

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

**EFFETS ANTIANDROGÉNIQUES DE PESTICIDES DANS LES
CELLULES CANCÉREUSES CORTICOSURRÉNALES HUMAINES
(H295R) ET DE LA PROSTATE HUMAINES (LNCaP)**

Par
Christina N.Robitaille

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

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Isabelle Plante
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Jonathan Verreault
UQAM

Directeur de recherche

J. Thomas Sanderson
Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Faire une Maîtrise en recherche, c'est s'investir à 100 % pour la science. J'ai consacré la majorité de mon temps à mon projet de recherche, qui me tient particulièrement à cœur et ce malgré les nombreux moments difficiles de ces trois années.

Je tiens tout d'abord remercier mon directeur de Maîtrise, Thomas Sanderson. Il a su me faire confiance dès mon arrivée dans son labo. D'ailleurs, au moment de mon stage de fin de baccalauréat, je n'avais même pas à l'idée de faire une Maîtrise. C'est Thomas qui m'a proposé de rester et j'ai tellement adoré mon stage, que j'ai décidé de poursuivre à la Maîtrise. Je veux également remercier Cathy Vaillancourt, qui a aussi toujours été là pour moi. Je me suis sentie aussi bien dans son labo que dans celui de Thomas.

Un énorme merci à ma maître de stage, Patricia Rivest, qui a su me guider et me mettre en confiance, dès mes premiers jours au laboratoire. Je tiens aussi à remercier tous les autres membres du laboratoires, qui ne sont pas que des collègues de travail, mais qui sont devenus des ami(e)s. Je tiens à remercier particulièrement Joey St-Pierre, un ami précieux, qui m'a d'ailleurs suggéré l'IAF. Il a toujours été là pour m'écouter et pour m'aider à résoudre des problèmes de labo. Parce qu'on le sait, le travail de labo fonctionne rarement du premier coup! Je tiens à remercier tous les autres étudiants des deux laboratoires : Ahmed Soliman, Alexander Goldberg, Andrée-Anne Hudon-Thibeault, Élyse Caron-Beaudoin, Hélène Clabault, Hossam Draz, Kathy Deroy, Laetitia Laurent, Lucas Fagundes, Marc Fraser, ainsi que tous les anciens étudiants. Même si on ne travaillait pas sur les mêmes projets, nous avons su travailler en équipe et avoir beaucoup de plaisir. Un énorme merci à mon amoureux, Samuel Beauchamp, qui tout au long de mon parcours académique m'a encouragé et soutenu. Merci aussi à mes amies Annie et Jennifer, qui m'ont soutenu tout au long et qui seront toujours là pour moi.

J'aurais aimé que mes parents soient là pour voir l'aboutissement de mes efforts, mais je sais qu'ils sont fiers de moi. Ils m'ont toujours encouragés dans mes projets et je leur aie apporté une grande fierté, j'en suis certaine. Je vous aime très fort.

« Le temps n'est qu'un lieu, mais le lieu n'a pas de temps. » Mario Robitaille

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ	11
INTRODUCTION	14
REVUE DE LITTÉRATURE	15
1 LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	16
1.1 Mécanismes d'action des PE.....	16
2 LA STÉROÏDOGÉNÈSE	18
2.1 Le cortex surrénalien	19
2.2 L'enzyme 5 α -réductase.....	20
2.3 Les androgènes.....	21
2.4 Régulation.....	22
2.5 L'enzyme CYP17	24
2.5.1 Régulation et expression du CYP17	24
2.5.2 Rôle du CYP17 dans le cancer.....	25
3 Le RÉCEPTEUR AUX ANDROGÈNES	27
3.1 Expression et régulation du AR	27
3.2 Rôle du AR dans le cancer.....	29
3.3 Modifications post-traductionnelles du AR.....	29
4 LA PROSTATE	32
4.1 L'antigène spécifique de la prostate	33
4.2 Le cancer de la prostate	34
4.2.1 Facteurs.....	35

4.2.2	Traitements	35
5	LES PESTICIDES.....	38
5.1	Atrazine	39
5.1.1	Propriétés antiandrogéniques.....	40
5.1.2	Propriétés oestrogéniques.....	40
5.2	Bénomyl	41
5.2.1	Propriétés oestrogéniques.....	41
5.2.2	Propriétés antiandrogéniques.....	41
5.2.3	Propriétés cancérogènes	42
5.3	Prochloraz	42
5.3.1	Propriétés antiandrogéniques.....	42
5.4	Vinclozoline	43
5.4.1	Propriétés antiandrogéniques.....	44
5.4.2	Propriétés oestrogéniques.....	45
6	LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX.....	46
6.1	Lignée cellulaire LNCaP	46
6.2	Lignée cellulaire H295R.....	47
6.3	Modèles animaux.....	48
7	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	49
8	Article : ANTIANDROGENIC MECANISMS OF PESTICIDES IN HUMAN LNCaP PROSTATE AND H295R ADRENOCORTICAL CARCINOMA CELLS	51
8.1	Résumé de l'article	52
8.2	Contribution de l'étudiante à l'article	53
9	DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....	69
9.1	PROBLÉMATIQUES RENCONTRÉES	71
9.2	PERSPECTIVES	72
Dégradation du AR	72	
Ubiquitination du AR.....	73	
X-CELLigence	73	
Expérimentations <i>in vivo</i>	74	
10	BIBLIOGRAPHIE	75

**ANNEXE : EFFETS DE NÉONICOTINOÏDES SUR LE CYP17 DANS LES H295R ET AR DANS
LES LNCAP 93**

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2-1: VOIES DE LA STÉROÏDOGÉNÈSE À PARTIR DU CHOLESTÉROL.....	19
FIGURE 3-1: DOMAINES GENIQUES (EN HAUT) ET PROTEIQUES (EN BAS) DU AR. LE GENE CONSISTE EN HUIT EXONS ET LA PROTEINE EN QUATRE DOMAINES: NTD, LBD, UNE REGION CHARNIERE ET DBD	27
FIGURE 3-2: TRANSLOCATION DU AR DANS LE NOYAU (T=TESTOSTÉRON, DHT=DIHYDROTESTOSTÉRON, P=PHOSPHATE)	28
FIGURE 8-1: PROLIFERATION OF LNCAP CELLS EXPOSED TO ATRAZINE, BENOMYL, VINCLOZOLIN OR PROCHLORAZ IN ABSENCE (A) OR PRESENCE (B) OF 0.1 nM DHT.....	59
FIGURE 8-2: PSA SECRETION BY LNCAP CELLS EXPOSED FOR 24H TO ATRAZINE, BENOMYL, VINCLOZOLIN OR PROCHLORAZ IN ABSENCE (TOP) OR PRESENCE (BOTTOM) OF 0.3 nM DHT.....	60
FIGURE 8-3: NUCLEAR ACCUMULATION OF AR IN LNCAP CELLS EXPOSED FOR 24H TO ATRAZINE, BENOMYL OR VINCLOZOLIN IN ABSENCE OR PRESENCE OF 10 nM DHT.	61
FIGURE 8-4: LEVELS OF AR PHOSPHORYLATED AT POSITIONS SER81 OR SER213 IN LNCAP EXPOSED FOR 1H TO PESTICIDES IN THE PRESENCE OF 10 nM DHT.	62
FIGURE 8-5: VIABILITY OF H295R CELLS EXPOSED FOR 24H TO ATRAZINE, BENOMYL, VINCLOZOLIN OR PROCHLORAZ EXPRESSED AS A PERCENTAGE OF DMSO CONTROL.	63
FIGURE 8-6 : RELATIVE CYP17 GENE (A) AND PROTEIN (B) EXPRESSION IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24H TO ATRAZINE, BENOMYL, VINCLOZOLIN OR PROCHLORAZ.....	63
FIGURE 8-7: RELATIVE <i>SRD5A1</i> EXPRESSION IN H295R AND LNCAP CELLS DETERMINED BY RT-QPCR.	64
FIGURE 8-8 : AR PROTEIN EXPRESSION LEVELS IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24 H TO DMSO (0.1%), DHT (10 nM) OR 1 OR 10 μM VINCLOZOLIN IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF DHT.....	65
FIGURE A-10-1: VIABILITÉ CELLULAIRE DES H295R EXPOSÉES 24H AUX NÉONICOTINOÏDES, PUIS 2H AU WST-1	95
FIGURE A-10-2: ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DU CYP17 DANS LES CELLULES H295R EXPOSÉES 24H AUX NÉONICOTINOÏDES, PUIS 90M AU TRILOSTANE 5μM ET À LA PREGNENOLONE 100nM	95
FIGURE A-10-3: SÉCRÉTION DE PSA PAR LES CELLULES LNCAP EXPOSÉES 24H AUX NÉONICOTINOÏDES EN PRÉSENCE DE DHT 10nM.....	95
FIGURE A-10-4: EXPRESSION DU AR DANS LES CELLULES LNCAP EXPOSÉES 24H AUX NÉONICOTINOÏDES.....	96

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABP.....	Androgen-Binding Protein
ACTH.....	Adrénocorticotrophine
ADNc.....	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMPc.....	Adénosine Monophosphate cyclique
AR.....	Récepteur aux androgènes
ER.....	Récepteur aux oestrogènes
BPH.....	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
BSA.....	Albumine Sérique Bovine
CYP.....	Cytochrome P450
DHEA.....	Déhydroépiandrostérone
DHT.....	Dihydrotestostérone
DMSO.....	Diméthyle Sulfoxide
D.O.	Densité optique
FBS.....	Sérum Bovin Fœtal
FSH.....	Hormone Folliculostimulante
GAPDH.....	Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase
GnRH.....	Hormone de libération de la gonadotrophine
PAPh.....	Phosphatase Acide de la Prostate humaine
HRP.....	Horseradish Peroxydase
HSP.....	Protéines de choc thermique (<i>heat shock proteins</i>)
LH.....	Hormone Lutéinisante

LOAEL.....Dose minimale avec effet observe (*Lowest Observed Adverse Effect Level*)

M1Acide buténoïque

M2.....Énanilide

NADPH.....Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

PSA.....Antigène Spécifique de la Prostate

P450scc.....Cytochrome P450 side-chain clivage

RTqPCR.....Reverse Transcription real-time Polymerase Chain Reaction

ROS.....Espèces réactives de l'oxygène

SDS.....Laurylsulfate de Sodium

SEM.....Erreur moyenne standard

SF-1.....Facteur stéroïdogénique

SHBG.....*Sex-Hormone-Binding-Globulin*

SRD5A.....Stéroïde 5 alpha-réductase

StAR.....Steroidogenesis Activator Protein

TBS.....Tampon Tris-salin

TGFβ.....Facteur de croissance de transformation

RÉSUMÉ

Plusieurs pesticides peuvent agir en tant que perturbateurs endocriniens. Ceux-ci peuvent être associés à des troubles de développement ou de la fonction reproductrice, mais aussi au développement de maladies hormono-dépendantes, comme le cancer du sein ou de la prostate. L'apparition de ce type de cancer peut certainement être influencée par l'exposition à des contaminants environnementaux. Il est connu que le développement du cancer de la prostate est entre autres lié à l'expression et l'activité du récepteur aux androgènes (AR). Outre, certains pesticides sont connus ou suspectés de posséder des propriétés antiandrogéniques. Ces composés pourraient donc agir par leur action sur le AR ou encore sur les enzymes de la stéroïdogénèse, qui sont essentielles à la formation d'androgènes. Par contre, un effet antiandrogénique, à certaines périodes du développement, pourrait perturber la masculinisation des jeunes mâles. Les effets de pesticides comme l'atrazine, le bénomyl, le prochloraz et la vinclozoline sont connus comme PE, mais leurs mécanismes d'action ne sont pas encore clairs.

Nos principaux objectifs étaient de déterminer les mécanismes éventuels pro- ou antiandrogéniques des pesticides, par l'étude de leurs effets au niveau du AR et de l'enzyme stéroïdienne du cytochrome P450_17A1 (CYP17). Ces deux mécanismes sont particulièrement intéressants, car les composés induisant des effets antiandrogéniques pourraient servir au développement de nouveaux traitements pour traiter les maladies androgéno-dépendantes. Par exemple, dans le cancer de la prostate ces composés permettraient de diminuer les taux d'androgènes, qui induisent la prolifération de cette pathologie. Afin de déterminer les effets des pesticides *in vitro*, nous avons utilisé deux lignées cellulaires distinctes. Pour déterminer leur effet pro- ou antiandrogénique au niveau du AR, nous avons utilisé la lignée humaine de cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP), dont la croissance cellulaire est dépendante des androgènes. En ce qui concerne les expériences menées sur les effets des pesticides sur l'expression et l'activité du CYP17, nous avons utilisé la lignée humaine de cellules cancéreuses corticosurrénales (H295R), qui exprime bien cette enzyme. Les cellules H295R sont d'ailleurs largement utilisées comme modèle de la stéroïdogénèse. Nous avons pour objectif général de déterminer les effets de différents pesticides sur ces facteurs impliqués dans le fonctionnement des androgènes.

Notre premier objectif était de déterminer les effets des pesticides sur le AR. Pour ce faire, nous avons d'abord déterminé si les pesticides peuvent influencer la viabilité cellulaire androgéno-dépendante des cellules LNCaP. Les résultats ont démontré que le bénomyl (30 μM), le prochloraz (10 et 30 μM) et la vinclozoline (10 et 30 μM) diminuent la viabilité des LNCaP dans un milieu dépourvu de stéroïdes et supplémenté avec de la dihydrotestostérone (DHT). Nous n'avons pas observé d'effet sur la viabilité des LNCaP exposées à l'atrazine. Afin d'atteindre notre premier objectif, nous devons aussi déterminer l'effet des pesticides sur la synthèse de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Nous n'avons pas observé d'effet pro- ou antiandrogénique pour l'herbicide atrazine. Nous avons démontré que tous les autres pesticides peuvent diminuer la sécrétion de PSA, à l'exception du thiaclopride qui augmente plutôt sa sécrétion. En présence de DHT (0,3 nM), le bénomyl (1, 3, 10 et 30 μM), le prochloraz (1, 3, 10 et 30 μM) et la vinclozoline (1, 3, 10 et 30 μM) diminuent le taux de PSA sécrété par les LNCaP. Ensuite, nous avons déterminé l'effet des pesticides sur l'expression du AR dans les LNCaP, plus précisément sur sa localisation et sur l'expression de certaines formes actives phosphorylées. Les pesticides bénomyl (10 μM) et vinclozoline (1 et 10 μM) diminuent la translocation nucléaire du AR, qui est induite par la DHT (10 nM). Le bénomyl (30 μM), le prochloraz (10 et 30 μM) et la vinclozoline (30 μM) ont démontré des propriétés antiandrogéniques, en diminuant significativement la phosphorylation du AR sur les positions de sérines 81 et 210-213. Nous avons aussi évalué l'effet de la vinclozoline sur le AR présent dans les cellules H295R. Dans cette lignée cellulaire, la DHT n'induit pas l'expression du AR et la vinclozoline n'a pas d'effet. Notre deuxième objectif était de déterminer l'effet des pesticides sur l'enzyme CYP17, dans les cellules stéroïdogéniques H295R. Nous avons d'abord évalué les concentrations de pesticides étant cytotoxiques pour ce type cellulaire. Les résultats ont démontrés que la vinclozoline diminue la viabilité des cellules H295R à 100 μM , alors que le prochloraz la diminue à partir de 10 μM . Nous avons pu confirmer que le bénomyl (30 μM) et le prochloraz (10 μM) diminuent à la fois l'expression génique et protéique du CYP17. Par contre, l'effet du prochloraz est plutôt une conséquence de sa cytotoxicité, à partir d'une concentration de 10 μM . Le bénomyl agit donc davantage en tant qu'inhibiteur du CYP17. De plus, le bénomyl (30 μM) et le prochloraz (1 et 10 μM) inhibent l'activité enzymatique du CYP17. Nous avons aussi évalué l'effet de la vinclozoline sur l'enzyme 5α -réductase dans les deux lignées cellulaires. Les résultats obtenus ont démontré que dans les deux types cellulaires, la DHT peut

induire l'expression génique de la 5 α -réductase, à 10 nM dans les H295R et à partir de 0,1 nM dans les LNCaP. La vinclozoline diminue cette induction d'expression par la DHT, uniquement dans les cellules LNCaP à 10 μ M.

Ces résultats permettent de conclure que certains des pesticides étudiés possèdent des propriétés antiandrogéniques. Leurs structures pourraient entre autres être utiles dans le développement de nouvelles molécules pour traiter le cancer de la prostate hormono-dépendant. En effet, des inhibiteurs de CYP17 ou d'autres types de composés antiandrogéniques peuvent être utilisés cliniquement pour traiter les patients. De nouveaux traitements moins toxiques seraient avantageux, surtout si ceux-ci possèdent des actions antiandrogéniques à plusieurs niveaux. Par contre, des composés ayant des propriétés antiandrogéniques pourraient induire des effets perturbant le développement fœtal, une démasculinisation ou encore des troubles hormonaux lors de la puberté.

Signature de l'étudiante

Signature du directeur

INTRODUCTION

Ce mémoire est présenté sous forme de mémoire par article. Cet article, publié dans *Toxicological Sciences*, traite des effets des pesticides atrazine, bénomyl, prochloraz et vinclozoline sur le AR et le PSA sécrété par les cellules cancéreuses de la prostate humaines LNCaP, ainsi que sur l'enzyme stéroïdogénique CYP17 et la 5 α -réductase dans les cellules cancéreuses corticosurrénales humaines. Une annexe, portant sur les effets de néonicotinoïdes (imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxam) sur les mêmes aspects que ceux abordés dans l'article, complète ce mémoire. L'annexe contient aussi les résultats préliminaires portant sur l'ubiquitination du AR.

REVUE DE LITTÉRATURE

1 LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont définis comme étant des composés exogènes pouvant altérer les hormones naturelles, en intervenant sur leur synthèse, leur sécrétion, leur liaison, leur action ou leur élimination (R. J. Kavlock, 2001). Les PE peuvent aussi induire des effets transgénérationnels. Les hormones étant essentielles pour le maintien de l'homéostasie, le développement et la reproduction, leur bouleversement peut avoir divers impacts. Il faut cependant savoir que la plupart des PE sont moins efficaces que les hormones endogènes. Nous sommes exposés au quotidien à une multitude de ces composés. En effet, ces perturbateurs sont retrouvés dans les cours d'eau, le sol, les aliments et les produits d'hygiène. Ces perturbateurs du système endocrinien peuvent entraîner plusieurs effets sur la faune, pouvant même être très sévères. Chez l'homme, il est estimé que l'exposition aux PE est une des premières causes d'infertilité masculine (Kashir & al., 2010). Les PE liés à une baisse de fertilité sont d'ailleurs principalement des pesticides. Ces-derniers sont aussi responsables d'un risque associé au développement de cancers hormono-dépendants, tels que le cancer de la prostate (Sankpal et al., 2012). Dans notre environnement, il est cependant rare que l'on soit exposé à un seul perturbateur à la fois. Plusieurs études sont donc faites sur l'exposition à des mélanges de pesticides. Par exemple, une étude menée *in vitro* sur un mélange de cinq pesticides a démontré des effets antiandrogéniques sur le AR synergiques, plutôt que des effets additifs (L. S. Kjeldsen, M. Ghisari, & Bonefeld-Jørgensen, 2013). Dans le cadre de recherches sur le développement de traitements contre le cancer de la prostate androgéno-dépendant, ce sont donc des composés avec des effets antiandrogéniques qui sont recherchés. Le moment et la durée de l'exposition influencent bien sûr les effets induits par les PE. De plus, les individus en cours de développement sont davantage vulnérables à ces effets. Certains PE sont connus ou suspectés pour induire des effets antiandrogéniques et l'humain y est exposé par diverses voies.

1.1 Mécanismes d'action des PE

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir par divers mécanismes et ce, par différentes voies de signalisation cellulaires. Ils peuvent intervenir en se liant avec des récepteurs stéroïdiens, perturber le métabolisme d'enzymes stéroïdiennes ou encore altérer directement l'axe

hypotalamo-pituitaire. Les PE peuvent entre autres compétitionner avec les hormones naturelles, par exemple en bloquant ou en s'insérant dans le site de liaison et mimer l'effet des hormones. Ils peuvent par exemple mimer une hormone et ainsi induire des effets pouvant être agonistes ou antagonistes aux récepteurs hormonaux. Ils peuvent alors initier une réponse normale, comme si le récepteur était lié à son ligand naturel, ou encore ils peuvent s'y lier mais sans induire de réponse (Stoker & Kavlock, 2010). Étant impliqué dans la fonction normale et cancéreuse de la prostate, le AR est une des cibles cellulaires importantes. Les PE peuvent aussi perturber l'homéostasie par d'autres mécanismes d'action, tels que la liaison aux protéines de transport, empêchant ainsi les hormones naturelles de ce rendre aux cellules cibles. Un autre mécanisme d'action important des PE est certainement leur interaction avec les différentes enzymes stéroïdiennes. Ils peuvent alors perturber leur expression ou encore leur activité. Le CYP17, qui est une enzyme primordiale à la synthèse de tous les androgènes, est une enzyme clé dans l'étude des maladies androgéno-dépendantes. D'autres composés peuvent, par exemple, inhiber la transcription du gène de la 5 α -réductase ou encore réduire son activité enzymatique. Ils induisent alors une diminution de la conversion de testostérone en DHT. Cette enzyme, étant primordiale dans le processus et le maintien de la virilisation, est donc aussi une cible importante dans la recherche de composés antiandrogéniques. Certains PE peuvent aussi agir directement sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les effets des perturbateurs du système endocrinien peuvent bien sûr être observés sur le développement sexuel, et peuvent être dus à une inhibition de l'activité du AR chez le mâle (Clement, Savenkova, Settles, Anway, & Skinner, 2010). De façon plus générale, les perturbateurs endocriniens agissent au niveau des voies de signalisation, par divers mécanismes d'action en agissant principalement sur les enzymes et les récepteurs sexuels. Les composés ayant des propriétés antiandrogéniques peuvent donc induire des effets néfastes lors du développement et chez des individus sains. Par contre, ces PE pourraient s'avérer intéressants pour les patients atteints de cancer de la prostate hormono-dépendant. Avec leurs propriétés antiandrogéniques sur le AR et les enzymes stéroïdiennes, ceux-ci pourraient permettre une diminution des taux hormonaux. Ces composés pourraient servir à la synthèse de nouvelles molécules pour le traitement du cancer de la prostate, tout comme le Casodex, qui est un médicament antiandrogénique encore utilisé cliniquement.

2 LA STÉROÏDOGÉNÈSE

Le cholestérol est le précurseur dans la biosynthèse de tous les stéroïdes, que ce soit les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes ou les stéroïdes sexuels progestagènes, androgènes et oestrogènes (fig 2-1). Le cholestérol est aussi un composant essentiel des membranes cellulaires et est essentiel à la signalisation intercellulaire. Les minéralocorticoïdes jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie ionique des fluides, alors que les glucocorticoïdes sont essentiels dans le maintien de la glycémie et la réponse au stress. D'ailleurs, l'enzyme CYP21 qui est responsable de leur formation est uniquement présente dans le cortex des surrénales (Sasano, White, New, & Sasano, 1988). Chez l'humain, le glucocorticoïde majoritairement formé est le cortisol, tandis que le minéralocorticoïde majoritaire est l'aldostérone, et la production de ce dernier est stimulée par le système rénine-angiotensine.

Le cholestérol est principalement sous forme estérifiée, ce qui le rend hydrophobe. Ce composant majeur des membranes cellulaires, provient à la fois de l'alimentation et de sa synthèse *de novo* à partir d'acétyl Co-A. Transporté dans le sang par les lipoprotéines, le cholestérol peut ensuite pénétrer les cellules. Une fois dans la cellule, c'est à l'aide d'un transporteur, la protéine activatrice de la stéroïdogénèse (StAR), que le cholestérol peut ensuite entrer dans la mitochondrie (Ohlsson, Ullerås, & Oskarsson, 2009). Cette action est d'ailleurs une étape limitante aux voies de la stéroïdogénèse (W.L. Miller, 2002). Par la suite, le cholestérol peut être clivé en pregnénolone, qui est biologiquement inactive, par l'enzyme du cytochrome p450 side-chain clivage (p450_{scc} ou CYP11A), situé dans la mitochondrie (W.L. Miller, 2002). Ces étapes limitantes catalytiques nécessitent une réductase ferredoxine acceptant les électrons de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), puis qui les transfère au cytochrome (Walter L. Miller, Auchus, & Geller, 1997). Différents enzymes du cytochrome P450 (CYPs), des hydroxystéroïdes déshydrogénases et des stéroïdes réductases, sont alors impliqués dans la biotransformation des différents précurseurs hormonaux en gonadocorticoïdes. Tous ces stéroïdes sont sous le contrôle d'hormones polypeptidiques sécrétées par l'hypophyse, telles que l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). En effet, ces deux hormones gonadotropes stimulent la sécrétion de testostérone, ainsi que la spermatogénèse chez l'homme. Les progestagènes formés de 21 atomes de carbones, tels que la progestérone, peuvent ensuite être convertis par des enzymes de type lyase en androgènes de 19 carbones. Leur

formation a lieu dans le cortex surrénalien, les testicules et aussi l’ovaire chez la femme. Ensuite, ces androgènes peuvent être biotransformés en oestrogènes de 18 carbones par l’enzyme aromatase ou CYP19. Cette enzyme, dont la réaction catalytique est limitée, est localisée dans le follicule ovarien et le placenta chez la femme, et au niveau des cellules de Leydig chez l’homme (Inkster & Brodie, 1989). Plus récemment, leurs études ont confirmé la présence de petite quantité de l’aromatase dans le stroma de la prostate.

