

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**L'INFLUENCE DES INSECTICIDES NÉONICOTINOÏDES SUR LA
STÉROÏDOGENÈSE DANS DEUX MODÈLES CELLULAIRES HUMAINS
EN CO-CULTURE PHYSIOLOGIQUEMENT PRÉSENTATIFS**

Par
Rachel Viau

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

DÉPÔT FINAL: 14 DÉCEMBRE 2018

Jury d'évaluation

Président du jury et
examinateur interne

Denis Girard
INRS – Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Marc-André Verner
Institut de Recherche en Santé Publique
Université de Montréal

Directeur de recherche

J. Thomas Sanderson
INRS – Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens à grandement remercier mon directeur de recherche Thomas Sanderson ainsi que ma collègue et ancienne superviseure de stages Élyse Caron-Beaudoin pour leurs aides et supports tout au long de mon séjour à l'INRS depuis ces quatre dernières années. Ils m'ont grandement inspiré dans mon cheminement professionnel et personnel. Merci de m'avoir introduit au monde de la toxicologie et de l'endocrinologie, pour m'avoir intégré dans votre équipe et vos recherches. Ma première expérience de stage de premier cycle en 2014 m'a vraiment donnée une ouverture et une confiance que je n'avais pas. Je vous remercie de m'avoir accueilli très chaleureusement dès le début et de m'avoir fait confiance pour poursuivre ces projets avec les années.

Je tiens aussi à remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) et à l'INRS pour m'accorder une bourse de maîtrise lors de ma deuxième année du programme. Je vais toujours en être reconnaissante de cet honneur et opportunité.

Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire de Thomas Sanderson, notamment Debbie Yancu, Andrée-Anne Hudon-Thibeault, Hélène Clabault et Hossam Draz. Merci à Debbie pour son travail et sa collaboration pour le développement de la nouvelle co-culture cellulaire. Cette nouvelle co-culture n'aurait pas pu être développée aussi rapidement et efficacement sans toi ! Un gros merci au personnel présent et précédent du laboratoire de Cathy Vaillancourt dont Josianne Bienvenue-Pariseault, Joey St-Pierre, Fatma Kharrat, Lucas Fagundes, Marc Fraser, Eugênia Assunção, Laetitia Laurent et Philippe Wong-Yen pour leurs amitiés et leurs aides lors de mon séjour dans le laboratoire et à l'institut. Je suis contente que nos chemins se sont croisés et je souhaite beaucoup de succès et de plaisirs dans vos projets futurs.

J'aimerais bien remercier mes amis de longues dates Emilie, Ryan, Gabrielle, Pascal et Josianne pour leurs amitiés et conseils lors de moments difficiles lors des études. Merci à mes amis scientifiques pour comprendre davantage la réalité et les difficultés d'être en recherches fondamentales, mais surtout pour s'encourager à réussir. Je vous remercie de croire en moi pour mon choix de carrière ainsi que pour être présents même si nous ne sommes pas toujours physiquement proches ! Merci à Josianne pour vouloir habiter avec moi lors de mon séjour à la maîtrise. Merci pour ta confiance et ton amitié. Merci pour nos bons moments ensemble, mais surtout pour notre passion pour le cinéma, Jake G., la musique, Winners et les chats (surtout à ton adorable Gizmo qui m'a adopté comme son deuxième humain).

Dernièrement et non le moindre, je tiens à remercier énormément ma famille et mon conjoint Etienne pour leur amour et soutien lors de mon séjour à l'INRS depuis ma première expérience de stage en 2014. Merci de me soutenir dans mon choix de carrière et parcours académique malgré les défis et obstacles. Merci de croire en moi et de m'inspirer de devenir la meilleure personne que je peux devenir. Un énorme merci à mes grands-parents Françine et Yves pour m'avoir logé et nourri lors de mes stages d'été de 2014 à 2016 ainsi que pour mes derniers mois de maîtrise à la suite de mon déménagement en juillet. Merci à vous tous pour votre présence et disponibilités malgré les complications et les limites d'être à correspondance. Malgré le kilométrage entre Laval-Ottawa, Laval-Borden et Laval-Valcartier pendant ces trois dernières années, je ne suis pas sentie seule. Merci infiniment.

Je vous aime tous.

RÉSUMÉ

Il existe des preuves croissantes qui démontrent que les humains sont constamment exposés à des composés chimiques perturbateurs endocriniens via l'alimentation et l'environnement. Une nouvelle classe majeure d'insecticides utilisés dans le monde pour la protection des cultures agricoles, nommée les néonicotinoïdes, est de plus en plus présent dans l'environnement. Le thiamethoxame, le thiaclopride et l'imidaclorpride sont les plus couramment utilisés sur le marché. Leurs persistances et applications posent plusieurs inquiétudes pour la santé humaine. Les perturbateurs endocriniens sont connus pour affecter les processus hormonaux qui pourraient causer des problèmes à la reproduction, des toxicités ainsi que de promouvoir certains cancers, comme le cancer du sein hormono-dépendant. L'aromatase (CYP19) est une enzyme clé de la synthèse des œstrogènes, où le gène est exprimé de façon promoteur- et tissu-spécifique. Cette enzyme peut être problématique dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant puisque la progression est basée sur la surproduction d'œstrogènes des cellules stromales aux alentours des tumeurs. L'aromatase est aussi essentielle au bon développement fœtal lors de la grossesse en assurant les communications complexes entre la mère, le placenta et le fœtus. L'objectif de cette étude était de démythifier les mécanismes que les insecticides néonicotinoïdes utilisent pour causer leurs effets potentiels perturbateurs endocriniens dans deux modèles de co-cultures distinctes et physiologiquement représentatives. En premier lieu, nous avons clarifiés les mécanismes par lesquels ces contaminants perturbent la biosynthèse de l'œstriol dans un modèle de co-culture fœto-placentaire utilisant les lignées cellulaires BeWo (placentaires) et H295R (surrénale fœtale). Notre deuxième objectif était de développer un nouveau modèle de co-culture représentant le microenvironnement stroma-tumoral d'un cancer du sein œstrogène-dépendant en utilisant les lignées cellulaires Hs578t (stromales mammaires) et T-47D (cancer du sein hormono-dépendant). Le premier modèle préétabli de l'unité fœto-placentaire a été appliqué comme outil de dépistage et de recherches mécanistiques pour les insecticides néonicotinoïdes. Les cellules Hs578t et T-47D pour le nouveau modèle ont été profilées par RT-qPCR pour l'expression des enzymes stéroïdogéniques. Les données préliminaires par expression génique (RT-qPCR) et prolifération cellulaire de T-47D en réponse aux œstrogènes (WST-1) valident la pertinence des deux types cellulaires pour ce modèle d'étude. Les premiers résultats obtenus en co-cultures suggèrent que les deux compartiments communiquent comme on observe chez des patients, ce qui valide leurs pertinences physiologiques. Le nouveau modèle requiert encore plusieurs optimisations et caractérisations. Le raffinement des conditions expérimentales va permettre l'utilisation de ce modèle comme outil de recherches fondamentales et appliquées pour évaluer davantage le potentiel perturbateur endocrinien des insecticides néonicotinoïdes.

Mots clés : Insecticides néonicotinoïdes; co-culture cellulaires; stéroïdogenèse; aromatase (CYP19); unité fœto-placentaire; cancer du sein hormono-dépendant

ABSTRACT

There is increasing evidence that humans and wildlife are continuously exposed to endocrine disrupting chemicals through their diet and environment. Neonicotinoids are a new group of insecticides used in crop protection and are increasingly present in our environment. Thiamethoxam, thiacloprid and imidacloprid are the most commonly used neonicotinoids on the market. Their use and persistence in the environment pose several concerns for human health. Endocrine disruptors are known to disrupt hormonal processes that may cause reproductive problems, developmental toxicities and promote endocrine cancers such estrogen-dependent breast cancer. Aromatase (CYP19) is a key enzyme in estrogen biosynthesis and its gene expression is tissue and promoter-specific. Aromatase activity is increased in hormone-dependent breast cancer and stimulates its progression due to the overproduction of estrogens in the stromal cells surrounding the tumors. Aromatase is also essential for fetal development during pregnancy by mediating the complex hormonal interactions between the mother, the placenta and the fetus. The main objective of this study was to elucidate potential endocrine disrupting mechanisms of neonicotinoid insecticides using two distinct physiologically relevant cellular co-culture models. As a first objective, we clarified the mechanism by which neonicotinoids differentially altered estradiol and estriol biosynthesis in a fetoplacental co-culture using BeWo (placental) and H295R (fetal adrenal) human cell lines. Our second objective was to develop a new co-culture model recreating the stromal-tumoral microenvironment found in estrogen-dependent breast cancer using the human cell lines Hs578t (mammary stromal) and T-47D (hormone-dependent breast cancer). The pre-established fetoplacental model was applied as a tool for mechanistic studies of the endocrine disrupting effects of neonicotinoid insecticides. The Hs578t and T-47D cell lines for the new co-culture model were profiled for the presence of steroidogenic enzymes by quantitative RT-qPCR. The gene expression (RT-qPCR) profile of the two cell types and T-47D cell proliferation in response to estrogenic compounds was consistent with that of human breast cancer patients, thus validating the physiological relevance of this co-culture model. The new model still requires further optimisation and characterization. The refinement of this novel co-culture model will allow it to be used as a physiologically relevant tool for fundamental and applied research to further assess the endocrine disrupting potential of neonicotinoid insecticides and other environmental chemicals.

Key words : Neonicotinoid insecticides; cellular co-cultures; steroidogenesis; aromatase (CYP19); fetoplacental unit; hormone-dependent breast cancer

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION.....	XVII
1 CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	XVIII
1.1 PROBLÉMATIQUES	19
1.1.1 <i>Contaminants environnementaux : Les perturbateurs endocriniens</i>	19
1.1.2 <i>Les insecticides néonicotinoïdes</i>	20
1.1.3 <i>Les environnements endocriniens humains</i>	22
1.1.4 <i>Les évaluations du risque toxicologiques et ses limites</i>	38
1.2 SOLUTIONS ALTERNATIVES IN VITRO	42
1.2.1 <i>Les modèles cellulaires en mono-cultures</i>	42
1.2.2 <i>Les modèles cellulaires en co-cultures</i>	43
1.2.3 <i>Les modèles cellulaires en trois dimensions</i>	44
1.2.4 <i>Recréer des microenvironnements endocriniens physiologiquement représentatifs</i>	46
1.3 LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	50
1.3.1 <i>L'unité féto-placentaire</i>	50
1.3.2 <i>Cancer du sein hormono-dépendant</i>	51
1.4 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	52
1.4.1 <i>Hypothèses</i>	52
1.4.2 <i>Objectifs</i>	52
1.5 IMPORTANCE DU PROJET	52
2 CHAPITRE 2:.....	55
ARTICLE : THE USE OF A UNIQUE CO-CULTURE MODEL OF FETOPLACENTAL STEROIDOGENESIS AS A SCREENING TOOL FOR ENDOCRINE DISRUPTORS: THE EFFECTS OF NEONICOTINOIDS ON AROMATASE ACTIVITY AND HORMONE PRODUCTION	55
2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	56

2.2	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE	57
2.3	INTRODUCTION.....	59
2.4	MATERIALS AND METHODS.....	61
2.4.1	<i>Chemicals</i>	61
2.4.2	<i>Feto-placental co-culture</i>	62
2.4.3	<i>CYP19 catalytic activity</i>	62
2.4.4	<i>Hormone quantification</i>	63
2.4.5	<i>RNA isolation and quantitative RT-PCR</i>	63
2.4.6	<i>Statistical analysis</i>	64
2.5	RESULTS.....	64
2.5.1	<i>Effects of neonicotinoids on CYP19 catalytic activity</i>	64
2.5.2	<i>Effects of neonicotinoids on hormone production</i>	65
2.5.3	<i>Effects of neonicotinoids on mRNA levels of CYP3A7 and SULT2A1</i>	66
2.6	DISCUSSION	74
2.6.1	<i>Fetoplacental co-culture as a screening tool for endocrine disrupting chemicals</i>	74
2.6.2	<i>Disruption of fetoplacental steroidogenesis by neonicotinoid insecticides</i>	75
2.6.3	<i>Possible metabolism of neonicotinoids by fetal CYP3A7</i>	76
2.6.4	<i>Implications for human health</i>	77
2.7	CONCLUSIONS	78
2.8	CONFLICTS OF INTEREST	78
2.9	ACKNOWLEDGMENTS.....	78
2.10	REFERENCES.....	79
3	CHAPITRE 3 :	87
DEVELOPPEMENT DU NOUVEAU MODELE DE CO-CULTURE REPRESENTANT LE MICROENVIRONNEMENT STROMA/TUMORAL DANS LE CANCER DU SEIN HORMONO- DEPENDANT		87
3.1	RÉSUMÉ	88
3.2	OBJECTIFS GÉNÉRAL ET SPÉCIFIQUES	89
3.2.1	<i>Objectif général</i>	89
3.2.2	<i>Objectifs spécifiques</i>	89
3.3	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	89
3.3.1	<i>Culture cellulaire des lignées humaines Hs578t et T-47D</i>	89
3.3.2	<i>Méthodologie RT-qPCR générale</i>	90
3.3.3	<i>Amorces</i>	90
3.3.4	<i>Viabilité et prolifération cellulaire</i>	91
3.3.5	<i>Assemblages et expérimentations en co-culture</i>	92

3.4	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	92
3.4.1	<i>Validations des lignées cellulaires</i>	92
3.4.2	<i>Compartimentation et densité</i>	94
3.4.3	<i>Réponses œstrogéniques en mono-cultures vs. co-cultures</i>	96
3.4.4	<i>Validations des communications intercellulaires</i>	99
3.4.5	<i>Premières évaluations des insecticides néonicotinoïdes</i>	101
3.5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	103
4	CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	105
5	CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE	106
6	ANNEXE	119
	ARTICLE : EFFECTS OF NEONICOTINOID PESTICIDES ON PROMOTER-SPECIFIC AROMATASE (CYP19) EXPRESSION IN HS578T BREAST CANCER CELLS AND THE ROLE OF THE VEGF PATHWAY	119
6.1	RESUME DE L'ARTICLE	120
6.2	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE	121
6.3	INTRODUCTION.....	123
6.4	MATERIAL AND METHODS	126
6.4.1	<i>Reagents</i>	126
6.4.2	<i>Cell Culture</i>	126
6.4.3	<i>Cell viability</i>	127
6.4.4	<i>RNA isolation and amplification by quantitative RT-PCR</i>	127
6.4.5	<i>Aromatase catalytic activity</i>	129
6.4.6	<i>Statistical analysis</i>	129
6.5	RESULTS.....	129
6.5.1	<i>Promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells</i>	129
6.5.2	<i>VEGF-mediated signalling pathways implicated in CYP19 expression in Hs578t cells</i>	131
6.5.3	<i>Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells</i>	133
6.5.4	<i>VEGF pathways implicated in promoter-switch of CYP19 expression in Hs578t cells exposed to neonicotinoids</i>	136
6.6	DISCUSSION	137
6.6.1	<i>Hs578t cells as a suitable model to study the promoter-specific expression of CYP19 in hormone-dependent breast cancer</i>	137
6.6.2	<i>Neonicotinoids induce a switch in CYP19 promoter usage in Hs578t cells</i>	139
6.7	LIMITATIONS AND PERSPECTIVES.....	140
6.8	CONCLUSIONS	141
6.9	REFERENCES.....	141

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1- 1. NOMS ET STRUCTURES DES TROIS INSECTICIDES NEONICOTINOÏDES TESTES	22
TABLEAU 1- 2. CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DE DIFFERENTS TYPES DE CANCER DU SEIN (DAI ET AL., 2015).....	35
TABLEAU 1- 3 : RÉSUMÉ DES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES MODÈLES DE CO-CULTURES ÉTABLIS POUR LE CANCER DU SEIN.....	49
TABLEAU 2- 1. SEQUENCES OF THE PRIMER PAIRS AND THEIR AMPLIFICATION CHARACTERISTICS FOR <i>CYP3A7</i> AND <i>SULT2A1</i> TRANSCRIPTS AND THAT OF TWO REFERENCE GENES (<i>UBC</i> AND <i>RPII</i>), IN H295R CELLS..	67
TABLEAU 3- 1. AMORCES UTILISEES CHEZ LES CELLULES Hs578T ET T-47D	91
TABLEAU 6- 1. PRIMER-PAIR SEQUENCE USED FOR AMPLIFICATION OF PROMTER-SPECIFIC <i>CYP19</i> EXPRESSION AND THEIR AMPLIFICATION CHARACTERISTICS IN Hs578T CELLS	128

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1- 1. (A) AXE DES HORMONES LH ET LA FSH ET (B) LES MODIFICATIONS DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR FEMININ LORS DU CYCLE MENSTRUEL (MELMED <i>ET AL.</i> , 2016).....	24
FIGURE 1- 2. PROMOTEURS DES EXONS CODANTS DE L'AROMATASE (<i>CYP19</i>) HUMAINS ADAPTÉ DE (J. T. SANDERSON, 2006).....	26
FIGURE 1- 3. VOIES STÉRÖIDOGÉNIQUES DANS L'OVaire CHEZ LA FEMME PRÉ-MÉNOpausée POUR LA SYNTHÈSE DE L'ESTRONE ET L'ESTRADIOL (MELMED <i>ET AL.</i> , 2016).....	26
FIGURE 1- 4. LES SITES DE PRODUCTION DES OESTROGENES CHEZ LA FEMME, INCLUANT LES SOURCES CHEZ LES FEMMES PRE- ET POST-MENOPAUSEE (BULUN <i>ET AL.</i> , 2007; MELMED <i>ET AL.</i> , 2016).....	27
FIGURE 1- 5. SCHÉMATISATION GÉNÉRALE DE L'ACTION, DES VOIES DE SIGNALISATIONS ET LES EFFETS CELLULAIRES DES ERA ET ERB. ADAPTÉ DE J. T. SANDERSON (SMEETS <i>ET AL.</i> , 1999).....	28
FIGURE 1- 6. VOIES DE LA STEROİDOGENESE FETO-PLACENTAIRE (MELMED <i>ET AL.</i> , 2016).....	31
FIGURE 1- 7. ILLUSTRATION DES STADES DE CROISSANCES ET DEVELOPPEMENT POST-NATAL DE LA GLANDE MAMMAIRE (MACIAS AND HINCK, 2013).....	33
FIGURE 1- 8. PROMOTEURS ET VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUES DANS LA REGULATION TISSU-SPECIFIQUE DE L'EXPRESSION DE L'AROMATASE HUMAINE AINSI QUE LES PROMOTEURS RELIES AU CANCER DU SEIN. ADAPTÉ DE (CARON-BEAUDOUIN AND J THOMAS SANDERSON, 2016).....	36
FIGURE 1- 9. INTERACTION INTERCELLULAIRES DANS LE CANCER DU SEIN HORMONO-DÉPENDANT (BULUN <i>ET AL.</i> , 2012; KRISHNAN, SWAMI AND FELDMAN, 2012; CARON-BEAUDOUIN AND J. THOMAS SANDERSON, 2016) ..	37
FIGURE 1- 10. SCHEMATISATION GENERALE DE LA VISION DE L'EVALUATION DE LA TOXICITE SELON LE COMITE <i>TOXICITY TESTING AND ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL AGENTS</i> (KREWski <i>ET AL.</i> , 2010)	39
FIGURE 1- 11. SCHEMA DU PRINCIPE DES MODELES DE CO-CULTURES CELLULAIRES DEUX DIMENSIONS UTILISANT LES INSERTS TRANSWELL® MICROPORÉUX DE 0.4 MM DE DIAMETRE.....	43
FIGURE 1- 12. COMPARAISON DES MODELES DE CO-CULTURES EN DEUX ET TROIS DIMENSIONS AVEC ET SANS CONTACTS ENTRE LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES (BOGDANOWICZ AND LU, 2013).	46
FIGURE 1- 13. SCHEMA DE LA STEROİDOGENESE DANS LE MODELE DE CO-CULTURE FETO-PLACENTAIRE BEWo/H295R ETABLÌ (THIBEAULT <i>ET AL.</i> , 2014)	47
FIGURE 1- 14. VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE L'ŒSTRIOL DANS LE MODELE BEWo/H295R (THIBEAULT <i>ET AL.</i> , 2014)	48
FIGURE 1- 15. SCHEMATISATION DU MODELE DE CO-CULTURE PROPOSE UTILISANT LES LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES Hs578T ET T-47D.....	50
FIGURE 2- 1. CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF THIACLOPRID (A), THIAMETHOXAM (B) AND IMIDACLOPRID (C) ON AROMATASE ACTIVITY IN H295R AND BEWo CELLS IN CO-CULTURE.	68

FIGURE 2- 2. CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF THIACLOPRID ON DHEA (A), ANDROSTENEDIONE (B), B-HCG (C), ESTRADIOL (D), ESTRONE (E) AND ESTRIOL (F) PRODUCTION BY A CO-CULTURE OF H295R AND BEWo CELLS.....	69
FIGURE 2- 3. CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF THIAMETHOXAM ON DHEA (A), ANDROSTENEDIONE (B), B-HCG(C), ESTRADIOL (D), ESTRONE (E) AND ESTRIOL (F) PRODUCTION BY A CO-CULTURE OF H295R AND BEWo CELLS.....	70
FIGURE 2- 4. CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF IMIDACLOPRID (ON DHEA (A), ANDROSTENEDIONE (B), B-HCG (C), ESTRADIOL (D), ESTRONE (E) AND ESTRIOL (F) PRODUCTION BY H295R AND BEWo CELLS IN CO-CULTURE.	71
FIGURE 2- 5. RELATIVE EXPRESSION LEVELS OF <i>CYP3A7</i> IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24 H TO 3 OR 10 mM OF THIACLOPRID, THIAMETHOXAM OR IMIDACLOPRID.	72
FIGURE 2- 6. RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP3A7</i> IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24H TO 3 mM OF THIACLOPRID, THIAMETHOXAM OR IMIDACLOPRID ('INDUCERS'), WITH OR WITHOUT CO-TREATMENT WITH ESTRIOL (5 NG/mL).	73
FIGURE 2- 7. STEROIDOGENIC PATHWAYS IN THE CO-CULTURE MODEL OF FETOPLACENTAL STEROIDOGENESIS, AND THE PROPOSED TARGETS OF NEONICOTINOID INSECTICIDES (IN RED) LEADING TO DECREASED ESTRIOL PRODUCTION AND INCREASED LEVELS OF DHEA. (FOR INTERPRETATION OF THE REFERENCES TO COLOUR IN THIS FIGURE LEGEND, THE READER IS REFERRED TO THE WEB VERSION OF THIS ARTICLE).	74
 FIGURE 3- 1. SCHÉMATISATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES ENZYMES STÉROÏDOGÉNIQUES CHEZ LES CELLULES HS578T ET T-47D.	93
FIGURE 3- 2. COMPARAISON DE LA CROISSANCE DES CELLULES T-47D (A) ET HS578T (B) DANS LEURS MILIEU RESPECTIF ET LE MILIEU DE CO-CULTURE PROPOSÉ (AVEC ROUGE DE PHÉNOL ET FBS RÉGULIER).	93
FIGURE 3- 3. EXPRESSION GENIQUE DE <i>CYP19</i> ET SES PROMOTEURS (A) ET (B) <i>TFF1</i> DANS LA CO-CULTURE MIXTE EXPOSEE AU 17B-ESTRADIOL.	95
FIGURE 3- 4. COMPARAISON DE L'EXPRESSION GENIQUE DE <i>TFF1</i> EN UTILISANT DEUX RATIOS DE CELLULES POUR LA DENSITE DES COMPARTIMENTS DU MODELE DE CO-CULTURE HS578T/T-47D.....	96
FIGURE 3- 5. PROLIFERATION EN REPONSE A PLUSIEURS DOSES DE B-ESTRADIOL DANS LE MILIEU DE CO-CULTURE REPRESENTEE (A) PAR L'ABSORBANCE CORRIGEE ET (B) L'INDUCTION.....	97
FIGURE 3- 6. COMPARAISON DE L'EXPRESSION GENIQUE DE <i>TFF1</i> CHEZ LES T-47D EN (A) MONO-CULTURE ET (B) EN CO-CULTURE.....	98
FIGURE 3- 7. EXPRESSION GENIQUE DE <i>CYP19</i> ET PROMOTEURS-SPECIFIQUES CHEZ HS578T EN MONO- (A) ET EN (B) CO-CULTURE EXPOSEES A LA 17B-ESTRADIOL.....	99
FIGURE 3- 8. EXPRESSION GENIQUE RELATIVE <i>CYP19</i> ET <i>TFF1</i> EN CO-CULTURE EXPOSES A LA TESTOSTERONE ET EN CO-TRAITEMENT AVEC DEX. EXPRESSION <i>CYP19</i> PROMOTEURS-SPECIFIQUES SANS (A) ET AVEC DEXAMETHASONE (B ET C) CHEZ HS578T ET (D) <i>TFF1</i> CHEZ T-47D.....	100

FIGURE 3- 9. EXPRESSION GENIQUE DE <i>TFF1</i> CHEZ T-47D EXPOSES A (A) L'IMIDACLOPRIDE, THIACLOPRIDE ET THIAMETHOXAME EN MONO-CULTURE ET (B) A L'IMIDACLOPRIDE EN CO-CULTURE SANS PRECURSEUR ANDROGENIQUE.....	102
FIGURE 3- 10. EXPRESSION (A) PROMOTEUR-SPECIFIQUE DE <i>CYP19</i> CHEZ LES CELLULES Hs578T ET (B) <i>TFF1</i> CHEZ LES CELLULES T-47D EN CO-CULTURE CO-TRAITES AVEC L'IMIDACLOPRIDE ET LA TESTOSTERONE EN CO-CULTURE.	102
FIGURE 3- 11. SCHEMATISATION RECAPITULATIVE DES PROPRIETES DU MODELE DE CO-CULTURE Hs578T/T-47D RECREANT LE MICROENVIRONNEMENT STROMA/TUMORAL DU CANCER DU SEIN HORMONO-DEPENDANT... ..	103
 FIGURE 6- 1. (A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND I.4, PII, I.3, AND I.7 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS (FOLD DMSO CONTROL). (B) AROMATASE CATALYTIC ACTIVITY IN Hs578T CELLS EXPOSED TO DEXAMETHASONE (DEX) 100 NM, FORSKOLIN (FRSK) 10 MM, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) 2,5 NG/ML, OR FORMESTANE (FORM) 1 MM.	131
FIGURE 6- 2. RELATIVE EXPRESSION OF (A) <i>CYP19</i> CODING REGION (NON PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS DERIVED FROM PROMOTERS (B) PII, (C) I.3, AND (D) I.7 IN Hs578T CELLS (FOLD DMSO CONTROL).....	132
FIGURE 6- 3. (A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND I.4, PII, I.3, AND I.7 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS (FOLD DMSO CONTROL). (B) AROMATASE CATALYTIC ACTIVITY IN Hs578T CELLS EXPOSED TO THIACLOPRID (0.03, 0.1, 0.3, 3, AND 10 MM).	134
FIGURE 6- 4. (A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND I.4, PII, I.3, AND I.7 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS (FOLD DMSO CONTROL). (B) AROMATASE CATALYTIC ACTIVITY IN Hs578T CELLS EXPOSED TO IMIDACLOPRID (0.03, 0.1, 0.3, AND 3 MM).	135
FIGURE 6- 5. RELATIVE EXPRESSION OF (A) <i>CYP19</i> CODING REGION (NON PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS DERIVED FROM PROMOTERS (B) PII, (C) I.3, AND (D) I.7 IN Hs578T CELLS EXPOSED TO THIACLOPRID (0.1 MM) OR IMIDACLOPRID (0.1 MM) IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF SELECTIVE INHIBITORS OF THE PLC (U73122, 2 MM) OR MEK/MAPK 1/3 (PD98059, 50 MM) SIGNALING PATHWAYS.	137
FIGURE 6- 6. PROPOSED SIGNALING PATHWAYS IMPLICATED IN THE PROMOTER-SPECIFIC EXPRESSION OF <i>CYP19</i> IN Hs578T CELLS.....	140

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3 β -HSD	Famille des 3 β -hydroxystéroïdes déhydrogénases
3 β -HSD1	3 β -hydroxystéroïdes déhydrogénases type 1
3 β -HSD2	3 β -hydroxystéroïdes déhydrogénases type 2
16 α -OH-DHEA-S	16 α -hydroxy-déhydroépiandrostérone-sulfaté
17 β -HSD	Famille 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase
17 β -HSD1	17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase type 1
17 β -HSD7	17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase type 7
ACTH	Hormone adrénocorticotropique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AKR1C3	17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase type 5
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
AOX	Aldéhyde oxidase cytosolique
AR	Récepteurs aux androgènes
β -hCG	β -hormone chorionique gonadotrope humaine
BMD	Benchmark Dose
BPA	Bisphénol A
BRCA1	Gène susceptible au cancer du sein 1
CYP	Famille des cytochromes P450
CYP11A1	Cholestérol monooxygénase
CYP19	Aromatase
CYP17	17 α -hydroxylase/17,20-lyase
CYP2C	Sous-famille isoformes cytochrome P450
CYP3A	Sous-famille isoformes cytochrome P450
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4

CYP3A5	Cytochrome P450 3A5
CYP3A7	Cytochrome P450 3A7 (16 α -hydroxyxase)
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEX	Dexamethasone
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHEA-S	Déhydroépiandrostérone-sulfaté
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E1	Estrone
E2	β -estradiol
E3	Estriol
EER	Récepteurs liés aux œstrogènes
ER	Récepteurs aux œstrogènes
ER α	Récepteurs aux œstrogènes α
ER β	Récepteurs aux œstrogènes β
ERE _s	Éléments de réponses aux œstrogènes
ERK	Extracellular signal-retulated kinase
FBS	Sérum Bovin Fœtal
FORM	Formestane
Frsk	Forskoline
FSH	Hormone follico-stimulante
GH	Hormone de croissance
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GR	Récepteurs aux glucocorticoïdes
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HSD	Hydroxystéroïde déhydrogénase
IGF-1	Insulin-like factor-1

IL-6/11	Interleukine 6 et 11
Imi	Imidaclopride
LH	Hormone lutéinisante
LOAEL	Dose minimale avec effet nocif observé
MAPK1/3	Mitogen-activated protein kinase 1 & 3
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOAEL	Dose sans effet toxique observable
PBGD	Porphobilinogen deaminase
PKA	Protéine Kinase A
PLC	Phospholipase C
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PR	Récepteurs à la progestérone
PRL	Prolactine
RPII	RNA polymerase II
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0
RT-qPCR	Reverse Transcription real-time Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	PCR transcriptase inverse
SEM	Erreur moyen standard
SULT2A1	Sulfotransférase sous-famille 2A1
TBP	TATA-binding protein
TFF1	Human trefoil factor 1
UBC	Ubiquitine C
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

La présentation de ce mémoire sera un peu différente du modèle habituel. Le mémoire est présenté en trois chapitres afin de faciliter la lecture. Le chapitre 1 est présenté par une revue de la littérature qui englobe les deux chapitres subséquents du mémoire. Le deuxième chapitre est un article publié dans *Toxicology and Applied Sciences*, comme deuxième auteure, portant sur l'utilisation d'un modèle de co-culture pré-établi de l'unité féto-placentaire comme outil de dépistage pour les insecticides néonicotinoïdes. Le troisième chapitre est présenté sous forme d'un mémoire traditionnel, portant sur le développement d'un nouveau modèle de co-culture cellulaire représentant un cancer du sein hormono-dépendant et son utilisation potentielle comme outil de dépistage. Les travaux au cours de la maîtrise divergent légèrement mais possèdent plusieurs éléments communs entre les modèles étudiés. Ces deux projets sont des continuations de projets précédents étant stagiaire de premier cycle et étudiante libre de deuxième cycle avant de débuter le programme en sciences expérimentales de la santé. Finalement, vous trouverez en annexe un second article publié dans le journal *Environmental Health Perspectives* comme deuxième auteure, faisant l'objet de recherche sur les effets de deux insecticides néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique ainsi que l'activité catalytique de l'aromatase (CYP19) dans la lignée cellulaire cancéreuses Hs578t. Cette étude a servie comme pilote pour le développement du nouveau modèle de co-culture du cancer du sein hormono-dépendant, décrit dans le chapitre 3 du mémoire.

1 CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 PROBLÉMATIQUES

1.1.1 Contaminants environnementaux : Les perturbateurs endocriniens

Les populations humaines et les espèces fauniques sont exposées à plusieurs contaminants par le biais de leur environnement et alimentation. Plusieurs de ces contaminants possèdent des caractéristiques qui leurs permettent d'influencer le système endocrinien, ce qui agit sur le bon fonctionnement de plusieurs fonctions métaboliques sur les organismes exposés. Le terme perturbateur endocrinien définit une substance exogène capable de causer des effets néfastes sur la santé d'un organisme et/ou à sa progéniture sur les fonctions endocrines (J Thomas Sanderson, 2006). Les perturbations endocrines sont uniques puisqu'elles peuvent affecter les capacités des cellules, des tissus et ultimement aux organes de communiquer entre-elles. Cela dit, une variété d'effets peut avoir lieu dû à ses perturbations dans les communications endocrines. Par exemple, la fertilité et la fécondité sont réduites, on retrouve des anomalies dans les tractus reproducteurs chez les deux sexes, la puberté est précoce, une variété de types de cancers ainsi que plusieurs autres syndromes à caractères sexuels. C'est seulement en 1949 que les liens entre les expositions aux pesticides et les perturbations endocriniennes ont été suggérés suite à une étude portant chez les hommes dans les applications aériennes du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) (Singer, 1949; McKinlay *et al.*, 2008). En effet depuis les dernières 50 années, plusieurs données épidémiologiques ont démontré l'augmentation de l'incidence et de la prévalence de maladies à caractères endocriniennes comme le cancer du sein, de la prostate, du testicule, le diabète, l'obésité ainsi que la diminution de la fertilité (Coster and Larebeke, 2012).

Les perturbateurs endocriniens agissent via différents mécanismes cellulaires, notamment par l'entremise de récepteurs nucléaires comme les récepteurs aux œstrogènes (ER), androgènes (AR) et progestérone (PR) et membranaires stéroïdiens et non-stéroïdiens (sérotonine, dopamine et noradrénaline) ainsi que les voies enzymatiques métaboliques impliquées dans la stéroïdogénèse (Coster and Larebeke, 2012). La majorité des recherches par rapport aux perturbateurs endocriniens depuis les années 1990 s'est concentrée sur les interactions potentielles agonistes/antagonistes entre les composés chimiques et les récepteurs hormonaux ER et AR ainsi que l'hormone thyroïdienne (Markey *et al.*, 2002; J. T. Sanderson, 2006). Les perturbations endocriniennes sont caractérisées par rapport aux composés xéno-œstrogéniques, anti-œstrogéniques/androgéniques ainsi qu'au niveau des fonctions thyroïdiennes et des corticoïdes de la glande surrénale (Coster and Larebeke, 2012).

Une particularité des perturbateurs endocriniens est que, pour la grande majorité de ces composés, les effets observés sont à des doses très faibles et non les plus élevées, comme dans le cas du bisphénol A (BPA) et le DTT. Pour le BPA, plusieurs études ont démontré que cette molécule induit des mécanismes de réponses aux œstrogènes géniques et non-géniques, et perturbent les fonctions cellulaires à des doses aussi faibles que 1 pM ou 0,23 ppt (vom Saal and Hughes, 2005). Précisément, il peut se lier et interagir avec les domaines de liaisons des ligands des ER en plus de recruter des co-régulateurs transcriptionnels. Essentiellement, le BPA peut être puissant comme l'estradiol (E2) pour la stimulation de réponses cellulaires et peut influencer plusieurs voies de signalisations endocrines (Rubin, 2011). Malgré tous les effets perturbateurs endocriniens rapportés au fil des années, c'est seulement en 2012 que le BPA a été banni en Amérique du Nord par le Food and Drug Administration (FDA) et Santé Canada. Pour le DDT et ses métabolites (comme le DDE), ils peuvent mimer l'action des œstrogènes, empêcher l'action des androgènes (antagonistes pour les récepteurs) ainsi que de promouvoir la prolifération de cellules sensibles aux androgènes (McKinlay *et al.*, 2008). Le DDT a été interdit dans les années 1970 en raison de sa toxicité environnementale et à la santé humaine. La logique contraintuitive de leurs effets est controversée dû à la difficulté à reproduire précisément les effets observés dans notre environnement et la faune en laboratoire. Il est suggéré que les faibles doses et expositions aux perturbateurs endocriniens sont capables de perturber les stades sensibles de l'embryogenèse d'un organisme sans stimuler les mécanismes de détoxification (Edwards, Moore and Jr, 2006).

1.1.2 Les insecticides néonicotinoïdes

Les populations humaines sont exposées régulièrement à différents types de pesticides, notamment les insecticides. Les néonicotinoïdes sont la nouvelle classe majeure d'insecticides utilisés dans le monde pour la protection des cultures et comme traitements pour les soins animaux (Honda, Tomizawa and Casida, 2006). Les néonicotinoïdes les plus couramment utilisés sont le thiaclopride, l'imidaclopride et le thiamethoxame (Tableau 1-1). Selon les registres de 2012, 261 000 kg de néonicotinoïdes actifs ont été appliqués sur 11 millions d'hectares de terrains au Canada. Ils sont utilisés comme enrobage de graines pour les cultures de fruits et légumes variées (Elbert *et al.*, 2008; Main *et al.*, 2014). Dû aux enrobages, les débris-vies de ces pesticides peuvent se rendre jusqu'à 1250 jours. De plus, les néonicotinoïdes se retrouvent dans les eaux de surfaces et dans les sols. Une étude effectuée à Boston, Massachusetts (É-U) a analysé des résidus de néonicotinoïdes dans le miel, les fruits et les

légumes achetés dans les épiceries locales. Les résultats ont démontré qu'au moins un des néonicotinoïdes couramment utilisés a été détecté dans tous les échantillons de fruits, légumes et dans 90% des échantillons de miel où l'imidaclopride était le plus fréquent. D'ailleurs, les taux des deux ou trois néonicotinoïdes détectés étaient jusqu'à 100.7 ng/g (John E. Casida, 2011; Chen *et al.*, 2014). Dans une étude en Californie, l'imidaclopride a été détecté dans 89% des échantillons d'eau à des concentrations supérieures à la valeur de référence pour la vie aquatique du *Environmental Protection Agency* des États-Unis dans 19% des échantillons (Starner and Goh, 2012). Au Canada, dans les régions humides de Saskatchewan, les concentrations de thiamethoxame et le clothianidine, un métabolite, ont été retrouvés à des doses aussi élevées que 3110 ng/L (Main *et al.*, 2014). Ces insecticides néonicotinoïdes se lient aux récepteurs d'acétylcholine nicotiniques ce qui leurs permet d'exercer leurs effets. Ceux-ci ont été associés avec le syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles.

Il est connu que les néonicotinoïdes sont métabolisés dans le foie chez l'adulte. Précisément, leurs métabolismes impliquent beaucoup de spécificités des substrats et de régiosélectivité pour les membres de la famille des cytochromes P450 (CYP), des aldéhydes oxidases, ainsi que pour les enzymes de phase II. Il est connu que les enzymes du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), 2D6 (CYP2D6) et 2B6 (CYP2B6) convertissent le thiamethoxame en clothianidine et que la clothianidine est convertie en desméthyl-clothianidine par la CYP3A4, le cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) et le cytochrome P450 2A6 (CYP2A6). D'ailleurs, le thiamethoxame peut être aussi converti en desméthyl-thiamethoxame par la CYP2C19 (Shi *et al.*, 2009). Pour l'imidaclopride, la CYP3A4 et l'aldéhyde oxidase cytosolique (AOX) sont les enzymes principales pour son métabolisme (Schulz-Jander and Casida, 2002; Dorne, Walton and Renwick, 2005; Honda, Tomizawa and Casida, 2006). De manière générale, le métabolisme de phase I est dépendante des isozymes des cytochromes de la famille P450 pour l'hydroxylation, la désaturation, la désalkylation, la réduction nitro et la sulfoxidation. Pour certains néonicotinoïdes, la réduction nitro est effectuée par l'aldéhyde oxidase cytosolique. Le métabolisme de phase II implique la méthylation, l'acétylation et la formation de plusieurs conjugués variés (glutathione, acides aminés, sulfates, glucuronide et glucoside). La biotransformation de quelques néonicotinoïdes a résulté à une puissance plus élevée pour les agonistes nicotiniques. En effet, les métabolites de certains néonicotinoïdes contribuent à l'hépatotoxicité et la carcinogenèse chez des mammifères (John E Casida, 2011).

La persistance dans l'environnement et les applications des insecticides néonicotinoïdes posent plusieurs inquiétudes pour la santé humaine (Main *et al.*, 2014; Schaafsma *et al.*, 2015; Cimino *et al.*, 2017).

Tableau 1-1. Noms et structures des trois insecticides néonicotinoïdes testés

Pesticides (Numéro CAS)	Noms détaillés	Structures chimiques
Thiamethoxame (153719-23-4)	3-[(2-Chloro-1,3-thiazol-5-yl)méthyl]-5-méthyl-N-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imine	
Imidaclopride (138261-41-3)	N-{1-[(6-Chloro-3-pyridyl)méthyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl}nitramide	
Thiaclopride (111988-49-9)	{(2Z)-3-[(6-Chloropyridin-3-yl)méthyl]-1,3-thiazolidin-2-ylidene}cyanamide	

1.1.3 Les environnements endocriniens humains

Le système endocrinien humain est tout ce qui englobe la production, les interactions et les effets résultant d'hormones. La puberté est l'étape indispensable au développement et à la maturation chez les humains. Tous ces signaux hormonaux permettent le déclenchement de la puberté, ce qui permet la maturation du système reproducteur par les hormones sexuelles stéroïdiennes, ainsi qu'au développement supplémentaire du cerveau. Dans ces travaux de maîtrise, nous nous sommes concentrés sur les environnements endocriniens humains chez les femmes. Les organes œstrogéniques principaux chez la femme sont la glande mammaire, l'appareil reproducteur et le cerveau.

