

INRS Institut Armand-Frappier

EFFETS DE CERTAINS PESTICIDES SUR L'ENZYME AROMATASE CHEZ LES
SOURIS BIOLUMINESCENTES ET SUR LA VOIE DE SIGNALISATION
DÉPENDANTE DES ANDROGÈNES DANS LES CELLULES DE LA PROSTATE
CANCÉREUSES HUMAINES (LNCaP)

Par

Patricia Rivest

Mémoire présenté pour l'obtention
Du grade de Maître en science (M. Sc)
En sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Dr Michel Charbonneau
INRS Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr Robert Tardif
Université de Montréal

Directeur de recherche

Dr Thomas Sanderson,
INRS Institut Armand-Frappier

Remerciements

Faire une maîtrise, c'est s'investir à cent pour cent à la science pendant plus de deux ans. Par contre, ces deux ans passent tellement rapidement lorsque les personnes qu'on côtoie tous les jours sont agréables et de bonne compagnie.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Dr Thomas Sanderson qui a su me faire confiance tout au long de ma maîtrise, pour toutes les discussions que nous avons eues et pour ses judicieux conseils. Au Dre Cathy Vaillancourt pour m'avoir aidée à trouver mon stage avec le Dr Sanderson et pour sa présence et ses nombreux conseils. Merci à tous mes collègues de travail; Jihane Gasmi, Khalil Abdelbaqi, Talal Oufkir, Marc Fraser et Tim Klempan avec qui j'ai partagé mes journées de travail au laboratoire.

Un gros merci à Dave Lanoix, ami et personne que je considère comme étant ma référence au labo. Merci pour toutes les explications données, les conseils pour différentes manipulations et pour ton grand support. Je trouve très important de mentionner également les filles avec qui j'ai partagé ma salle étudiante; Sandra, Kathy, Andrée-Anne H et Andrée-Anne L, que je considère aujourd'hui comme des amies. Elles ont su me remonter le moral durant les périodes plus difficiles et elles ont également rendu ma maîtrise plus agréable, par nos discussions, qui n'étaient pas toujours scientifiques. C'est leur bonne humeur et notre complicité qui ont fait en sorte que c'était un plaisir de venir travailler chaque matin.

Je tiens aussi à remercier le Dre Truong pour l'ensemble des conseils qu'elle a partagé, de même que son aide pour maintenir la colonie de souris transgéniques.

Finalement merci à ma famille et à mes amies, qui m'ont encouragée et soutenue tout au long de ma maîtrise.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
RÉSUMÉ.....	X
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
1.0 LA STÉROÏDOGÉNÈSE.....	3
1.1 LES ANDROGÈNES	4
1.2 LES ŒSTROGÈNES	6
2.0 L'AROMATASE.....	9
2.1 RÉGULATION ET EXPRESSION TISSUS SPÉCIFIQUE.....	10
2.2 RÔLE DANS LE CANCER HORMONO-DÉPENDANT	12
2.2.1 Récepteurs des œstrogènes.....	13
2.2.2 Effets physiologiques et pathologiques des œstrogènes.....	15
3.0 STÉROÏDE 5α-RÉDUCTASE	16
3.1 RÉGULATION ET EXPRESSION	17
3.1.1 Le cerveau	18
3.1.2 La prostate.....	19
3.2 RÔLE DANS LES CANCERS HORMONO-DÉPENDANTS.....	20
3.2.1 Récepteurs des androgènes.....	22
3.2.2 Effets physiologiques et pathologiques des androgènes.....	22
4.0 PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....	24
4.1 DIFFÉRENTES CIBLES (AR, ER, ENZYMES STÉROÏDIENNES)	24
4.2 LES PESTICIDES	25
4.2.1 Le vinclozoline.....	26
4.2.1.1 Propriétés anti-androgéniques.....	28
4.2.1.2 Propriétés anti-oestrogéniques.....	28
4.2.1.3 Propriétés neurotoxiques.....	29

4.2.1.4	Conséquences d'une exposition au vinclozoline	30
4.2.2	<i>L'atrazine</i>	30
4.2.2.1	Propriétés anti-androgéniques.....	32
4.2.2.2	Propriétés anti-oestrogéniques.....	32
4.2.2.3	Propriétés neurotoxiques.....	33
4.2.2.4	Conséquences d'une exposition à l'atrazine	33
4.2.3	<i>Le bénomyl</i>	34
4.2.3.1	Propriétés anti-oestrogéniques.....	36
4.2.3.2	Conséquences d'une exposition au bénomyl	36
5.0	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX POUR L'ÉTUDE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	38
5.1	MODÈLE <i>IN VITRO</i>	38
5.1.1	<i>L'étude des composés pro ou anti-androgéniques</i>	38
5.1.1.1	Le modèle LNCaP.....	38
5.1.2	<i>L'étude de la stéroïdogénèse et de l'aromatase</i>	39
5.1.2.1	Le modèle H295R	40
5.2	MODÈLE <i>IN VIVO</i>	41
5.2.1	<i>L'étude des composés pro- ou anti-androgéniques</i>	42
5.2.2	<i>L'étude de la Cyp 19 (souris bioluminescentes)</i>	43
6.0	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	46
	PREMIÈRE PARTIE	47
	ARTICLE: EVALUATION OF A BIOLUMINESCENT MOUSE MODEL EXPRESSING AROMATASE PII- PROMOTER-CONTROLLED LUCIFERASE AS A TOOL FOR THE STUDY OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS	47
	RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	48
	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE À L'ARTICLE	50
	DEUXIÈME PARTIE	59
7.0	RÉSUMÉ	60
8.0	INTRODUCTION.....	62
9.0	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	63
10.0	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	64
10.1	CULTURE CELLULAIRE	64
10.2	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN.....	64

10.3 PROLIFÉRATION CELLULAIRE	65
10.4 DÉTERMINATION DU TAUX DE SÉCRÉTION DE PSA.....	65
10.5 ANALYSES STATISTIQUES	66
11.0 RÉSULTATS	67
11.1 LOCALISATION DES RÉCEPTEURS DES ANDROGÈNES.....	67
11.2 VIABILITÉ CELLULAIRE	67
11.3 DÉTERMINATION DU TAUX DE SÉCRÉTION DE PSA.....	67
FIGURES.....	68
12.0 DISCUSSION ET CONCLUSION	77
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	79
ANNEXE A	84
ARTICLE: PROLIFÉRATIVE AND ANDROGENIC EFFECTS OF INDURUBIN DERIVATIVES IN LNCAP HUMAN PROSTATE CANCER CELLS AT SUB-APOPTOTIC CONCENTRATIONS.....	84
ANNEXE B	93
LPTA® CD-1-TG (CYP19-LUC)-XEN	93
LISTE DES REFERENCES.....	98

Liste des abréviations

AKT	Sérine-thréonine kinase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AR	Récepteur aux androgènes
BSA	Albumine sérique bovine
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
Cyp19	Aromatase
DA	Dopamine
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DHAS	Déhydroépiandrostérone sulfate
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DMSO	Diméthyle sufoxyde
DOPAC	Acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique
E1	Estrone
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
ER	Récepteur aux œstrogènes
ERE	Élément de réponse aux œstrogènes
FBS	Sérum foetal bovin
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GnRH	Gonadotropin-releasing hormon
HCG	Human chorionic gonadotropin
hPAP	Phosphatase acide de la prostate chez l'humain
HSP	Heat shock protein
HVA	Acide homovanillique
LBD	Domaine de liaison au ligand
LH	Hormone lutéinisante
LOAEL	Dose minimale avec effet nocif observé
M1	Acide buténoïque

M2	Énanilide
MAO	Monoamine oxydase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NOAEL	No observed adverse effect level
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoïnositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
PSA	Antigène spécifique de la prostate
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
SF-1	Facteur Stéroïdogénique 1
SRD5A	Stéroïde 5 alpha-réductase (isoformes 1 et 2)

Liste des figures

Figures

- Figure 1** Biosynthèse des androgènes à partir du cholestérol.
- Figure 2** Synthèse de l'estrone, l'estradiol et de l'estriol par l'aromatase.
- Figure 3** Mécanisme de conversion de l'androstenedione en estrone par l'aromatase.
- Figure 4** Promoteurs de l'aromatase spécifiques à différent tissus.
- Figure 5** Conversion de la testostérone en dihydrotestostérone par le stéroïde 5 α -réductase.
- Figure 6** Représentation moléculaire de l'atrazine, du bénomyl et du vinclozoline.
- Figure 7** Structure moléculaire des métabolites du vinclozoline; l'acide buténoïque et l'énanilide.
- Figure 8** Voies métaboliques de l'atrazine, la simazine et la propazine et leurs métabolites.
- Figure 9** Transformation du bénomyl dans une solution aqueuse.
- Figure 10** Réaction d'oxydation de la luciférine par l'enzyme luciférase.
- Figure 11** Présence des récepteurs des androgènes (AR) à l'intérieur du noyau des cellules LNCaP après une exposition à l'atrazine et à la DHT.
- Figure 12** Présence des récepteurs des androgènes (AR) à l'intérieur du noyau des cellules LNCaP après une exposition au vinclozoline et à la DHT.
- Figure 13** Présence des récepteurs des androgènes (AR) à l'intérieur du noyau des cellules LNCaP après une exposition au bénomyl et à la DHT.
- Figure 14** Détermination de la prolifération des cellules LNCaP exposées à l'atrazine.
- Figure 15** Détermination de la prolifération des cellules LNCaP exposées au vinclozoline.
- Figure 16** Détermination de la prolifération des cellules LNCaP exposées au bénomyl.

- Figure 17** Détermination du taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), après une exposition à l'atrazine.
- Figure 18** Détermination du taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), après une exposition au vinclozoline.
- Figure 19** Détermination du taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), après une exposition au bénomyl.

Résumé

Plusieurs pesticides ont été identifiés comme étant des perturbateurs endocriniens, pouvant être associés au développement de différents cancers hormono-dépendants tels que le cancer du sein et de la prostate. L'apparition de ces derniers peut être due à un déséquilibre de l'expression du gène de l'aromatase, une enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes, mais également suite à l'inactivation des voies de signalisation impliquant les récepteurs des androgènes. L'atrazine par exemple, un herbicide grandement utilisé pour prévenir la pousse de mauvaises herbes dans le domaine de l'agriculture, est également connu comme étant un inducteur de l'aromatase *in vitro*. Par ailleurs, très peu de recherches sur ses effets *in vivo* ont été faites jusqu'à présent. Les conséquences que peuvent provoquer une exposition à certains fongicides tels que le vinclozoline, et le bénomyl, de même qu'à l'atrazine, sur les voies de signalisation dépendantes des androgènes demandent également à être étudiées davantage.

Afin de déterminer les effets *in vivo* de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase, nous avons utilisé un nouveau modèle de souris transgéniques LPTA® CD-1-Tg (Cyp19-luc)-Xen (Caliper LifeScience, Alameda, CA) (Internet 1). À l'intérieur de ces souris bioluminescentes, l'expression du gène de la luciférase se trouve à être sous le contrôle du promoteur murin pII de *Cyp19*, qui est spécifique aux gonades chez les mammifères et les humains. C'est par micro-injection que le transgène est introduit à l'intérieur de la souris lors de la phase embryonnaire. Nous avons donc, dans un premier temps, le mandat de valider l'efficacité de ce nouveau modèle de souris bioluminescentes comme outil de recherche, et par le fait même, de vérifier les effets *in vivo* de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase. Par la suite, à l'aide des cellules LNCaP, nous devons tester l'impact de différents pesticides (vinclozoline, atrazine et bénomyl) sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate dépendantes des androgènes, ainsi que leurs effets sur l'expression des gènes médiée par le récepteur aux androgènes dans des conditions *in vitro*.

En premier lieu, nous avons travaillé sur les effets de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase *in vivo*. Pour ce faire, nous avons soumis les souris soit à une exposition aiguë (100 mg/kg) uniquement lors de la première journée d'expérimentation ou soit à une exposition répétée (30 mg/kg/jour pour 5 jours) de ce composé. Par la suite, l'efficacité du modèle a pu être vérifiée suite à l'analyse des effets de la forskoline, du «Pregnant mare serum gonadotropin» (PMSG) et de «l'human chorionic gonadotropin» (hCG).