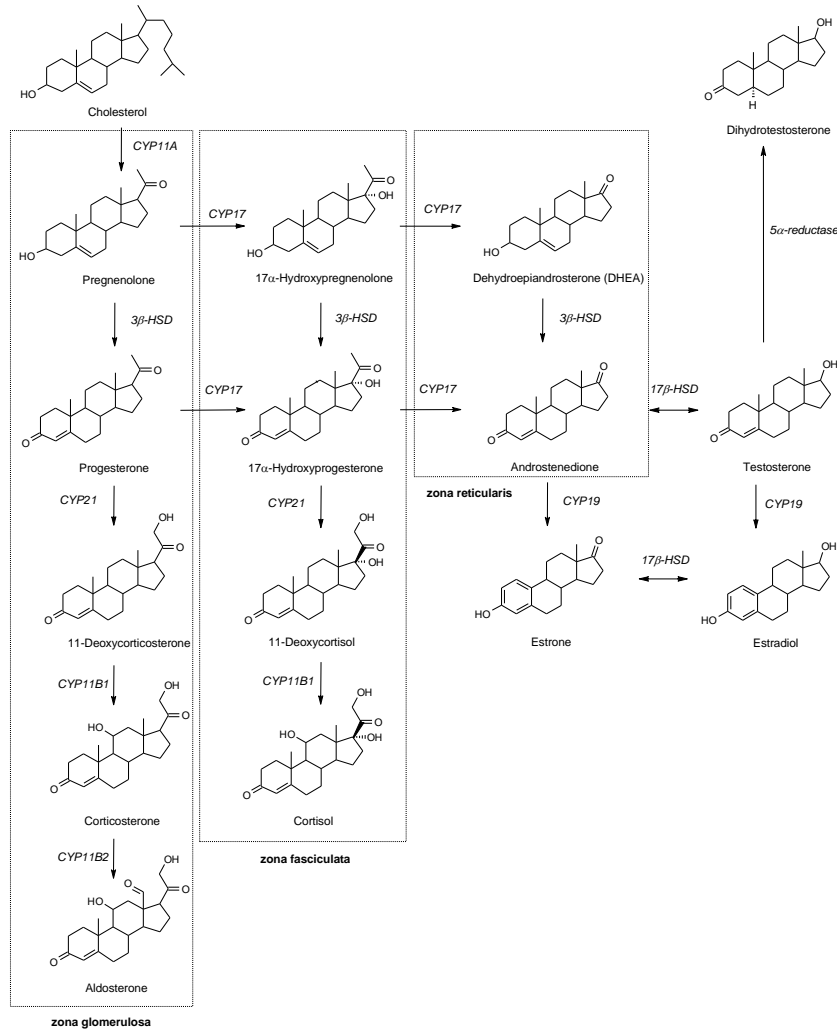


Figure 2-1: Voies de la stéroïdogénèse à partir du cholestérol

2.1 Le cortex surrénalien

Les glandes surrénales sont des glandes endocriniennes, c’est-à-dire qu’elles relâchent les hormones qu’elles produisent directement dans le liquide interstitiel et que ces dernières

diffusent ensuite vers le sang. Le cortex de la glande surrénale est essentiel à la survie et il est formé de trois zones : la zona glomerulosa, la zona fasciculata et la zona reticulata. C'est cette dernière qui est le lieu de la synthèse des androgènes dans la surrénale. C'est dans la zone glomérulée que se produit la synthèse et la sécrétion des minéralocorticoïdes, tandis que la zone fasciculée est responsable de la formation des glucocorticoïdes. La glande surrénale ne possède pas de capacité de stockage, les hormones produites sont donc libérées au fur et à mesure. Bien que les cellules de Leydig soient majoritairement responsables de la production de testostérone, la glande surrénale exprime aussi l'enzyme 17 β -HSD. Elle possède donc la capacité de produire de la testostérone, mais en plus faible importance que les testicules. Le cortex surrénalien est responsable de seulement environ dix pourcent de la production chez l'homme, alors que chez la femme, la production de testostérone a lieu principalement au niveau de la glande surrénale. La glande surrénale est plutôt responsable de la majeure production de dihydroépiandrostérone (DHEA) (C. C. Chen & Parker Jr., 2004).

2.2 L'enzyme 5 α -réductase

L'enzyme 5 α -réductase est localisée principalement dans le cytoplasme des cellules de la prostate et de l'épididyme, mais elle est présente aussi dans la peau (Sanderson, 2006). Son activité est beaucoup plus faible dans les testicules, que dans l'épididyme et la prostate, où son rôle est majeur (Sanderson, 2006). D'ailleurs, il existe deux isoenzymes de la 5 α -réductase, qui sont localisées de manière tissu-dépendante (Lo, King, Alléra, & Klingmüller, 2007). Ces deux isoformes sont encodées respectivement par deux gènes différents. De plus, leurs propriétés diffèrent et elles sont retrouvées dans différents tissus. Le type 1 est retrouvé entre autres au niveau de la peau, du foie et du cerveau, alors que le type 2 se retrouve davantage dans la prostate et les glandes accessoires reproductrices mâles (Thigpen et al., 1993). La DHT est d'ailleurs une hormone importante dans le maintien des fonctions sexuelles de ces organes. Le principal rôle de la 5 α -réductase est la conversion de la testostérone en DHT (Bruchovsky & Wilson, 1968). Cette conversion en DHT, qui est un androgène davantage actif que la testostérone, est d'ailleurs irréversible (Rizner et al., 2003b). L'expression de la 5 α -réductase est régulée de façon rétroactive par son précurseur hormonal, la testostérone, et aussi par son produit, la DHT. La présence de la testostérone induit aussi l'activité enzymatique de la 5 α -

réductase. L'expression génique de cette enzyme est entre autres surexprimée lors d'un cancer de la prostate. Quant aux phospholipases contenues dans la membrane cellulaire, elles peuvent inhiber l'activité enzymatique de la 5 α -réductase (Weisser H, Ziemssen T, & M., 2001). Une baisse de l'activité de cette enzyme mène à une diminution de production de DHT. L'augmentation de son expression est plutôt associée à la BPH et au cancer de la prostate (Sanderson, 2006). Ceci entraîne une baisse d'activité androgénique, car la DHT est moins disponible pour se lier au AR. Plusieurs pesticides possèdent la capacité d'inhiber cet enzyme, ce qui pourrait être utile lors de traitement du cancer de la prostate, car les taux de DHT seraient alors réduits. Par contre, dans d'autres circonstances, certains troubles pourraient être causés par une inhibition de la 5 α -réductase, comme la baisse de fertilité et les troubles érectiles (Lo, King, Allera, & Klingmuller, 2007).

2.3 Les androgènes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes, dérivant du cholestérol, et qui sont donc lipophiles. Elles peuvent donc diffuser librement à travers la membrane cellulaire pour pénétrer dans les cellules. Les hormones androgéniques possèdent plusieurs rôles et sont responsables entre autres du développement des traits masculins et de leur maintien. Aussi tôt qu'au stade fœtal, la testostérone initie la transformation du phénotype mâle (N. C. Bennett, Gardiner, Hooper, Johnson, & Gobe, 2010). À un niveau non-reproductif, les androgènes jouent un rôle dans le maintien de la masse musculaire et la densité osseuse (Brill et al., 2002). La DHT est considérée comme l'androgène le plus puissant, car elle possède plus d'affinité pour le AR (Rizner et al., 2003a). Les androgènes sont aussi responsables de plusieurs pathologies dépendantes aux hormones. En effet, la testostérone, et surtout la DHT, sont deux hormones étant connues pour être impliquées non seulement dans la croissance des tissus normaux de la prostate, mais aussi dans celle des tissus malins (Wilson, 1996). Un taux élevé de DHT est associé principalement à une augmentation des risques de développer des pathologies prostatiques, telles que le BPH ou le cancer (Ntais, Polycarpou, & Ioannidis, 2003). La testostérone joue un rôle important dans la régulation des gonadotrophines, de la spermatogénèse, ainsi que dans la différenciation sexuelle. La testostérone est entre autres responsable de la différenciation des canaux de Wolf, alors que la DHT régule plutôt la

virilisation externe (Harris et al., 1992). De plus, la DHT est responsable de la maturation sexuelle au moment de la puberté. La testostérone demeure cependant l'androgène en plus grande concentration dans le sang. Son transport sanguin se fait par des protéines de transport, soient l'albumine et la *Sex-Hormone-Binding-Globulin* (SHBG). La SHBG lie avec plus d'affinité la DHT que la testostérone. Par contre, c'est seulement la fraction sanguine libre de ces hormones qui peut pénétrer à l'intérieur des cellules. Chez la femme, c'est seulement lors de la ménopause que les androgènes deviennent les stéroïdes les plus présents. Leur effet est alors protecteur contre les cancers dépendants des oestrogènes (Nicolás Díaz-Chico et al., 2007). De même, lors de l'andropause chez les hommes, la synthèse en androgènes diminue et ce sont les oestrogènes qui deviennent majoritaires. Ces déséquilibres hormonaux du ratio androgènes/oestrogènes peuvent affecter la qualité du sperme, entraîner des malformations et un mauvais fonctionnement du système reproducteur (Benachour, Moslemi, Sipahutar, & Seralini, 2007). Bien que les androgènes soient associés au développement de cancers de la prostate, plusieurs autres facteurs environnementaux et génétiques sont aussi impliqués.

2.4 Régulation

La régulation des taux d'androgènes débute par la production de l'hormone de libération de la gonadotrophine (GnRH) par l'hypothalamus. Lorsque les taux d'androgènes sont bas, la sécrétion de GnRH active la glande pituitaire à produire de la LH et de la FSH. Chez l'homme, la FSH stimule entre autres la spermatogénèse. En réponse à la hausse de LH, les cellules de Leydig produisent la majorité de la testostérone, alors que la surrénale est responsable d'un faible pourcentage (Konety B & J., 2001). Cette production de LH augmente alors l'activité de certaines enzymes du cytochrome P450 impliquées, ainsi que l'expression du AR. Le LH agit plus précisément en augmentant le transport du cholestérol à l'intérieur des cellules via StAR et en augmentant l'activité des enzymes de biotransformation de la pregnénolone (Walter L. Miller et al., 1997). Par boucle de rétro-inhibition, la production de testostérone inhibe alors la sécrétion de GnRH, de LH et de FSH. De plus, les cellules de Sertoli sécrètent l'hormone inhibine, qui inhibe aussi la sécrétion de FSH. La testostérone, en se liant aux récepteurs hormonaux, est entre autre responsable de la synthèse des protéines de liaison aux androgènes ABP (*androgen-binding protein*). Selon le taux de cholestérol disponible, une réponse aïgue à une hausse

d'adrénocorticotrophine (ACTH) correspond à la production de cortisol (Stocco & Clark, 1996). En effet, l'ACTH augmente la conversion du cholestérol en pregnénolone, et de la pregnénolone en DHEA, en activant la transcription des enzymes CYP11A1 et CYP17, ainsi que celle des cholestérols estérases (Rainey, Carr, Sasano, Suzuki, & Mason, 2002). L'ACTH régule donc aussi la sécrétion d'androgènes, de façon dépendante à l'expression génique des gènes codant pour les enzymes stéroïdogéniques.

2.5 L'enzyme CYP17

Le CYP17 est une enzyme clé de la stéroïdogénèse. En effet, les individus présentant une déficience congénitale de cette enzyme, possèdent un trouble de la stéroïdogénèse à la fois corticosurrénale et gonadale (Auchus, 2004). Le CYP17 est certainement une des enzymes majeures des premiers stades de la stéroïdogénèse, et intervient à plusieurs étapes. Elle est responsable de la conversion de la pregnénolone en 17α -hydroxypregnenolone, de la progestérone en 17α -hydroxyprogestérone, ainsi que de leur conversion respective en DHEA et en androsténédione (Hall, 1986). La première voie est prioritaire, alors que celle de la 17α -hydroxyprogestérone est dite accessoire. Le DHEA et son sulfate conjugué (DHEAS) sont les précurseurs hormonaux stéroïdiens les plus abondants en circulation (Auchus, 2004). Le DHEA est principalement produite au niveau de la zone réticulée du cortex surrénalien (Biernacka-Lukanty, 2004). Cette hormone peut aussi être convertie ensuite en androsténédione, qui mène à la formation de testostérone et d'œstrogènes. La réaction du DHEA en DHEAS, par des enzymes de sulfotransférases, est réversible par les enzymes sulfatases. Le DHEAS constitue donc une réserve de DHEA.

2.5.1 Régulation et expression du CYP17

Le CYP17 est encodé par un gène, situé au niveau du chromosome 10q24.3 (Picado-Leonard & Miller, 1987). Cependant, même si le CYP17 est encodé par un seul et unique gène, il possède deux types d'activités distinctes. Elles sont toutes deux essentielles à la synthèse d'hormones stéroïdiennes sexuelles, la 17α -hydroxylase et la $17,20$ -lyase (Hall, 1991). Diverses mutations peuvent altérer le CYP17, et chacune altèrent ses deux types d'activités catalytiques. Cela confirme l'existence d'un seul gène codant pour le CYP17 chez l'humain (Fardella, Hum, Homoki, & Miller, 1994). Il existe cependant différents ratios entre les deux types d'activité, selon les tissus. Cela pourrait être dû à la quantité disponible du principal donneur d'électrons, soit la réductase P450 et la cytochrome b5 réductase (Tamburini & Gibson, 1983). Le ratio est trois à quatre fois plus élevé en flavoprotéine cytochrome b5 dans les testicules que dans les glandes corticosurrénales (Walter L. Miller et al., 1997). De plus, il y a une différence entre le poids moléculaire de la protéine CYP17 dans les différents tissus, ce qui suggère plutôt

l'existence de processus post-traductionnels agissant de manière tissu-spécifique (Walter L. Miller et al., 1997). Par exemple, pour acquérir son activité 17,20-lyase, le CYP17 doit être phosphorylé au niveau d'une sérine ou d'une thréonine (Walter L. Miller et al., 1997). Chez l'humain, le CYP17 possède plus d'affinité pour son substrat 17 α -hydroxypregnénolone (Nakajin, Shinoda, Haniu, Shively, & Hall, 1984). C'est donc la voie passant par la formation de DHEA qui est favorisée. Le CYP17 humain est exprimé principalement dans les gonades et les glandes surrénales (Chung et al., 1987). De façon générale, son expression est sous le contrôle de l'hormone hypophysaire LH. Le CYP17 présent dans les cellules corticosurrénales est aussi régulé à la baisse par les glucocorticoïdes (Trzeciak, LeHoux, Waterman, & Simpson, 1993) et à la hausse par l'ACTH (Rainey, Carr, Sasano, Suzuki, & JI., 2002). L'effet de l'ACTH est aussi connu pour induire la sécrétion du facteur de croissance de transformation (TGF). Cette cytokine présente en trois isoformes est impliquée dans la différenciation cellulaire, l'angiogenèse et possède une capacité d'anti-rejet. Dans les cellules H295R, l'expression du TGF β est stimulé par la présence d'androgènes (Zatelli, Rossi, & Degli Uberti, 2000). Le TGF β diminue aussi l'expression du CYP17, ce qui au final diminue la production d'androgènes (Brand, Nury, Chambaz, Feige, & Bailly, 2000). De plus, le facteur stéroïdogénique (SF-1) stimule l'expression du CYP17 (Bakke & Lund, 1995). En plus d'être une enzyme primordiale dans les voies de la stéroïdogénèse, le CYP17 possède la capacité de métaboliser certains xénobiotiques (Niwa et al., 2001).

2.5.2 Rôle du CYP17 dans le cancer

Dans les cas de cancers de la prostate métastatiques résistants à la castration, l'enzyme du CYP17 est surexprimée, tout comme d'autres enzymes stéroïdogéniques (Montgomery et al., 2008). Son expression plus élevée entraîne donc une hausse de la synthèse des androgènes. Un inhibiteur de CYP17 agirait donc en inhibant la synthèse d'androgènes. Il existe un lien entre l'enzyme CYP17 et le AR. En effet, en plus de diminuer la synthèse des androgènes, lorsque le CYP17 est régulé à la baisse, l'expression du AR l'est aussi, car le taux d'androgènes est plus bas (T. S. Vasaitis, Bruno, & Njar, 2011). L'efficacité anti-tumorale d'un inhibiteur de CYP17 est donc dupliquée.

3 LE RÉCEPTEUR AUX ANDROGÈNES

Le AR est un membre de la famille des récepteurs nucléaires et est encodé par le chromosome Xq11-12 (Brown et al., 1989). Sa protéine est formée d'environ 920 acides aminés et possède un poids moléculaire d'environ 110 kDa (Rahman, Miyamoto, & Chang, 2004). Son poids varie selon les espèces, les organes/tissus, ainsi que la propriété normale ou néoplasique du tissu (M. P. Johnson, Young, Rowley, & Tindall, 1987). Le AR est formée de quatre domaines, un domaine de liaison au ligand (LBD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine N-terminal (NTD) et une région charnière (fig 3-1) (Martin, Muracciole, Berenguer, Boudouresque, & Ouafik, 2008). Cette dernière région détermine l'activité transcriptionnelle du récepteur.

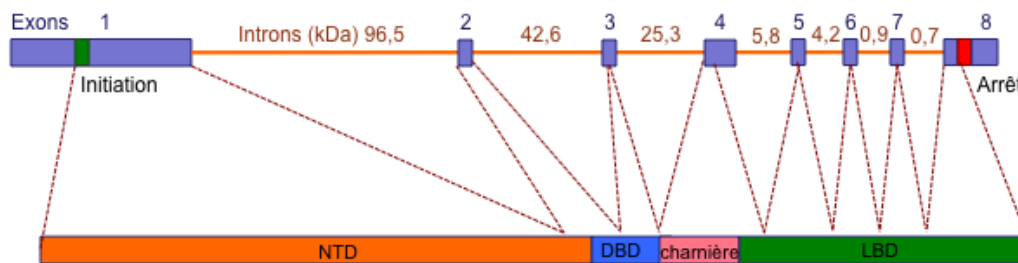


Figure 3-1: Domaines géniques (en haut) et protéiques (en bas) du AR. Le gène consiste en huit exons et la protéine en quatre domaines: NTD, LBD, une région charnière et DBD

3.1 Expression et régulation du AR

Le AR est retrouvé principalement dans les tissus sensibles aux androgènes, tels que les organes reproducteurs, mais aussi en plus faibles concentrations au niveau du cœur, des muscles et du foie (Martin et al., 2008). En plus de réguler les caractères masculins, le AR joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose, le métabolisme de différents tissus et la sécrétion de plusieurs protéines, comme le PSA (N. C. Bennett et al., 2010). L'expression du gène du AR est elle-même induite par les taux d'androgènes (Wolf, Herzinger, Hermeking, Blaschke, & Horz, 1993). À un niveau *in vitro*, la prolifération des cellules présentant un AR muté et acétylé est augmentée en présence de DHT, comparativement aux lignées possédant un AR de type sauvage (Anbalagan, Huderson, Murphy, & Rowan, 2012). Le AR se retrouve au niveau de cytoplasme, mais est transloqué au noyau lorsqu'il est activé (fig 3-2) (Georget et al.,

1997). En effet, le AR migre dans le noyau cellulaire lors de la liaison de son domaine de liaison au ligand avec une hormone, soit la testostérone et principalement la DHT (Gioeli & Paschal, 2012). Cette liaison permet au AR de se dissocier de ses protéines chaperonnes, les protéines de choc thermique 70, 90, 56 et 23 (*heat shock protein*, HSP), qui assurent stabilité au récepteur en absence de son ligand hormonal (T. A. Yap, C. P. Carden, G. Attard, & J. S. de Bono, 2008). Le AR peut alors se dimériser et être phosphorylé, ce qui permet au complexe récepteur/androgène un changement de conformation, afin de pénétrer dans le noyau (Martin et al., 2008). Ce sont les protéines kinases qui permettent l'ajout de phosphates aux différents groupements du récepteur (Gioeli & Paschal, 2012). La phosphorylation du AR en position sérine 81 est d'ailleurs associée à la translocation nucléaire du récepteur (S. Chen, Y. Xu, X. Yuan, G.J. Bubley, & S.P. Balk, 2006b). Le AR peut ensuite agir en se liant aux différents promoteurs de gènes, comme facteur de transcription, au niveau des éléments de réponses aux androgènes (AREs) (Velasco et al., 2004). Les AREs sont des régions où le AR est recruté pour moduler l'expression de gènes d'une manière androgéno-dépendantes. Les gènes transcrits par les AREs positifs sont des gènes régulés par le AR, des gènes de survie et des gènes de prolifération cellulaires, tels que le PSA (T.A. Yap, C.P. Carden, G. Attard, & J.S. de Bono, 2008). La production de tels facteurs de croissance favorise ainsi le maintien et la prolifération de la tumeur. Tant qu'aux AREs négatifs, ils répriment l'expression de ces gènes (Grosse, Bartsch, & Baniahmad, 2012).

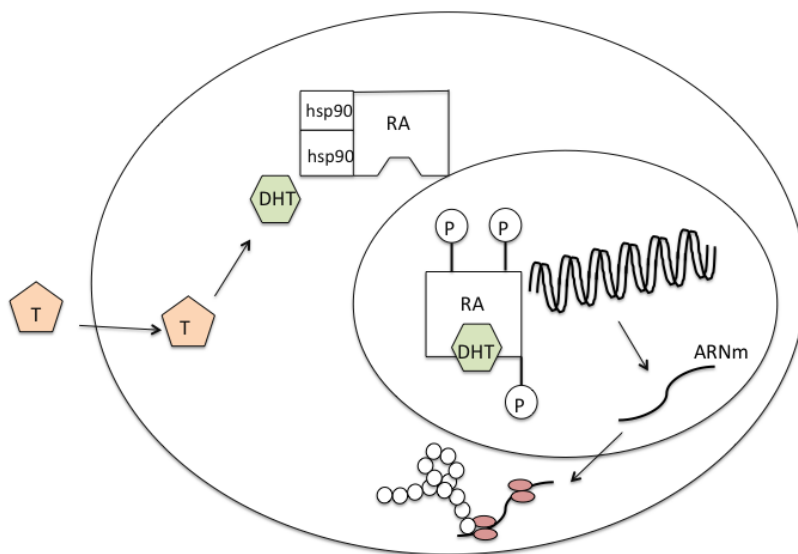


Figure 3-2: Translocation du AR dans le noyau (T=testostérone, DHT=dihydrotestostérone, P=phosphate)

3.2 Rôle du AR dans le cancer

Le AR joue à la fois un rôle de suppresseur et de stimulateur tumoral (Niu et al., 2010). Il joue un rôle dans le développement normal de la prostate, mais peut participer aussi à la progression de différentes pathologies, dont le cancer prostatique. Effectivement, le AR peut stimuler une tumeur de plusieurs façons : par son expression, ses mutations et parfois son activation indépendante au ligand (Culig, Klocker, Bartsch, Steiner, & Hobisch, 2003). En effet, l'augmentation de l'expression du AR est nécessaire à la conversion du cancer hormono-dépendant vers une forme indépendante (Moon et al., 2009). La privation d'androgènes ne devient donc plus assez efficace, car le AR peut alors être activé sans son ligand hormonal. Dans ce type de cancer de la prostate, le AR est d'ailleurs souvent surexprimé, de même que dans les cancers résistants à la castration (Y. S. Kim et al., 2012). En effet, le AR demeure exprimé dans environ 80 % des cas de cancers hormono-résistants (Han et al., 2005). Même après un traitement, jusqu'à 30 % des patients ayant une rechute de cancer présentent une amplification du AR (Culig, Hobisch, & Hittmair, 1997). Le AR surexprimé peut aussi mener au développement ou à la prolifération du cancer de la prostate, par l'activation de gènes, tels que le PSA (Nakabayashi et al., 2011). Le cancer de la prostate peut aussi se développer suite à une mutation du récepteur, à un plus grand recrutement de coactivateurs transcriptionnels ou à d'autres voies de signalisation dans lesquelles est impliqué le AR. Un des coactivateurs du AR est le récepteur stéroïdien coactivateur p160 (SRC), qui active aussi plusieurs autres récepteurs nucléaires (Culig, Comuzzi, Steiner, Bartsch, & Hobisch, 2004). Une surexpression des SRC induit une hausse de la prolifération et de la survie cellulaire, ce qui contribue à la promotion de cancers hormonaux, tels que le cancer du sein et de la prostate (A. B. Johnson & O'Malley, 2012). Une mutation du AR peut aussi survenir lorsque celui-ci est activé par des ligands exogènes ou des ligands moins puissants que les androgènes (Taplin, Bubley, & Ko, 1999).

