi que des souches mutées (HWY11, JPYAA4 et HWYG19) aux pesticides MCPA et imidaclopride. Les souches encadrées de rouge ont des défauts dans leur réponse de dommage à l'ADN.

Notre but était de voir s'il était possible de voir un effet direct sur la croissance des levures suite à leur exposition à ces produits. Comme nous pouvons voir sur la figure 14, nous avons testé un gradient de concentrations à partir de ce qui a été détecté dans l'eau (pesticides et dérivé de pesticides) du Québec (Giroux I, 2015). Pour le 4-hydroxyœstradiol, nous avons essayé des concentrations ressemblant à celles utilisées lors des traitements de cellules à l'œstradiol. Les deux souches sauvages de levures semblent croître normalement sur le milieu complet YPD. La souche DGY13 qui est mutée au gène *htz.1* semble avoir des problèmes de croissance, mais pas 1703 qui a aussi une mutation à *htz.1*. Lorsque ces souches poussent sur les milieux contenant de l'AMPA, un dérivé du glyphosate, l'herbicide contenu dans le RoundUp, nous ne voyons pas de différence dans leur croissance à toutes les concentrations sauf la plus forte (5mM). À cette dose extrêmement forte, nous pouvons observer que la souche sauvage W303 ne croît plus, mais aussi les deux souches mutées pour *htz.1*. Les cellules de levures exposées au 4-hydroxyœstradiol ne semblent pas être affectées par ce métabolite de l'œstradiol. Leur croissance est comparable à celle sur le milieu YPD pour toutes les doses de 4-OHE auxquelles elles sont soumises. Nous avons aussi fait pousser les quatre souches de levures (Fig. 14) sur le milieu complet supplémenté avec de l'imidaclopride. La présence du néonicotinoïde, tout comme celle du 4-hydroxyœstradiol, ne semble pas affecter la croissance de levures aux concentrations de 4µM et 14µM. Les images présentées en figure 15 montrent le témoin négatif ainsi que les quatre conditions aux concentrations

maximales, c'est-à-dire 20µM de MCPA et 20µM d'imidaclopride obtenus de Sigma-Aldrich puis 3µM de MCPA Amine 600 obtenu de NuFarm. Cette fois ci nous avons repris notre souche sauvage W303, mais aussi utilisé trois différentes souches obtenues du laboratoire du Dr. Wurtele à l'Université de Montréal: HWYI1 (rad52Δ), JPYAA4 (mec1Δ sml1Δ) et HWYG19 (rad53Δ sml1Δ). Un patron similaire à celui de la croissance des quatre souches est dressé pour toutes les conditions. Les cellules, sauvages ou mutées, ont pu croître normalement sur le milieu YPD ou le même milieu avec les pesticides ajoutés. À la concentration la plus basse de cellules, nous voyons que parfois il n'y a pas de croissance, mais cela est dû à des erreurs de manipulation et de préparation d'échantillons.

3.2. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement d'imidaclopride

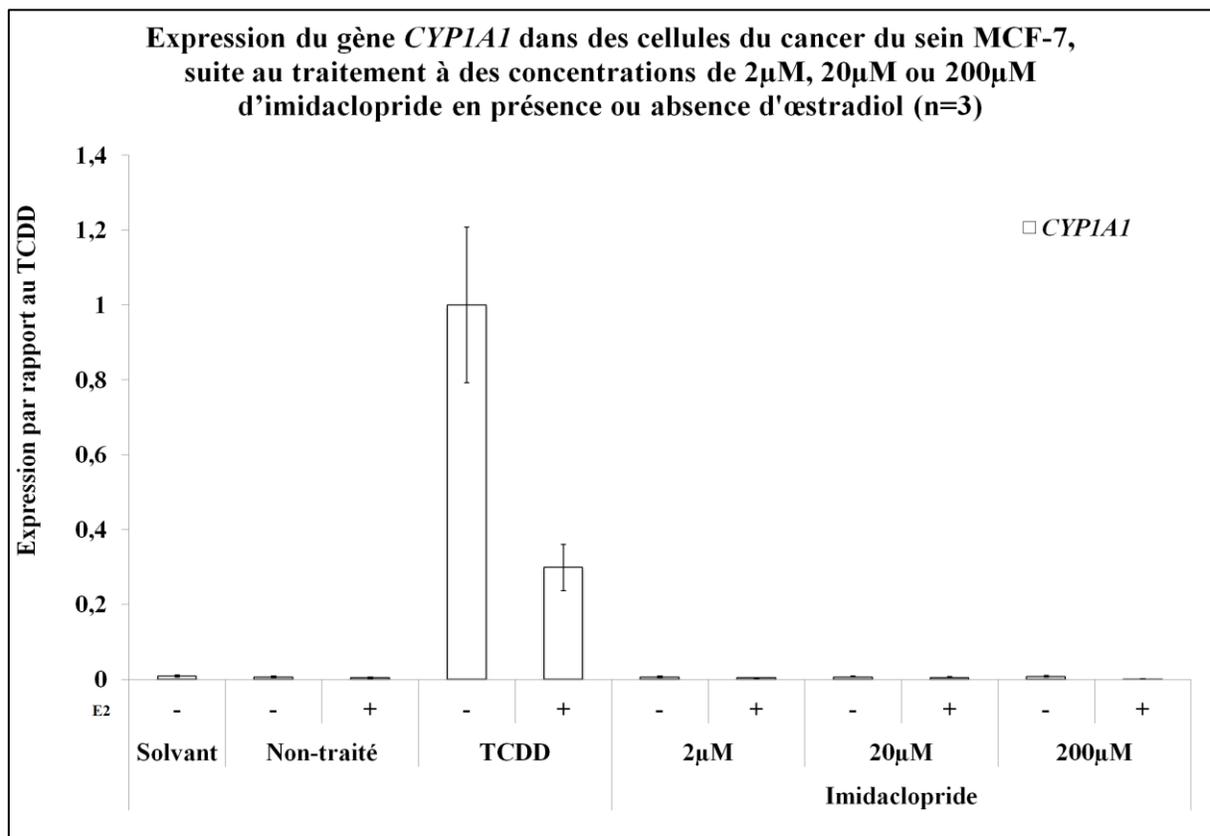


Figure 16 : Expression du gène *CYP1A1* dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 2µM, 20µM ou 200µM d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol.

Nous avons entamé avec les tests avec les cellules MCF-7 et l'imidaclopride en ingrédient actif seul. Afin de voir si le pesticide perturbe la voie AhR, nous suivions l'expression des gènes cibles du récepteur. Comme on peut voir en figure 16, l'expression du gène *CYP1A1* est presque nulle lors du traitement avec le solvant (dans lequel est dilué l'imidaclopride, de même que l'œstradiol). Avec ou sans œstradiol, l'expression demeure extrêmement faible dans les échantillons non-traités. Par contre, lors du traitement au TCDD, on perçoit une grande expression du gène cible, qui diminue à presque 40% lorsqu'il y a traitement à la dioxine et à l'œstradiol. L'imidaclopride, avec ou sans œstradiol, semble induire *CYP1A1* de façon comparable aux témoins négatifs (solvant et non-traité).

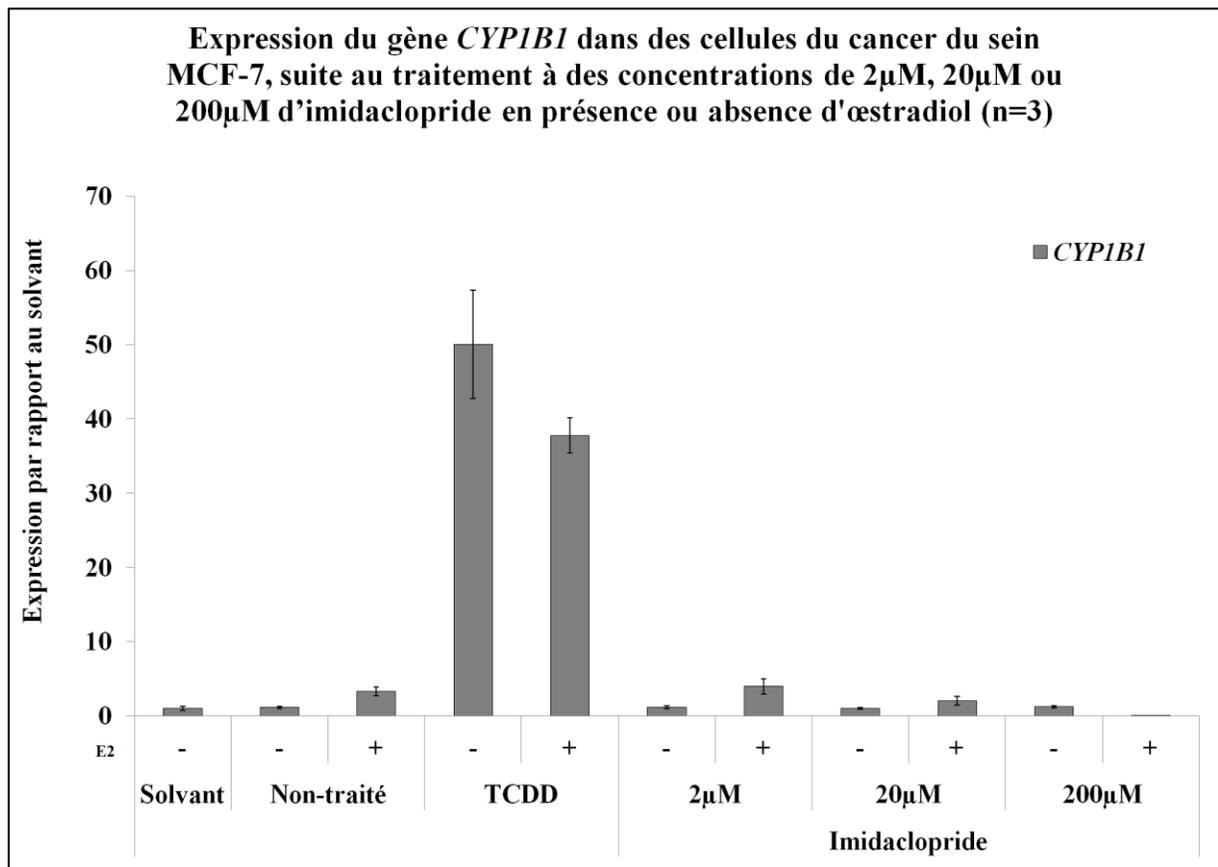


Figure 17: Expression du gène *CYP1B1* dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 2µM, 20µM ou 200µM d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol.

Comme mentionné dans l'introduction, c'est la balance de l'expression des enzymes CYP1A1 à CYP1B1 qui nous intéresse particulièrement. De ce fait, nous avons examiné l'expression de *CYP1B1* par rapport au solvant en figure 17. Nous observons l'expression de *CYP1B1* par rapport au solvant. Sans surprise, nous voyons que lorsque les cellules MCF7 sont traitées au TCDD sans œstradiol, on peut voir une expression de presque 50 fois plus que dans l'échantillon non-traité, mais qui diminue lors de l'ajout de l'œstradiol pour ces deux traitements. Il demeure que ces niveaux d'expression sont nettement plus forts que l'expression sans traitement. Encore une fois, comme pour l'expression de *CYP1A1*, l'expression de *CYP1B1* est comparable à l'échantillon non-traité et au solvant lorsqu'il y a un traitement à 2, 20 ou même 200µM d'imidaclopride.

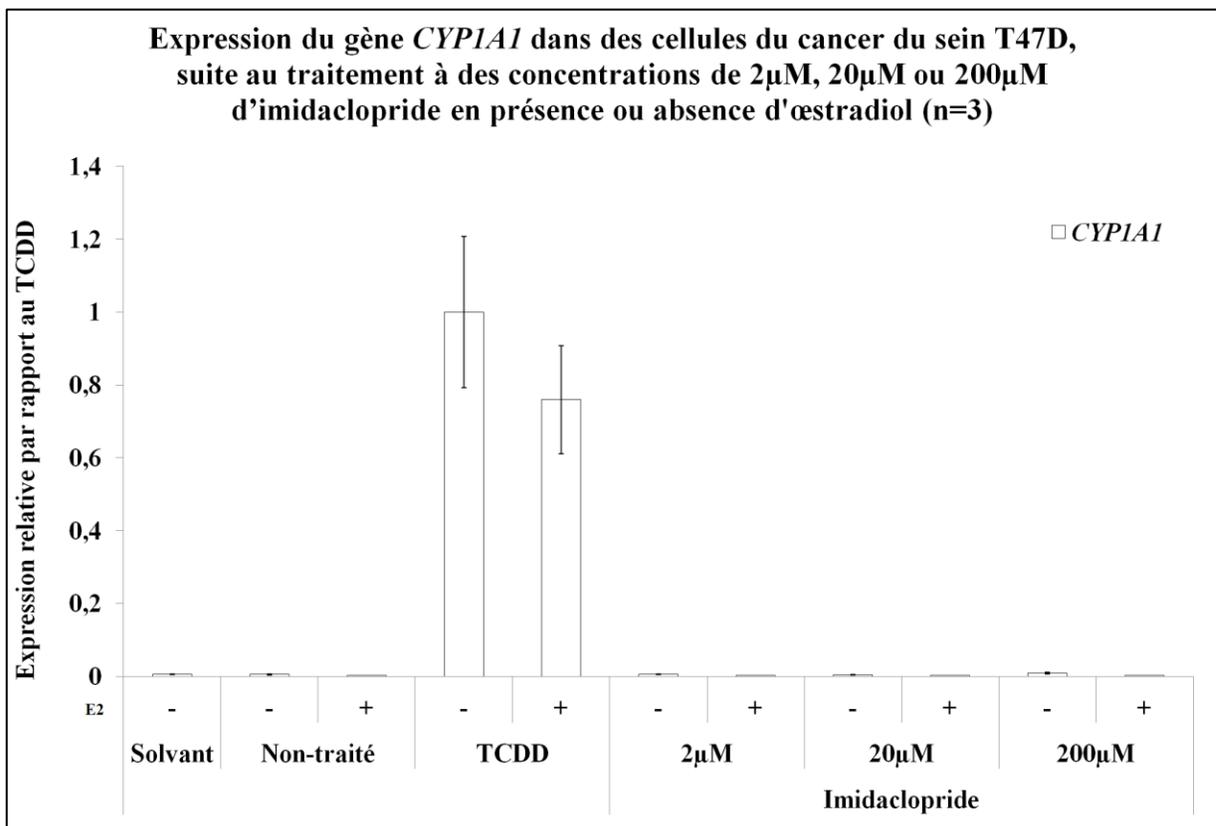


Figure 18: Expression du gène *CYP1A1* dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 2µM, 20µM ou 200µM d'imidaclopride en présence d'imidaclopride ou absence d'œstradiol.

Il semblerait donc que l'ingrédient actif de ce pesticide n'affecte pas l'expression de *CYP1A1* ni *CYP1B1* de façon significative à ces doses-là. Afin de confirmer ces résultats, nous avons reproduit cette expérience dans une autre lignée de cellulaire du cancer du sein, les T47D. L'expression de *CYP1A1* (Fig. 17) dans les T47D suivant le traitement de 24h aux mêmes concentrations d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol était aussi faible que celle des échantillons traités au solvant ou non-traité. Le TCDD activait très fortement l'expression du gène cible mais l'ajout d'œstradiol affectait moins la baisse de l'expression que dans les cellules MCF-7. Par rapport à *CYP1B1* (Fig. 19), de nouveau, les résultats coïncident entre les deux lignées cellulaires, avec des expressions plus fortes du gène cible lors du traitement avec la dioxine mais demeurant stable pour toutes les autres conditions.

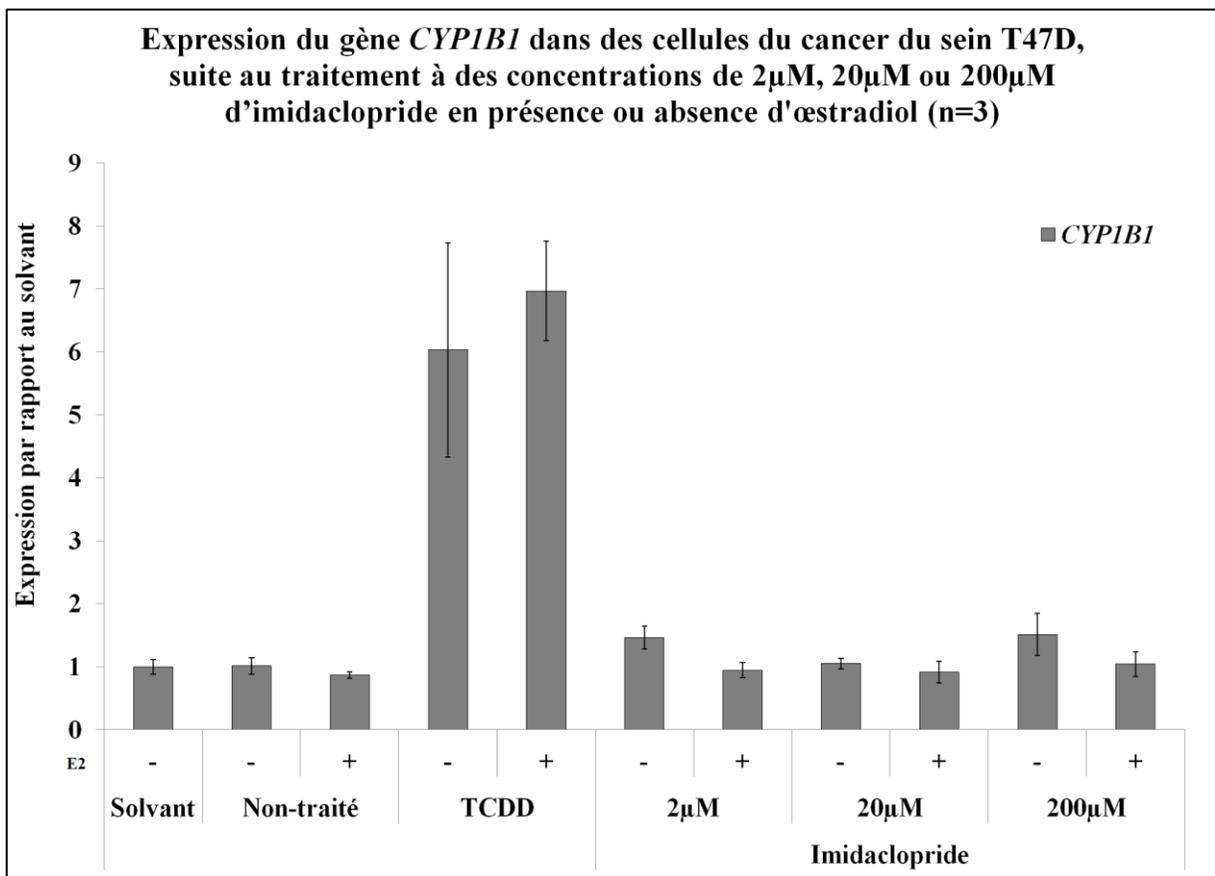


Figure 19: Expression du gène *CYP1B1* dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 2µM, 20µM ou 200µM d'imidaclopride en présence ou absence d'œstradiol.