En accord avec la littérature, nos résultats démontrent que la forskoline (10 mg/kg), de même que le PMSG (5 UI) induisent de manière significative ($p < 0.05$) l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur pII de l'aromatase. Par ailleurs, aucune des deux expositions à l'atrazine (répétée ou aiguë) ne produit d'effet *in vivo*, et ce, au temps de 5 jours. On observe toutefois une augmentation de la bioluminescence en fonction du temps chez les femelles exposées à 100 mg/kg d'atrazine et une induction de l'expression de la luciférase à l'intérieur de l'épididyme *ex vivo*.

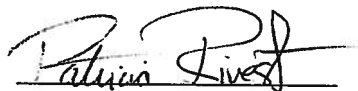
Il a été possible d'observer une corrélation entre la bioluminescence émise par les souris transgéniques et le taux d'œstradiol dans le sang de ces dernières, 48 heures après l'injection de PMSG. Il est donc possible d'en conclure que le gène de la luciférase est bel et bien sous le contrôle du promoteur murin pII de l'aromatase. En effet, l'expression de la luciférase est observée dans les gonades pour chacun des sexes. Toutefois, elle est aussi présente à l'intérieur du cerveau chez les femelles. Le modèle de souris bioluminescentes *Cyp19-luc* possède donc un certain potentiel, mais son utilisation est limitée pour l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur l'expression de l'aromatase. En effet, un nombre restreint de souris répond aux différents composés testés, mais un nombre plus important ne répond pas. C'est suite au test *ex vivo*, qu'il a été possible de confirmer que l'atrazine est un inducteur du gène de l'aromatase. Il est évident que certaines améliorations de ce modèle de souris transgéniques se doivent d'être faites. Ces dernières nous permettraient une meilleure étude des perturbateurs de l'aromatase et de découvrir le potentiel de plusieurs autres substances.

Notre deuxième objectif était de déterminer les effets des différents pesticides sur les cellules LNCaP, soit la localisation des récepteurs des androgènes, la viabilité cellulaire, de même que le taux de sécrétion de PSA. De plus, différents impacts des trois pesticides ciblés sur l'expression de la 5 alpha-réductase ont été observés.

Les résultats obtenus démontrent que le vinclozoline et le bénomyl induisent la translocation des AR vers le noyau, augmentent le taux de sécrétion de PSA et diminuent de manière significative la prolifération cellulaire à fortes concentrations. L'atrazine, pour sa part, n'a aucun effet sur les récepteurs des androgènes, de même que sur le PSA. Par contre, l'atrazine inhibe la prolifération cellulaire en présence de DHT, pour chacune des concentrations testées.

Ces résultats de la deuxième série d'expériences prouvent que les trois pesticides à l'étude peuvent, à certains niveaux, retarder la croissance des cellules cancéreuses de la prostate dépendantes des androgènes.

Finalement, est présenté en annexe un second article, lequel est indirectement lié au présent mémoire et qui traite des effets prolifératifs et androgéniques des dérivés de l'indurubine sur les cellules cancéreuses de la prostate humaine (LNCaP) à des concentrations sous apoptotiques. Les résultats de cette étude permettent de conclure que certains composés provoquent des effets pro-androgènes et favorisent la prolifération des cellules LNCaP.



Signature de l'étudiant



Signature du directeur

Introduction

Le présent mémoire vous sera présenté sous forme de mémoire par article. Toutefois, la présentation sera quelque peu différente du modèle habituel. En effet, afin de faciliter la lecture du document, ce dernier comprendra deux parties distinctes. La première section aura la forme d'un mémoire par article, traitant du potentiel d'un nouveau modèle de souris bioluminescentes comme outil de recherche, afin d'étudier différents perturbateurs endocriniens. La seconde section, quant à elle, sera présentée sous la forme d'un mémoire traditionnel. Il sera possible d'y retrouver un ensemble de résultats permettant d'évaluer les effets de certains pesticides sur le développement du cancer de la prostate. Le tout sera suivi d'une discussion de même que d'une conclusion générale. Finalement, vous trouverez en annexe un second article faisant l'objet de recherche sur les effets prolifératifs et androgéniques des dérivés de l'indurubine sur les cellules cancéreuses de la prostate humaine (LNCaP) à des concentrations sous apoptotiques.

Revue de littérature

1.0 La stéroïdogénèse

Les stéroïdes sont définis comme étant une grande famille chimique, possédant une même structure de base polycyclique carbonée. Leur régulation, de même que leur biosynthèse sont assurées par les hormones polypeptidiques d'origines hypophysaires (Baulieu, 1991).

Une ou deux étapes sont nécessaires à la biosynthèse des stéroïdes. La première étape a lieu au niveau du squalène, un intermédiaire lipidique essentiel à la biosynthèse du cholestérol, des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D chez l'humain (Bloch, 1979). Ce dernier, sous l'effet de l'acide mévalonique, est métabolisé en stérol, le plus abondant des stéroïdes (Barenholz, 2002). Lors de la seconde étape, le stérol subira certaines transformations métaboliques, permettant ainsi la formation d'hormones stéroïdiennes jouant un rôle biologique important (Baulieu, 1991).

Ces étapes permettent de diviser l'ensemble des stéroïdes en deux groupes distincts tels que les stéroïdes non hormonaux et hormonaux. La première catégorie regroupe un grand nombre de substances possédant des structures, de même que des rôles biologiques assez différents. En effet, ce groupe est formé de stérols, d'alcools biliaires, de stéroïdes alcaloïdiques et de plusieurs autres stéroïdes.

Dérivées du cholestérol, les hormones stéroïdiennes, quant à elles, se caractérisent par leur noyau cyclopentanophénanthrénique hydrophobe, qui peut être complètement ou partiellement hydrogéné (Garcia-Segura, 2008). Ces stéroïdes lipidiques (Galikova, Klepsatel et al., 2010) sont synthétisés à l'intérieur de différentes glandes endocrines telles que les gonades, les corticosurrénales, le placenta, mais également par le système nerveux central sous le nom de neurostéroïdes (Garcia-Segura, 2008).

Il existe cinq catégories de stéroïdes, regroupées selon leur récepteur. Il y a entre autre les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes, principalement produits au niveau de la glande surrénale (Eick et Thornton, 2010), tandis que les progestagènes, les androgènes et

les œstrogènes sont d'une grande importance à l'intérieur d'une multitude de tissus (Levin, 2010).

1.1 Les androgènes

Les androgènes sont tous des composés naturels ou synthétiques, assurant la stimulation ou contrôlant le maintien du développement et du caractère masculin chez l'humain (Wilson, 1999). Les hormones stéroïdiennes regroupent la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'androstènedione, l'androstènediol, l'androstérone, la dihydrotestostérone et la testostérone, l'androgène le mieux caractérisé jusqu'à présent (Wilson, 2001). Les androgènes naturels tels que l'androstènedione sont formés à l'intérieur du cortex surrénalien, des ovaires et des testicules, plus particulièrement au niveau des cellules de Leydig (Leder, Longcope et al., 2000). La déhydroépiandrostérone, comparativement aux androgènes mentionnés précédemment, est biosynthétisée dans les glandes corticosurrénales (Mo, Lu et al., 2006). Ces deux stéroïdes agissent en fait en tant que précurseurs à la formation de la testostérone (Leder, Longcope et al., 2000), une hormone jouant un rôle très important au niveau du fonctionnement sexuel, puisqu'elle permet d'obtenir le phénotype masculin chez un embryon mâle (Mooradian, Morley et al., 1987). La DHT, métabolite de la testostérone, est considérée comme l'androgène le plus puissant étant donné sa grande force de liaison aux récepteurs des androgènes (Mooradian, Morley et al., 1987), tandis que l'androstènediol régule la sécrétion de gonadotrophines.

La biosynthèse des androgènes peut se faire selon deux voies métaboliques importantes, que ce soit au niveau des testicules ou des glandes corticosurrénales. La première voie débute par la transformation du cholestérol en prégnenlone, un intermédiaire commun à toutes les hormones stéroïdiennes. Ce dernier devient ensuite de la progestérone, qui subit par la suite une hydroxylation à la position 17 α (Pepe et Albrecht, 1999). Cette voie prend fin par la formation de l'androstènedione. La seconde voie débute de manière semblable à la première. La progestérone, dans ce cas-ci, se trouve à être convertie en DHEA au lieu de subir une hydroxylation. La DHEA va, à son tour, être convertie en

androstènedione, pour finalement devenir de la testostérone (Cooper, Miller et al., 1999) (Figure 1).

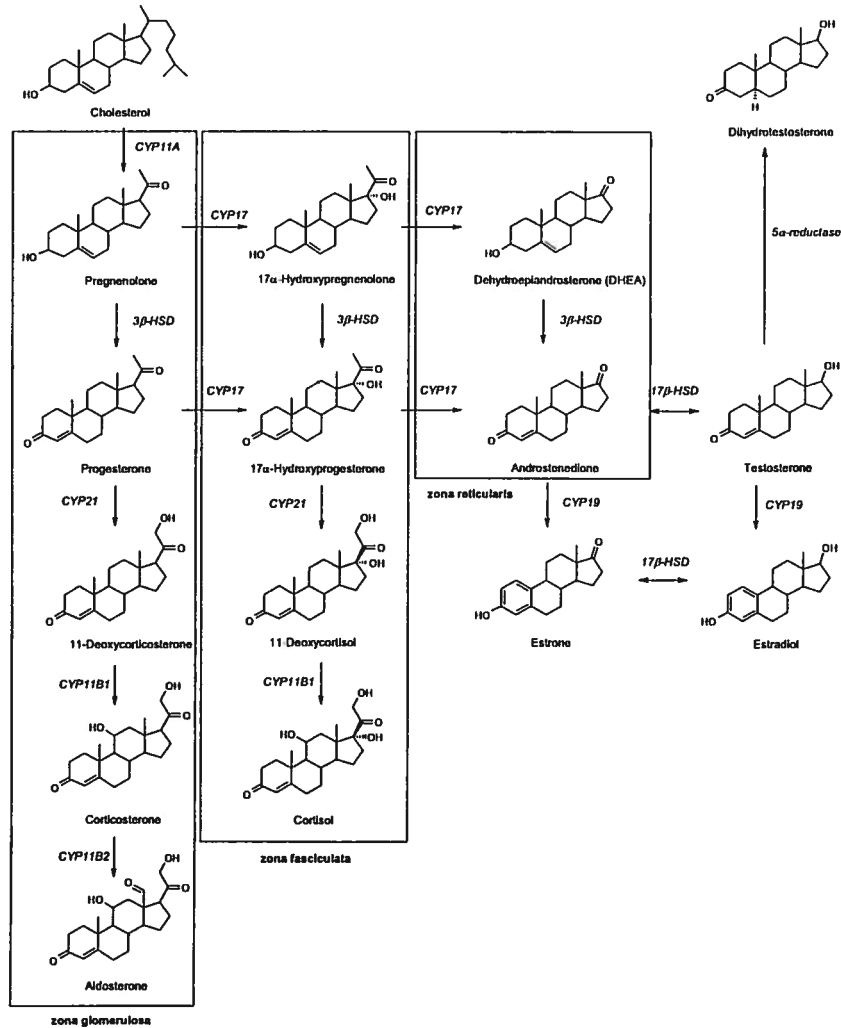


Figure 1 : Biosynthèse des androgènes à partir du cholestérol

La présence d'androgènes à l'intérieur du corps humain est très bénéfique puisqu'il a été démontré que ces derniers inhibent la capacité d'entreposer les lipides dans les cellules graisseuses (Singh, Artaza et al. 2006) et favorisent le développement cellulaire au niveau des muscles squelettiques, tout en augmentant la fonction musculaire (Sinha-Hikim, Taylor et al. 2004). Toutefois, en trop grande quantité, les androgènes peuvent provoquer la stérilité. Stéroïdes anabolisants, les androgènes sont également les précurseurs de l'ensemble des œstrogènes via une aromatisation via par l'enzyme aromatase (Mooradian, Morley et al., 1987).

1.2 Les œstrogènes

Trois œstrogènes endogènes sont présents à l'intérieur du corps humain, l'estrone (E1), l'estradiol (E2) et l'estriol (E3). Chacun de ces derniers exerce un effet biologique d'une importance variable, en débutant par le plus puissant, soit l'estradiol, suivi de l'estrone et de l'estriol (Chen, Zeng et al., 2008).