3.3 Modifications post-traductionnelles du AR

Le AR peut subir différentes modifications post-traductionnelles réversibles, par l'ajout de groupements fonctionnels, telles que l'acétylation, l'ubiquitination et la phosphorylation. L'acétylation est certainement la modification protéique la plus courante, et celle-ci augmente son activité sur différents promoteurs. L'acétylation protège les protéines de la dégradation

produite par l'ubiquitination et le protéasome. Cette modification survient entre autres en présence de DHT (Fu et al., 2004). L'ubiquitination régule le taux de AR en assurant sa dégradation, mais serait aussi associé à diverses pathologies (Anbalagan et al., 2012). Tout comme les androgènes, ces modifications régulent aussi le AR, et ce par différentes voies de signalisation (Y Koryakina, Q.Ta, & Gioeli, 2014). Le AR est activé par des phosphorylations additionnelles sur différents résidus ciblés, tels que les sérines, les tyrosines et les thréonines. C'est d'ailleurs le phosphosite, qui détermine l'effet sur l'activité du AR et ce en présence ou en absence de ligand (Gioeli & Paschal, 2012). C'est la phosphorylation qui permet aux différents ligands du AR d'agir de façon agoniste ou antagoniste (Wang, Liu, Kreis, & Budman, 1999). Le AR recrute des coactivateurs et des corépresseurs, qui déterminent l'activation ou la répression de gènes possédant des propriétés androgéniques (Pang et al., 2012). Ces corégulateurs influencent aussi la localisation, la liaison, la stabilité et l'activité transcriptionnelle de celui-ci (Lee & Chang, 2003). Les agonistes du AR ont la capacité à promouvoir les interactions entre les domaines N-terminal et Carboxy-terminal avec des coactivateurs, ce qui régule l'activité du AR (Culig et al., 2003). Les ligands du AR, tels que la testostérone et la DHT, stimulent à la fois son expression et sa phosphorylation. D'ailleurs, une deuxième activation peut avoir lieu lors d'une action agoniste, mais pas dans le cas d'une action antagoniste (Brinkmann & Trapman, 2000). De plus, la stabilité et la durée d'une liaison avec un antagoniste est plus faible (Farla, Hersmus, Trapman, & Houtsmuller, 2005). Plusieurs kinases, qui font partie de la famille des kinases dépendantes à la cycline (CDK), ont la capacité de phosphoryler le AR en position 81 (Gioeli & Paschal, 2012). Les CDK sont d'ailleurs connues pour réguler la prolifération des cellules cancéreuses (Malumbres & Barbacid, 2009). Une phosphorylation au niveau d'une sérine augmente généralement la capacité de liaison du récepteur (Martin et al., 2008). Par exemple, lorsqu'une phosphorylation survient en position sérine 81, l'activité androgénique du AR est augmentée. En effet, la localisation nucléaire du récepteur est associée à une augmentation du AR phosphorylé en position sérine 81 (Gioeli & Paschal, 2012). La sérine 81 est d'ailleurs le site le plus souvent phosphorylé lors d'une exposition hormonale (Y Koryakina et al., 2014). Dans les cellules LNCaP, la phosphorylation sur la position sérine 81 est induite par la présence d'androgènes (Gioeli, Ficarro, Kwiek, Aaronson, Hancock, Catling, et al., 2002). La phosphorylation est aussi une modification particulièrement importante dans la stabilité, l'interaction du récepteur avec ses coactivateurs et son activité transcriptionnelle (Gioeli, Ficarro,

Kwiek, Aaronson, Hancock, & Catling, 2002). Ainsi, le AR phosphorylé est souvent associé au développement d'un cancer de la prostate résistant aux hormones et à une baisse de survie (Anbalagan et al., 2012). La phosphorylation de ce récepteur, ainsi que le développement d'un cancer prostatique se fait par la voie PI3K/Akt. Cette voie permet la phosphorylation du AR en position sérine 210-213, ce qui modifie aussi l'activité transcriptionnelle du AR à la hausse (Anbalagan et al., 2012). Ce type de phosphorylation est associé à une résistance du cancer à la privation hormonale. De plus, il a été démontré que la phosphorylation en position S210 diminue le taux de survie des patients (McCall, Gemmell, Mukherjee, Bartlett, & Edwards, 2008). Dans les cellules LNCaP, la phosphorylation par Akt mène aussi à une activation du PSA et à la survie cellulaire (Wen et al., 2000). Le taux de pAR S210-213 pourrait donc être aussi impliqué dans la progression du cancer de la prostate. De plus, il a été suggéré que la phosphorylation en position S213 peut rendre les cellules cancéreuses de la prostate sensibles à des faibles concentrations androgéniques (Y Koryakina et al., 2014). La phosphorylation du AR sur d'autres résidus peut parfois mener à une baisse de son potentiel de liaison, comme c'est le cas des sérines 215 et 792 (Palazzolo et al., 2007). Lors de ces différentes phosphorylations, le poids moléculaire du AR est légèrement modifié. Il passe d'environ 99 kDa à environ 105 kDa. La phosphorylation du AR peut aussi intervenir de manière indépendante au ligand, via d'autres voies de signalisation. Un des plus importants régulateurs non stéroïdiens du AR est l'interleukine 6 (IL-6). Cependant, cette cytokine pro-inflammatoire ne peut qu'induire une activité du AR équivalent à 50 % de ce qui est normalement atteint avec un ligand hormonal (Culig et al., 2003). Le TGF β peut aussi phosphoryler le AR, et ce en absence de son ligand naturel (Lapouge et al., 2008). D'autres composés peuvent agir plutôt comme antagonistes du AR, de plusieurs façons, dont l'inhibition de sa phosphorylation. Ces ligands antagonistes permettent plutôt une conformation du récepteur qui interagit avec des corépresseurs, ce qui empêche l'activation de la transcription (N. C. Bennett et al., 2010). Un composé diminuant la phosphorylation du AR serait donc intéressant dans le développement de traitements contre le cancer de la prostate.

4 LA PROSTATE

La prostate est une glande exocrine du système reproducteur masculin. Située sous la vessie, elle est responsable de la production de la majeure partie des sécrétions composant le sperme (Santos, Huang, & Tindall, 2004). Plusieurs facteurs interviennent dans la croissance de la glande prostatique, dont plusieurs hormones endocriniennes, des hormones de croissances et des neurotransmetteurs, tels que la sérotonine (Martin et al., 2008). Les tissus prostatiques sont donc régulés à la fois par les androgènes et les oestrogènes. Par contre, la testostérone produite par les cellules de Leydig, ainsi que la DHT, demeurent les hormones majoritairement responsables du développement et de la fonction de la prostate (Hsing, 2001). La prostate est formée de deux types tissulaires, soient un épithélium glandulaire et un stroma fibromusculaire (Lapouge et al., 2008). Ce sont les cellules sécrétrices de cet épithélium qui sécrètent les composantes du liquide prostatique. Lorsqu'un carcinome se développe, c'est d'ailleurs au niveau de cet épithélium qu'il se forme. La plupart des cellules prostatiques expriment le AR, sauf les fibroblastes, qui sont donc androgéno-indépendantes (Lapouge et al., 2008). Le AR dans les cellules de l'épithélium de la prostate induit l'activation de gènes, tels que celui du PSA (Lapouge et al., 2008). La prostate exprime l'enzyme 5α -réductase, dont l'isoforme de type 2 qui est prédominant dans cet organe (Thigpen et al., 1993). L'expression de cette enzyme est plus élevée dans les cas de cancer de la prostate, mais aussi lors d'une hyperplasie bénigne de la prostate (BPH). Cependant, cette pathologie ne doit pas être confondue avec le cancer de la prostate. Tout comme le cancer de la prostate, la BPH apparaît plus fréquemment avec l'âge, mais bien qu'elle soit accompagnée d'une élévation des taux de PSA et de DHT (Cohen & Parsons, 2012), la BPH n'est cependant pas d'origine cancéreuse (Salvador, Pinto, & Silvestre). Les principaux symptômes de la BPH sont des troubles urinaires, dus à la prolifération de l'épithélium et du stroma de la prostate. Cette croissance incontrôlée mène souvent à un blocage de l'urètre et une baisse de la capacité de la vessie (Salvador et al.). Tout comme pour le traitement du cancer de la prostate, les enzymes CYP17 et 5α -réductase sont des cibles d'intérêt pour traiter la BPH, dans le but de réduire les taux d'androgènes.

4.1 L'antigène spécifique de la prostate

Le PSA est une protéase de la famille des kallikréine, qui est uniquement sécrétée par l'épithélium de la prostate (Santos et al., 2004). Le PSA contribue principalement à donner de la motilité aux spermatozoïdes (Santos et al., 2004). Le PSA contribue aussi à l'homéostasie de la prostate et est d'ailleurs un biomarqueur utile dans la détection du cancer de la prostate (Alapont Alacreu et al., 2008). La transcription du PSA est régulée par les AREs (Santos et al., 2004). La DHT régule aussi à la hausse la production de PSA (M. F. Lin et al., 1993). L'expression génique du PSA peut aussi être induite par les glucocorticoïdes (Cleutjens et al., 1997). Avec le toucher rectal, le dosage sanguin du PSA demeure la technique standard de détection d'un cancer de la prostate. Le taux normal de PSA est d'environ 4 ng/ml de sang, mais varie selon l'âge de l'individu. Le PSA circule dans le sang via deux protéines, soient l' α -1-antichymotrysin et l' α -2-macroglobuline (Santos et al., 2004). Par contre, une bonne fraction (entre 5 à 30 %) de PSA demeure libre dans la circulation sanguine (Lorenzetti, Marcoccia, Narciso, & Mantovani, 2010). Le rôle du PSA libre est inconnu, mais son taux est plus élevé dans les cas de BPH, que dans les cas de cancers de la prostate (Finne et al., 2000). De plus, le PSA total est sécrété en plus grande quantité lors d'une pathologie prostatique, telle qu'un cancer de la prostate (Lorenzetti et al., 2010). Le PSA est donc non seulement influencé par le volume de la prostate, mais aussi par le volume d'une tumeur et par la différenciation prostatique (Lapouge et al., 2008). Il a été démontré qu'une thérapie par privation androgénique, lors de cancer métastatique, diminue les taux de PSA (Diaz-Carballo et al., 2012). Par contre, si les taux sont encore élevés après un traitement, cela peut indiquer une pathologie systémique ou un état métastatique avancé. De plus, après plusieurs années de rémission, si les taux de PSA se remettent à augmenter, cela peut être dû à une rechute du patient (Partin, Pearson, & Landis, 1994). Par contre, un diagnostic établi avec le taux de PSA peut aussi mener à un faux-positif. En effet, non seulement un cancer de la prostate, mais aussi une hypertrophie bénigne de la prostate (BPH) ou tout autre inflammation d'origine non cancéreuse, peuvent mener à une augmentation du taux de PSA (Sengupta, Amling, D'Amico, & Blute, 2008). Lors d'une pathologie de la prostate, les androgènes ne parviennent plus à réguler le AR correctement et l'activation de gènes, tels que le PSA, est donc faite de manière constitutive (Balk, Ko, & Bublely, 2003). Les androgènes

augmentent la synthèse de PSA, tout comme certains composés antiandrogéniques, qui peuvent l'augmenter, mais de façon moins importante (Lorenzetti et al., 2010).

La phosphatase acide prostatique humaine (PAPh) est un autre antigène spécifique à la différenciation de l'épithélium prostatique. Autrefois, avant une bonne connaissance du PSA, c'était plutôt le PAPh qui était utilisé comme marqueur pour diagnostiquer un cancer de la prostate. Tout comme le PSA, la sécrétion de PAPh est régulée par le taux d'androgènes (Bolton, Lahtonen, Vihko, Kontturi, & Vihko, 1981). De plus, le taux de PAPh est souvent plus élevé qu'à la normale, lors d'une affection à la prostate. Par contre, à l'inverse du PSA, l'hormone DHT diminue la sécrétion de PAPh (M.-F. Lin, Lee, Garcia-Arenas, & Lin, 2000).

4.2 Le cancer de la prostate

Aux États-Unis, le cancer de la prostate demeure le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme entre 65 et 75 ans, et la deuxième cause de mortalité par cancer (Jeong et al., 2011). Au niveau mondial, il s'agit du sixième cancer le plus commun, mais le troisième en importance chez l'homme (Parkin, 2001). Bien que le taux de survie de ce type de cancer soit assez élevé, il demeure asymptomatique, ce qui peut amener un dépistage tardif. Les méthodes de dépistage les plus rapides sont le toucher rectal et le dosage du PSA. Par ailleurs, il a été démontré que depuis le début de l'utilisation du marqueur PSA, le taux de décès par cancer de la prostate a chuté (Écho, Dominique, & Ravery, 2006). La phosphatase acide prostatique (PAPh) et la kallistéine humaine de type 2 sont deux autres marqueurs d'un cancer prostatique, mais de stades plus avancés (Lapouge et al., 2008). La PAPh est entre autres associée à la présence de métastases osseuses (Gutman & Gutman, 1939). L'expression et la sensibilité du AR sont augmentées lors d'un cancer hormonal (T. Vasaitis et al., 2008). Ceci peut être dû à la plus grande stabilité du AR et à une altération de facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire. De plus, les gènes des enzymes de conversion des androgènes, ainsi que les gènes régulés par les androgènes, sont aussi surexprimés dans les cas de cancers hormono-dépendants (T. Vasaitis et al., 2008). 90 % des cancers de la prostate sont initialement androgéno-dépendants (Handratta et al., 2004), mais dans la majorité des cas, il évolue pour devenir plus résistant (Diaz-Carballo et al., 2012). Une augmentation de l'expression du AR est d'ailleurs nécessaire à cette transition vers une forme hormono-indépendante (Moon et al., 2009). Cette résistance hormonale peut être

causée par une surexpression, une mutation ou une activation indirecte du récepteur. Cette forme plus agressive du cancer continue à prendre de l'ampleur, même quand les taux sériques en androgènes sont bas. Le AR peut même être activé en absence de ligand et devenir sensible à de très faibles concentrations hormonales (Gioeli & Paschal, 2012). Il a aussi été démontré que les métastases expriment aussi un AR surexprimé (Culig, 2003).

4.2.1 Facteurs

Le cancer de la prostate est majoritairement développé chez les hommes de plus de 65 ans, selon la Société Américaine du Cancer. Les inflammations chroniques de la prostate, tel que l'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH), peuvent aussi mener au développement d'un cancer (Ferrís-i-Tortajada et al., 2011). Le lieu de résidence influence aussi les risques. Par exemple, les statistiques de la Chine montrent jusqu'à 60 fois moins d'incidence de cancer de la prostate qu'aux États-Unis (Parkin, 2001). Cela est certainement dû à leur diète riche en soya, qui contient des phytoestrogènes protecteurs face au développement de cancers hormono-dépendants (Fritz, Wang, Eltoun, & Lamartiniere, 2002). De plus, un taux plus faible de polyglutamine, mène à une plus grande activité du AR (Culig et al., 2003). Ceci pourrait expliquer un plus grand taux d'incidence de cancer de la prostate chez les Afro-Américains, qui possèdent de plus petites séquences de polyglutamine (Irvine, Yu, Ross, & Coetzee, 1995). Même si les prédispositions génétiques ont un rôle à jouer, une grande part du risque de développer des lésions à la prostate serait de nature hormonale. En effet, un déséquilibre entre les taux d'androgènes et d'oestrogènes est un facteur pouvant entraîner ou accélérer le développement d'un cancer hormonal (Cândido, Fávoro, Montico, Hetzl, & Cagnon, 2012).

4.2.2 Traitements

Le but principal d'un traitement est de stopper la progression, ainsi que l'agressivité du cancer. Dans les cas de cancers de la prostate incurables, les méthodes thérapeutiques les plus répandues consistent à la privation d'androgènes et à la chimiothérapie (H. L. Bennett et al., 2013). Même chez les patients avec un stade plus avancé, la privation d'androgènes démontre une augmentation de leur survie (Berthelet, Pickles, Lee, Liu, & Truong, 2005). La prostatectomie est surtout efficace lors de stades avancés et métastatiques du cancer (Pignon et al., 2009). Pour éviter les risques de rechutes, il est préférable de la combiner à une hormonothérapie ou une

radiothérapie (Hennequin, Ravery, Maylin, & Boccon-Gibbod, 2002). Lorsque l'orchiectomie s'avère nécessaire, elle n'élimine cependant pas la production d'androgènes par les glandes corticosurrénales. L'utilisation de composés antiandrogéniques, tels que les analogues de GnRH, est donc essentielle dans le traitement de cancers hormonaux (Crawford, Eisenberger, & McLeod, 1989). Les analogues agonistes, telle que la gosérelina, stimulent d'abord la sécrétion de LH, puis une surstimulation est induite et provoque une hyposensibilisation de l'hypophyse (Handelsman et al., 2014). Cependant, à long terme ce traitement mène au développement d'une résistance à la castration chimique (H. L. Bennett et al., 2013). Les inhibiteurs de CYP17 peuvent aussi être utiles, car ils diminuent la biosynthèse d'androgènes, et ce à la fois au niveau testiculaire et corticosurrénale (Hille et al., 2009). Le kétoconazole, un fongicide dans la famille des imidazole, est utilisé pour abaisser le taux de PSA. Il est cependant non spécifique et induit plusieurs effets secondaires (Long et al., 2000). Quant à l'abiratérone, qui est aussi un inhibiteur du CYP17, il est plus puissant et davantage sélectif (Barrie, Potter, & Goddard, 1994). Ce composé se lie à l'enzyme de façon irréversible en tant qu'analogue de la pregnénolone (Reid, Attard, Barrie, & de Bono, 2008). Chez les patients, ce traitement a démontré une baisse de 50 % du taux de PSA (D. W. Lin, 2009), ainsi qu'une augmentation significative de leur taux de survie (Nakabayashi et al., 2011).

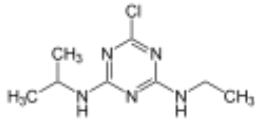
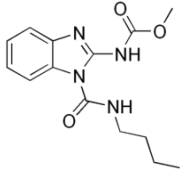
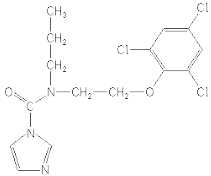
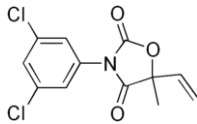
Les composés antiandrogéniques non-stéroïdiens, qui sont plutôt utilisés dans les stades avancés de cancer, comme le bicalutamide (Casodex), sont à privilégier car ils possèdent moins d'effets secondaires. Le Casodex se lie au domaine de liaison au ligand du AR, empêchant ainsi les ligands naturels de s'y lier (Hodgson, Astapova, Hollenberg, & Balk, 2007). Il a aussi été démontré que le bicalutamide diminue le niveau de phosphorylation du AR (Wang et al., 1999). Le flutamide agit en diminuant la conversion des androgènes, en se liant au AR et en bloquant ainsi la liaison de la DHT, diminuant ainsi les taux sanguins de PSA (Elzoghby, Saad, Helmy, Samy, & Elgindy, 2013). Une thérapie avec des antagonistes du AR non-stéroïdiens, tels que le bicalutamide, peut aussi mener à une forme du cancer résistante à la castration. En effet, lorsque des antagonistes non-stéroïdiens sont administrés à long terme, le AR est muté et les composés agissent alors comme agonistes (Purushottamachar et al., 2008). D'autres types d'inhibiteurs peuvent être utilisés, comme la finastéride, qui agit plutôt en inhibant l'enzyme 5 α -réductase (Long et al., 2000). Bien que ce composé bloque efficacement la production de DHT, celui-ci augmente les taux de testostérone, ne pouvant plus être converti par l'enzyme 5 α -réductase.

Alors, même si la testostérone possède moins d'affinité pour le AR, elle peut tout de même s'y lier. Il est donc crucial de développer des traitements moins toxiques. De plus, ces traitements agissent la plupart du temps sur une seule cible, alors que des effets antiandrogéniques à plusieurs niveaux seraient certainement plus efficaces. En effet, un composé à la fois inhibiteur de l'enzyme CYP17 et antagoniste du AR serait davantage efficace pour traiter un cancer de la prostate hormono-dépendant.

5 LES PESTICIDES

Bien qu'ils soient utilisés principalement dans l'agriculture, dans le but de prévenir, de détruire et de repousser les ravageurs, certains pesticides peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens. Les pesticides sont largement utilisés pour protéger les cultures contre les ravageurs. Ces pesticides ne possèdent pas tous les mêmes caractéristiques; toxicité, persistance, métabolisation, ... Il existe d'ailleurs une stratégie qui consiste à faire une rotation ou des mélanges de pesticides avec différents mode d'action (Basit, Saeed, Saleem, & Sayyed, 2013). Ainsi, une action synergique peut diminuer les concentrations à utiliser et les coûts associés. Il a été démontré que les pesticides sont retrouvés non seulement dans l'environnement, mais aussi dans les tissus et l'urine de populations humaines. En effet, une étude faite sur des populations d'Allemagne et des États-Unis, a démontré que la majorité des individus présentaient des concentrations significatives de métabolites de pesticides dans leur urine (Nasuti Cinzia, 2013). Ces produits synthétiques, tels que l'atrazine, le bénomyl, le prochloraz et la vinclozoline, sont associés à diverses altérations du système endocrinien chez les animaux. Entre autres, le prochloraz et la vinclozoline sont reconnus pour posséder des actions antiandrogéniques (Lo, King, Allera, et al., 2007). Plusieurs études ont démontrées que plusieurs pesticides peuvent engendrer la féminisation d'espèces aquatiques (T. B. Hayes et al., 2011). De même, chez l'humain des études épidémiologiques ont démontrées que l'exposition à des pesticides pouvait engendrer un sperme de faible qualité et même augmenter le risque de développer des malformations, telles que la cryptorchidie, chez les enfants de jardiniers (Laier et al., 2006). Certains de ces pesticides sont maintenant bannis dans certains pays, mais ils sont rapidement remplacés par de nouveaux composés. Ces nouveaux pesticides étant moins connus sont souvent suspectés à leur tour d'être des perturbateurs endocriniens. Par contre, les standards environnementaux sont de plus en plus élevés et les risques toxicologiques sont de mieux en mieux connus.

Table 1: Noms et structures des pesticides testés

Pesticides	Noms détaillés	Structures chimiques
Atrazine	chloro-2 éthylamino-4 isopropylamino-6-triazine-1,3,5	
Bénomyl	butylcarbamoyl-1 benzimidazolyl-2 ou carbamate de méthyle	
Prochloraz	N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophénoxy)éthyl]imidazole-1-carboxamide	
Vinclozoline	[3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyl-oxazolidine-2,4-dione]	

5.1 Atrazine

L'atrazine est un herbicide de la famille des triazines. Il est le pesticide le plus largement utilisé aux États-Unis (Pogrmic-Majkic, Fa, Dakic, Kaisarevic, & Kovacevic, 2010). Son mécanisme d'action vise à bloquer la photosynthèse des mauvaises herbes. Dans le sol, sa demi-vie est d'environ 40 jours, et il peut être hydrolysé par les bactéries présentes. Par contre, selon l'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (1999), sa demi-vie passe à environ 200 jours lorsque l'atrazine se retrouve dans l'eau. Dû à sa persistance, l'atrazine se retrouve abondamment dans les nappes phréatiques. En effet, il s'agit du principal contaminant des sols et de l'eau (T. Hayes et al., 2002b). Il a d'ailleurs été banni dans plusieurs pays européens. On le retrouve aussi à l'intérieur d'organismes aquatiques et l'utilisation de l'atrazine est associé au déclin des amphibiens (T. B. Hayes et al., 2011). L'atrazine est dégradé dans l'organisme en plusieurs

métabolites : le diéthyl-atrazine, le déisopropyl-atrazine, le diaminochloro-atrazine et l'hydroxy-atrazine (ATSDR, 1999). L'excrétion de ces métabolites se fait majoritairement via l'urine et les fèces. L'atrazine n'est pas classé dans les agents cancérigènes pour les humains, selon les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC). Ce pesticide est davantage reconnu pour ses effets oestrogéniques (Tinfo et al., 2011). En effet, l'atrazine démasculinise et féminise plusieurs espèces et est d'ailleurs associé à certains problèmes du système reproducteur féminin (Fan et al., 2007). Mise à part ses effets sur le système reproducteur, l'atrazine induit aussi des troubles de la fonction immunitaire chez plusieurs espèces de vertébrés (T. B. Hayes et al., 2011).

5.1.1 Propriétés antiandrogéniques

L'atrazine est davantage connu pour ses effets oestrogéniques, mais plusieurs études menées sur différents animaux de sexe masculin ont démontrées que l'atrazine altère le développement gonadale (T. B. Hayes et al., 2011). De plus, cet herbicide empêche la liaison de la DHT avec le AR (T. B. Hayes et al., 2011). De plus, il a été suggéré que l'atrazine inhibe la production de LH et de testostérone (Trentacoste, Friedmann, Youker, Breckenridge, & Zirkin, 2001). Par contre, cet herbicide possède généralement peu d'affinité pour les récepteurs hormonaux (Roberge, Hakk, & Larsen, 2004). Chez les humains, une étude menée sur des agriculteurs a démontré qu'une exposition à l'atrazine induit une baisse de fertilité masculine (Swan SH1, 2003).

5.1.2 Propriétés oestrogéniques

Les effets oestrogéniques de l'atrazine sont bien connus. Entre autre, l'atrazine augmente jusqu'à 200 % l'expression génique de certaines enzymes de la stéroïdogénèse (Pogrmic-Majkic et al., 2010). Il a été démontré que l'atrazine augmente l'expression de l'aromatase (CYP19) (Sanderson, Seinen, Giesy, & Berg, 2000). Par exemple, une augmentation à la fois de l'expression du CYP17 et du CYP19, entraînerait au final une augmentation du taux d'oestrogènes. L'augmentation de l'expression du CYP19 ce fait de façon dépendante au SF-1 (Fan et al., 2007). Le SF-1, qui est exprimé dans les tissus stéroïdogéniques, est essentiel pour la stéroïdogénèse et la différenciation sexuelle (Morohashi & Omura, 1996). Certainement due à la hausse de l'expression du CYP19, une augmentation du taux de cancer du sein chez les femmes vivant dans les milieux agricoles contaminés à l'atrazine est observée (M.K. Kettles, 1997).

5.2 Bénomyl

De la famille des benzimidazoles, le bénomyl est un fongicide, toxique à la fois pour les microorganismes et les invertébrés. Le bénomyl agit principalement en inhibant la tubuline, nécessaire à la prolifération cellulaire des MO (Davidse, 1986). Ce composé a cependant une affinité moindre pour la tubuline des mammifères (Lim & Miller, 1997). Dans l'environnement, le bénomyl est rapidement dégradé par hydroxylation dans les solutions aqueuses en un métabolite plus persistant, la carbendazime. Dans le sol, sa demi-vie peut être plus courte lorsqu'il est hydroxylé par les bactéries (Morinaga et al., 2004). À l'intérieur des organismes, le bénomyl est principalement éliminé via l'urine, en carbendazime et son métabolite le 5-hydroxycarbendazine (Lim & Miller, 1997). Au niveau de sa toxicité, la dose létale pour 50 % des individus (LD50) est assez faible, étant de 10 g/kg chez le rat (Lim & Miller, 1997).