L'échelle d'expression était aussi moins grande dans la lignée cellulaire des T47D, mais cela est sûrement dû à des différences dans le métabolisme de ces cellules.

3.3. Expression des gènes cible de la voie du récepteur AR suite au traitement d'imidaclopride

Nous avons poursuivi nos expériences avec l'imidaclopride mais sur les cellules du cancer de la prostate, afin de voir s'il pouvait causer une disruption à la voie de signalisation du récepteur aux androgènes.

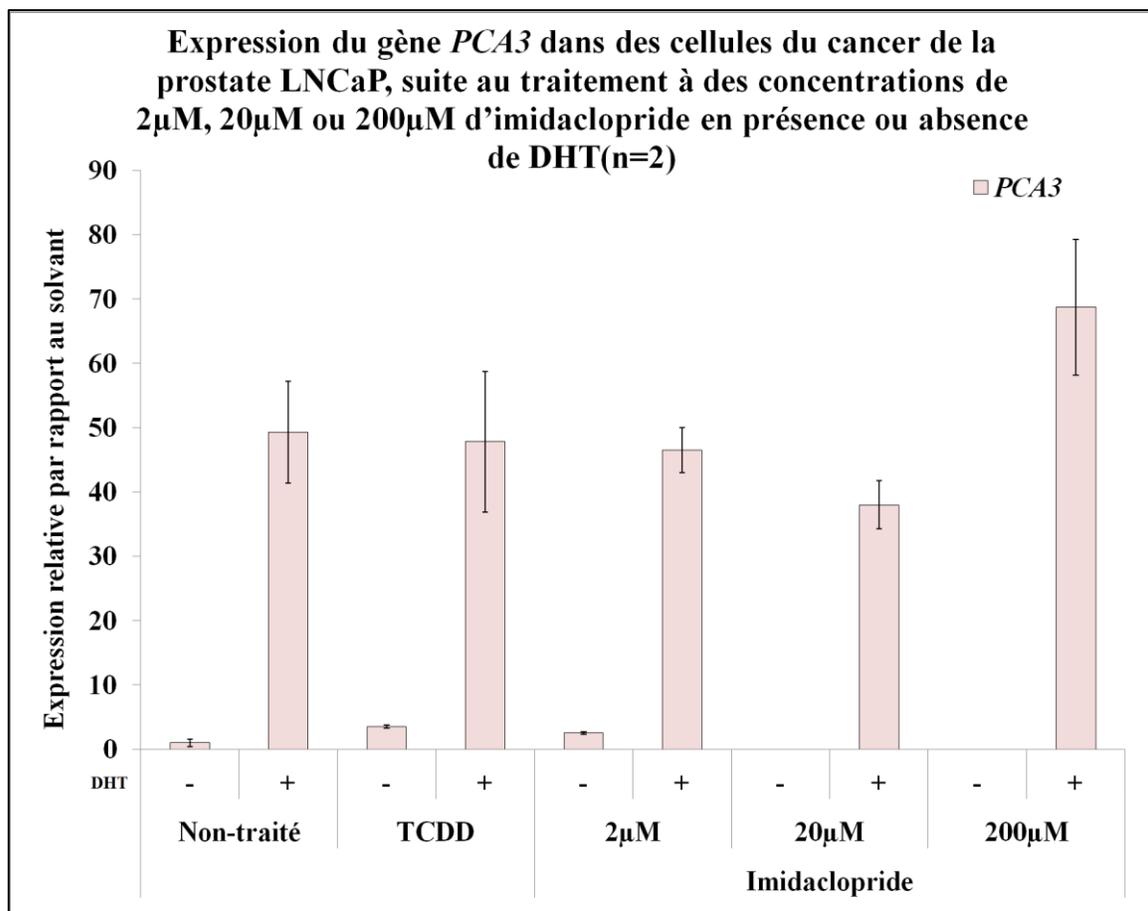


Figure 20 : Expression du gène *PCA3* dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 2µM, 20µM ou 200µM d'imidaclopride en présence ou absence de DHT.

Pour ce faire, nous suivions les changements dans l'expression de deux gènes AR dépendants, *PCA3* et *PSA*. En figure 20 et 21, nous pouvons voir l'expression de ces deux gènes cibles dans les cellules LNCaP, des cellules du cancer de la prostate. Elles ont été soumises à des traitements au TCDD, ainsi qu'au même gradient de concentrations d'imidaclopride utilisé auparavant sur les cellules du cancer du sein. Les cellules étaient soit en présence ou en absence de dihydrotestostérone, qui active la voie du récepteur AR. Sans surprise, la première remarque à faire est que nos gènes cibles sont tous deux nettement plus exprimés dans les cellules lorsqu'il y a ajout de DHT (témoin positif). De plus, il ne semble pas avoir de variabilité entre les expressions selon les traitements.

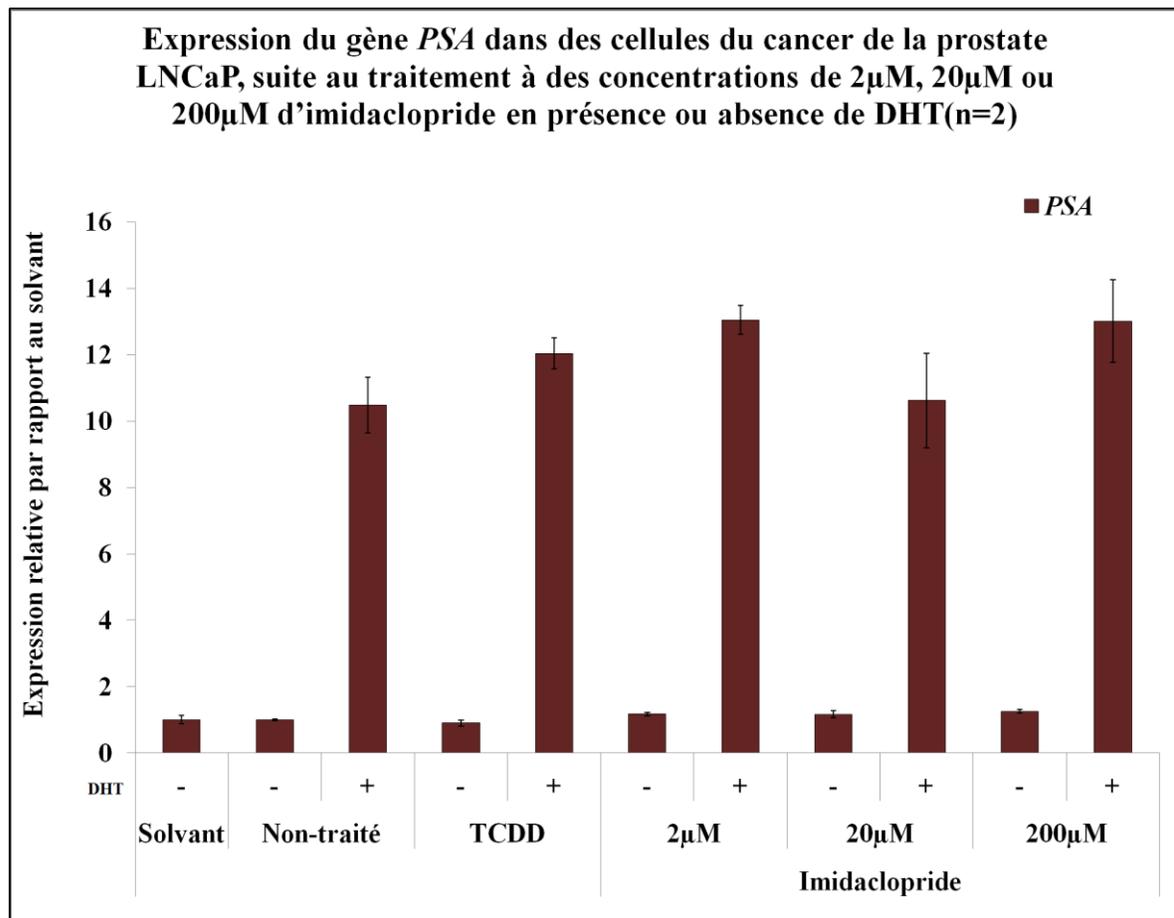


Figure 21: Expression du gène *PSA* dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 2µM, 20µM ou 200µM en présence ou absence de DHT.

Pour *PCA3* et *PSA*, l'expression sans DHT se situe à un niveau semblable à l'échantillon non-traité. On voit que *PCA3* est nettement plus exprimé à presque 60 fois par rapport au non-traité lorsqu'il y a ajout de l'hormone, alors que *PSA* se situe plus à une quinzaine de fois l'expression de base. À toutes doses de pesticide, les expressions se situent dans les mêmes intervalles. Il faut noter que nous ne sommes pas arrivés à détecter l'expression de *PCA3* pour les conditions de 20 et 200 μ M d'imidaclopride sans DHT. L'expression de ce gène était trop faible pour que l'on puisse la détecter, avec différents échantillons, testés à plusieurs reprises.

3.4. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA

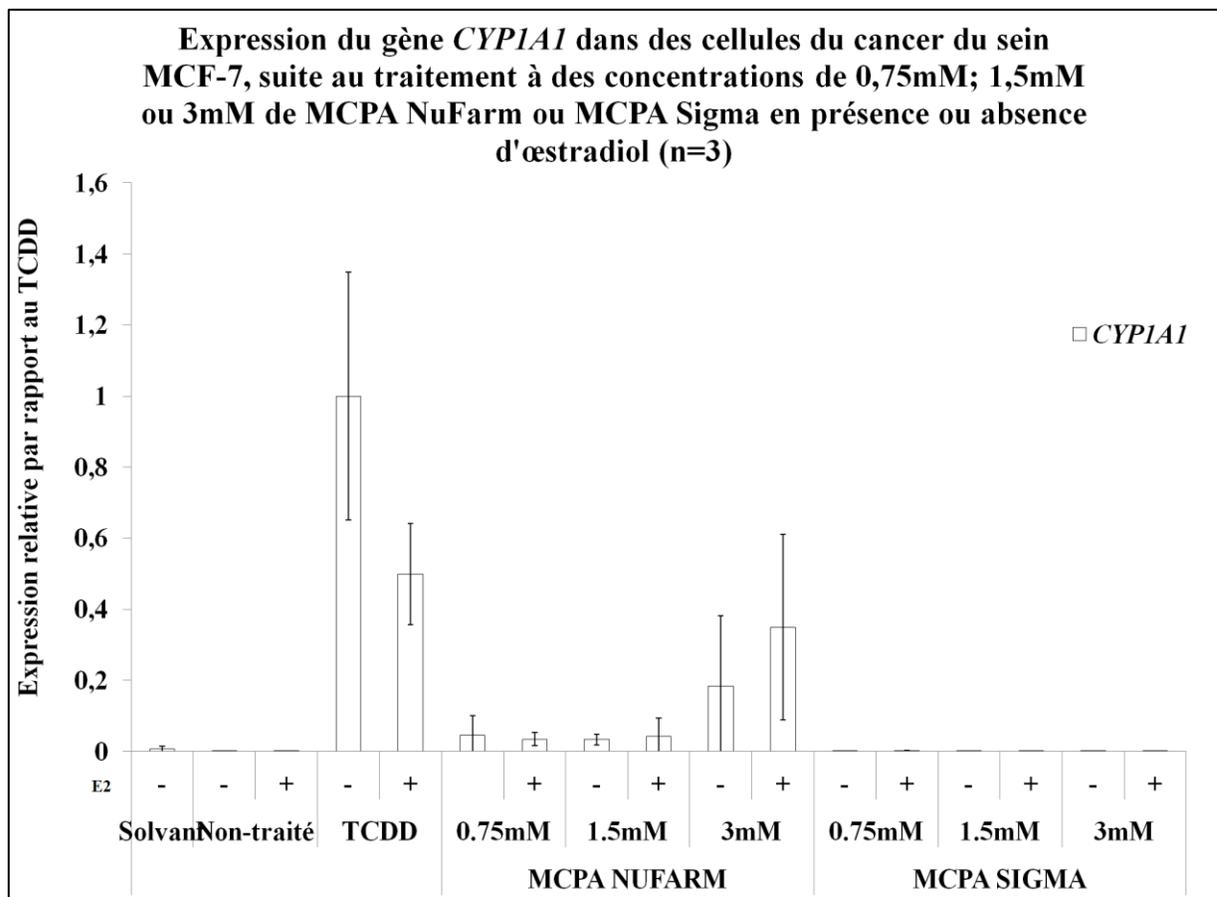


Figure 22: Expression du gène *CYP1A1* dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

Nous avons poursuivi les tests avec le second pesticide, l'herbicide MCPA. D'anciens membres du laboratoire avaient déjà eu des résultats préliminaires avec ce pesticide soupçonnant sa capacité à affecter la voie de signalisation du récepteur aux xénobiotiques AhR. Nous avons pu obtenir ce pesticide dans sa forme simple d'ingrédient actif de chez Sigma-Aldrich, mais aussi sa formulation complète utilisée dans les champs de la province. Comme avec l'imidaclopride, nous avons donc commencé nos expériences sur les cellules MCF-7.

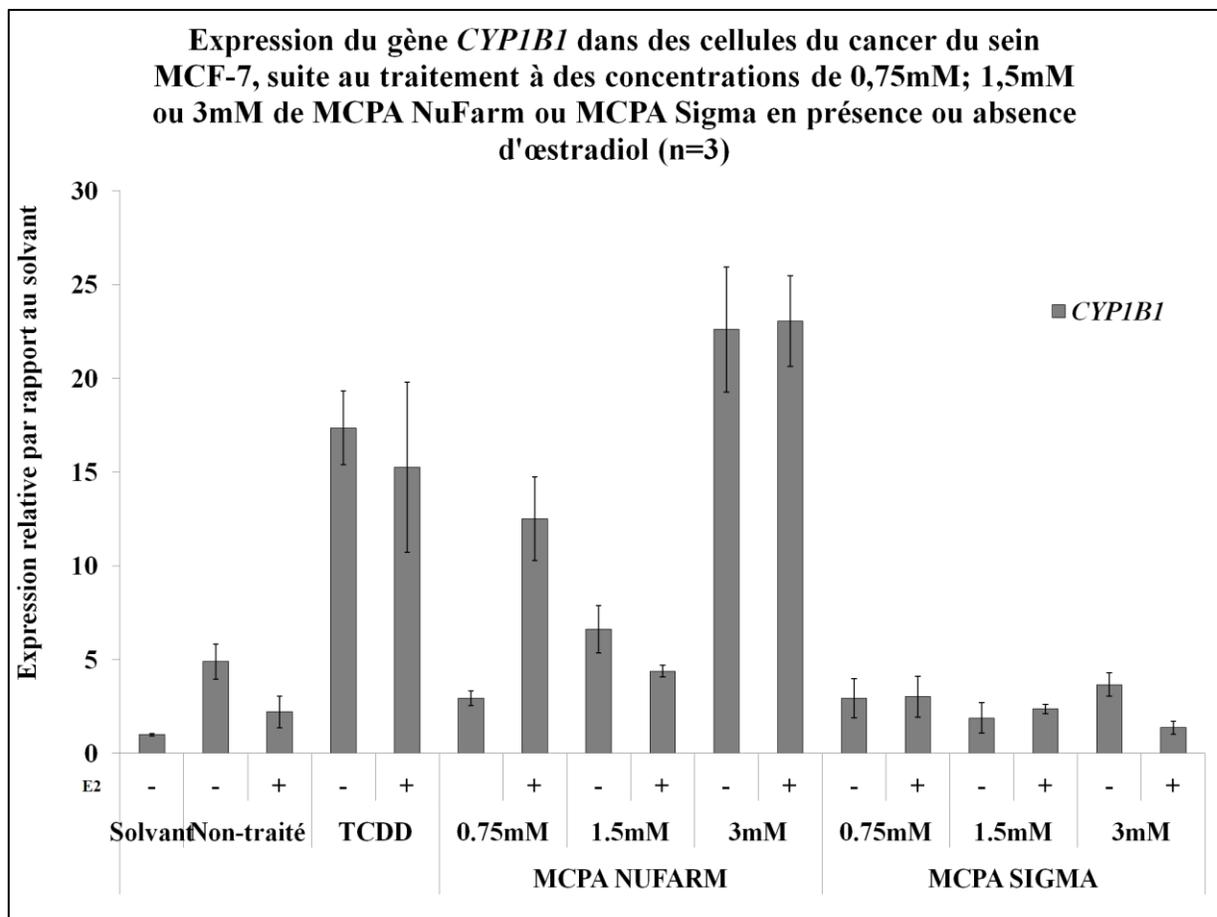


Figure 23: Expression du gène *CYP1B1* dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

Nous avons établi des concentrations équivalentes pour le pesticide « complet » qu'on appelle MCPA NuFarm et le pesticide comme ingrédient actif seul qu'on nomme MCPA Sigma. Nous avons examiné à nouveau l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation de AhR à commencer par *CYP1A1*, en figure 22. Comme auparavant, nous observons son expression par rapport au témoin positif qu'est le TCDD. On peut noter que l'expression est presque nulle pour le solvant, les échantillons non-traités ainsi que toutes les concentrations de MCPA Sigma, avec ou sans œstradiol. Ce qui est intrigant est l'expression de *CYP1A1* qui est plus forte que les témoins négatifs sans la présence de l'œstradiol, mais surtout son expression à la plus forte concentration de la formulation complète. À 3mM, on voit que les niveaux d'expression se rapprochent de ceux du TCDD en présence d'œstradiol.