Tel que mentionné précédemment, l'ensemble des œstrogènes dérive de réactions enzymatiques produites à partir des androgènes. C'est précisément suite à la conversion de la testostérone et de l'androstènedione, par l'aromatase, que sont formées l'œstradiol et l'estrone (Figure 2). Leur biosynthèse se produit principalement à l'intérieur des cellules de la granulosa du follicule, initiée par l'influence de l'hormone lutéinisante des cellules thécales et du FSH (Stocco, 2008).

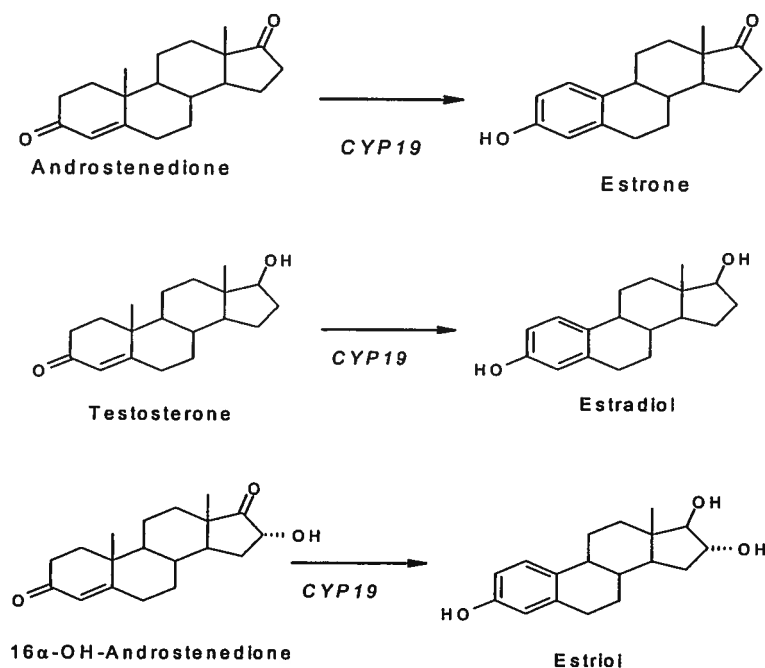


Figure 2 : Synthèse de l'estrone, l'œstradiol et de l'estriol par l'aromatase

L'estriol est quant à lui métabolisé uniquement lors d'une grossesse, à partir de la 16 α -OH-androstènedione produit par l'embryon (Wilson, 2001) (Figure 1). En effet, la concentration des œstrogènes augmente drastiquement, chez la femme enceinte. Cette

production massive est provoquée par l'unité fœtale-placentaire-maternelle. Cette unité joue un rôle fondamental étant donné l'absence de l'enzyme 17 hydroxylase à l'intérieur du placenta, et de la 3 β -hydroxydeshydrogénase au niveau du fœtus. Par le fait même, la prégnénolone placentaire est métabolisée en déhydroépiandrostérone sulfate (DHEAS) à l'intérieur de la surrénale fœtale, suivi de la conversion en 16 α -OH-DHEAS dans le foie fœtal. Dès son retour à l'intérieur du placenta, la 16 α -OH-DHEAS, est transformée en 16 α -OH-androstènedione pour finalement devenir l'estriol. En l'absence de grossesse, la faible concentration d'E3 détectable chez la femme serait due à l'hydroxylation de l'E2 et E1 au niveau hépatique (Stocco, 2008).

Les œstrogènes peuvent agir selon deux voies de signalisation, la voie génomique, aussi appelée la voie classique, et la voie non-génomique. La voie classique est activée suite à la liaison du ligand aux récepteurs aux œstrogènes (ER α et ER β). C'est au niveau du noyau qu'ils formeront un complexe inactif causé par leur liaison à une *heat shock protein* (HSP). Une fois le ligand lié au récepteur, il s'en suit un changement de conformation, permettant la dissociation du complexe ER-HSP et finalement l'activation du récepteur aux œstrogènes (Fagan et Yee, 2008). Par le fait même, cette activation permettra le recrutement de protéines co-activatrices et la libération de corépresseurs. Suite à cela, le complexe ligand-ER peut se lier à l'ADN par l'entremise des éléments de réponses aux œstrogènes (ERE), localisés au niveau du promoteur du gène, permettant ainsi de débiter la transcription de ce dernier et de causer une réponse physiologique (Chen, Zeng et al., 2008).

La voie non génomique quant à elle peut être activée suite à la liaison de l'œstradiol aux récepteurs aux œstrogènes, situés au niveau de la membrane ou du cytoplasme. Cette liaison a pour conséquence d'entraîner plusieurs réponses cellulaires telles qu'une augmentation du taux de calcium et d'oxyde nitrique. Elle permet également l'activation de plusieurs voies de signalisations dont la voie de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), de *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), *protein kinase A* (PKA) et *protein kinase C* (PKC), ayant pour effet de moduler la croissance cellulaire (Song, Fan et al., 2006; Fagan et Yee, 2008). Par ces deux modes d'activation, les ER sont donc des facteurs de

transcriptions permettant la régulation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, l'angiogenèse et à l'apoptose (Chen, Zeng et al., 2008).

Chez la femme, l'œstradiol exerce plusieurs fonctions telles qu'un effet mitotique sur la muqueuse utérine et le sein, permet le contrôle positif et négatif de la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires et agit au niveau de la minéralisation des os (Simpson, 2000). Par ailleurs, le rôle de l'estrone (E1), n'est pas encore tout à fait compris. Il semblerait toutefois agir au niveau de la régulation du degré d'estrogénisation via l'interconversion d'E1 et de l'estradiol (E2) par les isoenzymes de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. Le rôle biologique de l'estriol est quant à lui toujours inconnu.

En plus d'être formés lors du développement folliculaire des ovaires, du corps jaune et du placenta, les œstrogènes peuvent également être produits, à des concentrations moindres par la glande surrénale, les seins et plusieurs tissus non-endocriniens comme les tissus adipeux, les os et le cerveau. Ce sont également les tissus adipeux qui, suite à la ménopause, deviennent la principale source d'œstrogènes chez la femme (Notelovitz, 2002); (Simpson, 2000). Des études ont également démontré que la concentration d'E1 et de son dérivé sulfate à l'intérieur de la circulation sanguine devient la plus importante chez les femmes ménopausées, de même que chez l'homme.

Les œstrogènes, sont des hormones sexuelles que l'on retrouve principalement chez la femme, mais elles sont également détectables dans la circulation sanguine en de plus faibles quantités chez l'homme. Les œstrogènes sont principalement synthétisés à l'intérieur des tissus périphériques suite à l'aromatase de la testostérone et de l'androsténédione en circulation (Lambard, Silandre et al., 2005). Il est possible de retrouver de l'estradiol chez l'homme, dont 20 % de sa production serait en provenance des cellules de Sertoli au niveau des testicules et 80 % serait due à la conversion périphérique des androgènes par l'aromatase (Simpson, 2000).

2.0 L'aromatase

L'aromatase se situe principalement à l'intérieur du réticulum endoplasmique des cellules productrices d'estrogènes (Benachour, Moslemi et al., 2007). D'un point de vue morphologique, cette enzyme est constituée de deux peptides : l'aromatase cytochrome P450 et la flavoprotéine NADPH cytochrome P450 réductase (Bulun, Chen et al., 2007).

L'aromatase (*Cyp19*) est responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes (Kazmierczak, Skalba et al., 2006), et par le fait même, assure l'équilibre entre ces derniers (Benachour, Moslemi et al., 2007). Le processus de conversion catalysé par la *Cyp19* est possible grâce à une succession de trois hydroxylations enzymatiques. En effet, les deux premières étapes se produisent sur le carbone 19, au niveau du groupement méthyle, tandis que la dernière hydroxylation permet la formation de l'estrone et d'une molécule d'acide formique (HCOOH) (Sebastian, Takayama et al., 2002) (Figure 3).

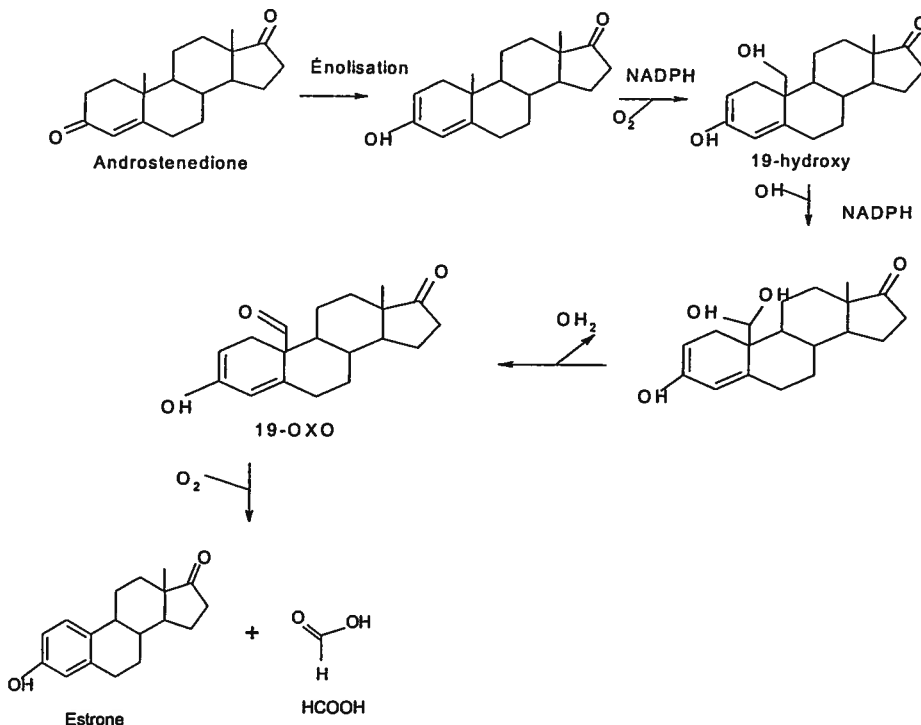


Figure 3: Mécanisme de conversion de l'androstenedione en estrone par l'aromatase

2.1 Régulation et expression tissu spécifique

Le gène de l'aromatase, d'une taille de 123 kb, est constitué de plusieurs promoteurs, spécifiques à différents tissus (Bulun, Sebastian et al., 2003) (Figure 4). Chez l'humain, on en dénombre au moins sept, situés en amont de la région codante de l'aromatase, permettant la transcription de l'ARN messager de l'enzyme. Ainsi, chaque promoteur est régulé par une voie de signalisation distincte (Imir, Lin et al., 2007). Par exemple, le promoteur pII, présent à l'intérieur de plusieurs tissus, régule l'expression de l'aromatase au niveau des ovaires, de la prostate, des testicules et à l'intérieur des tissus adipeux (Bulun, Chen et al., 2007); (Mendelson, Jiang et al., 2005). L'activation de ce promoteur est produite par l'AMPc via la stimulation de PKA et requière également la participation de l'élément de réponse liant l'AMPc (CREB) et du facteur stéroïdogénique 1 (SF-1) (Imir, Lin et al., 2007). D'un autre côté, le promoteur I.1 est actif uniquement à l'intérieur du placenta (Bulun, Chen et al., 2007) sous l'action de l'AMPc, du PKA ainsi que des autres facteurs responsables de la stimulation du PKC (Simpson, 2000). Le gène de l'aromatase à l'intérieur des tissus adipeux est quant à lui, transcrit suite à l'activation du promoteur I.4 (Bulun, Chen et al., 2007), lui-même étant régulé pas les glucocorticoïdes et l'interleukine-6 (Imir, Lin et al., 2007).