1.1.3.1 Les œstrogènes chez la femme pré- et post-ménopausée

Les femmes subissent une variété de changements hormonaux tout au long de leurs vies. Les œstrogènes sont les hormones stéroïdiennes sexuelles associées chez les femmes. Celles-ci permettent de régulariser la croissance et le fonctionnement de tissus cibles dans le corps

humain. Notamment, elles sont essentielles pour les quatre structures de l'appareil reproducteur femelle : les glandes mammaires, l'utérus, les trompes de Fallope et les ovaires. Elles sont aussi essentielles au développement de caractéristiques sexuelles secondaires, pour la régulation de la sécrétion de la gonadotrophine pour l'ovulation, le maintien de la masse osseuse, la prévention de l'atrophie urogénitale, la régulation de la réactivité de l'insuline et finalement pour le maintien des fonctions cognitives (Nelson and Bulun, 2001; Björnström and Sjöberg, 2005; Lee, Kim and Choi, 2012; Melmed *et al.*, 2016).

L'hypothalamus, l'hypophyse, les ovaires et l'endomètre doivent fonctionner en coordination afin d'assurer une ovulation cyclique régulière. L'hypothalamus est responsable de la sécrétion pulsative de l'hormone de libération des gonadotropines hypophysaire (GnRH) qui permet la libération de l'hormone lutéinisante (LH) et follico-stimulante (FSH) à partir des cellules hypophysaires antérieures. La LH stimule la production d'androstenedione dans les cellules de la thèque des ovaires tandis que la FSH régule la production de l'E2 et de l'inhibine B dans les cellules du granulosa et tout d'abord la croissance des follicules. La libération d'un ovule provenant du follicule mature dépend sur l'augmentation du niveau de LH à mi-chemin du cycle menstruel. À la suite de l'ovulation, le follicule se transforme en corps jaune (*corpus luteum*) qui sécrète E2 et la progestérone sous le contrôle de LH et la FSH. D'ailleurs, la LH stimule aussi la sécrétion de l'inhibine A et B des cellules du corps jaune. C'est suite à l'ovulation que les follicules se transforment en corps jaunes qui sécrètent E2 et la progestérone, tous deux médiés par la FSH et LH (Melmed *et al.*, 2016).

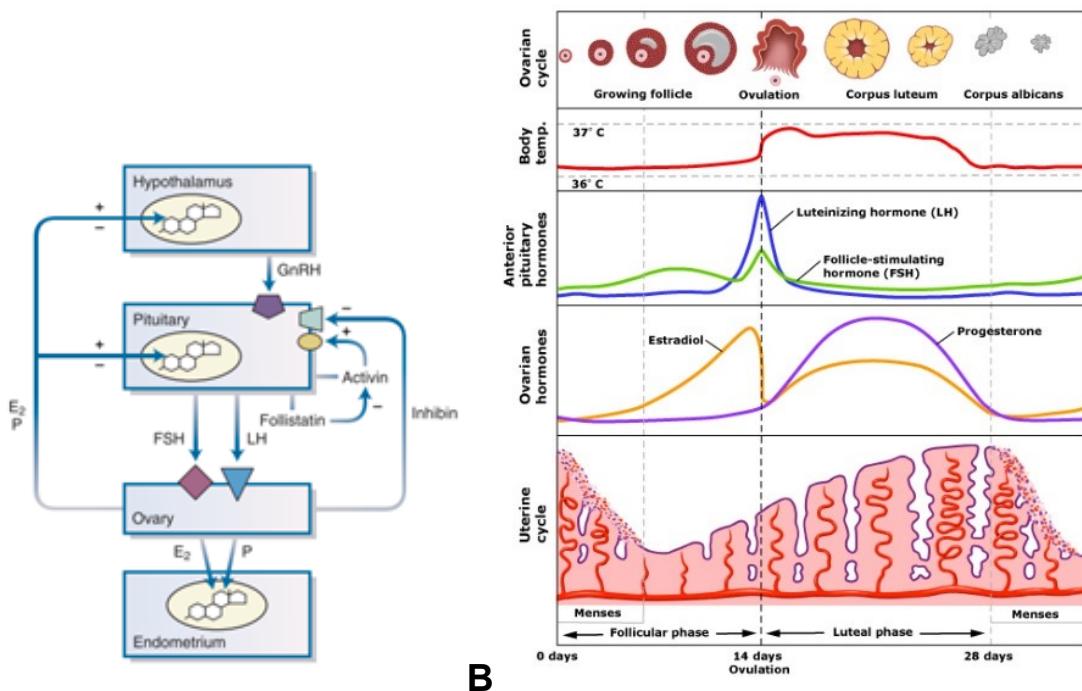


Figure 1-1. (A) Axe des hormones LH et la FSH et (B) les modifications de l'appareil reproducteur féminin lors du cycle menstruel (Melmed et al., 2016).

La faible production des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et des androgènes dans la glande surrénale est régulée par des stimuli externes comme l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) via la voie des protéines kinases A (PKA) et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ces androgènes faibles sont formés par la 17α-hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) responsable de la conversion de la prégnénolone en progestérone à l'intérieur de la zone réticulaire et fasciculaire de la glande surrénale. Ces androgènes agissent comme précurseurs pour la biosynthèse des œstrogènes, précisément sous-forme de déhydroépiandrosterone (DHEA) et d'androstenedione (J. T. Sanderson, 2006). La biosynthèse de toutes hormones stéroïdes débute par la conversion du cholestérol en prégnénolone par la cholestérol monooxygénase (CYP11A1) liée dans la membrane interne de la mitochondrie de tissus stéroïdogéniques. La prégnénolone est ensuite convertie en progestérone par la 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase (3β-HSD) retrouvée dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique lisse. La prégnénolone et la progestérone servent de précurseurs pour toutes les autres hormones stéroïdes. Les cellules de la thèque dans les ovaires sont grandement vascularisées et produisent la progestérone et les androgènes en grandes quantités. Ces androgènes agissent comme précurseurs pour la synthèse des œstrogènes dans les cellules de granulosa. L'androstenedione et la testostérone diffusent dans

les cellules de granulosa voisines moins vascularisées où elles vont être converties majoritairement en E2 via l'action de l'aromatase (CYP19), la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase (17 β -HSD) type 1 (17 β -HSD1) et 7 (17 β -HSD7) qui favorisent la conversion de l'estrone (E1) en E2 (J. T. Sanderson, 2006; Melmed *et al.*, 2016).

Les œstrogènes E1 et E2 sont produites par l'enzyme CYP19 exprimée dans plusieurs tissus via l'axe LH/FSH. Plus précisément, la FSH induit l'aromatase, ce qui cause la production cyclique d'E2 dans le follicule ovarien. L'aromatase, située dans le réticulum endoplasmique des cellules, catalyse la biosynthèse des œstrogènes via les précurseurs stéroïdes androgéniques provenant de sites variés dans le corps (Nelson and Bulun, 2001). Elle est exprimée de façon tissu- et promoteur-spécifique. Plus précisément, son site d'expression prédominant se retrouve chez les cellules de granulosa ovariens (I.3 et pII), mais elle est aussi exprimée dans le syncytiotrophoblaste placentaire (I.1) et plusieurs autres sites extra-glandulaires comme le cerveau (I.f), les fibroblastes de la peau et les tissus adipeux (I.4). L'aromatisation des stéroïdes androgéniques dans les tissus périphériques comme la peau et les tissus adipeux est le mécanisme principal de CYP19 (Bulun *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2009; Melmed *et al.*, 2016). L'expression de CYP19 dans les ovaires est médiée principalement par le promoteur pII, les récepteurs à la FSH, et par la production d'AMPc (Michael *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 2000). Tel que mentionné auparavant, l'expression de CYP19 est contrôlée et régulée via des voies de signalisations variées, ce qui engendre son expression promoteur-spécifique. De plus, il existe plusieurs inducteurs de voies signalétiques qui affectent l'expression des différents promoteurs de CYP19. Par exemple, les glucocorticoïdes stimulent l'expression du promoteur I.4 via la voie PKC et le promoteur I.3 et pII sont stimulés via la voie PKA (Sanderson *et al.*, 2000; Bulun *et al.*, 2003). La nature de l'expression tissu-spécifique de CYP19 est unique pour l'ensemble des enzymes stéroïdogéniques chez l'humain, mais elle peut être problématique dans certaines situations dû à sa complexité (Mahendroo, Mendelson and Simpson, 1993; Zhao *et al.*, 1996; Kamat *et al.*, 2002).

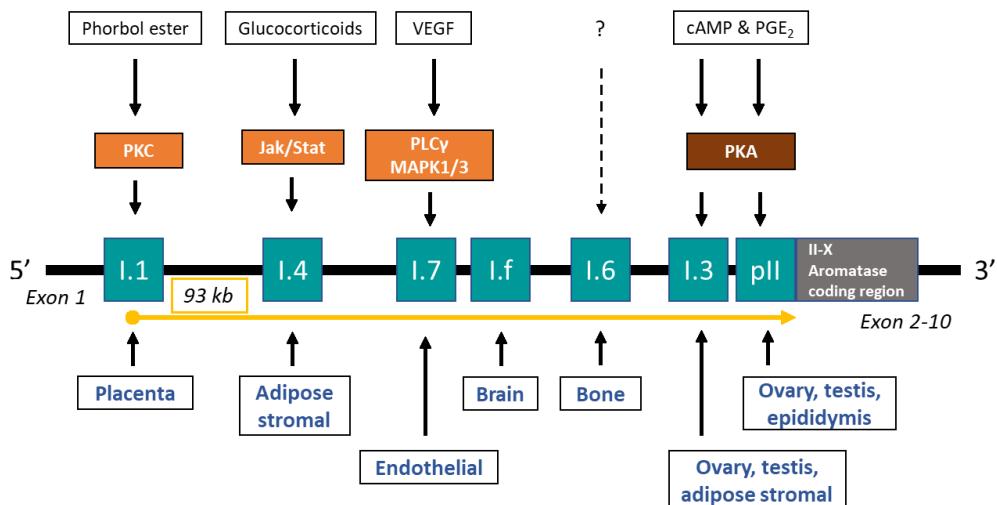


Figure 1- 2. Promoteurs des exons codants de l'aromatase (CYP19) humains adapté de (J. T. Sanderson, 2006).

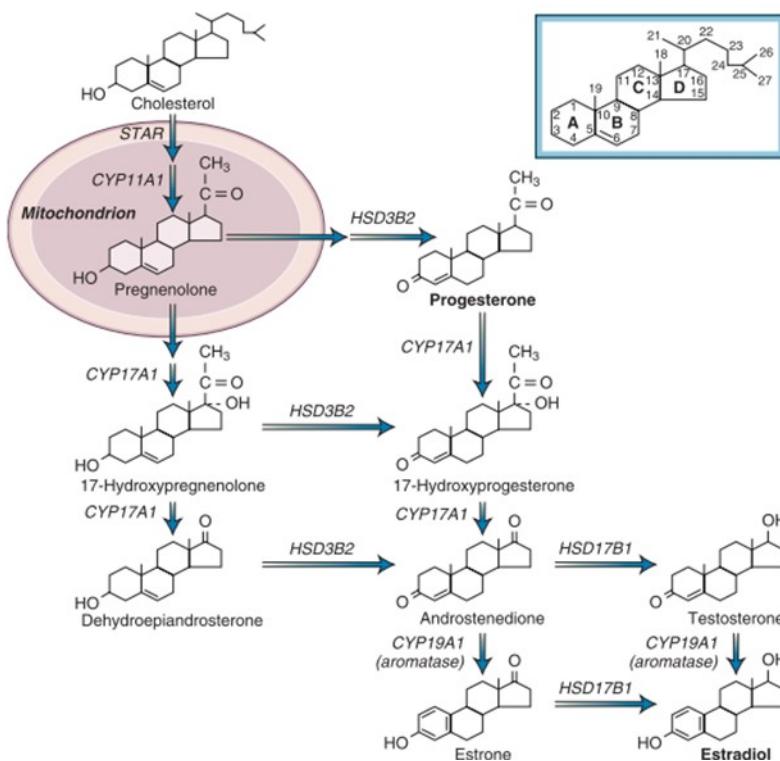


Figure 1- 3. Voies stéroïdogéniques dans l'ovaire chez la femme pré-ménopausée pour la synthèse de l'estrone et l'estradiol (Melmed et al., 2016).

L'estradiol nouvellement synthétisé est secrétée et libérée dans la circulation. Elle est ensuite rapidement liée aux globulines liantes aux hormones sexuelles (« *sex hormone-binding globulin* ») dû à leurs hautes affinités. Les œstrogènes E1 et l'œstriol (E3) sont aussi présents mais à des niveaux grandement inférieurs à l'E2. D'autre part, E2 est capable de se diffuser

librement à travers le plasma et les membranes nucléaires des cellules jusqu'à temps qu'elles se lient aux récepteurs aux œstrogènes (ER) (Nelson and Bulun, 2001; Björnström and Sjöberg, 2005; Lee, Kim and Choi, 2012).

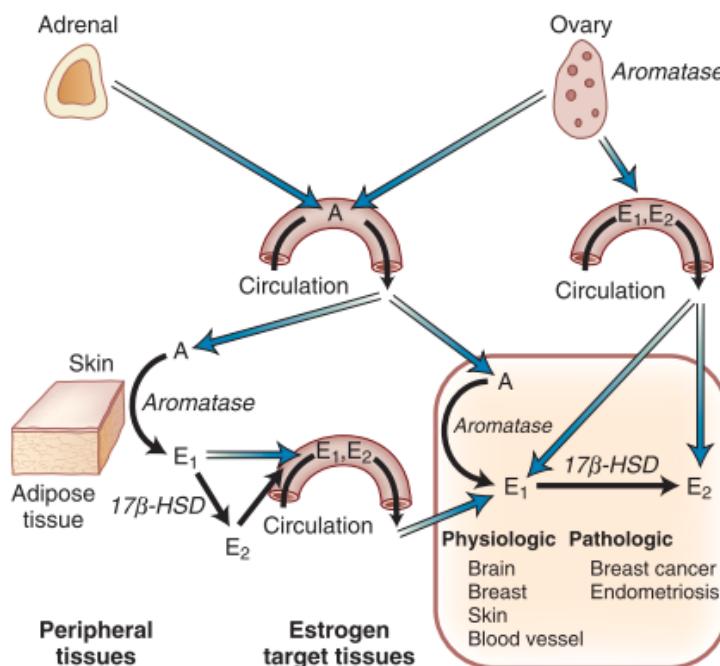


Figure 1- 4. Les sites de production des œstrogènes chez la femme, incluant les sources chez les femmes pré- et post-ménopausée (Bulun *et al.*, 2007; Melmed *et al.*, 2016).

L'action des stéroïdes œstrogéniques E1, E2 et E3 est médiée majoritairement par les ER. Ces récepteurs font partie d'une super-famille de récepteurs nucléaires qui comprend les récepteurs liés aux œstrogènes (EER), à la progestérone (PR), aux androgènes (AR), aux glucocorticoïdes (GR) et aux corticoïdes minéraux. Ceux-ci agissent comme facteurs de transcriptions dépendants aux ligands où leurs activités sont associées aux cycles cellulaires (Lee, Kim and Choi, 2012). Il existe deux formes des ER, dont la forme α (ER α) et β (ER β) ayant des rôles similaires. Tous deux sont présents dans les tissus reproducteurs féminins, les ovaires, l'utérus et la glande mammaire (Yashwanth *et al.*, 2006). Précisément, ER α est hautement exprimé dans l'utérus, les cellules de la thèque, les cellules de Leydig, l'épididyme, le sein et le foie. Le ER β est exprimé dans les cellules de granulosa, le cerveau, la moelle épinière et les testicules (Lee, Kim and Choi, 2012). En absence de ligands, les ER forment des complexes protéiques dans le noyau incluant les protéines de chocs thermiques (« *heat shock protein* »). C'est lors de la liaison des œstrogènes aux ER en premier lieu qui permet la dissociation de ces protéines et le déclenchement des effets biologiques. Cette liaison provoque la dimérisation du récepteur suivie par la liaison du récepteur aux ERE retrouvés en amont des

promoteurs du gène d'intérêt. Ces ERE se retrouvent habituellement dans la région 5'-adjacente des gènes sensibles aux œstrogènes et servent comme activateurs, ce qui attribue leurs potentiels d'inductions. Autrement dit, la liaison du récepteur aux EREs déclenche la transcription de gènes pour la croissance et la prolifération des cellules (Hayes and Lewis-Wambi, 2015). Cette liaison hormonale au ERE provoque un changement de la conformation du domaine de liaison du ligand des récepteurs, et cela permet le recrutement des protéines co-activatrices (Nelson and Bulun, 2001; Björnström and Sjöberg, 2005). La signalisation des œstrogènes est sélectivement stimulée selon l'équilibre entre l'activité de ER α et β selon les organes cibles. Les ER sont tout d'abord impliqués dans le cancer du sein. Les ER α sont prédominants et sont essentiels pour agir comme marqueurs biologiques pour l'identification et les traitements. Malgré que le rôle de ER β dans le cancer du sein n'est pas bien déterminé, son expression est diminuée lors de la progression tumorale (Jonsson, Katchy and Williams, 2014; Hayes and Lewis-Wambi, 2015).

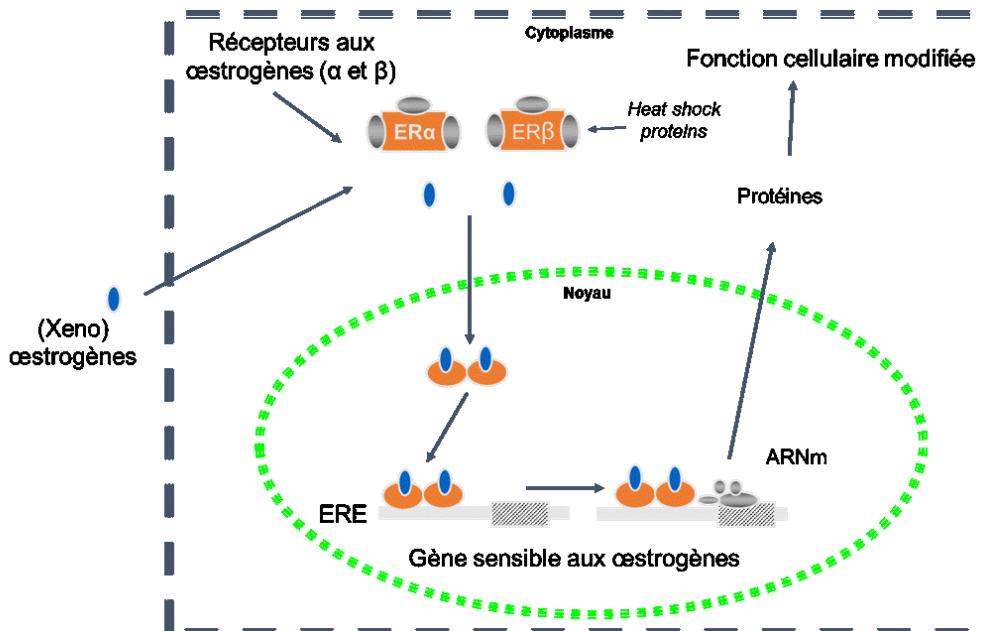


Figure 1-5. Schématisation générale de l'action, des voies de signalisations et les effets cellulaires des ER α et ER β . Adapté de J. T. Sanderson (Smeets et al., 1999).

Au fil des années, les voies stéroïdogéniques changent chez la femme afin de cesser les fonctions des ovaires. En autres mots, la ménopause est le processus où la femme atteint la fin de sa période reproductrice. Ce processus requiert plusieurs modifications endocrines, spécifiquement au niveau des œstrogènes par le changement du site de production des œstrogènes aux tissus périphériques (Purohit and Reed, 2002). Progressivement, l'expression et l'activité de l'aromatase changent en fonction des promoteurs chez la femme en ménopause

(Simpson *et al.*, 2000; Bulun *et al.*, 2005, 2007; Singh *et al.*, 2006). La biosynthèse des œstrogènes E1 et E2 varie chez la femme pré- et post-ménopausée via différents promoteurs de l'aromatase. Chez les femmes pré-ménopausées (jusqu'à 45 ans), le site principal de l'expression de l'aromatase est le du follicule ovarien, où la FSH induit l'aromatase et résulte à la production de l'estradiol de façon cyclique. Comme mentionné, l'expression de l'aromatase dans les ovaires est médiée principalement par les récepteurs à la FSH, la production d'AMPc et l'activation du promoteur pII de l'aromatase. L'estradiol est l'œstrogène principal produit chez les cellules de granulosa ovariens lors de la phase folliculaire (Simpson *et al.*, 2000; Bulun *et al.*, 2009). Chez les femmes post-ménopausées, les tissus adipeux deviennent les sites majeurs d'expression de CYP19. Bien que les niveaux d'expression de l'aromatase par les fibroblastes des tissus adipeux soient faibles, il s'agit de la somme des œstrogènes provenant des tissus adipeux du corps qui cause un impact physiologique. Dans ces tissus, E1 plus faible est produit en grande quantité à partir de l'androstenedione provenant des glandes surrénales (Parker, 1999). Plus de la moitié de l'estrone produite en périphérie est ensuite convertie en estradiol dans les tissus extra-ovariens. Le promoteur I.4 de l'aromatase dirige son expression dans les tissus adipeux et les fibroblastes de la peau (Bulun *et al.*, 2005, 2007). Celui-ci est régulé par l'action combinée des glucocorticoïdes et de la famille de cytokines de la classe I (Bulun *et al.*, 2009).

1.1.3.2 *La biosynthèse des œstrogènes pendant la grossesse*

La grossesse est un phénomène physiologique normal qui est à la fois transitoire et unique chez les mammifères. À la suite de la fécondation, il y a la formation et l'implantation du placenta afin d'assurer le développement et la santé du fœtus. Cet organe temporaire et unique agit d'intermédiaire entre la mère et le fœtus. Il permet l'apport et l'échange des nutriments, d'oxygène et plusieurs autres molécules essentielles. Plus précisément, le placenta permet l'apport des hormones et autres molécules stéroïdogéniques de la mère qui assure le développement du fœtus. Le cholestérol maternel peut être assimilé par le placenta afin de le transformer en prégnénolone par la CYP11A1 et ensuite transporté chez le fœtus pour produire le précurseur de l'œstrogène principal et le plus abondant de la grossesse, l'œstriol (E3).

L'œstriol est un indicateur du bien-être fœtal puisque sa biosynthèse requiert des échanges entre la mère, le placenta et le fœtus. En effet, quelques études ont démontré que les niveaux d'E3 mesurés lors de la grossesse corrèlent avec le poids du bébé à la naissance (Kaijser *et al.*, 2000; Marill *et al.*, 2002; Mucci *et al.*, 2003). L'œstriol présent dans le sérum et l'urine maternel sont dérivés de précurseurs fœtaux. La réaction de 16 α -hydroxylation joue un

rôle important puisqu'elle est associée avec tous les changements et processus hormonaux lors de la grossesse. Cette réaction a lieu principalement dans le fœtus dans l'unité stéroïdogénique fœtal-maternel (Milewich *et al.*, 1986). Le syncytiotrophoblaste est l'unité fonctionnelle du placenta responsable de la production des œstrogènes, dont E1, E2 et E3. Des processus comme l'invasion des trophoblastes ainsi que le flux sanguin utéro-placentaire sont nécessaires pour assurer une grossesse saine. Ceux-ci sont médiés et régulés par les œstrogènes (Cronier, Guibourdenche and Malassiné, 1999; Yashwanth *et al.*, 2006). Premièrement, la biosynthèse de E3 débute lorsque la prégnénolone maternelle issue du cholestérol est transportée dans l'unité fœtale pour être transformée en déhydroépiandrosterone-sulfaté (DHEA-S). Ce DHEA-S, le stéroïde le plus abondant, entre dans la circulation fœtale et subit l'hydroxylation par la CYP3A7 du foie fœtal pour former la 16 α -hydroxy-DHEAS (Cerný, Hill and Hampl, 2003; Geyer *et al.*, 2017). Celle-ci va être désulfatée en 16 α -DHEA dans le placenta par des sulfatases. La production de E3 est générée par le métabolisme de 16 α -DHEA dans les trophoblastes placentaires par les enzymes 3 β -HSD, 17 β -HSD et CYP19. Les DHEA-S provenant du fœtus et de la mère sont par la suite prises par le placenta pour être convertis en E2 via les actions de sulfatases, de 3 β -HSD1, 17 β -HSD et CYP19 ou sinon en E1 par des sulfatases, CYP19 et 3 β -HSD1 (Melmed *et al.*, 2016; Geyer *et al.*, 2017). L'hydroxylation des stéroïdes à la position 16 α joue un rôle important dans les réactions enzymatiques du métabolisme des stéroïdes.

Le fœtus possède une multitude d'enzymes essentielles lors de son développement provenant de la super-famille du cytochrome P450. Ces hémoprotéines catalysent le métabolisme oxydatif de composés endogènes hydrophobes comme les stéroïdes, les acides gras et les prostaglandines, ainsi que des composés exogènes comme des médicaments, des carcinogènes et des polluants environnementaux. Ces substrats peuvent être convertis en métabolites variés en présence de NADPH et d'oxygène afin de les métaboliser et de les éliminer. Dans le foie, les isoformes majeures de la famille des cytochromes P450 sont les sous-familles CYP2C et CYP3A, où leurs expressions varient selon le profil génétique et le mode de vie de la personne (Schuetz, Kauma and Guzelian, 1993). La sous-famille CYP3A possède trois isoformes majeures ayant des structures similaires, dont la CYP3A4, le cytochrome 3A5 (CYP3A5) et 3A7 (CYP3A7). Plus précisément, la similarité de séquence d'acides aminées entre CYP3A4 et CYP3A5 est de 83% tandis qu'elle est de 88% entre la CYP3A4 et CYP3A7. Elles se diffèrent selon leurs distributions de tissus, l'âge ainsi que pour leurs propriétés enzymatiques. L'isoforme CYP3A4 est l'enzyme clé dans le métabolisme des médicaments, des xénobiotiques et de molécules endogènes dans le foie et intestins adultes. L'expression de CYP3A7 est principalement confinée au foie fœtal mais il a déjà été détecté

dans quelques cas chez des adultes (Lacroix *et al.*, 1997; Andrew Williams *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2003).

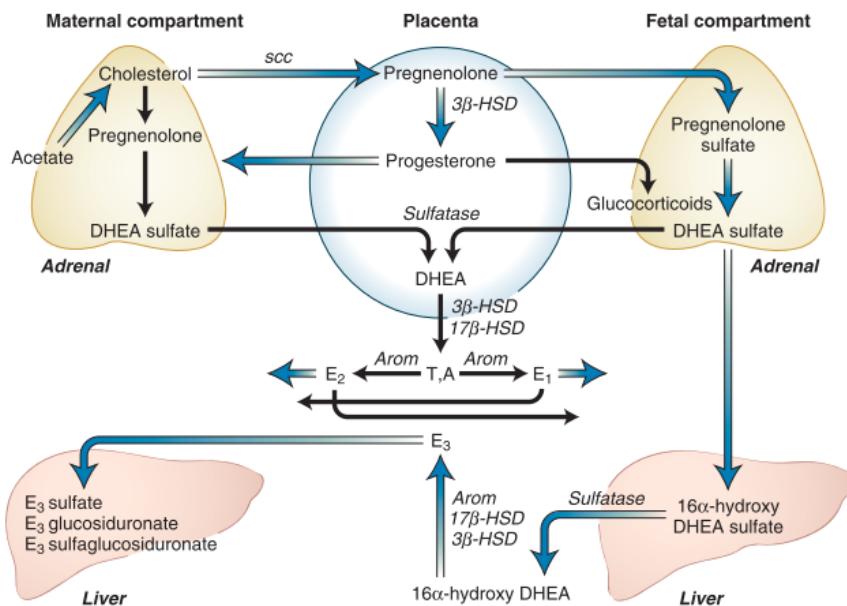


Figure 1- 6. Voies de la stéroïdogenèse feto-placentaire (Melmed *et al.*, 2016).

La grossesse est une période caractérisée par des changements dramatiques dans le métabolisme et les fonctions endocrines de la mère qui mène à la formation et au développement du placenta et du fœtus. Au fil de la grossesse, le placenta devient un organe endocrinien puissant qui produit plusieurs hormones uniques comme la β -hormone chorionique gonadotrope humaine (β -hCG) et E₃ via les échanges entre la mère, le fœtus et le placenta (Robins *et al.*, 2011). Les femmes enceintes sont exposées à une variété de composés perturbateurs endocriniens via leurs alimentations, leurs environnements, leurs styles de vie ainsi que leurs prises de médicaments. Ces molécules, capables de traverser la barrière placentaire, peuvent affecter le placenta et le fœtus puisqu'elles sont détectables dans des tissus placentaires, le liquide amniotique et dans le sang fœtal (Foster, Chan and Hughes, 2000; Leino *et al.*, 2013; Thibeault *et al.*, 2014). Ces contaminants peuvent aussi s'accumuler dans les organes fœtaux comme le sang, la rate, la moelle osseuse, le cerveau ainsi que le foie (Leino *et al.*, 2013). Par conséquent, des perturbations à ces fonctions peuvent engendrer des problèmes obstétriques sérieux comme la prééclampsie, la naissance prématurée ainsi que des restrictions de croissances intra-utérines (Kaijser *et al.*, 2000; Troisi *et al.*, 2003; Albrecht, Aberdeen and Pepe, 2005). Les expositions fœtales à des polluants sont moins connues et seulement peu d'informations sont disponibles pour seulement certaines substances. La

contamination du placenta par des contaminants environnementaux peut agir comme indicateur d'expositions pour la mère et le fœtus/enfant plus tard dans la vie (Leino *et al.*, 2013).

Puisque la CYP3A7 joue un rôle important dans la biosynthèse de l'estriol et par rapport au métabolisme des médicaments et xénobiotiques, il est essentiel de savoir si elles sont susceptibles aux perturbateurs endocriniens. Leurs fonctions variées peuvent être problématiques pour des expositions à des xéno-oestrogènes. Il n'y a que peu d'études qui ont évalué le métabolisme des xénobiotiques au niveau fœtal, mais il est connu que les néonicotinoïdes sont métabolisés dans le foie, notamment par la CYP3A4. Du point de vue génétique, une étude en 2010 a démontré qu'un allèle au niveau du gène CYP3A7, la CYP3A7*2 (T409R), associé à une activité plus élevée du métabolisme de médicament. Cet allèle suggère que la CYP3A7 pourrait jouer un rôle pharmacologique et/ou toxicologique important dans la protection du foetus. L'association significative entre les génotypes de CYP3A7 et l'expression adulte/fœtale hépatique de CYP3A7 implique que des variations génétiques peuvent aider à prédire les variations interindividuelles de l'activité des CYP3A chez des individus. Des variations génétiques de CYP3A7 sont associées avec les niveaux d'estrone dans le sérum, la densité des os, ainsi qu'avec l'activité des CYP3A chez les adultes. (Lee *et al.*, 2010).

1.1.3.3 La stéroïdogenèse et les oestrogènes dans le cancer du sein homono-dépendant

Le sein est un organe bilatéral qui subit des changements drastiques de tailles, formes et de fonctions à partir de la croissance infantile, la puberté, la grossesse, l'allaitement ainsi que la régression chez les femmes post-ménopausées (Russo and Russo, 2004).

La glande mammaire est un organe unique chez les mammifères responsable de synthétiser, secréter et de fournir le lait au nouveau-né. Les modifications drastiques au fil du temps sont médiées par les changements d'expression génique qui caractérisent les stades physiologiques de développement et leur permettent de performer sa fonction (Weigelt and Bissell, 2008). Contrairement aux autres organes du corps, la glande mammaire atteint un état mature fonctionnel seulement pendant le cycle de grossesse-allaitement chez les femmes adultes.

Le développement de la glande mammaire requiert des phases distinctes au fil du temps. Dès la vie embryonnaire, la crête mammaire est formée et poursuit au développement et au maintien des bourgeons mammaires lors de l'enfance. C'est lors de la puberté, déclenchée par les premiers signes de changements sexuels, qu'il y a une croissance rapide de la glande

mammaire et la stimulation de l'activité dans les tissus glandulaires et le stroma environnant. D'ailleurs, l'ovulation, les cycles menstruels et l'augmentation de dépôts de tissus adipeux sont des facteurs qui mènent davantage la croissance rapide des glandes mammaires lors de la puberté et à l'âge adulte. L'épithélium de la glande mammaire à la naissance contient quelques canaux primitifs qui poussent de façon allométrique jusqu'à la puberté. À ce stade, la glande mammaire est incorporée dans le stroma composé de cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes, les adipocytes et la matrice extracellulaire (Hassiotou and Geddes, 2013). C'est le déclenchement de la puberté qui permet la morphogenèse des canaux qui remplit les tissus adipeux avec les branches mammaires épithéliales. Cette croissance est influencée par l'hormone de croissance (GH) et les œstrogènes, ainsi que le facteur de croissance « *insulin-like factor-1* » (IGF-1). Chez les adultes, les courtes branches tertiaires sont formées sous l'influence de la progestérone mais l'alvéogenèse se déroule uniquement lors de la grossesse suite à la stimulation de la prolactine (PRL). Ces deux facteurs ensemble stimulent davantage la croissance des cellules alvéolaires. La stimulation prolongée de PRL poursuit au stade de la lactogenèse, ce qui culmine à la production de lait et se maintient jusqu'à temps qu'il y a une diminution de la demande aux signaux de sevrage. Cela provoque le processus d'involution, ce qui remodèle la glande mammaire à son état original adulte (Macias and Hinck, 2013).

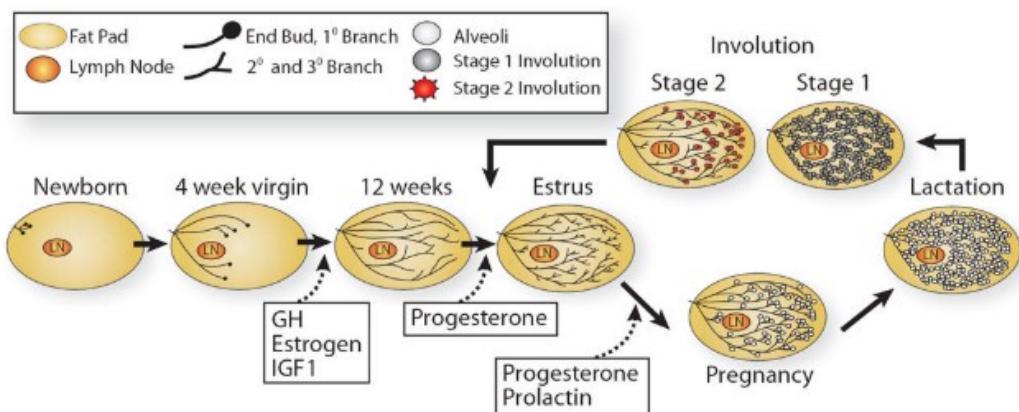


Figure 1- 7. Illustration des stades de croissances et développement post-natal de la glande mammaire (Macias and Hinck, 2013).

Le sein est la source de cancer la plus fréquemment diagnostiquée chez les femmes dans les pays industrialisés. Cette maladie est grandement hétérogène puisqu'elle comprend une variété d'entités ayant des traits pathologiques particuliers et des implications cliniques (Dai *et al.*, 2015). Malgré que les risques de développer le cancer du sein sont multifactoriels, il est toutefois essentiel de comprendre davantage comment les œstrogènes et androgènes peuvent

influencer le développement et la progression du cancer du sein dans les glandes mammaires. Selon le *World Health Organization*, il existe au moins 18 différents types de cancer du sein, tous catégorisés selon leurs caractéristiques cliniques, profils d'expression de marqueurs tumoraux et par types histologiques (Tang, Wang and Bourne, 2008; Sotiriou and Pusztai, 2009; Spitali *et al.*, 2009). Les deux types histologiques les plus communs et invasifs sont les carcinomes canalaires et lobulaires.

Plusieurs études semblent suggérer que les carcinomes lobulaires ont plus de chances à être positifs aux récepteurs aux œstrogènes, androgènes et progestérone que les carcinomes canalaires (Russo and Russo, 2004; Weigelt *et al.*, 2008; Lever and Sheer, 2010; Dai *et al.*, 2015). Approximativement 60 à 70% des cancers du sein expriment les ER α chez les cellules cancéreuses. L'aromatase est grandement exprimée dans les cellules du stroma intratumorales et les adipocytes mammaires. Les cellules du stroma intratumorales jouent un rôle paracrine important dans l'apport des œstrogènes dans les tissus cancéreux (Vallejos *et al.*, 2010). Les marqueurs immunohistochimiques classiques comme ER, PR, AR et le « *human epidermal growth factor receptor 2* » (HER2) sont utilisés afin de diagnostiquer, distinguer et pour traiter les patientes atteintes du cancer du sein (Bouzubar *et al.*, 1989; Leonardi *et al.*, 1992). La protéine nucléaire Ki67 détectée dans la phase G1 et M de la mitose est aussi utilisée comme marqueur pour déterminer la croissance des cellules de carcinomes (Dent *et al.*, 2007; Miki *et al.*, 2012). Il existe une variété de types de cancer du sein mais les mieux répertoriés sont : luminal A et B, triple-négatif et HER2-enrichie (Tableau 1-2).

Tableau 1- 2. Caractéristiques moléculaires de différents types de cancer du sein (Dai et al., 2015).

Type	Caractéristiques moléculaires
Luminal A	ER, AR et PR (+) HER2 (-) Ki67 faible
Luminal B	ER, AR et PR (+) HER2 (+ ou -) Ki67 élevé
Triple-négatif	ER, AR et PR (-) HER2 (-) Ki67 (-) Associé mutations gène <i>BRCA1</i>
HER2-enrichie	ER, AR et PR (-) HER2 (+) Ki67 (-)
Basal	ER (-) Associé mutations gène <i>BRCA1</i>

Les néoplasmes malins sont capables d'envahir les tissus normaux adjacents. Cependant, pour les néoplasmes épithéliaux, le processus d'invasion engendre la réaction desmoplastique chez les tissus hôtes ce qui mène à l'accumulation de fibroblastes adjacents aux cellules épithéliales cancéreuses (Meng et al., 2001; Iacobuzio-Donahue et al., 2002). Cette réaction engendre la présence d'un stroma de collagène dense de provenance de myofibroblastes de l'interstitium (Walker, 2001). Les tumeurs stromales sont composées de fibroblastes, d'adipocytes, de cellules inflammatoires (lymphocytes, macrophages) et des cellules endothéliales. Ces réponses stromales-hôtes résultent à des communications complexes et synergistiques entre les néoplasmes envahissants, les fibroblastes et les cellules inflammatoires (Iacobuzio-Donahue et al., 2002).

Dû à la nature sensible des glandes mammaires aux œstrogènes E1 et E2 chez la femme, les expositions aux perturbateurs endocriniens posent beaucoup d'inquiétudes puisqu'elles augmentent les chances de développer un cancer du sein hormono-dépendant. Le développement et la progression de ce type de cancer du sein sont intimement liés à l'augmentation des œstrogènes aux alentours de la tumeur. En réalité, celui-ci représente

environ 80% des cas diagnostiqués chez les femmes aux États-Unis (American Cancer Society, 2017). La biosynthèse des œstrogènes E1 et E2 varie chez la femme pré- et post-ménopausée via différents promoteurs de l'aromatase et possèdent des inducteurs selon les voies de signalisations intracellulaires, comme décrites ultérieurement. Plusieurs études depuis les 30 dernières années ont démontré que l'expression génique et l'activité catalytique de CYP19 peuvent être influencées par certains perturbateurs endocriniens en changeant les profils d'expressions des promoteurs (Sanderson *et al.*, 2000; J. T. Sanderson, 2006; Caron-Beaudoin and J. Thomas Sanderson, 2016). Ces études ont démontré que les promoteurs habituellement inactifs I.4, I.7, I.3 et pII sont exprimés dans les cas de cancer du sein. L'induction de l'expression de ces promoteurs résulte à l'augmentation de la synthèse des œstrogènes dans le microenvironnement stroma-tumoral de la glande mammaire. L'herbicide atrazine augmente l'expression des promoteurs pII et I.3 de l'aromatase dans la lignée cellulaire H295R (Chen, 1998; Kinoshita and Chen, 2003; Bulun *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009; Sanderson, 2009). Des dysfonctions au niveau de l'aromatase ont été associées à des pathologies endocrines comme la réduction de la fertilité, l'ostéoporose ainsi que le développement de cancers hormono-dépendants (Rivest, Devine and Sanderson, 2010).

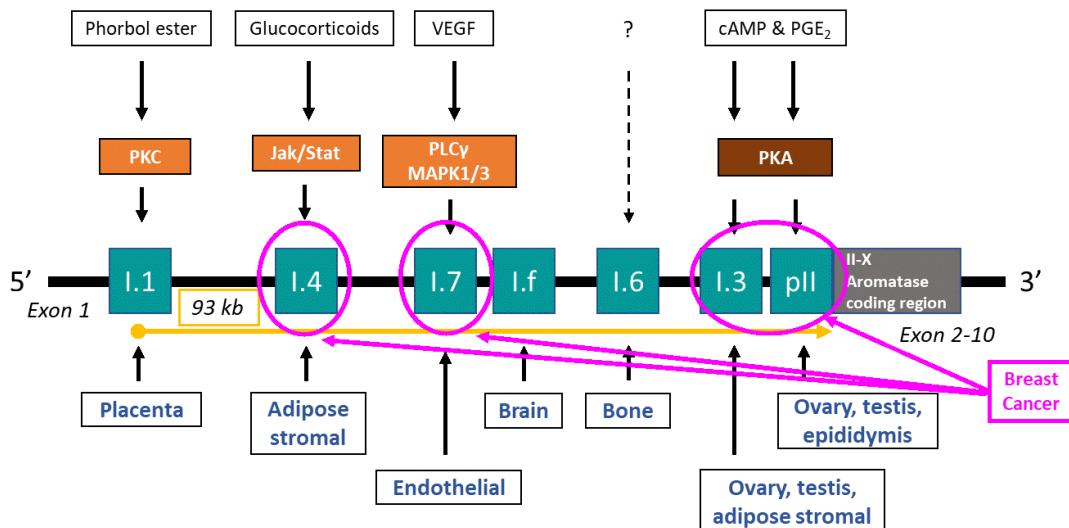


Figure 1- 8. Promoteurs et voies de signalisation impliqués dans la régulation tissu-spécifique de l'expression de l'aromatase humaine ainsi que les promoteurs reliés au cancer du sein. Adapté de (Caron-Beaudoin and J Thomas Sanderson, 2016).

Le cancer du sein hormono-dépendant est particulier puisque la maladie est intimement reliée à l'augmentation des œstrogènes aux alentours de la tumeur (Purohit and Reed, 2002).