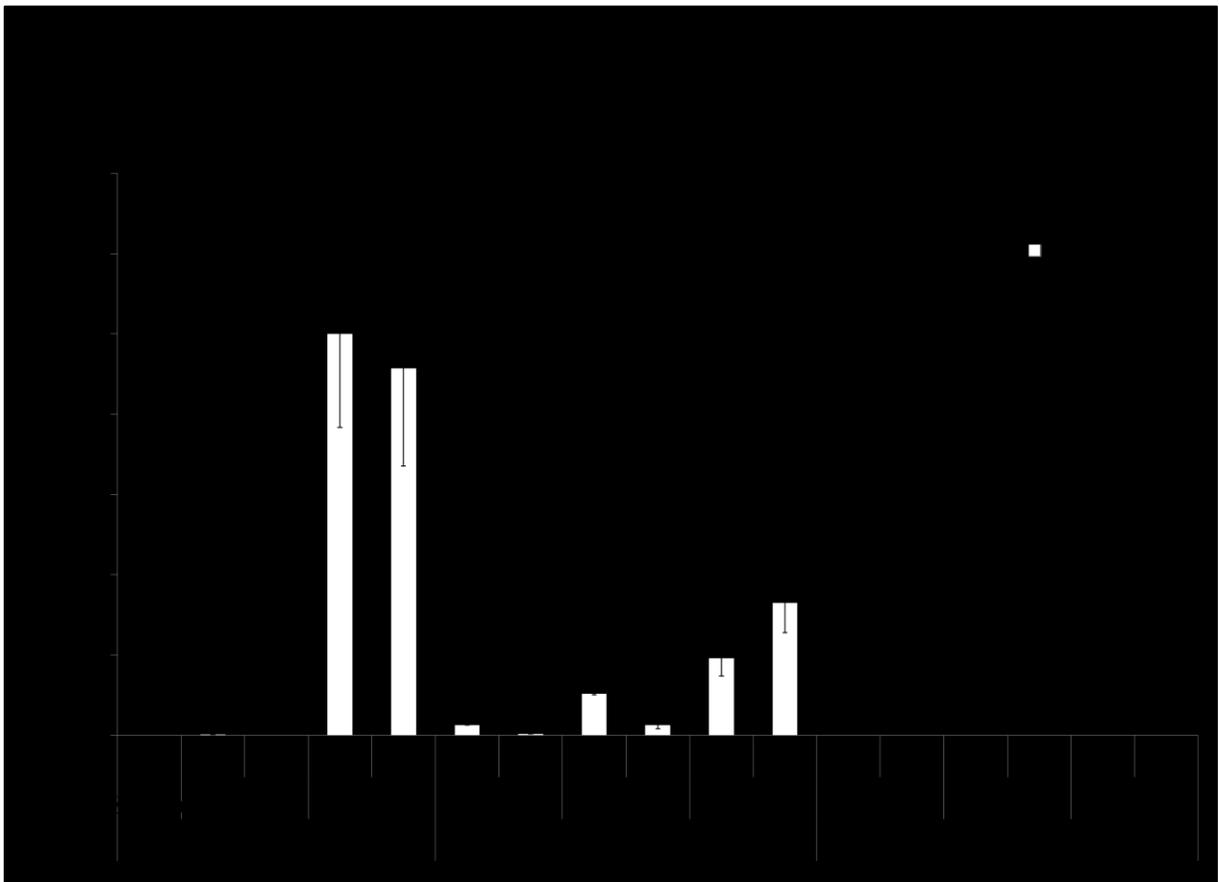


Figure 24: Expression du gène *CYP1A1* dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

Il est vrai que les barres d'erreurs sont très grandes, mais le patron pour chaque échantillon montrait cette hausse. Nous avons aussi regardé l'expression du gène de *CYP1B1*, étant donné que la balance des deux enzymes codées par ces gènes nous intrigue pour comprendre le potentiel de production de métabolites génotoxiques et leur accumulation. Ce que l'on peut voir en figure 23, c'est l'expression de *CYP1B1* par rapport au solvant (témoin négatif) dans lequel sont dissous nos pesticides et autres produits utilisés pour traiter les cellules. L'expression du solvant est légèrement moins grande que celle du non-traité sans œstradiol, ce qui était légèrement inattendu. Différemment de l'effet de l'interaction croisée entre les récepteurs AhR et ER, *CYP1B1* n'est pas affecté, donc on ne devrait pas observer une diminution de son expression lors de l'ajout de l'E2.

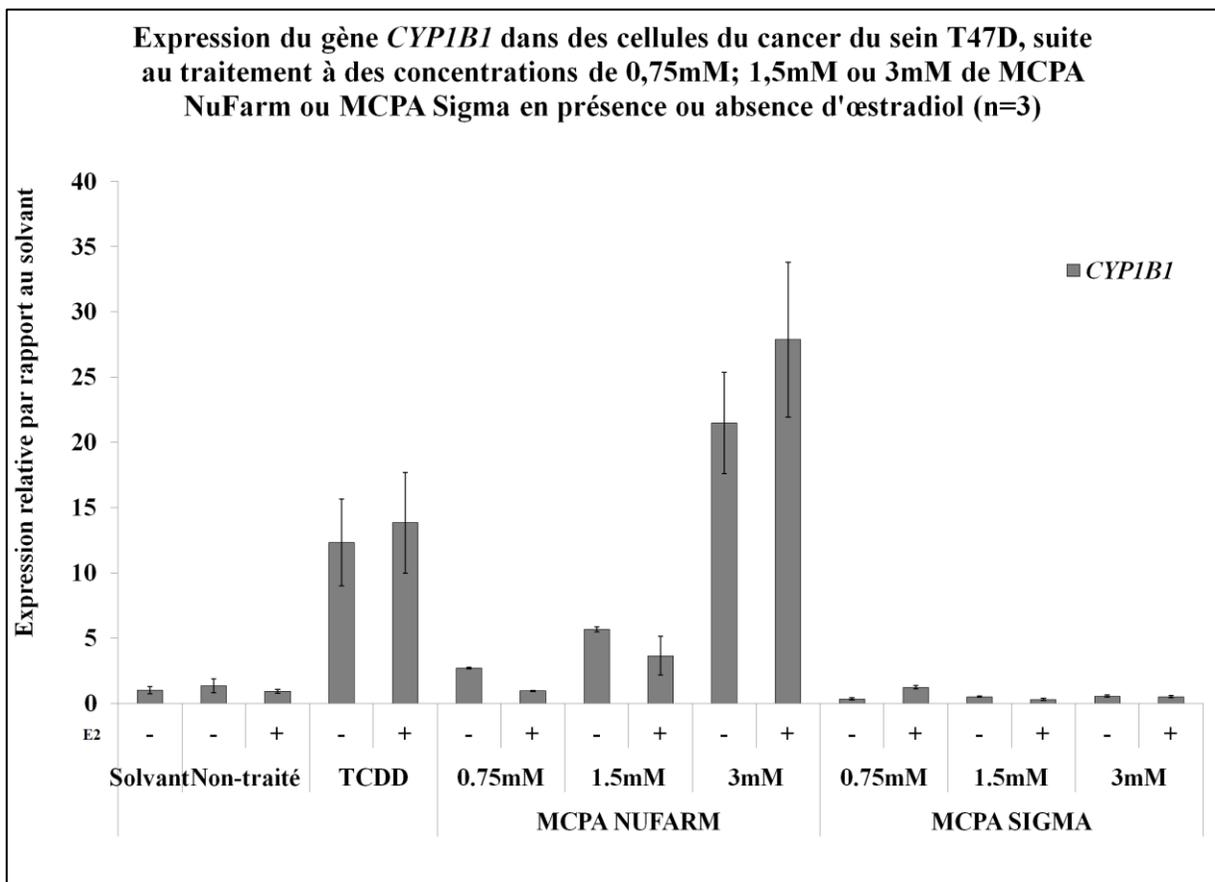


Figure 25: Expression du gène *CYP1B1* dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

On voit tout de même une légère baisse lors de l'ajout de l'hormone dans l'échantillon non-traité. Une hausse de *CYP1B1* était prévue lors du traitement au TCDD (plus d'une quinzaine de fois l'expression du solvant) avec ou sans l'œstradiol. Ce qui est particulièrement intéressant dans la figure 23 est l'effet du MCPA NuFarm, la formulation complète utilisée en champ. Nous voyons à la plus basse dose de 0,75mM de MCPA des niveaux d'expression similaires aux témoins négatifs sans E2, mais à l'ajout de l'œstradiol, l'expression grimpe à des niveaux semblables au TCDD. Ce patron ne se produit pas pour la concentration de 1,5mM de pesticide appliqué aux cellules, on voit plutôt l'expression comparable au non-traité. À la plus forte concentration, l'expression de *CYP1B1* relative au solvant dépasse même les résultats observés suite aux traitements à la dioxine. L'ingrédient actif seul du MCPA obtenu de Sigma ne cause pas les mêmes changements d'expression à *CYP1B1* par contre, à toutes concentrations avec ou sans l'œstradiol. Nous avons répété l'expérience dans les cellules de la lignée T47D afin de vérifier si cela concordait avec ce qui a été obtenu dans les MCF-7. Les résultats étaient moins spectaculaires que dans la lignée des MCF-7. La figure 24 expose les résultats d'expression du gène *CYP1A1* dans les cellules T47D par rapport au TCDD. En comparant à la figure 22, on voit que cette fois-ci, le patron est presque identique excepté pour le traitement à la dioxine et à l'œstradiol, où *CYP1A1* est au même niveau que sans œstradiol par opposition à la baisse attendue et notée dans les cellules MCF-7. Les niveaux de *CYP1B1* ont aussi été examinés (Fig. 25) et encore une fois, les résultats d'expression ressemblent fortement à ceux obtenus auparavant dans l'autre lignée cellulaire du cancer du sein. On note que le gène cible est encore plus exprimé dans les T47D lors du traitement au 3mM de MCPA NuFarm. Il paraîtrait alors que le MCPA Amine 600 obtenu de la compagnie NuFarm a possiblement un effet perturbateur sur la voie de signalisation du récepteur AhR.

3.5. Expression des enzymes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA

Puisque que les données obtenues corrèlent, nous avons décidé d'analyser de façon semi-quantitative l'expression réelle des protéines que codent les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* par

immunobuvardage de type Western afin de confirmer ce qui a été obtenu par q-RT-PCR. Nous avons collecté les cellules des deux lignées cellulaires (MCF-7 et T47D) et extrait les protéines totales.

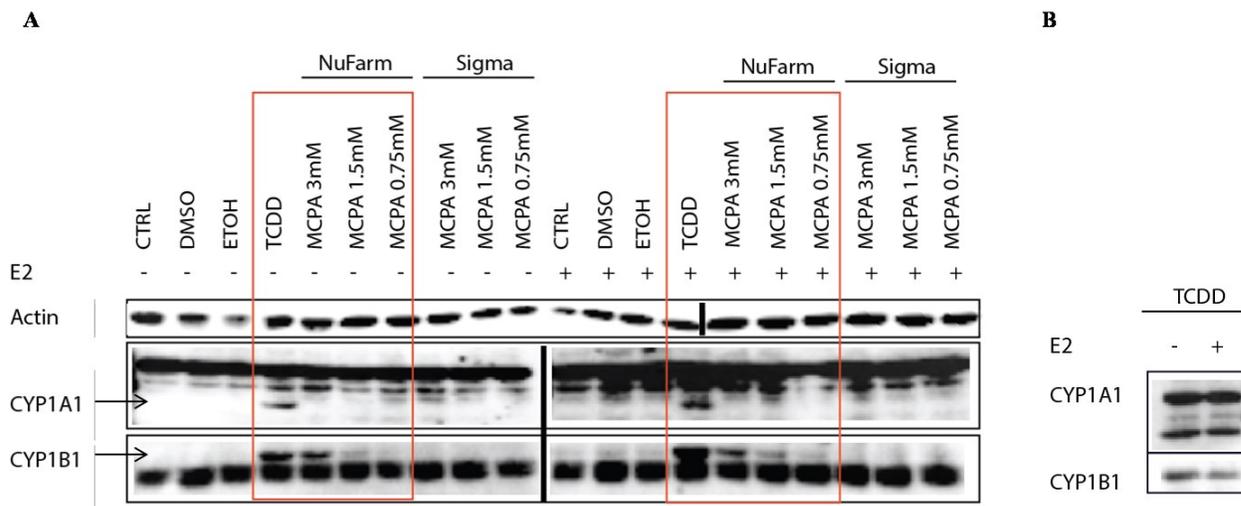


Figure 26: A. Immunobuvardage de type Western dans les cellules MCF-7.

On peut distinguer l'expression de l'actine (43kDa), CYP1A1 (56kDa) et CYP1B1 (55kDa). Le DMSO et l'éthanol (ETOH) sont des témoins négatifs. B. Immunobuvardage de type Western dans les cellules MCF-7 pour vérifier l'expression de CYP1A1 et CYP1B1 suite au traitement au TCDD.

Les cellules avaient été sujettes aux mêmes traitements que pour les essais d'expression des gènes cible de la voie du récepteur aux xénobiotiques. Présentés dans la figure 26a sont les résultats d'immunobuvardage de type Western des cellules MCF-7 traitées. Nous avons un témoin d'actine (43kDa) afin de vérifier que les quantités introduites dans chaque puit étaient équivalentes. Il est possible d'observer les bandes correspondant à la protéine CYP1A1 (boîte du centre, 56kDa) seulement pour les échantillons traités au TCDD. Les bandes apparaissant plus haut sont du bruit de fond accompagnant cet anticorps. Ce qui nous a surpris était l'expression de cette enzyme plus forte lors de l'ajout d'E2 aux cellules exposées à la dioxine. Cela nous a poussés à recommencer avec les deux mêmes échantillons et nous pouvons bien voir à la figure 26b que l'expression de CYP1A1 diminue lors de l'ajout de l'œstradiol. Aucune autre bande pour cette enzyme n'est remarquable pour les autres traitements. Plus bas dans la figure 26a, l'expression de CYP1B1 (boîte du bas, 55kDa) est présentée. On remarque

que l'enzyme ne paraît pas être exprimée pour les conditions de témoins négatifs (CTRL, DMSO et ETOH). Une quantité nettement plus forte est visible suite au traitement à la dioxine sans œstradiol, mais aussi lorsque les cellules sont traitées au MCPA commercial NuFarm. À la concentration de 3mM de ce dernier, CYP1B1 semble se manifester aux mêmes niveaux que ceux de la dioxine, et décroître graduellement plus la concentration de pesticide appliqué diminue. Ces résultats ne se présentent pas lorsque l'exposition des cellules à l'ingrédient actif seul à toutes les concentrations. Lorsqu'on ajoute l'œstradiol, on observe de très légères bandes dans les témoins négatifs. Le même patron qui a été observé sans œstradiol pour les traitements au TCDD et à la formulation complète du MCPA est encore noté. Nous avons refait cet immunobuvardage (données non présentées) et CYP1B1 était de niveau presque égal avec ou sans œstradiol lorsqu'exposé à la dioxine. Les autres échantillons exprimaient les protéines de façon similaire à ce qui montré en figure 26a. Il semblerait que ces données d'immunobuvardage de type Western soutiennent nos résultats d'expression de gènes obtenus auparavant dans les cellules MCF-7. Une fois de plus, pour en être certains, nous confirmons nos résultats dans la lignée cellulaire T47D, que l'on peut voir en figure 27. Nous nous attendions à observer une présence de CYP1A1 que dans les échantillons traités au TCDD. Justement, lors de l'ajout d'E2 à la dioxine, on remarque même que l'intensité de la bande est légèrement plus faible que celle de l'échantillon sans l'hormone.

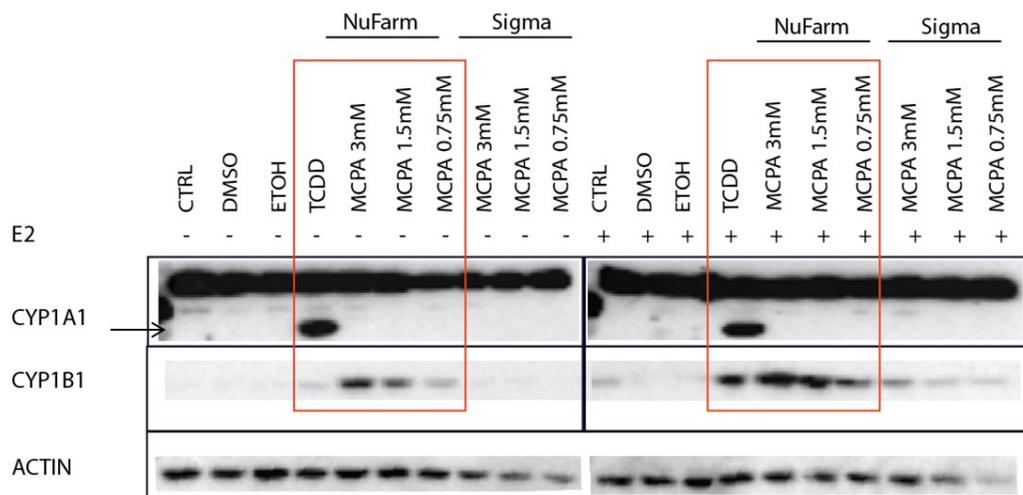


Figure 27: Immunobuvardage de type Western dans les cellules T47D.