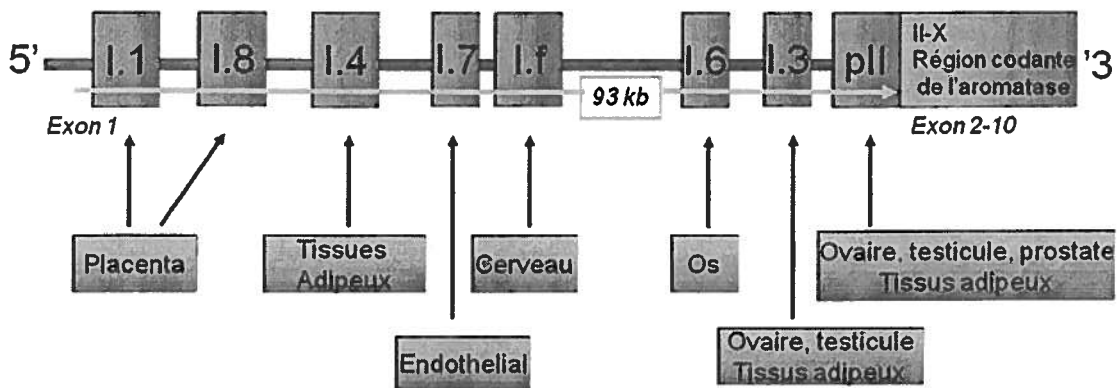


Figure 4 : Promoteurs de l'aromatase spécifiques à différent tissu chez l'humain

Inspirée de (Demura, Reierstad et al., 2008)

L'expression du gène de l'aromatase peut donc être régulée par plusieurs substances, dont certaines hormones et enzymes, et ce, en fonction du tissu qui l'exprime. En effet, au niveau des ovaires, l'expression de la *Cyp19* est sous le contrôle de l'hormone folliculo-stimulante (FSH), tandis que ce sont les glucocorticoïdes via leurs propres récepteurs, de même que l'AMPc, qui assurent ce rôle à l'intérieur des tissus adipeux. L'aromatase peut également être stimulée par les prostaglandines, par exemple la prostaglandine E2 (PGE2), suite à l'activation des voies de signalisations des PKC et PKA, stimulées par les récepteurs de prostaglandine EP1 et EP2, respectivement (Zhao, Agarwal et al., 1996; Richards et Brueggemeier, 2003; Bulun, Chen et al., 2007; Chen, Reierstad et al., 2007). À l'intérieur de la prostate, l'aromatase est principalement exprimée au niveau des cellules stromales. Ce serait la prostaglandine E2, qui stimulerait l'expression de l'enzyme suite à des interactions épithéliales-stromales. Le mécanisme permettant cette stimulation n'est toutefois pas complètement défini. Cependant, certaines études ont démontré le rôle important des récepteurs oestrogéniques (ER α) sur l'induction de l'expression de l'aromatase par la prostaglandine (Miao, Shi et al., 2010).

La présence de l'aromatase à l'intérieur d'une multitude de tissus lui assure plusieurs fonctions, en plus de convertir les androgènes en œstrogènes. En effet, la *Cyp19* joue un rôle essentiel dans le processus de reproduction par son action au niveau de la régulation du cycle ovarien (Bulun, Chen et al., 2007; Mendelson et Kamat, 2007). Outre le fait de réguler différentes régions du cerveau, telles que la zone préoptique, l'hypothalamus et les amygdales, la présence de la *Cyp19* est également importante au niveau des follicules capillaires, des tissus adipeux, des testicules, de même qu'à l'intérieur de l'ossature (Smith, Boyd et al., 1994; Brodie et Njar, 1998; Simpson, 2000).

Une mauvaise régulation de l'enzyme peut entraîner le développement de plusieurs pathologies telles que le dérèglement du cycle menstruel, l'ostéoporose et une diminution de la qualité du sperme, caractérisée par une diminution de la motilité et de la quantité totale de spermatozoïdes. Il est également possible d'observer un dysfonctionnement au niveau de la structure et du fonctionnement du système reproducteur, de la croissance et

du développement de diverses cellules (Benachour, Moslemi et al., 2007). L'aromatase peut également être impliquée dans la cancérogenèse de type hormono-dépendante (Benachour, Moslemi et al., 2007).

2.2 Rôle dans le cancer hormono-dépendant

Le développement de certains cancers, dits hormono-dépendants est souvent associé à une augmentation de l'expression de l'aromatase. Une surexpression de l'enzyme peut être constatée à l'intérieur d'un tissu donné, suite à l'activation de plusieurs promoteurs normalement non actifs dans le tissu. Par exemple, à l'intérieur des tissus pré-adipeux (fibroblastes) constituant le sein, l'expression de l'aromatase est majoritairement régulée par le pI.4, tandis que les promoteurs pII et I.3 y sont très faiblement activés (Chen, Reierstad et al., 2007). Par ailleurs, en plus de constater une activité beaucoup plus importante de pII et de pI.3, lorsqu'il y a développement d'un cancer, le promoteur pI.7 est alors activé. L'expression de l'aromatase est donc régulée par quatre promoteurs au lieu d'un seul. Le fonctionnement de ce 'promoter-switch' n'est toutefois pas encore connu. Par le fait même, suite à la conversion des androgènes par l'enzyme, la concentration locale d'œstrogènes devient beaucoup plus importante (Lu, Chen et al., 2006; Bulun, Lin et al., 2009).

La tumeur elle-même peut également jouer un rôle important dans la cancérogenèse puisqu'elle exprime un taux important d'aromatase, permettant la biosynthèse locale d'œstrogènes. Cette hormone peut aussi être produite de manière autocrine par la tumeur, en présence d'une grande concentration de l'enzyme *Cyp19* (Chen, Zeng et al., 2008).

Les œstrogènes et leurs récepteurs peuvent être impliqués dans le développement d'une multitude de tumeurs malignes. En effet, il est possible de les regrouper en quatre catégories distinctes, soient a) les cancers du sein et gynécologiques (cervicals, endométriaux et ovariens), b) cancers des glandes endocriniennes (adrénocortical, ovarien, pancréatique, de la prostate et de la glande thyroïde), c) cancers au niveau digestif (colorectals, pancréatiques, de l'œsophage et du foie) et finalement d) cancer du poumon

(Chen, Zeng et al., 2008). Il n'est toutefois pas connu si les mécanismes de cancérogenèse par les œstrogènes sont semblables d'un organe à l'autre.

2.2.1 Récepteurs des œstrogènes

Il existe deux types de récepteurs des œstrogènes (ER): le récepteur ER α et ER β (Bilinska, Wiszniewska et al., 2006). Il est possible de les trouver à l'intérieur de divers tissus responsables des fonctions reproductives, tels que les glandes mammaires, les ovaires, le vagin et l'utérus chez la femme et au niveau de l'épididyme et de la prostate chez l'homme (Diel, 2002). On en retrouve également au niveau de plusieurs tissus non-endocriniens ou reproducteurs comme le cerveau, les os, le système cardiovasculaire et immunitaire, les reins et à l'intérieur du foie (Diel, 2002). Le ER α est détectable dans l'hypophyse, les ovaires, l'utérus, les reins, au niveau de la glande surrénale et des glandes mammaires, tandis que le récepteur bêta est présent plus spécifiquement dans les organes tels que la prostate, les ovaires, les poumons, de même qu'à l'intérieur de plusieurs parties du système nerveux central et périphérique (Diel, 2002). Ces récepteurs se localisent principalement au niveau du cytosol, mais bon nombre d'entre eux se trouvent sur la membrane cytoplasmique, ainsi que dans le noyau (Laing, Smith et al., 1977).

Malgré le fait que l'ER α et l'ER β soient codés par différents gènes, leur structure demeure similaire (Fox, Davis et al., 2008); (Anderson et Clarke, 2004). En effet, ils sont tous deux composés d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et de liaison du ligand (LBD), en plus des deux sites d'activation transcriptionnels communément appelés AF-1 et AF-2 (Fagan et Yee, 2008). Les récepteurs ER α et ER β possèdent tous deux une très grande affinité pour l'œstradiol, qui est considéré comme leur ligand le plus important. Toutefois, l'efficacité de la liaison peut être variable d'une substance à l'autre, provoquant ainsi une grande diversité entre les réponses biologiques (Fox, Davis et al., 2008). En effet, ces récepteurs, qui font partie de la famille des récepteurs nucléaires, régulent la prolifération et la différenciation cellulaire, en plus d'assurer le rôle de régulateur au niveau du processus de reproduction (Fowler et Alarid, 2007).

Jusqu'à présent, trois isoformes du récepteur ER α (ER α , ER α -36 et ER α -46) et cinq du ER β (ER β , ER β 2, ER β exon 5, ER β 4 et ER β 5) ont été découvertes chez l'humain (Heldring, Pike et al., 2007). Ces dernières ont fait leur apparition suite au phénomène d'épissage alternatif, créant ainsi différentes variantes à l'intérieur même du domaine fonctionnel des récepteurs. Leurs rôles respectifs restent toutefois non déterminés (Fox, Davis et al., 2008). Cependant, il semblerait que les formes modifiées d'ER α joueraient un rôle répressif sur la signalisation génomique, suite à l'activité de la forme mère du récepteur. Elles agiraient donc en tant qu'activateur cellulaire (Heldring, Pike et al., 2007). En contre-partie, l'ensemble des isoformes du récepteur bêta, en plus d'être exprimé à l'intérieur d'un grand nombre de tissus, interviendrait au niveau des récepteurs alpha, en tant qu'inhibiteur (Strom, Hartman et al., 2004). C'est plus précisément l'ER β 2 qui, une fois dimérisée, va former l'hétérodimère ER α /ER β 2 et inhiber la liaison de l'œstradiol aux récepteurs alpha (Heldring, Pike et al., 2007; Fox, Davis et al., 2008).

Des études ont démontré que la balance entre les ER α et ER β peut influencer de manière importante le développement de tumeurs ainsi que leur traitement (Chen, Zeng et al., 2008). En effet, une forte expression du récepteur alpha peut provoquer des conséquences telles que le développement de tissus malins (Fowler et Alarid, 2007). Il a d'ailleurs été démontré que le récepteur alpha, contrairement aux récepteurs bêta, est responsable d'une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses du sein, des cancers gynécologiques et des glandes endocriniennes et inhibe le développement des cancers du système digestif et du poumon (Chen, Zeng et al., 2008). La régulation de l'activité, de même que le niveau d'ER α peut avoir lieu suite à une hyperméthylation/hypométhylation et par une phosphorylation. Ces deux dernières conditions peuvent engendrer une certaine résistance à divers cancers, tel que le cancer du sein, ainsi qu'aux traitements par anti-œstrogènes (Chen, Zeng et al., 2008).

Dans les cas de cancer de la prostate, il est possible d'associer l'activation des récepteurs ER α à une forte prolifération, à l'inflammation et au développement de tumeurs malignes. D'un autre côté, l'activation des ER β procure des effets anti-prolifératifs,

permet la différenciation ainsi que l'apoptose cellulaire (Chen, Zeng et al., 2008). C'est donc la présence d'ER β à l'intérieur des tumeurs en croissances dans certains tissus tels que les ovaires, les seins et l'endomètre, qui indique un pronostic favorable, de même qu'une meilleure chance de survie. En contrepartie, un ratio élevé ER α /ER β est directement associé à la survenue d'un cancer de la prostate ou du sein.

2.2.2 Effets physiologiques et pathologiques des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes responsables de la croissance, de la différenciation, du processus physiologique de la reproduction (Pepe et Albrecht, 1999) et participent à la biosynthèse des récepteurs de la progestérone (Diel, 2002); (Singh et Kumar, 2005). Elles maintiennent également la densité en minéraux des os (Diel, 2002) et exercent des effets cardioprotecteurs (Bilinska, Wiszniewska et al., 2006).

D'un autre côté, lorsqu'il y a déséquilibre d'œstrogènes, plusieurs pathologies peuvent se développer telles que l'artériosclérose, l'ostéoporose (Simpson, 2000), et entraîner la dégénérescence du système nerveux central. Chez les hommes, un excès d'œstrogènes peut causer le cryptorchidisme, des malformations au niveau de l'épididyme ainsi que l'infertilité (Bilinska, Wiszniewska et al., 2006). De plus, il peut conduire au développement de différents cancers dits hormono-dépendant tels que le cancer du sein, de la prostate, de l'endomètre, de l'ovaire, de la thyroïde (Chen, Zeng et al., 2008) et des testicules (Bilinska, Wiszniewska et al., 2006). À forte concentration d'œstrogènes dans le corps, les risques de développer une tumeur se voient augmentés (Diel, 2002).

Les effets néfastes des œstrogènes peuvent avoir lieu selon trois processus distincts. En premier lieu, ils augmentent l'effet prolifératif des cellules suite à l'activation de voies de signalisation génomiques et non génomiques activées par les ERs. Un grand nombre de molécules inductrices d'œstrogènes a également la capacité d'induire la prolifération et la croissance cellulaire, de réduire la sensibilité des stimuli apoptotiques et finalement de favoriser l'envahissement (Clarke, Anderson et al., 2004). Les œstrogènes augmentent également la prolifération cellulaire suite à la phosphorylation des récepteurs

membranaires, sans se lier aux ERs de la molécule cible. Par exemple, les hormones stéroïdiennes peuvent activer la voie de signalisation d'AKT suite à la phosphorylation de sa SER473. Cette activation peut être arrêtée en présence d'un inhibiteur de la PI3K. Par contre, les antagonistes des récepteurs aux œstrogènes n'ont aucun effet sur cette dernière. Finalement, les œstrogènes et leurs métabolites peuvent induire un effet cancérogène par une action génotoxique directe sur l'ADN, causant ainsi quelques dommages, mutations et transformations au niveau cellulaire (Chen, Zeng et al., 2008).