L'augmentation de la production d'oestrogènes peut influencer davantage la prolifération des cellules tumorales, ce qui peut ultimement engendrer la réaction desmoplastique dans le microenvironnement tumoral. Les cellules épithéliales tumorales expriment les ER, ce qui permet aux oestrogènes endogènes et/ou exogènes de se lier. Dans les tumeurs mammaires, les cellules stromales adipeuses qui entourent les cellules épithéliales tumorales expriment l'aromatase. Cela dit, des expositions à des inducteurs de CYP19 peuvent provoquer l'accélération de la croissance tumorale dû à l'augmentation des niveaux d'oestrogènes. La croissance tumorale établit un mécanisme de rétrocontrôle positif où les cellules épithéliales tumorales sécrètent les facteurs nécessaires comme la prostaglandine E2 (PGE₂) et les interleukines 6 et 11 (IL-6 et 11) pour induire l'activité de CYP19 chez les fibroblastes avoisinants. Cette induction permet la surproduction des oestrogènes qui de leur tour stimulent la croissance des cellules épithéliales tumorales, et le mécanisme se poursuit (Heneweer, Muusse, Dingemans, *et al.*, 2005; Heneweer, Van Den Berg, *et al.*, 2005; Bulun *et al.*, 2012; Krishnan, Swami and Feldman, 2012; Caron-Beaudoin and J. Thomas Sanderson, 2016).

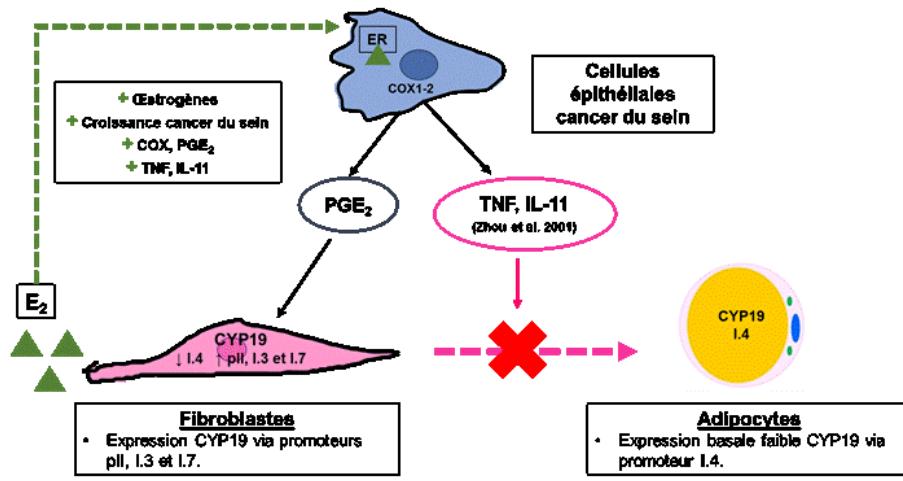


Figure 1- 9. Interaction intercellulaires dans le cancer du sein hormono-dépendant (Bulun *et al.*, 2012; Krishnan, Swami and Feldman, 2012; Caron-Beaudoin and J. Thomas Sanderson, 2016).

Dans ces cas de cancers du sein, les ER peuvent réguler l'expression de certains gènes chez les cellules tumorales, notamment le « *human trefoil factor 1* » (TFF1) (préalablement nommé *pS2*). L'expression génique de *TFF1* est directement médiaée et régulée par les ER, donc de manière oestrogène-dépendante et déclenche la prolifération cellulaire (Jeltsh *et al.*, 1987; Crombach *et al.*, 1993; Gillesby and Zacharewski, 1999; Heneweer, Muusse, Van Den Berg, *et al.*, 2005). La protéine TFF1 se retrouve majoritairement dans les muqueuses couvrant l'épithélium sain (Madsen *et al.*, 2007).

1.1.4 Les évaluations du risque toxicologiques et ses limites

Les évaluations du risque sont des rapports présentés sous forme de paradigmes systématiques et organisés qui déterminent les standards. Plus précisément, il s'agit de revues de la littérature scientifique élaborées sous forme de rapport et/ou de profil sur des composés et substances présentant des propriétés potentiellement nocives. Essentiellement, ces évaluations servent à déterminer les doses d'expositions minimales et maximales de ces composés, et d'avoir une idée des effets connus. D'ailleurs, la toxicité de contaminants environnementaux fait partie du processus d'approbation et de la mise en marché de ces produits (Krewski *et al.*, 2010). Autrement dit, il s'agit d'un processus d'évaluations qui mène à un résultat quantitatif afin qu'une stratégie de gestion des risques appropriée puisse être élaborée et mise en place (Pease and Gentry, 2016).

1.1.4.1 Processus habituel et contre-indications en Amérique du Nord

L'évaluation du risque est un processus qui vise d'acheminer et d'évaluer les données expérimentales de recherches fondamentales et appliquées afin d'être incorporées dans les règlementations (Krewski *et al.*, 2010; Pease and Gentry, 2016). L'évaluation du risque est effectuée lorsque l'ensemble des publications scientifiques, les rapports gouvernementaux ainsi que les rapports non-publiés sont révisés par les pairs. Les données provenant de la phase précédente sont évaluées dans différents contextes afin de déduire les risques potentiels à l'environnement et à la santé. Ces données sont identifiées et catégorisées selon quatre paramètres dont, 1) l'identification des dangers; 2) les analyses dose-réponse; 3) l'évaluation des expositions; 4) la caractérisation du risque. Chaque paramètre évalue la nature des composés chimiques et leurs effets précis (ex : formation de tumeurs, effets neurologiques, défauts à la naissance) et généraux (ex : quantifications des expositions dans les populations générales et distinctes) observés sur la santé humaine tout en quantifiant les liens de causalités (Krewski *et al.*, 2010; Pease and Gentry, 2016). Autrement dit, ces paramètres permettent la mise en place de doses seuils comme la NOAEL et la LOAEL qui permettent de fournir une estimation des niveaux d'expositions à des composés chimiques chez les humains. Cependant, les NOAELs et LOAELs sont limités puisqu'ils ne tiennent pas toujours en compte de la forme de la relation dose-réponse. La dose Benchmark (BMD), ou bien la modélisation BMD, est le processus d'ajuster un modèle à des données de doses-réponses afin d'estimer la dose de départ (« *point-of-departure* »). Cette dose de départ est associée à un niveau prédéterminé d'une réponse biologique, dont la réponse Benchmark. Cette modélisation répond à quelques

limites posées par la NOAEL et la LOAEL en s'adressant à la forme de la courbe dose-réponse, en étant plus indépendants de certains éléments de conception de l'étude (ex : choix de la dose), et en ayant une meilleure comparaison entre les différentes études (« *cross-study comparison* ») (Dorne, Walton and Renwick, 2005; Wignall et al., 2014; Krewski et al., 2010). La caractérisation du risque est l'ensemble des paramètres décrit ci-haut. Cette caractérisation est essentielle afin d'avoir une estimation de la probabilité et de la portée du risque dans les populations ciblées. Finalement, la dernière étape est le transfert des données caractérisées aux responsables régulateurs (ex : gouvernement). Ceux-ci vont être comparés avec des données externes sociétales (socioéconomiques et politiques) afin de déterminer la pertinence régulatoire afin que la nature et l'étendue (Krewski et al., 2010).

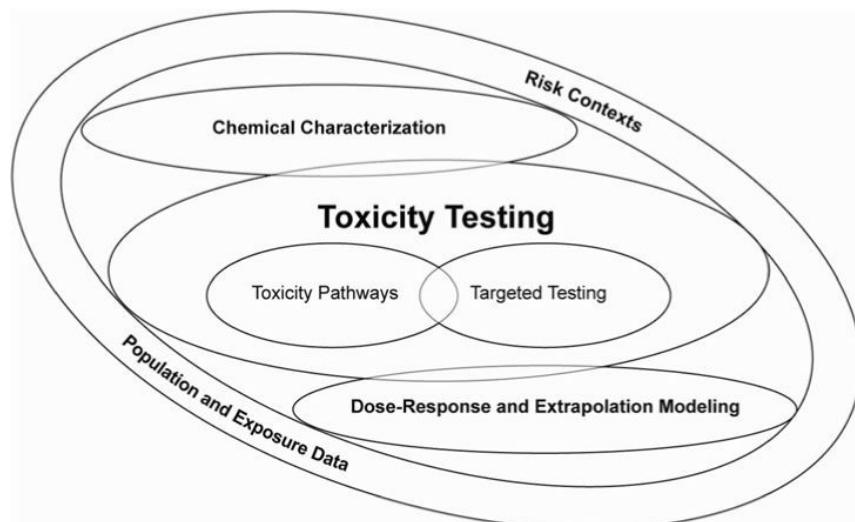


Figure 1- 10. Schématisation générale de la vision de l'évaluation de la toxicité selon le comité *Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents* (Krewski et al., 2010).

Malgré tout ce travail, les règlementations gouvernementales ne prennent pas toujours en considération les perturbateurs endocriniens. Les perturbateurs endocriniens sont plus difficiles à étudier, dû à la nature d'expositions; nous sommes exposés à faibles doses (variant de ppb à ppt), mais de façon prolongée au fil des années. Leurs effets ne sont pas détectables à court terme mais ils se manifestent à long terme (période de latence). Les doses étudiées dans les tests toxicologiques standards sont souvent supérieures aux doses retrouvées dans notre environnement. Les approches traditionnelles posent plusieurs défis pour étudier la toxicité de composés chimiques puisqu'il existe une dizaine de milliers à travers tous les secteurs de l'économie (ex : produits chimiques industrielles, les pesticides, additifs et contaminants alimentaires, et les médicaments). Les humains sont habituellement exposés à une variété de composés chimiques simultanément, ce qui complique et résulte à un nombre

incalculable de combinaisons chimiques possibles à évaluer (McKinlay *et al.*, 2008; Krewski *et al.*, 2010). De nouveaux tests de toxicités et des évaluations pour la sécurité doivent être développés et ajoutés dans les organismes gouvernementaux afin de pouvoir effectuer des évaluations plus complètes et efficaces (McKinlay *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2011).

1.1.4.2 *Le principe des trois « R » : Raffiner, Réduire et Remplacer*

La recherche scientifique fondamentale et appliquée dans plusieurs domaines porte à l'utilisation d'animaux expérimentaux comme modèles d'études. Cependant, il existe une dizaine de milliers de produits chimiques variés dans le monde qui devraient être évalués. Il est donc impossible de tous les analyser par les méthodes toxicologiques classiques *in vitro* et *in vivo* à cause du très faible débit, les coûts, au nombre excessif d'animaux utilisés qui posent des questionnements éthiques. D'autre part, le processus d'approbation pour l'utilisation d'animaux de laboratoires peut être long et très laborieux (approbations éthiques et l'approbation des protocoles expérimentaux). Le principe des trois « R » s'agit de l'effort du raffinement, de la réduction et du remplacement des modèles expérimentaux en recherches fondamentales et appliquées. Ces trois principes se basent sur les inquiétudes du grand public et des chercheurs par rapport au bien-être, le potentiel de détresse et la souffrance des animaux utilisés dans les expérimentations. D'ailleurs, l'augmentation du nombre d'animaux utilisés par expériences en recherches fondamentales et appliquées a motivé davantage la rédaction du livre *The Principles of Humane Experimental Techniques* en 1959 par Bill Russell et Rex Burch. Pendant les 60 dernières années, les trois "R" sont acceptés et intégrés dans les principes éthiques et dans la conduite des expérimentations basées sur des animaux au Canada et dans de nombreux pays du monde (Pajor and Milligan, 1997; American Psychological Association, 2012; Services, Health and Welfare, 2015).

Le développement de modèles *in vitro* physiologiquement représentatifs et pertinents est essentiel pour réduire l'utilisation des animaux. Il existe une variété de lignées cellulaires humaines cataloguées qui sont utilisées pour les analyses toxicologiques depuis les années 1960. Depuis ce temps, les techniques de laboratoires et la technologie se sont grandement améliorées et a permis le développement de cultures cellulaires plus complexes. Les modèles cellulaires représentatifs *in vitro* peuvent servir comme outils pour les évaluations pour élucider rapidement les mécanismes par lesquels les composés chimiques causent des effets néfastes chez les humains. Afin de pouvoir dépister le plus de composés chimiques existants possibles, il y a eu la création et le développement du programme *Toxicology Testing in the 21st Century : A Vision and A Strategy* aux États-Unis en 2007. D'ailleurs, ce programme a été instauré afin de

répondre aux lacunes posées par les méthodes d'évaluations de toxicités traditionnelles en collaboration entre plusieurs agences fédérales américaines. Cette stratégie est composée d'outils de prédictions rapides utilisant des robots (systèmes automatisés) ainsi que des approches classiques comme des tests à bases de cellules pour répertorier des milliers de composés chimiques. Malgré l'initiative de ce programme innovateur, il y a des éléments clés qui auraient pu être ajoutés, par exemple des modèles de co-cultures cellulaires (Greenberg and Lowrie, 2009; Krewski *et al.*, 2010; Thomas, 2018). Les interactions intercellulaires et leurs microenvironnements tissulaires sont essentiels pour les évaluations sur les perturbateurs endocriniens, ce qui est attribuable à la nature du système endocrinien humain. Il est indispensable de développer des modèles de co-cultures cellulaires afin de pouvoir étudier les communications intercellulaires pour approfondir les études toxicologiques mécanistiques, tout en réduisant l'utilisation d'animaux en recherches.

Les modèles *in vivo* pour les études stéroïdogéniques portant sur le cancer du sein peuvent être problématiques dû à la nature de la glande mammaire ainsi que la composition hétérogène des tumeurs. Les interactions stromales-tumorales retrouvées dans le cancer du sein ne peuvent pas être répliquées en utilisant des monocultures cellulaires pour des essais rapporteurs donc elles doivent être recréées par des modèles cellulaires ou bien par des modèles animaux. Les rongeurs ne sont pas de bons modèles pour recréer ce microenvironnement particulier du cancer du sein puisque ceux-ci n'expriment pas la CYP19 mammaire comme les humains (Sonneveld *et al.*, 2006). À cause de cela, il faut utiliser des modèles animaux plus proches des humains, les primates (Wood *et al.*, 2013; Dewi *et al.*, 2016). Les macaques sont utilisés pour des études toxicologiques pour le cancer du sein dû à leurs similarités anatomiques et physiologiques (Cline and Wood, 2008). L'utilisation de primates pour les études toxicologiques peut être controversée à cause des partisans du bien-être animal et pour plusieurs questionnements éthiques. Parallèlement, pour les études portant sur la grossesse, il n'y a pas de bons modèles et outils expérimentaux humains disponibles. Ils sont extrêmement limités puisque les approches invasives ne sont pas possibles pour des raisons éthiques évidentes. Malgré les modèles *in vivo* existants de rongeurs, ils ne sont pas nécessairement pertinents et représentatifs de la grossesse chez l'humain (Soto *et al.*, 1995; Malassiné, Frendo and Evain-Brion, 2003; Thibeault *et al.*, 2014).

1.2 SOLUTIONS ALTERNATIVES *IN VITRO*

1.2.1 Les modèles cellulaires en mono-cultures

Plusieurs découvertes importantes sur la biologie du cancer ont été effectuées grâce aux cultures cellulaires depuis le milieu du XXe siècle. Les cultures cellulaires nous permettent de maintenir et de croître des cellules humaines en laboratoire dans des conditions stériles. La culture cellulaire s'est développée depuis la réalisation de la lignée cellulaire HeLa provenant de la patiente Henrietta Lacks en 1951. Cette découverte a permis l'établissement d'une multitude de lignées cellulaires subséquentes, notamment les MCF-7 en 1973. Ces avancements ont permis d'évaluer en profondeur la biochimie et la biologie moléculaire associées avec certains types de cancers ainsi que notre compréhension de la physiologie cellulaire normale et maligne (Miki *et al.*, 2012; Edmondson *et al.*, 2014). La toxicité et les effets des perturbateurs endocriniens et des xéno-œstrogènes ont été déterminés historiquement par les études animales et cellulaires en monocultures. Par exemple, il y a eu le développement d'outils pour le dépistage de composés œstrogéniques (E-SCREEN) et androgéniques (A-SCREEN). Ces modèles ont été créés pour effectuer des bioessais quantitatifs basés sur l'expression génique induite par les œstrogènes (« *estrogen-induced gene expression* ») afin de dépister les activités œstrogéniques d'une multitude de composés chimiques. Cependant, une des limites de ces outils de dépistages était l'induction de l'expression des gènes par des composés non-œstrogéniques. Ultimement, les monocultures cellulaires sont nécessaires pour les bioessais dû à leurs facilités d'utilisations, faibles coûts et peuvent être exécutées simultanément et rapidement (Soto *et al.*, 1995; Sonnenschein and Soto, 1998).

Depuis ce temps, les techniques de culture cellulaires et de tissus en laboratoire sont encore utilisées et raffinées. Malgré les innovations et des avancements technologiques, il n'est pas possible de recréer la réalité et la complexité d'un organisme complet *in vitro*. Les monocultures en deux dimensions (2D) traditionnelles sont limitées dû à leurs représentations simplistes qui ne considèrent pas l'environnement naturel en trois dimensions (3D) des cellules. Ceci dit, les évaluations utilisant les cellules en 2D peuvent parfois générer des données trompeuses et non-prédictives pour les extrapolations *in vivo* (Edmondson *et al.*, 2014).

1.2.2 Les modèles cellulaires en co-cultures

Il est possible de recréer des microenvironnements *in vitro* en utilisant deux types cellulaires simultanément, ce que l'on appelle les modèles de co-cultures. Ces co-cultures permettent de mettre en culture deux types de cellules afin d'évaluer les communications intercellulaires entre les deux compartiments, recréant certains microenvironnements humains *in vivo*.

Il existe plusieurs types de co-cultures cellulaires, notamment les cultures mixtes ou séparées. Essentiellement, les co-cultures mixtes peuvent être réalisées en couches où les deux types de cellules sont cultivés l'une sur l'autre. Ces modèles visent à étudier le rôle des contacts cellule-cellule ainsi que les interactions para- et autocrines. Malgré la facilité technique de ces modèles, le contact physique et le mélange des cellules peuvent être un défi du point de vue technique contrairement aux modèles de co-cultures séparées (Miki *et al.*, 2012). Pour les co-cultures séparées, les cellules sont mises en plaques séparément et sont assemblées par la suite. Dans ces cas, les communications intercellulaires sont possibles grâce à des inserts microporeux de 0.4 µm de diamètre (inserts Transwell®) où elles communiquent entre elles par l'entremise de petites molécules capables de diffuser à travers de la membrane translucide microporeuse en polyester de l'insert. Les co-cultures utilisant les inserts sont favorables dû à leurs facilités d'utilisations, la fiabilité et la reproductibilité des données *in vitro* contrairement aux co-cultures mixtes (Miki *et al.*, 2012). D'ailleurs, la réponse de chaque compartiment du modèle peut être analysée séparément pour permettre de comparer les réponses cellulaires en mono- et en co-culture et pour étudier les effets paracrinies. Malgré les avantages des modèles de co-cultures utilisant des inserts microporeux, il ne s'agit pas d'un modèle parfait. Par exemple, une croissance excessive de cellules dans l'insert peut couvrir les pores de la membrane, ce qui peut limiter les interactions cellulaires et peut limiter les réponses de la co-culture (Bogdanowicz and Lu, 2013). Encore une fois, les cellules sont toujours en 2D, ce qui ne recréé pas la nature trois-dimensionnelle des cellules dans un organisme (Edmondson *et al.*, 2014).

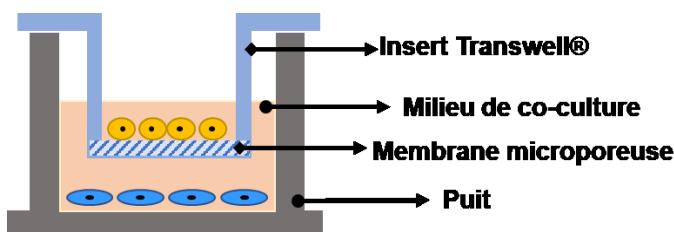


Figure 1- 11. Schéma du principe des modèles de co-cultures cellulaires deux dimensions utilisant les inserts Transwell® microporeux de 0.4 µm de diamètre.

Malgré la pertinence physiologique des cultures primaires de tissus sains et/ou cancéreux dérivés de biopsies et de chirurgies, ceux-ci posent toujours des défis aux utilisateurs. Bien que ces cellules fournissent des informations très importantes pour notre compréhension des tissus cancéreux et les microenvironnements, leurs difficultés techniques les empêchent d'être établis comme standard dans les évaluations toxicologiques *in vitro*. Ces cellules représentent plus fidèlement le microenvironnement du tissu original cancéreux du patient, ce qui est préférable pour les études toxicologiques mécanistiques. Cependant, la culture de ces cellules peut être problématique dû à leurs limites. Par exemple, la croissance et la prolifération des cellules de carcinomes primaires sont généralement très lentes et le temps de doublement est nettement long. D'ailleurs, dans plusieurs cas, les cellules primaires en cultures survivent seulement deux ou trois passages, et l'expression des gènes réduit au fil du temps (Rivest, Devine and Sanderson, 2010). Non seulement elles sont difficiles à entretenir et à standardiser, mais elles sont plus difficiles à obtenir à cause des processus d'approbations (comité d'éthique). Les modèles de co-cultures utilisant des lignées cellulaires cataloguées ont été établies afin de pouvoir recréer et évaluer les interactions cellule-cellule des microenvironnements normaux et cancéreux de la réalité.

Dans la présente étude, l'approche des co-cultures avec les inserts Transwell® a été choisie comme modèle d'étude pour les chapitres 2 et 3. Dans chaque chapitre, les co-cultures utilisant les inserts ont permis d'apprendre davantage sur les microenvironnements stéroïdogéniques comparativement aux données obtenues en monocultures.

1.2.3 Les modèles cellulaires en trois dimensions

Il y a beaucoup d'intérêt et de besoins pour développer des modèles de cultures en trois dimensions. Ces modèles sont physiologiquement pertinents et tiennent en compte la contribution de la matrice extracellulaire. Les cellules cultivées en 3D démontrent des caractéristiques qui se rapprochent des conditions complexes que l'on retrouve *in vivo*. Ces modèles ont démontré que les extrapolations des résultats des recherches pour des applications *in vivo* étaient plus réalistes et peuvent être utilisés pour une variété d'applications. La culture de lignées cellulaires humaines en 3D les incite à être fidèles aux conditions normales retrouvées dans les tissus. En effet, 380 lignées cellulaires différentes avaient été utilisées pour des études de cultures en trois dimensions en 2015. Pour que les cellules adoptent des propriétés et caractéristiques retrouvées en trois dimensions, il doit avoir des matrices et plateformes (« scaffolds ») comme l'agarose, le collagène, la gélatine, la laminine et

la vitronectine. Les propriétés physicochimiques de la matrice et la plateforme synthétiques peuvent varier selon les besoins et l'application du modèle. La matrice de collagène de type I est la plus utilisée dans les systèmes de cultures 3D dû à sa facilité, ses faibles coûts, sa flexibilité pour les manipulations cellulaires, ses pores, sa rigidité et la facilité de modifier ses propriétés structurelles (Ravi *et al.*, 2015).

Un des grands avantages des co-cultures en trois dimensions est qu'il est possible d'évaluer les interactions cellule-cellule par les contacts paracrinies ainsi que les contacts directs. Même si il y a encore des paramètres à optimiser dans ce système, cette technologie peut grandement contribuer à l'avancement des dépistages à haut débit ainsi que dans la prédiction des réponses aux médicaments. D'ailleurs, ces modèles 3D permettent de pouvoir contrôler la distribution ainsi que les interactions des cellules pour qu'elles soient étudiées du point de vue micro- et macroscopiques, ce qui n'est pas possible avec les modèles en 2D (Bogdanowicz and Lu, 2013).

Les modèles en 3D *in vitro* se rapprochent de plus en plus à la réalité des tissus humains pour plusieurs aspects. Ils fournissent de l'information supplémentaire pour étudier les interactions complexes qui ne sont pas possibles en cultures 2D. Il y a plusieurs applications en recherches fondamentales qui bénéficient l'utilisation des cultures 3D, comme par exemple : les études du cytosquelette; l'apoptose; l'adhésion et les signalisations; la motilité cellulaire; la morphologie cellulaire et l'architecture tissulaire, parmi tant d'autres (Ravi *et al.*, 2015). Malgré leurs pertinences physiologiques, quelques paramètres des cultures 3D peuvent limiter les expérimentations. Par exemple, la structure des sphéroïdes limite les expositions des cellules du centre aux nutriments et facteurs de croissances du milieu de culture ainsi que les molécules d'intérêts. De plus, il y a beaucoup de variabilité entre les données expérimentales dû au manque de reproductibilité des matrices et des sphéroïdes produites. Essentiellement, les cultures en 3D sont les modèles *in vitro* les plus représentatifs disponibles ils requièrent encore des mises au point afin qu'elles soient plus accessibles (moins coûteuses) et ultimement instaurées dans le processus des dépistages toxicologiques (Edmondson *et al.*, 2014; Ravi *et al.*, 2015).

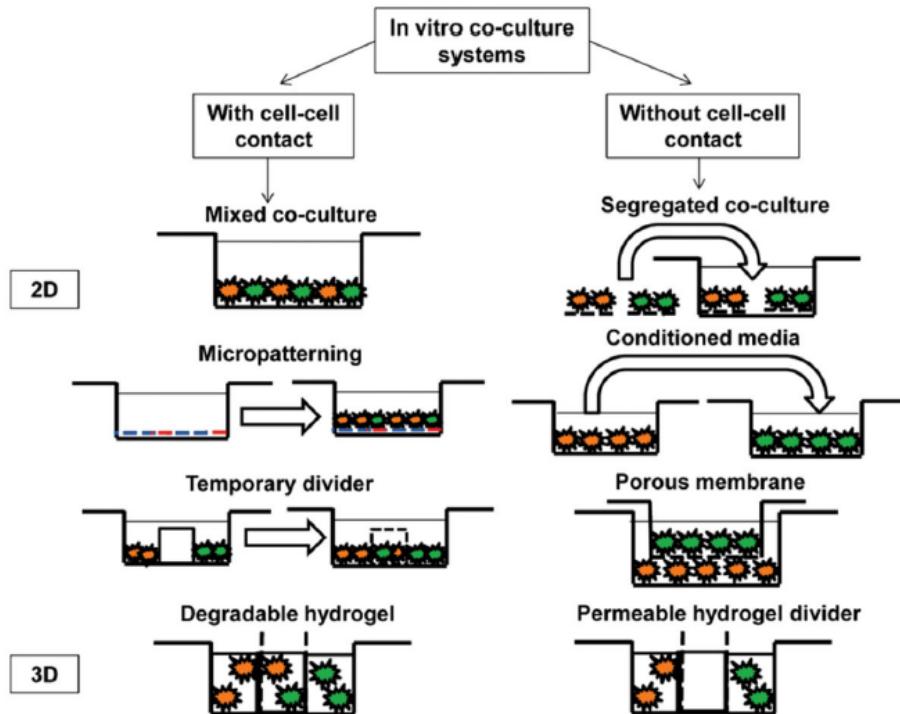


Figure 1- 12. Comparaison des modèles de co-cultures en deux et trois dimensions avec et sans contacts entre les différents types de cellules (Bogdanowicz and Lu, 2013).

1.2.4 Recréer des microenvironnements endocriniens physiologiquement représentatifs

Le microenvironnement cancéreux correspond à plusieurs types de cellules différentes impliquées dans le maintien des tissus cancéreux (Miki *et al.*, 2012). Plusieurs modèles *in vitro* à base de cellules humaines ont été développés au fil des années pour recréer des microenvironnements endocriniens pour le dépistage de composés chimiques sur la stéroïdogenèse. Par exemple, une variété de lignées cellulaires humaines et cultures primaires a été placé en co-cultures pour comprendre les effets des xénobiotiques sur l'activité et l'expression génique de CYP19 tout en ayant leurs avantages et inconvénients (J. T. Sanderson, 2006; Rivest, Devine and Sanderson, 2010).

1.2.4.1 Modèle établi de la stéroïdogenèse féto-placentaire

Le modèle représentant la stéroïdogenèse dans l'unité féto-placentaire a été établi dans nos laboratoires en 2014 (Thibeault *et al.*, 2014). Ce modèle a été établi afin de répondre au manque de modèles *in vitro* précis et pertinents pour la stéroïdogenèse de la grossesse chez les humains. Celui-ci a été établi en utilisant les lignées cellulaires humaines cataloguées

H295R et BeWo afin de représenter l'unité fœtale (foie et surrénales) et le placenta (voir les détails sur les lignées cellulaires dans la section 1.3). Ces deux cellules, séparées par des inserts, ayant des pores de 0.4 µm de diamètre pour permettre l'échange de facteurs solubles entre les deux types cellulaires, expriment les enzymes stéroïdogéniques nécessaires pour la biosynthèse des œstrogènes (E1, E2 et E3) ainsi que la β-hCG, l'hormone principale indicatrice de la grossesse. Précisément, les BeWo fournissent les œstrogènes et la β-hCG aux H295R afin qu'elles fournissent les précurseurs androgéniques. Ces interactions représentent la réalité des échanges et la coopération stéroïdogéniques entre le fœtus et le placenta.

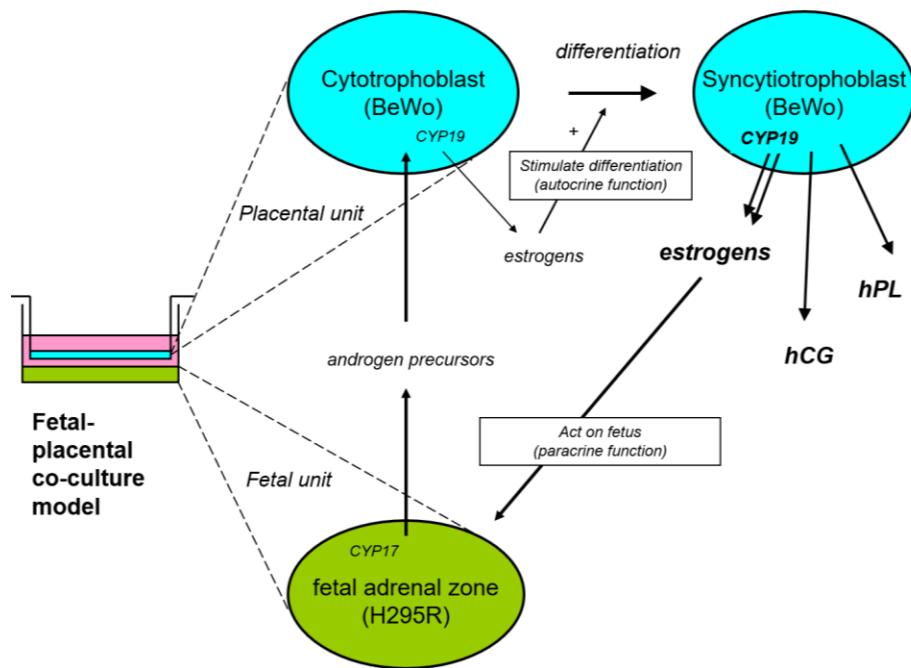


Figure 1- 13. Schéma de la stéroïdogénèse dans le modèle de co-culture féto-placentaire BeWo/H295R établi (Thibeault et al., 2014).

Dans l'établissement de ce modèle, la biosynthèse de E3 était fortement suggérée dû à sa présence dans le milieu de co-culture. Cependant, une biosynthèse *de novo* n'était pas démontrée clairement. C'est lors de l'application de ce modèle comme outil de dépistage pour les insecticides néonicotinoïdes que le métabolisme des xénobiotiques dans l'unité fœtal a été fortement considéré (voir chapitre 2). La biosynthèse de E3 dépend entièrement de l'activité du cytochrome CYP3A7, l'isoforme fœtale de CYP3A4 dans le foie adulte. La figure 1-13 démontre la biosynthèse précise de l'œstriol dans le modèle établi de l'unité féto-placentaire BeWo/H295R, incluant les enzymes stéroïdogéniques exprimées et impliquées.

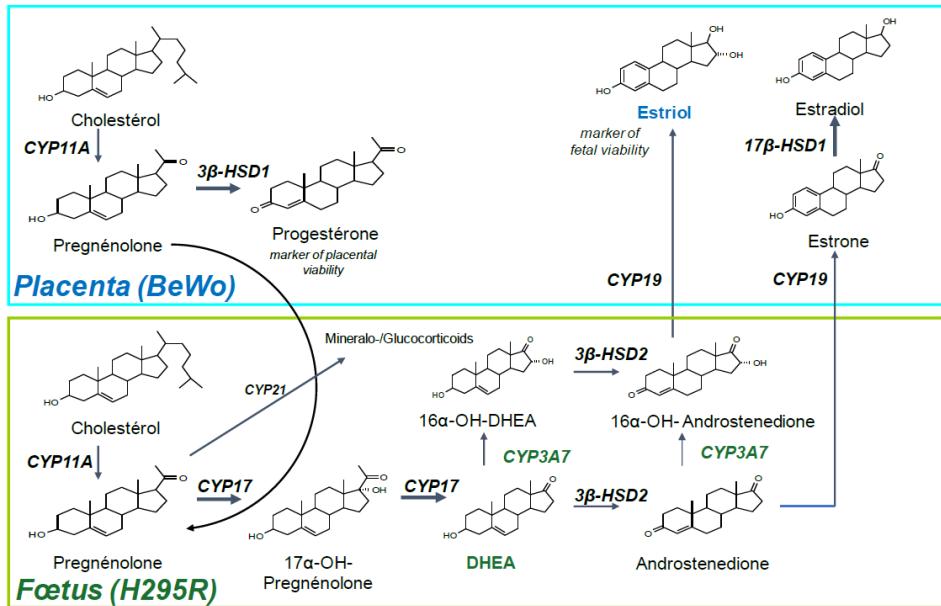


Figure 1- 14. Voie de biosynthèse de l'œstriol dans le modèle BeWo/H295R (Thibeault et al., 2014)

1.2.4.2 Modèles pour le cancer du sein : Différentes approches et défis rencontrés

Plusieurs efforts ont été réalisés afin de développer des modèles de co-culture représentant différents types de cancer du sein. Certains de ces modèles ont utilisé des lignées cellulaires, et d'autres des cultures primaires saines et malignes. Au moins quatre modèles recréant un cancer du sein ont été établis par les pairs. Chacun des modèles a des propriétés, méthodologies et buts variés. Cependant, ils servent d'inspirations et de guides potentiels pour de nouveaux modèles. Le tableau 1-3 résume les trois modèles de co-cultures existants et les modèles *in vivo*, décrits brièvement ci-dessous, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

En premier lieu, l'équipe du laboratoire de J. Thomas Sanderson en 2005 a établi un modèle de co-culture utilisant la lignée cellulaire MCF-7 et des fibroblastes mammaires primaires. Ils ont cultivé les cellules dans un seul compartiment afin que les cellules soient en contacts directs pour recréer la boucle de rétrocontrôle positif (réaction desmoplastique, décrite dans section 1.1.3.3) retrouvées dans les cancers du sein ER positifs. Des composés aux propriétés anti- et œstrogéniques sont capables d'influencer cette boucle de rétrocontrôle qui peut résulter à l'accroissement des tumeurs. Ils ont développés ce modèle pour détecter les effets potentiels des composés œstrogéniques, par PCR transcriptase inverse (RT-PCR), dans la promotion des tumeurs dans le cancer du sein (Heneweer, Muusse, Dingemans, et al., 2005; Heneweer, Van Den Berg, et al., 2005).

Un deuxième modèle de co-culture pertinent représentant un cancer du sein a été développé dans le laboratoire du professeur Charles Doillon de l'Université de Laval en 2015. Ce modèle consiste en la culture des lignées cellulaires MCF-7 et Hs578Bst en co-culture 3D afin d'investiguer les interactions entre les cellules cancéreuses épithéliales mammaires (MCF-7) et les cellules stromales (Hs578Bst) au niveau de l'expression et l'inhibition des enzymes stéroïdogéniques (Wang *et al.*, 2015).

Le troisième modèle de co-culture a été établi en 2014 par Chottanapund et al. utilisant la lignée cellulaire T-47D et des fibroblastes adipeux primaires mammaires. Ce modèle a été établi afin d'évaluer le potentiel de la mélatonine et le resvératrol comme inhibiteurs de l'aromatase pour des traitements hormonaux contre le cancer du sein. Les fibroblastes primaires et les cellules T-47D ont été cultivés en couches résultant à des contacts directs cellule-cellule.

Tableau 1- 3 : Résumé des avantages et inconvénients des modèles de co-cultures établis pour le cancer du sein.

Modèle	Avantages	Défis rencontrés	Référence
MCF-7 / Fibroblastes mammaires primaires	<ul style="list-style-type: none"> Lignée MCF-7 très bien établie. Cellules placées en couches (contacts cellule-cellule). 	<ul style="list-style-type: none"> Accès restreint au tissus humains (processus d'approbations). Prolifération limitée cultures primaires. MCF-7 est un biosenseur limité pour l'activité œstrogénique (<i>TFF1</i>). Reproductibilité des données expérimentales. 	(Heneweer, Muusse, Dingemans, <i>et al.</i> , 2005)
MCF-7 / Hs578Bst	<ul style="list-style-type: none"> Hs578Bst lignée immortalisée non-cancéreuse. Représentation réaliste du cancer du sein hormono-dépendant. Lignées cellulaires accessibles. Modèle en 3D (gels de collagène). 	<ul style="list-style-type: none"> Prolifération des Hs 578Bst limitée. Lignées cellulaires immortalisées. Mise au point laborieuse. Reproductibilité des données expérimentales. 	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
T-47D / Fibroblastes adipeux mammaires primaires	<ul style="list-style-type: none"> Fibroblastes sains. Contacts cellule-cellule (cellules placées en couches). 	<ul style="list-style-type: none"> Cultures primaires (prolifération limitée). Reproductibilité des données expérimentales. 	(Chottanapund <i>et al.</i> , 2014a)

Afin d'accommoder certaines limites des modèles préétablis, on suggère le développement d'un nouveau modèle de co-culture utilisant les inserts Transwell® avec les deux lignées cellulaires humaines uniques et complémentaires Hs578t et T-47D (Figure 1-15). L'utilisation de ces deux types cellulaires en co-culture va permettre de recréer le

microenvironnement stromale-tumorale retrouvés dans les cas de cancer du sein hormono-dépendant. Plus précisément, il va être possible de recréer la réaction desmoplastique (Figure 1-13). Le développement et la méthodologie pour ce nouveau modèle sont décrits dans le chapitre 3 du mémoire.

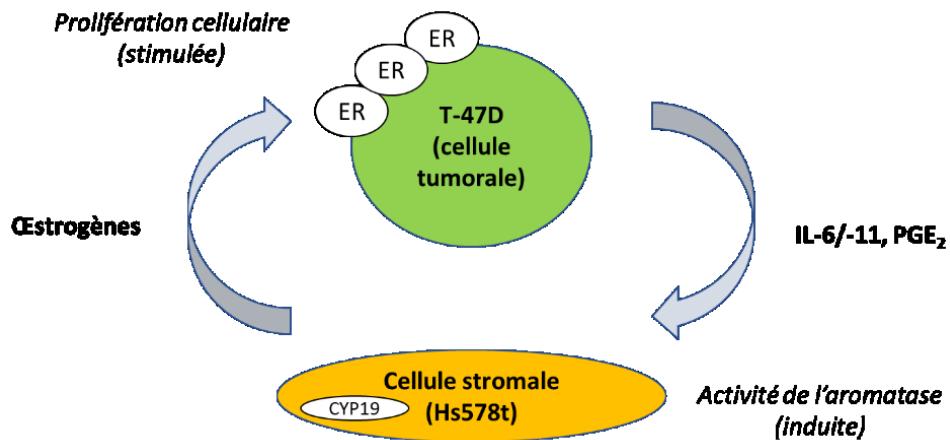


Figure 1- 15. Schématisation du modèle de co-culture proposé utilisant les lignées cellulaires humaines Hs578t et T-47D.

1.3 LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

1.3.1 L'unité féto-placentaire

L'utilisation de cette co-culture féto-placentaire, en tant qu'outil de criblage pour les perturbateurs endocriniens, a été validée dans une autre étude dans notre laboratoire (Thibeault *et al.*, 2017). Les deux lignées cellulaires possèdent les caractéristiques nécessaires pour pouvoir évaluer les effets des insecticides néonicotinoïdes sur l'activité et l'expression génique de CYP19, sur la production des hormones clés de la grossesse (E1, E2, E3, β-hCG, DHEA et androstenedione) ainsi que l'expression génique de CYP3A7.

1.3.1.1 Lignée cellulaire H295R

La lignée cellulaire humaine H295R sont des cellules humaines d'un carcinome surrénalien (CRL-2128; ATCC). Ces cellules ont été utilisées dans le modèle de co-culture de l'unité féto-placentaire afin de représenter l'unité fœtale. Les H295R possèdent toutes les capacités enzymatiques des cellules surrénaлиennes non-différenciées comme présentes dans la glande surrénale fœtale et elles produisent les androgènes 16α-hydroxylés. Cela indique qu'elles peuvent fournir les précurseurs uniques fœtales pour la biosynthèse de l'oestriol, l'oestrogène

unique à la grossesse. De plus, les H295R expriment la *CYP3A7*, l'isoforme fœtale essentielle dans le métabolisme et la biotransformation des xénobiotiques (Sanderson *et al.*, 2000; Hecker and Giesy, 2008; Sanderson, 2009; Thibeault *et al.*, 2014, 2017).

1.3.1.2 Lignée cellulaire BeWo

La lignée cellulaire humaine BeWo sont des cellules d'un choriocarcinome humain placentaire (CCL-98; ATCC, Rockville, MD). Ces cellules ont été utilisées dans le modèle de co-culture fœto-placentaire pour représenter le compartiment de trophoblastes villeux (placenta). Les cellules BeWo possèdent une grande similarité aux trophoblastes villeux et peuvent être induites par la forskoline afin de fusionner et de former le syncytiotrophoblaste. Celui-ci agit comme le syncytium humain; sous cette forme, l'activité basale de *CYP19* chez les BeWo est relativement élevée (Thibeault *et al.*, 2014).

1.3.2 Cancer du sein hormono-dépendant

1.3.2.1 Lignée cellulaire Hs578t

Les cellules humaines Hs578t (ATCC HTB-126) sont dérivées d'un carcinosarcome, un type de tumeurs du stroma rare et unique. Ces cellules n'expriment pas les ER, PR et HER2/neu (elles sont triple-négatives) mais expriment le *CYP19* et ses promoteurs pertinents (pII, I.3, I.4 et I.7) ainsi que les marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine et la vimentine. D'autre part, elles n'expriment presque pas les marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine (Lacroix and Leclercq, 2004; Prat *et al.*, 2010). Ces cellules vont servir à représenter les cellules stromales dans notre modèle de co-culture.