On peut distinguer l'expression de l'actine (43kDa), CYP1A1 (56kDa) et CYP1B1 (55kDa). Le DMSO et l'éthanol (ETOH) sont des témoins négatifs.

Par rapport à CYP1B1, on note aucune présence de l'enzyme dans les témoins ainsi que ceux qui ont été exposés au MCPA Sigma, tous sans œstradiol. On voit des bandes par contre pour les échantillons traités au TCDD (faible bande) et au MCPA NuFarm, comme pour les cellules MCF-7. Justement, en comparaison à l'expression dans les cellules MCF-7, on note que CYP1B1 est moins fortement exprimée pour l'échantillon de TCDD sans œstradiol. Par contre, on voit que l'enzyme est fortement présente suite au traitement à la formulation complète du MCPA à 0,75mM, 1,5mM et 3mM. En fait, à la plus basse concentration, la bande représentant CYP1B1 est même plus forte que celle de la dioxine. Lorsqu'on examine l'expression de l'enzyme dans les traitements auxquels l'œstradiol a été ajouté, on remarque que l'échantillon non-traité l'exprime légèrement, mais curieusement pas nos solvants (DMSO et ETOH). Ce dernier résultat correspond par contre à ce qui avait été noté dans les essais d'expression de *CYP1B1*, nous forçant à nous demander si nos solvants n'avaient pas un faible effet inhibiteur sur ce gène. Comme prévu, la dioxine en présence d'œstradiol cause une forte expression de la protéine, mais toujours plus faible que celle visible dans les traitements au MCPA NuFarm aux concentrations de 1,5mM et 3mM. La plus basse concentration du pesticide lors de l'ajout de l'E2 demeure notable et d'ailleurs elle est plus forte que celle de l'échantillon non-traité (CTRL). Les traitements à l'ingrédient actif seul (Sigma) combinés à l'œstradiol résultent en bandes faibles, comparables au témoin négatif non-traité. Seule la concentration de 3mM semble induire une expression de CYP1B1 plus forte, et presque au niveau de l'échantillon traité au MCPA NuFarm à 0,75mM.

3.6. Expression des gènes cible du récepteur ER suite au traitement au MCPA

Nous avons tenté par la suite de comprendre si les résultats obtenus suite à l'exposition des cellules aux pesticides étaient dus à l'interaction croisée entre les récepteurs AhR et ER. Nous avons donc vérifié par q-RT-PCR de nouveau l'expression de gènes cible de la voie de signalisation du récepteur aux œstrogènes dans nos deux lignées cellulaires du cancer du sein.

En figure 28, nous pouvons voir l'expression de *GREBI* dans les cellules MCF-7 suite aux traitements à la dioxine et aux pesticides.

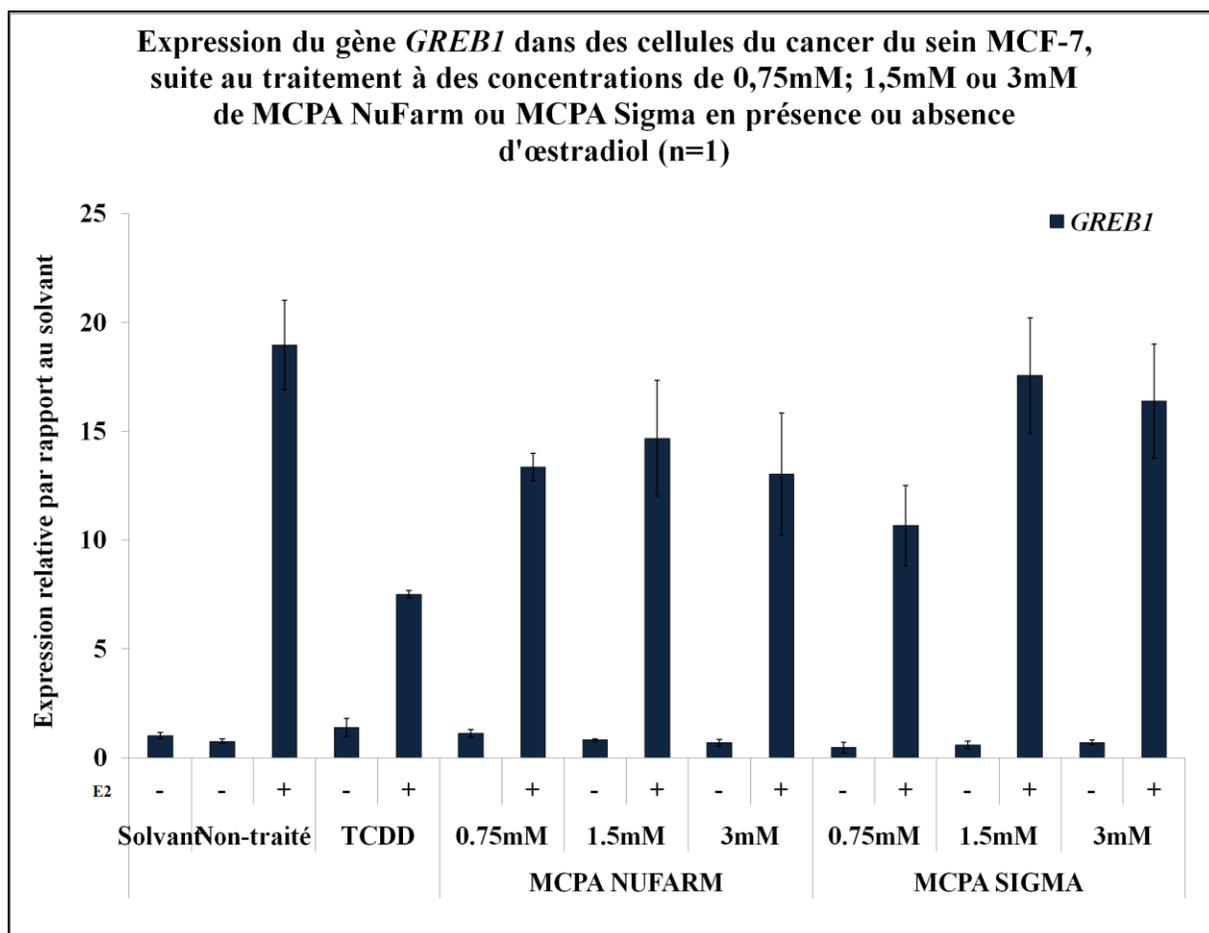


Figure 28: Expression du gène *GREBI* dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

On note pour tous les échantillons sans œstradiol que le gène est peu induit, sans surprise. L'expression de *GREBI* est environ à vingt fois l'expression de l'échantillon solvant pour lorsqu'on ajoute l'E2 seul. Excepté l'échantillon TCDD+E2 dont l'expression du gène est nettement plus basse, les autres traitements sont à peu près équivalents au témoin positif (Non-traité + E2). Pour l'expression du gène *TFF1* toujours dans les cellules MCF-7, en figure 29, nous notons un patron différent selon les traitements lors de l'ajout de l'E2. L'expression du

gène avec le traitement à l'œstradiol seul est très forte, presque 600 fois celle du témoin négatif.

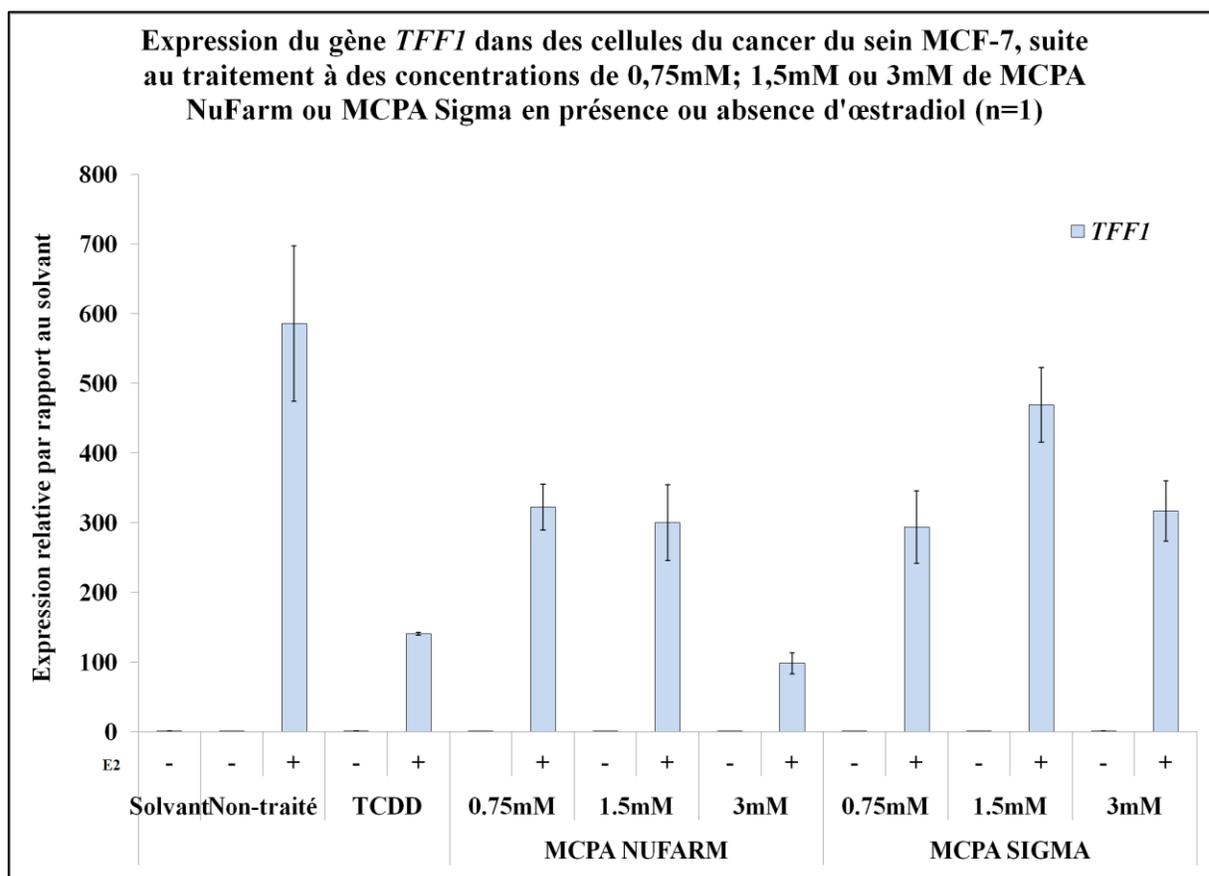


Figure 29: Expression du gène *TFF1* dans des cellules du cancer du sein MCF-7, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

La dioxine en présence d'œstradiol réprime fortement l'expression de *TFF1*, mais aussi le MCPA NuFarm à 3mM. Les autres traitements au MCPA, c'est-à-dire 0,75mM, 1,5mM MCPA NuFarm et toutes les concentrations de MCPA Sigma induisent le gène ER-dépendant de manière similaire, mais moins intensément que l'œstradiol seul. Dans la lignée cellulaire des T47D, les mêmes gènes ont été suivis et nous pouvons voir leur expression en figures 30 et 31. Le gène *GREB1* (Fig. 30) semble être induit de façon semblable à ce qui a été vu dans les MCF-7, mais la répression du gène est notée particulièrement aux concentrations de

1,5mM et 3mM de MCPA NuFarm. De plus, sa répression était minimale lors de l'ajout de l'œstradiol à la dioxine.

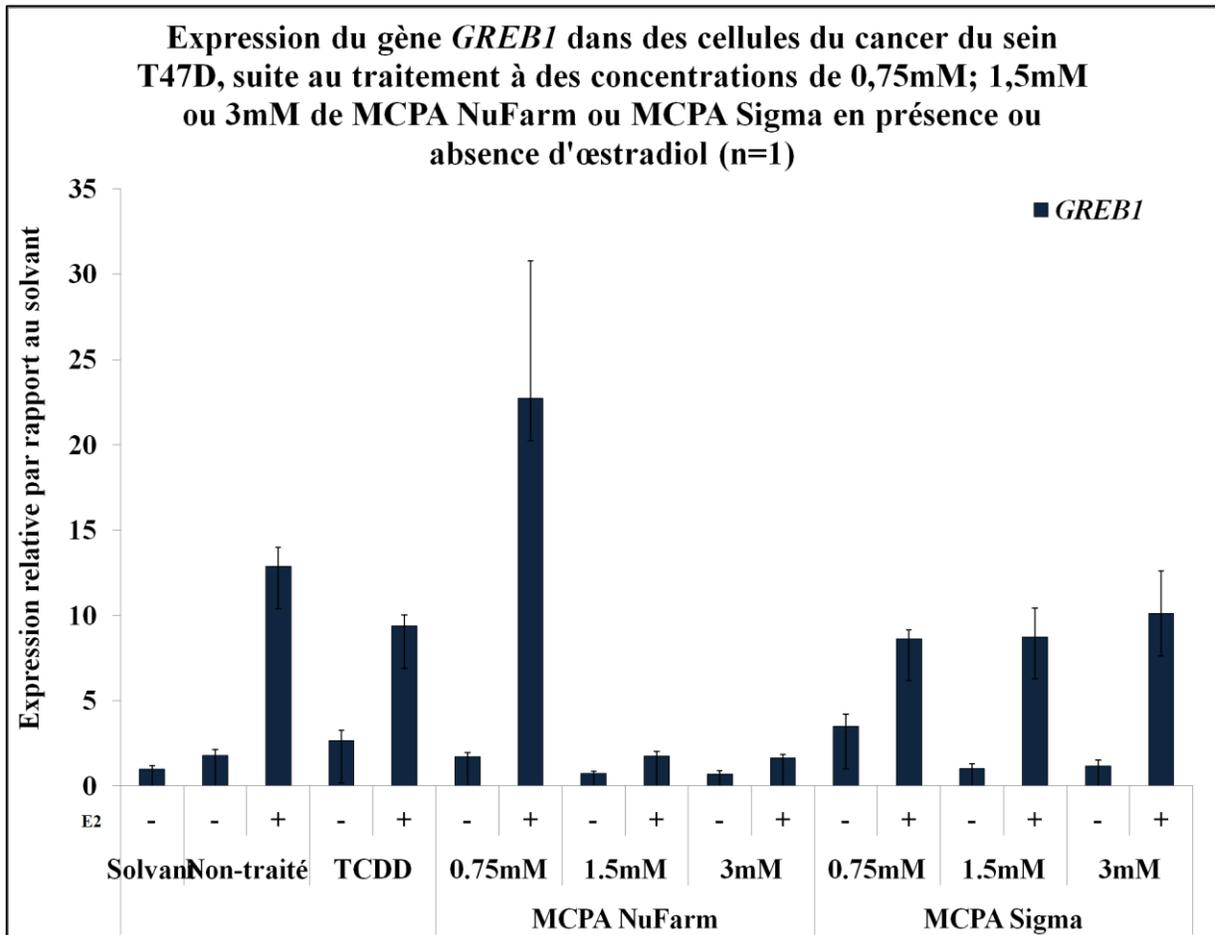


Figure 30: Expression du gène *GREB1* dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

Pour l'expression du gène *TFF1* (Fig. 31), nous voyons la répression pour l'échantillon traité à la dioxine et à l'œstradiol, ainsi que pour tous les échantillons traités au MCPA NuFarm. Encore une fois, l'ingrédient actif ne semble pas causer le même effet que la formulation complète. Les deux lignées cellulaires se soutiennent par rapport à l'effet de répression de la dioxine en présence d'œstradiol sur le récepteur à l'œstrogène, déjà répertoriés dans la littérature, mais aussi à la capacité du traitement au MCPA NuFarm (à la plus forte dose) de

faire de même. Considérant que l'exposition au TCDD cause un débalancement du ratio de ces enzymes présentes dans la cellule qui peut favoriser l'accumulation de métabolites génotoxiques, on peut supposer avec ces résultats que le MCPA NuFarm pourrait avoir la même conséquence. Le potentiel de perturbateur de la voie de signalisation du récepteur AhR est nettement plus fort pour ce dernier que pour l'ingrédient actif seul.