3.0 Stéroïde 5 α -réductase

Les gènes de la stéroïde 5 α -réductase (type 1 et 2) se répartissent sur une région couvrant approximativement 35 Kb. Quant à la protéine résultante, elle permet la diminution de la polarité des stéroïdes et entraîne également leur réarrangement moléculaire. Cette enzyme est composée de 254 à 260 acides aminés et possède des propriétés qui lui permettent d'être profondément encrée dans la bicouche lipidique membranaire. La 5 α -réductase est principalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Lephart, Lund et al., 2001) et est responsable de la conversion irréversible des androgènes tels que la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) (Figure 5). Cette enzyme expose les différents androgènes à un mécanisme nécessitant le transfert irréversible de deux atomes d'hydrogènes provenant du NADPH, permettant ainsi la réduction de la double liaison en position 4-5 du substrat (Lephart, Lund et al., 2001). La testostérone, alors convertie en dihydrotestostérone par cette enzyme, peut ensuite être reconfigurée en 3 α -androstenediol et finalement devenir l'androstérone. Ces dernières étapes demeurent réversibles et sont possibles grâce à deux enzymes, la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase et la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (Wilson, 2001).

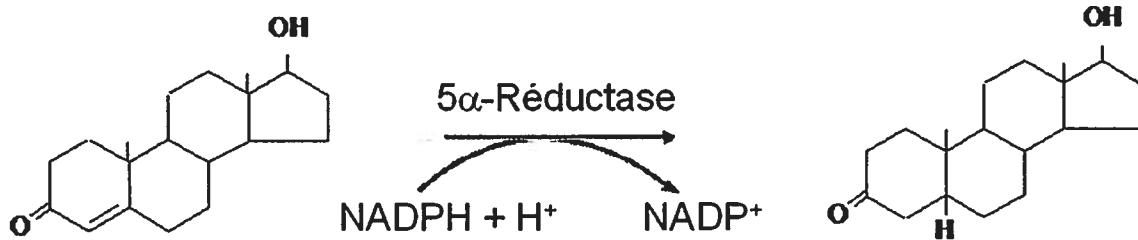


Figure 5: Conversion de la testostérone en dihydrotestostérone par le stéroïde 5 alpha-réductase

Tirée de (Russell et Wilson, 1994)

Chez l'humain, cette enzyme peut être exprimée à partir de gènes homologues complètement distincts les uns des autres, permettant sa transcription sous deux formes, la 5α-réductase 1 (SRD5A1) et la 5α-réductase 2 (SRD5A2). Le gène de la première forme est localisé sur le chromosome 5, tandis que le second est situé sur le chromosome 2. Les deux iso-enzymes possèdent cinq exons entrecoupés de 4 séquences (introns) identiques.

L'activité de l'enzyme étant pratiquement la même, c'est principalement leurs pH optimaux qui les différencient. Leur activité respective serait donc influencée par le pH local d'un tissu. En effet, l'enzyme de type 1 a une échelle de pH optimal assez large, variant de 6.0 à 8.5, comparativement au second type, dont le pH unique est de 5.5 (Lephart, Lund et al., 2001).

3.1 Régulation et expression

L'expression des deux isotypes de l'enzyme est spécifique à différents tissus. En effet, il est possible de retrouver la SRD5A1 au niveau du foie, de la peau et du cerveau, tandis que la SRD5A2 est fortement exprimée au niveau de la prostate. Il est également possible de la localiser au niveau de l'épididyme, de la peau et du foie, de la vésicule séminale, de l'utérus, des seins, des follicules de cheveux, du placenta et du cerveau (Toorians, Kelleher et al., 2003).

3.1.1 Le cerveau

Les cellules gliales ainsi que les cellules neuronales contiennent la 5 α -réductase, mais c'est au niveau des neurones qu'il est possible de trouver l'activité la plus importante de cette enzyme. Tout au long du processus de développement du cerveau, l'activité de la 5 α -réductase varie. En effet, lors de la période périnatale, l'activité enzymatique ainsi que le niveau d'ARNm sont élevés, et diminuent rapidement lors du développement postnatal. Au moment de la puberté, l'expression de la 5 α -réductase diminue drastiquement et se maintient à un taux relativement faible, à l'âge adulte. En plus d'être variable en fonction du développement du cerveau, l'expression de l'enzyme n'est pas uniforme d'une région à l'autre. En effet, lors du développement périnatal, la vitesse d'expression de cette dernière diffère dépendamment de sa localisation au niveau du média basal, de l'hypothalamus, des amygdales ou du cortex frontal (Lephart, Lund et al., 2001).

La 5 α -réductase de type 1 est la forme prédominante dans le cerveau, plus précisément à l'intérieur de l'hypothalamus, du cortex cérébral de même qu'au niveau de la membrane de myéline purifiée. L'activité de l'isoenzyme de type 2 semble toutefois masquée par l'imposant Vmax de l'isoforme de type 1. La 5 α -réductase de type 2 peut être exprimée à l'intérieur de structures particulières du cerveau ou durant des phases importantes du développement. En effet, il est possible de trouver le deuxième type dans le cerveau juste avant la naissance. Si cette dernière est détectée chez l'adulte, ce ne sera qu'en très faible quantité (Poletti, Coscarella et al., 1998).

La testostérone joue un rôle très important à l'intérieur du cerveau. En effet, cette hormone a la capacité d'induire l'expression de la 5 α -réductase 2 à l'intérieur des neurones hypothalamiques. De plus, son intensité se voit augmentée lors de la sécrétion neuronale de LHLH, à l'intérieur de la moelle épinière ainsi qu'au moment de l'expression des motoneurones (Melcangi, Poletti et al., 1998). Au niveau cervical, un grand nombre de neurotransmetteurs et de neuropeptides sont capables d'activer la voie de signalisation des protéines kinases (PKC). Le TPA, un activateur connu de la PKC, pourrait également induire l'ARNm de la SRD5A2 à l'intérieur des neurones de

l'hypothalamus. En plus de convertir la testostérone en dihydrotestostérone à l'intérieur du cerveau, la 5 α -réductase influence la sécrétion de gonadotrophines endocriniennes.

En effet, la 5 α -réductase de type 1 est présente tout au long des différents stades de développement, ayant des fonctions cataboliques, en protégeant les neurones d'un excès d'hormones stéroïdiennes. Il est connu qu'un haut taux de corticoïdes peut devenir dangereux pour les fonctions cérébrales puisqu'il induit le processus de la mort cellulaire par apoptose, particulièrement au niveau des neurones de l'hypothalamus. La SRD5A1 a donc pour rôle de transformer le cortisol et la corticostérone en des composés moins néfastes tels que le 5 α -tétrahydrocortisol et la 11-dehydrocorticosterone (Livingstone, Jones et al., 2000). Cette neuroprotection au niveau des ganglions spinaux, a le pouvoir d'influencer le niveau d'apprentissage et la mémoire, diminuer le risque de crise épileptique, altérer l'humeur, la fatigue et finalement l'activité motrice (Lephart, Lund et al., 2001).

3.1.2 La prostate

À l'intérieur de la prostate, plus précisément au niveau des cellules du stroma, la 5 α -réductase de type 2 est l'enzyme dominante. Dans un grand nombre de tissus et d'espèces, cette enzyme est régulée par la présence d'androgènes. Dans ce cas-ci, c'est le produit de l'enzyme, soit la présence de DHT, ainsi que son précurseur, la testostérone, qui vont augmenter l'activité de la SRD5A, de même que la transcription de son ARNm (Figure 8). Ce phénomène représente un 'feedback' positif, qui se trouve à être l'inverse de ce qui se produit habituellement, c'est-à-dire que le produit d'une enzyme exerce une réponse négative sur l'expression du gène de cette dernière.

Il a été démontré que le promoteur de la 5 alpha-réductase 1 a une activité bidirectionnelle et qu'elle est régulée par la présence du facteur de transcription Sp1. Ce dernier, exprimé à l'intérieur de la cellule assure d'un côté la transcription du gène de la 5 alpha-réductase et d'un autre sens son inhibition. C'est la présence de deux motifs AUUUA, qui permet l'explication de son faible taux d'expression puisqu'ils induisent la dégradation du gène de l'enzyme (Blanchard, Seenundun et al., 2007).

Chez l'humain, une défectuosité ou une mutation au niveau du gène de la 5 α -réductase de type 2 peut entraîner, et ce, à différents degrés, une forme rare de pseudohermaphrodisme chez les hommes. Toutefois, aucune déficience de l'enzyme de type 1 chez l'humain n'a été rapportée jusqu'à maintenant (Poletti, Coscarella et al., 1998; Lo, King et al., 2007).

3.2 Rôle dans les cancers hormono-dépendants

Le taux de testostérone produit par la prostate au cours de la vie n'est pas constant, car il décroît avec l'âge, plus précisément à partir de la quarantaine. En effet, avec l'âge, les testicules produisent de moins en moins de testostérone, et donc, son niveau sérique diminue. Cette diminution n'est toutefois pas observée au niveau du taux d'oestrogène. Ce dernier peut donc demeurer constant ou augmenter suite à l'aromatisation des androgènes produits par les tissus adipeux périphériques. Ce phénomène a pour conséquence d'augmenter de manière significative le ratio oestrogènes/androgènes, ce qui a pour conséquence d'augmenter les risques de développer un cancer de la prostate (Ellem et Risbridger, 2006). Ce type de cancer peut également se développer suite à une hyper-expression du récepteur aux androgènes, à une mutation au niveau du récepteur, à un recrutement excessif de co-activateurs transcriptionnels et suite à la participation de plusieurs autres voies de signalisation comprenant le récepteur (Carruba, 2006).

En effet, un cancer de la prostate peut se développer selon l'interaction des oestrogènes à leurs récepteurs. Par exemple, l'activation des récepteurs ER β par l'oestrogène chez une souris ER α knockout ne produit aucun effet sur le développement d'un cancer au niveau de la prostate. Toutefois chez un modèle ER β knockout, il y a induction de dysplasie, et apparition de lésion pré-maligne de la prostate (Chang et Prins, 1999; Ellem et Risbridger, 2006). La surexpression du gène du type 1 a pour effet d'augmenter la prolifération cellulaire de même que la production de PSA en présence d'une faible concentration d'androgènes (Thomas, Douglas et al., 2009). En effet, à l'intérieur des cellules de la prostate dites malignes, l'activité de la 5 α -réductase de type 1 se trouve à être de 3 à 4

fois plus importante que dans les cellules bénignes, comparativement à l'activité de la 5 α -réductase de type 2, qui demeure similaire dans les deux cas (Russell et Wilson, 1994). La présence d'une forte concentration de l'enzyme fait augmenter le taux de conversion de la testostérone en DHT. Cette hormone stéroïdienne est considérée comme étant un autre facteur pouvant engendrer le développement d'une tumeur bénigne hyperplasique ou d'un cancer de la prostate (Thomas, Douglas et al., 2009).

Des études ont démontré que la SRD5A2 est principalement localisée à l'intérieur du cytoplasme au niveau des cellules non malignes, de même que chez les cellules cancéreuses de la prostate. Toutefois, l'iso-enzyme de la 5 α -réductase 1 se trouve en temps normal dans le noyau, et se déplace vers le cytoplasme lors du développement d'un cancer prostatique. Ce changement de localisation n'est pas totalement connu. Par contre, une théorie à ce sujet a été mise au point par Xu et ses collaborateurs (2006). Cette dernière propose qu'une fois la DHT liée aux récepteurs des androgènes dans les cellules du stroma de la prostate, il y aurait sécrétion de l'andromédistin, un facteur de croissance peptidique, capable de diffuser du stroma vers l'épithélium. L'existence de cette voie de signalisation paracrine permettant la croissance des cellules épithéliales non malignes de la prostate aurait pour conséquence d'inhiber la SRD5A2 (Xu, Dalrymple et al., 2006). Ce phénomène pourrait expliquer le succès d'un traitement des cellules grâce à la présence d'inhibiteur sélectif telle que la finastéride. Par contre, dans les cellules malignes, un changement moléculaire se produit pouvant produire un dérèglement dans l'axe des récepteurs des androgènes, passant de la voie autocrine à paracrine. Par conséquent, la liaison de la DHT aux AR à l'intérieur du noyau des cellules nucléaires malignes a pour conséquence de déclencher la production de facteurs de croissance, favorisant la survie de la tumeur ainsi que son développement. Ce processus est renforcé par l'expression du gène de la 5 alpha-réductase 1. En effet, le passage intracellulaire du noyau vers le cytoplasme de la SRD5A1 est dû à l'augmentation de la synthèse de cet isoenzyme, qui par la suite, va augmenter la quantité de DHT disponible aux cellules et aux récepteurs des androgènes (Thomas, Douglas et al., 2008).