1.3.2.2 Lignées cellulaires T-47D

La lignée cellulaire humaine T-47D (ATCC HTB-133) est dérivée d'un carcinome canalaire du sein hormono-dépendant. Celles-ci expriment des taux élevés de marqueurs typiques luminal épithéliaux dont ER et la E-cadhérine (Lacroix and Leclercq, 2004). D'ailleurs, elles n'expriment pas le *CYP19* comparativement à la lignée cellulaire stromale Hs578t. Les cellules T-47D servent donc à représenter les cellules dépendantes aux œstrogènes dans notre modèle de co-culture puisque leur prolifération est dépendante aux œstrogènes. De plus, elles expriment la *TFF1*, un gène dont son expression génique est uniquement médiée par les ER. (Kao *et al.*, 2009).

1.4 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

1.4.1 Hypothèses

- 1) Les voies stéroïdogéniques qui sont actives chez la femme durant des situations sensibles comme la grossesse et le cancer du sein hormono-dépendant sont susceptibles aux perturbateurs endocriniens.
- 2) Les insecticides néonicotinoïdes imidaclopride, thiaclopride et thiamethoxame peuvent perturber la stéroïdogenèse dans deux modèles de co-cultures cellulaires distincts représentant respectivement l'unité féto-placentaire et le cancer du sein hormono-dépendant.

1.4.2 Objectifs

Notre **objectif général** est de démystifier les mécanismes cellulaires que les pesticides néonicotinoïdes utilisent pour causer les perturbations observées aux niveaux de la stéroïdogenèse féto-placentaire et dans la glande mammaire chez les humains en utilisant deux modèles de co-cultures distincts.

Nous avons comme objectifs spécifiques:

- 1) D'élucider les mécanismes utilisés par les néonicotinoïdes pour perturber la stéroïdogenèse féto-placentaire, notamment la biosynthèse de l'œstriol, dans le modèle préétabli de l'unité féto-placentaire utilisant les lignées cellulaires BeWo et H295R.
- 2) De développer un nouveau modèle en co-culture représentant le microenvironnement stroma/tumoral du cancer du sein hormono-dépendant en utilisant les lignées cellulaires humaines Hs578t et T-47D.

1.5 IMPORTANCE DU PROJET

Le processus des évaluations du risque toxicologiques sont laborieuses et requièrent beaucoup de temps. Le procédé d'approbation des composés chimiques est essentiel pour la sécurité et le bien-être de l'environnement, des humains ainsi que pour la faune. Cependant, les données expérimentales toxicologiques des composés chimiques aux propriétés perturbateurs

endocriniens ne sont pas toujours représentatives de la réalité dû à des extrapolations incertaines. Les données expérimentales proviennent majoritairement de modèles *in vitro* à base de cellules humaines ainsi que des modèles animaux subséquemment dans le processus d'approbation. Toutefois, ces modèles expérimentaux ne sont pas toujours les plus physiologiquement pertinents pour représenter les microenvironnements endocriniens humains afin d'évaluer les perturbateurs endocriniens dû à la nature de leurs voies d'expositions et aux effets observés. Le développement de modèles *in vitro* physiologiquement pertinent est essentiel afin de palier aux limites présentées par les modèles *in vitro* classiques et par les modèles *in vivo* animaux. Les modèles de co-cultures utilisant deux lignées cellulaires humaines peuvent servir comme meilleurs outils de dépistages pour évaluer les risques posés par les contaminants environnementaux, notamment les perturbateurs endocriniens. Ces modèles cellulaires permettent d'effectuer plusieurs analyses stéroïdogéniques simultanément, ce qui augmenterait la vitesse et le rendement des évaluations toxicologiques industrielles et gouvernementales. De plus, le développement de modèles cellulaires physiologiquement représentatifs contribut à l'initiative des trois « R » pour ultimement réduire le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations en recherche académique et industrielle.

2 CHAPITRE 2:

ARTICLE : The Use of a Unique Co-Culture Model of Fetoplacental Steroidogenesis as a Screening Tool for Endocrine Disruptors: The Effects of Neonicotinoids on Aromatase Activity and Hormone Production

Élyse Caron-Beaudoin, Rachel Viau, Andrée-Anne Hudon-Thibeault, Cathy Vaillancourt
et J. Thomas Sanderson

Toxicology and Applied Pharmacology 332 (2017) 15-24

2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

La biosynthèse des œstrogènes durant la grossesse est dépendante de la collaboration entre le fœtus produisant les précurseurs androgènes et le placenta exprimant l'enzyme aromatase (CYP19). La perturbation de la production des œstrogènes par des contaminants peut résulter à des conséquences de grossesses graves. Nous avons utilisés notre modèle *in vitro* de co-culture de la stéroïdogenèse féto-placentaire pour dépister les effets de trois insecticides néonicotinoïdes sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production des hormones stéroïdes. Une co-culture de cellules humaines de carcinome adrénocortical ayant des caractéristiques fœtale et les cellules de choriocarcinome humain qui possèdent des caractéristiques du trophoblaste villeux ont été exposés pendant 24h à des concentrations variées des trois néonicotinoïdes : thiaclopride, thiamethoxame et l'imidaclopride. L'activité catalytique de l'aromatase a été déterminé dans les deux lignées cellulaires en utilisant l'essai de la libération d'eau tritiée. La production d'hormones a été déterminée par ELISA. Les trois néonicotinoïdes ont induit l'activité de l'aromatase dans notre modèle de co-culture féto-placentaire et en concordance, la production d'estradiol et d'estrone ont été augmentées. Au contraire, la production d'œstriol a été grandement inhibée par les néonicotinoïdes. Les trois pesticides ont induits l'expression de CYP3A7 chez les H295R, et cette induction a été renversée par des co-traitements des cellules H295R avec de l'œstriol exogène. Le CYP3A7 est normalement exprimé dans le foie fœtal et il est un enzyme clé impliqué dans la synthèse de l'œstriol. Nous suggérons que les néonicotinoïdes sont métabolisées par la CYP3A7, entravant ainsi que la 16 α -hydroxylation du DHEA-S fœtal qui est normalement converti en œstriol par l'aromatase placentaire. Nous avons utilisé le modèle de co-culture féto-placentaire avec succès comme outil physiologiquement pertinent afin de souligner les effets potentiels des néonicotinoïdes sur la production des œstrogènes, l'activité de l'aromatase et l'expression de CYP3A7 pendant la grossesse.

2.2 CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE

Les résultats présentés dans l'article ont été obtenus par une collaboration entre Élyse Caron-Beaudoin et Rachel Viau. Elle a contribué à ce projet initialement en tant que stagiaire, où elle a participé dans l'obtention des résultats d'ELISA, les préparations de la co-culture féto-placentaire et pour l'activité catalytique de l'aromatase dans ce modèle. C'est lorsque Rachel Viau a commencée le programme de maîtrise qu'elle a poursuivie le projet en déterminant les mécanismes utilisés par les trois néonicotinoïdes afin d'inhiber la production d'œstriol dans le modèle établi (Figures 2-1 à 2-4). Rachel a procédé aux expériences dans les cellules H295R pour quantifier l'expression génique de *CYP3A7* et *SULT2A1* exposés aux trois néonicotinoïdes et en co-traitements avec de l'œstriol exogène (Figures 2-5 et 2-6). Les travaux de Rachel Viau ont permis de comprendre le mécanisme des néonicotinoïdes pour influencer la stéroïdogenèse dans l'unité féto-placentaire. De plus, ses travaux ont permis de lui familiariser avec les modèles de co-cultures cellulaires utilisant les inserts Transwell®. Cet apprentissage a été grandement bénéfique pour le développement du nouveau modèle de co-culture du microenvironnement stroma/tumoral décrit dans le chapitre 3 du mémoire.

The use of a unique co-culture model of fetoplacental steroidogenesis as a screening tool for endocrine disruptors: The effects of neonicotinoids on aromatase activity and hormone production

Élyse Caron-Beaudoin, Rachel Viau, Andrée-Anne Hudon-Thibeault, Cathy Vaillancourt and J. Thomas Sanderson

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada

Centre de Recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

CINBIOSE, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

ABSTRACT

Estrogen biosynthesis during pregnancy is dependent on the collaboration between the fetus producing the androgen precursors, and the placenta expressing the enzyme aromatase (CYP19). Disruption of estrogen production by contaminants may result in serious pregnancy outcomes. We used our recently developed *in vitro* co-culture model of fetoplacental steroidogenesis to screen the effects of three neonicotinoid insecticides on the catalytic activity of aromatase and the production of steroid hormones. A co-culture of H295R human adrenocortical carcinoma cells with fetal characteristics and BeWo human choriocarcinoma cells which display characteristics of the villous cytotrophoblast was exposed for 24h to various concentrations of three neonicotinoids: thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid. Aromatase catalytic activity was determined in both cell lines using the tritiated water-release assay. Hormone production was measured by ELISA. The three neonicotinoids induced aromatase activity in our fetoplacental co-culture and concordantly, estradiol and estrone production were increased. In contrast, estriol production was strongly inhibited by the neonicotinoids. All three pesticides induced the expression of CYP3A7 in H295R cells, and this induction was reversed by co-treatment of H295R cells with exogenous estriol. CYP3A7 is normally expressed in fetal liver and is a key enzyme involved in estriol synthesis. We suggest that neonicotinoids are metabolized by CYP3A7, thus impeding the 16 α -hydroxylation of fetal DHEA(-sulfate), which is normally converted to estriol by placental aromatase. We successfully used the fetoplacental co-culture as a physiologically relevant tool to highlight the potential effects of neonicotinoids on estrogen production, aromatase activity and CYP3A7 expression during pregnancy.

2.3 INTRODUCTION

The use of *in vitro* models in toxicology has significantly enhanced our understanding of the mechanisms by which chemicals cause adverse effects in humans and wildlife. However, to mimic the interactions that occur *in vivo* is a challenge when whole animal or human studies are not possible. Well thought-out *in vitro* models, such as the use of co-culture models, are promising approaches to study the communication between different cell types in a more complex context. As example, a co-culture using primary human mammary fibroblasts and MCF-7 (epithelial breast cancer cells) was developed by (Heneweer et al., 2005) to study intercellular interactions in breast cancer. More recently, we developed a co-culture model that reproduces the steroidogenic fetoplacental unit and can be used to evaluate the impacts of endocrine disruptors on this delicate aspect of fetoplacental communication (Hudon Thibeault et al., 2014; Hudon Thibeault et al., 2017).

During pregnancy, the fetoplacental unit plays an important endocrine role, ensuring, amongst others, estrogen (estrone, estradiol and estriol) biosynthesis. Estrogens are required in several physiological processes during pregnancy, such as the formation of the syncytiotrophoblast and regulation of uteroplacental blood flow (Yashwanth et al., 2006). Maternal cholesterol is converted to androgen precursors in the fetus by the action of several enzymes, such as cytochrome P450 17 (*CYP17*), sulfotransferase 2A1 (*SULT2A1*) and steroid 16 α -hydroxylase (*CYP3A7*). In the placenta, *CYP19* (aromatase) is responsible for the final step in estrone, estradiol and estriol biosynthesis (Leeder et al., 2005; Rainey et al., 2002). Alone, the placenta cannot produce estrogens *de novo*, as it needs the steroid precursors synthesized by the fetus (for complete steroidogenesis pathway, see Fig. 2-7 in Results section). Estriol is uniquely produced during pregnancy, and its synthesis requires correct functioning of the fetoplacental unit (Mucci et al., 2003). Thus, a disruption in biosynthesis of estrogens such as that of estriol may adversely alter development and influence important indicators of fetal health like birth weight and head circumference (Kaijser et al., 2000; Troisi et al., 2003). Moreover, decreased free estriol in maternal serum has been associated with growth retardation, reduced Apgar scores and postnatal complications in a control study of 869 women (Gerhard et al., 1986).

Exposure during pregnancy to contaminants such as heavy metals, pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs) and phthalates have been linked to fetal growth retardation (Siddiqui et al., 2003), spontaneous abortions, learning disabilities (Hu, 1991; Abadin et al.,

1997), reduced birthweight, preterm birth (Jacobson et al., 1990) and disruption of reproductive development (Mylchreest et al., 2000; Honma et al., 2002; Foster, 2006). It is not surprising that exposure to certain chemicals during pregnancy can lead to adverse pregnancy and birth outcomes, since *in utero* development is a critical window of vulnerability of the embryo (Bellinger, 2013). The fetoplacental co-culture model of steroidogenesis developed in our laboratory (Hudon Thibeault et al., 2014) allows us to study chemicals that may impair estrogen biosynthesis or that of other key placental hormones such as β-human chorionic gonadotropin (β-hCG), potentially leading to serious pregnancy complications (Albrecht and Pepe, 1999; Albrecht et al., 2000; Svedas et al., 2002). We have reported earlier that prochloraz, a widely-used fungicide, and norfluoxetine, a selective serotonin-reuptake inhibitor, strongly inhibited aromatase activity and estrogen production in our fetoplacental co-culture model (Hudon Thibeault et al., 2014; Hudon Thibeault et al., 2017).

Neonicotinoids are some of the most widely used insecticides in the world. For example, thiamethoxam and clothianidin were both in the top 10 most sold insecticides in Canada in 2010 (Health Canada, 2014). By 2012, neonicotinoids were applied to 11 million hectares in Canada, representing 216,000 kg of active neonicotinoid (Main et al., 2014). Neonicotinoids are mostly used as seed coatings on the vast majority of crops, fruits and vegetables. Moreover, their physicochemical characteristics (Kow and pKa) explain their systemic properties and their distribution throughout the entire plant (Bonmatin et al., 2015; Simon-Delso et al., 2015). For this reason, neonicotinoid insecticides also target pollinators, mammals and humans. The scientific community is increasingly accepting that exposure to these insecticides partially explains the worldwide decline in honeybees populations (Decourtye et al., 2004; Girolami et al., 2009; Henry et al., 2012; Goulson, 2013). Neonicotinoid insecticides are also persistent in the environment. Half-lives in soil vary and can reach 1250 days for imidacloprid (Main et al., 2014). Because of their persistence and repeated application, it is expected that neonicotinoids will continue to accumulate in soil (Stokstad, 2013). A recent study analyzed neonicotinoid levels in surface waters from 136 wetlands across Saskatchewan, Canada. Clothianidin and thiamethoxam concentrations were detected in the majority of water samples, reaching concentrations as high as 3110 ng/L (Main et al., 2014). Moreover, human populations are also exposed to neonicotinoids through diet. A study conducted in Boston, Massachusetts, analyzed neonicotinoid residues in honey, fruits and vegetables purchased in local grocery stores. Imidacloprid was the most frequently detected neonicotinoid in the samples. At least one neonicotinoid was detected in all the tested fruits and vegetables. Also, in 72% of fruits and 45% of the tested vegetables, two or more neonicotinoids were detected, with concentrations

reaching 100.7 ng/g (Chen et al., 2014). Furthermore, a study conducted with a cohort of 147 farm workers from northeastern Japan evaluated the presence of neonicotinoid metabolites in urine. A metabolite of the neonicotinoid dinotefuran, 3-furoic acid, was detected in 100% of the samples at concentrations as high as 0.13 μ M (Nomura et al., 2013). Moreover, the concentrations of 6-chloronicotinic acid, a metabolite of imidacloprid and thiacloprid, reached concentrations of 0.05 μ M (Nomura et al., 2013).

In recent years, a growing number of studies have evaluated the endocrine disrupting potential of neonicotinoid insecticides. We demonstrated that two neonicotinoids (thiacloprid and thiamethoxam) induce aromatase expression in a promoter-specific manner *in vitro*, targeting promoters known to be overexpressed in breast cancer (Caron-Beaudoin et al., 2016).

Moreover, Bal et al. (2012) found that male rats exposed to imidacloprid (2 mg/kg/day) through diet showed increased apoptosis and fragmentation of seminal DNA. In female rats exposed to the same neonicotinoid (20 mg/kg/day), Kapoor et al. (2011) noted decreased ovarian weight and altered levels of follicle stimulating hormone and progesterone.

In this study, we used our recently developed fetoplacental co-culture model as a screening tool to determine the effects of three widely used neonicotinoid insecticides on steroidogenesis in the human fetoplacental unit and more precisely, on aromatase activity, estrogen production and CYP3A7 expression (key enzyme in the fetal production of the estriol precursor 16 α -hydroxyDHEA(-sulfate)). Our previous work showed that two neonicotinoid insecticides, thiacloprid and thiamethoxam, induced CYP19 expression and aromatase activity at environmentally relevant concentrations in human H295R adrenocortical carcinoma cells displaying characteristics of the fetal adrenal cortex and which represents the fetal compartment of our fetoplacental co-culture (Caron-Beaudoin et al., 2016). Therefore, we hypothesized that neonicotinoids may also disrupt the production of estrogens within the fetoplacental unit.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Chemicals

All pesticides were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) (thiacloprid, Pestanal 37905, purity > 99%; thiamethoxam, Pestanal 37924, purity > 99%; imidacloprid, Pestanal 37894, purity > 99%). All neonicotinoids were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) as 30 or 100 mM stock solutions.

2.4.2 Feto-placental co-culture

The feto-placental co-culture (Hudon Thibeault et al., 2014) consists of H295R adrenocortical carcinoma and BeWo choriocarcinoma cells. H295R cells have the characteristics of the fetal adrenocortex (Gazdar et al., 1990; Staels et al., 1993) as well as that of fetal liver (Hudon Thibeault et al., 2014) and reflect the steroidogenesis that would occur in the fetal compartment. BeWo cells are a well documented model of the placental trophoblast (Ellis et al., 1990; Nampoothiri et al., 2007). This co-culture model of the fetoplacental unit is capable of *de novo* production of estrogens, including the unique pregnancy estrogen estriol, under our experimental conditions (Hudon-Thibeault et al., 2014). Briefly, BeWo (ATCC no. CCL-98) and H295R (ATCC no. CRL-2128) cells were cultured in DMEM/F-12 without phenol red (Catalog no. 11039021, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Tempe, AZ). H295R were cultured in DMEM/F-12 (Catalog no. 11039021, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), supplemented with 2.5% Nu Serum (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and 1% ITS + Premix (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Once confluent, BeWo and H295R were trypsinized, and H295R cells were seeded in 24-well plates at a concentration of 2.5×10^4 cells/well, whereas BeWo cells were seeded in transwell inserts (Corning Life Sciences, Corning, NY) at a concentration of 1.25×10^4 cells/insert. After 24h, the co-culture was assembled by adding the inserts containing BeWo cells to the 24-well plates containing H295R cells. The original culture media were removed and replaced with co-culture media which contained DMEM/F-12 without phenol red, supplemented with 2.5% stripped Nu Serum, 1% ITS + Premix and 1% stripped FBS, and the various concentrations of the neonicotinoids or vehicle control (DMSO at a final concentration of 0.1%). Neonicotinoid concentrations were chosen based on our previous study that determined their effects on CYP19 expression in H295R cells and an absence of cytotoxicity (Caron-Beaudoin et al., 2016). Moreover, the selected concentrations are environmentally relevant as our lower range is similar to what is measured in urine samples from farm workers (Nomura et al., 2013). Exposures were for 24h in an incubator at 37°C with a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.4.3 CYP19 catalytic activity

Aromatase activity was determined as previously described (Sanderson et al., 2000; Hudon Thibeault et al., 2014; Caron-Beaudoin et al., 2016). Briefly, after the 24h exposure period, the

treated media in the insert and well were combined and removed (and stored at -80°C for hormone quantification), and H295R and BeWo cells were washed twice with 1x PBS. The inserts containing BeWo cells were removed from the wells containing H295R cells and placed in 12-well plates for further steps. A volume of 250 µL of serum and additive-free culture medium containing 54 nM 1 β -³H-androstenedione (Perkin Elmer, Wellesley, MA) was added to H295R cells. This volume was 50 µL for BeWo cells. Cells were incubated for 90 min at 37°C, during which there was a linear conversion of 1 β -³H-androstenedione (and release of tritiated water). Tritiated water was extracted from the reaction medium of each of the cell types, and counted in plates containing liquid scintillation cocktail using a Microbeta Trilux (PerkinElmer). Formestane (1 µM), an irreversible CYP19 inhibitor, was used to ensure the specificity of the aromatase reaction. Forskolin (10 µM) was used as a positive control for the induction of aromatase activity.

2.4.4 Hormone quantification

The following hormones, dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione, β -human chorionic gonadotropin (β -HCG), estradiol, estrone and estriol) were quantified in the co-culture media (well and insert pooled) using ELISA kits from DRG Diagnostics (Marburg, Germany).

2.4.5 RNA isolation and quantitative RT-PCR

RNA isolation and quantitative RT-PCR were performed as described in Caron-Beaudoin et al. (2016). Briefly, H295R cells were cultured in CellBind 6-well plates (Corning Inc., Corning, New York) at a concentration of 750,000 cells/well in 2 mL medium/well for 24h. Cells were subsequently exposed for 24h to thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid at 3 and 10 µM, which were the concentrations with the greatest effects on aromatase catalytic activity in the co-culture. To investigate whether the inhibitory effects of neonicotinoids on estriol production in the co-culture were responsible for altering CYP3A7 enzyme expression, H295R cells were pretreated for 4h with estriol (5 ng/mL), prior to a 24-h exposure to thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid (3 µM). DMSO (0.1% or 0.2% in the case of co-treatments) was used as a vehicle control. RNA was extracted using the RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, Ontario) according to enclosed instructions and stored at -80 °C. The 260/280 nm absorbance ratio was used to verify RNA purity. Reverse transcription was subsequently performed with 1 µg of RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) and T3000 Thermocycler (Biometra,

Göttingen, Germany): cDNA was stored at -20°C for quantitative PCR. Primer pair sequences and standard curves characteristics for the reference genes (*UBC* and *RPII*), as well as *CYP3A7* and *SULT2A1*, are described in Table 2-1. Real-time quantitative PCR was performed using EvaGreen MasterMix (BioRad) with CFX96 real-time PCR Detection System(BioRad). Housekeeping genes were selected based on their stability for each pesticide treatment (gene expression stability (M) value below 0.5) using the geNorm algorithm method (Biogazelle qbase Plus Soft- ware, Zwijnaarde, Belgium).

2.4.6 Statistical analysis

Experiments were performed 3 or 4 times using different cell passages, and per experiment each treatment was conducted in triplicate. Results are presented as means with standard errors. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post-hoc test, or a Student t-test was performed (JMP Software, SAS, Cary, NC), depending on the experimental design. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

2.5 RESULTS

2.5.1 Effects of neonicotinoids on CYP19 catalytic activity

In this study, we determined the effects of three widely used neonicotinoids (thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid) on the catalytic activity of *CYP19* in a co-culture of H295R and BeWo cells. Forskolin increased aromatase activity by 3.9 and 12-fold in BeWo and H295R cells, respectively (Fig. 2-1). Formestane (1 µM) decreased its activity by 80-90% in both cell lines (not shown). A 24h exposure to increasing concentrations of thiacloprid induced aromatase activity in both cell types in co-culture (Fig. 2-1A). In BeWo cells, thiacloprid induced aromatase activity by 1.3-fold at 10 µM, which was statistically significant. In H295R cells, thiacloprid increased aromatase activity by 1.9- and 2.0-fold above control at a concentration of 0.1 and 0.3 µM, respectively. At greater concentrations this increase was no longer apparent. A 24-h exposure of the co-culture to various concentrations of thiamethoxam induced aromatase activity in H295R cells by 1.8- and 2.2-fold above control, at 3 and 10 µM, respectively (Fig. 2-1B). Thiamethoxam did not affect the catalytic activity of *CYP19* in the BeWo cell compartment of the co-culture (Fig. 2-1B). Finally, a 24h exposure of the co-culture to 3 and 10 µM imidacloprid induced the aromatase activity in H295R cells by 2.2- and 2.4-fold, respectively

(Fig. 2-1C), whereas in BeWo cells it was induced significantly by 2.3-fold at 10 µM only (Fig. 2-1C).

2.5.2 Effects of neonicotinoids on hormone production

Basal production of dehydroepiandrosterone (DHEA) (1962 ± 166 pg/mL), androstenedione (38.8 ± 1.4 pg/mL), estriol (486.2 ± 131.8 pg/mL), estradiol (21.9 ± 3.7 pg/mL) and estrone (363.1 ± 13.3 pg/mL) by the co-culture was similar to that found in our previous study (Hudon Thibeault et al., 2014) which initially characterized the model, although estrone and β-HCG production in our study was slightly higher than previously reported. Thiacloprid increased DHEA production statistically significantly at 3 µM (3506 ± 450 pg/mL) and 10 µM (3912 ± 402 pg/mL), compared to vehicle control (1961 ± 166 pg/mL) (Fig. 2-2A), although it had no effect on androstenedione production (Fig. 2-2B). Thiacloprid increased β-hCG production to a statistically significant extent at 0.1 µM (140.8 ± 24.6 mIU/mL) compared to DMSO (74.5 ± 12.3 mIU/mL), but not at greater concentrations (Fig. 2-2C). Thiacloprid significantly increased estradiol and estrone production by the co-culture at 0.1 and 0.3 µM, resulting in estradiol concentrations of 108.7 ± 32.6 and 55.4 ± 7.1 pg/mL, and estrone concentrations of 617.2 ± 48.6 and 499.7 ± 79.4 pg/mL, respectively, compared to vehicle control (estradiol: 21.9 ± 3.7 pg/mL; estrone: 363.1 ± 13.3 pg/mL) (Fig. 2-2D, 2-2E). Strikingly, estriol production in the co-culture was strongly inhibited by 0.3 and 3 µM thiacloprid (146.5 ± 76.0 and 148.8 ± 78.3 pg/mL), decreasing production to about 30% of DMSO control (486.2 ± 131.8 pg/mL) (Fig. 2-2F). In the co-culture exposed to thiamethoxam, DHEA production was increased concentration-dependently and was significantly greater than control (1790 ± 29.5 pg/mL) by 1.67-fold at 0.3 µM (2992 ± 166 pg/mL), by 1.9-fold at 3 µM (3464 ± 550 pg/mL) as well as at 10 µM (3436 ± 466 pg/mL) (Fig. 2-3A). The production of androstenedione and β-hCG remained unchanged (Fig. 2-3B, 2-3C). Thiamethoxam concentration-dependently increased estradiol production with a 5.0-fold increase at 10 µM (108.6 pg/mL) compared to DMSO control (21.9 ± 3.7 pg/mL) (Fig. 2-3D). Estrone production was increased by 2-fold (735.2 pg/mL) at 10 µM thiamethoxam compared to control production (363.1 ± 13.3 pg/mL) (Fig. 2-3E). Estriol production was inhibited by about 80% at all tested concentrations of thiamethoxam compared to DMSO control (Fig. 2-3F).

In the co-culture exposed to imidacloprid, DHEA production was significantly increased at all concentrations by about 1.7-fold (3088 ± 325 to 3381 ± 475 pg/mL) compared to control (1962 ± 166 pg/mL) (Fig. 2-4A), whereas androstenedione production was not affected (Fig. 2-

4B, 2-4E). The production of β -hCG was increased statistically significantly at an imidacloprid concentration of 10 μ M (181.1 ± 19.0 mIU/mL) by about 2.8-fold above control (64.5 ± 18.9 mIU/mL) (Fig. 2-4C). Estradiol production was strongly elevated at 10 μ M imidacloprid (158.4 ± 51.9 pg/mL) and was about 7.2-fold greater than control (Fig. 2-4D). Imidacloprid at all concentrations inhibited estriol production by about 80% compared to DMSO control (Fig. 2-4F).

2.5.3 Effects of neonicotinoids on mRNA levels of CYP3A7 and SULT2A1

In the co-culture exposed to each of the three neonicotinoids, a significant decrease in estriol production was observed. *SULT2A1*, expressed in the fetal adrenal, and *CYP3A7*, expressed in the fetal liver, are key enzymes in the biosynthesis of the precursor for estriol, which is produced predominantly in placenta. Therefore, we wished to confirm the presence of *SULT2A1* and *CYP3A7* in H295R cells by RT-qPCR and then determine the potential effects of neonicotinoids on their expression. As a novel finding, we were able to detect *SULT2A1* and *CYP3A7* expression in H295R cells, confirming our previous suggestion that H295R cells act as the fetal adrenocortical as well as liver compartment of the co-culture model. *SULT2A1* expression was not affected by exposure to thiadiazolidinedione, thiamethoxam or imidacloprid at 3 or 10 μ M (data not shown). A 24h exposure of H295R cells to thiadiazolidinedione at 3 and 10 μ M resulted in a statistically significant increase in levels of *CYP3A7* expression by 6.29 and 6.83-fold, respectively, compared to DMSO control (Fig. 2-5). Thiamethoxam at 3 μ M induced *CYP3A7* mRNA levels statistically significantly by 5.88-fold compared to DMSO control. A 24h exposure to 3 μ M imidacloprid increased *CYP3A7* expression in H295R cells by 3.75-fold compared to DMSO control, although this induction was not statistically significant (Fig. 2-5).

To determine whether the increased *CYP3A7* gene expression was related to the decreased estriol levels in response to the neonicotinoids, we determined the effect of estriol supplementation (using a concentration normally found in the co-culture under basal conditions) on the expression of *CYP3A7* in response to thiadiazolidinedione, thiamethoxam or imidacloprid. Co-treatment of H295R cells with estriol (5 ng/mL) prior to a 24h exposure to thiadiazolidinedione, thiamethoxam or imidacloprid at 3 μ M resulted in significantly reduced levels of *CYP3A7* expression compared to the neonicotinoid treatments alone, which all increased *CYP3A7* levels significantly above DMSO control. In the case of imidacloprid, co-treatment with estriol reduced imidacloprid-induced *CYP3A7* to levels not significantly different from DMSO control.

Tableau 2- 1. Sequences of the primer pairs and their amplification characteristics for *CYP3A7* and *SULT2A1* transcripts and that of two reference genes (*UBC* and *RPII*), in H295R cells.

Gene	Primer pairs (5'-3')	Amplification characteristics	Reference
<i>CYP3A7</i>	Fw: CTCTTAAGAAAGCTGTGCC Rv: GGGTGGTGGAGATAGTCCTA	Standard curve: $r^2=0.97$ Efficiency: 117.6%	Kondoh et al. (1999)
<i>SULT2A1</i>	Fw: TCGTCATAAGGGATGAAGATGTAATAA Rv: TGCATCAGGCAGAGAATCTCA	Standard curve: $r^2=0.982$ Efficiency: 118.6%	Shiraki et al. (2011)
<i>UBC</i>	Fw: ATTTGGGTGCGCGTTCTTG Rv: TGCCTTGACATTCTCGATGGT	Standard curve: $r^2=0.981$ Efficiency: 109.0%	Vandesompele et al. (2002)
<i>RPII</i>	Fw: GCACCACGTCCAATGACAT Rv: GTGCGGCTGCTTCCATAA	Standard curve: $r^2=0.986$ Efficiency: 100.1%	Radonić et al. (2004)

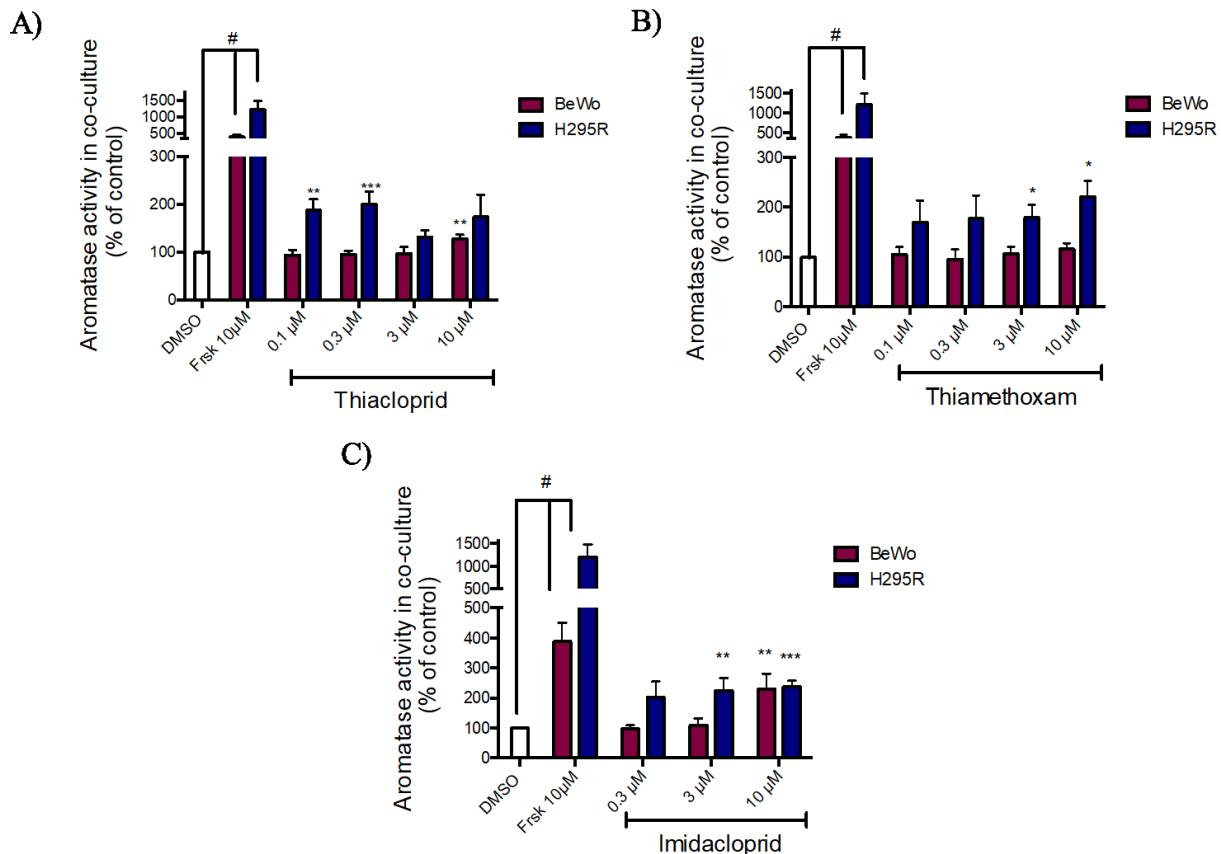


Figure 2- 1. Concentration-dependent effects of thiacloprid (A), thiamethoxam (B) and imidacloprid (C) on aromatase activity in H295R and BeWo cells in co-culture.

Forskolin (Frsk) was used as a positive control for induction of aromatase activity. (#) A statistically significant difference between Frsk treatment and DMSO control (Student t-test; $P < 0.05$). (*, **, ***). A statistically significant difference between neonicotinoid treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Experiments were performed 4 times using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

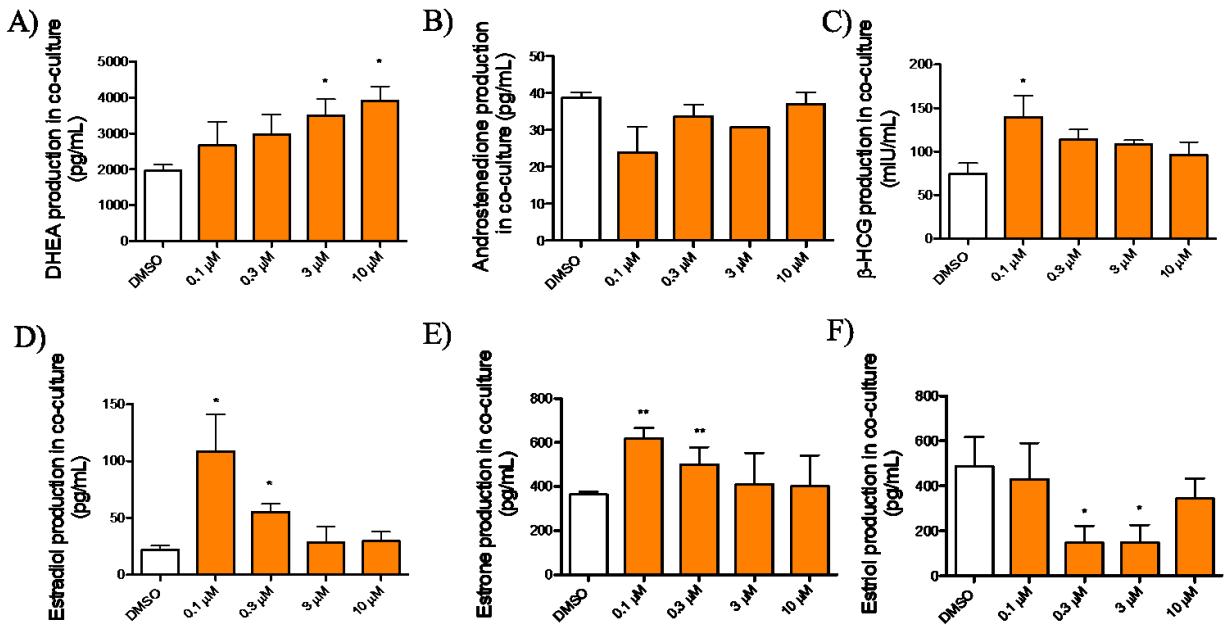


Figure 2-2. Concentration-dependent effects of thiacloprid on DHEA (A), androstenedione (B), β -hCG (C), estradiol (D), estrone (E) and estriol (F) production by a co-culture of H295R and BeWo cells.

(*, **, ***). A statistically significant difference between neonicotinoid treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Experiments were performed 4 times using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

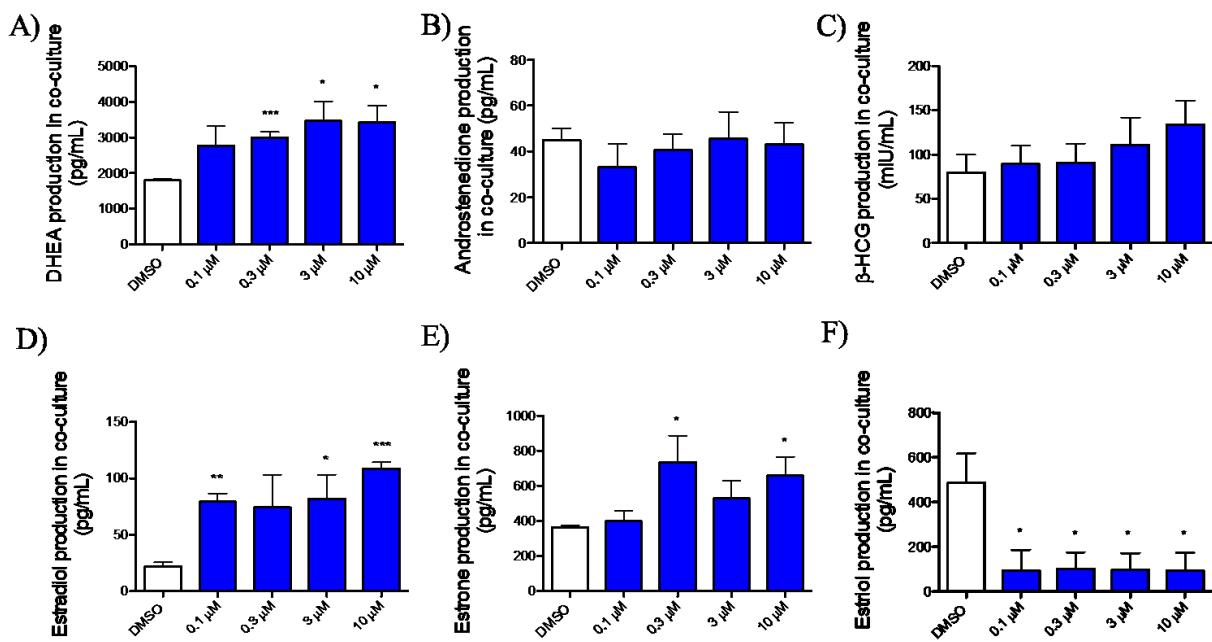


Figure 2-3. Concentration-dependent effects of thiamethoxam on DHEA (A), androstenedione (B), β -hCG(C), estradiol (D), estrone (E) and estriol (F) production by a co-culture of H295R and BeWo cells.

(*, **, ***) A statistically significant difference between neonicotinoid treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). Experiments were performed 4 times using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

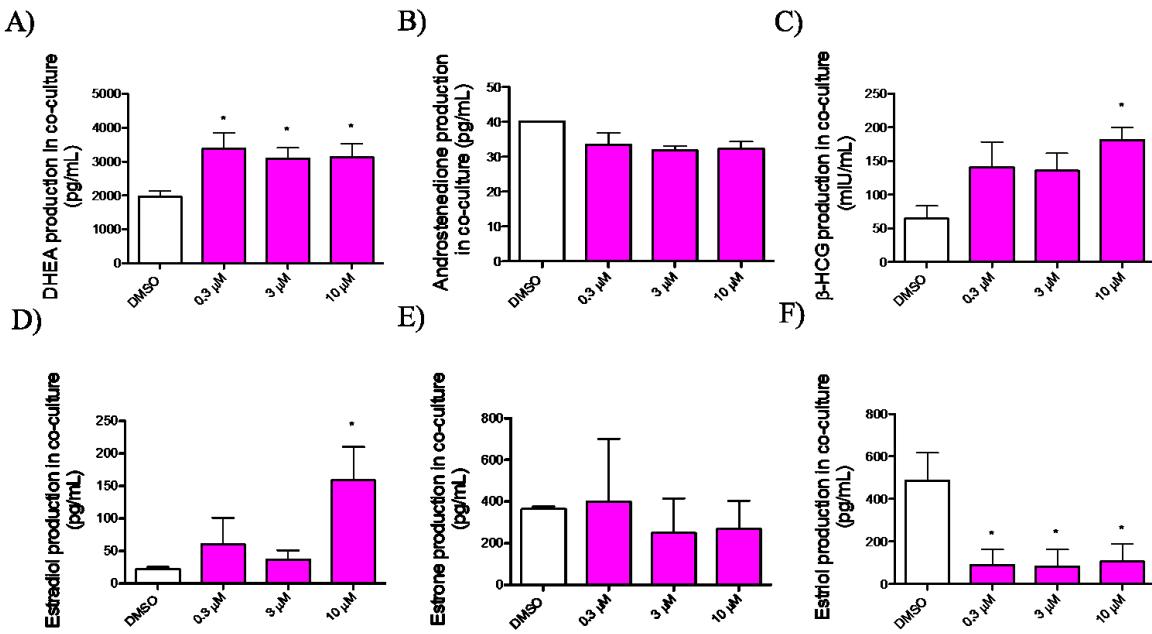


Figure 2-4. Concentration-dependent effects of imidacloprid (on DHEA (A), androstenedione (B), β -hCG (C), Estradiol (D), Estrone (E) and Estriol (F) production by H295R and BeWo cells in co-culture.