3.7. Expression des gènes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA

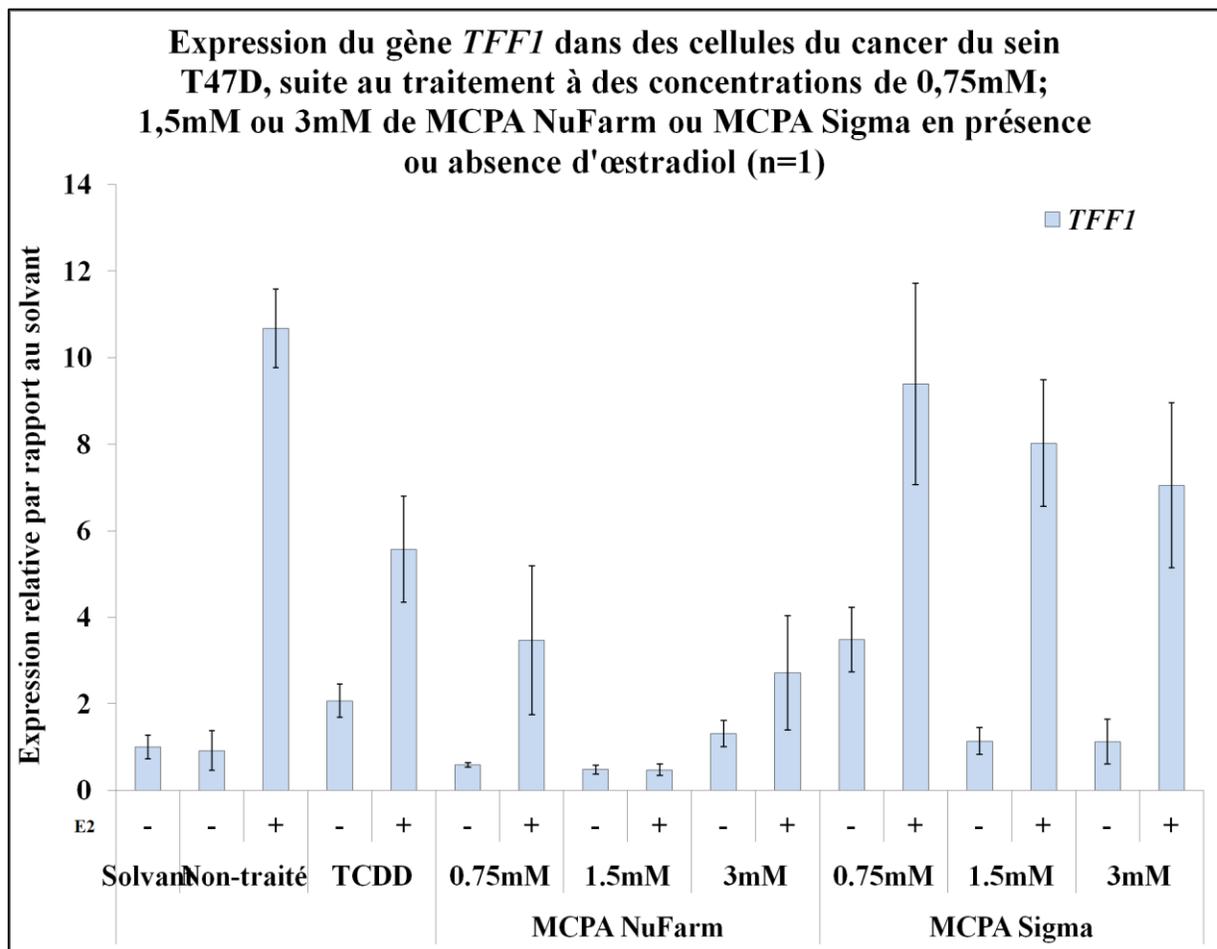


Figure 31: Expression du gène *TFF1* dans des cellules du cancer du sein T47D, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence d'œstradiol.

Enfin, nous avons décidé de vérifier si ce pesticide pouvait aussi perturber la voie de signalisation du récepteur aux androgènes. Comme pour ER, les gènes cibles de AR sont induits lors de l'activation du récepteur lors de la liaison avec une hormone; dans ce cas-ci la dihydrotestostérone. En figure 32, nous voyons l'expression du gène *PCA3* dans les conditions de traitement utilisées auparavant sur les cellules du cancer du sein. Il est possible de noter une expression minimale de *PCA3* pour toutes les conditions sans DHT. Le gène est fortement induit par la présence de DHT seul, mais ce n'est pas le cas lorsque la dioxine ou le MCPA, l'ingrédient actif ou la formulation complète est combinée à l'hormone.

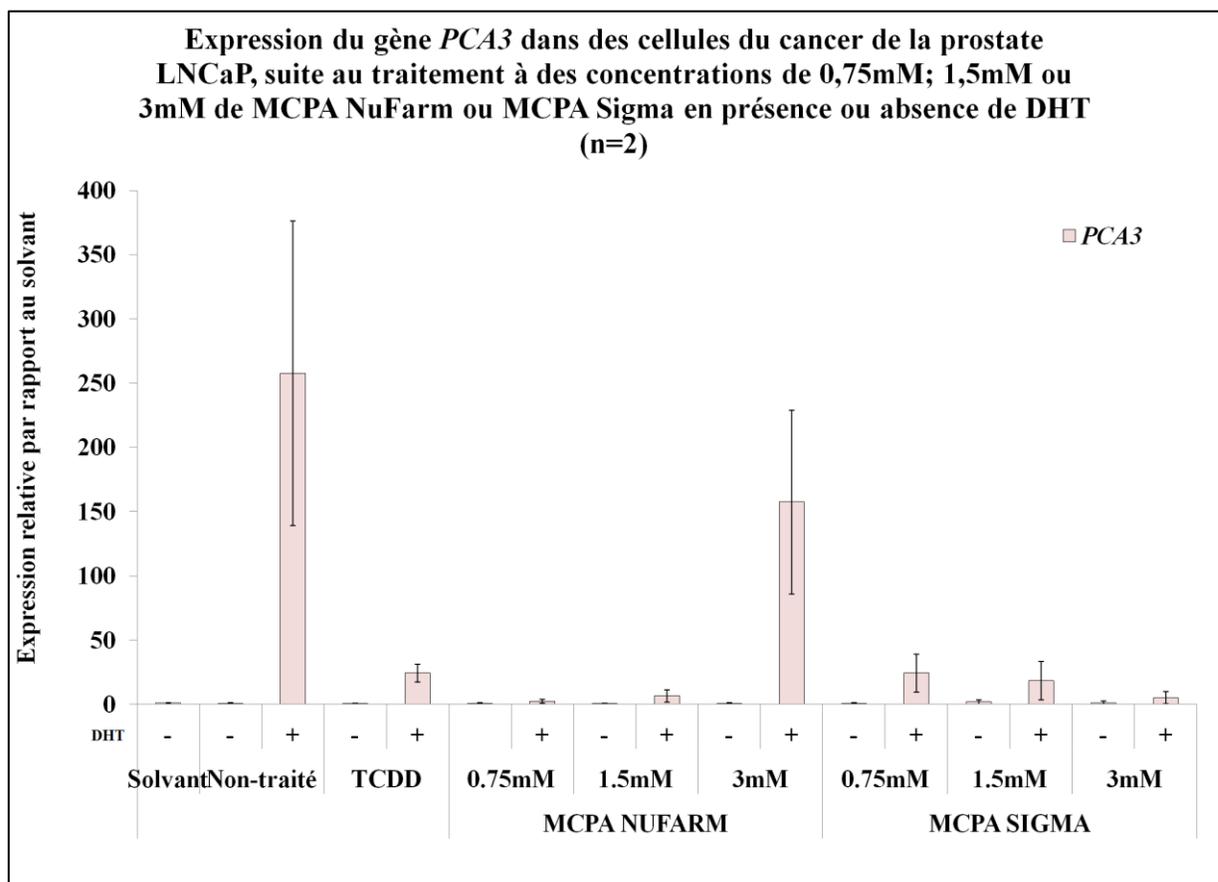


Figure 32: Expression du gène *PCA3* dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.

En fait, *PCA3* est plus exprimé dans les échantillons TCDD+ DHT, MCPA Sigma 0,75mM+DHT et MCPA Sigma 1,5mM+DHT. Il l'est moins que le témoin positif avec la DHT seule dans les échantillons MCPA Nufarm 0,75mM+ DHT, MCPA Nufarm 1,5mM+ DHT et MCPA Sigma 3mM+ DHT. Étonnés, nous avons vérifié si l'expression de *PSA* (figure 33) aussi était affectée par l'exposition à la dioxine et au pesticide. Tout comme *PCA3*, l'expression de *PSA* était affectée par le MCPA obtenu de NuFarm ainsi que celui obtenu de Sigma dans les échantillons auxquels la DHT était ajoutée.

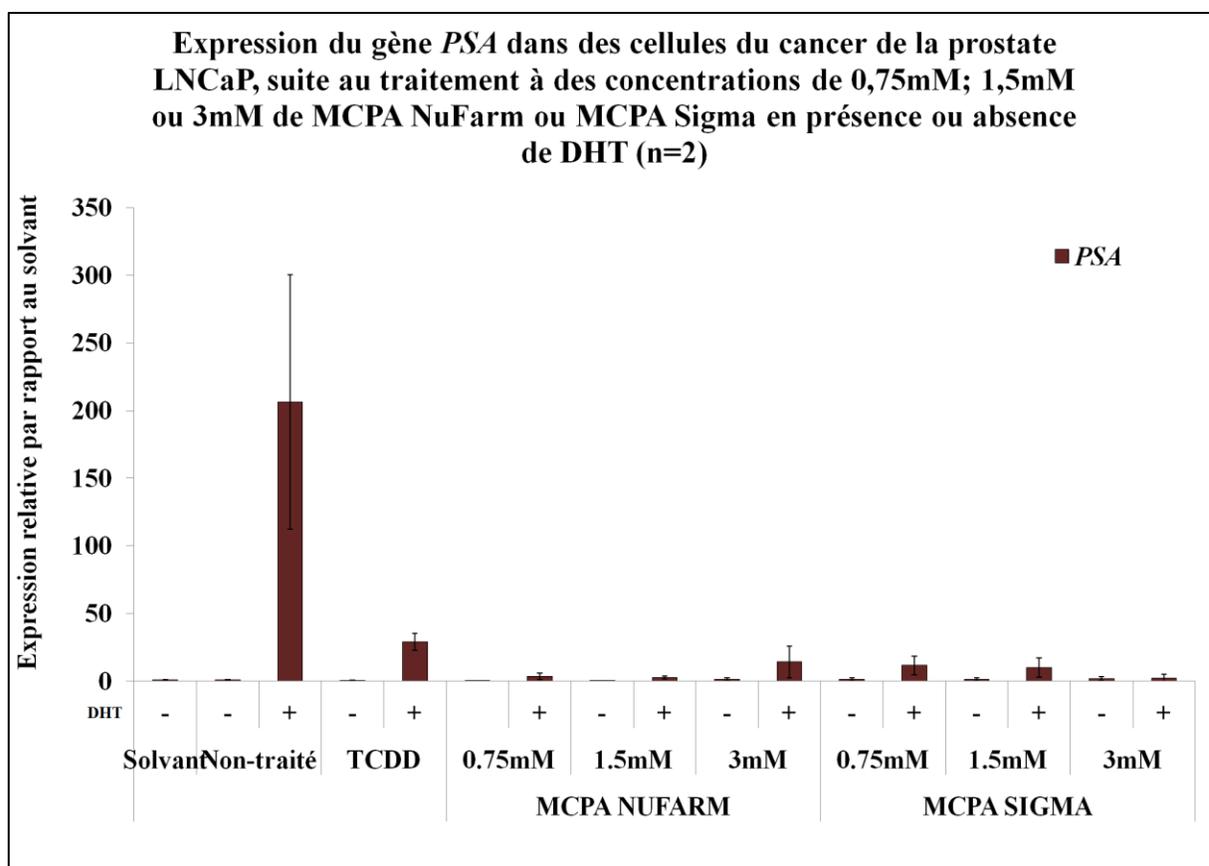


Figure 33: Expression du gène *PSA* dans des cellules du cancer de la prostate LNCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.

La dioxine aussi semble affecter l'expression du gène en comparaison à l'échantillon avec de la DHT seulement (témoin positif). Nous avons été étonnés de voir ces résultats suggérant que

l'herbicide pouvait changer l'expression des gènes AR dépendants. Nous avons souhaité vérifier dans une seconde lignée cellulaire du cancer de la prostate, les VCaP, les données obtenues dans les LNCaP. Comme dans les LNCaP, les niveaux d'expression des deux gènes sont comparables au témoin négatif pour les traitements sans dihydrotestostérone. Nous notons tout d'abord que l'expression de l'échantillon traité au TCDD ne semble affecter ni l'expression de *PCA3* (Fig. 34) ou *PSA* (Fig. 35) lors de l'addition de l'hormone, et qu'elle est équivalente à l'expression lors de l'ajout de DHT seule. On remarque aussi que *PCA3* et *PSA* sont nettement moins induits lors de l'exposition des cellules au pesticide complet (NuFarm) sauf à la plus faible concentration.

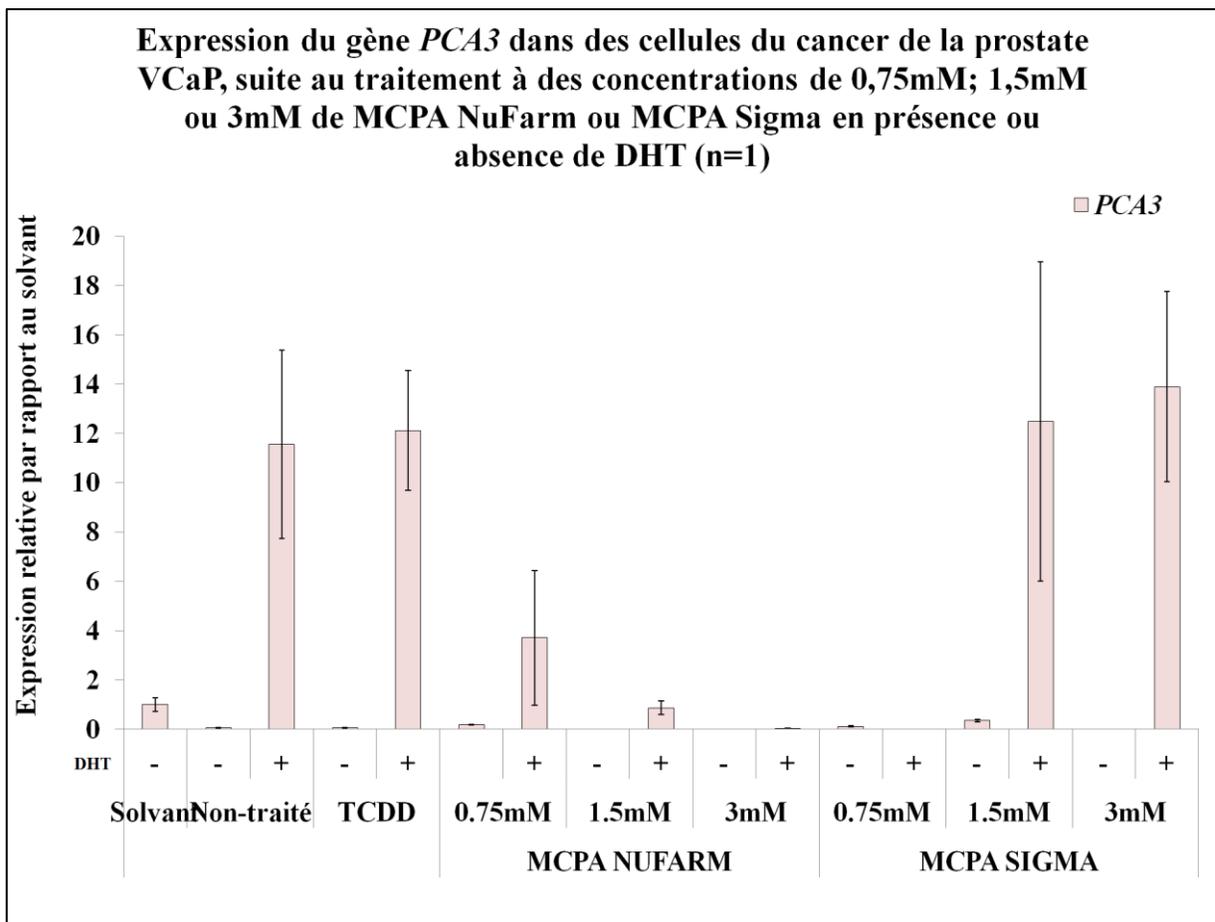


Figure 34: Expression du gène *PCA3* dans des cellules du cancer de la prostate VCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.

Il faut aussi remarquer les résultats d'expression lors des traitements à l'ingrédient actif du MCPA, où l'on voit l'expression comparable au témoin positif pour *PCA3* aux concentrations de 1,5mM et 3mM, ainsi que pour *PSA* à 1,5mM, toujours en combinaison avec la dihydrotestostérone. À 3mM du MCPA Sigma, on voit même que le gène *PSA* est nettement plus induit que le témoin positif. À 0,75mM d'herbicide pur en présence de DHT, l'expression des deux gènes n'est que légèrement plus forte que sans l'hormone.

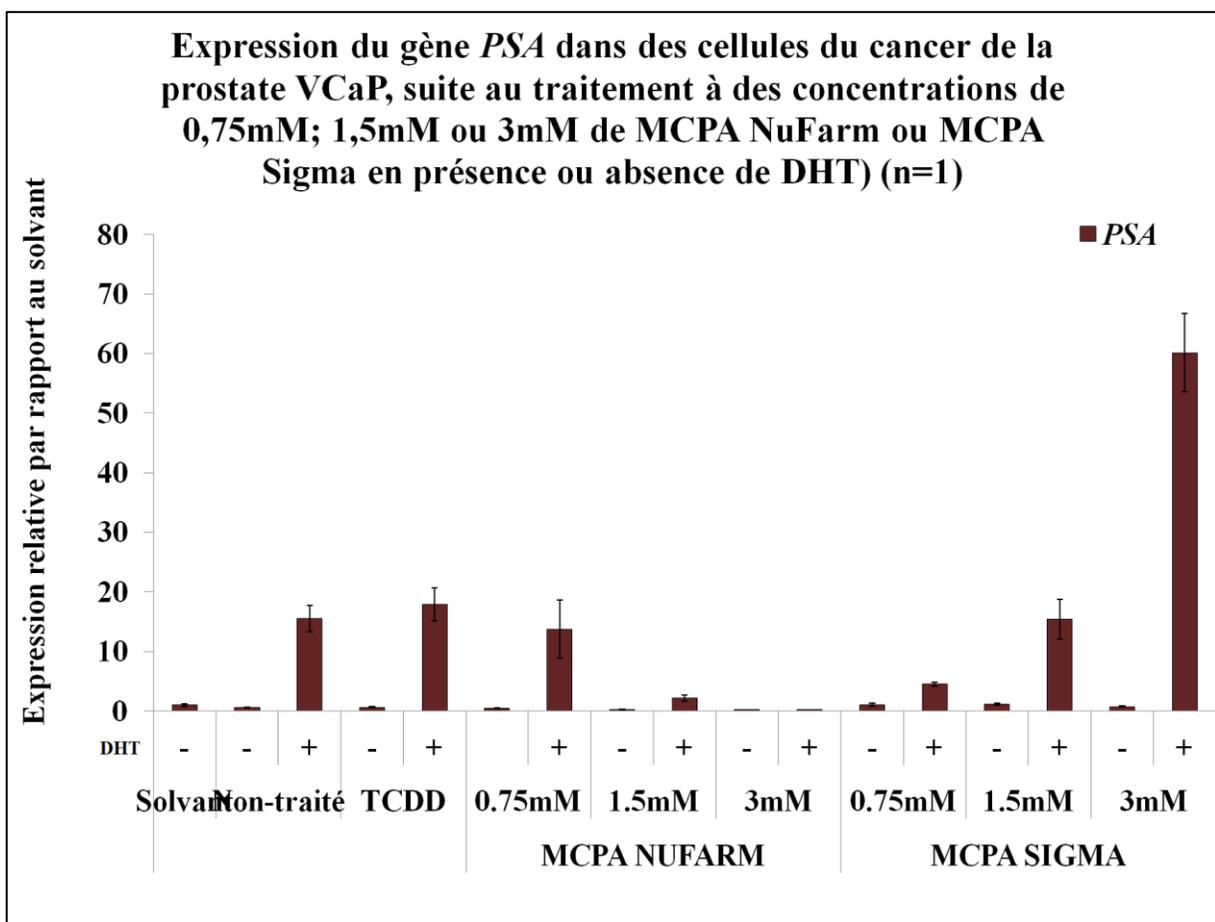


Figure 35: Expression du gène *PSA* dans des cellules du cancer de la prostate VCaP, suite au traitement à des concentrations de 0,75mM; 1,5mM ou 3mM de MCPA NuFarm ou MCPA Sigma en présence ou absence de DHT.