3.2.1 Récepteurs des androgènes

Membre de la classe 1 de la super famille des récepteurs stéroïdes/nucléaires, les récepteurs des androgènes (AR) sont encodés par le chromosome X, activés par un ligand de type hormonal et agissant via leur séquence de liaison à l'ADN comme facteur de transcription intracellulaire. Caractéristiques de cette famille, les AR sont solubles et leurs différents constituants sont rassemblés au niveau du cytoplasme, avant de migrer vers le noyau suite à la formation du complexe androgène/récepteur (Gooren, Saad et al., 2008). La DHT est l'hormone stéroïdienne possédant l'affinité la plus importante envers les récepteurs des androgènes, comparativement à la testostérone, dont le potentiel de liaison est 5 à 10 fois moins important que son dérivé (Gooren, Saad et al., 2008).

Le mécanisme activant, entre autres, les récepteurs des androgènes au niveau de la prostate, et du cerveau est assez semblable à celui des œstrogènes. Il débute par la production de testostérone, qui est alors métabolisée en dihydrotestostérone (DHT) par la 5- α -réductase. Par la suite, la DHT vient se lier au récepteur aux androgènes (AR), qui se dissocie de la protéine chaperonne HSP 90, qui assure sa stabilité en absence de ligand. Cette liaison permet au récepteur de dimériser et de se phosphoryler afin de pénétrer dans le noyau. À l'intérieur de ce dernier, le complexe AR-DHT vient alors se positionner sur l'ADN et recrute des cofacteurs lui permettant ainsi de faire la transcription de gènes inducteurs de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et la transcription de l'antigène prostatique spécifique (PSA), un marqueur spécifique du cancer de la prostate (Zouboulis, Chen et al., 2007).

3.2.2 Effets physiologiques et pathologiques des androgènes

Les androgènes, produits de novo par les gonades et les surrénales, sont des hormones stéroïdiennes responsables de la stimulation et ils contrôlent le développement ainsi que la maintenance des caractères masculins. Ils interviennent lors de la spermatogenèse, diminuent les réserves de graisse, permettent le développement de la

masse musculaire et influencent le comportement humain par leurs interactions au niveau du système nerveux central (Wong, Kelce et al., 1995).

La prostate est l'un des principaux fournisseurs de DHT entrant à l'intérieur de la circulation sanguine. En effet, ce tissu exprime une grande quantité de récepteurs des androgènes et de l'enzyme 5 α -réductase, lui permettant de convertir facilement la testostérone en DHT, avec un taux estimé à 95 %. Les effets de ce grand apport en androgènes, sont principalement visibles lors de la puberté, par l'apparition de l'acné, la pousse des poils au niveau du visage et sur l'ensemble du corps (Toorians, Kelleher et al., 2003). Toutefois, les androgènes peuvent, à long terme provoquer l'alopecie androgénique, définie comme une perte de cheveux ou de poils (Randall, Hibberts et al., 2000).

Un manque de DHT à l'intérieur de divers tissus peut être dû à une mutation au niveau de l'expression de la 5 α -réductase, une modification de son activité, un changement de concentration des hormones précurseurs, ainsi qu'à une inactivation de la dihydrotestostérone suite à une dérégulation de l'enzyme 3-ketostéroïde réductase (Lo, King et al., 2007).

Les stéroïdes jouent un rôle essentiel tout au long du processus de différenciation sexuelle des régions spécifiques du cerveau lors du développement embryonnaire, ainsi que durant la vie postnatale. Lors de ce processus, le rôle direct de la testostérone et de la DHT est de modifier le nombre de branches des neurones préoptiques. Ils agissent également comme un signal morphologique afin de permettre le développement des neurones hypothalamiques, influencent la plasticité et la connectivité synaptique (Lephart, Lund et al., 2001).

4.0 Perturbateurs endocriniens

L'être humain peut être exposé à différents perturbateurs endocriniens pouvant se trouver dans l'atmosphère, dans l'eau, dans divers produits ménagers et à l'intérieur des aliments comestibles (Ait-Aissa, Laskowski et al., 2010). Ces derniers peuvent être définis comme étant toutes substances exogènes, pouvant intervenir sur la synthèse, la sécrétion, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles du corps, responsables de la maintenance de l'homéostasie, de la reproduction, du développement ainsi que du comportement de l'équilibre hormonal d'un organisme (Cowin, Gold et al., 2010). Ils peuvent agir sur les récepteurs hormonaux en tant qu'agonistes ou antagonistes (Clement, Savenkova et al., 2010) et peuvent entraîner des effets néfastes sur la santé suite à l'altération de diverses fonctions qu'elles exercent. Pour se faire, les perturbateurs de la fonction endocrinienne peuvent agir selon plusieurs modes d'action. Les sections suivantes traiteront principalement des mécanismes engendrés par les perturbateurs endocriniens au niveau du fonctionnement des hormones sexuelles.

4.1 Différentes cibles (AR, ER, enzymes stéroïdiennes)

Les perturbateurs endocriniens peuvent entrer en compétition avec les différentes hormones telles que les œstrogènes et les androgènes en se liant à leurs récepteurs respectifs (Ankley, Jensen et al., 2005). De plus, ils ont la capacité d'agir directement au niveau des enzymes stéroïdiennes, par exemple l'aromatase et la 5 α -réductase, en inhibant la transcription de leur gène ou simplement en l'inactivant et ce, au niveau de l'activité catalytique. En plus d'agir au niveau de la stéroïdogenèse, ils peuvent agir sur d'autres voies biologiques comme l'appareil reproducteur et l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonodien, qui joue un rôle important dans la régulation du comportement sexuel (Ankley, Jensen et al., 2005; Hoffmann et Kloas, 2010). En effet, plusieurs xénobiotiques peuvent perturber les fonctions endocriniennes, suite à des interactions au niveau des voies de signalisation, avec des protéines de transports, les enzymes

synthétiques et métaboliques et les récepteurs hormonaux (Benachour, Moslemi et al., 2007).

Les perturbateurs endocriniens peuvent aussi être impliqués dans une multitude d'anomalies au niveau de la reproduction chez les animaux exposés de même que chez les humains (Clement, Savenkova et al., 2010). Par exemple, il a été reconnu que les perturbateurs des fonctions endocriniennes ont pour effet d'empêcher le développement sexuel normal chez les mâles suite à une inhibition de l'activité des récepteurs des androgènes (Clement, Savenkova et al., 2010).

Plusieurs composés anti-androgène ou anti-œstrogène peuvent prendre pour cible la *Cyp19* et la *SRD5A*, dont certaines substances entrant dans la composition de divers médicaments (fadrozole), différents composés naturels tels que le genisteine et la chryisine de même que plusieurs pesticides.

4.2 Les pesticides

En effet, un grand nombre de substances entrant dans la composition de certains pesticides a été classé comme étant responsable de la détérioration du système endocrinien chez l'humain. En effet, le vinclozoline, l'atrazine et le bénomyl sont trois composés chimiques appartenant à cette catégorie (Figure 6).

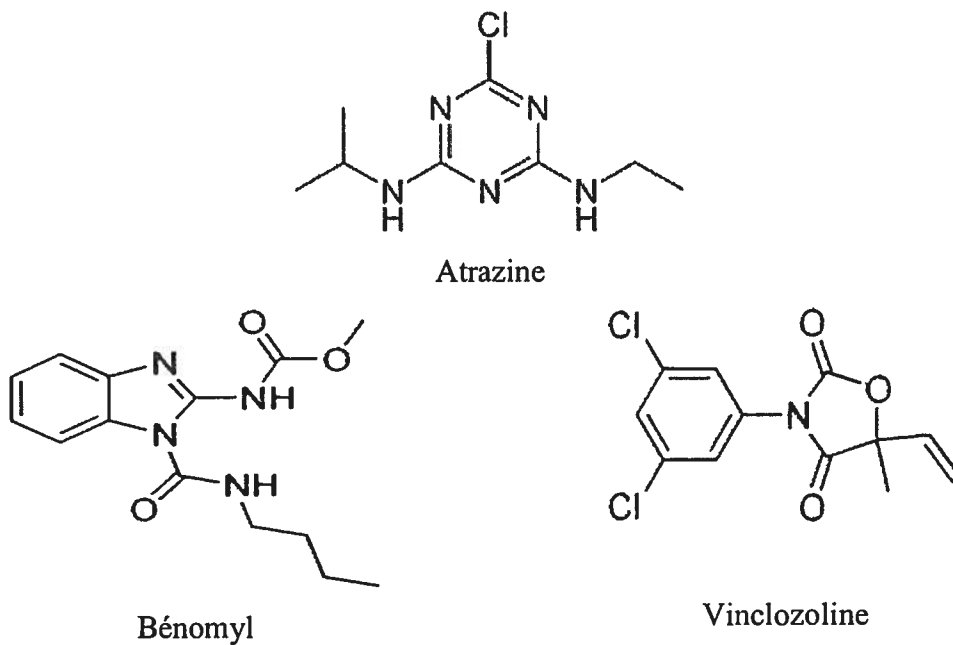


Figure 6 : Représentation moléculaire de l'atrazine, du bénomyl et du vinclozoline

4.2.1 Le vinclozoline

Le vinclozoline [3-(3,5-dichlorophenyl)-5-méthyl-5-vinyl-oxazolidine-2-4-dione] (Kelce, Monosson et al., 1994) appartenant à la famille des dicarboxamides (Eustache, Mondon et al., 2009), est un fongicide utilisé principalement dans les vignobles, sur les cultures maraîchères et sur les tourbières (Clement, Savenkova et al., 2010). Sa consommation est estimée à plusieurs tonnes par année (Hoffmann et Kloas, 2010). Le vinclozoline n'est pas persistant dans la nature, mais il a la propriété de se dégrader en plusieurs métabolites une fois à l'intérieur du sol ou des végétaux (Kelce, Monosson et al., 1994). Il est donc possible de retrouver deux métabolites de ce pesticide dans l'environnement et à l'intérieur d'animaux exposés au vinclozoline, soit l'acide buténoïque (M1) et l'énanilide (M2) (Kelce, Monosson et al., 1994; Wong, Kelce et al., 1995) (Figure 7).

La conversion du vinclozoline en son premier métabolite (M1) est réversible contrairement à l'hydrolyse nécessaire pour obtenir M2 (Kelce, Monosson et al., 1994).

Ce fongicide a pour mode d'action d'inhiber directement la biosynthèse des triglycérides chez les champignons. Le ruissellement et le lessivage sont deux procédés écologiques permettant aux trois composés de se déplacer de la zone traitée vers d'autres sites (Hoffmann et Kloas, 2010). Il est donc possible de les retrouver dans plusieurs cours d'eau à une concentration de 500.69 ng/L, de même que dans l'eau potable à une concentration maximale détectée de 100.14 ng/L (Hoffmann et Kloas, 2010). Il a cependant, été démontré que le vinclozoline pouvait également avoir des effets sur la synthèse de différents gènes chez certains mammifères (Blystone, Lambright et al., 2009).