5.2.1 Propriétés oestrogéniques

Il a déjà été démontré que le bénomyl administré de façon aiguë ou chronique peut induire des dommages au niveau du système reproducteur masculin de souris et de rats (Lim & Miller, 1997). Les effets observés sont entre autres une baisse des poids épидидymaires et testiculaires, et une diminution des comptes spermatiques (Lim & Miller, 1997). Le bénomyl peut aussi induire l'expression de l'enzyme aromatase dans les cellules H295R (Fan et al., 2007). Cela pourrait donc augmenter les risques de développer un cancer du sein chez les femelles exposées. Par contre, plusieurs fongicides de la famille imidazole sont connus pour leur effet inhibiteur sur l'enzyme aromatase dans le placenta humain (Sanderson, Boerma, Lansbergen, & van den Berg, 2002). Chez les mâles, le bénomyl induit des effets féminisants, tels qu'une hypospérmato-génèse et des cellules germinales multinuclées (Morinaga et al., 2004). La toxicité testiculaire du bénomyl et de son métabolite est certainement due à leur effet sur les microtubules lors de la spermatogénèse.

5.2.2 Propriétés antiandrogéniques

Plusieurs carbamates ont démontré une inhibition d'enzymes stéroïdiennes, telles que la 5 α -réductase et le CYP17 à un niveau *in vitro* (Moreira, Vasaitis, Guo, Njar, & Salvador, 2008). Même si la toxicité du bénomyl est plutôt faible chez le rat, une dose unique de 100 mg/kg suffi

à induire des lésions testiculaires (Hess, Moore, Forrer, Linder, & Abuel-Atta, 1991). Par contre, cette étude suggère que ce serait plutôt les métabolites du bénomyl qui induiraient cette toxicité au niveau de l'assemblage des microtubules testiculaires, de façon similaire à son action sur les tubules des champignons. Évidemment, les effets d'une exposition à long terme seraient plus importants que ceux d'une exposition aiguë.

5.2.3 Propriétés cancérogènes

En 2002, le bénomyl et son métabolite la carbendazime ont été classés cancérogènes par la «US Environmental Protection Agency». En effet, il y a été démontré qu'une exposition chronique au bénomyl peut entraîner le développement de tumeurs (Y. S. Kim et al., 2012). Des doses élevées de bénomyl et de carbendazime peuvent aussi induire la tératogénèse chez les rats (Casarett, 2007). Par ailleurs, plusieurs autres carbamates ont démontré des effets antiprolifératifs (Moreira et al., 2008).

5.3 Prochloraz

Le prochloraz est un fongicide de la famille des imidazoles, encore utilisé de nos jours dans l'agriculture (Ohlsson et al., 2009). Le mode d'action du prochloraz est l'inhibition de l'enzyme 14 α -déméthylase (CYP51), qui est essentielle à la formation de la membrane cellulaire des champignons (Zarn, Bruschweiler, & Schlatter, 2003). Cette enzyme est aussi présente chez les animaux et sa fonction permet la biosynthèse du cholestérol. Le prochloraz pourrait possiblement interagir avec cette forme de l'enzyme, car il possède la capacité à interagir avec certains cytochromes de mammifères (Kjærstad, Taxvig, Nellemann, Vinggaard, & Andersen, 2010). Ce fongicide est bien documenté pour ces effets antiandrogéniques, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

5.3.1 Propriétés antiandrogéniques

Le prochloraz agit comme antagoniste du AR et ER (Vinggaard et al., 2005). Il peut aussi inhiber à la fois la production d'oestrogènes et d'androgènes, et cela a été démontré dans plusieurs modèles *in vitro* (Kjærstad et al., 2010). Le prochloraz possède aussi la capacité d'affecter l'activité de certains cytochromes P450 (Laignelet, Narbonne, Lhuguenot, & Riviere, 1989). En effet, plusieurs imidazoles sont des inhibiteurs de l'aromatase. Il a d'ailleurs été démontré que le

prochloraz est un des plus puissants inhibiteur de l'aromatase dans les cellules H295R (Sanderson et al., 2002). Une concentration de 0,005 μM est suffisante pour inhiber 50 % de la synthèse de testostérone par ce type cellulaire (Kjærstad et al., 2010). Des résultats similaires ont été démontrés par une autre étude pour plusieurs pesticides de type conazole (Kjærstad et al., 2010). Le prochloraz est reconnu pour ses effets démasculinisant *in vivo*, ainsi que sa toxicité sur le système reproducteur mâle (Laier et al., 2006). Par exemple, il a été démontré qu'il affecte le développement sexuel des rats mâles exposés *in utero* (Ohlsson et al., 2009). Cette exposition prénatale diminuerait aussi leur stéroïdogénèse fœtale. Cette féminisation des fœtus serait principalement due à une diminution de production de testostérone. En effet, une autre expérience sur les rats a démontré une augmentation des taux de progestérone, ainsi qu'une diminution des taux de testostérone sanguins et testiculaires (Laier et al., 2006). Un essai de Hershberger a aussi démontré que le prochloraz induit chez les rats une réduction du poids de la prostate et des vésicules séminales (Lo, King, Allera, et al., 2007). Bien sûr, c'est la fenêtre d'exposition de l'individu qui détermine les effets engendrés. Une autre étude chez les rats a pu démontrer que le prochloraz est retrouvé dans le lait maternel (Vinggaard et al., 2005). De plus, leur étude a démontré que le prochloraz diminue l'expression protéique du CYP17. Leurs résultats ont aussi été confirmés *in vitro*, dans les cellules H295R. Ce pesticide diminue aussi de manière dose-dépendante l'expression génique de plusieurs enzymes stéroïdiennes, telles que StAR, CYP17 et 3β -HSD2 (Ohlsson et al., 2009). Cette étude a aussi démontré que le prochloraz inhibe l'activité enzymatique du CYP17, diminuant ainsi la conversion de la pregnénolone en DHEA. En diminuant l'efficacité du CYP17, le prochloraz mène donc à une augmentation du taux de progestérone dans les cellules H295R (Tinfo et al., 2011). De plus, ce pesticide diminue l'activité de l'enzyme 5α -réductase, induisant en plus une baisse du taux de DHT (Allera, Lo, King, Steglich, & Klingmuller, 2004).

5.4 Vinclozoline

La vinclozoline est un fongicide de la famille des carboximides. Son utilisation de plusieurs tonnes par années, qui se fait principalement dans les vignobles et tourbières, est encore largement répandue (Hoffmann & Kloas, 2010). Par contre, ce fongicide a été banni de l'Europe en 2006 (Auxietre et al., 2014). La vinclozoline se dégrade rapidement dans l'environnement en

deux principaux métabolites : l'acide buténoïque (M1) et l'énanilide (M2) (Laws, Carey, Kelce, Cooper, & Gray Jr, 1996). Cette conversion est réversible pour l'acide buténoïque, mais pas pour le second métabolite. La vinclozoline peut se retrouver dans les cours d'eau, grâce aux processus de ruissellement et de lessivage et se retrouver ensuite dans l'eau potable jusqu'à des concentrations maximales de $3,5 \times 10^{-10}$ M (Hoffmann & Kloas, 2010). La vinclozoline est bien connue pour ses effets antiandrogéniques, qui peuvent d'ailleurs être observés sur trois générations (Inawaka et al., 2009). La vinclozoline peut aussi mener à divers problèmes de développement neurologiques et sexuels (Clement et al., 2010).

5.4.1 Propriétés antiandrogéniques

Il a été démontré que ce fongicide et ses deux métabolites possèdent une action antiandrogénique. En effet, ils inhibent toute l'activité du AR, en compétitionnant directement avec son ligand (Clement et al., 2010). En se fixant au domaine de liaison du AR à la place de la DHT ou de la testostérone, ces composés sont internalisés dans le noyau et empêchent donc la transcription de gènes prolifératifs, tels que le PSA (Hoffmann & Kloas, 2010). Il a été démontré que la vinclozoline diminue à la fois les taux de PSA totaux et libre dans les cellules LNCaP (Lorenzetti et al., 2010). Ses deux métabolites M1 et M2 agissent de la même façon et sont même plus efficaces que la vinclozoline pour se lier au AR (Pothuluri, Freeman, Heinze, Beger, & Cerniglia, 2000). M1 agit comme antagoniste, mais M2 demeure plus efficace, et est davantage semblable au traitement flutamide (Auxietre et al., 2014). Par contre, M2 agit plutôt comme agoniste en absence de DHT (Laws et al., 1996). De plus, la vinclozoline augmente aussi le taux de dégradation du AR (Smolinsky, Doughman, Kratzke, & Lassiter, 2010). À un autre niveau, il a été démontré que la vinclozoline et ses deux métabolites inhibent l'enzyme 5 α -réductase (Wong, Kelce, Sar, & Wilson, 1995). Cependant, la vinclozoline n'est pas connue pour avoir des effets sur l'enzyme CYP17. Au niveau *in vivo*, la vinclozoline a démontré chez des fœtus de rats une augmentation de l'apoptose des cellules spermatogéniques, une baisse de la motilité des spermatozoïdes, des maladies rénales et prostatiques, ainsi que le développement tumoral (Clement et al., 2010). De plus, lors d'une exposition périnatale, ce pesticide induit des troubles de différenciations de la morphologie sexuelle masculine chez les rats (Laws et al., 1996). Les métabolites de la vinclozoline agissent aussi comme antagonistes du AR chez le rat. De plus, une exposition chronique peut entraîner le développement de tumeurs au niveau des

cellules de Leydig, des vésicules séminales et de la prostate (Laws et al., 1996). Une étude faite à l'aide d'un essai Hershberger a permis de démontrer que la vinclozoline induit une baisse du poids des vésicules séminales, de la prostate et des glandes de Cowper chez les rats exposés (Kang et al., 2004). Ces diminutions sont comparables aux résultats obtenus pour leur contrôle flutamide, un puissant antagoniste androgénique. Leur étude a aussi permis de démontrer que les organes les plus dépendants des androgènes sont les vésicules séminales, ainsi que la prostate. La vinclozoline retarde aussi la puberté chez les rats exposés, en plus d'induire une féminisation. Une autre étude a permis de démontrer que les effets antiandrogéniques du vinclozoline sur la génération F1 sont comparables au flutamide, mais pas de la même façon sur les autres générations (Anway, Rekow, & Skinner, 2008).

5.4.2 Propriétés oestrogéniques

Notre laboratoire a déjà démontré une activité éventuellement oestrogénique de ce composé, c'est-à-dire son effet sur l'induction de l'expression et l'activité de l'aromatase dans les cellules H295R (Sanderson et al., 2002). Parmi plusieurs pesticides testés lors de ces expériences, la vinclozoline s'est avérée le plus efficace inducteur de CYP19. En effet, ce pesticide augmente les taux d'AMPC, un effet qui peut aussi être observé avec l'atrazine, ce qui pourrait expliquer la voie par laquelle ces fongicides agissent sur l'aromatase (Sanderson et al., 2002).

6 LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Il existe plusieurs modèles stéroïdogéniques *in vitro* et *in vivo*. Pour toutes nos expériences, nous avons procédé *in vitro* avec deux lignées cancéreuses humaines, pour déterminer si les pesticides pourraient être utilisés comme traitements de cancers. Nous avons testés directement les pesticides, et non leurs métabolites. Ce sont des cytochromes P450 hépatiques qui les métabolisent. Ils ne sont donc pas exprimés ou non fonctionnel dans les H295R et les LNCaP. Pour certains effets, comme la phosphorylation, la durée d'exposition de seulement une heure est trop courte pour induire une métabolisation significative. Nous pourrions dans de futures expériences, tester les métabolites des pesticides, afin de savoir s'ils s'avèrent aussi efficace ou même plus efficace que les composés primaires dans un système physiologique complet.

6.1 Lignée cellulaire LNCaP

Le modèle androgénique que nous avons utilisé dans le cadre de nos études, est la lignée cellulaire cancéreuse de la prostate humaine. Celle-ci possède un AR fonctionnel et est sensible aux androgènes, ce qui est idéal pour tester les effets des pesticides sur le AR. Comparativement à d'autres lignées cellulaires prostatiques, comme les PC3 ou les 22Rv1, la prolifération des LNCaP est dépendante des androgènes (H. J. Kim, Park, & Dong, 2006). Le AR dans les cellules LNCaP est un mutant T877A (Grosse et al., 2012). Cette forme du récepteur répond non seulement aux androgènes, mais peut aussi se lier et être activée par les oestrogènes et les progestines, quoique avec une affinité réduite (Grigoryev, Long, Njar, & Brodie, 2000). Par contre, dans les LNCaP, le gène du AR n'est pas surexprimé (Makkonen, Kauhanen, Jaaskelainen, & Palvimo, 2011). Lorsque la quantité d'androgènes présents est faible, l'expression nucléaire du AR est plus faible, alors qu'une plus grande quantité de DHT induit cette translocation du AR au noyau (Pang et al., 2012). Le AR dans ces cellules est phosphorylé à un niveau basal, mais il est augmenté lorsqu'il y a présence d'androgènes (Van Laar & Trapman, 1991). Selon une étude menée sur les cellules LNCaP, la DHT stimule 1,81 fois la phosphorylation du AR (Van Laar & Trapman, 1991). De plus, selon plusieurs études, la demi-vie du AR serait située entre deux et quatre heures (Van Laar & Trapman, 1991). Ce type cellulaire provient d'un adénocarcinome métastatique sous-claviculaire d'un homme caucasien

de la cinquantaine (J.S. Horoszewicz et al., 1983). Ces cellules épithéliales nécessitent des androgènes dans leur milieu de culture pour se diviser. Ainsi, du sérum bovin fœtal (FBS) est ajouté à leur milieu de culture, ou directement de la DHT lorsque des traitements avec un milieu sans suppléments sont ajoutés. En plus de posséder un AR fonctionnel, les cellules LNCaP sécrètent le PSA (H. J. Kim et al., 2006). La DHT stimule la prolifération des LNCaP, ainsi que la synthèse de PSA de façon dose-dépendante (Berns, de Boer, & Mulder, 1993). Inversement, plus la quantité de PSA ajoutée est grande, moins la prolifération cellulaire est intense. La pregnénolone, la progestérone, ainsi que les oestrogènes possèdent aussi la capacité à stimuler la croissance des LNCaP et ce, à dose physiologique (Grigoryev et al., 2000). De plus, la lignée LNCaP est la seule à exprimer la PAPH (van Steenbrugge et al., 1989). Ces cellules étant peu adhérentes, nécessitent des flasques adhérentes. En effet, lors d'un simple passage, 30 % des cellules peuvent être perdues. Possédant une faible capacité d'adhérence, les LNCaP peuvent aussi se détacher spontanément lorsqu'elles sont à trop forte confluence (J. S. Horoszewicz et al., 1983). Ce type cellulaire n'exprime cependant pas l'enzyme du CYP17 (Jeong et al., 2011).

6.2 Lignée cellulaire H295R

Les cellules H295R, qui sont des cellules corticosurrénales cancéreuses humaines, ont été utilisées comme modèle de stéroïdogénèse, car elles expriment toutes les enzymes nécessaires aux différentes voies (Gazdar et al., 1990b). Nous avons choisi un modèle cancéreux, car cela permet de déterminer l'efficacité antiandrogénique des pesticides testés sur un CYP17 surexprimé, tel qu'il est présent dans les cancers de la prostate. Il est donc possible de déterminer si les pesticides ont des propriétés diminuant ou accentuant un cancer déjà existant. Dans les H295R, les CYPs peuvent être induits par des analogues d'AMPc ou par la forskoline, qui stimule l'adénylate cyclase (Sanderson et al., 2002). Ceci permet d'augmenter la stimulation de la protéine kinase A, menant ainsi à une augmentation de la transcription génique. Dans ces cellules, l'expression du CYP17 est inhibée par les androgènes (Biernacka-Łukanty, Lehmann, & Trzeciak, 2004). De plus, les H295R expriment toutes les protéines de transport nécessaires à la sécrétion des hormones stéroïdiennes (Gazdar et al., 1990a). Comme cette lignée cellulaire possède tous les enzymes de la stéroïdogénèse, elle est surtout préconisée pour les études portant

sur la production d'hormones sexuelles. Cette lignée est donc utile pour observer les effets des pesticides sur l'expression et l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse.

6.3 Modèles animaux

Lors d'un futur volet à notre projet, nous pourrions envisager l'utilisation de modèles *in vivo*. Le type d'essai de Hershberger est très utile pour déterminer les actions androgéniques ou antiandrogéniques de composés sur différents modèles de rongeur (Kang et al., 2004). Les avantages de ce type de bioessai sont la rapidité à obtenir les résultats et la spécificité relative aux composés androgéniques et antiandrogéniques (Kang et al., 2004). Ce type d'étude est donc utile pour déterminer les effets médiés par le AR ou encore les enzymes de la stéroïdogénèse. De plus, le modèle de rats Sprague Dawley, expriment aussi les récepteurs AR, ce qui fait d'eux un excellent modèle pour étudier les cancers hormonaux-dépendants (Fritz et al., 2002). Ce modèle animal a d'ailleurs été utilisé dans une étude portant sur l'effet d'une alimentation riche en phytoestrogènes sur la protection face au cancer de la prostate (Fritz et al., 2002). Cette étude a démontré qu'une diète enrichie en génistéine diminue l'expression du AR chez les rats, mimant ainsi l'effet probable du soya dans l'alimentation des Asiatiques.

7 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Les perturbateurs endocriniens peuvent posséder des activités pro- ou antiandrogéniques à différents niveaux cellulaires. Certains pesticides pourraient donc avoir divers impacts sur le taux de sécrétion de PSA, la localisation du AR, ainsi que son taux de phosphorylation. Afin de vérifier ces hypothèses, nous devons déterminer s'ils peuvent agir en augmentant ou en diminuant des réponses androgéno-dépendantes dans un système répondant au AR, soit les cellules LNCaP. Le deuxième mécanisme d'intérêt dans notre étude est la stéroïdogénèse, dont l'enzyme clé CYP17 et la 5 α -réductase, qui sont exprimées dans le modèle stéroïdogénique H295R. Nous avons émis comme hypothèse que dans les H295R, les pesticides peuvent influencer l'expression du CYP17 et de la 5 α -réductase, ainsi que le AR qui y est présent.

Nos objectifs de recherche étaient de déterminer l'effet de l'atrazine, du bénomyl, du prochloraz et de la vinclozoline, sur la synthèse de PSA, la localisation et l'expression du AR, l'expression du CYP17 et de la 5 α -réductase. Nous avons débuté les mêmes tests avec l'exposition à des néonicotinoïdes, une nouvelle classe de pesticides. Les résultats préliminaires se trouvent en annexe. Pour réaliser notre premier objectif, nous avons d'abord déterminé l'effet des pesticides sur la viabilité cellulaire des LNCaP, après stimulation à l'hormone DHT. Puis, nous avons déterminé si les pesticides peuvent influencer le taux de PSA sécrété. Nous avons comme objectif de déterminer l'effet des pesticides testés sur la localisation cellulaire du AR, à savoir si les pesticides influencent sa translocation nucléaire. Nous avons aussi déterminé si les pesticides modifient le taux de phosphorylation du AR sur différentes positions de sérines (sérine 81 et 210-213). Afin de réaliser le deuxième objectif de notre étude, nous avons évalué l'effet de la DHT sur le AR présent dans les H295R. Nous avons aussi déterminé les effets des pesticides sur l'expression du CYP17 et de la 5 α -réductase. Les pesticides démontrant des propriétés antiandrogéniques pourraient éventuellement être utilisés pour synthétiser de nouvelles molécules utilisées dans le traitement du cancer prostatique hormono-dépendant. En effet, plusieurs médicaments utilisés dans le traitement du cancer de la prostate sont des inhibiteurs d'enzymes stéroïdiennes ou des antagonistes du AR. Un pesticide possédant plus d'un effet antiandrogénique serait encore plus efficace pour réduire la progression d'un cancer de la

prostate. Par contre, l'antiandrogénicité de ces pesticides demeurent néfastes durant certains stades du développement, tels que lors du développement embryonnaire et à la puberté.

8 ARTICLE : ANTIANDROGENIC MECANISMS OF PESTICIDES IN HUMAN LNCAP PROSTATE AND H295R ADRENOCORTICAL CARCINOMA CELLS

Christina N. Robitaille, Patricia Rivest and J. Thomas Sanderson

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

Toxicological Sciences

8.1 Résumé de l'article

Plusieurs pesticides connus ou suspectés de posséder des effets perturbateurs endocriniens ont été testés pour leurs propriétés pro- ou antiandrogéniques, en déterminant leurs effets sur la viabilité, la sécrétion de PSA et l'expression du AR, dans les cellules humaines cancéreuses de la prostate LNCaP androgéno-dépendantes. Nous avons aussi évalué leurs effets sur l'expression et l'activité catalytique de l'enzyme CYP17 dans les cellules cancéreuses corticosurrénales humaines H295R, comme modèle de stéroïdogénèse *in vitro*. Le bénomyl, le prochloraz et la vinclozoline, mais pas l'atrazine, diminuent de manière concentration-dépendante, la viabilité des cellules LNCaP stimulée avec la DHT, sans causer de cytotoxicité (1-30 μM ; 96 h d'exposition). Tous les pesticides, sauf l'atrazine, diminuent la sécrétion de PSA par les LNCaP stimulées à la DHT, à des concentrations ≥ 1 μM après 24 h d'exposition. Le bénomyl et la vinclozoline (24 h d'exposition) diminuent de manière concentration-dépendante, l'accumulation nucléaire du AR stimulée par la DHT, dans les cellules LNCaP. Le bénomyl, le prochloraz et la vinclozoline (≥ 10 μM) diminuent aussi les niveaux de AR phosphorylé en position sérine 81 et 210/213, après 1 h d'exposition. Le bénomyl (30 μM) et le prochloraz (10 μM), mais pas l'atrazine ni la vinclozoline, diminuent l'expression génique et protéique du CYP17 dans les cellules H295R (24 h d'exposition). Dans le cas du prochloraz, une part de l'effet est probablement due à sa toxicité dans les cellules H295R à des concentrations plus grandes ou égales à 10 μM .

8.2 Contribution de l'étudiante à l'article

Antiandrogenic mechanisms of pesticides in human LNCaP prostate and H295R adrenocortical carcinoma cells

Publié dans *Toxicological Sciences*

Les résultats présentés dans l'article ont été obtenus par deux étudiantes du laboratoire. Patricia Rivest, une étudiante graduée à la maîtrise dans notre laboratoire, a procédé aux tests préliminaires de la viabilité androgéno-dépendante des cellules LNCaP exposées aux pesticides atrazine, bénomyl et vinclozoline. Elle a aussi procédé aux expérimentations préliminaires portant sur la production du PSA et la localisation nucléaire du AR dans les cellules LNCaP. J'ai ensuite reproduit et complété les expériences de Patricia avec les trois pesticides mentionnées et j'ai procédé à l'évaluation des effets antiandrogénique du pesticide prochloraz. J'ai aussi procédé à toutes les manipulations concernant l'expression du AR phosphorylé dans les LNCaP, ainsi que du AR présent dans les H295R. J'ai aussi effectué toutes les expérimentations portant sur l'expression et l'activité de l'enzyme CYP17, ainsi que la viabilité des cellules H295R. Nous tenons à remercier Sébastien Algerola pour les résultats portant sur l'expression génique de l'enzyme 5 α -réductase dans les deux lignées cellulaires.

Antiandrogenic mechanisms of pesticides in human LNCaP prostate and H295R adrenocortical carcinoma cells

Christina N. Robitaille, Patricia Rivest and J. Thomas Sanderson

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

ABSTRACT

Several pesticides suspected or known to have endocrine disrupting effects were screened for pro- or antiandrogenic properties by determining their effects on proliferation, prostatic specific antigen (PSA) secretion and androgen receptor (AR) expression and phosphorylation in androgen-dependent LNCaP human prostate cancer cells. We also evaluated their effects on the catalytic activity of the enzyme *CYP17* and the gene expression of *CYP17* and *SRD5A1*, as well as for the presence of AR protein in H295R human adrenocortical carcinoma cells, an *in vitro* model of steroidogenesis. Benomyl, vinclozolin and prochloraz, but not atrazine, concentration-dependently decreased dihydrotestosterone-(DHT)-stimulated proliferation of LNCaP cells, without causing cytotoxicity (1-30 μM ; 96 h exposure). All pesticides, except atrazine, decreased DHT-stimulated PSA secretion by LNCaP cells at concentrations ≥ 1 μM after a 24 h exposure. Benomyl and vinclozolin (24 h exposure) concentration-dependently decreased DHT-stimulated AR nuclear accumulation in LNCaP cells. Benomyl, vinclozolin and prochloraz (≥ 10 μM) also decreased levels of AR phosphorylated on serines 81 and 213 after a 1 h exposure. Benomyl (30 μM) and prochloraz (10 μM), but not vinclozolin or atrazine, decreased levels of *CYP17* gene and protein expression in H295R cells (24 h exposure). None of the pesticides affected *SRD5A1* expression levels in H295R cells.

1. Introduction

Accumulating evidence implicates certain pesticides in causing endocrine disrupting effects that can be associated with reproductive and developmental dysfunction as well as with an increased risk of development of hormone-dependent cancers. Many studies focus on estrogenic effects, but pro- or antiandrogenic mechanisms of action of endocrine disruptors

have not been investigated in the same detail. A notable exception is the fungicide vinclozolin, which has been reported to directly antagonize the androgen receptor (AR), thus preventing its activation by endogenous androgens such as testosterone and dihydrotestosterone (DHT). The consequence of this disruption is a demasculinization of male offspring in rats exposed to vinclozolin for the full duration of pregnancy (Gray Jr, 1998) and alterations in

androgen-dependent developmental processes such as prostate growth and androgen-mediated gene expression in this tissue in adult male rats (Kelce, Lambright, Gray, & Roberts, 1997).