Donc, il y a certaines concordances et discordances entre les résultats des deux lignées cellulaires. Dans les deux lignées cellulaires prostatiques, nous apercevons que le MCPA

NuFarm contre l'induction des deux gènes cibles due à l'activation du récepteur AR par la DHT. Par contre, les résultats dans les LNCaP (figures 32 et 33) semblent indiquer que l'ingrédient actif seul peut aussi causer cette inhibition, alors que ce qui est vu dans les VCaP dévoile l'inverse (Fig. 34 et Fig. 35). Étant donné que les tests d'expression n'ont été faits qu'une seule fois, il est préférable de faire confiance aux données des LNCaP répétées deux fois. Il faudra faire de nouvelles expériences afin d'avoir un minimum de trois échantillons afin d'être confiants en les résultats que nous voyons ici.

3.8. Expression des enzymes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA

Nous avons vérifié en immunobuvardage de type Western si le récepteur AR et le récepteur AhR étaient bel et bien affectés par l'exposition des cellules à l'herbicide dans les cellules LNCaP. Comme dans les autres « Western Blots », nous avons utilisé l'actine comme témoin. Dans la boîte du haut (Fig. 36), nous observons l'expression du récepteur AR selon les traitements subis par les cellules. La bande de AR (boîte du haut, 110 kDa) qui saute aux yeux est celle de l'échantillon ayant été traité au MCPA NuFarm 3mM sans DHT.

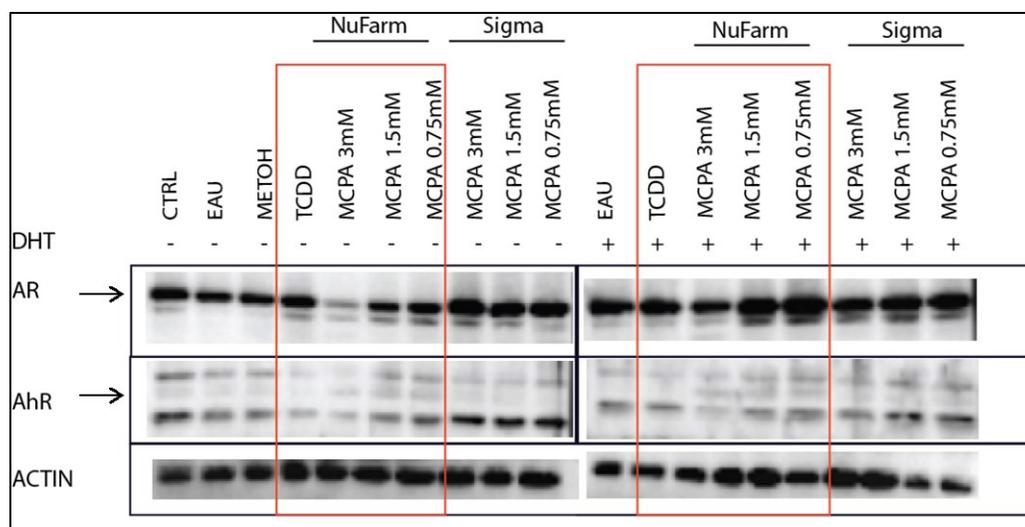


Figure 36: Immunobuvardage de type Western dans les cellules LNCaP.

On peut distinguer l'expression de l'actine (43kDa), AR (110kDa) et AhR (122kDa). L'eau et le méthanol (METOH) sont des témoins négatifs.

Elle est extrêmement faible en comparaison aux témoins négatifs (CTRL, EAU et METOH) et devient plus forte plus la concentration du pesticide diminue. Le même patron est visible lors de l'ajout de la dihydrotestostérone pour ce traitement-là. Contrairement à ce qu'on a vu dans les résultats d'expression des gènes cible de AR auparavant, l'ingrédient actif seul semble inhiber que légèrement l'expression du récepteur AR à la plus forte concentration (3mM). L'expression du récepteur AR par les échantillons traités à la dioxine en présence ou absence de DHT demeure inchangée. Le récepteur AhR (boite du bas 122 kDa), est présent en très faibles doses dans les témoins et s'intensifie lors de l'ajout de MCPA comme traitement, mais pas pour le TCDD. Nos résultats sont intéressants mais nécessitent d'être confirmés dans une seconde lignée cellulaire.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1. Tests de croissance de levures exposées aux pesticides

Nous avons commencé les expériences sur *Saccharomyces cerevisiae*, afin de voir si les pesticides avaient un effet direct sur leur croissance. Dans les levures sauvages et les levures mutantes *htz1*, l'imidaclopride, l'AMPA et le 4-hydroxyestradiol ont été utilisés comme traitements (figure 14). Tous ces produits ne semblent pas avoir d'effets sur la croissance des cellules. Les résultats ne nous ont pas surpris, étant donné que les levures ont une paroi cellulaire extrêmement efficace, ce qui pourrait expliquer le fait que nous ne voyions qu'un faible effet à des doses très fortes. Pour cela, nous doutions que nos produits puissent se glisser dans les cellules et avoir un effet toxique direct et altérer leur croissance. D'un autre côté, si les produits ont pénétré dans la cellule ici, la croissance de ces levures pourrait aussi simplement ne pas être affectée. Nous avons tout de même décidé de vérifier si *S. cerevisiae* ayant des défauts dans la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN pourrait être plus sensible aux pesticides. Si ces produits causent des dommages à l'ADN et que les cellules n'arrivent pas à les réparer, des problèmes de survie devraient survenir. Le MCPA et l'imidaclopride ont été employés sur des cellules sauvages et des cellules déficientes en mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (figure 15). Encore une fois, il semblerait soit que les pesticides ne puissent pénétrer les cellules à cause de leur paroi ou ne causent pas de dommages à l'ADN et n'ont pas de potentiel toxique direct sur ces levures. Étant donné que ces tests étaient pour vérifier la toxicité des produits antiparasitaires, nous n'avons pas poussé les tests sur levure plus loin. Ceci étant dit, il serait intéressant de tester à plus large spectre de concentrations pour l'imidaclopride et de MCPA et voir comment la croissance des levures sauvages et mutantes serait affectée. De plus, il serait intéressant de doser les métabolites par

spectroscopie de masse afin de confirmer ou infirmer si les produits pénètrent bien dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement d'imidaclopride

Suite à ces tests préliminaires, nous avons continué nos expériences sur des cellules humaines. Nous avons suivi l'expression de nos gènes clés, *CYP1A1* et *CYP1B1* pour les cellules du cancer du sein. En figure 16, nous avons observé un phénomène déjà connu, ou l'on voit l'expression du gène *CYP1A1* croître fortement en présence de dioxine, mais cette expression est réprimée à environ 60% lors de l'ajout d'estradiol. Ce résultat a déjà été montré dans la littérature, et l'induction du gène *CYP1A1* est maximale lors du traitement au TCDD, d'où la normalisation de l'expression par rapport à ce dernier (Matthews et Gustafsson 2006). Étant donné que ce témoin positif était cohérent, nous avons noté l'effet de l'imidaclopride sur les cellules MCF-7 et T47D sur les gènes cibles d'AhR. On remarque que nos résultats sont équivalents dans les deux lignées cellulaires et que le pesticide ne semble pas affecter l'expression des gènes *CYP1A1* ou *CYP1B1* de façon remarquable. Il faut quand même noter que les cellules sont toutes deux de type laminaire A et forment des structures compactées cohésives grâce à leur adhésions cellule à cellule fortes. Les deux lignées sont ER+, donc leur récepteur aux œstrogènes est fonctionnel, donc sans E2, elles ne peuvent pas croître (Holliday et Speirs, 2011). Étant donné que nos résultats étaient confirmés dans ces deux lignées cellulaires, nous pouvons affirmer que l'imidaclopride, en ingrédient actif seul aux concentrations testées, obtenu de Sigma-Aldrich, ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des gènes codant pour les enzymes de détoxification CYP1A1 et CYP1B1 selon nos résultats d'expression en q-RT-PCR. Il est serait aussi recommandé de faire des analyses de la présence de ces protéines par immunobuvardage de type Western, afin de confirmer les résultats, car des modifications post-transcriptionnelles peuvent se produire. De plus, il faudrait quantifier la concentration du pesticide qui pénètre réellement dans la cellule, afin de bien comprendre son comportement au niveau cellulaire et moléculaire. Nous souhaitons obtenir l'ingrédient utilisé dans les champs agricoles du Québec, mais il a été impossible de se le procurer, faute de

prescription d'un agronome. Les suppléments chimiques mélangés à l'ingrédient actif auraient peut-être eu une conséquence différente si nous avions utilisé la formulation complète de ce néonicotinoïde. Plus de recherche par rapport à cette gamme de pesticides et son effet sur la voie de signalisation du récepteur AhR est nécessaire, car c'est une voie importante pour la détoxification des cellules. D'ailleurs, il n'y a toujours pas d'articles dans la banque de NCBI qui correspondent aux termes « Imidacloprid + AhR », ni « Imidacloprid + CYP1A1 » ou « Imidacloprid + CYP1B1 ». Cela vaut la peine d'être étudié car ces produits sont utilisés de façon régulière sur une très grande variété de cultures.

4.3. Expression des gènes cible du récepteur AR suite au traitement d'imidaclopride

Nous avons aussi vérifié l'effet de l'imidaclopride sur les cellules du cancer de la prostate, en suivant l'expression de deux gènes AR dépendants, *PCA3* et *PSA*. L'ajout de DHT aux cellules résultait en une forte expression de ces deux gènes, comme prévu. L'imidaclopride, de nouveau, ne semble pas affecter l'expression de *PCA3* ou *PSA*. Il faut remarquer que *PCA3* n'était pas toujours détectable sans dihydrotestostérone et nous sommes convaincus que l'expression de ce gène était trop faible pour que l'on puisse la détecter, étant donné que nous avons testé plusieurs fois différents échantillons à différentes concentrations. Nous n'avons pas testé ces mêmes conditions dans une autre lignée cellulaire, comme les VCAPs, mais il serait intéressant de vérifier si les résultats seraient similaires. De plus, aucune vérification par rapport au niveau protéique n'a été faite. Il est important de rappeler que le gène *PCA3* ne code pas pour une protéine, alors que *PSA* code pour la protéine du même nom. Par contre, il est connu que plusieurs facteurs peuvent affecter l'expression de *PSA*, donc il faudrait au moins une seconde protéine pour vérifier que l'effet est dû à notre traitement à l'imidaclopride. C'est difficile de formuler une conclusion avec ces résultats-là car nous n'avons pas trois réplicats de faits, ni la confirmation dans une seconde lignée cellulaire.

Peu d'études (quatre seulement pour les mots clés « imidacloprid + androgen ») ont été faites par rapport à l'effet potentiel de ce néonicotinoïde sur la voie de signalisation du récepteur aux androgènes. Il demeure très important de poursuivre cela, car une multitude de pesticides

peuvent inhiber les voies de signalisation d'AR, et il faudrait vérifier pour l'imidaclopride si c'est le cas ou pas. D'ailleurs, une étude récente suggère qu'il pourrait avoir un effet de perturbateur endocrinien suite à leurs recherches sur des cellules de souris (Kugathas *et al.* 2015). Il est important de comprendre comment l'imidaclopride ainsi que la classe des néonicotinoïdes pourraient affecter les voies de signalisation cellulaires dues à leur grande utilisation au Québec et dans le monde.

4.4. Expression des gènes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA

Étant donné que d'anciens membres du laboratoire avaient déjà eu des résultats intéressants avec le MCPA, nous avons enquêté plus en profondeur sur sa capacité à affecter la voie de signalisation du récepteur AhR. Nos résultats indiquent que l'ingrédient actif seul du MCPA (Sigma) ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1*, alors que le MCPA appliqué en champ (NuFarm) en a. Plus concentration est forte, plus on observe une hausse d'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1*. Cela est vrai dans les deux lignées cellulaires du cancer du sein que nous avons utilisé, c'est-à-dire, les MCF-7 et les T47D. Il est vrai qu'il y a beaucoup de variabilité entre nos échantillons, mais il faut prendre en compte que les cellules sont connues pour leurs expressions décroissantes à chaque passage. Il est particulier de noter que le pesticide en formulation complète peut cause une hausse d'expression de *CYP1B1* comparable et même plus forte que celle induite par le TCDD. Cela est particulièrement frappant, car on voit ici que le MCPA en formulation complète de NuFarm cause une expression moins forte de *CYP1A1* et une expression plus forte de *CYP1B1* par rapport à la dioxine. Il faut rappeler qu'une plus grande expression du gène *CYP1B1* résulte en plus d'enzyme du même nom, qui métabolise l'œstradiol en 4-hydroxyœstradiol alors que *CYP1A1* le métabolise en 2- hydroxyœstradiol. Ce dernier n'as pas d'effet néfaste sur la cellule et même parfois un effet bénéfique, alors que le 4-hydroxyœstradiol est connu pour son potentiel de formation d'adduits à l'ADN. Ce résultat indique un potentiel du MCPA produit par la compagnie NuFarm comme perturbateur du ratio des enzymes clés, comme le TCDD. Donc, ce que l'on observe pourrait indiquer un potentiel de production de métabolites génotoxiques

et leur accumulation. Nous supposons que les ingrédients ajoutés à l'ingrédient actif pour obtenir la formulation complète pourraient donc en soit activer AhR, en plus du pesticide et avoir un effet sur la voie de signalisation du récepteur. Des surfactants, des antigels ainsi que des adjuvants sont mélangés en général aux produits antiparasitaires afin d'améliorer leur efficacité. Il est difficile de pointer du doigt ce qui peut causer cet effet, ou si c'est un effet additif ou synergique, car la recette des produits appliqués en champ relève du secret industriel. Par contre, selon un article publié cette année par l'équipe des docteurs Song et Hong, un surfactant présent dans le MCPA commercial du nom de polyoxyethylene tridecyl ether, ou PTE, causait une baisse de viabilité cellulaire ainsi qu'une hausse d'expression de gènes impliqués dans différentes voies de signalisation cellulaires et d'inflammation (Hwang et al 2015). Malheureusement, il n'est pas clair d'où les chercheurs ont obtenu leur formulation du pesticide ni quelle compagnie le produisait. Donc, il serait important d'analyser la composition du pesticide utilisé en champ de la compagnie NuFarm et tester séparément ses composantes sur nos cellules. De cette manière, nous pourrions déterminer l'effet de chacun des ingrédients dit inertes sur la voie de signalisation afin de mieux expliquer les résultats obtenus avec le pesticide complet par rapport à l'ingrédient actif seul.

4.5. Expression des enzymes cible du récepteur AhR suite au traitement au MCPA

Nous avons vérifié si les enzymes CYP1A1 et CYP1B1 étaient exprimées de façon similaire que les gènes les codants. Nos vérifications de nos résultats d'expression génique au niveau protéique soutiennent ce qui a été obtenu auparavant (figures 26 et 27), c'est-à-dire l'apparition d'une bande correspondant à CYP1A1 seulement aux traitements de TCDD. Cela qui était logique considérant les résultats d'expression obtenus auparavant, même si nous prévoyions voir une faible bande pour les traitements au MCPA NuFarm à la plus forte concentration. De plus, la dioxine est connue pour induire très fortement ce gène. Les résultats pour l'expression de l'enzyme CYP1B1 dans les cellules (figure 26 et 27) correspondent par contre à ce qui avait été noté dans les essais d'expression de *CYP1B1*, nous forçant à se demander si nos solvants, le DMSO et l'éthanol, n'avaient pas un faible effet inhibiteur sur ce

gène. Cela nous force à recommencer ces expériences avec différents solvants afin de confirmer nos données.

Les données obtenues dans les deux lignées cellulaires semblent indiquer que la formulation complète du pesticide induit beaucoup plus fortement l'expression de l'enzyme CYP1B1, mais pas CYP1A1. Il demeure que nous pouvons noter de façon qualitative que le MCPA de la compagnie NuFarm aurait un effet nettement plus puissant. Sachant que le TCDD a un potentiel perturbateur avec son ratio d'enzymes CYP1A1 à CYP1B1, le ratio engendré pesticide appliqué en champ du MCPA est nettement plus grand. Cela n'est pas observé du tout pour l'ingrédient actif seul. Étant donné que nous voyons une différence, il serait important de quantifier les deux enzymes et avoir un ratio « marqueur ». Ceci ne pourrait qu'être fait une fois que l'on détermine par spectroscopie de masse la quantité de métabolites de l'œstradiol, le 2-OHE et le 4-OHE, et noter la corrélation entre leur quantité et la quantité d'enzymes CYP1A1 et CYP1B1.