(*, **, ***) A statistically significant difference between neonicotinoid treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). Experiments were performed 4 times using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

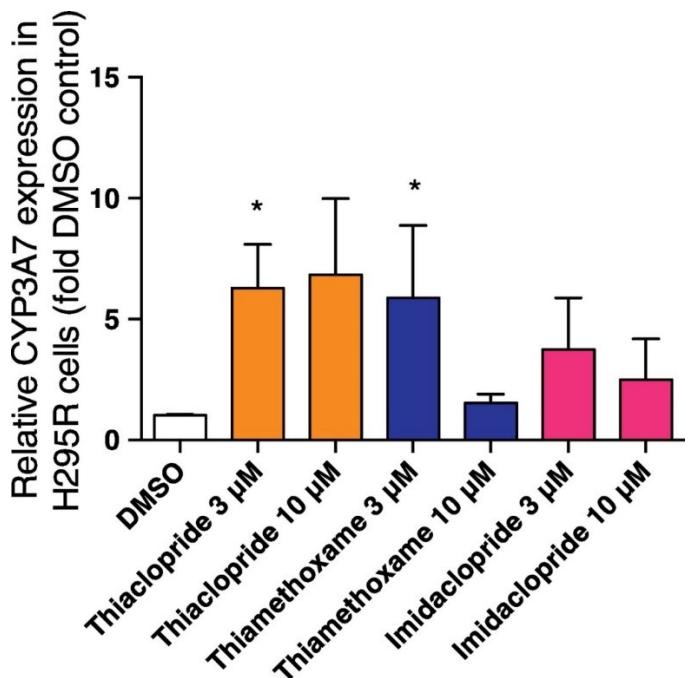


Figure 2- 5. Relative expression levels of CYP3A7 in H295R cells exposed for 24 h to 3 or 10 μ M of thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid.

DMSO was used as a negative control. (*, **, ***) A statistically significant difference between neonicotinoid treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). Experiments were performed 3 times using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

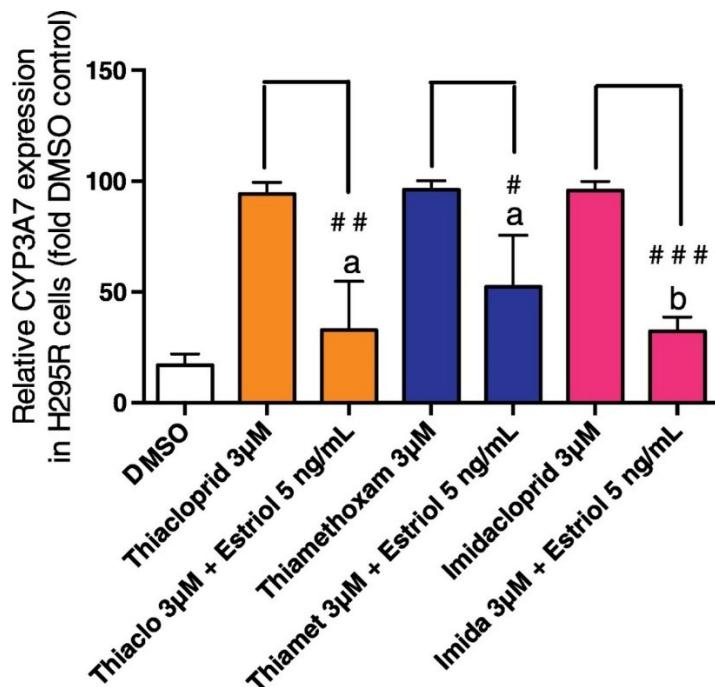


Figure 2- 6. Relative expression of CYP3A7 in H295R cells exposed for 24h to 3 μ M of thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid ('inducers'), with or without co-treatment with estriol (5 ng/mL).

CYP3A7 expression levels in cells co-treated with estriol were expressed as a % of those in cells treated with each neonicotinoid alone (100%). (#, ##, ###). A statistically significant difference between neonicotinoid- and co-treated cells; Student t-test; #P < 0.05. ##P < 0.01; ###P < 0.001. (a) No statistical difference between co-treatment and DMSO control, (b) A statistically significant difference between co-treatment and DMSO control; Student t-test; P < 0.05. Experiments were performed 3 times using different cell passages; per experiment each treatment was tested in triplicate.

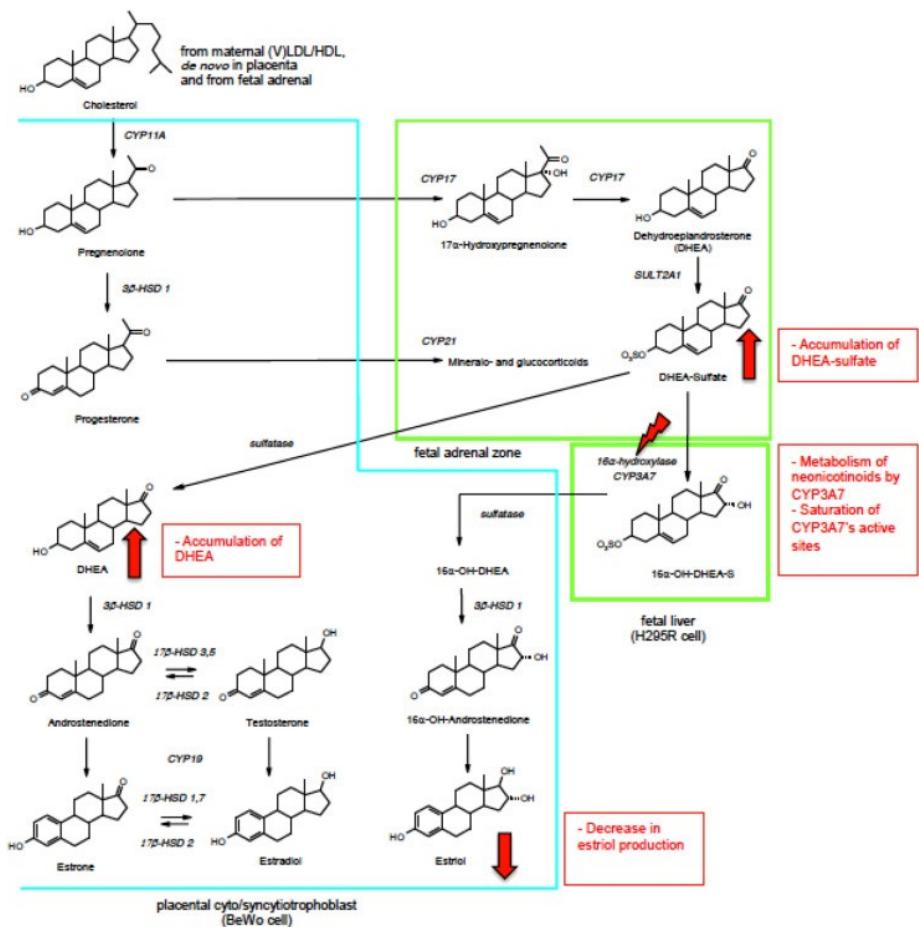


Figure 2-7. Steroidogenic pathways in the co-culture model of fetoplacental steroidogenesis, and the proposed targets of neonicotinoid insecticides (in red) leading to decreased estriol production and increased levels of DHEA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

2.6 DISCUSSION

2.6.1 Fetoplacental co-culture as a screening tool for endocrine disrupting chemicals

We have successfully applied our previously developed fetoplacental co-culture model as a unique screening tool to evaluate the potential endocrine disrupting effects of a series of neonicotinoids on steroidogenesis during pregnancy. Naturally, our co-culture system has some limitations – it uses cancer cells, not primary cells and cannot fully describe the complex interactions that occur *in vivo*, but as a model of fetoplacental steroidogenesis it is capable of producing a variety of hormones important during pregnancy. We measured aromatase activity in both the fetal (H295R) and placental (BeWo) compartments of the co-culture model with

basal activity being at least 15 times higher in BeWo cells than in H295R cells (Fig. 2-1A, 2-1C), as previously demonstrated (Hudon Thibeault et al., 2014). This corresponds well with the *in vivo* situation where the placenta is responsible for the majority of *CYP19* expression and estrogen biosynthesis (Mesiano and Jaffe, 1997; Hanley et al., 2001; Rainey et al., 2002; Pezzi et al., 2003). It is well understood that estrogen production in the fetoplacental unit is dependent upon a close collaboration between the fetus and the placenta. As the human placenta does not express significant levels of *CYP17* or its associated catalytic activities, it is, despite high levels of aromatase activity, incapable of producing significant amounts of estrogens *de novo* and is dependent on androgen precursors produced by the fetal adrenal and liver. During pregnancy, up to 90% of the unique pregnancy estrogen estriol is derived from fetal precursors (Gerhard et al., 1986). As previously shown, our fetoplacental co-culture model produces significant quantities of estriol (Figs. 2-2F, 2-3F, 2-4F), whereas each cell type in monoculture produces negligible amounts (Hudon Thibeault et al., 2014), further supporting the physiological relevance of our co-culture as a representative model of the fetoplacental steroidogenic unit and justifying its use as a meaningful screening tool for the effects of potential endocrine disrupting chemicals during pregnancy (Hudon Thibeault et al., 2017).

2.6.2 Disruption of fetoplacental steroidogenesis by neonicotinoid insecticides

It is widely accepted that an important number of environmental contaminants have estrogen-like activity. The most commonly studied mechanism for estrogenic effects is the binding of chemicals to the estrogen receptor, whereby they act as (partial) agonists. This mechanism has been demonstrated for several contaminants to which pregnant women may be exposed, such as bisphenol A (Diel et al., 2002; Vivacqua et al., 2003; Heneweer et al., 2005; Wetherill et al., 2007; Chou et al., 2011). However, estrogen receptor activation is not the only possible mechanism by which environmental contaminants may exert pro- or antiestrogenic activity. For example, atrazine, a herbicide widely used in North America, induces aromatase activity and expression in various human cell lines (Sanderson et al., 2000, 2001, 2002; Sanderson, 2006; Fan et al., 2007; Caron-Beaudoin et al., 2016). A growing number of studies have determined that neonicotinoid insecticides are potential endocrine disruptors. A recent study showed that clothianidin, a neonicotinoid and metabolite of thiamethoxam, caused DNA fragmentation in germ cells of male quails (Hoshi et al., 2014). Kapoor et al. (2011) showed that female rats exposed to neonicotinoids had lower ovarian weight, as well as LH and progesterone levels. We

also previously demonstrated that two neonicotinoids, thiacloprid and thiamethoxam, induced *CYP19* expression and aromatase activity in H295R cells at environmentally relevant concentrations (Caron-Beaudoin et al., 2016). In the present study, the neonicotinoids thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid induced aromatase activity in H295R and BeWo cells in co-culture (Fig. 2-1), highlighting the tissue- and promoter-specific differences in the effects of neonicotinoids on *CYP19* expression, aromatase activity and estrogen biosynthesis. Beside the potential direct effects of neonicotinoids on *CYP19* expression, the tested pesticides also increased the synthesis of DHEA and β -hCG (the latter an important early indicator of pregnancy), resulting in the increased production of estradiol and estrone that we observed in the co-culture. It is known that hCG induces cAMP intracellular levels (Massicotte et al., 1981), which we have shown can increase aromatase expression and activity (Sanderson et al., 2002). Estrogen biosynthesis is, therefore, complex and cannot be explained simply by the production of precursors like DHEA or androstenedione.

2.6.3 Possible metabolism of neonicotinoids by fetal CYP3A7

In this study, a 24h exposure of our fetoplacental co-culture to each of the three neonicotinoids resulted in a significant decrease of estriol production (Figs. 2-2F, 2-3F, 2-4F). SULT2A1 and CYP3A7 are key enzymes in the fetal production of the estriol precursor 16 α -hydroxyDHEA(-sulfate). We are the first to report the presence of CYP3A7 transcript in H295R cells, the fetal compartment of our co-culture model (Fig. 2-5, 2-6), and we confirmed a previous report that SULT2A1 is expressed in H295R cells (Oskarsson et al., 2006). We further found that the neonicotinoids only affected the expression of CYP3A7, which was increased. It is known that CYP3A4 is involved in the metabolism of neonicotinoids in human adult liver (Schulz-Jander and Casida, 2002; Dorne et al., 2005; Shi et al., 2009; Casida, 2011). Adult hepatic CYP3A4 is structurally closely related to fetal hepatic CYP3A7, sharing an amino acid sequence that is 88% similar (Komori et al., 1989; Schuetz et al., 1989; Komori et al., 1990). As fetal CYP3A7 is considered to have the same catalytic function as adult CYP3A4 (Lacroix et al., 1997), we hypothesize that neonicotinoid insecticides are metabolized by CYP3A7 in the fetoplacental unit, thus competing with the ability of this enzyme to produce 16 α -hydroxylated DHEA (and its sulfate conjugate) which are the precursors for estriol synthesis (Fig. 2-7).

This would explain the decreased estriol biosynthesis and the accumulation of DHEA in our co-culture when exposed to neonicotinoids. The excess androgen precursors would result in the overproduction of estrone and estradiol by the placental compartment of the co-culture,

resulting in the increased levels of these two estrogens we observed (Figs. 2-2D, E, 2-3D, E, 2-4D, E). We further suggest that the strong decrease in estriol levels triggers a positive feedback mechanism that increases *CYP3A7* gene expression, thus explaining the *CYP3A7* overexpression in H295R cells (the fetal compartment of the co-culture). To provide evidence for this hypothesis, we determined the effects of thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid on *CYP3A7* expression in H295R cells supplemented with a normalizing concentration of estriol to overcome the strong suppression of estriol synthesis by the neonicotinoids (Fig. 2-6). Estriol reversed the neonicotinoid-mediated induction of *CYP3A7* mRNA expression, suggesting such a positive feedback mechanism may exist. During pregnancy, levels of circulating estrone and estradiol increase by 100-fold. This induction reaches 1000-fold for estriol, bringing its concentration up to similar levels as the other estrogens, compared to non-pregnant women (Blackburn, 2007). To reach these levels, placental estrogens use a positive feedback mechanism, consisting of upregulating DHEA(-S) production by the fetal adrenal zone. The final result of this positive feedback is the induction of placental estrogen, including estriol (Albrecht and Pepe, 1999; Kaludjerovic and Ward, 2012). The decrease in estriol levels in the fetoplacental co-culture model exposed to neonicotinoids may activate this positive feedback mechanism, leading to overexpression of *CYP3A7* in H295R cells (Fig. 2-5). The control of placental estrogen production by this positive feedback mechanism would also explain why neonicotinoid-induced *CYP3A7* expression is reversed by a co-treatment with estriol (Fig. 2-6).

2.6.4 Implications for human health

During pregnancy, estrogens regulate uteroplacental blood flow, trophoblast invasion and cellular differentiation (Yashwanth et al., 2006). Disruption of estrogen biosynthesis during this critical period may impact the development of the fetus and placenta, as well as affect the mother's health (Kaijser et al., 2000). For example, disruption of estrogen production has been associated with negative birth outcomes (Gerhard et al., 1986; Kaijser et al., 2000; Troisi et al., 2003). It remains unclear if environmental concentrations of neonicotinoids are sufficient to disrupt aromatase activity or hormone production (specifically estriol) in pregnant women. Nevertheless, neonicotinoids are frequently detected in vegetables and fruits (Chen et al., 2014) and their concentrations are steadily increasing in water samples in agricultural areas in North America, with concentrations up to 3.6 µg/L (about 0.012 µM for thiamethoxam) having been measured (Anderson et al., 2013; Main et al., 2014; Smallling et al., 2015). These widely used insecticides' metabolites are also detected in the urine of farm workers at concentrations similar

to those used in our experiments (up to 0.05 µM for metabolite of thiacloprid and imidacloprid) (Nomura et al., 2013). Importantly, it is suspected that ingested neonicotinoids can pass through the placental barrier (Taira et al., 2014), since neurobehavioral deficits were measured in rat offspring exposed *in utero* to these insecticides (Abou-Donia et al., 2008). Therefore, the steadily increasing use of neonicotinoid pesticides is a cause of concern for the health of pregnant women.

2.7 CONCLUSIONS

We applied a fetoplacental co-culture model to screen for potential endocrine disrupting effects of neonicotinoid insecticides. We found thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid to induce aromatase activity in this *in vitro* model of fetoplacental steroidogenesis. The neonicotinoids increased estrone and estradiol production, while strongly inhibiting estriol production. We also have in direct *in vitro* evidence that neonicotinoids may be competing with DHEA(-S) as a substrate for CYP3A7, thus explaining the decrease in estriol production in the co-culture model. This study contributes to growing evidence of the endocrine disrupting potential of neonicotinoid insecticides. Given the importance of estrogen synthesis during pregnancy and the association between environmental contaminants and birth outcomes, the use of physiologically relevant screening tools such as our co-culture model of fetoplacental steroidogenesis is paramount for a credible evaluation of the potential health risks posed by such chemicals.

2.8 CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare to have no conflicts of interest.

2.9 ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery grant (NSERC; no. 313313-2012) to JTS and graduate studentships from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and Fondation Universitaire Armand-Frappier INRS to ECB, the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) to AHT and NSERC to RV. This study is part of Rachel Viau's Master's degree.

2.10 REFERENCES

- Abadin, H.G., Hibbs, B.F., Pohl, H.R., 1997. Breast-feeding exposure of infants to cadmium, lead, and mercury: a public health viewpoint. *Toxicol. Ind. Health* 13, 495–517.
- Abou-Donia,M.B.,Goldstein, L.B., Bullman, S., Tu, T., Khan,W.A.,Dechkovskaia, A.M., Abdel-Rahman, A.A., 2008. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in themotor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *J.Toxic.Environ.HealthA*71,119–130.
- Albrecht, E.D., Pepe, G.J., 1999. Central integrative role of oestrogen inmodulating the communication between the placenta and fetus that results in primate fetal–placental development. *Placenta* 20, 129–139.
- Albrecht, E.D., Aberdeen, G.W., Pepe, G.J., 2000. The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 432–438.
- Anderson, T.A., Salice, C.J., Erickson, R.A.,McMurry, S.T., Cox, S.B.,Smith, L.M., 2013. Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* 92, 84–90.
- Bal, R.,Naziroğlu,M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E., Baydas, G., 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem. Funct.* 30, 492–499.
- Bellinger, D.C., 2013. Prenatal exposures to environmental chemicals and children's neurodevelopment: an update. *Saf. HealthWork* 4, 1–11.
- Blackburn, S., 2007. Reproductive and developmental processes. *Maternal, Fetal and Neonatal Physiology* 100–102.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro,M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67.
- Caron-Beaudoin, É., Denison,M.S., Sanderson, J.T., 2016. Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (CYP19) in human adrenocortical

carcinoma (H295R) and primary umbilical vein endothelial (HUVEC) cells. *Toxicol. Sci.* 149, 134–144.

Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2923–2931.

Chen,M., Tao, L., McLean, J., Lu, C., 2014. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *J.Agric.Food Chem.* 62, 6082–6090.

Chou,W.-C., Chen, J.-L., Lin, C.-F., Chen, Y.-C., Shih, F.-C., Chuang, C.-Y., 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environ. Health* 10, 94.

Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M.-H., 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 410–419.

Diel, P., Olff, S., Schmidt, S., Michna, H., 2002. Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o, p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 61–70.

Dorne, J.L.C.M., Walton, K., Renwick, A.G., 2005. Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review. *Food Chem. Toxicol.* 43, 203–216.

Ellis, S.A., Palmer,M.S., McMichael, A.J., 1990. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J. Immunol.* 144, 731–735.

Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H., 2007. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ. Health Perspect.* 115, 720–727.

Foster, P.M.D., 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.* 29, 140–147.

Gazdar, A.F., Oie, H.K., Shackleton, C.H., Chen, T.R., Triche, T.J., Myers, C.E., Chrousos, G.P., Brennan, M.F., Stein, C.A., La Rocca, R.V., 1990. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 50, 5488–5496.

- Gerhard, I., Fitzer, C., Klinga, K., Rahman, N., Runnebaum, B., 1986. Estrogen screening in evaluation of fetal outcome and infant's development. *J. Perinat. Med.* 14, 279–291.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Bernardo, A.D., Greatti, M., Giorio, C., Tapparo, A., 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.* 102, 1808–1815.
- Goulson, D., 2013. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987.
- Hanley, N.A., Rainey, W.E., Wilson, D.I., Ball, S.G., Parker, K.L., 2001. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol. Endocrinol.* 15, 57–68.
- Health Canada, 2014. Pest control products sales report for 2010 [Internet]. Health Canada, Ottawa, ON Available from: <http://web.archive.org/web/20141019054418/> http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest_corp-plan/sales-2010-ventes/index-eng.php.
- Heneweerd, M., Muusse, M., Dingemans, M., de Jong, P.C., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2005. Co-culture of primary human mammary fibroblasts and MCF-7 cells as an in vitro breast cancer model. *Toxicol. Sci.* 83, 257–263.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtey, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T., 2002. Lowdose effect of in utero exposure to bisphenol a and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol.* 16, 117–122.
- Hoshi, N., Hirano, T., Omotehara, T., Tokumoto, J., Umemura, Y., Mantani, Y., Tanida, T., Warita, K., Tabuchi, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., 2014. Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1439–1443.
- Hu, H., 1991. Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *Am. J. Public Health* 81, 1070–1072.
- Hudon Thibeault, A.-A., Deroy, K., Vaillancourt, C., Sanderson, J.T., 2014. A unique co-culture model for fundamental and applied studies of human fetoplacental steroidogenesis and interference by environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* 122, 371–377.

- Hudon Thibeault, A.-A., Laurent, L., Duy, S.V., Sauvé, S., Caron, P., Guillemette, C., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C., 2017. Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the feto-placental unit. *Mol. Cell. Endocrinol.* 442, 32–39.
- Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Humphrey, H.E.B., 1990. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J. Pediatr.* 116, 38–45.
- Kaijser,M., Granath, F., Jacobsen, G., Cnattingius, S., Ekbom, A., 2000. Maternal pregnancy estriol levels in relation to anamnestic and fetal anthropometric data. *Epidemiology* 11, 315–319.
- Kaludjerovic, J., Ward, W.E., 2012. The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *J. Nutr. Metab.* 837901.
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Srivastava, L.P., 2011. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem. Toxicol.* 49, 3086–3089.
- Komori, M., Nishio, K., Ohi, H., Kitada, M., Kamataki, T., 1989. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing the entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450. *J. Biochem.* 105, 161–163.
- Komori, M., Nishio, K., Kitada, M., Shiramatsu, K., Muroya, K., Soma, M., Nagashima, K., Kamataki, T., 1990. Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry* 29, 4430–4433.
- Kondoh, N., Wakatsuki, T., Ryo, A., Hada, A., Aihara, T., Horiuchi, S., Goseki, N., Matsubara, O., Takenaka, K., Shichita, M., 1999. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 59, 4990–4996.
- Lacroix, D., Sonnier, M., Moncion, A., Cheron, G., Cresteil, T., 1997. Expression of CYP3A in the human liver—evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur. J. Biochem.* 247, 625–634.
- Leeder, J.S., Gaedigk, R., Marcucci, K.A., Gaedigk, A., Vyhildal, C.A., Schindel, B.P., Pearce, R.E., 2005. Variability of CYP3A7 Expression in Human Fetal Liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 626–635.

- Main, A.R., Headley, J.V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., Morrissey, C.A., 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PLoS One* 9, e92821.
- Massicotte, J., Borgus, J.-P., Lachance, R., Labrie, F., 1981. Inhibition of hCG-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in rat luteal cells by an LHRH agonist. *J. Steroid Biochem.* 14, 239–242.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.* 18, 378–403.
- Mucci, L.A., Lagiou, P., Tamimi, R.M., Hsieh, C.-C., Adami, H.-O., Trichopoulos, D., 2003. Pregnancy estriol, estradiol, progesterone and prolactin in relation to birth weight and other birth size variables (United States). *Cancer Causes Control* 14, 311–318.
- Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 2000. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.* 55, 143–151.
- Nampoothiri, L.P., Neelima, P.S., Rao, A.J., 2007. Proteomic profiling of forskolin-induced differentiated BeWo cells: an in-vitro model of cytotrophoblast differentiation. *Reprod. BioMed. Online* 14, 477–487.
- Nomura, H., Ueyama, J., Kondo, T., Saito, I., Murata, K., Iwata, T., Wakusawa, S., Kamijima, M., 2013. Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using GC-MS. *J. Chromatogr. B* 941, 109–115.
- Oskarsson, A., Ullerås, E., Plant, K.E., Hinson, J.P., Goldfarb, P.S., 2006. Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro. *J. Appl. Toxicol.* 26, 484–492.
- Pezzi, V., Mathis, J.M., Rainey, W.E., Carr, B.R., 2003. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 181–189.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856–862.
- Rainey, W.E., Carr, B.R., Sasano, H., Suzuki, T., Mason, J.I., 2002. Dissecting human adrenal androgen production. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 234–239.

- Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.* 94, 3–21.
- Sanderson, J.T., Seinen,W.,Giesy, J.P., van den Berg,M., 2000. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (cyp19) activity in h295r human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121–127.
- Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweerd, M., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 109, 1027–1031.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44–54.
- Schuetz, J.D., Molowa, D.T., Guzelian, P.S., 1989. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 355–365.
- Schulz-Jander, D.A., Casida, J.E., 2002. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicol. Lett.* 132, 65–70.
- Shi, X., Dick, R.A., Ford, K.A., Casida, J.E., 2009. Enzymes and inhibitors in neonicotinoid insecticide metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4861–4866.
- Shiraki, N., Yamazoe, T., Qin, Z., Ohgomori, K., Mochitate, K., Kume, K., Kume, S., 2011. Efficient differentiation of embryonic stemcells into hepatic cells in vitro using a feeder-free basement membrane substratum. *PloS One* 6, e24228.
- Siddiqui,M., Srivastava, S.,Mehrotra, P.,Mathur, N., Tandon, I., 2003. Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76, 75–80.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.-M., Chagnon,M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34.

- Smalling, K.L., Reeves, R., Muths, E., Vandever, M., Battaglin,W.A., Hladik, M.L., Pierce, C.L., 2015. Pesticide concentrations in frog tissue andwetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Sci. Total Environ.* 502, 80–90.
- Staels, B.,Hum, D.W.,Miller, W.L., 1993. Regulation of steroidogenesis inNCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal.*Mol. Endocrinol.* 7, 423–433.
- Stokstad, E., 2013. Pesticides under fire for risks to pollinators. *Science* 340, 674–676.
- Svedas, E., Nisell, H., VanWijk, M.J., Nikas, Y., Kublickiene, K.R., 2002. Endothelial dysfunction in uterine circulation in preeclampsia: can estrogens improve it? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187, 1608–1616.
- Taira, K., 2014. Human neonicotinoids exposure in Japan. *Jpn. J. Clin. Ecol.* 23, 14–24.
- Troisi, R., Potischman, N., Roberts, J., Siiteri, P., Daftary, A., Sims, C., Hoover, R.N., 2003. Associations of maternal andumbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States). *Cancer Causes Control* 14, 347–355.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 research0034. 0031.

3 CHAPITRE 3 :

DÉVELOPPEMENT DU NOUVEAU MODÈLE DE CO-CULTURE REPRÉSENTANT LE MICROENVIRONNEMENT STROMA/TUMORAL DANS LE CANCER DU SEIN HORMONO- DÉPENDANT

3.1 RÉSUMÉ

Les premières évaluations du nouveau modèle de co-culture créant le microenvironnement stroma-tumoral dans le cancer du sein hormono-dépendant ont validé l'utilisations des deux lignées cellulaires choisies. Les cellules Hs578t et T-47D ont été profilées pour l'expression des enzymes stéroïdogéniques dans ce nouveau modèle de co-culture. Les données préliminaires par expression génique (RT-qPCR) et par prolifération cellulaire (WST-1) valident la pertinence des deux types cellulaires. Les résultats obtenus en co-cultures suggèrent que les deux compartiments communiquent comme on le désire en présence d'estradiol et de testostérone. Les perturbations par les néonicotinoïdes dans ce modèle vont être élucidé et comparées avec l'étude précédente (en annexe).

3.2 OBJECTIFS GÉNÉRAL ET SPÉCIFIQUES

3.2.1 Objectif général

Développer un nouveau modèle de co-culture représentant le microenvironnement du cancer du sein hormono-dépendant utilisant les lignées cellulaires Hs578t et T-47D.

3.2.2 Objectifs spécifiques

1. Validations des lignées cellulaires et la formulation d'un milieu de co-culture.
2. Réponses œstrogéniques des deux compartiments du modèle par WST-1 et RT-qPCR.
3. Optimisations des paramètres de cultures et validations des communications intercellulaires entre les deux unités.
4. Évaluations du modèle avec les insecticides néonicotinoïdes afin de comparer avec l'étude précédente portant sur les cellules Hs578t.

3.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.3.1 Culture cellulaire des lignées humaines Hs578t et T-47D

Les cellules Hs578t sont mises en culture dans un milieu de base DMEM ayant un contenu élevé en glucose (ATCC® 30-2002). Le milieu de culture de base est complété avec du PenStrep ainsi que de l'insuline bovine. La mise en culture des cellules Hs578t se fait dans les flacons de 75 cm² (*Cellbind* T75, Corning Life Science). Les cellules T-47D sont mises en culture dans un milieu de base RMPI-1640 contenant de la glutamine, HEPES, glucose, sodium pyruvate et du bicarbonate de sodium (ATCC® 30-2001 ; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Le milieu de culture de base est complété avec du sérum bovin fœtal (FBS) (10%) et 0.01 mg/mL d'insuline bovine. La mise en culture des cellules T-47D se fait dans les flacons de 75 cm² (*Cellbind* T75, Corning Life Science). Toutes les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'air et le milieu de culture est changé aux 48 heures. Lorsque les cellules présentent un pourcentage de confluence de 95%, elles subissent des passages cellulaires et/ou mises en plaques. Les cellules sont alors nettoyées avec du PBS 1% et décollées par la trypsine trypLE (Life Technologies).

3.3.2 Méthodologie RT-qPCR générale

Pour les expériences d'expression génique individuelles, les cellules Hs578t et T-47D sont mises en culture dans des plaques à 6 puits Cellbind (Corning Life Science) à une densité de $2,0 \times 10^6$ cellules/puits pendant 24h. Par la suite, ces cellules sont exposées à des molécules d'intérêts par ajout du composé dans le milieu de culture pendant 24 à 72h, selon l'expérimentation.

L'extraction d'ARNm se déroule en utilisant le kit *RNAeasy mini kit* (Qiagen, Mississauga, ON) selon les recommandations du fabricant, suivi de la RT-PCR utilisant le kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) afin d'obtenir 1 µg d'ADNc avec l'appareil *T300 Thermocycler* (Biometra, Allemagne). Pour les cellules Hs578t, une pré-amplification de l'ADNc est nécessaire afin de réduire le nombre de cycles lors de la qPCR. Cette pré-amplification est réalisée avec le réactif *SsoAdvanced PreAmp Supermix* (Bio-Rad). La PCR en temps réel (qPCR) a été réalisée en utilisant l'intercalant SYBR, précisément le réactif *Super mix Ssofast EvaGreen* avec le thermocycleur et logiciel *CFX96 Real-Time PCR Detection System* de la compagnie Bio-Rad, en respectant les recommandations MIQE (Taylor *et al.*, 2010). Les gènes de références utilisés pour les cellules Hs578t sont *RPLP0* et *TBP*. Pour les T-47D, les gènes *PBGD* et *TBP*.

3.3.3 Amorces

L'expression d'enzymes clés impliqués dans la stéroïdogenèse a été vérifié chez les deux types cellulaires de la co-culture par RT-qPCR. La présence des ARNm des enzymes 17 β -HSD type 1, 5 et 7 (*HSD17B1*, *HSD17B5/AKR1C3* et *HSD17B7*), la 3 β -HSD type 2 (*HSD3B2*), l'aromatase (*CYP19*) et *CYP17* a été analysée chez les deux types cellulaires. D'ailleurs chez les cellules T-47D, la présence des ARNm du gène *TFF1* a été analysé afin d'identifier ce gène comme rapporteur de l'activité œstrogénique. Les amores utilisées sont présentées dans le tableau 3-1.

Tableau 3- 1. Amorces utilisées chez les cellules Hs578t et T-47D

Gène	Séquence nucléotidique (5'→3')	Caractéristiques d'amplifications	Référence
HSD17B1 (17 β -HSD1)	S : GTCTCCTCACCGCTTGCGCGCC A : GCACTGCGCCGGCCTCGTCCTC	T-47D Courbe standard r^2 : 0.964 Efficacité : 172.9%	(Watzka, Steckelbroeck and Schramm, 1999)
AKR1C3 (17 β -HSD5)	S : GGGATCTAACGAGACAAACG A : AAAGGACTGGGTCCCTCCAAGA	T-47D Courbe standard r^2 : 0.957 Efficacité : 117.8% Hs578t Courbe standard r^2 : 0.967 Efficacité : 115.0%	(Doig <i>et al.</i> , 2016)
HSD3B2 (3 β -HSD2)	S : GGGCCCAACTCCTACAAGGA A : ACTTGGGGCCTTCTGGGGT	Hs578t Courbe standard r^2 : 0.821 Efficacité : 155.0%	(Montgomery <i>et al.</i> , 2009)
TFF1	S : TTTGGAGCAGAGAGGAGGCAATGG A : TGGTATTAGGATAGAACGACCAGGG	T-47D Courbe standard r^2 : 0.975 Efficacité : 114.9%	(Gillesby and Zacharewski, 1999)
CYP19	S : TGTCTCTTGTTCATGCTATTCTC A : TCACCAATAACAGTCTGGATTCC	Hs578t Mise au point (Caron-Beaudoin <i>et al.</i> , 2018)	(Sanderson <i>et al.</i> , 2000)
CYP17	S : GCCTCCTGCTGCACAATCCT A : AAACTCACCGATGCTGGAGTCAAC	Non exprimés chez Hs578t et T- 47D	(Robitaille, Rivest and Sanderson, 2014)

S : Sens ; A : Anti-sens

3.3.4 Viabilité et prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire des lignées Hs578t et T-47D dans le milieu de co-culture proposé a été testée par le réactif WST-1 (Roche; Manheim, Allemagne). Les cellules ont été mises en culture séparément dans une plaque à 96 puits à une densité de à 4×10^3 cellules/puits et mises en culture dans leur milieu de culture respectifs ainsi que le milieu de co-culture pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Par la suite, 10 µL (ratio 1 :10) du réactif WST-1 a été ajouté aux puits pendant 4 heures à 37°C, 5% CO₂. L'absorbance a été mesurée à toutes les 30 minutes de l'incubation afin d'obtenir une courbe plus exacte de la prolifération (absorbance du produit formazan à une longueur d'onde de 450 nm). Le réactif WST-1 est un substrat pour les réductases mitochondrielles qui permet la quantification spectrophotométrique de la viabilité cellulaire et la réponse cellulaire aux expositions chimiques (Peskin and Windterbourn, 2000).

3.3.5 Assemblages et expérimentations en co-culture

Pour les expériences de co-cultures, les cellules sont mises en plaques dans un milieu de base DMEM F-12 sans rouge de phénol, 2 mM glutamine (Fisher #21041-025). Ce milieu est complété avec 1% de *stripped-FBS* au *dextran-charcoal* (Sigma-Aldrich F6765), 0.01 mg/mL d'insuline bovin et de 5% PenStrep. Les cellules sont mises en plaques séparément pendant 24h. Plus précisément, les cellules T-47D sont mises dans des plaques à six trous à une densité de 1×10^6 cellules/trou tandis que les cellules Hs578t sont mises en plaque dans des inserts à six trous Transwell® (Corning) à une densité de 2×10^6 cellules/insert. Pour l'assemblage de la co-culture, les inserts contenant les cellules Hs578t sont déplacés dans les plaques à six trous contenant les cellules T-47D. Pour s'y faire, le milieu de culture a dû être changé pour celui contenant le traitement désiré (préalablement préparé). Précisément, 3.5 mL de milieu est utilisé par répétition de co-culture (1.5 mL dans l'insert et 2 mL dans le trou) afin que les cellules puissent communiquer par l'entremise du milieu de culture. Les cellules assemblées en co-cultures sont ensuite exposées pendant 72h avant l'extraction d'ARNm et la récupération du milieu de co-culture pour des dosages subséquents par ELISA (DRG International, No EIA-2693). À partir de l'ARNm, l'ADNc est synthétisé par la RT-PCR et suivie de la qPCR, comme décrite dans la section 3.2.2.

3.4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.4.1 Validations des lignées cellulaires

Les cellules choisies pour notre modèle de co-culture proposé expriment les enzymes stéroïdogéniques nécessaires pour la biosynthèse de l'estradiol à partir des précurseurs androgènes. Leurs expressions vont valider la production et la sécrétion d'estradiol retrouvées dans le microenvironnement stroma-tumoral. Autrement dit, c'est un indicateur pour déterminer si les cellules de chaque compartiments vont pouvoir produire l'estradiol à partir de précurseurs androgéniques comme le DHEA et/ou l'androstenedione dans le milieu de co-culture.

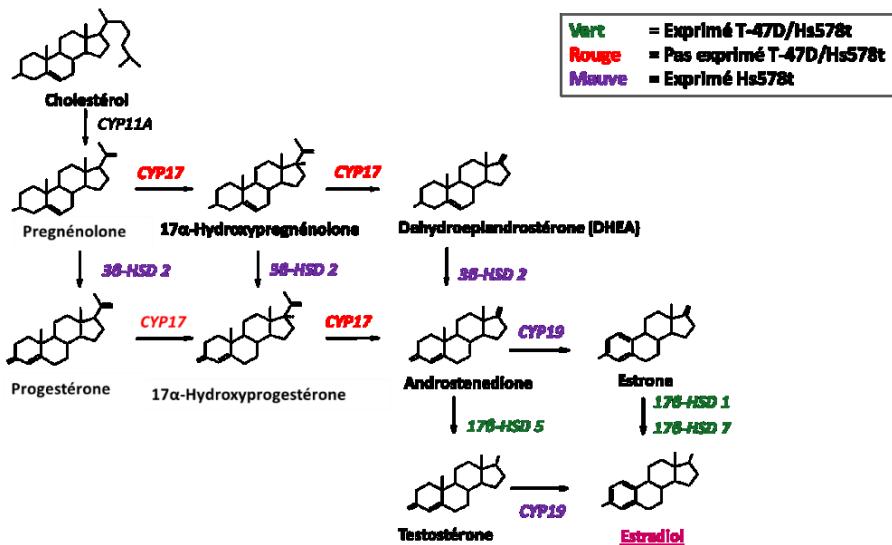


Figure 3- 1. Schématisation de l'expression génique des enzymes stéroïdogéniques chez les cellules Hs578t et T-47D.

Le milieu de co-culture a été formulé en se basant sur une étude qui a démontré la prolifération des cellules T-47D dans le milieu de culture de base DMEM au lieu du milieu de base natif RMPI pour accomoder les cellules Hs578t (Chottanapund *et al.*, 2014b). Le milieu de co-culture qui avait été proposé est approprié pour les deux types cellulaires choisis pour ce modèle de co-culture (Figure 3-2).

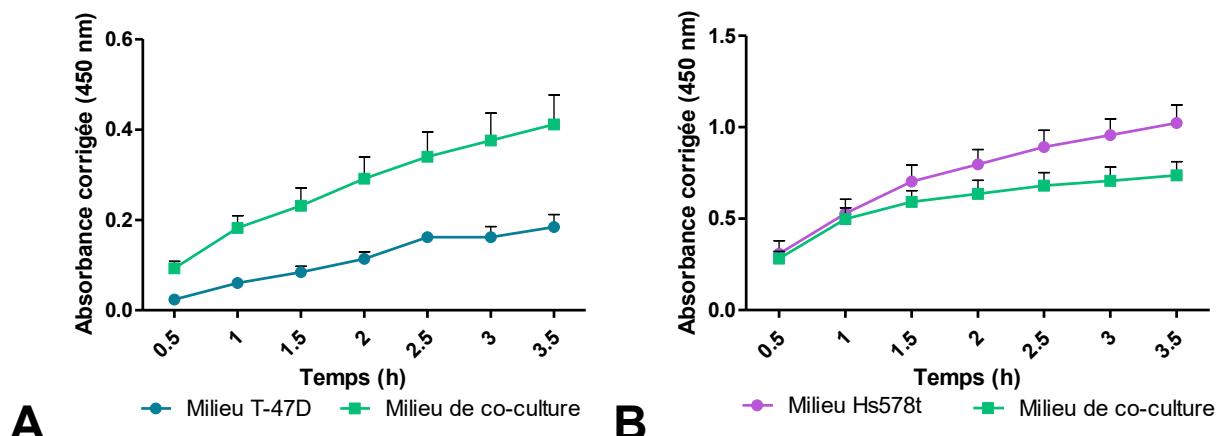


Figure 3- 2. Comparaison de la croissance des cellules T-47D (A) et Hs578t (B) dans leurs milieu respectif et le milieu de co-culture proposé (avec rouge de phénol et FBS régulier).

Contrairement au modèle pré-établi de l'unité féto-placentaire (Thibeault *et al.*, 2014), ce modèle n'est pas capable de synthétiser les œstrogènes *de novo*. Donc, ce modèle requiert

l'ajout d'un précurseur androgénique afin de stimuler la biosynthèse de l'estradiol dans l'unité stromale. Afin de mieux représenter la réalité, la DHEA serait le précurseur idéal à ajouter dans le milieu de co-culture. Cependant, il est très difficile d'obtenir cette molécule dû à sa nature controversée. En premier lieu, la DHEA est une substance contrôlée par Santé Canada, donc il nécessite une demande d'exemption pour y avoir accès (Health Canada, 2012). De plus, le DHEA est reconnu comme produit dopant (agent anabolisant) par l'Agence Mondiale d'Antidopage (Pipe et al., 2002). Donc, la testostérone a été utilisé comme précurseur androgénique dans le modèle de co-culture puisqu'il était déjà disponible dans le laboratoire.