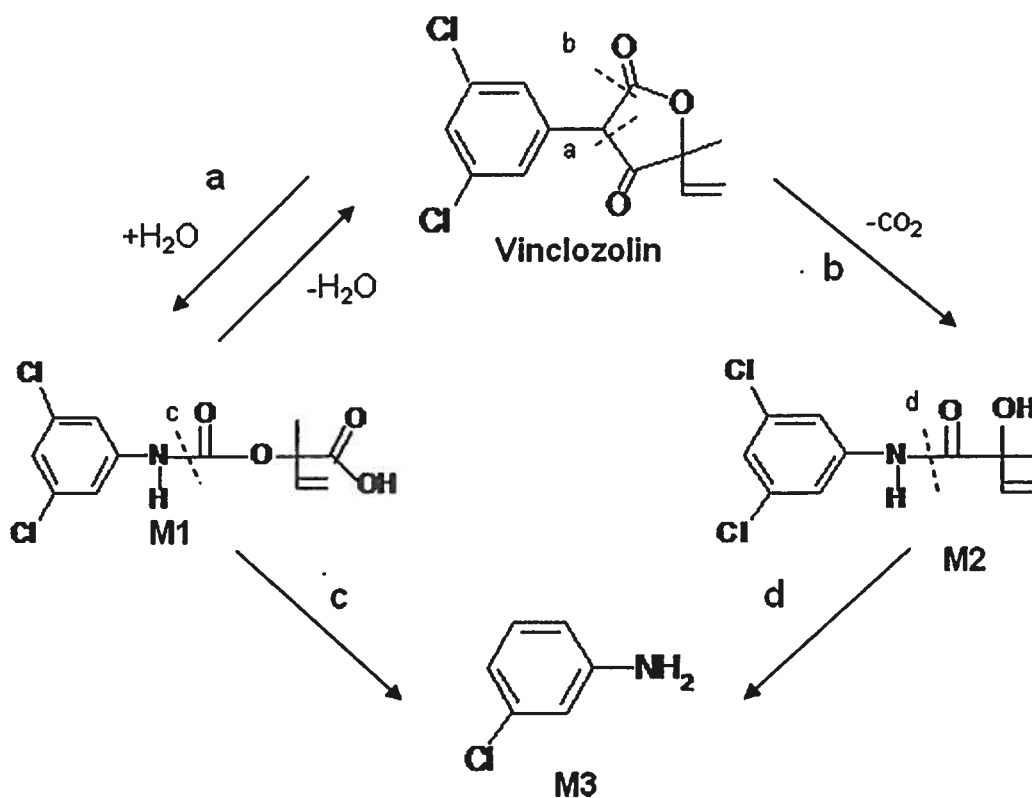


Figure 7 : Structure moléculaire des métabolites du vinclozoline; l'acide buténoïque (M1) et l'énanilide (M2)

Tirée de (Wong, Kelce et al., 1995; Sierra-Santoyo, Barton et al., 2004)

4.2.1.1 Propriétés anti-androgéniques

Des études ont démontré que ce fongicide agit en tant qu'anti-androgène en inhibant l'activité des récepteurs des androgènes (Clement, Savenkova et al., 2010). En effet, il a la capacité d'entrer en compétition avec la DHT ou tout autre androgène, afin de se fixer sur les AR et par le fait même, d'inhiber la transcription des différents gènes tels que ceux impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la production de PSA. Une fois lié aux récepteurs des androgènes, le complexe vinclozoline/AR migre vers le noyau où il inhibe l'expression des gènes dépendant des récepteurs des androgènes, en empêchant le changement conformationnel et par le fait même la liaison de ces derniers aux éléments de réponse aux androgènes sur l'ADN (Kelce, Monosson et al., 1994; Smolinsky, Doughman et al., 2010). Plusieurs études ont démontré que M1, de même que M2 sont de 10 à 100 fois plus efficaces que le vinclozoline à se lier aux récepteurs des androgènes. Cependant, à forte concentration et en absence de DHT, le métabolite M2 se lie aux AR, pénètre à l'intérieur du noyau et agit comme agoniste (Kelce et Wilson, 1997). Ces effets contradictoires permettent de soumettre l'hypothèse de la présence de deux ligands (un agoniste et l'autre antagoniste) sur le dimère des récepteurs des androgènes (Kelce et Wilson, 1997). Le vinclozoline peut aussi empêcher l'activation des ARs et inhiber l'expression de gènes dépendants des androgènes et finalement augmenter la dégradation des androgènes (Smolinsky, Doughman et al., 2010).

Le vinclozoline ainsi que ces deux métabolites peuvent également avoir un impact direct sur l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT, la 5 alpha-réductase. En effet, l'inhibition de cette dernière peut causer une malformation au niveau du système rénal et de l'appareil reproducteur chez le rat, suite à un traitement oral au vinclozoline (Wong, Kelce et al., 1995).

4.2.1.2 Propriétés anti-oestrogéniques

En plus d'avoir un effet anti-androgénique, le vinclozoline peut intervenir sur la synthèse des œstrogènes par son action sur l'aromatase. Ce sont les recherches de

Sanderson et *al*, qui ont mis en évidence l'induction de l'expression du gène de la *Cyp19* en présence de vinclozoline chez la lignée cellulaire H295R (Sanderson, Boerma et al., 2002). Il a également été démontré chez le rat, qu'une exposition au fongicide pouvait entraîner l'hyperplasie des cellules de Leydig, ainsi que l'atrophie de la prostate et de la vésicule séminale (Wong, Kelce et al., 1995). Chez les rates gestantes, le vinclozoline a pour effet d'interrompre le développement normal de l'appareil reproducteur mâle.

4.2.1.3 Propriétés neurotoxiques

Il a également été démontré chez les rats mâles que le vinclozoline pouvait altérer l'activité du système neuroendocrinien central ainsi que la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonodien. En effet, il interfère avec la boucle de rétroaction négative de la testostérone sur la sécrétion de gonadotrophines, affectant par le fait même le taux d'hormone et l'activation de mécanismes androgéniques et oestrogéniques (Hoffmann et Kloas, 2010).

Le vinclozoline est également responsable de l'altération de la *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) sans toutefois interagir au niveau des hormones. Il est possible d'observer une diminution de GnRH à l'intérieur des neurones, cela étant dû à une perte de cellules, par mort cellulaire ou par migration. Cette baisse hormonale peut aussi être causée par une altération au niveau des fonctions cellulaires par exemple par une diminution de la production de cellules et via une interruption du processus de transport de peptides GnRH. Il est toutefois possible d'observer une augmentation peptidique de GnRH en réponse à sa surproduction, faisant suite à la sécrétion normale de l'hormone, ou résultant de la production régulière de la GnRH sujette à l'accumulation (Wadas, Hartshorn et al., 2010). Ces différentes observations démontrent qu'il y a perturbation du transport ainsi que de la sécrétion du décapeptide GnRH à l'intérieur de la voie neuronale et ce, en présence de vinclozoline (Wadas, Hartshorn et al., 2010).

4.2.1.4 Conséquences d'une exposition au vinclozoline

Une exposition de l'embryon au vinclozoline lors de la période de la détermination sexuelle peut entraîner chez l'adulte différents phénomènes. Il peut y avoir augmentation de l'apoptose chez les cellules spermatogéniques et une diminution de la motilité des spermatozoïdes. Ces diverses conséquences à long terme d'une exposition au vinclozoline peuvent être observées pendant trois générations. Le vinclozoline favorise le développement de diverses maladies de la prostate, du rein, la formation de tumeurs (Inawaka, Kawabe et al., 2009; Clement, Savenkova et al., 2010), mais également des anomalies histologiques au niveau des testicules. Finalement, le fongicide peut altérer le niveau de méthylation de l'ADN à l'intérieur des testicules et des spermatozoïdes (Inawaka, Kawabe et al., 2009; Cowin, Gold et al., 2010).

Une exposition à ce pesticide à différentes périodes telles que la gestation, la lactation, la puberté ainsi qu'à l'âge adulte produit divers problèmes : réduction de la distance anogénitale, présence de l'hypospadias, de la cryptorchidie, diminution du poids de la prostate ventrale et diverses autres maladies de la prostate et du rein. L'exposition au vinclozoline peut également entraîner différentes anomalies au niveau du système immunitaire et une diminution du nombre de spermatozoïdes pouvant mener à l'infertilité (Eustache, Mondon et al., 2009).

4.2.2 L'atrazine

La famille des chloro-S-triazine regroupe plusieurs substances telles que l'atrazine, la simazine, la propazine et leur métabolite commun, le diaminochlorotriazine, (Tennant, Hill et al., 1994; Sanderson, Letcher et al., 2001) (Figure 8). Ce dernier, un herbicide encore employé en agriculture, a pour fonction de réduire et/ou de prévenir la pousse de mauvaises herbes en inhibant leur photosynthèse (Wetzel, Luempert et al., 1994; Cummings, Rhodes et al., 2000; Suzawa et Ingraham, 2008). Employée depuis près de 40 ans, son utilisation aux États-Unis est estimée à plus de 35 milles kilogrammes par année (Stoker, Guidici et al., 2002). L'épandage de ce pesticide reste toutefois

controversé puisque des effets néfastes ont été observés chez des espèces non ciblées telles que les amphibiens (Hayes, Khoury et al., 2010). L'atrazine est considérée comme étant le plus commun des contaminants des eaux souterraines et de surface, étant donné qu'il est relativement persistant (Cummings, Rhodes et al., 2000). En effet, à long terme, en plus de le détecter dans l'eau potable, il est possible d'en retrouver à l'intérieur de plusieurs aliments de même que dans l'organisme des poissons (Stoker, Guidici et al., 2002; Albanito, Lappano et al., 2008; Suzawa et Ingraham, 2008).

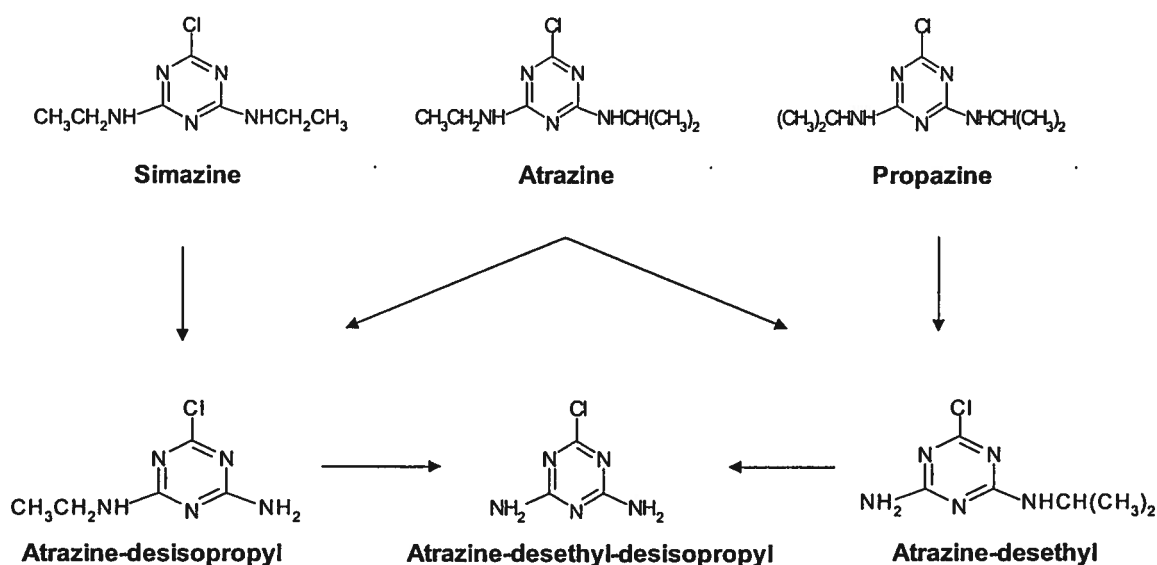


Figure 8 : Voies métaboliques de l'atrazine, la simazine et la propazine et leurs métabolites
Tirée de (Sanderson, Letcher et al., 2001)

Durant ses premières années d'utilisation, l'atrazine n'était pas considéré comme étant une substance toxique pour les mammifères, en vertu de sa dose létale (LD50) par voie orale, qui est de 3 g/kg (Tennant, Hill et al., 1994). À souligner également les valeurs de NOAEL (10 mg/kg/jour) et de LOAEL (70 mg/kg/jour) (Filipov, Stewart et al., 2007). Sous certaines conditions environnementales, les triazines sont très persistantes. En effet, le temps de demi-vie de l'atrazine et de ses métabolites est relatif aux propriétés aérobiques ou anaérobiques du sol variant de 58 à 547 jours et peut doubler en milieu aquatique (Solomon, Carr et al., 2008). Après absorption, l'atrazine et le simazine sont excrétés à 93 % par l'urine et les fèces.

4.2.2.1 Propriétés anti-androgéniques

Une exposition à long terme à l'atrazine peut entraîner plusieurs dysfonctions. En effet, il peut y avoir suppression de la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone à l'intérieur de l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et la prostate. L'atrazine peut également empêcher la liaison de la DHT aux récepteurs des androgènes au niveau de la prostate et entraîner la réduction de cette dernière, de la vésicule séminale et de l'hypophyse (Kniewald, Jakominic et al., 2000; Stoker, Laws et al., 2000).