4.6. Expression des gènes cible du récepteur ER suite au traitement au MCPA

Nous avons déjà expliqué auparavant que le récepteur aux œstrogènes réprime l'expression de *CYP1A1*, mais n'affecte pas l'expression de *CYP1B1* lorsque le récepteur AhR est activé (Marques *et al.* 2013). Nous avons vérifié si le MCPA était un agoniste de la voie de signalisation de ER en suivant l'expression des gènes *GREB1* et *TFF1*, tous deux inductibles par l'œstrogène. Dans les figures 28 à 30, nous notons que l'expression de *GREB1* et *TFF1* dans les cellules du cancer du sein est réprimée par rapport au témoin positif (traitement à l'œstradiol) lorsqu'on ajoute la dioxine ou le MCPA à sa plus forte concentration, sauf pour *GREB1* dans les cellules MCF-7. Il est difficile d'expliquer cette discordance, car les cellules étaient à leurs premiers passages, mais il est possible que dans cette lignée cellulaire l'expression du gène *GREB1* soit moins sensible à ces traitements que *TFF1*. Les résultats dans les deux lignées cellulaires se soutiennent par rapport à l'effet de répression de la dioxine en présence d'œstradiol sur le récepteur à l'œstrogène, qui était déjà connu, mais aussi à la capacité du traitement au MCPA NuFarm (à 3mM) de faire de même. Ce que nous pouvons

déduire de ces données est que le MCPA peut être un agoniste du récepteur ER, sauf à des concentrations très fortes de la formulation du pesticide appliquée en champ. Ces résultats pourraient expliquer la hausse de l'expression du gène *CYP1A1* vue plutôt dans les essais d'expression à la concentration de 3mM de MCPA NuFarm, étant donné que la répression du récepteur aux œstrogènes va annuler la répression du gène que l'on voit habituellement lors de l'interaction croisée entre les récepteurs AhR et ER. Comme mentionné auparavant, il est possible que les autres produits chimiques comme les adjuvants et les surfactants généralement ajoutés interagissent aussi avec la voie de signalisation du récepteur ER, ou d'une autre manière pouvant expliquer les données obtenues. L'expression des deux gènes cibles de ER était aussi plus faible lorsque le traitement à l'ingrédient actif était appliqué, mais pas de façon consistante ni significative. Cela pourrait être expliqué justement par les produits ajoutés dans la formulation complète utilisée en champs. Il faudra investiguer plus en profondeur afin de comprendre comment le MCPA par quels mécanismes il peut agir comme agoniste sur ce récepteur lors des traitements au MCPA.

4.7. Expression des gènes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA

À nouveau, nous avons utilisé les cellules LNCaP pour voir l'effet de cet herbicide sur la voie de signalisation aux androgènes. Pour tous les traitements au MCPA, qu'il soit en forme d'ingrédient actif ou de formulation complète, nous avons remarqué que l'expression de *PCA3* et *PSA* était nettement réprimée en présence de DHT. Nous avons été étonnés de voir ces résultats suggérant que l'herbicide pouvait affecter l'expression des gènes AR dépendants. Le TCDD aussi avait un effet d'inhibiteur de la voie de signalisation du récepteur aux androgènes similaire au MCPA. La dioxine a été suggérée comme apte à affecter des parties importantes du système reproducteur dans plusieurs animaux et même qu'elle pouvait cause une inhibition du récepteur AR (Jin *et al.* 2008). Nous avons vérifié les données obtenues dans une seconde lignée cellulaire du cancer de la prostate (VCaP) et les niveaux d'expression des deux gènes sont comparables au témoin négatif pour les traitements sans dihydrotestostérone. La même tendance est remarquée quant à l'effet du MCPA de la compagnie NuFarm, mais les résultats

diffèrent par rapport au traitement au TCDD en présence de dihydrotestostérone, et au traitement au MCPA obtenu de la compagnie Sigma. Donc, il y a certaines concordances et discordances entre les résultats des deux lignées cellulaires. Dans les deux lignées cellulaires prostatiques, nous apercevons que le MCPA NuFarm contre l'induction des deux gènes cibles due à l'activation du récepteur AR par la DHT. Par contre, les résultats dans les LNCaP (figures 32 et 33) semblent indiquer que l'ingrédient actif seul peut aussi causer cette inhibition, alors que ce qui est vu dans les VCaP dévoile l'inverse (Fig. 34 et Fig. 35). Étant donné que les tests d'expression n'ont été faits qu'une seule fois, il est préférable de faire confiance aux données des LNCaP répétées deux fois. Ces données demeurent toutefois très intéressantes, car plusieurs pesticides ont déjà été signalés comme des perturbateurs potentiels AR, mais ce serait la première indication de MCPA en être un. Plus de recherche devra être exécutée par rapport au récepteur aux androgènes, surtout dans le contexte actuel où un nombre grandissant d'hommes souffre de problèmes au niveau de leurs systèmes reproducteurs.

4.8. Expression des enzymes cible du récepteur AR suite au traitement au MCPA

Comme pour nos résultats d'expression dans les cellules du cancer du sein, nous avons vérifié en immunobuvardage ceux obtenus dans les cellules prostatiques. Contrairement à ce qu'on a vu dans les résultats d'expression des gènes cible de AR auparavant, le MCPA, l'ingrédient actif seul, semble inhiber que légèrement l'expression du récepteur AR à la plus forte concentration (3mM). L'expression du récepteur AR par les échantillons traités à la dioxine en présence ou absence de DHT demeure inchangée. Sachant que ces gènes sont dépendants de l'activation du récepteur, les différences entre les résultats d'expression des gènes cibles et ceux d'immunobuvardage constatés dans les expériences d'expression pourraient signifier que le pesticide interfère plutôt avec la signalisation ainsi que l'expression d'AR en soi.

Cela indiquerait plutôt que le récepteur AhR est encore plus présent et sa voie de signalisation risque d'être plus activée, afin de détoxifier les cellules des produits xénobiotiques. On ne voit pas la même chose pour le TCDD, même si nous savons qu'il induit fortement la signalisation

d'AhR. La dioxine ne semble pas changer l'expression du récepteur, en concordance avec la littérature qui indique que la dioxine ne va pas altérer l'activité d'AR, ni son activité (Björk et Giwercman, 2013). Nos résultats indiquent quand même une modulation de sa signalisation, mais nous n'avons pas d'explications tant qu'au pourquoi nous observons cela. Évidemment, plus d'expériences pour vérifier nos résultats et essayer de comprendre les mécanismes derrière les effets observés sur cette voie de signalisation cellulaire sont nécessaires.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

En prenant en compte tous les résultats obtenus et discutés plus haut, nous pouvons en venir à plusieurs conclusions. Notre objectif était de voir si l'imidaclopride et le MCPA pouvaient être des perturbateurs des voies de signalisation des récepteurs AhR et AR. L'imidaclopride ne semblait pas affecter la croissance de la levure, ni l'expression des gènes cible de AR. Par ailleurs, l'insecticide n'apparaît pas comme ayant un effet sur la voie de signalisation du récepteur à la dioxine. Nous n'avons pas poussé et regardé si les enzymes étaient en fait différemment exprimées en immunobuvardage de type Western, mais il aurait été intéressant de vérifier les niveaux des enzymes CYP1A1 et CYP1B1. De plus, nous n'avions pu obtenir que l'imidaclopride en ingrédient actif seul et non pas la formulation complète utilisée en champ. Comme les résultats du MCPA variaient entre l'ingrédient actif et la formulation complète, il est impératif de voir si cela serait le cas avec l'imidaclopride. Pour en revenir aux résultats du MCPA, cet herbicide perturbe décidément les deux voies auxquelles nous nous intéressions. Le fait que le pesticide appliqué en champ affectait nettement la voie des récepteurs AR et AhR a été le plus intéressant, car l'ingrédient actif n'avait pas le même potentiel comme perturbateur. Le pesticide obtenu de NuFarm à la plus forte concentration cause un changement d'expression dans l'expression des enzymes détoxifiantes du cytochrome P450. En présence d'œstradiol, une plus forte présence de CYP1B1 métabolise plus de 4-hydroxyœstradiol par rapport au 2-hydroxyœstradiol produit par CYP1A1, se traduisant par une accumulation de la forme génotoxique qui peut causer des adduits à l'ADN. Pour extrapoler cette remarque, l'exposition des femmes à ce pesticide pourrait possiblement accroître leur risque d'accumuler ces métabolites et de développer des cancers. Du côté des hommes, nos résultats dans les cellules du cancer de la prostate suite au traitement à l'herbicide appliqué en champ nous indiquaient que la signalisation d'AR était inhibée. Troublés par ces résultats, nous avons vérifié l'expression même du récepteur et noté qu'il était moins présent lors du traitement à forte concentration de MCPA NuFarm. Étant donné

que nos résultats d'expression n'ont été faits que deux fois en LNCaP et qu'ils ne concordaient pas exactement avec ce qui a été noté en VCaP, nous devons le faire à nouveau pour être sûrs. Il demeure que ce qui a été obtenu comme données est intrigant, car une signalisation plus faible de ce récepteur peut signifier des problèmes de sexualité chez les hommes. De plus, la baisse de testostérone qui est de plus en plus marquée chez les hommes plus jeunes joue déjà sur leur santé. Les hommes plus exposés aux pesticides pourraient possiblement ajouter un autre facteur de risque affectant leur désir sexuel et le bon fonctionnement de leurs organes génitaux (Rider *et al.* 2010).

Les doses utilisées dans nos expériences sont nettement plus fortes à celles auxquelles la population est exposée, mais il est important de connaître le potentiel de ces produits chimiques. Plusieurs pesticides ont été pointés du doigt comme étant des perturbateurs endocriniens entre autres, mais demeurent en usage extensif. De plus, la bioaccumulation est un facteur peu pris en compte lors des études sur les pesticides sur la santé humaine à long terme. Ces produits peuvent s'accumuler dans les gras et affecter la signalisation cellulaire et affecter le bien-être des personnes. Finalement, les produits de lutte antiparasitaires sont constamment utilisés dans l'industrie agricole, et se retrouvent dans la nourriture et l'eau de la population du Québec. Plus d'études afin de comprendre leurs effets à long terme sont nécessaires ainsi qu'un meilleur encadrement au niveau de leur utilisation. Des mesures comme l'interdiction d'utiliser des néonicotinoïdes, comme l'imidaclopride, en traitements préventifs par le gouvernement du Québec sont un pas dans la bonne direction.

ANNEXE

Collaboration à la publication de Dr. Maud Marques

J'ai effectué des expérimentations demandées par les éditeurs du journal BMC Cancer qui ont permis la publication de l'article de Dr. Maud Marques (Marques *et al.* 2014). J'ai fait des immunobuvardages de type Western afin de vérifier si les protéines CYP1A1, p21, GREB1 et TFF1 étaient présentes de la manière indiquée par les résultats d'expression de ces mêmes gènes. Cela a été fait dans trois lignées cellulaires de cancer du sein, deux lignées ER positives (MCF-7 et T47D) et une lignée ER négative (MDAMB-23). De plus, des expériences de cytométrie de flux ont été réalisées afin de suivre la croissance cellulaire suite au traitement des cellules au 3,3'-diindolylméthane (DIM). Les figures ci-bas sont celles auxquelles j'ai collaboré.

Référence: Marques, M., Laflamme, L., Benassou, I., Cissokho, C., Guillemette, B., & Gaudreau, L. (2014). Low levels of 3,3'-diindolylmethane activate estrogen receptor α and induce proliferation of breast cancer cells in the absence of oestradiol. BMC Cancer, 14, 524.

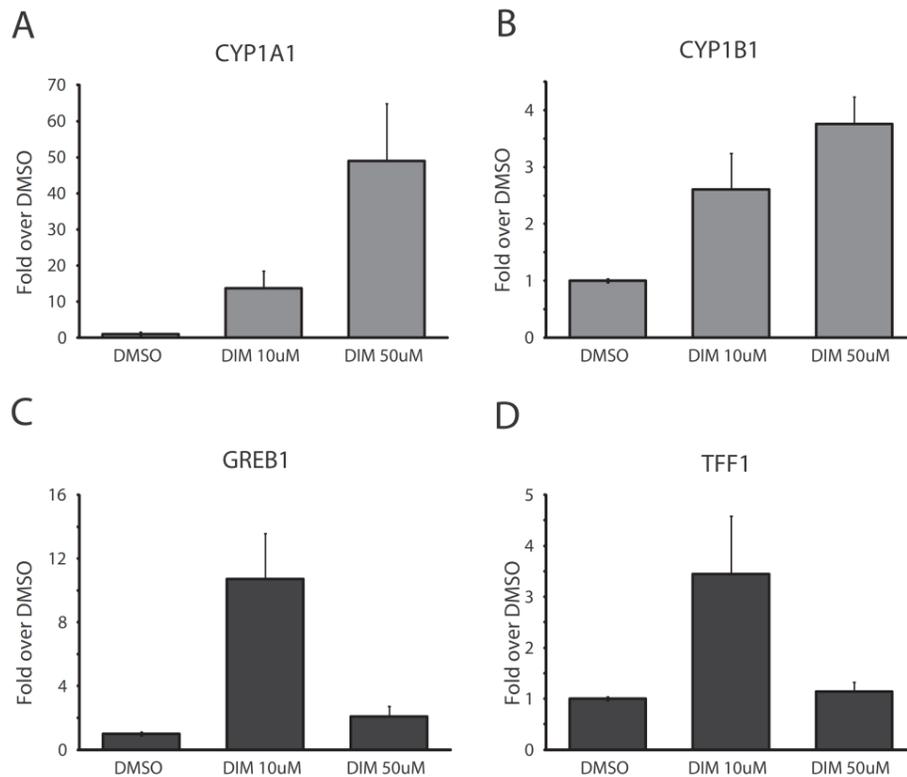


Figure 37: Figure 3 de Marques *et al.* 2014.

Effects of different concentrations of DIM on AhR et ERα target gene expression. mRNA levels of AhR target genes CYP1A1 (A) et CYP1B1 (B) et ERα target genes GREB1 (C) et TFF1 (D) were quantified in MCF7 cells grown in estrogen-free media for three days, then treated with DMSO, 10 μM DIM or 50 μM DIM for 24 h. Results are shown as fold over DMSO et represent the mean of three independent experiments with standard deviation. »

FIGURE S1

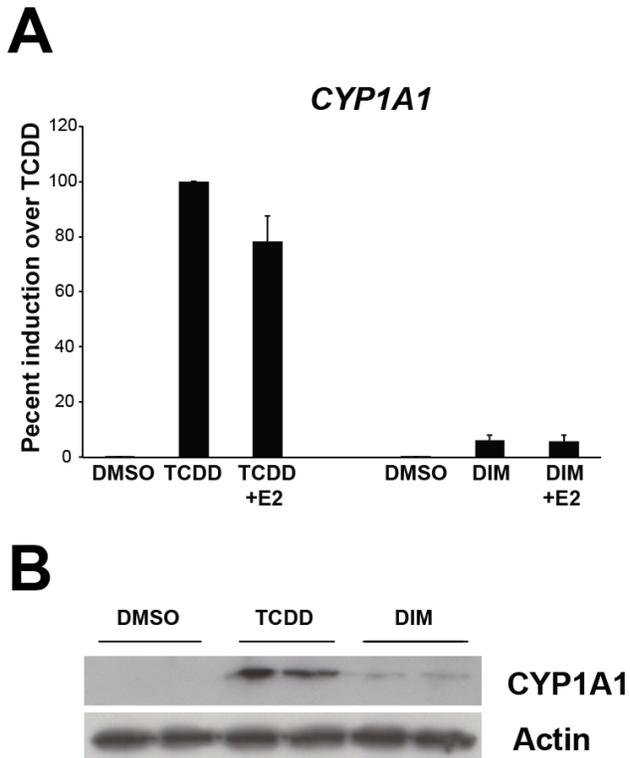


Figure 38 : Figure supplémentaire 1 de Marques *et al.* 2014.

(A) DIM activates both AhR and ER signaling pathways in T47D cells. Cells were grown in estrogen free media for 3 days, then treated with DMSO, 10nM TCDD, 10nM TCDD +100nM E2, 50 μ M DIM or 50 μ M DIM + 100nM E2. After 24 h, the cells were lysed, RNA was extracted et reverse transcribed. Results are presented as percent induction over TCDD. Results represent the mean of 3 independent experiments with standard deviation. (B) CYP1A1 protein levels are induced by treating cells with 10 μ M DIM. Immunoblot of CYP1A1 using an anti-CYP1A1 antibody in T47D cells. Conditions are as described in (A) using 10 μ M DIM or DMSO-treated cells.