3.4.2 Compartimentation et densité

La compartimentation est un concept important dans les modèles de co-cultures. Il existe une variété de modèles et de techniques distinctes ayant chacun leurs applications et pertinences. L'utilisation d'inserts Transwell® permet de pouvoir étudier les communications intercellulaires via le milieu de co-culture tout en récupérant les cellules pour des analyses subséquentes. Malgré les bénéfices de compartimentation et de récupération, l'utilisation d'inserts peut être un facteur limitant par rapport aux manipulations au laboratoire ainsi que ses frais associés. Donc, la compartimentation des cellules Hs578t et T-47D a été évaluée en regardant l'expression de *CYP19* et *TFF1* suite à une exposition de 72h à 17 β -estradiol (Figure 3-3). Les résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'effets significatifs pour l'expression de *CYP19* et ses promoteurs (Figure 3-3A), mais qu'il y a une induction de l'expression de *TFF1* à 100 pM de 17 β -estradiol (Figure 3-3B). Malgré la facilité et la simplicité technique de la préparation et les analyses des co-cultures mixtes, il est plus difficile de distinguer et d'évaluer les deux compartiments malgré leurs différences d'expressions géniques. Afin d'éviter le blocage des pores de la membrane microporeuse des inserts par les cellules tumorales, les Hs578t sont placés dans les inserts et les T-47D dans les trous lors des assemblages de co-cultures. Donc, la compartimentation des cellules stromales et tumorales est nécessaire pour la co-culture afin d'assurer la qualité et la reproductibilité (rendement) des données expérimentales.

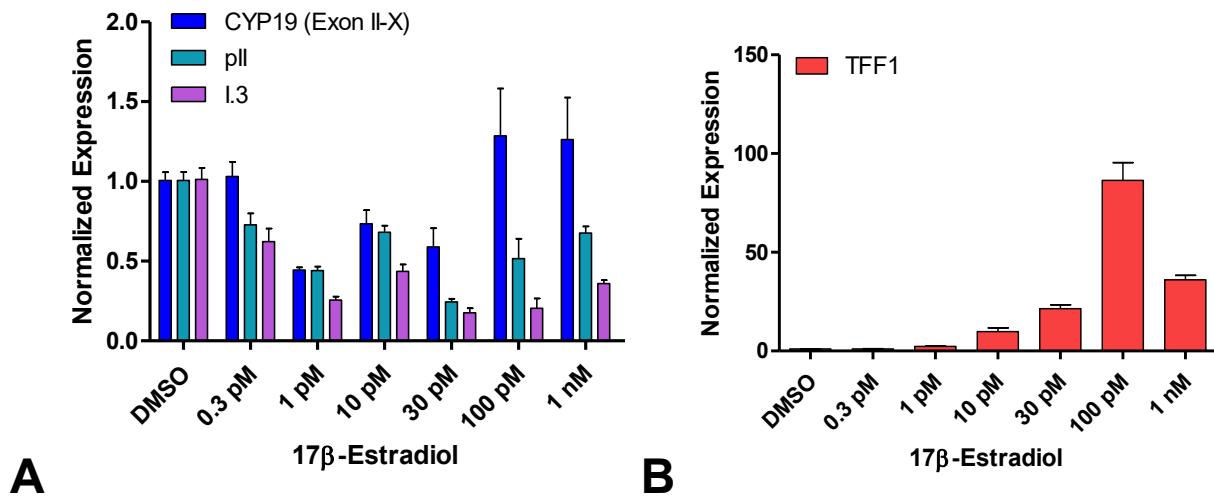


Figure 3-3. Expression génique de CYP19 et ses promoteurs (A) et (B) TFF1 dans la co-culture mixte exposée au 17β -estradiol.

Une fois que la compartimentation des cellules du modèle a été établie, il était nécessaire de déterminer la densité de ces compartiments afin de maximiser les réponses. La densité a été mesurée en comparant l'expression de *TFF1* suite à une exposition d'E2 pendant 72h puisqu'il s'agit d'un gène médié aux ER. Autrement dit, l'augmentation de l'expression de *TFF1* indique la stimulation de l'activité œstrogénique de l'unité tumorale en réponse à l'unité stromale productrice d'E2 par la CYP19. Deux ratios de cellules ont été testés avec le modèle de co-culture afin de vérifier les hypothèses, notamment un ratio de 1 :1 (ex : 100 000 Hs578t/insert versus 100 000 T-47D/puits) et 2 :1 (ex : 200 000 Hs578t/insert versus 100 000 T-47D/puits). Le ratio de 2 :1 a été estimé afin de maximiser la production d'œstrogènes via l'unité stromale du modèle pour qu'elle puisse ensuite enclencher le mécanisme de rétrocontrôle positif avec les cellules tumorales. Selon les résultats obtenus, il est favorable de maintenir un ratio de 2 :1 pour les cellules Hs578t pour les expérimentations en co-cultures (Figure 3-4).

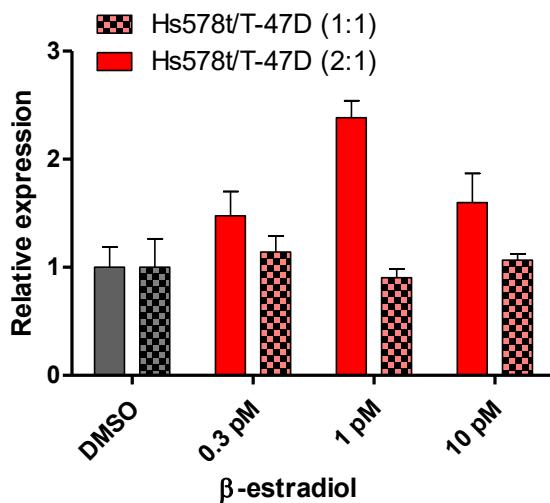


Figure 3- 4. Comparaison de l'expression génique de TFF1 en utilisant deux ratios de cellules pour la densité des compartiments du modèle de co-culture Hs578t/T-47D.

3.4.3 Réponses œstrogéniques en mono-cultures vs. co-cultures

Il est essentiel que les cellules tumorales T-47D répondent aux composés œstrogéniques afin d'assurer les interactions entre les deux compartiments lors des essais en co-cultures. Seulement l'unité tumorale doit répondre aux composés œstrogéniques puisqu'ils sont les seuls à exprimer les ER et AR. Ces profils ont été effectués en vérifiant la viabilité et prolifération cellulaire par le réactif WST-1 et l'expression génique de *TFF1* (RT-qPCR) des cellules exposées à l'estradiol. En premier lieu, la prolifération cellulaire est véritablement stimulée par la présence d'estradiol, précisément jusqu'à 1 nM où il commence à y avoir une inhibition aux concentrations supérieures (Figure 3-5). Les profils d'expression ont été comparés entre les expositions en mono- et co-cultures pour vérifier l'influence des cellules stromales Hs578t en présence d'E2 (Figure 3-6). L'expression de *TFF1* est plus importante à une dose inférieure en co-culture versus en mono-culture, à 30 pM et 100 pM respectivement (Figure 3-6B). Ceci suggère fortement que l'estradiol agit sur les T-47D et permet l'induction de *CYP19* chez les cellules Hs578t. D'autre part, l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* chez les cellules stromales a été vérifiée en mono- et co-culture (Figure 3-7). L'expression du promoteur pII et I.7 sont plus stimulées en mono-culture seulement aux concentrations plus faibles d'E2, dont 1 pM et 10 pM respectivement (Figure 3-7A). En co-culture, l'expression de I.7 et I.3 sont plus importantes à 1 pM d'estradiol et se maintiennent aux concentrations plus élevées, jusqu'à 100 pM (Figure 3-7B).

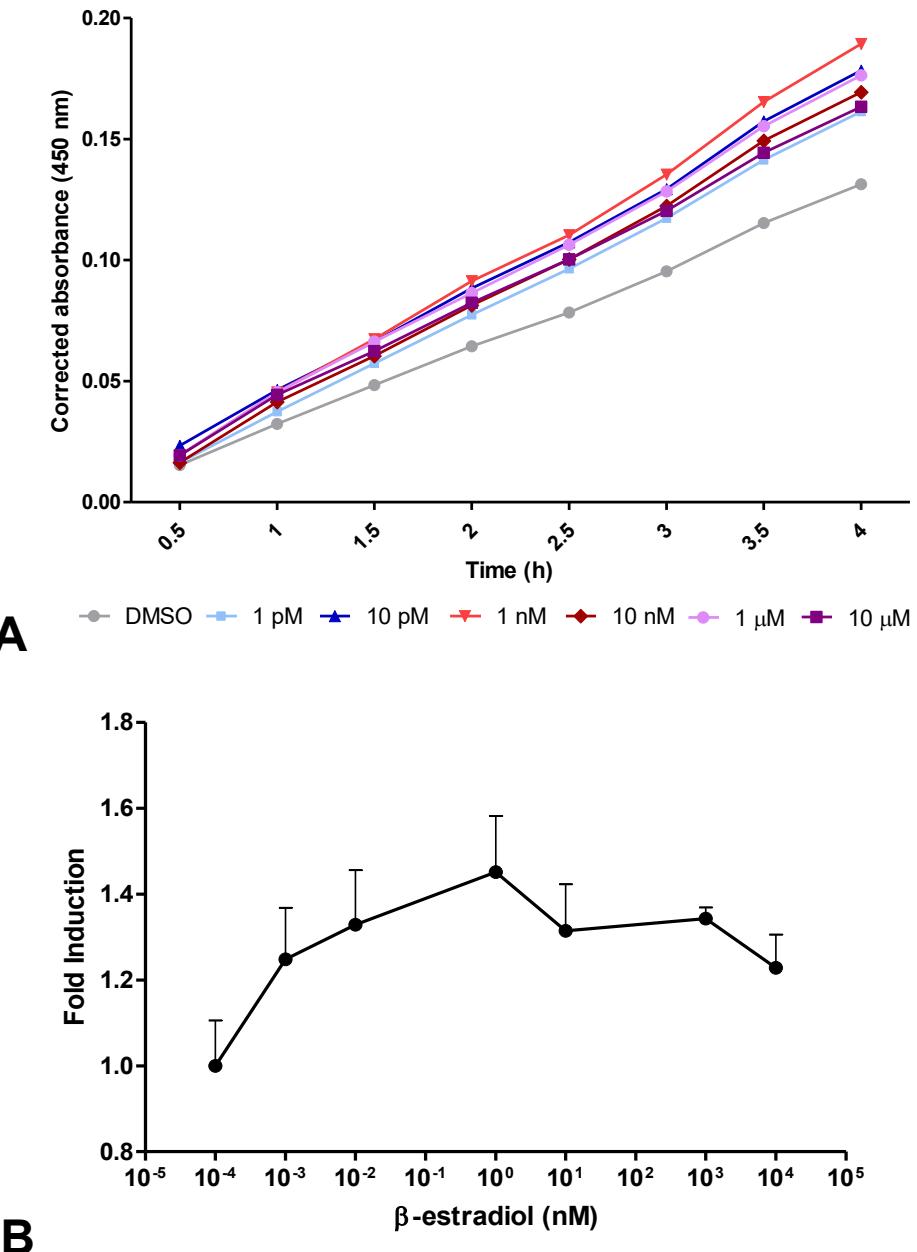


Figure 3- 5. Prolifération en réponse à plusieurs doses de β -estradiol dans le milieu de co-culture représentée (A) par l'absorbance corrigée et (B) l'induction.

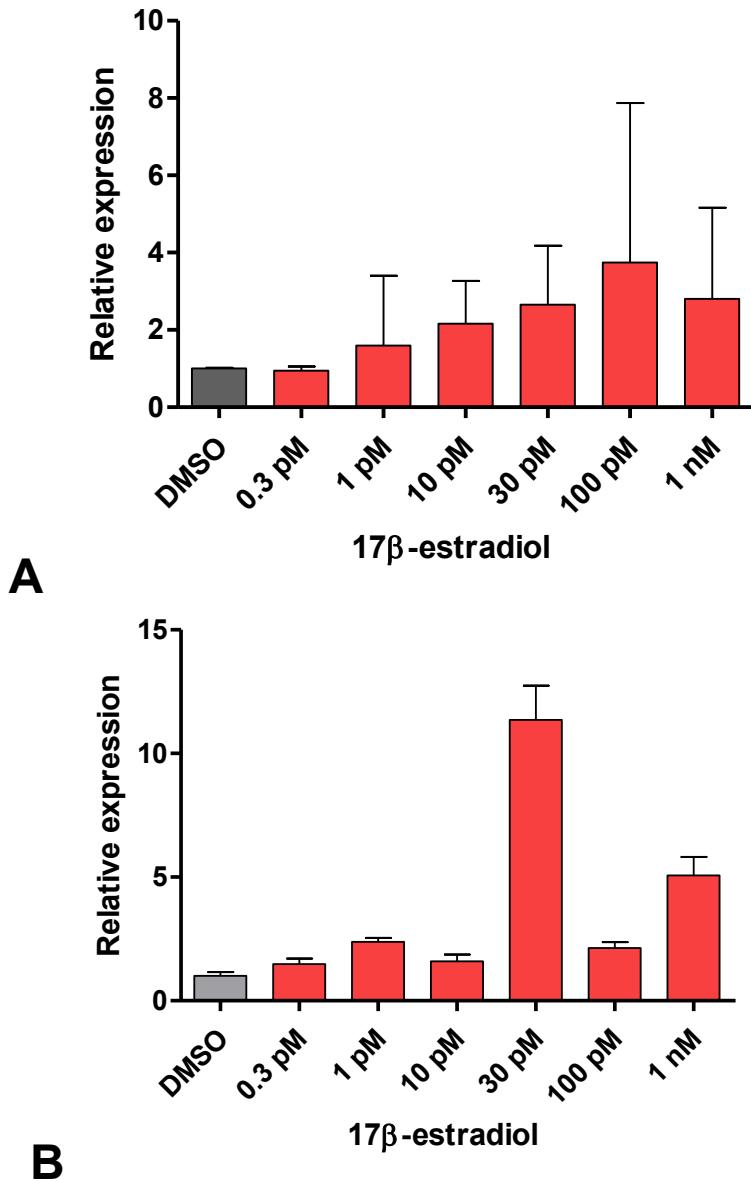
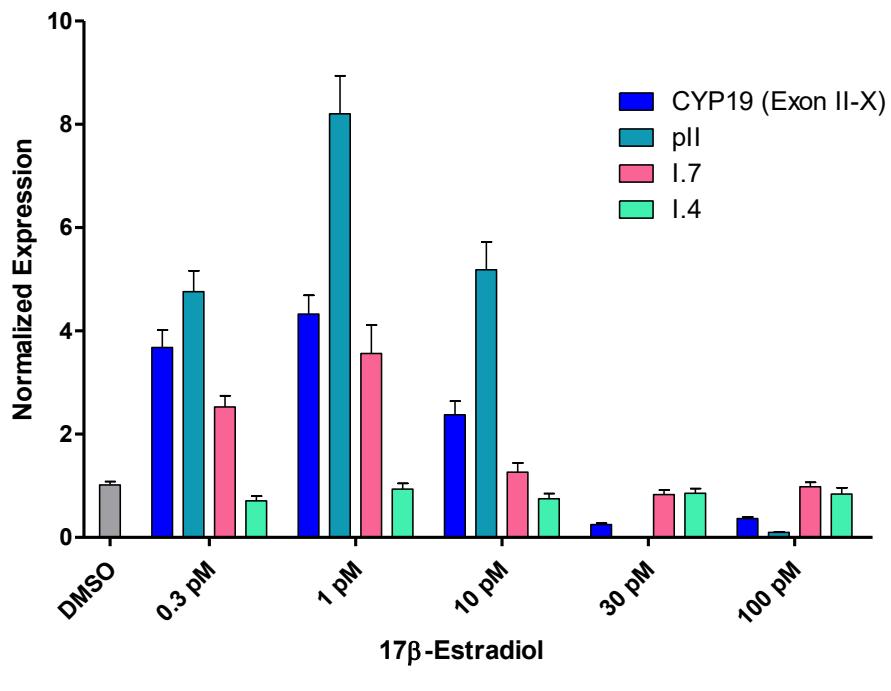
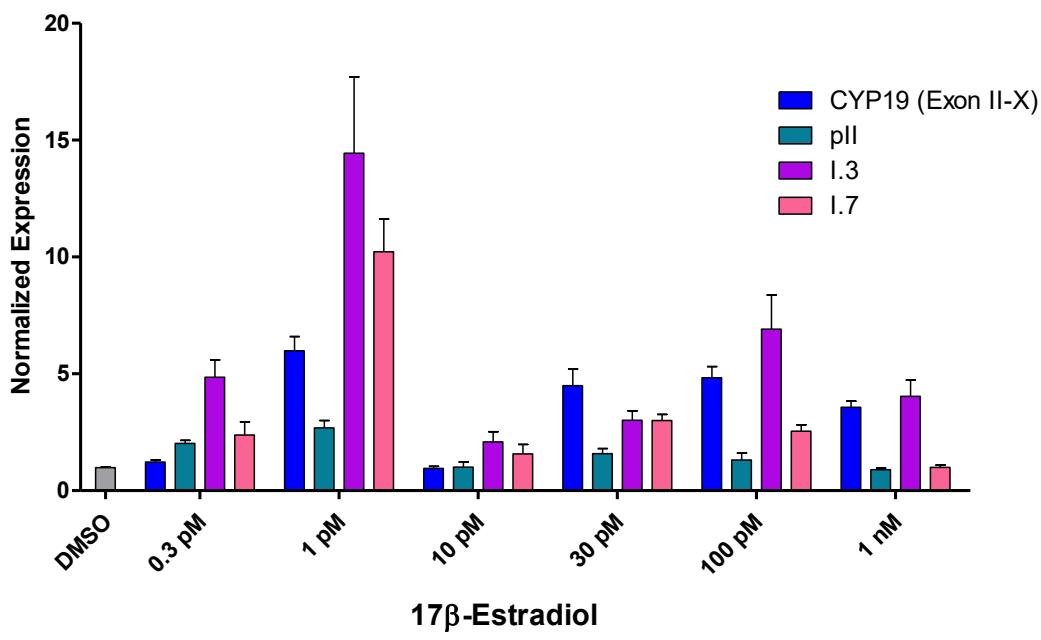


Figure 3- 6. Comparaison de l'expression génique de *TFF1* chez les T-47D en (A) mono-culture et (B) en co-culture.



A



B

Figure 3-7. Expression génique de CYP19 et promoteurs-spécifiques chez Hs578t en mono- (A) et en (B) co-culture exposées à la 17 β -estradiol.

3.4.4 Validations des communications intercellulaires

Afin de valider les conversions des composés œstrogéniques dans les compartiments, les co-cultures ont été co-traitées avec la testostérone et un inducteur du promoteur I.4 de CYP19, le

dexamethasone, afin de stimuler davantage la production d'E2. Précisément, la testostérone a été ajoutée comme précurseur androgénique dans le milieu de co-culture afin d'être converti en E2 par l'unité stromale du modèle par la CYP19. Les co-traitements de testostérone et de dexamethasone ont stimulé l'expression globale de CYP19 dû à l'induction du promoteur I.4 (Figure 3-10B et C). Le profil d'expression du promoteur I.4 suggère d'être dose-dépendant (Figure 3-10C). Chez les cellules T-47D, l'exposition au dexamethasone semble augmenter la réponse de *TFF1* (Figure 3-10D). La conversion de la testostérone en estradiol est fortement augmentée dû à l'induction (environ 1000x) de CYP19 chez les Hs578t.

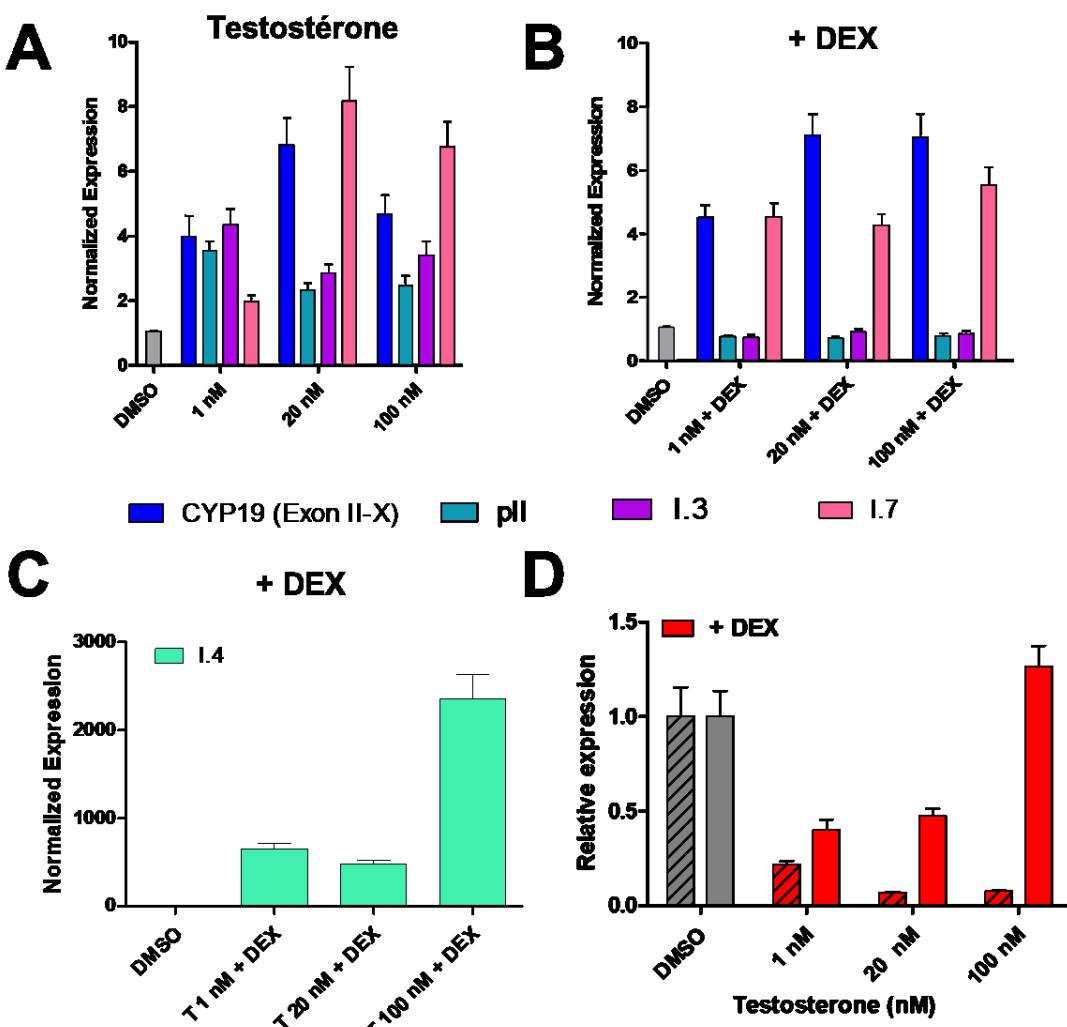


Figure 3-8. Expression génique relative CYP19 et *TFF1* en co-culture exposés à la testostérone et en co-traitement avec DEX. Expression CYP19 promoteurs-spécifiques sans (A) et avec dexamethasone (B et C) chez Hs578t et (D) *TFF1* chez T-47D.

3.4.5 Premières évaluations des insecticides néonicotinoïdes

Les effets des néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique ainsi que l'activité catalytique de l'aromatase chez les cellules Hs578t ont été démontrés dernièrement par Dre Caron-Beaudoin (voir Annexe). Les résultats obtenus de cette étude a déclenché le développement du nouveau modèle de co-culture utilisant les cellules Hs578t et T-47D. Les insecticides néonicotinoïdes imidaclopride et thiaclopride ont été étudiés et ont démontré des effets à des doses de 0.1 µM à 10 µM, ce que l'on retrouve dans la réalité (Main *et al.*, 2014; Starner and Goh, 2012). Donc, afin de comparer les effets de ces néonicotinoïdes en monoculture et en co-culture, les doses utilisées pour les évaluations en co-cultures ont demeurée les mêmes que celles ayant des effets significatifs, avec et sans la présence de la testostérone comme précurseur. Premièrement, les effets des néonicotinoïdes ont été vérifiés chez les cellules T-47D seules afin de pouvoir comparer avec les expérimentations en co-cultures. Le thiaclopride, le thiamethoxame et l'imidaclopride tous à 3 µM ne semble pas affecter l'expression génique de *TFF1* chez les cellules T-47D (Figure 3-11A). Une exposition de 72h en co-culture d'imidaclopride aux concentrations provenant de l'étude précédente (0.1, 0.3 et 3 µM) ne semblent pas affecter l'expression de *TFF1* (Figure 3-11B). Malheureusement, des difficultés techniques n'ont pas permis une extraction d'ARN efficace des cellules Hs578t en co-culture exposées à l'imidaclopride 72h donc il n'est pas possible de comparer l'expression *CYP19* promoteur-spécifique des Hs578t exposés à l'imidaclopride pendant 24h (voir annexe) et 72h. Sans précurseur androgénique, les néonicotinoïdes n'ont pas d'effets œstrogéniques chez les T-47D en mono-culture et en co-culture. Comme décrit précédemment, un précurseur androgénique comme la DHEA est nécessaire afin de provoquer la réaction desmoplastique entre les deux compartiments du modèle du microenvironnement stromale-tumorale du cancer du sein.

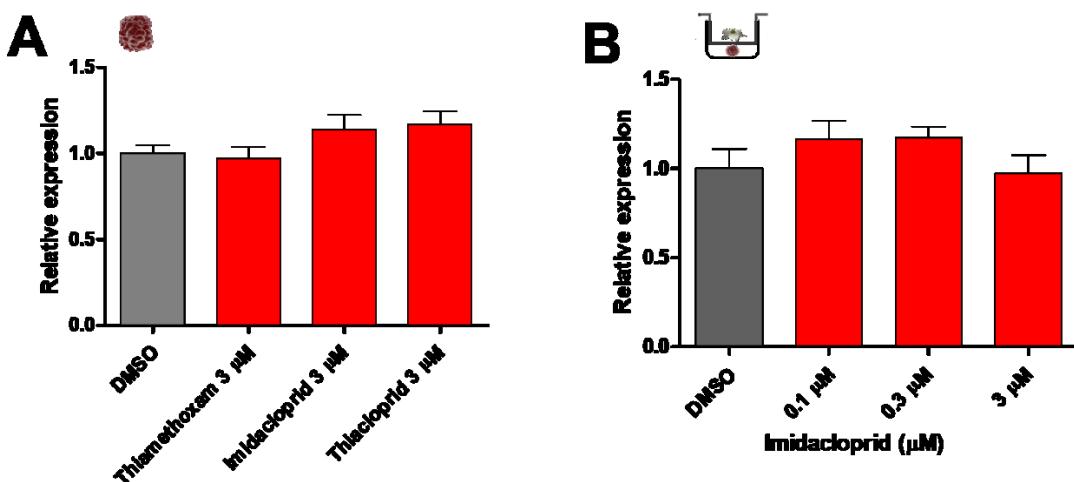


Figure 3- 9. Expression génique de *TFF1* chez T-47D exposés à (A) l'imidaclopride, thiaclopride et thiamethoxame en mono-culture et (B) à l'imidaclopride en co-culture sans précurseur androgénique.

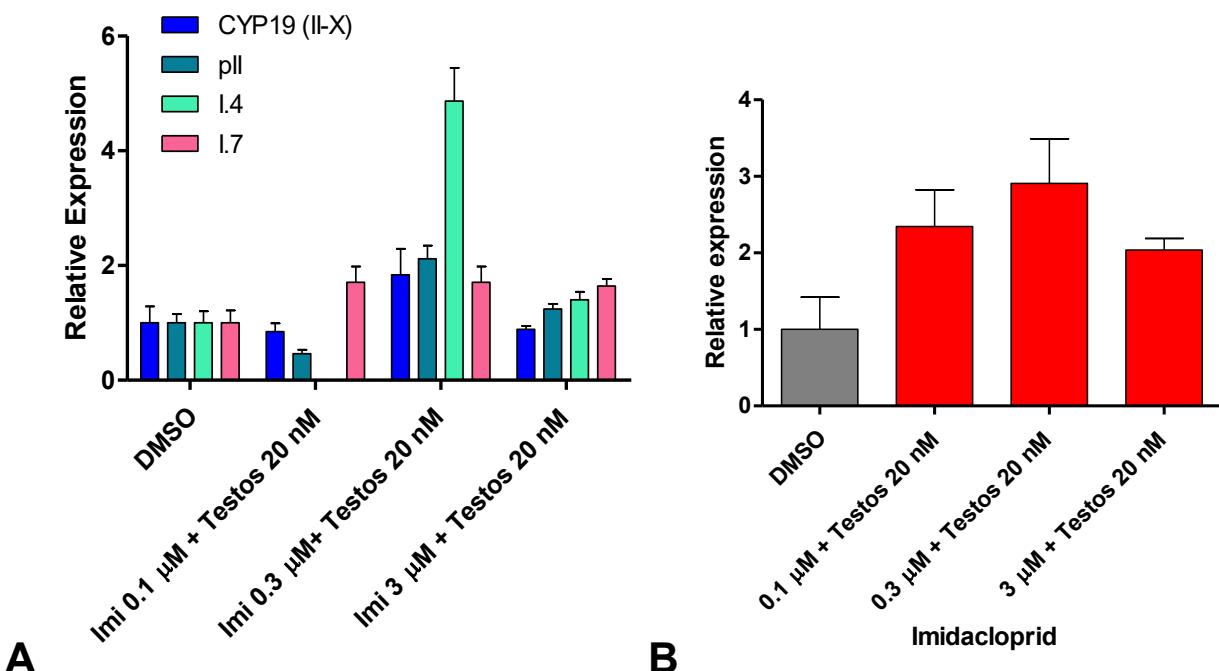


Figure 3- 10. Expression (A) promoteur-spécifique de *CYP19* chez les cellules Hs578t et (B) *TFF1* chez les cellules T-47D en co-culture co-traités avec l'imidaclopride et la testostérone en co-culture.

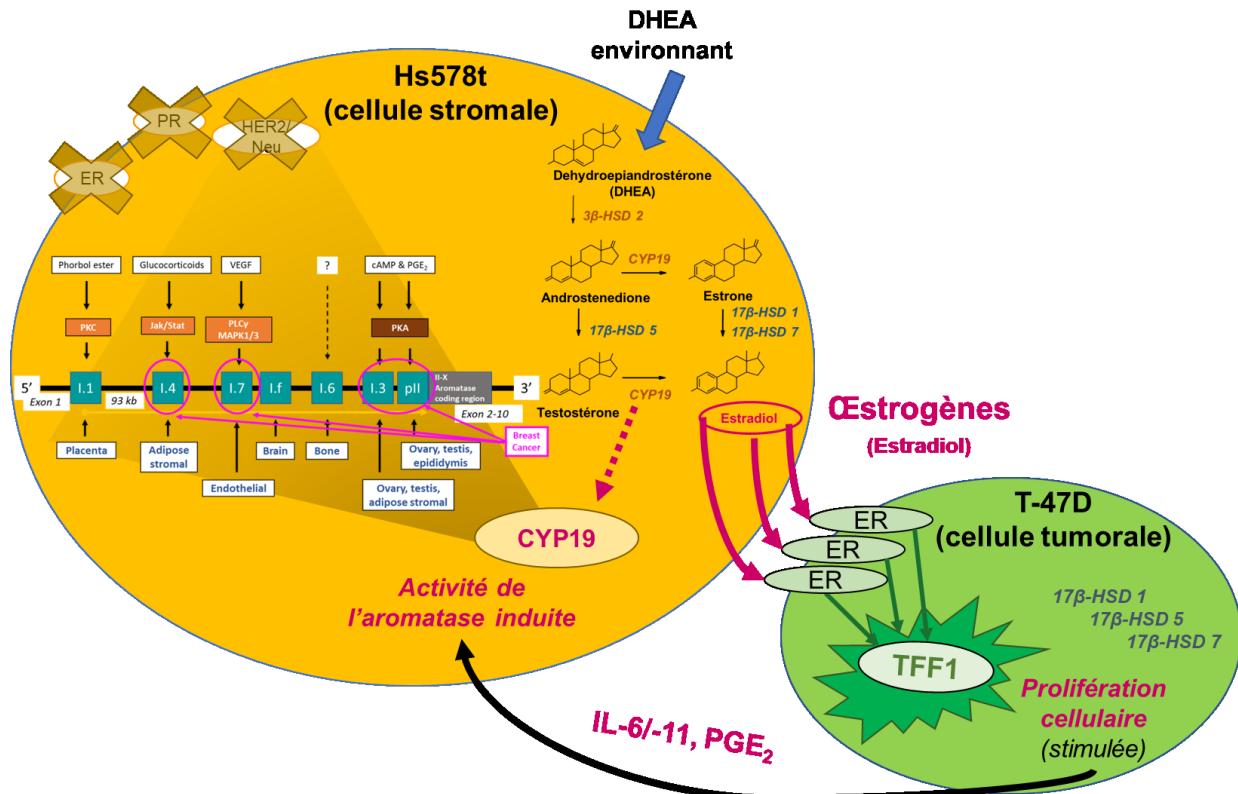


Figure 3- 11. Schématisation récapitulative des propriétés du modèle de co-culture Hs578t/T-47D recréant le microenvironnement stroma/tumoral du cancer du sein hormono-dépendant.

La DHEA environnant entre dans les cellules Hs578t afin d'être convertie en estradiol. Cet estradiol est ensuite relâché et se lie aux récepteurs aux œstrogènes des cellules tumorales T-47D, ce qui enclenche l'expression génique du gène *TFF1*. Cette activation stimule la prolifération des cellules tumorales, ce qui permet la sécrétion de facteurs inflammatoires dont l'interleukine-6 et -11, ainsi que la prostaglandine E2. Ces facteurs induisent l'activité de l'aromatase des cellules stromales, ce qui stimule davantage la biosynthèse et le relâchement d'estradiol dans le microenvironnement, créant cette boucle de rétrocontrôle positive.

3.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, les lignées cellulaires humaines Hs578t et T-47D choisies pour ce nouveau modèle sont pertinentes pour recréer le microenvironnement stromal-tumoral du cancer du sein hormono-dépendant. Les premières évaluations démontrent que les deux types cellulaires répondent aux hormones stéroïdes comme l'estradiol et la testostérone comme prévues, selon les profils d'expressions géniques pour *CYP19* et *TFF1* en mono- et co-cultures. Précisément, les évaluations avec les néonicotinoïdes en co-cultures démontrent que les profils d'expressions promoteurs-spécifiques de *CYP19* correspondent aux profils observés dans l'étude précédente (en annexe). De plus, les profils d'expressions de *TFF1* confirment

davantage les communications entre les deux compartiments du modèle de co-culture. Donc, ce nouveau modèle de co-culture est promettant comme outil pertinent pour le criblage et les études fondamentales des produits chimiques avec des propriétés perturbatrices endocriniennes.

Comme perspectives, plusieurs évaluations sont encore nécessaires pour le nouveau modèle afin de confirmer que le microenvironnement stromale/tumorale est véritablement recréé en utilisant ces deux lignées cellulaires. Une série d'évaluations devrait être effectuée utilisant des inducteurs et inhibiteurs de l'aromatase, en plus de mesurer la sécrétion des facteurs inflammatoires et stéroïdogénique afin de valider la réaction desmoplastique entre les cellules Hs578t et T-47D. Ces évaluations devront être bien établies précédemment aux dépistages avec divers perturbateurs endocriniens. Parallèlement, les cellules transfectées T-47D-KBluc (ATCC CRL-2865) exprimant la luciférase (Wilson, Bobseine and Jr., 2004) devraient être utilisées comme modèles supplémentaires pour valider les réponses œstrogéniques en évitant l'utilisation de l'expression de *TFF1* par RT-qPCR comme biomarqueur dans le modèle de co-culture.

4 CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES

Dans les deux modèles de co-cultures représentant des environnements endocriniens féminins importants, les insecticides néonicotinoïdes exercent des effets sur la stéroïdogenèse. Ces modèles cellulaires en co-cultures ont permis d'approfondir l'importance des communications intercellulaires des microenvironnements endocriniens humains. Les modèles cellulaires en co-cultures physiologiquement représentatifs sont des approches très prometteuses non seulement pour tester les composés chimiques mais aussi pour les recherches fondamentales. Ces modèles permettent d'étudier des paramètres tissulaires importants qui ne sont pas possibles avec les modèles cellulaires en monocultures. Ces travaux en sciences expérimentales de la santé ont contribué à l'initiative des trois « R », premièrement en utilisant un modèle en co-culture de l'unité féto-placentaire préétabli comme outil de dépistage et deuxièmement en développant un nouveau modèle recréant spécifiquement le microenvironnement stromal-tumoral du cancer du sein hormono-dépendant. Une perspective future pour le modèle de l'unité féto-placentaire serait de remplacer les cellules BeWo et H295R pour des cellules souches humaines afin de répondre aux limites posées par l'utilisation des lignées cellulaires cancéreuses pour ce microenvironnement physiologique. Le raffinement du nouveau modèle de co-culture Hs578t/T-47D va être poursuivi afin de pouvoir l'utiliser comme outil de dépistage pour les perturbateurs endocriniens. Ces modèles de co-cultures visent à réduire l'utilisation des animaux en recherche fondamentale et appliquée.

5 CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE

Albrecht, E. D., Aberdeen, G. W. and Pepe, G. J. (2005) 'Estrogen elicits cortical zone-specific effects on development of the primate fetal adrenal gland', *Endocrinology*, 146(4), pp. 1737–1744. doi: 10.1210/en.2004-1124.

American Psychological Association (2012) *Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals in Research Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman*.

Andersen, M. E. et al. (2011) 'Case Study Approaches for Implementing the 2007 NRC Report "Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and A Strategy"', *ALTEX*, 3(28), pp. 175–182. doi: 10.1002/bmb.20244.DNA.

Andrew Williams, J. et al. (2002) 'Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7', *Drug Metabolism and Disposition*, 30(8), pp. 883–891. doi: 10.1124/dmd.30.8.883.

Björnström, L. and Sjöberg, M. (2005) 'Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes', *Molecular Endocrinology*, 19(4), pp. 833–842. doi: 10.1210/me.2004-0486.

Bogdanowicz, D. R. and Lu, H. H. (2013) 'Studying cell-cell communication in co-culture', *NIH Public Access*, 8(4), pp. 395–396. doi: 10.1002/biot.201300054.Studying.

Bouzubar, N. et al. (1989) 'Ki67 immunostaining in primary breast cancer: Pathological and clinical associations', *British Journal of Cancer*, 59(6), pp. 943–947. doi: 10.1038/bjc.1989.200.

Bulun, S. E. et al. (2003) 'The human CYP19 (aromatase P450) gene: Update on physiologic roles and genomic organization of promoters', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3–5), pp. 219–224. doi: 10.1016/S0960-0760(03)00359-5.

Bulun, S. E. et al. (2005) 'Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment.', *Pharmacological reviews*, 57(3), pp. 359–383. doi: 10.1124/pr.57.3.6.

Bulun, S. E. et al. (2007) 'Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 106(1–5), pp. 81–96. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.05.027.

Bulun, S. E. et al. (2009) 'Aromatase Excess in Cancers of Breast, Endometrium and Ovary',

NIH Public Access, 106(312), pp. 503–520. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.05.027.AROMATASE.

Bulun, S. E. et al. (2012) ‘Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction’, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(2), pp. 1212–1217. doi: 10.1016/j.ten.2009.07.003.Characterization.

Caron-Beaudoin, É. and Sanderson, J. T. (2016) ‘Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase: Implications for the Development of Hormone-Dependent Breast Cancer’, *Cancer Cell & Microenvironment*, (November). doi: 10.14800/ccm.1216.

Caron-Beaudoin, É. and Sanderson, J. T. (2016) ‘Effets of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase: implications for the development of hormone-dependent breast cancer’, *Cancer Cell & Microenvironment*, 149(1), pp. 134–144. doi: 10.1093/toxsci/kfv220.

Casida, J. E. (2011) ‘Neonicotinoid metabolism: Compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), pp. 2923–2931. doi: 10.1021/jf102438c.

Casida, J. E. (2011) ‘Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms, and Relevance’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 2923–2931. doi: 10.1021/jf102438c.

Cerný, I., Hill, M. and Hampl, R. (2003) ‘Synthesis of two new haptens of 16α-hydroxydehydroepiandrosterone’, *Steroids*, 68, pp. 149–158. doi: 10.1016/S0039-128X(02)00176-9.

Chen, D. et al. (2009) ‘Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters’, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 273(1), pp. 15–27. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.038.

Chen, M. et al. (2014) ‘Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: Implication for dietary exposures’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), pp. 6082–6090. doi: 10.1021/jf501397m.

Chen, S. (1998) ‘Aromatase and Breast Cancer’, *Frontiers in Biosciences* 3, pp. 922–933.

Chottanapund, S. et al. (2014a) ‘Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts’, *Toxicology in Vitro*, 28(7), pp. 1215–1221. doi: 10.1016/j.tiv.2014.05.015.

Chottanapund, S. et al. (2014b) 'Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts', *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 28(7), pp. 1215–1221. doi: 10.1016/j.tiv.2014.05.015.

Cimino, A. M. et al. (2017) 'Review Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health : A Systematic Review', *Environmental Health Perspectives*, 125(2), pp. 155–162.

Cline, J. M. and Wood, C. E. (2008) 'The Mammary Gland of Macaques', *Toxicological Pathology*, 36(7), pp. 397–401. doi: 10.1177/0192623308327411.The.

Coster, S. De and Larebeke, N. Van (2012) 'Endocrine-Disrupting Chemicals : Associated Disorders and Mechanisms of Action', *Journal of Environmental and Public Health*, 2012. doi: 10.1155/2012/713696.

Crombach, G. et al. (1993) 'Expression of pS2 protein in breast cancer', *Gynecology and Obstetrics*, 253, pp. 183–192.

Cronier, L., Guibourdenche, J. and Malassiné, A. (1999) 'Oestradiol Stimulates Morphological and Functional Differentiation of Villous Cytotrophoblast', *Placenta*, 20, pp. 669–676.

Dai, X. et al. (2015) 'Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends', *American Journal of Cancer Research*, 5(10), pp. 2929–2943.

Dent, R. et al. (2007) 'Triple-Negative Breast Cancer : Clinical Features and Patterns of Recurrence', *Clinical Cancer Research*, 13(15), pp. 4429–4435. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.

Dewi, F. N. et al. (2016) 'Effects of Pubertal Exposure to Dietary Soy on Estrogen Receptor Activity in the Breast of Cynomolgus Macaques', *Cancer Prevention Research*, 9(5), pp. 385–396. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0165.