Pesticides may act via various potential mechanisms to cause disruption of androgen function, which beside an interaction with steroid hormone receptor, such as the AR, as exemplified by vinclozolin, may include interferences with the function of steroidogenic enzymes or 'cross-talk' pathways that influence AR signalling by altering AR phosphorylation or degradation. The androgen receptor (AR) is a key target for pro- or antiandrogenic compounds and is involved in (sexual) development in both males and females, as well as in the progression of certain hormone-dependent cancers such as that of prostate. Key steroidogenic enzymes that may be targeted by androgen-disrupting chemicals are CYP17, which is responsible for the synthesis of precursors for all androgens, and SRD5A1/2 which converts testosterone to the significantly more potent androgen DHT.

Given the time-consuming and expensive aspects of *in vivo* experiments to determine disruptive effects of chemicals on androgenic function, a number of *in vitro* tools have been developed and applied to the rapid screening of pro- or antiandrogenic effects of compounds of interest (Beck, Reiter, & Jungbauer, 2008; Kollé et al., 2010; Sohoni & Sumpter, 1998). In the

present study, we used LNCaP human prostate cancer cells, which express functional AR, to screen the effects of several pesticides suspected or known to have endocrine disrupting effects on androgen-dependent cell proliferation, prostatic specific antigen (PSA) secretion, SRD5A1 expression and phosphorylation and nuclear accumulation of AR. We used H295R human adrenocortical carcinoma cells as a model of steroidogenesis to determine effects of pesticides on the function of the androgen synthesizing enzymes CYP17 and SRD5A1.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

LNCaP human prostate carcinoma cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and grown in RPMI 1640 medium (Life Technologies; Cat. No. 21870-076) supplemented with 1% L-glutamine (21051-024), 1% penicillin/streptomycin (15070-063), 1% HEPES buffer (15630-080), 10% fetal bovine serum (FBS) (12483-020) and 1% sodium pyruvate (11360-070). Cells were exposed to pesticides in phenol red-free medium (11835-030), supplemented with 2% dextran/charcoal-stripped FBS (12676-011). Pesticides and DHT were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) as 1000-fold stock solutions.

H295R human adrenocortical carcinoma cells (ATCC) were grown in Dulbecco' Modified

Eagle's medium with phenol red, complemented with 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1% insulin-transferrin/sodium selenite/bovine serum albumin/linoleic acid (ITS+1) (Sigma-Aldrich, MO) and 2.5% Nu-serum (BD Biosciences). H295R cells were seeded in Dulbecco medium without supplement, when exposed with hormones treatments.

2.2. *Cell proliferation and viability*

LNCaP cells were seeded in 96-well plates (5×10^3 cells/well) in phenol red- and steroid-free medium and acclimatized for 24h. Cells were then exposed to fresh medium containing 1, 3, 10 or 30 μM pesticides in presence or absence of 0.1 nM DHT; cells were re-exposed to identical treatments in fresh medium 24 h later and after another 72h the number of viable cells was determined using a WST-1 cell viability kit (Roche, Mississauga, Canada). Cells were incubated with WST-1 substrate for 2h, after which the formation of formazan was quantified by measuring its absorbance at a wavelength of 440 nm and a reference wavelength of 630 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). H295R cell viability was determined in 24-well plates (5×10^4 cells/well) using a WST-1 assay after a 24 h exposure to 1, 3, 10, 30 or 100 μM of each pesticide.

2.3. *PSA secretion*

LNCaP cells (0.3×10^4 cells/well) in 12-well plates (Corning) were exposed to pesticides with or without 0.3 nM DHT for 24h, after which medium was collected and centrifuged. PSA levels were determined using a commercial enzyme-linked immunoabsorbance assay kit (No. EL10050; Anogen, Mississauga, ON, Canada). Media from cells treated without DHT were diluted 10 times and from those treated with DHT 20 times prior to assay. Cellular protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and PSA secretion levels were expressed in ng per 100 ng cellular protein.

2.4. *AR expression and phosphorylation*

LNCaP cells (5×10^5 cells/well) in 6-well plates (Corning) were exposed to pesticides in the presence or absence of 10 nM DHT for 24h, after which cytoplasmic and nuclear proteins were extracted using a NE-PER extraction kit (Pierce, IL). Nuclear proteins (25 μg) were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) by migration for 1h through a 10% SDS-PA gel at 150 V, after which proteins were transferred over a 10 min period to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad). Membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 5% milk powder for 1h and then

incubated overnight in the same blocking buffer containing primary antibody.

H295R cells (5.5×10^5 cells/well) were treated with various concentrations of DHT, and with 10 μ M vinclozolin in the presence or absence of 10 nM DHT, after which AR protein levels were determined in total lysates, as described for LNCaP cells above.

Phosphorylated AR levels were determined in total lysates of LNCaP or H295R cells exposed for 1, 6 or 24 h to pesticides with or without DHT. When using phospho-antibodies, the blocking buffer contained bovine serum albumin instead of milk. Primary antibodies against AR were PG-21 (Cat No. FCABS415PE, Millipore, Billerica, MA), p-AR-Ser81 (07-1375, Millipore) and p-AR-Ser210/213 (ab45089, Abcam, Cambridge, UK). Secondary antibodies were horse radish peroxidase-conjugated antirabbit (31210, Pierce) for AR and p-AR-Ser81, and HRP-conjugated antimouse (31172, Pierce) for p-AR-Ser210/213. Protein bands were made visible by immunofluorescence, with Clarity Western ECL substrate (170-5061) and a ChemiDoc MP Imager (Biorad). Densities of the protein bands were analysed by Image Lab Software (Bio-Rad).

2.5. *CYP17 and SRD5A gene expression*

Gene expression was quantified by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR). H295R or LNCaP cells

(5.5×10^5 cells/well) were added to 6-well plates in 4 ml of medium and acclimatized for 24h. Cells were then exposed to fresh medium containing the pesticides atrazine benomyl, vinclozolin or prochloraz. Forskoline (10 μ M) was used as a positive control for *CYP17* gene induction to verify the responsiveness of the H295R cells. DHT was used as a positive control for *SRD5A1* induction to verify the responsiveness of LNCaP cells. Wells without cells were used as negative controls. Total RNA was extracted using a High Pure RNA Isolation kit (Cat. No. 11828665001, Roche, Mississauga, Canada). RNA was quantified by measuring its absorbance at a wavelength of 260 and 280 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer. After reverse transcription using a Thermocycler T3000 (Biometra, Germany), 1 μ g of the resultant cDNA was amplified by PCR using a Thermal Cycler C1000 (Biorad, CA) and primers that selectively recognized either *CYP17* (fw: 5'-GCC-TTC-CTG-CTG-CAC-AAT-CCT; rv: 5'-AAA-CTC-ACC-GAT-GCT-GGA-GTC-AAC-3'; amplicon: 207 bp), *SRD5A1* (fw: 5'-GCG-AGG-AGG-AAA-GCC-TAT-GC-3'; rv: 5'-CAG-GGC-ATA-GCC-ACA-CCA-CT-3'; amplicon: 316 bp) or *SRD5A2* (fw: 5'-ATT-GCG-CCA-GCT-CAG-GAA-G-3'; rv: TGG-AAT-AAG-GGC-TTT-CCG-AGA-T-3'; amplicon: 256 bp) (Soderstrom et al., 2001). The reference genes β -actin and glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase

(GAPDH) were verified to be suitable for use to normalise gene expression.

2.6. *CYP17 protein expression*

H295R cells (5.5×10^5 cells/well) were added to 6-well plates in 4 ml of medium and acclimatized for 24h. Cells were exposed to fresh medium containing pesticides (atrazine 30 μ M, benomyl 30 μ M, prochloraz 10 μ M and vinclozolin 30 μ M) or forskolin 10 μ M, as positive control. We also used a well with DMSO, as control. Proteins were extracted using a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Sigma-Aldrich) with 1% anti-protease and 1% anti-phosphatase. The amount of total protein extracted was determined using a bicinchoninic acid (BCA) kit (Pierce, IL). This colorimetric test is based on the reduction of Cu^{2+} to Cu^+ by proteins in alkaline medium. Proteins were quantified by measuring the absorbance of Cu^+ at a wavelength of 562 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer. Total protein (50 μ g) underwent SDS-PAGE and immunoblotting, using same protocol as for AR, except with CYP17-selective anti-rabbit antibodies at a 1:100 dilution (Cat. No. 14447-1-AP, Acris, CA) and HRP-conjugated secondary anti-rabbit antibodies 1:5000 dilution (Cat. No. 31210, Pierce).

2.8. *CYP17 catalytic activity*

H295R cells (5×10^4 cells/well) were added to 24-well plates in 1 ml medium and acclimatized for 24h. Cells were then exposed to

pesticides in fresh medium for another 24 h, after which the medium was replaced with fresh medium without supplements, containing 100 nM of the CYP17 substrate pregnenolone and 5 μ M of the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) inhibitor trilostane to prevent conversion of pregnenolone to progesterone. After a 90 min incubation, the reaction medium was removed and dehydroepiandrosterone (DHEA) content was quantified using an ELISA kit (EIA3415; DRG Intl., NJ). This assay design allowed for the integrated measurement of both the 17α -hydroxylase and $17,20$ -lyase activity of CYP17 without the rapid loss of either substrate or product via 3β -HSD-mediated reactions, which are known to be strong in H295R cells (Canton et al., 2006).

2.9. *Statistical analysis*

Results were presented as means with standard errors. Statistically significant differences (* $p < 0.05$) from control were determined by Student t-test or by one-way analysis of variance (ANOVA) and a Dunnett post-hoc test to correct for multiple comparisons to control. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Antiandrogenic effects in LNCaP cells

None of the pesticides affected basal LNCaP cell proliferation under steroid-deprived conditions at concentrations between 1 and 30 μM (Fig 8.1A). An incubation of LNCaP cells with 0.1 nM DHT increased cell proliferation by 5-6 fold above control (Fig 8B), which corresponded to a 75% effective concentration (EC_{75}) for this response, which was consistent with our previous studies (Rivest, Renaud, & Sanderson, 2011). Passage number had a strong effect on androgen-stimulated cell proliferation, with passage numbers above 18 resulting in strongly diminished stimulation, as reported previously (Sanderson et al., 2013). DHT-stimulated LNCaP cell proliferation was reduced concentration dependently and statistically significantly by benomyl, vinclozolin and prochloraz, but not by atrazine (Fig. 8B). At 30 μM , benomyl, vinclozolin and prochloraz reduced DHT-stimulated cell proliferation by 55, 60 and 88 %, respectively.

None of the pesticides at concentrations between 1 and 30 μM affected basal secretion of PSA by steroid-deprived LNCaP cells (Fig 8.2A). DHT at an EC_{75} of 0.3 nM increased PSA secretion by LNCaP cells by about 3-fold (Fig 2B). DHT-stimulated PSA secretion decreased concentration dependently after exposure to benomyl, prochloraz and vinclozolin, but not

atrazine (Fig. 8.2B). These decreases were statistically significant at concentrations of 1 μM and above, with inhibition between 90 and 100% at each concentration.

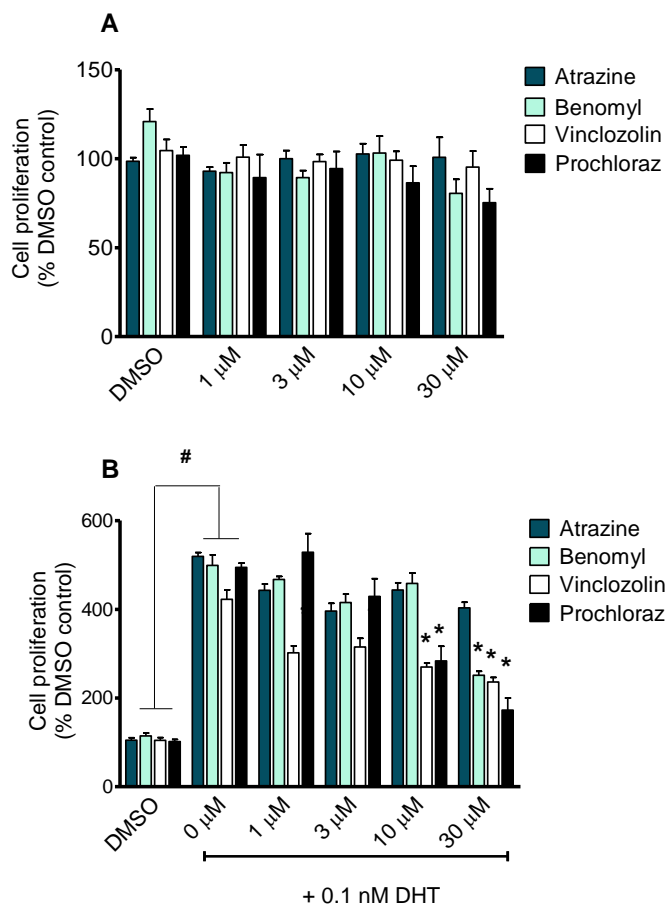


Figure 8-1: Proliferation of LNCaP cells exposed to atrazine, benomyl, vinclozolin or prochloraz in absence (A) or presence (B) of 0.1 nM DHT.

Proliferation rates were expressed as a percentage of DMSO control. (#) A statistically significant difference between DHT and DMSO control; Student t-test; $p < 0.05$. (*) A statistically significant differences of pesticide treatment from either DMSO (A) or DHT (B) controls; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; $p < 0.05$. Experiments were performed in triplicate; per experiment, each concentration was tested in triplicate.

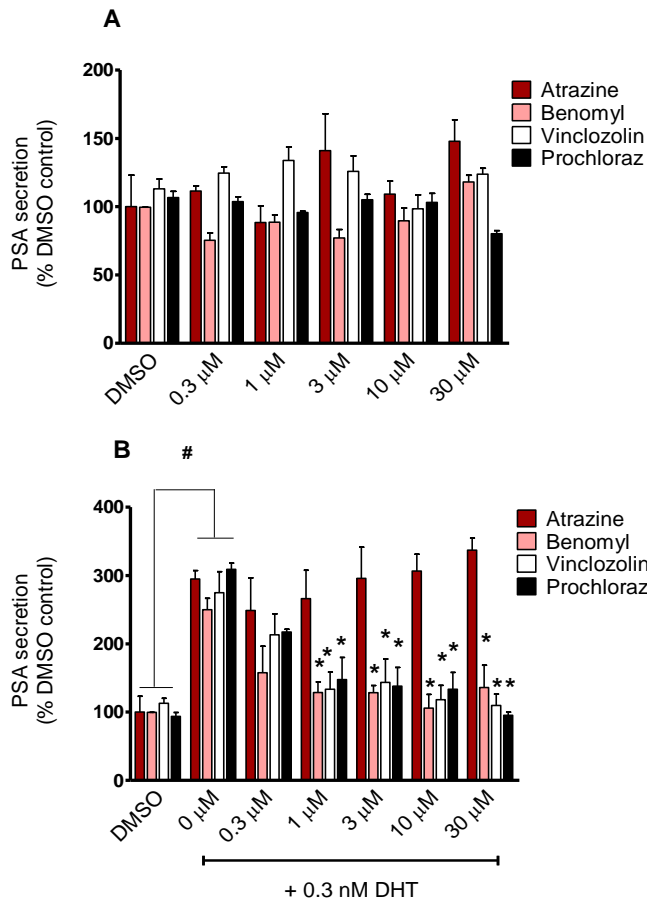


Figure 8-2: PSA secretion by LNCaP cells exposed for 24h to atrazine, benomyl, vinclozolin or prochloraz in absence (top) or presence (bottom) of 0.3 nM DHT.

PSA secretion levels were expressed as a percentage of DMSO control. (#) A statistically significant difference between DHT and DMSO control; Student t-test; $p < 0.05$. (*) A statistically significant differences of pesticide treatment from either DMSO (A) or DHT (B) controls; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; $p < 0.05$. Experiments were performed in triplicate; per experiment, each concentration was tested in triplicate.

DHT at an EC_{75} of 10 nM increased levels of AR in the nucleus of LNCaP cells by about 4- to 6-fold after a 24 h exposure (Fig 8.3). Benomyl (10 μ M) and vinclozolin (1 and 10 μ M) significantly reduced the DHT-stimulated increase in nuclear AR levels after a 24 h exposure (Fig. 8.3). To assess whether AR levels stimulated by DHT were phosphorylated at positions known to convey transcriptional activity to the receptor (Gioeli, Ficarro, Kwiek, Aaronson, Hancock, Catling, et al., 2002; Gioeli & Paschal,

2012), we determined the effects of DHT and the pesticides on levels of AR phosphorylated at serine positions 81 and 213. A preliminary concentration and time-course experiment showed that levels of phosphorylated AR were highest after a 1 h exposure to 10 nM DHT (not shown). The fungicides vinclozolin (10 and 30 μ M), benomyl and prochloraz (30 μ M) decreased the DHT-mediated phosphorylation of AR on serine positions 81 and 213 (Fig. 8.4).

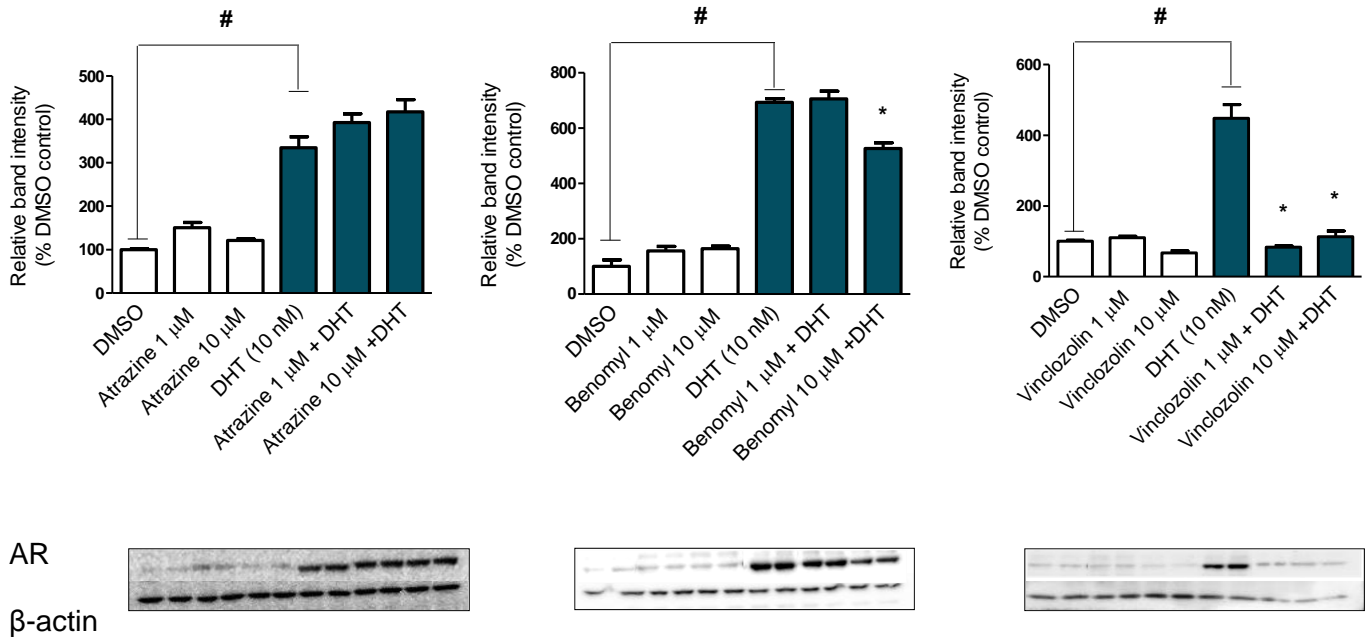
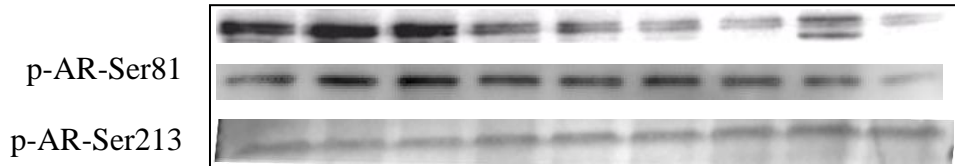
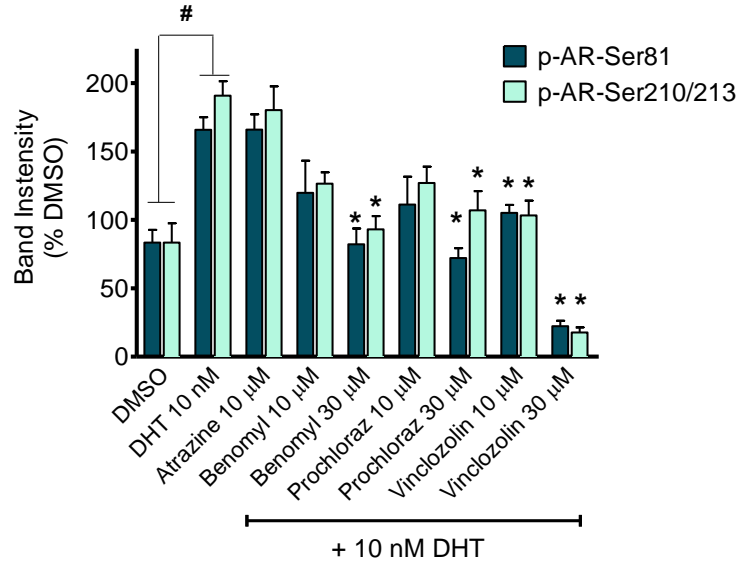


Figure 8-3: Nuclear accumulation of AR in LNCaP cells exposed for 24h to atrazine, benomyl or vinclozolin in absence or presence of 10 nM DHT.

B-actin was used as reference protein. Relative protein levels were expressed as a percentage of the DMSO control. (#) A statistically significant difference between DHT and DMSO control; Student t-test; $p < 0.05$. (*) A statistically significant differences of pesticide treatment from DHT control; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; $p < 0.05$. Experiments were performed in triplicate; per experiment, each concentration was tested in duplicate (as shown here in representative gels).



amido black

Figure 8-4: Levels of AR phosphorylated at positions Ser81 or Ser213 in LNCaP exposed for 1h to pesticides in the presence of 10 nM DHT.

Relative protein levels, normalized with Amido Black, were expressed as a percentage of DMSO control. (#) A statistically significant difference between DHT and DMSO control; Student t-test; $p < 0.05$. (*) A statistically significant difference of pesticide treatment from DHT control; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; $p < 0.05$. Experiments were performed twice with each treatment in duplicate.

3.2. CYP17 expression and catalytic activity in H295R

As an alternate mechanism of pro- or antiandrogenicity, the effects of the pesticides on CYP17 expression and catalytic activity were evaluated in H295R cells, as we did not detect CYP17 activity in LNCaP cells (not shown). To differentiate inhibitory effects from possible cytotoxicity, the viability of H295R cells was determined after a 24 h exposure to each pesticide

(1-100 μM). Prochloraz was cytotoxic at concentrations of 10 μM and above; vinclozolin was cytotoxic at 100 μM (Fig 8.5). Exposure to benomyl (30 μM) and prochloraz (10 μM) decreased CYP17 gene expression in H295R cells (Fig. 8.6A). These two pesticides also decreased CYP17 protein expression (Fig. 8.6B). As a measure of CYP17 activity, DHEA concentration decreased in H295R cells exposed to benomyl (30 μM) and prochloraz (1 and 10 μM) (Fig. 8.6C).

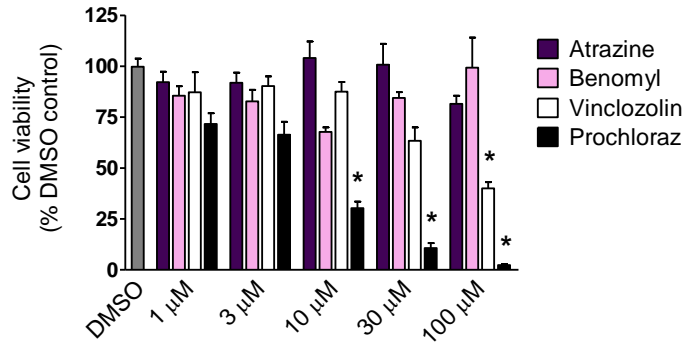


Figure 8-5: Viability of H295R cells exposed for 24h to atrazine, benomyl, vinclozolin or prochloraz expressed as a percentage of DMSO control.

(*) A statistically significant difference of pesticide treatment from DHT control; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; $p < 0.05$. Experiments were performed twice and each treatment in triplicate.