Figure S3

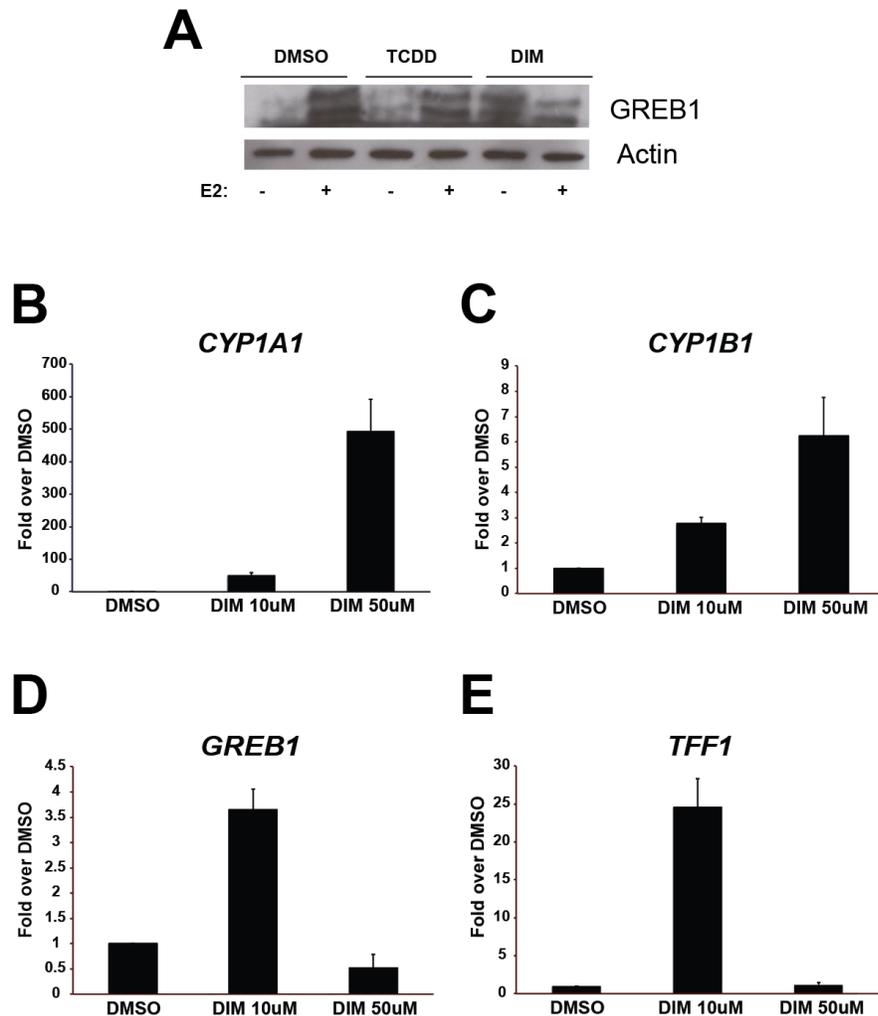


Figure 39 : Figure supplémentaire 3 de Marques *et al.* 2014.

Effects of different concentrations of DIM on AhR et ER α target gene expressions. Protein levels of GREB1 are monitored by immunoblotting (A), mRNA levels of AhR target genes CYP1A1 (B) et CYP1B1 (C) et ER α target genes GREB1 (D) et TFF1 (E) were quantified in T47D cells grown in estrogen free media for 3 days, then treated with DMSO, 10uM DIM or 50uM DIM for 24 h. Results are showed as fold over DMSO et represent the mean of 3 independent experiments with standard deviation.

FIGURE S6

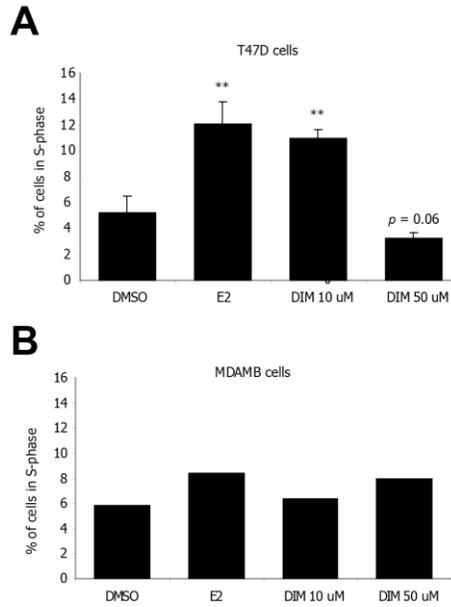


Figure 40: Figure supplémentaire 6 de Marques *et al.* 2014. FACS analysis of cells treated with either 10 or 50 μ M DIM. (A) T47D or (B) MDAMB-231 cells. Bar plot shows the percentage of S-phase cells in each sample.

BIBLIOGRAPHIE

Alexander, A.C., Culp, JM, Liber, K, Cessna, A.J. (2007). Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in Mayflies and Oligochaetes, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 26, no 8, p. 1726-1732.

Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y. (2005). Intrinsic function of the arylhydrocarbon (dioxin). receptor as a key factor in female reproduction *MolCell Biol*25, 10040-51

Barhooover, M.A., Hall, J.M., Greenlee, W.F., Thomas R.S. 2010. Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol. Pharmacol.* 77:195–201

Beischlag, T.V., Wang, S., Rose, D.W., Torchia, J., Reisz-Porszasz, S., Muhammad, K., Nelson, W.E., Probst, M.R., Rosenfeld, M.G., Hankinson, O. (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol. Cell. Biol.* 22:4319–33

Bergander, L., Wincent, E., Rannug, A., Foroozesh, M., Alworth, W., Rannug, U. (2004). Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem. Biol. Interact.* 149:151–64

Björk, C., Giwercman, Y.L. (2013). Androgen receptor CAG repeat length modifies the effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on receptor activity in human prostate cells. *Reprod Toxicol.* Jan;35:144-9.

Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P., Chagnon M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to Neonicotinoïds, Atrazine and Glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 20, no 8, p. 5603-5614.

Brinkmann, A.O. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*; 179: 105–9.

Cancer de la prostate Canada (2015). Notions de base. <http://www.prostatecancer.ca/Prostate-Cancer/About-Prostate-Cancer/What-is-the-prostate#.VhPoIvIViko>

Cancer de la prostate Canada (2015). Test de l'APS. http://www.prostatecancer.ca/Prostate-Cancer/Testing-and-Diagnosis/The-PSA-Test#.VhPp9_IVikp

Chang, C., Saltzman, A., Yeh, S., Young, W., Keller, E., Lee, H.J., Wang, C., Mizokami, A. (1995). Androgen receptor: an overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*;5(2):97-125.

Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C. and Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 61, 3942–3948.

Cribb, A.E., Knight, M.J., Dryer, D., Guernsey, J., Hender, K., Tesch, M., Saleh, T.M. (2006). Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 551–558

Currier, N., Solomon, S.E., Demicco, E.G., Chang, D.L., Farago, M., Ying, H., Dominguez, I., Sonenshein, G.E., Cardiff, R.D., Xiao, Z.X., Sherr, D.H., Seldin, D.C. (2005). Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicol. Pathol.* 33, 726–737

Dohle, G.R., Smit, M., Weber, R.F. (2003). Androgens and male fertility. *World J. Urol.* 21, 341–345.

Dubik, D., Dembinski, T.C., Shiu, R.P. (1987). Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.*;47:6517–6521

Environnement Canada (1999). Les insecticides -- En attendant le violoneux, les pesticides et l'environnement dans les provinces de l'Atlantique.
<http://www.parl.gc.ca/HousePublications/Publication.aspx?DocId=1031697&Mode=1&Parl=36&Ses=2&Language=F&File=42#N20>

Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E. (2003). 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat. Res.* 531, 127–139

Frericks, M., Meissner, M., Esser, C., (2007). Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220:320–32

Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 270:29270–78

Gill, R.J., Ramos-Rodriguez O., Raine N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual and colony-level traits in bees, *Nature*, vol. 491, no 7422, p. 105-119.

Giroux, I. (2015). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014, Québec, ministère du Développement durable, de

l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement, ISBN . 978-2-550-73603-5, 47 p. + 5 ann.

Giroux, I., Sarrasin B. (2011). Pesticides et nitrates dans l'eau souterraine près de cultures de pommes de terre – Échantillonnage dans quelques régions du Québec en 2008 et 2009, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ISBN 978-2-550-61396-1, 31 p. 5 annexes.

Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, p. 1-11.

Gouvernement du Canada (2009). Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. La réglementation des pesticides au Canada.
http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/alt_formats/pdf/pubs/pest/_fact-fiche/regulation-Pesticides-reglementation-fra.pdf

Gouvernement du Canada, Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA). (2002). Loi sur les produits antiparasitaires. L.C. 2002, ch. 28. <http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/P-9.01.pdf>

Gouvernement du Canada (2000). Rapport du Comité permanent de l'environnement et du développement durable. Parlement du Canada, Mai.
<http://www.parl.gc.ca/HousePublications/Publication.aspx?Language=f&Mode=1&Parl=36&Ses=2&DocId=1031697>

Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.A., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., Neckers, L.M., Toft, D.O. (1997). The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90). that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.* 272:23843–50

Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., Bradfield, C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:519–61

Hahn, M.E., Karchner, S.I., Shapiro, M.A., Perera, S.A. (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin). receptors (AHR1 and AHR2). and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13743–48

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR*, 13(4), 215.

Holsapple, M.P., Morris, D.L., Wood, S.C., Snyder, N.K. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: possible mechanisms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:73–100

Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E.A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W.B., Nelson, P.S., Bluemn, E., Plymate, S.R., Luo, J. (2012). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* Jul 15;72(14):3457-62.

Huggins, C. (1967) Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Res*; 27: 1925–30.

Hwang, I., Lee, J.W., Kim, J.S., Gil, H.W., Song, H.Y., Hong, S.Y. (2015) Surfactant toxicity in a case of (4-chloro-2-methylphenoxy) acetic acid herbicide intoxication. *Hum Exp Toxicol.* Aug;34(8):848-55.

Ingelman-Sundberg, M. (2004). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 193–200.

Ito, S., Chen, C., Satoh, J., Yim, S., Gonzalez F.J. (2007). Dietary phytochemicals regulate whole-body CYP1A1 expression through an arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-dependent system in gut. *J. Clin. Investig.* 117:1940–50

Jin, M.H., Ko, H.K., Hong, C.H., Han, S.W. (2008) In utero exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin affects the development of reproductive system in mouse. *Yonsei Med J.* Oct 31;49(5):843-50.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. and Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-4

Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregoro, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., Jilka, R.L. and Manolagas, S.C. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719-30.

Kugathas, S., Audouze, K., Ermler, S., Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., & Kortenkamp, A. (2015). Effects of Common Pesticides on Prostaglandin D2 (PGD2) Inhibition in SC5 Mouse Sertoli Cells, Evidence of Binding at the COX2 Active Site, and Implications for Endocrine Disruption. *Environ Health Perspect.* 2015 Sep 11.

Kundu, P., Pettersson, S. Immunology: Mammalian watchdog targets bacteria. *Nature* Aug 28;512(7515):377-8. doi: 10.1038/nature13741.

L'Héritier, F., Marques, M., Fauteux, M., Gaudreau, L. (2014). Defining molecular sensors to assess long-term effects of pesticides on carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* Sep 25;15(9):17148-61.

LeBlanc, H.M., Culp, J.M., Baird, D.J., Alexander, A.C., Cessna, A.J. (2012). Single versus combined lethal effects of three agricultural insecticides on larvae of the freshwater insect *Chironomus dilutus*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 63, p. 378-390.

Liehr, J.G. and Ricci, M.J. (1996). 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 3294–3296.

Lonergan, P.E, Tindall, D.J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.*;10:20.

Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 175:221–30

Marques, M., Laflamme, L., Benassou, I., Cissokho, C., Guillemette, B., Gaudreau, L. (2014) Low levels of 3,3'-diindolylmethane activate estrogen receptor α and induce proliferation of breast cancer cells in the absence of α estradiol. *BMC Cancer*. Jul 21;14:524.

Marques, M., Laflamme, L., Gaudreau, L. (2013) Estrogen receptor α can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. *Nucleic Acids Res. Sep*;41(17):8094-106.

Martenies, S.E., Perry, M.J. (2011) Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: A systematic review. *Toxicology*, Volume 307, Issue null, Pages 66-73

Martucci, C.P. and Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol. Ther.*, 57, 237–257.

Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J. and Gustafsson, J. A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor α to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters *Mol Cell Biol* 25, 5317-5328.

Matthews, J., Gustafsson, J.A. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal*. 2006;4:e016. Epub 2006 Jul 7

Meyer, B.K., Perdew, G.H. (1999). Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 38:8907–17

Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., Bradfield, C.A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.*185:3190–98

Ministère du développement durable, environnement et lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) (2014). À propos des pesticides. <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/apropos.htm>

Ministère du développement durable, environnement et lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) (2012). Bilan des ventes de pesticides au Québec. <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/bilan/index.htm>

Miniero, R., De Felip, E., Ferri, F., di Domenico, A. (2001). An overview of TCDD half-life in mammals and its correlation to body weight. *Chemosphere* 43:839–44

Moura-Alves, P., Faé, K., Houthuys, E., Dorhoi, A., Kreuchwig, A., Furkert, J., Barison, N., Diehl, A., Munder, A., Constant, P., Skrahina, T., Gühlich-Bornhof, U., Klemm, M., Koehler, A.B., Bandermann, S., Goosmann, C., Mollenkopf, H.J., Hurwitz, R., Brinkmann, V., Fillatreau, S., Daffe, M., Tümmler, B., Kolbe, M., Oschkinat, H., Krause, G., Kaufmann, S.H. (2014). AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*. Aug 28;512(7515):387-92.

Nebert, D. W. & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155–1162

Nebert, D.W., Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. Dec;6(12):947-60.

Nguyen, L.P., Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 21:102–16

NIH Genetics Home Reference (2015). Androgen Receptor. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/AR>

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550

Okino, S.T., Whitlock, J.P. Jr. (1995). Dioxin induces localized, graded changes in chromatin structure: implications for Cyp1A1 gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 15:3714–21

Omura, T. & Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375–1376

Parlement du Canada (2000). Historique de l'utilisation des pesticides. <http://www.parl.gc.ca/HousePublications/Publication.aspx?DocId=1031697&Mode=1&Parl=36&Ses=2&Language=F&File=36>

Pongratz, I., Mason, G.G., Poellinger, L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 267:13728–34

Prensner, J.R., Chinnaiyan, A.M. (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* Oct;1(5):391-407.

Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C., Knudsen, E.S., Maier, M.A. (2000). Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 275, 2943–2950

QIAGEN (2015). SABiosciences Pathway Central. Androgen Signalling.
http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Androgen_Signaling

Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H.S., Winqvist, L., Westerholm, R. (1987). Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262:15422–27

Rider, C.V., Furr, J.R., Wilson, V.S., Gray, L.E. Jr. (2010) Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl.* Apr;33(2):443-62.

Ritter, L., Blair, A., Kerkvliet, N.I., Sigal, E.A., Stellman, J.M. (2013). Le rapport du Comité indépendant d'enquête sur l'herbicide 2, 4, 5-T: rapport final. Gouvernement de l'Ontario.
<https://dr6j45jk9xcmk.cloudfront.net/documents/2864/the-panel-report-f-online-w-errata.pdf>

Safe, S. and Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor α cross-talk and mechanisms of action *Chem Res Toxicol* 16, 807-16.

Santé Canada (2010)., Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique — acide (4-chloro-2-méthylphénoxy)acétique (MCPA). Bureau de l'eau, de l'air et des changements climatiques, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario). (No de catalogue H128-1/10-620F-PDF).

Santé Canada (2014). Update on Neonicotinoid Pesticides and Bee Health
http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/_fact-fiche/neonicotinoid/neonicotinoid-eng.php#a2

Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. and Bradfield, C.A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6731-6

Shertzer, H.G., Senft, A.P. (2000). The micronutrient indole-3-carbinol: implications for disease and chemoprevention. *Drug Metab. Drug Interact.* 17:159–88

Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95:1–6

Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:403-32.

Stokstad, E. & Grullon, G. (2013). Infographic : pesticide planet *Science.* Aug 16;341(6147):730-1. doi: 10.1126/science.341.6147.730.

Syme, A., & Wansbrough, H. (1998). The Production of Phenoxy Herbicides. *Chemical Processes in New Zealand*, 1J 1-8. Retrieved from <http://www.nzic.org.nz/>

Tan, M.H., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E.L. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* Jan;36(1):3-23.

Tian, Y., Ke, S., Chen, M., Sheng, T. (2003). Interactions between the aryl hydrocarbon receptor and P-TEFb. Sequential recruitment of transcription factors and differential phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II at *cyp1a1* promoter. *J. Biol. Chem.* 278:44041–48

Travison, T. G., Araujo, A. B., O'Donnell, A. B., Kupelian, V., & McKinlay, J. B. (2007). A population-level decline in serum testosterone levels in American men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(1), 196-202.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M. and Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.*, 227, 115–124.

UniProt - The Universal Protein Resource (2016). SIM1 – Single-Minded Gene and Protein. http://www.uniprot.org/uniprot/P81133#section_comments

Van Der Sluijs, J.P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bijleveld Van Lexmond, M.F.I.J., Bonmatin, J-M., Chagnon, M., Downs, C.A, Furlan, L., Gibbons, D.W, Giorio, C., and *al.* (2014). Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of Neonicotinoids and Fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. Editorial, *Environmental Science and Pollution Research*.

http://www.lpo.fr/images/Presse/cp/2014/impact_pesticides/WIA_The_following_is_a_summary_of_the_conclusions_chapter_that_will_appear_in_Environmental_Sciences_and_Pollution_Research.pdf.

Wang, S. and Hankinson, O. (2002). Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex. *J. Biol. Chem.* 277:11821–27

Wang, S., Ge, K., Roeder, R.G., Hankinson, O. (2004). Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 279:13593–600

Watts, M. (2011). Pesticide Action Network Asia and the Pacific: Neonicotinoids. <http://www.panna.org/sites/default/files/PAN%20AP%20pesticides-factsheet-hhps-neonicotinoids.pdf>

Weizmann Institute of Science (2016). Gene Cards, Human Gene Database. AhR gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AHR>

Weizmann Institute of Science (2015). Gene Cards, Human Gene Database. KLK3 gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLK3>

Weizmann Institute of Science (2015). Gene Cards, Human Gene Database. PCA3 gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PCA3&keywords=pca3>

Weizmann Institute of Science (2016). Gene Cards, Human Gene Database. SIM1 gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIM1>

Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*. Apr 20;336(6079):351-2. doi:

Williams, R. T. (1971). The metabolism of certain drugs and food chemicals in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 179, 141–154

Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J. Biol. Chem.* 284:2690–96