Doig, C. L. et al. (2016) 'Knockdown of AKR1C3 exposes a potential epigenetic susceptibility in prostate cancer cells', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 155, pp. 47–55. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.037.

Dorne, J. L. C. M., Walton, K. and Renwick, A. G. (2005) 'Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment : a review', *Food and Chemical Toxicology*, 43, pp. 203–216. doi: 10.1016/j.fct.2004.05.011.

Edmondson, R. et al. (2014) 'Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in

Drug Discovery and Cell-Based Biosensors', *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), pp. 207–218. doi: 10.1089/adt.2014.573.

Edwards, T. M., Moore, B. C. and Jr, L. J. G. (2006) 'Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view', *International Journal of Andrology*, 29, pp. 109–121. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00631.x.

Elbert, A. et al. (2008) 'Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection', *Pest Management Science*, 64(June), pp. 1099–1105. doi: 10.1002/ps.

Foster, W., Chan, S. and Hughes, C. (2000) 'Detection of Endocrine Disrupting Chemicals in Samples of Second Trimester Human Amniotic Fluid', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(8), pp. 2954–2957.

Geyer, J. et al. (2017) 'The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 172, pp. 207–221. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.002.

Gillesby, B. and Zacharewski, T. (1999) 'pS2 (TFF1) levels in human breast cancer tumor samples: correlation with clinical and histological prognostic markers', *Breast cancer research and treatment*, 2(3), pp. 253–265. doi: 10.1023/a:1006215310169.

Greenberg, M. and Lowrie, K. (2009) *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*, The National Academies Press. doi: 10.1111/j.1539-6924.2009.01222.x.

Hassiotou, F. and Geddes, D. (2013) 'Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge', *Clinical Anatomy*, 26(1), pp. 29–48. doi: 10.1002/ca.22165.

Hayes, E. L. and Lewis-Wambi, J. S. (2015) 'Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA', *Breast Cancer Research*, 17(40), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13058-015-0542-y.

Health Canada, 2012: *Listing of Drugs Currently Regulated as New Drugs - Health Canada*. Ottawa, Ontario. Disponible à <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/drug-products/applications-submissions/guidance-documents/listing-drugs-currently-regulated-new-drugs.html>.

Hecker, M. and Giesy, J. P. (2008) 'Novel trends in endocrine disruptor testing: The H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(1), pp. 287–291. doi: 10.1007/s00216-007-1657-5.

Heneweer, M., Muusse, M., Van Den Berg, M., *et al.* (2005) 'Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(2), pp. 170–177. doi: 10.1016/j.taap.2005.02.006.

Heneweer, M., Muusse, M., Dingemans, M., *et al.* (2005) 'Co-culture of Primary Human Mammary Fibroblasts and MCF-7 Cells as an InVitro Breast Cancer Model', *Toxicological Sciences*, 83(2), pp. 257–263. doi: 10.1093/toxsci/kfi025.

Heneweer, M., Van Den Berg, M., *et al.* (2005) 'Inhibition of aromatase activity by methyl sulfonyl PCB metabolites in primary culture of human mammary fibroblasts', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(1), pp. 50–58. doi: 10.1016/j.taap.2004.06.006.

Honda, H., Tomizawa, M. and Casida, J. E. (2006) 'Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and -aldehyde oxidase systems', *Toxicology Letters*, 161(2), pp. 108–114. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.08.004.

Iacobuzio-Donahue, C. A. *et al.* (2002) 'The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: Gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types', *Cancer Research*, 62(18), pp. 5351–5357.

Jeltsh, J. M. *et al.* (1987) 'Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2', *Nucleic Acids Research*, 15(4), pp. 1353–1361.

Jonsson, P., Katchy, A. and Williams, C. (2014) 'Support of a bi-faceted role of estrogen receptor beta in estrogen receptor alpha positive breast cancer cells', *Endocrine-Related Cancer*, 21(2), pp. 143–160. doi: doi:10.1530/ERC-13-0444.

Kaijser, M. *et al.* (2000) 'Maternal pregnancy estriol levels in relation to anamnestic and fetal anthropometric data', *Epidemiology*, 11(3), pp. 315–319. doi: 10.1097/00001648-200005000-00015.

Kamat, A. *et al.* (2002) 'Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(3), pp. 122–128. doi: 10.1016/S1043-2760(02)00567-2.

Kao, J. *et al.* (2009) 'Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery', *PLoS one*, 4(7). doi: 10.1371/journal.pone.0006146.

Kinoshita, Y. and Chen, S. (2003) 'Induction of Aromatase (CYP19) Expression in Breast

Cancer Cells through a Nongenomic Action of Estrogen Receptor α Induction of Aromatase (CYP19) Expression in Breast Cancer Cells through a Nongenomic Action of Estrogen Receptor $\square 1$ ', *Cancer Research*, (24), pp. 3546–3555.

Krewski, D. et al. (2010) 'Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy', *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 13(0), pp. 51–138. doi: 10.1080/10937404.2010.483176.TOXICITY.

Krishnan, A. V., Swami, S. and Feldman, D. (2012) 'The Potential Therapeutic Benefits of Vitamin D in the Treatment of Estrogen Receptor Positive Breast Cancer', *Steroids*, 77(11), pp. 477–479. doi: 10.1016/j.jimmuni.2010.12.017.Two-stage.

Lacroix, D. et al. (1997) 'Expression of CYP3A in the human liver - Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth.', *European journal of biochemistry / FEBS*, 247(2), pp. 625–634. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00625.x.

Lacroix, M. and Leclercq, G. (2004) 'Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update', *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(3), pp. 249–289. doi: 10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc.

Lee, H.-R., Kim, T.-H. and Choi, K.-C. (2012) 'Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse', *Laboratory Animal Research*, 28(2), p. 71. doi: 10.5625/lar.2012.28.2.71.

Lee, S. S. et al. (2010) 'Identification of a null allele of cytochrome P450 3A7: CYP3A7 polymorphism in a Korean population', *Molecular Biology Reports*, 37(1), pp. 213–217. doi: 10.1007/s11033-009-9608-1.

Leino, O. et al. (2013) 'Pollutant concentrations in placenta', *Food and Chemical Toxicology*, 54, pp. 59–69. doi: 10.1016/j.fct.2011.10.058.

Leonardi, E. et al. (1992) 'PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables', *Journal of Clinical Pathology*, 45(5), pp. 416–419. doi: 10.1136/jcp.45.5.416.

Lever, E. and Sheer, D. (2010) 'The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade', *The Journal of pathology*, 220(September), pp. 114–125. doi: 10.1002/path.

Macias, H. and Hinck, L. (2013) 'Mammary Gland Development', *Wiley Interdisciplinary*

Reviews: *Developmental Biology*, 1(4), pp. 533–557. doi: 10.1002/wdev.35.Mammary.

Madsen, J. et al. (2007) 'Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3', *J Histochem Cytochem*, 55(5), pp. 505–513. doi: jhc.6A7100.2007 [pii]r10.1369/jhc.6A7100.2007.

Mahendroo, M. S., Mendelson, C. R. and Simpson, E. R. (1993) 'Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue', *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), pp. 19463–19470. doi: 10.1210/mend-5-12-2005.

Main, A. R. et al. (2014) 'Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada ' s Prairie Pothole Region', *PloS one*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0092821.

Malassiné, A., Frendo, J. L. and Evain-Brion, D. (2003) 'A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model', *Human Reproduction Update*, 9(6), pp. 531–539. doi: 10.1093/humupd/dmg043.

Marill, J. et al. (2002) 'Human cytochrome P450s involved in the metabolism of 9-cis- and 13-cis-retinoic acids', *Biochemical Pharmacology*, 63(5), pp. 933–943. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00925-X.

Markey, C. M. et al. (2002) 'Endocrine disruptors: From Wingspread to environmental developmental biology', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83(1–5), pp. 235–244. doi: 10.1016/S0960-0760(02)00272-8.

McKinlay, R. et al. (2008) 'Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment', *Environment International*, 34(2), pp. 168–183. doi: 10.1016/j.envint.2007.07.013.

Melmed, S. et al. (2016) *Williams Textbook of Endocrinology*. 13th Editi. Edited by Saunders. Philadelphia, PA: Elsevier.

Meng, L. et al. (2001) 'Tumor necrosis factor α and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ : Mechanism of desmo', *Cancer Research*, 61(5), pp. 2250–2255. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035266474&partnerID=tZOTx3y1>.

Michael, M. D. et al. (1995) 'Ad4BP/SF-1 Regulates Cyclic AMP-induced Transcription from the Proximal Promoter (PII) of the Human Aromatase P450 (CYP19) Gene in the Ovary', *The*

Journal of Biological Chemistry, 270(June 2), pp. 13561–13566.

Miki, Y. et al. (2012) 'The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 131(3–5), pp. 68–75. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.12.004.

Milewich, L. et al. (1986) 'Human fetal liver estrogen 16alpha-hydroxylase: precursor specificity, kinetic parameters, and in vitro regulation', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 63(1), pp. 180–191. doi: 10.1210/jcem-63-1-180.

Montgomery, R. B. et al. (2009) 'Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth', *NIH Public Access*, 68(11), pp. 4447–4454. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0249.Maintenance.

Moreau, F. et al. (2009) 'Aromatase expression in the normal human adult adrenal and in adrenocortical tumors: biochemical, immunohistochemical, and molecular studies.', *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 160(1), pp. 93–99. doi: 10.1530/EJE-08-0215.

Mucci, L. A. et al. (2003) 'Pregnancy estriol, estradiol, progesterone and prolactin in relation to birth weight and other birth size variables (United States)', *Cancer Causes and Control*, 14(4), pp. 311–318. doi: 10.1023/A:1023966813330.

Nelson, L. R. and Bulun, S. E. (2001) 'Estrogen production and action', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(3), pp. 116–124. doi: 10.1067/mjd.2001.117432.

Pajor, E. A. and Milligan, B. N. (1997) 'A Scientific Conception of Animal Welfare That Reflects Ethical Concerns', *Animal Welfare*, 6(2), pp. 187–205.

Parker, C. R. (1999) 'Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging', *Steroids*, 64(9), pp. 640–647. doi: 10.1016/S0039-128X(99)00046-X.

Pease, C. K. and Gentry, R. P. (2016) 'Systematic review in chemical risk assessment — A chemical industry perspective', *Environment International*. Elsevier Ltd, 92–93, pp. 574–577. doi: 10.1016/j.envint.2015.12.007.

Peskin, A. V. and Windterbourn, C. C. (2000) 'A microtiter assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)', *Clinica Chimica Acta*, 293, pp. 157–166. doi: 10.1016/S0009-8981(99)00246-6.

Pipe, A.; Ayotte, C., 2002: Nutritional supplements and doping. *Clinical Journal of Sport Medicine.*, **141**, 245–249.

Prat, A. et al. (2010) 'Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer'. doi: 10.1186/bcr2635.

Purohit, A. and Reed, M. J. (2002) 'Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women', *Steroids*, 67(12), pp. 979–983. doi: 10.1016/S0039-128X(02)00046-6.

Ravi, M. et al. (2015) '3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications', *Journal of Cellular Physiology*, (May 2014), pp. 16–26. doi: 10.1002/jcp.24683.

Rivest, P., Devine, P. J. and Sanderson, J. T. (2010) 'Evaluation of a bioluminescent mouse model expressing aromatase PII-promoter-controlled luciferase as a tool for the study of endocrine disrupting chemicals', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(1), pp. 33–40. doi: 10.1016/j.taap.2010.08.011.

Robins, J. C. et al. (2011) 'Endocrine disruptors, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy.', *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3, pp. 690–700. doi: 10.1016/j.bbci.2008.05.010.

Robitaille, C. N., Rivest, P. and Sanderson, J. T. (2014) 'Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells.', *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 143(1), pp. 126–135. doi: 10.1093/toxsci/kfu212.

Rubin, B. S. (2011) 'Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 127(1–2), pp. 27–34. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.05.002.

Russo, J. and Russo, I. H. (2004) 'Development of the human breast', *Maturitas: The European Menopause Journal*, 49(1), pp. 2–15. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.04.011.

vom Saal, F. S. and Hughes, C. (2005) 'An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment', *Environmental Health Perspectives*, 113(8), pp. 926–933. doi: 10.1289/ehp.7713.

Sanderson, J. T. et al. (2000) '2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity?', *Toxicological Sciences*, 127, pp. 121–127.

Sanderson, J. T. (2006) 'The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals.', *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 94(1), pp. 3–21. doi: 10.1093/toxsci/kfl051.

Sanderson, J. T. (2006) 'The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals', *Toxicological Sciences*, 94(1), pp. 3–21. doi: 10.1093/toxsci/kfl051.

Sanderson, J. T. (2009) 'Adrenocortical Toxicology In Vitre: Assessement of Steroidogenic Enzyme Expression and Steroid Production in H295R Cells', *Adrenal Toxicology*, 26(January 2008), pp. 175–182.

Schaafsma, A. et al. (2015) 'Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario', *PLoS one*, 10(2), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0118139.

Schuetz, J. D., Kauma, S. and Guzelian, P. S. (1993) 'Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta', *Journal of Clinical Investigation*, 92(2), pp. 1018–1024. doi: 10.1172/JCI116607.

Schulz-Jander, D. A. and Casida, J. E. (2002) 'Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction', *Toxicology Letters*, 132, pp. 65–70.

Services, U. S. D. of H. and H., Health, N. I. of and Welfare, O. of L. A. (2015) *Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*. Bethesda, MD: NIH Publication.

Shi, X. et al. (2009) 'Enzymes and inhibitors in neonicotinoid insecticide metabolism', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), pp. 4861–4866. doi: 10.1021/jf900250f.

Simpson, E. et al. (2000) 'The role of local estrogen biosynthesis in males and females', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(5), pp. 184–188. doi: 10.1016/S1043-2760(00)00254-X.

Singer PL. *Occupational oligospermia*. J Am Med Dir Assoc 1949; 140:1249.

Singh, B. et al. (2006) 'COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells', *Journal of Surgical Research*, 131(2), pp. 267–275. doi: 10.1016/j.jss.2005.11.582.

Smeets, J. M. W. et al. (1999) 'In vitro Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti)Estrogenic Activity of Xenobiotics',

- Toxicology and Applied Pharmacology*, 157, pp. 68–76. doi: 10.1006/taap.1999.8663.
- Society, T. A. C. (2017) *Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018*. Atlanta, Georgia (USA).
- Sonnenschein, C. and Soto, A. M. (1998) ‘An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists’, 65(1), pp. 143–150.
- Sonneveld, E. *et al.* (2006) ‘Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities’, *Toxicological Sciences*, 89(1), pp. 173–187. doi: 10.1093/toxsci/kfj009.
- Sotiriou, C. and Pusztai, L. (2009) ‘Gene-Expression Signatures in Breast Cancer’, *New England Journal of Medicine*, 360(8), pp. 790–800. doi: 10.1056/NEJMra0801289.
- Soto, A. M. *et al.* (1995) ‘The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants’, *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 7), pp. 113–122. doi: 10.1289/ehp.95103s7113.
- Spitale, A. *et al.* (2009) ‘Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: Clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland’, *Annals of Oncology*, 20(4), pp. 628–635. doi: 10.1093/annonc/mdn675.
- Starner, K. and Goh, K. S. (2012) ‘Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010-2011’, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(3), pp. 316–321. doi: 10.1007/s00128-011-0515-5.
- Stevens, J. C. *et al.* (2003) ‘Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes’, *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 307(0022–3565 LA–eng PT–Journal Article RN–53–43–0 (Dehydroepiandrosterone) RN–9035–51–2 (Cytochrome P–450 Enzyme System) RN–EC 1.14.14.1 (Aryl Hydrocarbon Hydroxylases) RN–EC 1.14.14.1 (CYP3A protein, human) RN–EC 1.14.14.1 (CYP3A7 protein, hum), pp. 573–582. doi: 10.1124/jpet.103.054841.P450-dependent.
- Tang, P., Wang, J. and Bourne, P. (2008) ‘Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same?’, *Human Pathology*, 39(4), pp. 506–513. doi: 10.1016/j.humpath.2007.09.005.
- Taylor, S. *et al.* (2010) ‘A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines’, *Methods*. Elsevier Inc., 50(4), pp. S1–S5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.

Thibeault, A.-A. H. et al. (2017) 'Molecular and Cellular Endocrinology Fluoxetine and its active metabolite nor fluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the feto-placental unit', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 442, pp. 32–39. doi: 10.1016/j.mce.2016.11.021.

Thibeault, A. H. et al. (2014) 'A Unique Co-culture Model for Fundamental and Applied Studies of Human Fetoplacental Steroidogenesis and Interference by Environmental Chemicals', *Environmental Health Perspectives*, 122(4), pp. 371–377.

Thomas, R. (2018) 'The US Federal Tox21 Program: A Strategic and Operational Plan for Continued Leadership', *Altex*, 35(2), pp. 163–168. doi: 10.14573/altex.1803011.

Troisi, R. et al. (2003) 'Associations of maternal and umbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States)', *Cancer Causes and Control*, 14(4), pp. 347–355. doi: 10.1023/A:1023934518975.

Vallejos, C. et al. (2010) 'Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: Subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database', *Clinical Breast Cancer*. Elsevier Inc., 10(4), pp. 294–300. doi: 10.3816/CBC.2010.n.038.

Walker, R. A. (2001) 'The complexities of breast cancer desmoplasia', *Breast Cancer Research*, 3(3), pp. 143–145. doi: 10.1186/bcr287.

Wang, X. et al. (2015) 'In vitro interactions between mammary fibroblasts (Hs 578Bst) and cancer epithelial cells (MCF-7) modulate aromatase, steroid sulfatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 412, pp. 339–348. doi: 10.1016/j.mce.2015.05.032.

Watzka, M., Steckelbroeck, S. and Schramm, J. (1999) 'Expression of 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1,2, 3 and 4 in the human temporal lobe', *Journal of Endocrinology*, 160, pp. 119–126.

Weigelt, B. et al. (2008) 'Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types', *Journal of Pathology*, 216(July), pp. 141–150. doi: 10.1002/path.

Weigelt, B. and Bissell, M. J. (2008) 'Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), pp. 311–321. doi: 10.1016/j.semcan.2008.03.013.

Wilson, V. S., Bobseine, K. and Jr., L. E. G. (2004) 'Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists', *Toxicological Sciences*, 81, pp. 69–77. doi: 10.1093/toxsci/kfh180.

Wignall, J. A.; Shapiro, A. J.; Wright, F. A.; Woodruff, T. J.; Chiu, W. A.; Guyton, K. Z.; Rusyn, I., 2014: Standardizing benchmark dose calculations to improve science-based decisions in human health assessments. *Environmental Health Perspectives*, 122, 499–505.

Wood, C. E. et al. (2013) 'Progestin effects on cell proliferation pathways in the postmenopausal mammary gland', *Breast Cancer Research*, 15(4), p. 1. doi: 10.1186/bcr3456.

Yashwanth, R. et al. (2006) 'Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: A study using human placental and rat Leydig cells', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246(1–2), pp. 114–120. doi: 10.1016/j.mce.2005.11.007.

Zhao, Y. et al. (1996) 'Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene', *Endocrinology*, 137(12), pp. 5739–5742. doi: 10.1210/en.137.12.5739.

6 ANNEXE

ARTICLE : EFFECTS OF NEONICOTINOID PESTICIDES ON PROMOTER-SPECIFIC AROMATASE (CYP19) EXPRESSION IN HS578T BREAST CANCER CELLS AND THE ROLE OF THE VEGF PATHWAY

Élyse Caron-Beaudoin, Rachel Viau et J. Thomas Sanderson

Environmental Health Perspectives 2018 Apr 26; 126(4):047014

6.1 Résumé de l'article

L'aromatase (CYP19) est un enzyme clé dans la biosynthèse des œstrogènes. Dans la glande mammaire, le gène *CYP19* est exprimé faiblement sous la régulation de son promoteur I.4. Dans le cancer du sein hormono-dépendant, les cellules de fibroblastes entourant la tumeur expriment des niveaux surélevés d'ARNm de *CYP19* dû à une diminution de l'activité du promoteur I.4 et une augmentation de l'activité des promoteurs PII, I.3 et I.7. Peu d'information existe en ce qui concerne les effets de contaminants sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19*. L'objectif des travaux étaient de déterminer les effets de deux néonicotinoïdes (thiaclopride et l'imidaclopride) sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* dans les cellules de cancer du sein Hs578t et de comprendre les voies de signalisations impliquées. Les cellules Hs578t ont été exposées à des stimulants variés de voies de signalisations ou les néonicotinoïdes pendant 24h. L'expression promoteur-spécifique de *CYP19* a été déterminée par réaction en chaîne PCR en temps réel et l'activité catalytique de l'aromatase par l'essai du libération d'eau tritiée. À notre connaissance, nous sommes les premiers à démontrer que le promoteur normal I.4 et les promoteurs pertinents au cancer du sein pII, I.3 et I.7 de *CYP19* sont actifs chez ces cellules. Nous avons trouvé que l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII, I.3 et I.7, chez les cellules Hs578t, étaient, en partie, dépendantes de l'activation de deux voies de signalisations VEGF : MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) 1 et 3 et phospholipase C (PLC). Les expositions aux cellules Hs578t à des concentrations environnementales d'imidaclopride et thiaclopride ont résulté à un changement dans l'utilisation des promoteurs, impliquant l'inhibition de l'activité du promoteur I.4 et une augmentation de l'activité et l'expression de l'aromatase médiée par les promoteurs PII, I.3 et I.7. Les effets les plus importants ont été observés à des concentrations plus faibles. Nos résultats suggèrent que l'imidaclopride et le thiaclopride exercent leurs effets, au moins en partie, en induisant les voies de signalisations MAPK 1 et 3 et/ou PLC. Nous avons démontrés *in vitro* que les néonicotinoïdes pourraient stimuler un changement dans l'utilisation des promoteurs *CYP19* de façon similaire à ce qui a été observé chez des patientes atteintes du cancer du sein hormono-dépendant.

6.2 CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE

Rachel Viau a collaboré dans le lancement de ce projet pendant les deux années précédant son inscription au programme de maîtrise en sciences expérimentales de la santé (stagiaire pendant l'été 2015 et étudiante libre de deuxième cycle durant l'été 2016). Elle a contribué dans la l'obtention de données ainsi qu'aux analyses de PCR en temps réel quantitatif (qPCR) de CYP19 et aux analyses de l'activité catalytique de l'aromatase par la libération d'eau tritiée. Ce projet a été le déclenchement pour le nouveau modèle de co-culture du cancer du sein hormono-dépendant utilisant les lignées cellulaires Hs578t et T-47D. Le développement du nouveau modèle de co-culture recréant le microenvironnement stromale/tumorale était une des perspectives de ce projet. Ces travaux ont permis à Rachel Viau de se familiariser avec les cellules Hs578t avant de poursuivre au développement du nouveau modèle de co-culture. Cette article est placé en annexe au mémoire puisque les résultats sont complémentaires au chapitre 3.

Effects of Neonicotinoid Pesticides on Promoter-Specific Aromatase (CYP19) Expression in Hs578t Breast Cancer Cells and the Role of the VEGF Pathway

Élyse Caron-Beaudoin, Rachel Viau and J. Thomas Sanderson

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada

Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

ABSTRACT

Aromatase (CYP19) is a key enzyme in estrogens biosynthesis. In the mammary gland, CYP19 gene is expressed at low levels under the regulation of its I.4 promoter. In hormone-dependent breast cancer, fibroblast cells surrounding the tumor express increased levels of CYP19 mRNA due to a decrease of I.4 promoter activity and an increase of PII, I.3, and I.7 promoter reactivity. Little is known about the effects of environmental chemicals on the promoter-specific CYP19 expression. We aimed to determine the effects of two neonicotinoids (thiacloprid and imidacloprid) on promoter-specific CYP19 expression in Hs578t breast cancer cells and understand the signaling pathways involved. Hs578t cells were exposed to various signaling pathway stimulants or neonicotinoids for 24h. Promoter-specific expression of CYP19 was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction and catalytic activity of aromatase by tritiated water release assay. To our knowledge, we are the first to demonstrate that the normal I.4 promoter and the breast cancer-relevant PII, I.3, and I.7 promoters of CYP19 are active in these cells. We found that the expression of CYP19 via promoters PII, I.3, and I.7 in Hs578t cells was, in part, dependent on the activation of two VEGF signaling pathways: mitogen-activated protein kinase (MAPK) 1/3 and phospholipase C (PLC). Exposure of Hs578t cells to environmental concentrations of imidacloprid and thiacloprid resulted in a switch in CYP19 promoter usage, involving inhibition of I.4 promoter activity and an increase of PII, I.3, and I.7 promoter-mediated CYP19 expression and aromatase catalytic activity. Greater effects were seen at lower concentrations. Our results suggest that thiacloprid and imidacloprid exert their effects at least partially by inducing the MAPK1/3 and/or PLC pathways. We demonstrated *in vitro* that neonicotinoids may stimulate a change in CYP19 promoter usage similar to that observed in patients with hormone-dependent breast cancer.

6.3 INTRODUCTION

In 2015, 25 000 women were diagnosed with breast cancer in Canada (Canadian Cancer Society, 2015). In the United States, it was expected that 246 660 new cases of breast cancer would be diagnosed in 2016 (Siegel *et al.*, 2016). Of these, 70% of diagnosed breast cancers are hormone-dependent. In this type of cancer, increased local estrogen is produced, resulting in greater concentrations in the tumor microenvironment, which stimulates the proliferation of breast cancer epithelial cells (Ghosh *et al.*, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2009). Aromatase (CYP19) is a key enzyme in the biosynthesis of estrogen, since it is responsible of the final conversion of androstenedione to estrone, and testosterone to estradiol (Bulun *et al.*, 2003). CYP19 gene is expressed in a tissue-specific manner by the activation of various promoters located in the non-coding region of the gene. For example, in premenopausal women, CYP19 is mostly expressed in ovaries by the activity of promoters PII and I.3. In pregnant women, the placenta expresses CYP19 via the I.1 and, to a lesser extent, I.8 promoter (Demura *et al.*, 2008, Simpson *et al.*, 1994). In the breast, CYP19 is expressed at low levels in fibroblast cells (stromal preadipocytes) and driven by the I.4 promoter. In breast cancer, a series of unknown events leads to the inhibition of I.4 promoter activity, and the activation of several promoters that are normally inactive in the stromal cells of the mammary gland, namely PII, I.3 and I.7 (Agarwal *et al.*, 1996, Bulun *et al.*, 2012, Harada *et al.*, 1993, Subbaramaiah *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2005). This unique switch in promoter usage results in an increase of overall CYP19 gene expression, aromatase catalytic activity and subsequent estrogen biosynthesis. In addition, malignant breast epithelial cells secrete a number of cytokines into the tumor microenvironment, such as tumor necrosis factor 1-alpha (TNF α) and interleukin-11 (IL-11). These cytokines are involved in triggering a desmoplastic reaction, which is characterized by a blockade of the normal differentiation of fibroblast cells expressing high levels of aromatase, into adipocytes, which express lower enzyme levels, resulting in the accumulation of undifferentiated estrogen-producing fibroblast cells surrounding the malignant epithelial cells (Meng *et al.*, 2001). Moreover, malignant epithelial cells synthesize prostaglandin E2 (PGE₂), which binds to its G-protein-coupled PGE₂ receptor to stimulate the production of cyclic AMP (cAMP), which increases CYP19 expression by activating promoters PII and I.3 (Chen *et al.*, 2007, Subbaramaiah *et al.*, 2012). PGE₂ can also activate the orphan nuclear receptor homologue-1 (LRH-1), known to induce CYP19 expression in breast tissue (Zhou *et al.*, 2005). Increased levels of PGE₂, TNF α and IL-11 in the tumor microenvironment only partially explain the promoter-switch in regulation of CYP19 expression that occurs in hormone-dependent breast

cancer patients. Another potential contribution to the promoter-switch in *CYP19* expression is the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor signalling pathway. The VEGF receptor (VEGFR) signalling pathway plays a central role in angiogenesis. More precisely, secretion of VEGF is associated with proliferation of vascular endothelial cells (Schneider *et al.*, 2007). It has been demonstrated that VEGF and its receptors are overexpressed in breast cancer (Adams *et al.*, 2000, Konecny *et al.*, 2004). Furthermore, we know that VEGF promotes angiogenesis and endothelial cells permeability by activating ERK 1/2 (MEK/MAPK1/3) (Breslin *et al.*, 2003, Pai *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2008) and PLC/PKC (Cross *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2015).

Given the importance of aromatase in hormone-dependent breast cancer, understanding the regulation of promoter-specific expression of *CYP19* is paramount to assess potential impacts of environmental contaminants on the development of this disease. Indeed, there is growing evidence that exposure to contaminants, such as pesticides, is a risk factor for hormone-dependent breast cancer (Cohn *et al.*, 2007, Fernández *et al.*, 2004, Mathur *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2010). A lot of research has focused on effects of endocrine disruptors on the estrogen receptor (Bouskine *et al.*, 2009, Roy *et al.*, 2009, Rubin *et al.*, 2001). The enzyme aromatase has been identified as a target for endocrine disrupting chemicals including environmental pesticides. However, we have little information on the roles that environmentally relevant levels of chemicals may play in these events. It was demonstrated that atrazine, an herbicide, induces estradiol synthesis in human cell lines by the activation of PII/I.3-mediated *CYP19* expression (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016, Sanderson *et al.*, 2002). More precisely, atrazine induces the synthesis of cAMP, which can have a direct effect on the signalling pathways implicated in the activation of the PII and I.3 promoters of *CYP19* (Fan *et al.*, 2007b, Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001). Furthermore, our laboratory recently demonstrated that the neonicotinoids thiacloprid and thiamethoxam induce PII/I.3-mediated *CYP19* expression as well as aromatase catalytic activity in a non-monotonic manner in H295R adrenocortical carcinoma cells, at relatively low concentrations (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016). We also demonstrated that three neonicotinoids (thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid) increased the production of estrone and estradiol, yet strongly inhibited the production of estriol, in a fetoplacental co-culture model of steroidogenesis during pregnancy (Caron-Beaudoin *et al.*, 2017). The impacts of neonicotinoid insecticides on human health have not been studied in any detail, but an increasing body of evidence suggests they have the potential to disrupt endocrine functions (Bal *et al.*, 2012, Hoshi *et al.*, 2014, Kapoor *et al.*, 2011, Sekeroglu *et al.*, 2014). For example, female rats exposed to imidacloprid through diet (20 mg/kg/day) showed decreased

ovarian weights and alterations in progesterone and follicle-stimulating hormone levels (Kapoor et al., 2011).

Neonicotinoids are widely used pesticides that have been linked to Honey Bee Colony Collapse Disorder (Goulson, 2013, Henry et al., 2012a). In 2012, 216 000 kg of active neonicotinoids were applied on 11 million hectares in Canada (Main et al., 2014). These insecticides exert their effects by binding to nicotinic acetylcholine receptors, and they are used as seed coating in a variety of crops, fruits and vegetables. Neonicotinoids' half-lives can reach 1250 days for imidacloprid (Main et al., 2014), and these insecticides are detected in surface water and soil (Schaafsma et al., 2015, Starner et al., 2012, Stokstad, 2013). Due to their relative persistence in the environment, and because neonicotinoids are used as seed treatments and repeatedly applied, concerns regarding human exposure have been raised. Imidacloprid has been detected in 89% of water samples in California, and concentrations were exceeding the United States Environmental Protection Agency's aquatic life benchmark dose in 19% of samples (Starner et al., 2012). In wetlands in Saskatchewan, Canada, concentrations of clothianidin and thiamethoxam were found to be as high as 3110 ng/L (Main et al., 2014). Furthermore, it was recently demonstrated that residues from at least one neonicotinoid were detected in vegetables and fruits purchased from grocery stores in Boston, United States, with concentrations reaching 100.7 ng/g. In this study, at least two different neonicotinoids were detected in 72% of fruits and 45% of vegetables (Chen et al., 2014). Finally, a study conducted in Japan analyzed neonicotinoids metabolites in urine samples of farmers. 3-furoic acid, the major metabolite of the neonicotinoid dinotefuran, was detected in all urine samples with concentrations reaching 0.13 μ M (Nomura et al., 2013). Ueyama et al. (2015) also measured urinary neonicotinoid levels in females from the general Japanese population. Thiacloprid and imidacloprid were detected at concentrations up to 0.01 μ M. The human exposure to neonicotinoid insecticides highlights the need to investigate their potential endocrine disrupting effects, especially at environmentally relevant concentrations.

Objectives. Using Hs578t cells as a breast cancer-relevant *in vitro* model, we aimed to understand the signalling pathways implicated in the expression of CYP19 via the activity of promoters I.4, I.7, I.3 and PII, and whether neonicotinoids can induce a promoter-switch in CYP19 expression, as has been described in breast cancer patients.

6.4 MATERIAL AND METHODS

6.4.1 Reagents

Thiacloprid (Pestanal® #37905, purity>99%) and imidacloprid (Pestanal® #37894, purity>99%) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO) and dissolved in sterile dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) as 100 mM stock solutions. The selective MAPK 1/3 pathway inhibitor PD98059 was purchased from Fisher Scientific (Waltham, MA) and dissolved in DMSO as a 50 mM stock solution. The phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 (Calbiochem, LaJolla, CA) was dissolved in DMSO as a 2 mM stock solution. Forskolin and dexamethasone were dissolved in DMSO as 10 mM and 100 µM stock solutions, respectively. VEGF was purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) at a concentration of 5.0 µg/mL.

6.4.2 Cell Culture

Hs578t cells (American Type Culture Collection, no. HTB-126) are triple-negative breast cancer epithelial cells derived from a 74-year-old patient with mammary carcinoma. Triple negative cells do not express estrogen or progesterone receptors, and do not display amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (Chavez et al., 2010). Cells from low passages (below 9) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM #30-2002) containing 4 mM of L-glutamine, 4500 mg/L of glucose, 1 mM of sodium pyruvate and 1500 mg/L of sodium bicarbonate. Medium was completed with 10% fetal bovine serum (FBS) and with 0.01 mg/mL of bovine insulin (Sigma Aldrich). Hs578t cells were exposed to various concentrations of each compound in culture media at a final DMSO concentration of 0.1%. To determine which *CYP19* promoters are active, Hs578t cells were exposed for 24 hours to 10 µM forskolin, 100 nM dexamethasone or 2.5 ng/mL VEGF. To determine which VEGF signalling pathways are implicated in the promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t cells, cells were exposed to the PLC or MAPK 1/3 inhibitors 4 hours prior to the addition of forskolin, dexamethasone or VEGF for 24 hours. To investigate the effects of neonicotinoids on *CYP19* expression, Hs578t cells were exposed to various concentrations of thiacloprid or imidacloprid for 24 hours. Finally, to determine if neonicotinoids exert their effects on *CYP19* expression via the PLC and/or MAPK1/3 pathways, Hs578t cells were exposed to the selective inhibitors for 4 hours prior to a 24 hours exposure to 0.1 µM thiacloprid or imidacloprid.

6.4.3 Cell viability

The cytotoxicity of thiacloprid and imidacloprid was determined using a WST-1 kit (Roche, Basel, Switzerland), which measures mitochondrial reductase activity in viable cells. Hs578t cells were incubated for 24 hours in 96-well plates (5×10^3 cells/well) in their culture medium (see section 6.4.2). After this period, cells were exposed for 24 hours to fresh medium containing various concentrations of thiacloprid or imidacloprid. Cells were then incubated with WST-1 substrate for 1.5 hour after which the formation of formezan was measured at an absorbance wavelength of 440 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

6.4.4 RNA isolation and amplification by quantitative RT-PCR

Real-time quantitative PCR (qPCR) is a well-established method used to determine gene expression levels. Our method, insuring strong RNA quality, primer design and choice of reference genes was previously published (Caron-Beaudoin et al., 2016) following recommendations from Taylor et al. (2010). Hs578t cells were cultured for 24 hours in 6-well plates (CellBind, Corning Incorporated, Corning, NY) (7.5×10^5 cells/well) containing 2 ml medium/well. To investigate signalling pathways implicated in *CYP19* expression in Hs578t cells, cells were exposed to various potential inducers and inhibitors of signalling pathways implicated in the activation of specific promoter (see section 6.4.2).

Dexamethasone (100 nM), a glucocorticoid known to induce I.4 promoter-mediated *CYP19* expression (Sigma-Aldrich), and forskolin (10 μ M) (Sigma-Aldrich), a known inducer of PII/I.3-mediated *CYP19* expression, were used as positive controls. VEGF (2.5 ng/mL) was used as a positive control for the induction of *CYP19* expression via its endothelial I.7 promoter. U73122 (2 μ M) and PD98059 (50 μ M), inhibitors of PLC and MAPK 1/3 pathways, respectively, were used to determine the role of these pathways in the promoter-specific expression of *CYP19*. DMSO (0.1% or 0.2% for co-exposures) was used as vehicle control. RNA was isolated using an RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, ON) according to the enclosed instruction, and stored at -80°C. Purity of the RNA samples was determined by measuring the 260nm/280nm absorbance ratio. Reverse transcription was performed using 0.5 μ g of RNA with an iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) and T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany); resultant cDNA was stored at -20°C. Preamplification of the obtained cDNA was performed using a PreAmp Kit (BioRad, Hercules, CA). Briefly, preamplification is a

supplemental step that amplifies cDNA for 10 cycles using classic PCR, along with the necessary primer pairs (for reference genes and genes of interest). This method is useful to determine the level of expression of genes that are expressed at endogenously low levels, which is the case for *CYP19* in the mammary gland. The preamplified cDNA obtained after this step was stored at -20°C and used to perform real-time quantitative PCR.

Primer pairs were designed to amplify mRNA species containing an untranslated 5' region uniquely derived from the promoters I.4, PII, I.3 or I.7 of *CYP19*; a primer pair designed to recognize only the coding region (exons II-X) was used to amplify overall (promoter non-distinct) *CYP19* transcript. All the primer pairs were analyzed with Blast and Primer-Blast (NCBI) to ensure their specificity. Real-time quantitative PCR was performed with EvaGreen MasterMix (BioRad) using a CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad) (95°C for 5 min; 40 cycles of 95°C for 5 sec and 60°C for 15 sec) (Table 6-1). For each pesticide treatment, a minimum of two suitable reference genes was determined using the geNorm algorithm method (Biogazelle qbase Plus software, Zwijnaarde, Belgium).

Tableau 6- 1. Primer-pair sequence used for amplification of promoter-specific *CYP19* expression and their amplification characteristics in Hs578t cells

<i>CYP19</i> promoter	Primer pairs (5'→3')	Amplification characteristics in Hs578t	Tissue-specific expression	Reference and NCBI accession number
<i>CYP19</i>-coding region	Fw: TGTCTTTGTTCTCATGCTATTCTC Rv : TCACCAATAACAGTCTGGATTTC	Standard curb : $r^2 = 0.991$ Efficiency : 92.8%	Detects all aromatase transcripts regardless of promoter utilized.	Sanderson <i>et al.</i> (2000) M22246
<i>CYP19</i>-I.4	Fw : GGCTCCAAGTAGAACGTGACCAACTG Rv : CAGCCCAAGTTGCTGCCGAA	Standard curb : $r^2 = 0.941$ Efficiency : 101.9%	Expressed in fibroblasts in the normal mammary gland.	Heneweer <i>et al.</i> (2004) S52794
<i>CYP19</i>-PII	Fw : TCTGCCCCTTGATTCACAG Rv : GCACGATGCTGGTGATGTTATA	Standard curb : $r^2 = 0.937$ Efficiency : 108.9%	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients.	Heneweer <i>et al.</i> (2004) S52794
<i>CYP19</i>-I.3	Fw : GGGCTCCTGTTTGACTTGTAA Rv : AGAGGGGGCAATTAGAGTCTGTT	Standard curb : $r^2 = 0.969$ Efficiency : 95.7%	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients.	Wang <i>et al.</i> (2008) D30796
<i>CYP19</i>-I.7	Fw : ACACTCAGCTTTCCAAACA Rv : TTTCACCCCTTCTCCGGTC	Standard curb : $r^2 = 0.983$ Efficiency : 90.7%	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients.	NM_001347251

Note: Fw, forward; NCBI, National Center Biotechnology Information; Rv, reverse.

6.4.5 Aromatase catalytic activity

Aromatase activity was measured using a tritiated water-release assay as described previously (Caron-Beaudoin et al., 2016, Sanderson et al., 2000). Briefly, Hs578t cells were cultured in 24-well plates (400,000 cells/well) containing 1 mL of culture medium. After 24 hours, cells were exposed to various concentrations of pesticides for another 24 hours. The treated medium was then removed and cells were washed twice with 500 µL PBS (1X). A volume of 250 µL of culture medium (without phenol red) containing 54 nM 1 β -³H-androstenedione was added to each well, and cells were incubated for 150 minutes at 37°C (5% CO₂). Further steps were as described previously (Sanderson et al., 2000). Tritiated water was counted in 24-well plates containing liquid scintillation cocktail using a Microbeta Trilux (PerkinElmer, Waltham, MA). Counts per minute emitted from each sample were corrected for quenching to determine disintegrations per minute, which were then converted into aromatase activity (fg/h/100,000 cells) and then expressed as a percent of control activity (DMSO). Formestane (1 µM), a selective and irreversible aromatase inhibitor, was used to ensure specificity for the aromatase reaction.

6.4.6 Statistical analysis

Results are presented as means with standard errors of three independent experiments using different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. The normal distribution of the residuals and the homoscedasticity of the data were verified for each analysis using JMP Software (SAS, Cary, NC). Statistically significant differences (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001) from control were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post-hoc test to correct for multiple comparisons to control using GraphPad Prism v5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6.5 RESULTS

6.5.1 Promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells

None of the tested neonicotinoid insecticides (0.03, 0.1, 0.3, 3 and 10 µM) was cytotoxic (data not shown). We determined the effects of a 24 hours exposure to various pharmacological compounds on the promoter-specific induction of CYP19 gene expression in Hs578t cells (Fig 6-1). Dexamethasone (100 nM) was used as an inducer of L4-mediated CYP19 expression,

while forskolin (10 μ M) was used to induce PII/I.3-mediated *CYP19* expression. VEGF (2.5 ng/mL) was used as a potential inducer of I.7-mediated *CYP19* expression (Kalluri et al., 2006). In Hs578t cells exposed to vehicle control (0.1% DMSO), basal *CYP19* expression appeared to be driven by the I.4 promoter ($Cq=31$; quantification cycle; the amplification cycle at which accurate quantification of expression levels can be made), the PII ($Cq = 32$), I.7 ($Cq = 33.5$) and I.3 ($Cq = 36$) promoters of aromatase. In Hs578t cells exposed to 100 nM dexamethasone, I.4 promoter-derived *CYP19* mRNA levels were induced 264 ± 85 fold compared to DMSO control, whereas no changes were observed in PII, I.3 and I.7 promoter-derived *CYP19* mRNA levels. Forskolin (10 μ M) induced PII and I.3 promoter-mediated *CYP19* expression by 4.6 ± 0.4 and 2.3 ± 0.3 fold, respectively, with no effects observed on transcripts derived from the I.7 promoter activity (Fig 6-1A). Finally, VEGF significantly induced I.7 and PII-mediated *CYP19* expression by 13.7 ± 1.2 and 6.6 ± 0.4 fold, respectively, in Hs578t cells (Fig 6-1A). I.3 promoter-mediated *CYP19* expression was also slightly increased by VEGF, but this was not statistically significant. To determine if the observed changes in promoter-derived transcripts levels translated into changes in aromatase activity, we measured the catalytic activity of aromatase in Hs578t cells exposed to dexamethasone, forskolin and VEGF. Dexamethasone (100 nM), forskolin (10 μ M) and VEGF (2.5 ng/mL) induced aromatase catalytic activity by 1973 ± 673 , 166 ± 23 and 169 ± 25 fold respectively, compared to DMSO control (Fig 6-1B).