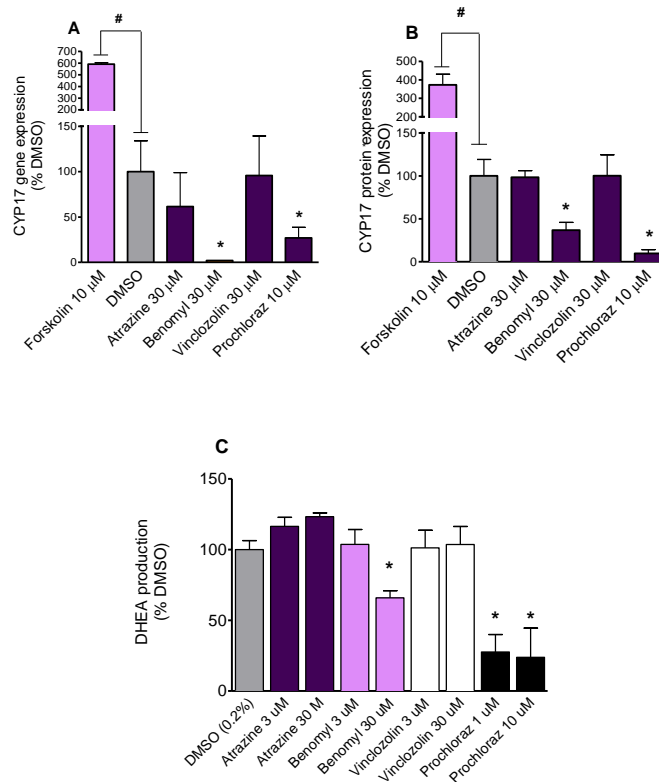


Figure 8-6 : Relative CYP17 gene (A) and protein (B) expression in H295R cells exposed for 24h to atrazine, benomyl, vinclozolin or prochloraz.

Forskolin was used as a positive control for induction of CYP17. (C) The effects of a 24 h exposure to atrazine, benomyl, vinclozolin and prochloraz on DHEA production in H295R cells stimulated with 100 nM pregnenolone in the presence of 5 μM trilostane. CYP17 gene expression, protein expression and catalytic activity were expressed as % of DMSO controls. (#) A statistically significant difference between forskolin treatment and DMSO control; Student t-test; $p < 0.05$. (*) A statistically significant difference of pesticide treatment from DMSO control; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; $p < 0.05$.

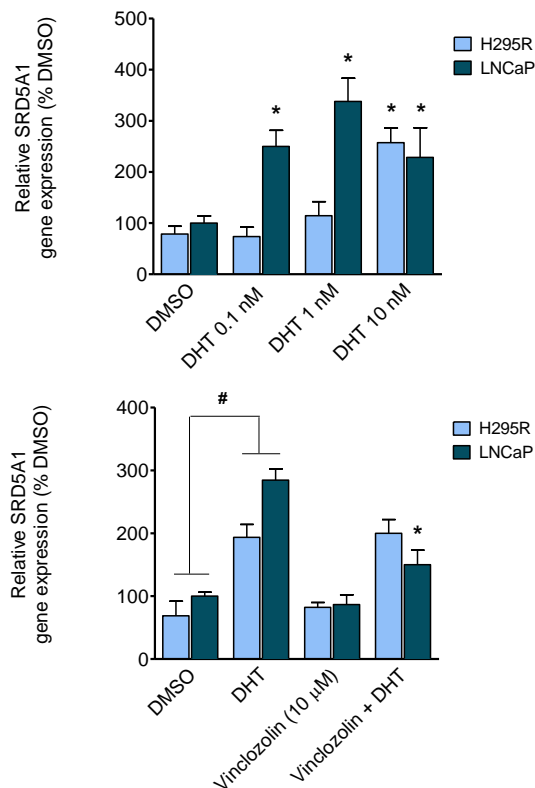


Figure 8-7: Relative *SRD5A1* expression in H295R and LNCaP cells determined by RT-qPCR.

(A) Cells were exposed to various concentrations of DHT for 24 h. (B) Cells were exposed for 24 h to 10 µM vinclozolin in the presence or absence of 0.1 (LNCaP) or 10 (H295R) nM DHT. (#) A statistically significant difference between DHT and DMSO control; Student t-test; $p < 0.05$. (*) A statistically significant difference of pesticide treatment from DHT control in LNCaP cells only; Student t-test; $p < 0.05$. Experiments were performed twice in triplicate.

3.3. *SRD5A1* expression in H295R and LNCaP cells

Another possible steroidogenic mechanism of pro- or antiandrogenicity is a chemical-induced change in the expression of *SRD5A1*. We found similar levels of *SRD5A1* gene expression in H295R and LNCaP cells; neither cell line expressed *SRD5A2* (not shown). In both cell lines, *SRD5A1* gene expression was inducible by DHT, although statistically significant increases occurred at a ten-fold lower concentration in LNCaP than H295R cells (Fig 8.7A). DHT-mediated induction of *SRD5A1* expression was decreased statistically significantly by 10 µM vinclozolin in LNCaP but not H295R cells (Fig. 8.7B). Similarly, neither atrazine (30 µM),

benomyl (30 μM) nor prochloraz (1 μM) had an effect on SRD5A1 expression in H295R cells (not shown).

3.4. AR expression in H295R cells

The similar induction of SRD5A1 expression by DHT in LNCaP and H295R cells suggests that H295R cells contain functional AR. We found that AR was expressed at relatively high basal levels in H295R cells, but that its expression was not increased by a 24 h exposure to 10 nM DHT. Neither did a 24 h exposure to vinclozolin in the presence or absence of DHT have any effect on AR expression relative to control (Fig 8.8.). In addition, we did not observe increased phosphorylation of p-AR-Ser81 in response to DHT and failed to detect any phosphorylation of AR at Ser213.

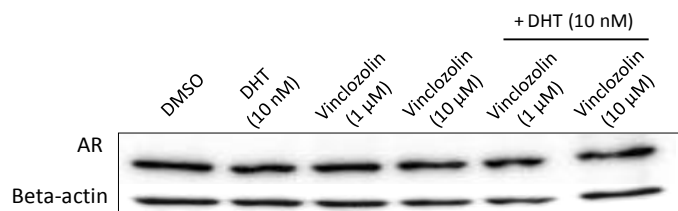


Figure 8-8 : AR protein expression levels in H295R cells exposed for 24 h to DMSO (0.1%), DHT (10 nM) or 1 or 10 μM vinclozolin in the presence or absence of DHT.

None of the treatments had a statistically significant effect on AR levels compared to DMSO control.

4. Discussion

4.1. Antiandrogenic effects in LNCaP cells

Our results using LNCaP cells confirm that certain pesticides, in particular vinclozolin, exert antiandrogenic effects, such as reduced DHT-stimulated LNCaP cell proliferation (Fig 8.1), PSA secretion (Fig 8.2) and nuclear AR accumulation (Fig 8.3). Prochloraz and benomyl appeared to act similar to vinclozolin, although benomyl was less potent. The observed antiandrogenic effects of vinclozolin are consistent with other studies of its endocrine disrupting properties, which have been attributed specifically to an interference with AR ligand-binding, resulting in disrupted male development and demasculinization (Gray, Ostby, Monosson, & Kelce, 1999; Gray, Ostby, & Kelce, 1994; R. Kavlock & Cummings, 2005; Kubota et al., 2003).

Prochloraz has been also reported to have antiandrogenic effects *in vivo* and *in vitro* (Vinggaard et al., 2005; Vinggaard, Nellemann, Dalgaard, Jorgensen, & Andersen, 2002), but benomyl has not been associated with any antiandrogenic activity, neither *in vitro* nor *in vivo* (Scippo et al., 2004; Yamada et al., 2005). However, we find that benomyl, at least at 30 μ M reduces DHT-stimulated LNCaP cell proliferation and PSA secretion, as well as decreased nuclear AR accumulation and AR phosphorylation on serine positions 81 and 213.

Atrazine did not exert any antiandrogenic effects in LNCaP cells. This is also consistent with the known behaviour of atrazine, which although it has clear endocrine disrupting properties, these are estrogenic and feminizing in nature (Belloni et al., 2011; T. Hayes et al., 2002a; Roy, Chakraborty, & Chakraborty, 2009; Wilhelms, Fitzpatrick, Scanes, & Anderson, 2006) and not related to an interaction with the androgen receptor signalling pathway (Vinggaard, Niemela, Wedebye, & Jensen, 2008).

The antiandrogenic potencies of the pesticides appeared to be dependent on the nature of the DHT-stimulated response in question. This may in part have to do with the amount of DHT required to exert an specific androgenic effect in LNCaP cells (under our conditions). Far less DHT was required to induce LNCaP cell proliferation or PSA secretion, than to observe significant nuclear AR accumulation. It is probable that far greater receptor occupancy is required for AR protein stabilisation, which is the main mechanism of androgen-mediated increases in cellular and nuclear AR levels (Zhou, Lane, Kemppainen, French, & Wilson, 1995), than for other more sensitive AR signalling responses.

4.2. *AR phosphorylation in LNCaP cells*

We are the first to report that certain pesticides can inhibit the androgen-induced phosphorylation of AR at sites known to be associated with increased translational activity (Gioeli, Ficarro, Kwiek, Aaronson, Hancock, Catling, et al., 2002; Gioeli & Paschal, 2012; Y. Koryakina, Ta, & Gioeli, 2014). The DHT-induced phosphorylation of AR on positions serine 81 and 213, which reside in the N-terminal domain of the receptor, is reported to convey transactivational activity, possibly by enhancing the interaction of this domain with AR co-activating factor, AF-1 (Gioeli, 2005). It is thought that the binding of DHT to the AR induces a conformational change that increases exposure of the phosphorylation site(s) to kinases. Cyclin-dependent kinases CDK1 (S. Chen, Y. Xu, X. Yuan, G. J. Bublely, & S. P. Balk, 2006a), CDK9

(Gordon et al., 2010) and CDK5 (Hsu et al., 2011) have been reported to phosphorylate AR on Ser81, which is highest stoichiometric phosphorylation site stimulated by DHT. Ser81 phosphorylation results in reduced ubiquitination of AR, and subsequent protein stabilization and rapidly increased intracellular levels of AR in the absence of increased AR gene expression (S. Chen et al., 2006a; Hsu et al., 2011). The Ser213 position is phosphorylated by Akt, which has an established role in sustained proliferation of prostate cancer cells when over expressed due to a loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) activity, which normally keeps levels of the PI3K substrate phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate low enough to suppress PI3K/Akt-mediated proliferative signalling (Mulholland, Dedhar, Coetzee, & Nelson, 2005).

Benomyl, vinclozolin and prochloraz reduced levels of phosphorylated p-AR-Ser81 and p-AR-213, indicating that these pesticides are effectively reducing the transactivational capacity of the AR. This is likely caused by preventing DHT from interacting with the ligand binding domain of the AR, given both AR phosphorylation sites are reduced to a similar extent. However, other possible mechanisms could also play a role, such as inhibition by the pesticides of various kinase activities or the stimulation of specific phosphatases, such as PPA2 which is known to dephosphorylate AR at position Ser81 (Yang et al., 2007). Infact, these mechanisms are interdependent, as pesticide-mediated blockade of androgen-binding to the AR would reduce exposure of the phospho-sites to kinases as well as enhance the recruitment of phosphatases, which would not normally be able to target androgen-bound AR (Yang et al., 2007).

4.3. Steroidogenic effects in H295R cells

We demonstrated that benomyl decreased *CYP17* gene expression as well as protein levels and catalytic activity in H295R cells. The genetic down-regulation of this enzyme by benomyl has not been reported previously. *CYP17* expression is under the control of steroidogenic factor-1 (SF-1) in human adrenal cortex and in H295R cells.

Prochloraz was a strong inhibitor of *CYP17* gene and protein expression, although this occurred at a concentration (10 μ M) that was partially toxic to the cells. However, prochloraz inhibited the catalytic activity of *CYP17* by 73% at a non-cytotoxic concentration of 1 μ M, which is consistent with previous reports.

To our knowledge, we report for the first time that H295R cells express *SRD5A1* and *AR*. *SRD5A1* is an AR-responsive gene, which is induced by potent androgens, as we found

previously in LNCaP cells (Gasmi & Sanderson, 2010). Here we show that *SRD5A1* gene expression is induced in both LNCaP and H295R cells (Fig 7), suggesting that AR may control similar genes in both cell types. However, the functions of AR in H295R cells are unknown and the receptor does not respond to androgens with increased intracellular levels. Nor did the AR antagonist vinclozolin reduce the induction of SRD5A1 in H295R cells, whereas it did so in LNCaP cells. The apparently high constitutive level of p-AR-Ser81 and lack of p-AR-Ser213, suggest different kinases play a role in AR phosphorylation and subsequent AR-signalling in H295R cells. The relevance of AR expression in H295R cells given the role of this cell line as a screening tool for chemical interferences with steroidogenesis is, thus far, unknown.

9 DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Le présent mémoire a permis d'évaluer certains des mécanismes d'action antiandrogéniques des pesticides étudiés dans deux lignées cellulaires distinctes. En effet, le modèle cellulaire LNCaP nous a permis d'évaluer les effets pro-/antiandrogéniques des pesticides sur la fonction du AR, alors que le modèle stéroïdogénique H295R nous a permis d'évaluer les effets pro-/antiandrogéniques des pesticides sur l'enzyme CYP17. Tel qu'attendu, nous avons aussi confirmé que le modèle LNCaP n'exprime pas le CYP17. De plus, nous avons pu évaluer l'effet de la DHT sur l'enzyme 5 α -réductase dans les deux types cellulaires et nous avons aussi démontré la présence du AR dans le modèle H295R. Cependant, celui-ci ne répond pas de façon similaire au AR présent dans les LNCaP. En effet, l'expression de cette forme du récepteur n'est pas influencée par la présence de DHT. D'autres expériences seraient nécessaires afin de déterminer la fonction du AR présent dans les cellules H295R.

Nos résultats ont permis de confirmer des effets antiandrogéniques connus ou suspectés de certains pesticides. Tel qu'attendu, l'atrazine n'a démontré aucun effet antiandrogénique dans les deux modèles cellulaires étudiés. D'ailleurs, la littérature suggère que cet herbicide empêche la liaison du AR avec la DHT. Aucune des concentrations d'atrazine testées n'ont démontré une baisse de viabilité cellulaire des LNCaP induites à la DHT. Si certains auteurs suggèrent que l'atrazine peut augmenter l'expression d'enzyme de la stéroïdogénèse, nous n'avons pas démontré d'effet de l'atrazine sur le CYP17. L'atrazine agirait davantage sur le CYP19, qui converti les androgènes en oestrogènes. L'atrazine aurait tout de même plusieurs effets néfastes sur la santé environnementale et humaine, en féminisant certaines espèces et en diminuant la fertilité masculine.

Le bénomyl a démontré une diminution de la viabilité cellulaire des LNCaP. Ce pesticide est plutôt connu pour ses effets féminisant, mais nous avons pu déterminer qu'il possède aussi des propriétés antiandrogéniques. En effet, nos expérimentations ont permis de démontrer que ce composé diminue la sécrétion de PSA en présence de DHT. De plus, le bénomyl induit une baisse significative de l'expression nucléaire du AR dans les cellules LNCaP en présence de DHT. Au niveau du CYP17, nous avons pu confirmer que le bénomyl diminue son expression génique et protéique dans les cellules H295R. Ceci correspond à ce que la littérature suggérait, à

savoir l'effet des carbamates sur l'expression de certaines enzymes stéroïdiennes. Le bénomyl diminue aussi l'expression du pAR sur les positions S81 et S210-213. Par contre, même si le bénomyl possède des effets antiandrogéniques, selon la littérature il pourrait aussi induire le développement de certaines tumeurs.

Le prochloraz est bien connu pour ses effets antiandrogéniques. Nous avons démontré que ce pesticide peut induire significativement une baisse de sécrétion de PSA en présence de DHT. Au niveau de l'expression du AR, le prochloraz a démontré qu'il diminue son expression phosphorylée. En effet, le prochloraz diminue à la fois l'expression du AR phosphorylé en position sérine 81 et sérine 210-213. Cela correspond à ce qui a été reporté dans la littérature. Cependant, cette diminution est probablement due à une cytotoxicité du prochloraz à partir de 10 μ M. De plus, ce pesticide diminue significativement à la fois l'expression ainsi que l'activité enzymatique du CYP17. Nous pouvons confirmer que l'effet du prochloraz sur l'activité du CYP17 n'est pas induit par sa toxicité, car une concentration de 1 μ M suffit pour diminuer la production de DHEA. Comme la littérature le suggère, en plus d'inhiber l'aromatase, le prochloraz est aussi un inhibiteur d'autres cytochromes, tels que le CYP17.

La vinclozoline est un autre composé qui diminue significativement la viabilité des LNCaP en présence de DHT. Tel qu'attendu, ce composé a démontré une baisse de sécrétion de PSA. La vinclozoline, qui était déjà connue par d'autres auteurs pour diminuer l'expression du AR, a aussi démontré une baisse significative de sa phosphorylation. Il a démontré à la fois une diminution de translocation du AR au noyau, ainsi qu'une diminution de sa phosphorylation en position sérine 81 et 210-213. La vinclozoline n'a démontré aucun effet significatif sur l'expression ou l'activité du CYP17. Ce pesticide agit donc davantage comme un antagoniste du AR.

Nous pouvons conclure par les actions antiandrogéniques des pesticides, que le bénomyl agit davantage en tant qu'inhibiteur de CYP17, tandis que la vinclozoline agit plutôt comme antagoniste du AR. Les résultats obtenus pour le prochloraz sur le AR et sur l'enzyme CYP17 seraient plutôt une conséquence de sa toxicité sur les cellules H295R. À différents niveaux, ces pesticides peuvent agir en tant que composé antiandrogénique, mais demeurent cependant néfastes à un niveau environnemental. Nous avons aussi pu démontrer la présence du AR dans les cellules H295R, mais celui-ci ne répond pas à la DHT comme dans les cellules LNCaP. De

plus, sa phosphorylation ne semble pas non plus influencée par la présence hormonale, ni par l'exposition aux pesticides. Nous avons aussi débuté des tests avec des pesticides de la classe des néonicotinoïdes. Ce sont des pesticides encore peu connus, qui méritent d'être davantage étudiés. Nos résultats préliminaires sont présentés en annexe.

9.1 PROBLÉMATIQUES RENCONTRÉES

Des tests non-paramétriques auraient dus être utilisés, car le nombre de tests effectués est insuffisant pour affirmer la normalité des distributions. Le nombre de réplica est parfois suffisant, mais il est important de bien distinguer les réplicas biologiques des réplicas techniques. Bref, un réplica technique ne devrait pas être compté dans les statistiques d'une expérience. Les réplicas techniques sont toutefois utiles pour diminuer un possible écart créé par le manipulateur. On ne devrait cependant faire de tests statistiques sur les tests impliquant moins de trois données biologiques.

Nous avons confirmé que l'atrazine n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules, alors que les autres pesticides la diminuent. Cependant, le benomyl, le prochloraz et la vinclozoline pourraient agir sur d'autres voies, telle que l'apoptose des cellules. Il faudrait donc vérifier si les pesticides testés possèdent un effet sur l'apoptose des LNCaP et des H295R. Ensuite, nous pourrions vraiment confirmer que les pesticides diminuent la viabilité cellulaire.

En ce qui concerne l'expression du AR phosphorylé, nous avons eu certaines difficultés à l'observer sur différentes positions de sérines. La masse moléculaire du AR d'environ 100 kDa, est influencée par sa phosphorylation et varie aussi selon la propriété normale ou néoplasique des cellules. Cependant, les immunobuvardage étaient difficile à lire et nous arrivions parfois même à détecter des bandes à un poids d'environ 50 kDa. Pour y remédier, nous avons essayer des anticorps de différentes compagnies, et ce à différentes concentrations. Nous avons aussi changer de produit pour la révélation de la chimioluminescence et essayer plusieurs concentrations. Nous nous sommes donc concentré sur l'expression de formes constitutivement actives en présence d'androgènes, à savoir si les pesticides peuvent induire une réponse antiandrogénique. Cela aurait été intéressant d'observer aussi l'expression du AR phosphorylé sur une sérine qui

diminue la réponse androgénique, telle que la S308 (Y Koryakina et al., 2014). Nous aurions ainsi pu déterminer si les pesticides peuvent augmenter son expression, ce qui serait aussi une réponse antiandrogénique.

9.2 PERSPECTIVES

Les effets antiandrogéniques des pesticides requièrent encore beaucoup d'études afin d'être mieux identifiés et compris. En effet, beaucoup d'études se font sur les effets oestrogéniques des perturbateurs endocriniens, mais peu portent sur leurs effets antiandrogéniques. Plusieurs aspects demeurent inexplorés et nous offre des possibilités pour des expérimentations futures. De plus, les néonicotinoïdes sont des pesticides émergents, dont les effets sur le système endocriniens sont encore peu connus. Ils nécessitent à être davantage étudiés, autant pour la santé environnementale que la santé humaine. Dans de prochaines études, nous pourrions approfondir nos recherches initiées ou encore investiguer de nouvelles avenues. Par exemple, nous avons observé l'effet de pesticides sur la phosphorylation sur une position augmentant l'activité androgénique du AR, soit la sérine 81. Nous pourrions aussi tester les pesticides sur le pAR sur d'autres positions, telles que les sérines 215 et 792, qui sont des phosphosites diminuant le potentiel de liaison du AR.

Dégradation du AR

Des expériences complémentaires pourraient permettre de connaître davantage les propriétés antiandrogéniques des pesticides étudiés. En plus des expériences déjà faites, le taux de dégradation du AR pourrait par exemple être étudié. En combinant des résultats sur l'expression protéique du AR marqué avec la protéine ubiquitine, l'activité du protéasome pourrait permettre de déterminer l'effet des pesticides sur la dégradation du AR. En effet, le complexe ubiquitines/protéasome permet de réguler le taux de dégradation de plusieurs protéines, telles que le AR. Ce processus intervient d'ailleurs dans la translocation du AR au noyau (H. K. Lin et al., 2002). Pour se faire, la fluorescence du 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC), qui est une mesure de l'activité protéasomale, pourrait être déterminée après incubation des protéines avec un substrat AMC. Le clivage de ce peptide par le protéasome génère une fluorescence qui peut être mesurée par spectrophotomètre.

Ubiquitination du AR

Nous avons aussi débuté des tests sur l'ubiquitination du AR, à savoir si les pesticides peuvent influencer son taux d'ubiquitination. Comme les protéines ubiquitines marquent les protéines pour leur dégradation par le protéasome, un pesticide augmentant l'ubiquitination du AR permettrait d'augmenter sa dégradation. D'ailleurs, une étude a permis de déterminer que le DDB2, une protéine se liant à l'ADN endommagé, interagit aussi avec le AR afin d'induire son ubiquitination et sa dégradation dans les cellules LNCaP (Chang et al., 2012). Nous avons donc émis comme hypothèse que certains pesticides pourraient agir de façon similaire. Lors de nos tests, nous avons rencontré quelques problèmes techniques. En effet, les échantillons extraits ne contenaient pas assez de protéines. Nous avons donc utilisé un kit d'extraction pour concentrer les protéines (Thermo Scientific, #89899). Par contre, le contrôle positif fourni dans le kit ne semblait pas fonctionner, nous n'obtenions pas de bande suffisamment visible. De plus, il était difficile de sélectionner la bande correspondant au AR. Si nous aurions obtenu des résultats concluants concernant le AR ubiquitiné, nous aurions ensuite procédé aux tests sur l'activité du protéasome, en utilisant par exemple le kit # APT280 de Chemicon. Cet essai est basé sur la détection du fluorophore 7-amino-4-méthylcoumarin (AMC) après le clivage du substrat LLVY-AMC. C'est la fluorescence du AMC libre qui peut ensuite être détectée par spectrophotomètre aux longueurs d'onde de 380/460 nm. Ainsi, nous aurions déterminé à la fois les effets des pesticides sur l'ubiquitination du AR et sur l'activité du protéasome, permettant la dégradation de la protéine du AR. Un pesticide augmentant à la fois l'ubiquitination du AR et l'activité du protéasome, contribuerait à la baisse de l'activité androgénique, néfaste lors d'un cancer prostatique.

X-CELLigence

L'appareil X-CELLigence pourrait être utilisé afin de confirmer les résultats obtenus sur la prolifération cellulaire. Cet instrument permet de détecter en temps réel l'impédance cellulaire à l'aide d'électrodes en or situées au fond d'une plaque de culture. L'index cellulaire obtenu prend en considération le nombre de cellules, leur adhérence et leur morphologie. Il est donc possible d'obtenir précisément les effets obtenus lors de l'ajout de traitements et d'enlever les erreurs créées par un changement de milieu par exemple.

Expérimentations *in vivo*

De plus, dans les prochaines étapes du projet, nous pourrions envisager l'utilisation de modèles animaux. En effet, les modèles animaux permettent d'impliquer les aspects physiologiques, ce qui n'est pas possible avec les modèles *in vitro*. Les modèles *in vivo* permettent par exemple d'inclure les tissus androgéno-dépendants. Comme dans cette étude de *Ellwood-Yen et al.*, nous pourrions utiliser un modèle de rongeur bioluminescent, qui exprime la luciférase spécifiquement dans la prostate et ce de façon dépendante aux androgènes. Ce modèle de souris transgénique (ARR2 Pb-Lux) permet de mesurer l'activité du AR par imagerie de la bioluminescence émise (Ellwood-Yen, Wongvipat, & Sawyers, 2006). Une autre étude utilisant un modèle de souris transgénique (Kap)-Luciférase, a pu démontrer par imagerie biophotonique que l'utilisation de traitements antiandrogéniques diminue le signal émis par la luciférase chez les mâles (Malstrom, Tornavaca, Meseguer, Purchio, & West, 2004). Nous pourrions ainsi évaluer les effets des pesticides que nous avons déjà testé dans nos modèles cellulaires sur l'enzyme CYP17 et le AR, mais à un niveau *in vivo*. En effet, ce modèle serait une technique efficace et rapide pour l'évaluation de composés, lors de développement de nouveaux traitements pour le cancer de la prostate androgéno-dépendant (Ellwood-Yen et al., 2006).

10 BIBLIOGRAPHIE

- Alapont Alacreu, J., Navarro Rosales, S., Budía Alba, A., España Furió, F., Morera Martínez, F., & Jiménez Cruz, J.F. (2008). PSA and hK2 in the diagnosis of prostate cancer. *Actas Urológicas Españolas*, 32, 575–588.
- Allera, A., Lo, S., King, I., Steglich, F., & Klingmuller, D. (2004). Impact of androgenic/antiandrogenic compounds (AAC) on human sex steroid metabolizing key enzymes. *Toxicology*, 205(1-2), 75-85. doi: 10.1016/j.tox.2004.06.039
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., & Rowan, B. G. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal*, 10, e001. doi: 10.1621/nrs.10001
- Anway, Matthew D., Rekow, Stephen S., & Skinner, Michael K. (2008). Comparative anti-androgenic actions of vinclozolin and flutamide on transgenerational adult onset disease and spermatogenesis. *Reproductive Toxicology*, 26(2), 100-106. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.07.008>
- Auchus, R.J. (2004). Overview of dehydroepiandrosterone biosynthesis. *Semin Reprod Med*, 22, 281-288.
- Auxietre, T.-A., Dumontier, M.-F., Balguy, I., Frapart, Y., Canivenc-Lavier, M.-C., Berges, R., . . . Savouret, J.-F. (2014). Sub-NOAEL amounts of vinclozolin and xenoestrogens target rat chondrogenesis in vivo. *Biochimie*, 99(0), 169-177. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.001>
- Bakke, M., & Lund, J. (1995). Mutually exclusive interactions of two nuclear orphan receptors determine activity of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive sequence in the bovine CYP17 gene. *Mol Endocrinol.*, 9, 327–339.
- Balk, S.P., Ko, Y.J., & Bubley, G.J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*, 21, 383–391.
- Barrie, S.E., Potter, G.A., & Goddard, P.M. (1994). Pharmacology of novel steroidal inhibitors of cytochrome P450(17) alpha (17 alpha-hydroxylase/ C17-20 lyase). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 50, 267- 273.
- Basit, M., Saeed, S., Saleem, M.A., & Sayyed, A.H. (2013). Can resistance in Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) be overcome with mixtures of neonicotinoids and insect growth regulators? *Crop Protection*, 44(0), 135-141. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.021>
- Beck, V., Reiter, E., & Jungbauer, A. (2008). Androgen receptor transactivation assay using green fluorescent protein as a reporter. *Anal Biochem*, 373(2), 263-271. doi: 10.1016/j.ab.2007.09.006
- Belloni, V., Dessi-Fulgheri, F., Zaccaroni, M., Di Consiglio, E., De Angelis, G., Testai, E., . . . Santucci, D. (2011). Early exposure to low doses of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice. *Toxicology*, 279(1-3), 19-26. doi: 10.1016/j.tox.2010.07.002

- Benachour, N., Moslemi, S., Sipahutar, H., & Seralini, G. E. (2007). Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222(2), 129-140. doi: S0041-008X(07)00133-0 [pii]
10.1016/j.taap.2007.03.033
- Bennett, H. L., Stockley, J., Fleming, J. T., Mandal, R., O'Prey, J., Ryan, K. M., . . . Leung, H. Y. (2013). Does androgen-ablation therapy (AAT) associated autophagy have a pro-survival effect in LNCaP human prostate cancer cells? *BJU Int*, 111(4), 672-682. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11409.x
- Bennett, N. C., Gardiner, R. A., Hooper, J. D., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(6), 813-827. doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.013
- Berns, E.M.J.J., de Boer, W., & Mulder, E. (1993). Androgen-dependent growth regulation of and release of specific proteins by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *Prostate*, 23, 213–223.
- Berthelet, E., Pickles, T., Lee, K. W., Liu, M., & Truong, P. T. (2005). Long-term androgen deprivation therapy improves survival in prostate cancer patients presenting with prostate-specific antigen levels > 20 ng/mL. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 63(3), 781-787. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.02.034
- Biernacka-Łukanty, J. M. (2004). Inhibition of Cyp17 expression by adrenal androgens and transforming growth-factor B in adrenocortical cells. *Acta Biochimica Polonica*, 51, 907-917.
- Biernacka-Łukanty, J. M., Lehmann, T. P., & Trzeciak, W. H. (2004). Inhibition of CYP17 expression by adrenal androgens and transforming growth factor β in adrenocortical cells. *Acta Biochimica Polonica*, 51(4), 907-917.
- Bolton, N.J., Lahtonen, R., Vihko, P., Kontturi, M., & Vihko, R. (1981). Androgens and prostate-specific acid phosphatase in whole tissue and in separated epithelium from human benign prostatic hypertrophic glands. *Prostate*, 2, 409–416.
- Brand, C., Nury, D., Chambaz, E.M., Feige, J.J., & Bailly, S. (2000). Transcriptional regulation of the gene encoding the StAR protein in the human adrenocortical cell line, H295R by cAMP and TGFbeta1. *Endocr Res.*, 26, 1045–1053.
- Brill, K.T., Weltman, A.L., Gentili, A., Patrie, J.T., Fryburg, D.A., Hanks, J.B., . . . Veldhuis, J.D. (2002). Single and combined effects of growth hormone and testosterone administration on measures of body composition, physical performance, mood, sexual function, bone turnover, and muscle gene expression in healthy older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 5649–5657.
- Brinkmann, A.O., & Trapman, J. (2000). Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Adv. Pharmacol.*, 41, 317–341.
- Brown, C., Goss, S., Lubahn, D., Joseph, D., Wilson, E., & Frech, F. (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet*, 44, 264–269.

- Bruchovsky, N., & Wilson, J.D. (1968). The conversion of testosterone to 5- α - androstan-17-h-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 243, 2012 – 2021.
- Buckingham, S.D., Lapied, B., Le Corronec, H., Grolleau, F., & Sattelle, D.B. (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol.*, 200, 2685-2692.
- Cândido, E. M., Fávoro, W.J., Montico, F., Hetzl, A.C., & Cagnon, V.H.A. (2012). Senescence and steroid hormone receptor reactivities in accessory sex glands of elderly rats (Sprague-Dawley) following exogenous hormonal therapy. *Tissue and Cell*, 44(4), 227-237. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2012.03.007>
- Canton, R. F., Sanderson, J. T., Nijmeijer, S., Bergman, A., Letcher, R. J., & van den Berg, M. (2006). In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: a novel mechanism of action? *Toxicol Appl Pharmacol*, 216(2), 274-281. doi: 10.1016/j.taap.2006.05.007
- Casarett, Doull's. (2007). *Toxicology The Basic Science of Poisons* (7 ed.).
- Chang, S. W., Su, C. H., Chen, H. H., Huang, C. W., Tsao, L. P., Tsao, Y. P., & Chen, S. L. (2012). DDB2 is a novel AR interacting protein and mediates AR ubiquitination/degradation. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(11), 1952-1961. doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.023
- Chen, C.C., & Parker Jr., C.R. (2004). Adrenal androgens and the immune system. *Semin. Reprod. Med.*, 22, 369–377.
- Chen, S., Xu, Y., Yuan, X., Bubley, G. J., & Balk, S. P. (2006a). Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43), 15969-15974. doi: 10.1073/pnas.0604193103
- Chen, S., Xu, Y., Yuan, X., Bubley, G.J., & Balk, S.P. . (2006b). Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Chung, B.C., Picado-Leonard, J., Haniu, M., Bienkowski, M., Hall, P.F., Shively, J.E., & Miller, W.L. (1987). Cytochrome P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of hu- man adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 407–411.
- Clement, T.M., Savenkova, M.I., Settles, M., Anway, M.D., & Skinner, M.K. (2010). Alterations in the developing testis transcriptome following embryonic vinclozolin exposure. *Reproductive Toxicology*, 30(3), 353-364. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.05.086>
- Cleutjens, C.B., Steketeer, K., van Eekelen, C.C., van der Korput, J.A., Brinkmann, A.O., & Trapman, J. (1997). Both andro- gen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth- stimulating properties of LNCaP cells. *Endocrinology*, 138, 5293.
- Cohen, S.A., & Parsons, J.K. (2012). Combination pharmacological therapies for the management of benign prostatic hyperplasia. *Drugs and Aging*, 29, 275–284.

- Crawford, E.D., Eisenberger, M.A., & McLeod, D.G. (1989). A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med*, *321*, 419 – 424.
- Culig, Z. (2003). Role of the androgen receptor axis in prostate cancer. *Urology*, *62*(5, Supplement 1), 21-26. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0090-4295\(03\)00698-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0090-4295(03)00698-8)
- Culig, Z., Comuzzi, B., Steiner, H., Bartsch, G., & Hobisch, A. (2004). Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *92*(4), 265-271. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.003>
- Culig, Z., Hobisch, A., & Hittmair, A. (1997). Androgen receptor gene mutations in prostate cancer. Implications for disease progression and therapy. *Drugs Aging*, *10*, 50 – 58.
- Culig, Z., Klocker, H., Bartsch, G., Steiner, H., & Hobisch, A. (2003). Androgen receptors in prostate cancer. *J Urol*, *170*, 1363-1369.
- Davidse, L. C. (1986). Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. . *Annu. Rev. Phytopathol.*, *24*, 43–65.
- de Oliveira, I.M., Nunes, B.V.F., Barbosa, D.R., Pallares, A.M., & Faro, L.R.F. (2010). Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicology Letters*, *192*(3), 294-297. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.11.005>
- Diaz-Carballo, D., Gustmann, S., Acikelli, A. H., Bardenheuer, W., Buehler, H., Jastrow, H., . . . Strumberg, D. (2012). 7-epi-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells. *Phytomedicine*, *19*(14), 1298-1306. doi: 10.1016/j.phymed.2012.08.004
- Écho, H., Dominique, S., & Ravery, V. (2006). Dépistage du cancer de la prostate : les arguments « pour ». *Annales d'Urologie*, *40*(3), 179-183. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anuro.2006.02.003>
- Ellwood-Yen, K., Wongvipat, J., & Sawyers, C. (2006). Transgenic Mouse Model for Rapid Pharmacodynamic Evaluation of Antiandrogens. *Cancer Res*, 10513-10516.
- Elzoghby, A.O., Saad, N.I., Helmy, M.W., Samy, W.M., & Elgindy, N.A. (2013). Ionically-crosslinked milk protein nanoparticles as flutamide carriers for effective anticancer activity in prostate cancer-bearing rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *85*(3, Part A), 444-451. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.003>
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., . . . Nawata, H. (2007). Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *355*(4), 1012-1018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.062>
- Fardella, C.E., Hum, D.W., Homoki, J., & Miller, W.L. (1994). Point mutation Arg440 to His in cytochrome P450c17 causes severe 17c~- hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, *79*, 160-164.

- Farla, P., Hersmus, R., Trapman, J., & Houtsmuller, A.B. (2005). Antiandrogens prevent stable DNA-binding of the androgen receptor. *J. Cell Sci.*, *118*(Part 18), 4187–4198.
- Ferrís-i-Tortajada, J., Berbel-Tornero, O., Garcia-i-Castell, J., López-Andreu, J. A., Sobrino-Najul, E., & Ortega-García, J. A. (2011). Non-dietary environmental risk factors in prostate cancer. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, *35*(5), 289-295. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuroe.2010.12.001>
- Finne, P., Finne, R., Auvinen, A., Juusela, H., Aro, J., & Määttänen, L. (2000). Predicting the outcome of prostate biopsy in screen-positive men by a multilayer perceptron network. *Urology*, *56*(418–22).
- Fritz, W.A., Wang, J., Eltoum, I-E., & Lamartiniere, C.A. (2002). Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *186*(1), 89-99. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00663-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00663-3)
- Fu, M., Rao, M., Wu, K., Wang, C., Zhang, X., Hessien, M., . . . Pestell, R.G. (2004). The androgen receptor acetylation site regulates cAMP and AKT but not ERK-induced activity. *J Biol Chem* *279*, 29436-29449.
- Gasmi, J., & Sanderson, J. T. (2010). Growth inhibitory, antiandrogenic, and pro-apoptotic effects of puniceic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *J Agric Food Chem*, *58*(23), 12149-12156. doi: 10.1021/jf103306k
- Gazdar, A.F., Oie, H.K., Shackleton, C.H., Chen, T.R., Triche, T.J., & Myers, C.E. (1990a). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*, *50*, 5488–5496.
- Gazdar, A.F., Oie, H.K., Shackleton, C.H., Chen, T.R., Triche, T.J., & Myers, C.E. (1990b). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*, *50*, 5488–5496.
- Georget, V., Lobaccaro, J.M., Terouanne, B., Mangeat, P., Nicolas, J.C., & Sultan, C. (1997). Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, *129*, 17–26.
- Gioeli, D. (2005). Signal transduction in prostate cancer progression. *Clin Sci (Lond)*, *108*(4), 293-308. doi: 10.1042/CS20040329
- Gioeli, D., Ficarro, S. B., Kwiek, J. J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A. D., . . . Weber, M. J. (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, *277*(32), 29304-29314. doi: 10.1074/jbc.M204131200
- Gioeli, D., Ficarro, S.B., Kwiek, J.J., Aaronson, D., Hancock, M., & Catling, A.D. (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, *277*(32), 29304–29314.
- Gioeli, D., & Paschal, B. M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, *352*(1-2), 70-78. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.004

- Gordon, V., Bhadel, S., Wunderlich, W., Zhang, J., Ficarro, S. B., Mollah, S. A., . . . Gioeli, D. (2010). CDK9 regulates AR promoter selectivity and cell growth through serine 81 phosphorylation. *Mol Endocrinol*, *24*(12), 2267-2280. doi: 10.1210/me.2010-0238
- Gray Jr, Leon Earl. (1998). Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicology Letters*, *102-103*(0), 677-680. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00287-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00287-2)
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Monosson, E., & Kelce, W. R. (1999). Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health*, *15*(1-2), 48-64.
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J. S., & Kelce, W. R. (1994). Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, *129*(1), 46-52.
- Grigoryev, D.N., Long, B.J., Njar, V.C.O., & Brodie, A.H.M. (2000). Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *75*(1), 1-10. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00131-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00131-X)
- Grosse, A., Bartsch, S., & Baniahmad, A. (2012). Androgen receptor-mediated gene repression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *352*(1-2), 46-56. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.032>
- Gutman, A.B., & Gutman, E.B. (1939). An "acid" phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. *J Clin Invest*, *17*(4), 473-478.
- Hall, P.F. (1986). Cytochromes P450 and regulation of steroid synthesis. *Steroids*, *48*, 131-196.
- Hall, P.F. (1991). Cytochrome P-450 C21sc: one enzyme with two actions: hydroxylase and lyase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, *40*, 527-532.
- Han, G., Buchanan, G., Ittmann, M., Harris, J.M., Yu, X., & Demayo, F.J. (2005). Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, *102*(4), 1151-1156.
- Handelsman, D.J., Idan, A., Grainger, J., Goebel, C., Turner, L., & Conway, A.J. (2014). Detection and effects on serum and urine steroid and LH of repeated GnRH analog (leuprolide) stimulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *141*(0), 113-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.01.011>
- Handratta, V.D., Jelovac, D., Long, B.J., Kataria, R., Nnane, I.P., Njar, V.C.O., & Brodie, A.M.H. (2004). Potent CYP17 inhibitors: improved syntheses, pharmacokinetics and anti-tumor activity in the LNCaP human prostate cancer model. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *92*(3), 155-165. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.07.006>
- Harris, G., Azzolina, B., Baginsky, W., Cimis, G., Rasmusson, G.H., Tolman, R.L., & Raetz, C.R. (1992). Identification and selective inhibition of an isozyme of steroid 5 alpha-reductase in human scalp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*, 10787-10791.

- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., & Vonk, A. (2002a). Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature*, *419*(6910), 895-896. doi: 10.1038/419895a
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., & Vonk, A. (2002b). Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature*, *419*, 895–896.
- Hayes, T.B., Anderson, L.L., Beasley, V.R., de Solla, S.R., Iguchi, T., Ingraham, H., . . . Willingham, E. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *127*(1–2), 64-73. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.015>
- Hennequin, C., Ravery, V., Maylin, C., & Boccon-Gibbod, L. (2002). Radiothérapie post-prostatectomie : pour quels patients et quand ? *Cancer/Radiothérapie*, *6*(3), 168-174. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1278-3218\(02\)00162-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1278-3218(02)00162-2)
- Hess, R. A., Moore, B. J., Forrer, J., Linder, R. E., & Abuel-Atta, A. A. (1991). The fungicide benomyl (methyl 1-(butylcarbonyl)-2-benzimidazolecarbamate) causes testicular dysfunction by inducing the sloughing of germ cells and occlusion of efferent ductules. *Fundam. Appl. Toxicol.*, *17*, 733–745.
- Hille, U. E., Hu, Q., Vock, C., Negri, M., Bartels, M., Muller-Vieira, U., . . . Hartmann, R. W. (2009). Novel CYP17 inhibitors: synthesis, biological evaluation, structure-activity relationships and modelling of methoxy- and hydroxy-substituted methyleneimidazolyl biphenyls. *Eur J Med Chem*, *44*(7), 2765-2775. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.01.002
- Hodgson, M.C., Astapova, I., Hollenberg, A.N., & Balk, S.P. (2007). Activity of androgen receptor antagonist bicalutamide in prostate cancer cells is independent of NCoR and SMRT corepressors. *Cancer Res*, *67*, 8388–8395.
- Hoffmann, F., & Kloas, W. (2010). An environmentally relevant endocrine-disrupting antiandrogen, vinclozolin, affects calling behavior of male *Xenopus laevis*. *Hormones and Behavior*, *58*(4), 653-659. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.008>
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., . . . Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*, *43*(4), 1809-1818.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., . . . Murphy, G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, *43*, 1809–1818.
- Hsing, A.W. (2001). Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol. Rev.*, *23* (1), 42–58.
- Hsu, F. N., Chen, M. C., Chiang, M. C., Lin, E., Lee, Y. T., Huang, P. H., . . . Lin, H. (2011). Regulation of androgen receptor and prostate cancer growth by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem*, *286*(38), 33141-33149. doi: 10.1074/jbc.M111.252080
- Inawaka, K., Kawabe, M., Takahashi, S., Doi, Y., Tomigahara, Y., Tarui, H., . . . Shirai, T. (2009). Maternal exposure to anti-androgenic compounds, vinclozolin, flutamide and procymidone, has no effects on spermatogenesis and DNA methylation in male rats of subsequent generations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *237*(2), 178-187. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.004>

- Inkster, S.E., & Brodie, A.M. (1989). Immunocytochemical studies of aro- matase in early and full-term human placental tissues: Comparison with biochemical assays. *Biol Reprod*, *100*, 1684–1695.
- Irvine, R.A., Yu, M.C., Ross, R.K., & Coetzee, G.A. (1995). The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res*, *55*, 1937.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., & Roe, R.M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, *23*(5), 371-378. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
- Jeong, C.W., Yoon, C.Y., Jeong, S.J., Hong, S.K., Byun, S.S., & Lee, S.E. (2011). Limited expression of cytochrome p450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase in prostate cancer cell lines. *Department of Urology, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea*.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 2897–2908.
- Johnson, A.B., & O'Malley, B.W. (2012). Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: Critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *348*(2), 430-439. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.021>
- Johnson, M. P., Young, C. Y. F., Rowley, D.R., & Tindall, D. J. (1987). A Common Molecular Weight of the Androgen Receptor Monomer in Different Target Tissues. *Biochemistry*.
- Kang, Il Hyun, Sik Kim, Hyung, Shin, Jae-Ho, Kim, Tae Sung, Moon, Hyun Ju, Kim, In Young, . . . Han, Soon Young. (2004). Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology*, *199*(2–3), 145-159. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.019>
- Kashir, J. , & al., et. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum. Reprod.*, 690–703.
- Kavlock, R., & Cummings, A. (2005). Mode of action: inhibition of androgen receptor function-- vinclozolin-induced malformations in reproductive development. *Crit Rev Toxicol*, *35*(8-9), 721-726.
- Kavlock, R.J. (2001). Pesticides as endocrine-disrupting chemicals, in Krieger R (ed): Handbook of Pesticide Toxicology. *San Diego: Academic Press*, pp. 727–746.
- Kelce, W. R., Lambright, C. R., Gray, L. E., Jr., & Roberts, K. P. (1997). Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*, *142*(1), 192-200. doi: S0041-008X(96)97966-1 [pii]
- 10.1006/taap.1996.7966
- Kim, H. J., Park, Y. I., & Dong, M. S. (2006). Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays. *Toxicol In Vitro*, *20*(7), 1159-1167. doi: 10.1016/j.tiv.2006.03.003

- Kim, Y. S., Kumar, V., Lee, S., Iwai, A., Neckers, L., Malhotra, S. V., & Trepel, J. B. (2012). Methoxychalcone inhibitors of androgen receptor translocation and function. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(5), 2105-2109. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.12.141
- Kjærstad, M.B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A.M., & Andersen, H.R. (2010). Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology*, 30(4), 573-582. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.009>
- Kolle, S. N., Kamp, H. G., Huener, H. A., Knickel, J., Verlohner, A., Woitkowiak, C., . . . van Ravenzwaay, B. (2010). In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. *Toxicol In Vitro*, 24(7), 2030-2040. doi: 10.1016/j.tiv.2010.08.008
- Konety B, & J., Nelson. (2001). Nonandrogenic mediators of prostate growth. *Hem/Onc Clin NA*, 15(3), 1-16.
- Koryakina, Y, Q.Ta, H, & Gioeli, D. (2014). Androgen Receptor Phosphorylation: biological context and functional consequences. *Society of Endocrinology*.
- Koryakina, Y., Ta, H. Q., & Gioeli, D. (2014). Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocr Relat Cancer*. doi: 10.1530/ERC-13-0472
- Kubota, K., Ohsako, S., Kurosawa, S., Takeda, K., Qing, W., Sakaue, M., . . . Tohyama, C. (2003). Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Dev*, 49(5), 403-412.
- L. S. Kjeldsen, M. Ghisari, & Bonfeld-Jørgenses, E. C. (2013). Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(2), 453-464. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.06.028>
- Laier, P., Metzdorff, S.B., Borch, J., Hagen, M.L., Hass, U., Christiansen, S., . . . Vinggaard, A.M. (2006). Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 213(2), 160-171. doi: 10.1016/j.taap.2005.10.013
- Laignelet, L., Narbonne, J.F., Lhuguenot, J.C., & Riviere, J.L. (1989). Induction and inhibition of rat liver cytochrome(s) P-450 by an imidazole fungicide (prochloraz). *Toxicology*, 59, 271-284.
- Lapouge, G., Marcias, G., Erdmann, E., Kessler, P., Cruchant, M., Serra, S., . . . Céraline, J. (2008) Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Vol. 617* (pp. 529-534).
- Laws, Susan C., Carey, Stephan A., Kelce, William R., Cooper, Ralph L., & Gray Jr, L. Earl. (1996). Vinclozolin does not alter progesterone receptor (PR) function in vivo despite inhibition of PR binding by its metabolites in vitro. *Toxicology*, 112(3), 173-182. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(96\)03354-9](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(96)03354-9)
- Lee, D.K., & Chang, C. (2003). Endocrine mechanisms of disease: expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9), 4043-4054.

- Lim, J., & Miller, M.G. (1997). The Role of the Benomyl Metabolite Carbendazim in Benomyl-Induced Testicular Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142(2), 401-410. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1996.8042>
- Lin, D. W. (2009). Commentary on Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer. Attard G, Reid AH, A'Hern R, Parker C, Oommen NB, Folkard E, Messiou C, Molife LR, Maier G, Thompson E, Olmos D, Sinha R, Lee G, Dowsett M, Kaye SB, Dearnaley D, Kheoh T, Molina A, de Bono JS, Royal Marsden National Health Service Foundation Trust. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 27(6), 690-691.
- Lin, H. K., Altuwaijri, S., Lin, W. J., Kan, P. Y., Collins, L. L., & Chang, C. (2002). Proteasome Activity Is Required for Androgen Receptor Transcriptional Activity via Regulation of Androgen Receptor Nuclear Translocation and Interaction with Coregulators in Prostate Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 36570-36576.
- Lin, M.-F., Lee, M.-S., Garcia-Arenas, R., & Lin, F.-F. (2000). DIFFERENTIAL RESPONSIVENESS OF PROSTATIC ACID PHOSPHATASE AND PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN mRNA TO ANDROGEN IN PROSTATE CANCER CELLS. *Cell Biology International*, 24(10), 681-689. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.2000.0433>
- Lin, M.F., Garcia-Arenas, R., Chao, Y.C., Lai, M.M.C., Patel, P.C., & Xia, X.Z. (1993). Regulation of prostatic acid phosphatase expression and secretion by androgen in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Arch. Biochem Biophys*, 300, 384-390.
- Lo, S., King, I., Allera, A., & Klingmuller, D. (2007). Effects of various pesticides on human 5 α -reductase activity in prostate and LNCaP cells. *Toxicol In Vitro*, 21(3), 502-508. doi: 10.1016/j.tiv.2006.10.016
- Lo, S., King, I., Allera, A., & Klingmüller, D. (2007). Effects of various pesticides on human 5 α -reductase activity in prostate and LNCaP cells. *Toxicology in Vitro*, 21(3), 502-508. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.016>
- Long, B.J., Grigoryev, D.N., Nnane, I.P., Liu, Y., Ling, Y.Z., & Brodie, A.M. (2000). Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer. *Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore 21201-1559, USA*.
- Lorenzetti, S., Marcoccia, D., Narciso, L., & Mantovani, A. (2010). Cell viability and PSA secretion assays in LNCaP cells: a tiered in vitro approach to screen chemicals with a prostate-mediated effect on male reproduction within the ReProTect project. *Reprod Toxicol*, 30(1), 25-35. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.03.008
- M.K. Kettles, S.R. Browning, T.S. Prince, S.W. Horstman. (1997). Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties, Environ. Health Perspect. *Environ. Health Perspect.*, 105, 1222-1227.
- Makkonen, H., Kauhanen, M., Jaaskelainen, T., & Palvimo, J. J. (2011). Androgen receptor amplification is reflected in the transcriptional responses of Vertebral-Cancer of the Prostate cells. *Mol Cell Endocrinol*, 331(1), 57-65. doi: 10.1016/j.mce.2010.08.008

- Malstrom, S. E., Tornavaca, O., Meseguer, A., Purchio, A. F., & West, D. B. (2004). The Characterization and Hormonal Regulation of Kidney Androgen- Regulated Protein (Kap)-Luciferase Transgenic Mice. *Toxicological Sciences*, 79, 266-277.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9, 153–166.
- Martin, P. M., Muracciole, X., Berenguer, C., Boudouresque, F., & Ouafik, L'H. (2008). Évolution de la cellule normale à la cellule cancéreuse prostatique hormonodépendante–hormono-indépendante. *Médecine Nucléaire*, 32(1), 5-23. doi: 10.1016/j.mednuc.2007.11.002
- McCall, P., Gemmell, L. K., Mukherjee, R., Bartlett, J. M., & Edwards, J. (2008). Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients. *Br J Cancer*, 98, 1094-1101.
- Miller, W.L. (2002). Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198, 7-14.
- Miller, Walter L., Auchus, Richard J., & Geller, David H. (1997). The regulation of 17,20 lyase activity. *Steroids*, 62(1), 133-142. doi: 10.1016/s0039-128x(96)00172-9
- Montgomery, R.B., Mostaghel, E.A., Vessella, R., Hess, D.L., Kalthorn, T.F., & Higano, C.S. (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res*, 68, 4447-4454.
- Moon, H.S., Lim, H., Moon, S., Oh, H.L., Kim, Y.-T., Kim, M.K., & Lee, C.-H. (2009). Benzylidihydroxyoctenone, a novel anticancer agent, induces apoptosis via mitochondrial-mediated pathway in androgen-sensitive LNCaP prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(3), 742-744. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.029>
- Moreira, V. M., Vasaitis, T. S., Guo, Z., Njar, V. C., & Salvador, J. A. (2008). Synthesis of novel C17 steroidal carbamates. Studies on CYP17 action, androgen receptor binding and function, and prostate cancer cell growth. *Steroids*, 73(12), 1217-1227. doi: 10.1016/j.steroids.2008.05.010
- Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., & Nawata, H. (2004). A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology*, 145(4), 1860-1869.
- Morohashi, K., & Omura, T. (1996). Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J.*, 10, 1569–1577.
- Mulholland, D. J., Dedhar, S., Coetzee, G. A., & Nelson, C. C. (2005). Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev*, 26(7), 898-915. doi: er.2003-0034 [pii]
- 10.1210/er.2003-0034
- Nakabayashi, M., Werner, L., Oh, W.K., Regan, M.M., Kantoff, P.W., & Taplin, M.-E. (2011). Secondary Hormonal Therapy in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer.