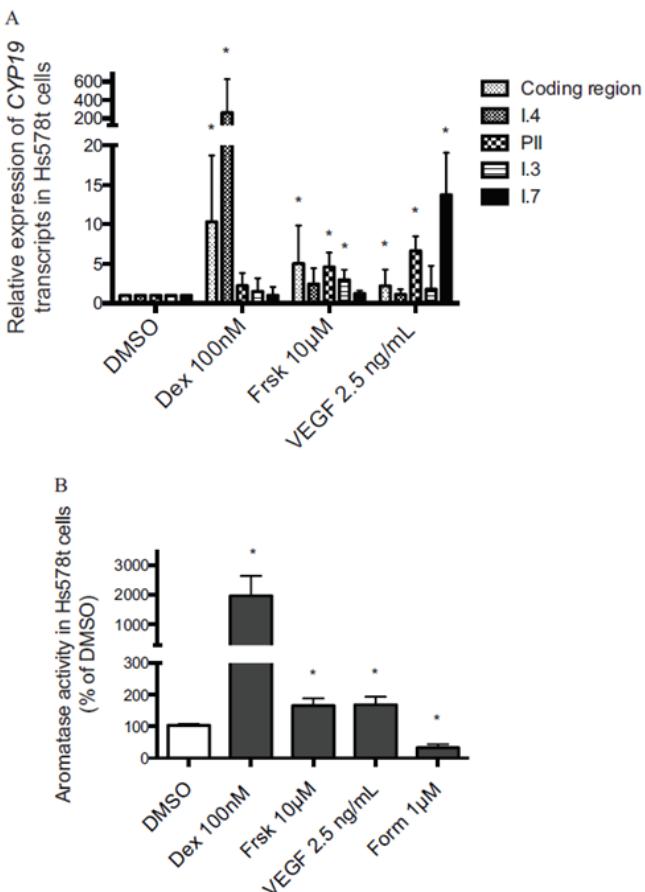


Figure 6- 1. (A) Relative expression of *CYP19* coding region (nonpromoter-specific or total), and I.4, PII, I.3, and I.7 promoter-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells (fold DMSO control). (B) Aromatase catalytic activity in Hs578t cells exposed to dexamethasone (DEX) 100 nM, forskolin (Fsk) 10 µM, vascular endothelial growth factor (VEGF) 2,5 ng/mL, or formestane (Form) 1 µM.

Experiments were performed in triplicate with three different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. Cells were exposed to treatments for 24h. *, p<0.05. Statistically significant difference between treatments compared with DMSO (Student t-test).

6.5.2 VEGF-mediated signalling pathways implicated in *CYP19* expression in Hs578t cells

To assess the involvement of two VEGF signalling pathways (PLC and MAPK 1/3 pathways) in the promoter-specific expression of *CYP19*, Hs578t cells were co-treated with selective inhibitors of these pathways 4 hours prior to the addition of VEGF or forskolin. Co-treatment of Hs578t cells with the PLC inhibitor U73122 (2 µM) and forskolin (10 µM) resulted in significantly reduced relative expression levels of *CYP19* (exon II-X: 1.4 ± 0.2 fold) (Fig 6-2A), PII- and I.3 promoter-mediated *CYP19* expression (2.7 ± 1.1 and 2.0 ± 0.8 fold, respectively) (Fig 6-2B-C) compared to forskolin treatment alone for exon II-X (5.7 ± 0.83 fold) (Fig 6-2A), PII (33 ± 14 fold)

(Fig 6-2B) and I.3-mediated *CYP19* expression (17.7 ± 9.5 fold) (Fig 6-2C). Furthermore, co-treatment of Hs578t cells with the MEK/MAPK 1/3 inhibitor PD98059 (50 μ M) followed by VEGF (2.5 ng/mL) also resulted in a significantly reduced relative expression of *CYP19* exon II-X (0.59 ± 0.25 fold) (Fig 6-2A) and I.7-mediated *CYP19* expression (2.9 ± 1.6 fold) (Fig 6-2D) compared to VEGF treatment alone for exon II-X (4.3 ± 1.3 fold) (Fig 6-2A) and I.7-mediated *CYP19* expression (35.0 ± 6.4 fold) (Fig 6-2D). Taken together, these results strongly suggest the involvement of two VEGF signalling pathways, namely PLC and MEK/MAPK 1/3, in the promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t breast cancer cells.

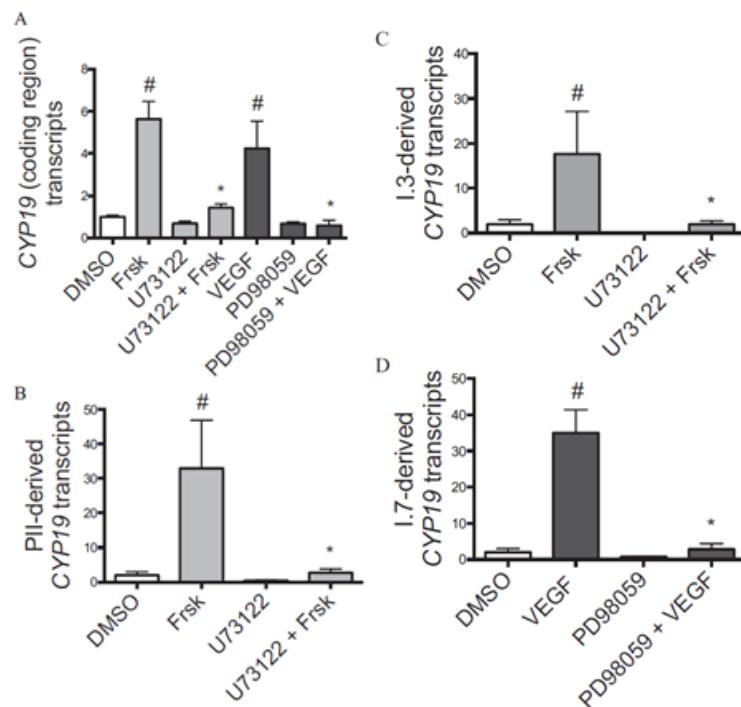


Figure 6- 2. Relative expression of (A) *CYP19* coding region (non promoter-specific or total), and *CYP19* transcripts derived from promoters (B) PII, (C) I.3, and (D) I.7 in Hs578t cells (fold DMSO control).

Cells were exposed for 24 h to 10 μ M forskolin (Fsk) or 2.5 ng/mL VEGF, inducers of PII/I.3 or I.7 promoter-mediated *CYP19* expression, in the presence or absence of selective inhibitors of the PLC (U73122; 2 μ M) or MEK/MAPK 1/3 (PD98059; 50 μ M) signaling pathways. Experiments were performed in triplicate with three different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. *, p<0.05. Statistically significant difference between Hs578t cells pretreated with U73122 compared with those treated with Fsk alone, or between Hs578t cells pretreated with PD98059 compared with those treated with VEGF alone (Student t-test). #, p<0.05. Significantly different from DMSO control (Student t-test)

6.5.3 Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells

In cells exposed to thiacloprid (0.1-10 µM), a switch in promoter usage for CYP19 expression was observed, characterized by a decrease of I.4-mediated CYP19 expression and an increase of PII-, I.3- and I.7-mediated CYP19 expression leading to an overall induction of the expression of CYP19 transcript containing promoter-non-specific coding region (exon II-X) (Fig 6-3A). Greater effects were seen at lower concentrations. In Hs578t cells exposed to 0.1 µM thiacloprid, relative expression via the I.4 promoter was decreased to 0.046 ± 0.041 fold of DMSO control, while PII (34.49 ± 12.07 fold), I.7-mediated CYP19 (3.54 ± 0.80) and overall exon II-X expression (57.37 ± 37.22 fold) were significantly induced compared to DMSO control (Fig 6-3A). I.3-mediated CYP19 expression appeared to increase by 2.00 ± 0.05 fold, although this was not statistically significant. We did not detect any statistically significant differences in the promoter-specific expression of CYP19 among the tested concentrations. We also observed an increase of the catalytic activity of aromatase at 0.1, 0.3 and 10 µM thiacloprid, with greater increases at lower concentrations (Fig 6-3B).

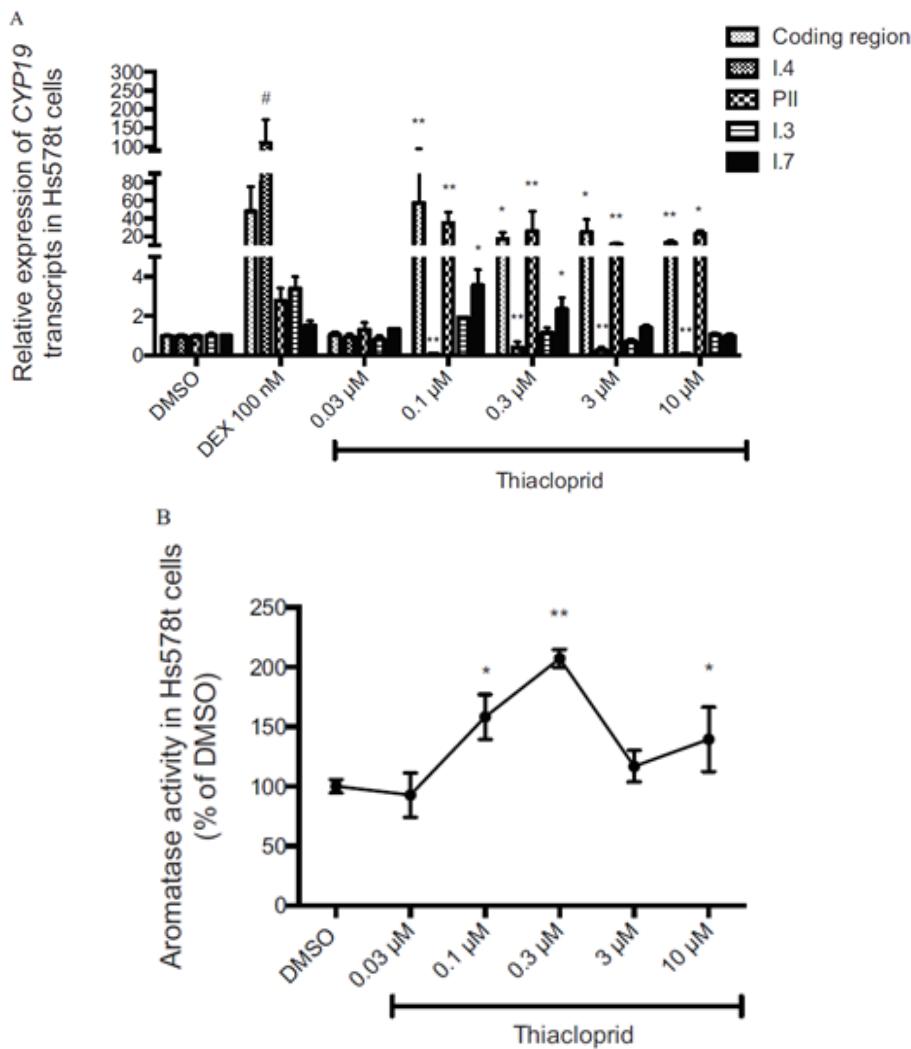


Figure 6-3. (A) Relative expression of *CYP19* coding region (non promoter-specific or total), and I.4, PII, I.3, and I.7 promoter-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells (fold DMSO control). (B) Aromatase catalytic activity in Hs578t cells exposed to thiacloprid (0.03, 0.1, 0.3, 3, and 10 μM).

DEX (100 nM) was used as a positive control for I.4 promoter-mediated *CYP19* expression. Experiments were performed in triplicate with three different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. DEX, dexamethasone. *, p<0.05; **, p<0.01). Statistically significant difference between thiacloprid and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test). #, p<0.05. Statistically significant difference between DEX treatment and DMSO control (Student t-test).

In Hs578t cells exposed to imidacloprid, a switch in promoter usage in *CYP19* expression occurred at concentrations above 0.03 μM, again with greater effects at lower concentrations. Following a 24 hours exposure to 0.1 μM imidacloprid, the relative levels of I.4 promoter-derived *CYP19* transcripts were significantly decreased to 0.61 ± 0.10 fold of DMSO control, while PII (11.0 ± 1.1 fold), I.3 (1.8 ± 0.3 fold) and I.7 promoter-mediated *CYP19* ($7.3 \pm$

0.3) and overall exon II-X expression (2.7 ± 0.4 fold) were significantly induced compared to DMSO control (Fig 6-4A). The levels of PII-, I.3- and I.7-derived *CYP19* mRNA in Hs578t cells were statistically different among the tested concentrations of imidacloprid. The catalytic activity of aromatase was statistically significantly induced at 0.1 μ M (Fig 6-4B).

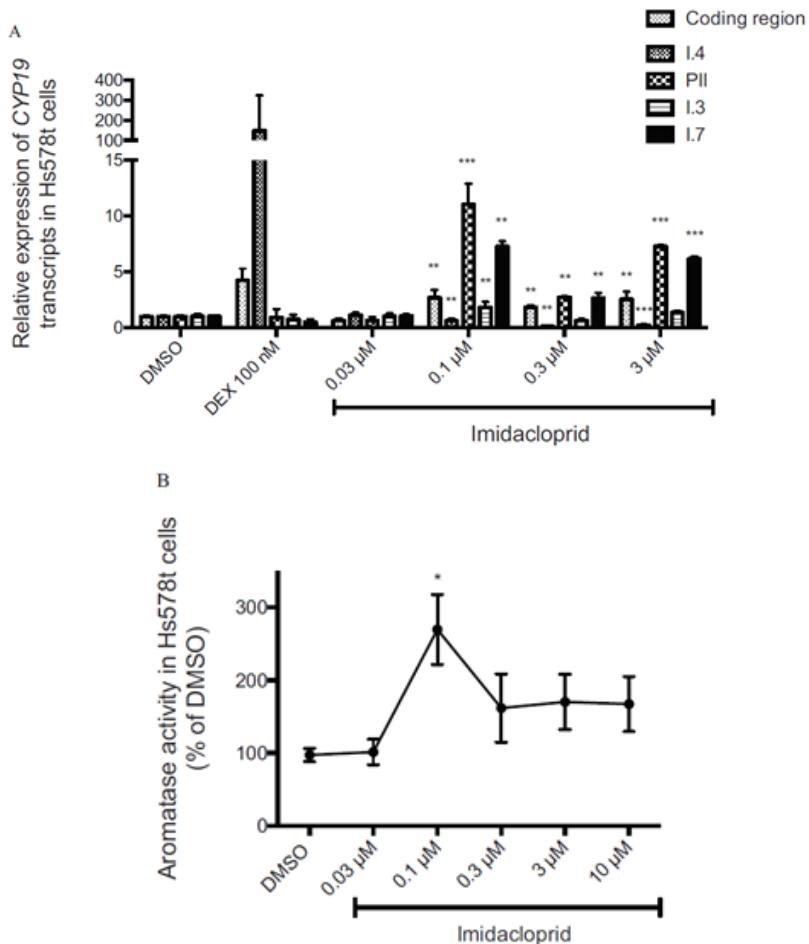


Figure 6- 4. (A) Relative expression of *CYP19* coding region (non promoter-specific or total), and I.4, PII, I.3, and I.7 promoter-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells (fold DMSO control). (B) Aromatase catalytic activity in Hs578t cells exposed to imidacloprid (0.03, 0.1, 0.3, and 3 μ M).

DEX (100 nM) was used as a positive control for I.4 promoter-mediated *CYP19* expression. DEX, dexamethasone. Experiments were performed in triplicate with three different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. Statistically significant difference between imidacloprid compared with DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test). #, p<0.05. Statistically significant difference between DEX treatment and DMSO control (Student t-test).

6.5.4 VEGF pathways implicated in promoter-switch of *CYP19* expression in Hs578t cells exposed to neonicotinoids

To investigate whether this switch in promoter usage may be explained by an action of neonicotinoids on the PLC and/or MEK/MAPK 1/3 pathways, we determined the promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t cells co-treated with either thiacloprid or imidacloprid (0.1 µM) and a selective inhibitor of either the PLC (U73122) or MEK/MAPK 1/3 (PD98059) pathways. Co-exposure to thiacloprid 0.1 µM and U73122 2 µM led to statistically significant inhibition of levels of promoter non-specific *CYP19* (exon II-X) transcripts to $32.9 \pm 17.8\%$ of the levels in Hs478t cells exposed to thiacloprid alone; when Hs578t cells were co-treated with PD98059, levels of promoter-non-specific *CYP19* transcripts were decreased to $56.0 \pm 19.2\%$ of the levels in cells exposed to thiacloprid alone, although this inhibition was not statistically significant (Fig 6-5A). Based on the promoter-specific expression of *CYP19*, thiacloprid appears to exert its effects by modulating the PLC pathway, since a co-exposure of thiacloprid and U73122 significantly decreased PII and I.3 promoter-mediated *CYP19* expression to $17.0 \pm 15.3\%$ and $33.1 \pm 17.9\%$ of what measured in Hs578t cells exposed to thiacloprid alone (Fig 6-5B-C). Furthermore, co-treatment of Hs578t cells with thiacloprid and PD98059 decreased I.7 promoter-mediated *CYP19* expression significantly to $39.0 \pm 4.1\%$ of that in Hs578t cells exposed to thiacloprid alone (Fig 6-5D), suggesting an impact of this neonicotinoid on the MEK/MAPK 1/3 signalling pathway.

We observed a similar trend for imidacloprid. In Hs578t cells co-exposed to imidacloprid and U73122, levels of promoter-non-specific *CYP19* (exon II-X) transcripts were decreased to $33.2 \pm 19.3\%$ of levels in Hs578t cells exposed to imidacloprid alone (Fig 6-5A); levels of PII and I.3-derived *CYP19* mRNA in cells co-treated with imidacloprid and U73122 were decreased to $29.7 \pm 1.8\%$ and $26.8 \pm 13.9\%$, respectively, compared to levels in cells exposed to imidacloprid alone (Fig 6-5B-C). It therefore appears that the PLC pathway, which is implicated in PII/I.3 promoter-driven *CYP19* expression, is targeted by imidacloprid. In Hs578t cells co-treated with imidacloprid and PD98059, we also observed a non-statistically significant decreased in the expression of *CYP19* coding region to $37 \pm 25\%$ of the response to imidacloprid alone (Fig 6-5A). However, the same co-treatment did not decrease I.7 promoter-mediated *CYP19* expression (Fig 6-5D), suggesting that the MEK/MAPK 1/3 signalling pathway may not be the only one implicated in the I.7 promoter-mediated expression of *CYP19* in Hs578t cells.

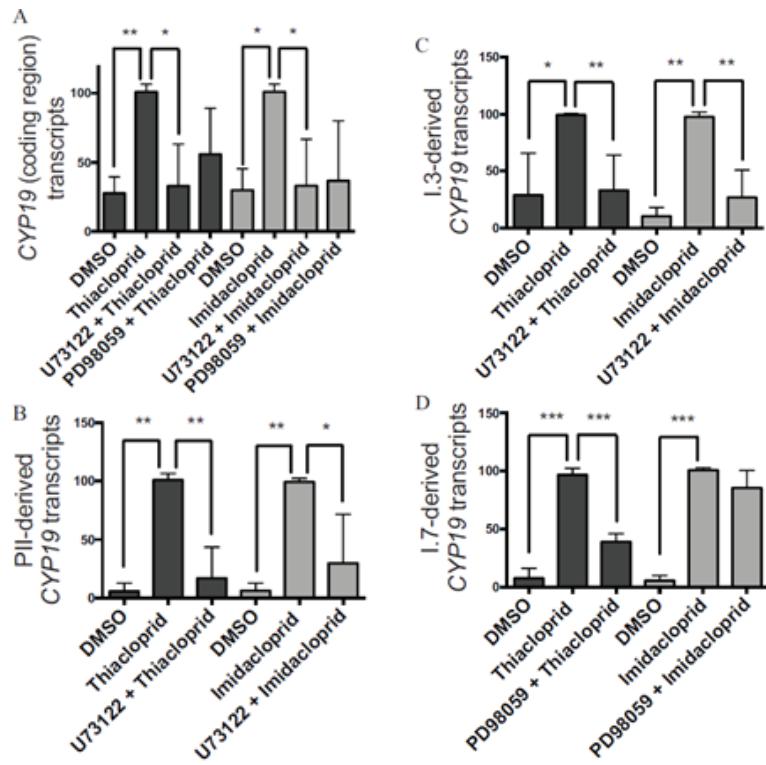


Figure 6- 5. Relative expression of (A) CYP19 coding region (non promoter-specific or total), and CYP19 transcripts derived from promoters (B) PII, (C) I.3, and (D) I.7 in Hs578t cells exposed to thiacloprid (0.1 μ M) or imidacloprid (0.1 μ M) in the presence or absence of selective inhibitors of the PLC (U73122, 2 μ M) or MEK/MAPK 1/3 (PD98059, 50 μ M) signaling pathways.

Relative transcript levels are expressed as a percentage (%) of the response of Hs578t cells exposed to 0.1 μ M thiacloprid or imidacloprid (100%). Experiments were performed in triplicate with three different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. Statistically significant difference between inhibitor pre-treatment and neonicotinoid treatment alone (Student t-test).

6.6 DISCUSSION

6.6.1 Hs578t cells as a suitable model to study the promoter-specific expression of CYP19 in hormone-dependent breast cancer

In this project, we successfully developed robust and sensitive real-time quantitative PCR methods to evaluate the expression of CYP19 by the activation of four specific promoters, namely the normally active I.4 promoter and the breast cancer-associated promoters PII, I.3 and I.7 using Hs578t cells as a representative model of the aromatase-expressing and estrogen-producing cells typically found in the hormone-dependent breast tumor environment. Epithelial cells normally do not express aromatase, but it has been previously demonstrated that triple

negative breast cancer cells (MDA-MB-231) expressed *CYP19* by the activation of the adipose I.4 promoter and breast cancer-associated proximal PII/I.3 promoters, and that aromatase was catalytically active in this cell line (Knower et al., 2010, Su et al., 2008).

In breast cancer, increased *CYP19* expression and estrogen synthesis is driven by a promoter-switch involving the activation of PII, I.3 and I.7 promoters, and inhibition of normal I.4 promoter activity (Irahara et al., 2006, Sebastian et al., 2001). We are the first to demonstrate that Hs578t cells express *CYP19* through these four breast cancer-relevant promoters, which is key to the relevance of this cell line as an *in vitro* model of the estrogen producing cells that are present in the hormone-dependent breast tumor environment. The mechanisms leading to this change in *CYP19* promoter usage are not fully understood. Breast cancer epithelial cells synthesize prostaglandin E2 (PGE₂), a potent activator of the protein kinase C (PKC) pathway, leading to production of cAMP. cAMP then activates the protein kinase A (PKA) and PKC pathways, both leading to the phosphorylation of the cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1). CREB1 then translocates to the nucleus and binds to CRE-like sequences in the PII/I.3 promoter region to stimulate their activity, which leads to increased expression of *CYP19* (Sofi et al., 2003, To et al., 2015, Zhao et al., 1996). PKA can also phosphorylate the transcription factor GATA-4, which recruits coactivators such as the CREB-binding protein (CBP). This complex then binds to the PII promoter region (Tremblay et al., 2003b). We know less about the endothelial I.7 promoter of *CYP19*. This promoter, originally characterized by Sebastian et al. (2002), may have implications in regulating the effects of estrogens on blood vessels through its main regulator, the transcription factor GATA-2. However, it has also been demonstrated that the I.7 promoter is overactive in breast cancer (Sebastian et al., 2002). As VEGF is involved in angiogenesis in breast cancer and has a role in increasing endothelial permeability (Breslin et al., 2003), we hypothesized that I.7 promoter activation is regulated by the VEGF/MEK/MAPK 1/3 signalling pathway in Hs578t cells. It is known that MEK/MAPK 1/3 is activated by the binding of VEGF to its receptors (VEGFR-1; VEGFR-2) (Breslin et al., 2003, Cross et al., 2001, Lee et al., 1998). We also know that the activation of VEGFR-2 in endothelial cells stimulates the PLC/PKC pathway (Cario et al., 2004, Cross et al., 2001, Jiang et al., 2015), thus explaining the overexpression of PII-derived *CYP19* in Hs578t cells exposed to VEGF (Fig 6-1A).

Angiogenesis is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer (Adams et al., 2000) and increased expression of VEGF and its receptors has been denoted in invasive breast carcinomas (Yoshiji et al., 1996). In our study, VEGF stimulated I.7- and PII-mediated

CYP19 expression, resulting in an increase in overall (non-promoter-specific) expression of *CYP19* (Fig 6-1A) and aromatase catalytic activity (Fig 6-1B). Using an inhibitor of the MEK/MAPK 1/3 pathway, we also demonstrated that the VEGF-mediated overexpression of I.7 promoter-derived *CYP19* was dependent on the MEK/MAPK 1/3 pathway (Fig 6-2A, D). This result confirms our hypothesis and is consistent with the literature (Breslin et al., 2003, Pai et al., 2001, Xu et al., 2008). We have also shown that forskolin stimulates PII/I.3-mediated *CYP19* expression and induces aromatase activity (Fig 6-1A-B), and that this effect is mediated through the PLC pathway (Fig 6-2A-B-C). This result is also supported by a study showing that in HEK-293 cells, forskolin induces calcium release (Schmidt et al., 2001), an important component of the PLC pathway. These results suggest that VEGF signalling pathways, and more specifically PLC and MEK/MAPK 1/3 pathways, are implicated in PII/I.3 and I.7-mediated *CYP19* expression in Hs578t breast cancer cells.

6.6.2 Neonicotinoids induce a switch in *CYP19* promoter usage in Hs578t cells

We have found that certain contaminants exert estrogenic activity by increasing *CYP19* expression and aromatase catalytic activity, which would result in increased biosynthesis of estrogens. Indeed, we have shown that the widely used triazine herbicides atrazine, simazine and propazine, and recently several neonicotinoid insecticides, induce *CYP19* expression in various *in vitro* cell systems (Caron-Beaudoin et al., 2016).

In the present study, we have found that the neonicotinoids thiacloprid and imidacloprid induce a switch in *CYP19* promoter usage in Hs578t breast cancer cells, leading to an overall increase in *CYP19* expression and catalytic activity of aromatase (Fig 6-3 and 6-4). We have also demonstrated that thiacloprid exerts its effects by increasing PII/I.3- and I.7 promoter-mediated *CYP19* expression through activation of the PLC and MEK/MAPK 1/3 pathways (Fig 6-5 and 6-6). We observed a similar promoter-specific response in Hs578t cells exposed to imidacloprid, although the MEK/MAPK 1/3 pathway did not appear to be statistically significantly affected by this neonicotinoid (Fig 6-5 and 6-6). Exposure to thiacloprid and imidacloprid resulted in an increase of predominantly PII promoter-specific *CYP19* transcripts and a more modest increase in I.3-specific transcripts. This situation is not unusual, as similar expression patterns have been observed in primary adipose stromal cells exposed to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), PGE₂ or forskolin (Heneweer et al., 2004, Zhao et al., 1996). We also

previously observed a similar response of the PII/I.3 promoters in H295R cells exposed to the neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid and thiamethoxam (Caron-Beaudoin et al., 2016).

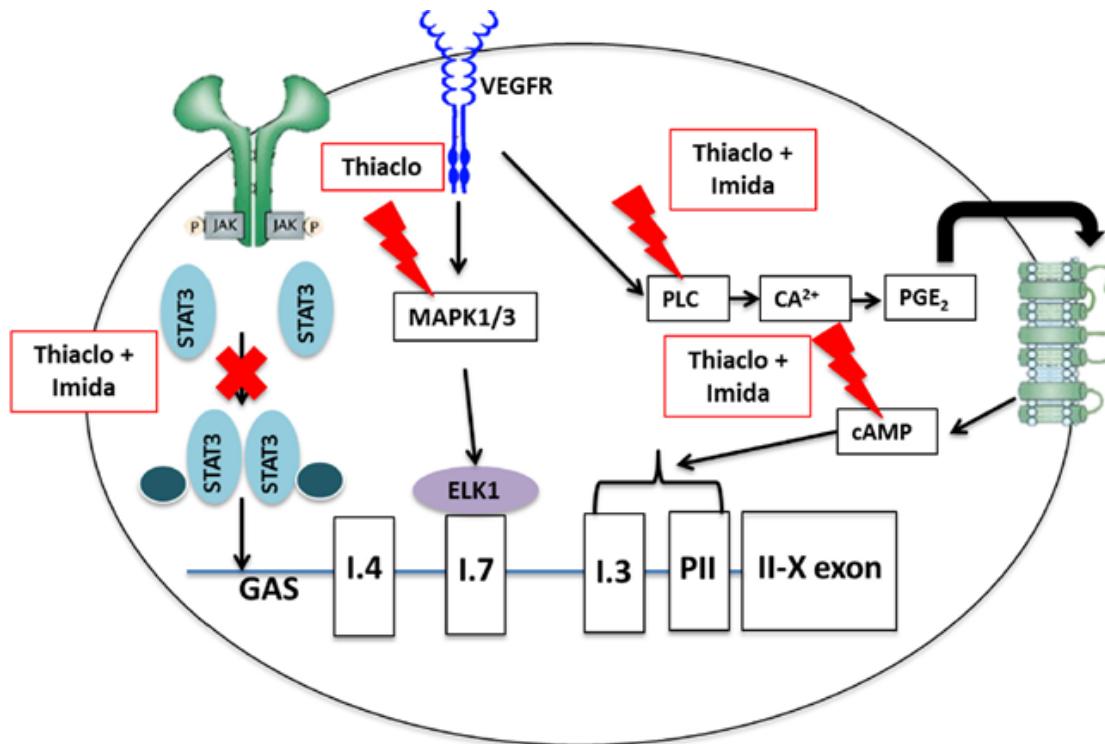


Figure 6- 6. Proposed signaling pathways implicated in the promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells.

It is proposed that thiacloprid and imidacloprid block the JAK/STAT3 pathway, which regulates I.4 promoter activity via a yet unknown mechanism. In addition, based on the effects of pathway inhibitors, the neonicotinoids are proposed to increase PII/I.3-mediated CYP19 expression in Hs578t cells via stimulation of the PLC pathway. Thiacloprid may also induce I.7-mediated CYP19 expression by stimulation of the MEK/MAPK 1/3 pathway. Ca²⁺, calcium ion; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; X, inhibition; ELK, electron transport system transcription factor; GAS, gamma interferon activation site; Imida, imidacloprid; JAK, Janus kinase; lightning bolt, activation/stimulation; MAPK, mitogen-activated protein kinases; PGE₂, prostaglandin E2; PLC, phospholipase C; STAT, signal transducer and activator of transcription protein; Thiacl, thiacloprid; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor.

6.7 LIMITATIONS AND PERSPECTIVES

Cell-cell communication during hormone-dependent breast cancer progression has been widely studied. For instance, communication between epithelial cancer cells and fibroblastic cells surrounding the tumor leads to a desmoplastic reaction. These cells highly express CYP19 and are key actors in the overproduction of estrogens in the tumor microenvironment, leading to

proliferation of cancer cells (Kalluri et al., 2006, Meng et al., 2001, Zhao et al., 1996). Therefore, using a single-cell bioassay has its limitations, since we are not able to adequately mimic the cellular interactions during breast cancer progression. However, the present study in Hs578t cells provides crucial information to a better understanding of the mechanisms underlying the expression of *CYP19* by breast cancer-relevant promoters, as well as the impacts of neonicotinoids on these processes. We are currently developing a cellular co-culture model in which Hs578t cells together with estrogen-responsive epithelial breast cancer cells will produce a more accurate model of the tumor microenvironment. This co-culture model will provide a considerably more physiologically and toxicologically relevant study tool to better understand impacts of environmental contaminants on hormone-dependent breast cancer.

6.8 CONCLUSIONS

The present study is the first to describe the promoter-specific expression of *CYP19* via the normal mammary promoter I.4 and the breast cancer relevant promoters PII, I.3 and I.7 in Hs578t cells. We have further shown that exposure of these cells to environmentally relevant concentrations of the neonicotinoid insecticides (similar to what is found in urine of farmers and women from the general population in Japan), thiacloprid and imidacloprid increases *CYP19* expression, by a decrease in the activity of the I.4 promoter and an increase in the activities of PII, I.3 and I.7 promoters. The observed promoter switch appears to involve VEGF-mediated PLC and MAPK 1/3 signalling pathways (Fig 6-6). This unique switch in promoter usage induced by thiacloprid and imidacloprid is a process usually observed in patients with progressive hormone-dependent breast cancer. However, the molecular targets of thiacloprid and imidacloprid that induce this promoter-switch remain unknown. These findings highlight the need for further research to assess the potential impacts of low-dose and chronic exposure to these insecticides on endocrine processes implicated in women's health.

6.9 REFERENCES

Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: Comparison of plasma, serum, and tissue vegf and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer research* 60:2898-2905.

- Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. 1996. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome p450 (cyp19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 81:3843-3849.
- Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yilmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, et al. 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* 30:492-499.
- Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. 2009. Low doses of bisphenol a promote human seminoma cell proliferation by activating pka and pkg via a membrane g-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 117:1053-1058.
- Breslin JW, Pappas PJ, Cerveira JJ, Hobson RW, Durán WN. 2003. Vegf increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving erk-1/2 and nitric oxide. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 284:H92-H100.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. 2003. The human cyp19 (aromatase p450) gene: Update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86:219-224.
- Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC, Zhao H. 2012. Aromatase, breast cancer and obesity: A complex interaction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23:83-89.
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK. 2004. Toll-like receptor 2 enhances zo-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase c. *Gastroenterology* 127:224-238.
- Caron-Beaudoin E, Viau R, Hudon Thibeault A-A, Vaillancourt C, Sanderson J. 2017. The use of a unique fetoplacental steroidogenesis co-culture model as a screening tool for endocrine disruptors: The effects of neonicotinoids on aromatase activity and hormone production. *Toxicology and Applied Pharmacology* 332:15-24.
- Caron-Beaudoin É, Denison MS, Sanderson JT. 2016. Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (cyp19) in human adrenocortical carcinoma (h295r) and primary umbilical vein endothelial (huvec) cells. *Toxicological Sciences* 149:134-144.
- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. 2010. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease* 32:35-48.

- Chen D, Reierstad S, Lin Z, Lu M, Brooks C, Li N, et al. 2007. Prostaglandin e2 induces breast cancer-related aromatase promoters via activation of p38 and c-jun nh2-terminal kinase in adipose fibroblasts. *Cancer Research* 67:8914-8922.
- Chen M, Tao L, McLean J, Lu C. 2014. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: Implication for dietary exposures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:6082-6090.
- Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. 2007. Ddt and breast cancer in young women: New data on the significance of age at exposure. *Environmental health perspectives* 115:1406.
- Cross MJ, Claesson-Welsh L. 2001. Fgf and vegf function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* 22:201-207.
- Demura M, Reierstad S, Innes JE, Bulun SE. 2008. Novel promoter i.8 and promoter usage in the cyp19 (aromatase) gene. *Reproductive Sciences* 15:1044-1053.
- Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, et al. 2007. Atrazine-induced aromatase expression is sf-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect* 115:720-727.
- Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, Expósito J, et al. 2004. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes & Control* 15:591-600.
- Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. 2009. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457:219-223.
- Goulson D. 2013. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50:977-987.
- Harada N, Utsumi T, Takagi Y. 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome p-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11312-11316.
- Heneweer M, van den Berg M, Sanderson J. 2004. A comparison of human h295r and rat r2c cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicology Letters* 146:183-194.
- Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, et al. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336:348-350.

Hoshi N, Hirano T, Omotehara T, Tokumoto J, Umemura Y, Mantani Y, et al. 2014. Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37:1439-1443.

Irahara N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. 2006. Quantitative analysis of aromatase mRNA expression derived from various promoters (i.4, i.3, pii and i.7) and its association with expression of tnf- α , il-6 and cox-2 mRNAs in human breast cancer. *International Journal of Cancer* 118:1915-1921.

Jiang M, Qin C, Han M. 2015. Primary breast cancer induces pulmonary vascular hyperpermeability and promotes metastasis via the vegf-pkc pathway. *Molecular carcinogenesis*.

Kalluri R, Zeisberg M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392-401.

Kapoor U, Srivastava MK, Srivastava LP. 2011. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology* 49:3086-3089.

Knower KC, To SQ, Simpson ER, Clyne CD. 2010. Epigenetic mechanisms regulating cyp19 transcription in human breast adipose fibroblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 321:123-130.

Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang H-J, Bauerfeind I, Epstein M, et al. 2004. Association between her-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 10:1706-1716.

Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulsom R. 1998. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *The Journal of Pathology* 185:394-401.

Main AR, Headley JV, Peru KM, Michel NL, Cessna AJ, Morrissey CA. 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. *PLoS ONE* 9:e92821.

Mathur V, Bhatnagar P, Sharma RG, Acharya V, Sexana R. 2002. Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from jaipur. *Environment international* 28:331-336.

Meng L, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM, Bulun SE. 2001. Tumor necrosis factor α and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by

selectively down-regulating ccaat/enhancer binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ : Mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Research* 61:2250-2255.

Nomura H, Ueyama J, Kondo T, Saito I, Murata K, Iwata T, et al. 2013. Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using gc-ms. *Journal of Chromatography B* 941:109-115.

Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H, Tarnawski AS. 2001. Pge2 stimulates vegf expression in endothelial cells via erk2/jnk1 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286:923-928.

Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit* 15:RA137-145.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol a affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma lh levels. *Environ Health Perspect* 109:675-680.

Sanderson J, Seinen W, Giesy JP, van den Berg M. 2000. 2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (cyp19) activity in h295r human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity? *Toxicological Sciences* 54:121-127.

Sanderson J, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, van den Berg M. 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ Health Perspect* 109:1027-1031.

Sanderson J, Boerma J, Lansbergen GWA, van den Berg M. 2002. Induction and inhibition of aromatase (cyp19) activity by various classes of pesticides in h295r human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182:44-54.

Schaafsma A, Limay-Rios V, Baute T, Smith J, Xue Y. 2015. Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern ontario. *PLOS ONE* 10:e0118139.

Schmidt M, Evellin S, Weernink PAO, vom Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, et al. 2001. A new phospholipase-c-calcium signalling pathway mediated by cyclic amp and a rap gtpase. *Nature cell biology* 3:1020.

Schneider BP, Sledge GW. 2007. Drug insight: Vegf as a therapeutic target for breast cancer. *Nature clinical practice Oncology* 4:181-189.

Sebastian S, Bulun SE. 2001. A highly complex organization of the regulatory region of the human cyp19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:4600-4602.

Sebastian S, Takayama K, Shozu M, Bulun SE. 2002. Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human cyp19 (aromatase p450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. *Mol Endocrinol* 16:2243-2254.

Sekeroglu V, Sekeroglu ZA, Demirhan E. 2014. Effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on thyroid hormone levels in rat serum. *Toxicol Ind Health* 30:40-46.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 66:7-30.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. 1994. Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342-355.

Sofi M, Young MJ, Papamakarios T, Simpson ER, Clyne CD. 2003. Role of cre-binding protein (creb) in aromatase expression in breast adipose. *Breast cancer research and treatment* 79:399-407.

Starner K, Goh KS. 2012. Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88:316-321.

Stokstad E. 2013. Pesticides under fire for risks to pollinators. *Science* 340:674-676.

Su B, Diaz-Cruz ES, Landini S, Brueggemeier RW. 2008. Suppression of aromatase in human breast cells by a cyclooxygenase-2 inhibitor and its analog involves multiple mechanisms independent of cyclooxygenase-2 inhibition. *Steroids* 73:104-111.

Subbaramaiah K, Morris PG, Zhou XK, Morrow M, Du B, Giri D, et al. 2012. Increased levels of Cox-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. *Cancer Discovery* 2:356-365.

Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. 2010. A practical approach to rt-qPCR—publishing data that conform to the miQE guidelines. *Methods* 50:S1-S5.

To SQ, Knower KC, Cheung V, Simpson ER, Clyne CD. 2015. Transcriptional control of local estrogen formation by aromatase in the breast. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 145:179-186.

Tremblay JJ, Viger RS. 2003. Transcription factor gata-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the camp/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells. *Journal of Biological Chemistry* 278:22128-22135.

Ueyama J, Harada KH, Koizumi A, Sugiura Y, Kondo T, Saito I, et al. 2015. Temporal levels of urinary neonicotinoid and dialkylphosphate concentrations in japanese women between 1994 and 2011. *Environmental science & technology* 49:14522-14528.

Wang Y, Ye L, Leung LK. 2008. A positive feedback pathway of estrogen biosynthesis in breast cancer cells is contained by resveratrol. *Toxicology* 248:130-135.

Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, et al. 2008. Mapk/erk signalling mediates vegf-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *Journal of cellular and molecular medicine* 12:2395-2406.

Xu X, Dailey AB, Talbott EO, Ilacqua VA, Kearney G, Asal NR. 2010. Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in u.S. Adults. *Environ Health Perspect* 118:60-66.

Yamaguchi Y, Hayashi S. 2009. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocr J* 56:1-7.

Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. 1996. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Research* 56:2013-2016.

Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. 1996. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by pge2 via cyclic amp, leading to activation of promoter ii of the cyp19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 137:5739-5742.

Zhou D, Zhou C, Chen S. 1997. Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61:273-280.

Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, et al. 2005. Interactions between prostaglandin e2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Research* 65:657-663.