- Nakajin, S., Shinoda, M., Haniu, M., Shively, J.E., & Hall, P.F. (1984). C21 steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes. Purification and characterization of the 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 259 (6), 3971–3976.
- Nasuti Cinzia, Carlono Manuel, Fedeli Donatella, Babbianelli Rosita, Di Stefano Antonio, Laura Serafina Cerasa, Silva Isabel, Domingues Valentina, Ciccocioppo Roberto. (2013). Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of pre-senescent rats. *Toxicology*, 303, 162-168.
- Nicolás Díaz-Chico, B., Germán Rodríguez, F., González, A., Ramírez, R., Bilbao, C., Cabrera de León, A., . . . Díaz-Chico, J.C. (2007). Androgens and androgen receptors in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 1–15.
- Niu, Y., Chang, T.-M., Yeh, S., Ma, W.-L., Wang, Y.Z., & Chang, C. (2010). Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. *Oncogene*, 29, 3593–3604.
- Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F., & Katagiri, M. (2001). Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol. Pharm. Bull.*, 24 (9), 1064–1067.
- Ntais, C., Polycarpou, A., & Ioannidis, J.P. (2003). SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12, 618–624.
- Ohlsson, Å., Ullerås, E., & Oskarsson, A. (2009). A biphasic effect of the fungicide prochloraz on aldosterone, but not cortisol, secretion in human adrenal H295R cells—Underlying mechanisms. *Toxicology Letters*, 191(2–3), 174-180. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.020>
- Osterauer, R., & Köhler, H.R. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 86(4), 485-494. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.013>
- Palazzolo, I., Burnett, B.G., Young, J.E., Brenne, P.L., La Spada, A.R., Fischbeck, K.H., . . . Pennuto, M. (2007). Akt blocks ligand binding and protects against expanded polyglutamine androgen receptor toxicity. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 1593-1603.
- Pang, Tammy P. S., Clarke, Michele V., Ghasem-Zadeh, Ali, Lee, Nicole K. L., Davey, Rachel A., & MacLean, Helen E. (2012). A physiological role for androgen actions in the absence of androgen receptor DNA binding activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(1), 189-197. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.017>
- Parkin, D. M. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology*, 2(9), 533-543. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00486-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00486-7)
- Partin, A.W., Pearson, J.D., & Landis, P.K. (1994). Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases. *Urology*, 43, 649.

- Picado-Leonard, J., & Miller, W.L. (1987). Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)*, 6 (5), 439–448.
- Pignon, J. C., Koopmansch, B., Nolens, G., Delacroix, L., Waltregny, D., & Winkler, R. (2009). Androgen receptor controls EGFR and ERBB2 gene expression at different levels in prostate cancer cell lines. *Cancer Research*, 69(7), 2941-2949.
- Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Dakic, V., Kaisarevic, S., & Kovacevic, R. (2010). Upregulation of peripubertal rat leydig cell steroidogenesis following 24 h in vitro and in vivo exposure to atrazine. *Toxicological Sciences*, 118(1), 52-60.
- Pothuluri, J.V., Freeman, J.P., Heinze, T.M., Beger, R.D., & Cerniglia, C.E. (2000). Biotransformation of vinclozolin by the fungus *Cunninghamella elegans*. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6138–6148.
- Purushottamachar, P., Khandelwal, A., Vasaitis, T.S., Bruno, R.D., Gediya, L.K., & Njar, V. C. O. (2008). Potent anti-prostate cancer agents derived from a novel androgen receptor down-regulating agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(7), 3519-3529. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.031>
- R., Sur, & A., Stork. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull Insectol.*, 56, 35-40.
- Rahman, M., Miyamoto, H., & Chang, C. (2004). Androgen receptor coregulators in prostate cancer: mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 10(7), 2208–2219.
- Rainey, W.E., Carr, B.R., Sasano, H., Suzuki, T., & Ji, Ma- son. (2002). Dissecting human adrenal an- drogen production. *Trends Endocrinol Metab.*, 13, 234–239.
- Rainey, W.E., Carr, B.R., Sasano, H., Suzuki, T., & Ma- son, J.I. (2002). Dissecting human adrenal an- drogen production. *Trends Endocrinol Metab.*, 13, 234–239.
- Reid, A.H., Attard, G., Barrie, E., & de Bono, J.S. (2008). CYP17 inhibition as a hormonal strategy for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol*, 5(11), 610–620.
- Rivest, P., Renaud, M., & Sanderson, J. T. (2011). Proliferative and androgenic effects of indirubin derivatives in LNCaP human prostate cancer cells at sub-apoptotic concentrations. *Chem Biol Interact*, 189(3), 177-185. doi: S0009-2797(10)00635-6 [pii] 10.1016/j.cbi.2010.11.008
- Rizner, T.L., Lin, H.K., Peehl, D.M., Steckelbroeck, S., Bauman, D.R., & Pen- ning, T.M. (2003a). Human type 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells. *Endocrinology*, 144, 2922–2932.
- Rizner, T.L., Lin, H.K., Peehl, D.M., Steckelbroeck, S., Bauman, D.R., & Pen- ning, T.M. (2003b). Human type 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells. *Endocrinology*, 144, 2922–2932.

- Roberge, M., Hakk, H., & Larsen, G. (2004). Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxico. Letter*, *154*, 61–68.
- Roy, J. R., Chakraborty, S., & Chakraborty, T. R. (2009). Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit*, *15*(6), RA137-145.
- Salvador, Jorge A. R., Pinto, Rui M. A., & Silvestre, Samuel M. Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*(0). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.04.006>
- Sanderson, J. T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci*, *94*(1), 3-21. doi: 10.1093/toxsci/kfl051
- Sanderson, J. T., Clabault, H., Patton, C., Lassalle-Claux, G., Jean-Francois, J., Pare, A. F., . . . Touaibia, M. (2013). Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem*, *21*(22), 7182-7193. doi: 10.1016/j.bmc.2013.08.057
- Sanderson, J. Thomas, Boerma, Joke, Lansbergen, Gideon W. A., & van den Berg, Martin. (2002). Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *182*(1), 44-54. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.2002.9420>
- Sanderson, J. Thomas, Seinen, Willem, Giesy, John P., & Berg, Martin van den. (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.
- Sankpal, U.T., Pius, H., Khan, M., Shukoor, M.I., Maliakal, P., Lee, C.M., . . . Basha, R. (2012). Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumour Biol.*, *33*, 1265–1274.
- Santos, A. F., Huang, H., & Tindall, D. J. (2004). The androgen receptor: a potential target for therapy of prostate cancer. *Steroids*, *69*(2), 79-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2003.10.005>
- Sasano, H., White, P. C., New, M. I., & Sasano, N. (1988). Immunohisto- chemical localization of cytochrome P-450C21 in human adrenal cortex and its relation to endocrine function. *Hum. Pathol.*, *19*, 181–185.
- Scippo, M. L., Argiris, C., Van De Weerd, C., Muller, M., Willemsen, P., Martial, J., & Maghuin-Rogister, G. (2004). Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal Bioanal Chem*, *378*(3), 664-669. doi: 10.1007/s00216-003-2251-0
- Sengupta, S., Amling, C., D'Amico, A.V., & Blute, M.L. (2008). Prostate Specific Antigen Kinetics in the Management of Prostate Cancer. *The Journal of Urology*, *179*(3), 821-826. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.10.023>
- Smolinsky, A. N., Doughman, J. M., Kratzke, L. T., & Lassiter, C. S. (2010). Zebrafish (*Danio rerio*) androgen receptor: sequence homology and up-regulation by the fungicide

- vinclozolin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 151(2), 161-166. doi: S1532-0456(09)00212-9 [pii]
- 10.1016/j.cbpc.2009.10.001
- Soderstrom, T. G., Bjelfman, C., Brekkan, E., Ask, B., Egevad, L., Norlen, B. J., & Rane, A. (2001). Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(2), 855-858.
- Sohoni, P., & Sumpter, J. P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*, 158(3), 327-339.
- Stocco, D.M., & Clark, B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.*, 17, 221/244.
- Stoker, T.E., & Kavlock, R.J. (2010). Chapter 18 – pesticides as endocrine-disrupting chemicals. In: Robert, K. (Ed.), Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. *Academic Press, third ed.* , pp. 551–569.
- Swan SH1, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, Wang C, Brazil C, Overstreet JW; Study for Future Families Research Group. (2003). Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect.*, 111, 1478-1484.
- Swenson, T. L., & Casida, J. E. (2013). Neonicotinoid formaldehyde generators: possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicol Lett*, 216(2-3), 139-145. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.11.027
- Tamburini, P.P., & Gibson, G.G. (1983). Thermodynamic studies of the protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b5. *J. Biol. Chem.*, 258, 13444/13452.
- Taplin, M.E., Bubley, G.J., & Ko, Y.J. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res*, 59, 2511-2515.
- Thigpen, A.E., Silver, R.I., Guileyardo, J.M., Casey, M.L., McConnell, J.D., & Russell, D.W. . (1993). Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.*, 92, 903–910.
- Tinfo, N. S., Hotchkiss, M. G., Buckalew, A. R., Zorrilla, L. M., Cooper, R. L., & Laws, S. C. (2011). Understanding the effects of atrazine on steroidogenesis in rat granulosa and H295R adrenal cortical carcinoma cells. *Reprod Toxicol*, 31(2), 184-193. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.11.005
- Trentacoste, S.V., Friedmann, A.S., Youker, R.T., Breckenridge, C.B., & Zirkin, B.R. (2001). Atrazine effects on testosterone levels and androgen- dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *J. Androl.*, 22, 142–148.
- Trzeciak, W.H., LeHoux, J.G., Waterman, M.R., & Simpson, E.R. (1993). Dexamethasone inhibits corticotropin-induced accumulation of CYP11A and CYP17 messenger RNAs in bovine adrenocortical cells. *Mol Endocrinol.*, 7, 206–213.
- van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.-M., & Belzunces, L.P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services.

- Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(3–4), 293-305. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2013.05.007>
- Van Laar, C.A. Berrevoets, J., & Trapman, N.D. Zegers, Albert, O. B. (1991). Hormone-dependent Androgen Receptor Phosphorylation Is Accompanied by Receptor Transformation in Human Lymph Node Carcinoma of the Prostate Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(February 25), 3734-3738.
- van Steenbrugge, G. J., Groen, M., van Dongen, J. W., Bolt, J., van der Korput, H., Trapman, J., . . . Horoszewicz, J. (1989). The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivatives. An overview. *Urol Res*, 17(2), 71-77.
- Vasaitis, T., Belosay, A., Schayowitz, A., Khandelwal, A., Chopra, P., Gediya, L. K., . . . Brodie, A. M. H. (2008). Androgen receptor inactivation contributes to antitumor efficacy of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase inhibitor 3 β -hydroxy-17-(1H- benzimidazole-1-yl)androsta-5,16-diene in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2348-2357.
- Vasaitis, T.S., Bruno, R.D., & Njar, V.C.O. (2011). CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1–2), 23-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.005>
- Velasco, A.M., Gillis, K.A., Li, Y., Brown, E.L., Sadler, T.M., Achilleos, M., . . . Zhang, Y. (2004). Identification and validation of novel androgen-regulated genes in prostate cancer. *Endocrinology*, 145(8), 3913–3924.
- Vinggaard, A. M., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M. E., Breinholt, V., Jarfelt, K., . . . Hass, U. (2005). Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol Sci*, 85(2), 886-897. doi: 10.1093/toxsci/kfi150
- Vinggaard, A. M., Nellemann, C., Dalgaard, M., Jorgensen, E. B., & Andersen, H. R. (2002). Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicol Sci*, 69(2), 344-353.
- Vinggaard, A. M., Niemela, J., Wedeby, E. B., & Jensen, G. E. (2008). Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure--activity relationship model for androgen receptor antagonism. *Chem Res Toxicol*, 21(4), 813-823. doi: 10.1021/tx7002382
- Wang, Long G., Liu, Xiao M., Kreis, Willi, & Budman, Daniel R. (1999). Phosphorylation/Dephosphorylation of Androgen Receptor as a Determinant of Androgen Agonistic or Antagonistic Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(1), 21-28. doi: 10.1006/bbrc.1999.0655
- Weisser H, Ziemssen T, & M., Krieg. (2001). In vitro modulation of steroid 5 α -reductase activity by phospholipases in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *Steroids*, 66(6), 521–528.
- Wen, Y., Hu, M.C., Makino, K., Spohn, B., Bartholomeusz, G., Yan, D.H., & Hung, M.C. (2000). HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res*, 60, 6841–6845.
- Wilhelms, K. W., Fitzpatrick, K. F., Scanes, C. G., & Anderson, L. L. (2006). In ovo exposure to a triazine herbicide: effects of atrazine on circulating reproductive hormones and gonadal

- histology in young Japanese quail. *Arch Environ Contam Toxicol*, 51(1), 117-122. doi: 10.1007/s00244-005-0165-x
- Wilson, J. D. (1996). Role of dihydrotestosterone action in androgen action. *Prostate*, 6 (Suppl.), 88s-92s.
- Wolf, D.A., Herzinger, T., Hermeking, H., Blaschke, D., & Horz, W. (1993). Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol*, 7, 924-936.
- Wong, C., Kelce, W. R., Sar, M., & Wilson, E. M. (1995). Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem*, 270(34), 19998-20003.
- Yamada, T., Sumida, K., Saito, K., Ueda, S., Yabushita, S., Sukata, T., . . . Seki, T. (2005). Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 205(1), 11-30. doi: 10.1016/j.taap.2004.09.002
- Yang, C. S., Xin, H. W., Kelley, J. B., Spencer, A., Brautigan, D. L., & Paschal, B. M. (2007). Ligand binding to the androgen receptor induces conformational changes that regulate phosphatase interactions. *Mol Cell Biol*, 27(9), 3390-3404. doi: 10.1128/MCB.02411-06
- Yap, T. A., Carden, C. P., Attard, G., & de Bono, J. S. (2008). Targeting CYP17: established and novel approaches in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 8(4), 449-457. doi: 10.1016/j.coph.2008.06.004
- Yap, T.A., Carden, C.P., Attard, G., & de Bono, J.S. (2008). Targeting CYP17: established and novel approaches in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 8(4), 449-457. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2008.06.004>
- Zarn, J.A., Bruschiweiler, B.J., & Schlatter, J.R. (2003). Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect*, 111(March (3)), 255-261.
- Zatelli, M.C., Rossi, R., & Degli Uberti, E.C. (2000). Androgen influences transforming growth factor-beta1 gene expression in human adrenocortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 847-852.
- Zhou, Z. X., Lane, M. V., Kempainen, J. A., French, F. S., & Wilson, E. M. (1995). Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol*, 9(2), 208-218. doi: 10.1210/mend.9.2.7776971

ANNEXE : EFFETS DE NÉONICOTINOÏDES SUR LE CYP17 DANS LES H295R ET AR DANS LES LNCAP

Les néonicotinoïdes sont des insecticides assez récents, représentant environ 25 % du total des insecticides utilisés, dont majoritairement l'imidaclopride et le thiaméthoxam (Jeschke, Nauen, Schindler, & Elbert, 2011). C'est un maximum de 20 % des néonicotinoïdes qui pénètre dans les semences et la majorité du produit étalé se retrouve alors dans l'environnement (R. & A., 2003). Les néonicotinoïdes, ainsi que leurs métabolites, sont persistants dans l'environnement (van der Sluijs et al., 2013). Leur mode d'action intervient sur le système nerveux, en tant qu'agoniste du récepteur nicotinique (Swenson & Casida, 2013). En effet, ces composés miment le neurotransmetteur acétylcholine pour se lier au récepteur, mais avec encore plus d'affinité (Buckingham, Lapied, Le Corronc, Grolleau, & Sattelle, 1997). Cette liaison du pesticide au récepteur ce fait de façon irréversible, ce qui entraîne une paralysie de l'insecte (Osterauer & Köhler, 2008). Ces insecticides possèdent bien sûr plus d'affinité pour le récepteur des insectes que celui des mammifères (de Oliveira, Nunes, Barbosa, Pallares, & Faro, 2010). Bien qu'ils soient moins toxiques chez les mammifères, le thiaclopride a démontré une toxicité chez les poissons, soit une IC50 de 30,5 mg/L chez la truite arc-en-ciel (Osterauer & Köhler, 2008). Par contre, leurs métabolites pourraient être plus sélectifs pour les mammifères. En effet, des expériences menées chez des souris ont démontré qu'environ 40 % du thiaméthoxam est métabolisé et que ses métabolites se retrouvent principalement au niveau du cerveau (de Oliveira et al., 2010). Le site de liaison des récepteurs à l'acétylcholine est différent chez les vertébrés et ont généralement moins d'affinité avec les néonicotinoïdes ou leurs métabolites (van der Sluijs et al., 2013). Le clothianidine est un des métabolites du thiaméthoxam, qui est d'ailleurs aussi vendu tel quel comme insecticide (de Oliveira et al., 2010). Des études ont démontré que le thiaméthoxam est hépatotoxique et hépatocarcinogénique chez certaines espèces animales, telle que la souris (Swenson & Casida, 2013). Les composés nitro-substitués, comme l'imidaclopride, sont davantage toxiques pour les abeilles (Iwasa, Motoyama, Ambrose, & Roe, 2004). Leur utilisation serait d'ailleurs associée au déclin des insectes pollinisateurs (van der Sluijs et al., 2013). L'imidaclopride et le thiaméthoxam ont d'ailleurs été récemment interdits par l'Union

Européenne en 2013. Le thiaclopride a été commercialisé seulement en 2003, mais il pourrait lui aussi être bientôt retiré du marché européen.

Nous nous sommes donc intéressé à ces composés assez récents et les résultats de notre étude ont démontrés que certains des néonicotinoïdes testés possèdent des propriétés antiandrogéniques. L'imidaclopride a démontré une capacité à diminuer la sécrétion de PSA par les cellules LNCaP. Nous avons aussi démontré que le thiaméthoxam diminue significativement l'activité du CYP17 dans les cellules H295R. Les néonicotinoïdes font partie d'une classe de pesticides émergents, qui méritent d'être davantage étudiée, car leurs effets sont peu connus.

Notre hypothèse générale est que les pesticides possèdent des actions antiandrogéniques au niveau du CYP17 et du AR. Plus précisément, il est possible que les néonicotinoïdes induisent une baisse de l'activité enzymatique du CYP17 et/ou une diminution de l'expression du AR. Ceci mènerait éventuellement à une diminution des taux de PSA. Nous avons donc évalué quelques néonicotinoïdes, qui sont des pesticides émergents, et qui sont donc encore peu connus. Leurs effets sur le système endocrinien sont donc pratiquement inconnus à ce jour et peu étudiés. Nos objectifs de recherche étaient de déterminer l'effet des différents néonicotinoïdes (imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxam) sur le CYP17 dans les cellules H295R, et sur la sécrétion de PSA et l'expression du AR dans les cellules LNCaP. Nous devons donc déterminer si ces pesticides peuvent avoir un effet sur ces différentes caractéristiques.

FIGURES

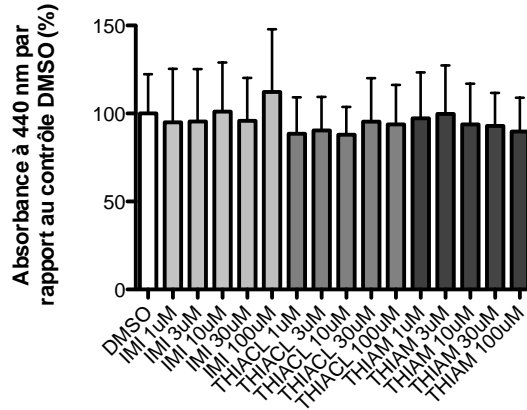


Figure A-10-1: Viabilité cellulaire des H295R exposées 24h aux néonicotinoïdes, puis 2h au WST-1

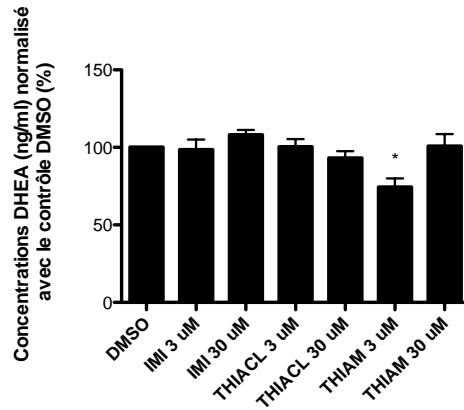


Figure A-10-2: Activité enzymatique du CYP17 dans les cellules H295R exposées 24h aux néonicotinoïdes, puis 90m au trilostane 5µM et à la pregnenolone 100nM

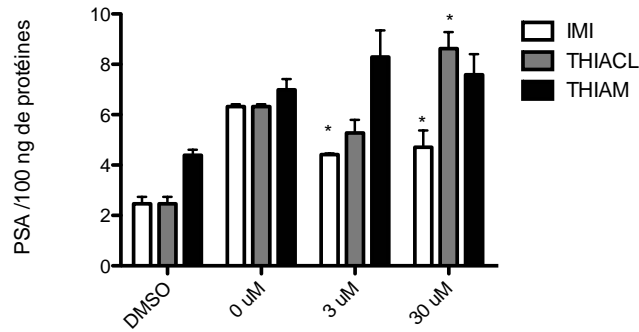


Figure A-10-3: Sécrétion de PSA par les cellules LNCaP exposées 24h aux néonicotinoïdes en présence de DHT 10nM

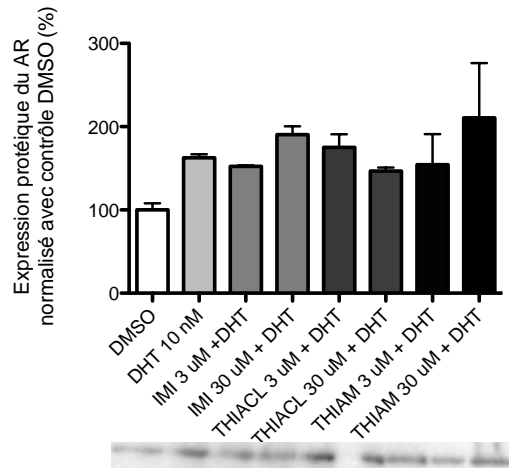


Figure A-10-4: Expression du AR dans les cellules LNCaP exposées 24h aux néonicotinoïdes

Nous nous sommes assuré que nos résultats n'étaient pas causés par une baisse de la viabilité cellulaire. Ainsi, les tests de cytotoxicité ont démontrés qu'aucunes concentrations des néonicotinoïdes testés n'étaient cytotoxiques pour les cellules H295R. Nous avons ensuite pu démontrer que le néonicotinoïde thiaméthoxam diminue l'activité enzymatique du CYP17. Le thiaméthoxam agit donc en tant qu'inhibiteur de CYP17 dans ce type cellulaire. De plus, l'imidaclopride diminue significativement le taux de sécrétion de PSA dans les LNCaP, alors que le thiaclopride l'augmente en présence de DHT. Bien que les néonicotinoïdes n'affectent pas l'expression du AR, d'autres études restent à faire afin de déterminer s'ils possèdent d'autres propriétés pro/antiandrogéniques.