4.2.2.2 Propriétés anti-oestrogéniques

Il a été démontré que l'atrazine induit l'expression ainsi que l'activité de l'aromatase, suite à l'observation d'une augmentation de la production d'oestrogènes et de la réduction de la synthèse et de l'activité des androgènes (McLachlan, Simpson et al., 2006; Roy, Chakraborty et al., 2009). Pour ce faire, l'atrazine agit selon deux mécanismes, qui se résument en une augmentation de l'activité et de l'expression de l'aromatase. En premier lieu, la phosphodiesterase est inhibée et l'atrazine augmente l'activité de l'AMPc, qui induit à son tour l'expression de SF-1, un régulateur majeur du promoteur pII du gène de l'aromatase. L'augmentation de la transcription du gène de la *Cyp19* a pour effet d'augmenter l'activité enzymatique de ce dernier ainsi que la production d'oestrogène. En second lieu, l'atrazine peut se lier au SF-1, ce qui facilite le recrutement de ce facteur par le promoteur pII, stimulant ainsi les effets biologiques (Albanito, Lappano et al., 2008). Il a été démontré que l'atrazine, en se liant et en activant le SF-1 a la capacité d'induire l'activité de l'aromatase de manière dose dépendante dans différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines transfectées avec des promoteurs et de la luciférase exogène (Suzawa et Ingraham, 2008). Une augmentation de l'expression de l'aromatase par l'atrazine a pour effet de diminuer le taux de testostérone et a pour conséquence de diminuer la masse corporelle et de réduire la consommation alimentaire chez certains individus (Suzawa et Ingraham, 2008).

En plus d'induire l'expression de l'œstrogène, des études ont démontré que l'atrazine pouvait avoir des effets dits anti-oestrogéniques suite à une interaction indirecte avec leurs récepteurs respectifs responsables de la voie de signalisation de la transduction (Connor, Howell et al., 1996).

4.2.2.3 Propriétés neurotoxiques

L'atrazine a un grand potentiel neurotoxique puisqu'elle peut perturber le contrôle exercé par l'hypothalamus au niveau des fonctions hypophysaires et ovariennes. Elle affecte en fait la sécrétion de dopamine (DA) et de norépinephrine, qui ont pour rôle de réguler la sécrétion de prolactine ainsi que de l'hormone lutéinisante. L'atrazine affecte en fait la formation de différents métabolites de la dopamine, soient l'acide 3,4-dihydroxyphenylacétique (DOPAC) et l'acide homovanillique (HVA). En temps normal, la dopamine est convertie en DOPAC à l'intérieur des neurones, tandis que le HVA est produit de manière extraneuronale. Par ailleurs, la présence d'atrazine, va inhiber l'absorption vésiculaire, faisant augmenter la quantité cytosolique de DA libre. Cette dernière est alors convertie en DOPAC par l'enzyme monoamine-oxydase (MAO). Ceci se résume par l'augmentation du ratio DOPAC+HVA/DA et de la diminution de dopamine à l'intérieur des tissus, pouvant mener à des troubles neurologiques tels que la maladie de Parkinson (Filipov, Stewart et al., 2007).

4.2.2.4 Conséquences d'une exposition à l'atrazine

Plusieurs études faites chez les poissons, les amphibiens et les mammifères suggèrent que l'atrazine altère la réponse endocrinienne, neuroendocrinienne et immunitaire dite normale suite à l'inhibition des effets oestrogéniques, sans toutefois entrer en compétition avec les ERs. En effet, une exposition de 48 heures à de faibles concentrations d'atrazine a pour effet d'augmenter le nombre de grenouilles intersexuées et à interrompre le développement normal des gonades (Suzawa et Ingraham, 2008; Roy, Chakraborty et al., 2009).

Un traitement à l'atrazine entraînerait chez les rats un changement dans le cycle œstral de même qu'au niveau des différents stéroïdes tels que l'œstrogène en circulation (McMullin, Andersen et al., 2004). Cette présence accrue de stéroïdes causée par l'atrazine augmenterait les risques de développement du cancer du sein et des ovaires et serait responsable de la croissance de tumeurs au niveau des glandes mammaires et au niveau des organes reproducteurs chez les femelles (Albanito, Lappano et al., 2008). Les changements morphologiques de l'utérus, du vagin ainsi que du col de l'utérus seraient dominés par la grande présence d'œstradiol (Wetzel, Luempert et al., 1994). L'atrazine a également pour effet d'altérer le profil hormonal, perturber le cycle ovarien normal et diminuer de manière dose dépendante l'induction d'œstrogène induite par l'hormone lutéinisante et la prolactine; chacun de ces effets peut mener à une mauvaise implantation du fœtus de même qu'à la perte de ce dernier (Cummings, Rhodes et al., 2000). En plus de diminuer la liaison de l'œstrogène à ces récepteurs à l'intérieur de l'utérus, une exposition à l'atrazine causerait cette même diminution au niveau des récepteurs à la progestérone empêchant par le fait même la synthèse de leur ARNm.

4.2.3 Le bénomyl

Le bénomyl [methyl 1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate] est un fongicide de la famille des benzimidazoles (Potocnik, Vukojevic et al., 2009) sélectivement toxique sur les microorganismes de même que sur les invertébrés tels que les vers de terre. Le bénomyl se lie aux microtubules venant interférer différentes fonctions cellulaires comme la méiose, le transport intracellulaire et il inhibe la prolifération cellulaire (Clement, Rathinasamy et al., 2008). Ce fongicide est principalement utilisé dans l'agriculture et pour les plantes ornementales (Morinaga, Yanase et al., 2004; Kim, Seok et al., 2009). Il a la capacité de se dégrader rapidement en un métabolite, la carbendazime (Figure 9), lorsqu'il se trouve en solution aqueuse, dans une solution organique ou suite à une hydroxylation produite par le système microsomale du cytochrome P450 (Morinaga, Yanase et al., 2004)

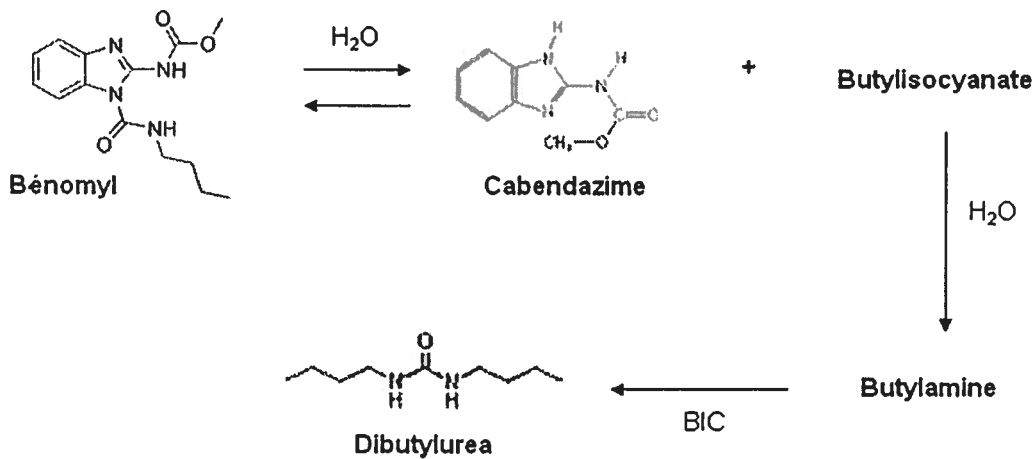


Figure 9: Transformation du bénomyl dans une solution aqueuse. Le bénomyl est premièrement converti en carbendazime, pour ensuite devenir de l'isocyanate (BIC), du butylamine (BA) et du bibutylurée (DBU) en présence de BIC. Inspirée de (Clement, Rathinasamy et al., 2008)

Ce sont les propriétés physiques du bénomyl et de son métabolite primaire, qui expliquent leur persistance dans le sol. En effet, ils peuvent être retenus par différents composés ioniques ou anioniques, liés à des matières organiques entrant dans la composition du sol et selon la teneur en argile de ce dernier (O'Connor, Manjarrez et al., 2009). La demie-vie de ce fongicide peut varier de 2 à 7 semaines puisque leur vitesse de dégradation dépend de l'activité microbienne, de la teneur en eau et du pH du sol (Lim et Miller, 1997; O'Connor, Manjarrez et al., 2009). Lorsque le bénomyl est présent dans une solution aqueuse et acide, sa demie-vie est d'environ trois heures et demie. À pH neutre, cette dernière diminue jusqu'à une heure et demie, tandis que pour une solution basique, moins d'une heure est nécessaire pour que le bénomyl perde la moitié de son activité (Gardiner, Kirkland et al., 1974).

Le bénomyl est considéré comme ayant une toxicité d'une moins grande importance chez les mammifères puisqu'il a une affinité moindre pour la tubuline, comparativement à celle que le pesticide possède pour les espèces fongiques (Hewitt, Mutch et al., 2005; Clement, Rathinasamy et al., 2008). En fait, il a été observé que l'assemblage *in vitro* de la tubuline fongique est inhibé par le composant actif du bénomyl, tandis qu'une résistance à cette inhibition est observée au niveau des cellules du cerveau. L'effet

inhibiteur du bénomyl serait dû à son action antimicrotubulaire (Kilmartin, 1981). Malgré ce fait, l'interaction du bénomyl sur la tubuline provoque un changement de conformation de la structure secondaire de cette dernière, entraînant une multitude d'effets néfastes (Clement, Rathinasamy et al., 2008). Il a été reporté que la dose létale (LD50) du bénomyl est très faible puisqu'elle se situe autour de 10 g/kg chez le rat (Lim et Miller, 1997). Par contre, des effets toxiques au niveau des testicules ont été observés suite à une simple exposition de 100 mg/kg. Une administration chronique de 500 mg/kg peut même diminuer l'efficacité du foie et augmenter son poids (McCarroll, Protzel et al., 2002; Rathinasamy et Panda, 2006). Suite à l'obtention de ces données, le bénomyl, ainsi que son métabolite ont été classés comme ayant un potentiel cancérigène par la «US Environmental Protection Agency».

4.2.3.1 Propriétés anti-oestrogéniques

Il a été démontré que le bénomyl et son dérivé, le carbendazime, induisent l'expression de l'aromatase dans la lignée cellulaire tumorale de la granulosa ovarienne KGN (Morinaga, Yanase et al., 2004; Ohno, Araki et al., 2004). Ils interviennent également au niveau de la transcription en agissant directement sur le promoteur pII de l'aromatase et augmentent ainsi le niveau d'ARNm de l'enzyme. Leur action n'est toutefois pas dépendante de l'activité de l'AMPc, une composante de la voie de signalisation responsable de l'induction de l'aromatase, sous le contrôle de la FSH. En effet, le bénomyl et le carbendazime n'ont aucun effet inducteur sur le niveau d'AMPc et sur l'activité transcriptionnelle activée par le CRE. Ils agissent plutôt en tant que perturbateurs des microtubules produisant ainsi un déséquilibre de la dynamique entre la tubuline et les microtubules (Morinaga, Yanase et al., 2004).

4.2.3.2 Conséquences d'une exposition au bénomyl

Une exposition à long terme au bénomyl peut entraîner le développement de différentes tumeurs, ainsi qu'une différenciation sexuelle inappropriée (Morinaga, Yanase et al., 2004; Ohno, Araki et al., 2004). Chez les femelles, il y a risque de cancer

du sein suite à une surexpression locale d'œstrogène provoquée par l'augmentation de l'expression de l'aromatase. En contrepartie, chez les mâles, le bénomyl a été reconnu comme un produit toxique au niveau de leur système reproducteur, puisqu'il est responsable d'une hypo-spermatogénèse et de la formation de cellules germinales multinuclées. Ces sévères dysfonctionnements des testicules seraient causés par une mauvaise division cellulaire et d'autres procédés dépendant des microtubules lors de la spermatogénèse (Morinaga, Yanase et al., 2004). Il a également été observé chez le rat une diminution du poids des testicules et de l'épididyme ainsi qu'un faible niveau de spermatozoïdes pouvant entraîner l'infertilité (Lim et Miller, 1997; Sorour et Larink, 2001; Kim, Seok et al., 2009). De plus, il est possible de constater une atrophie au niveau du tubule séminifère et une hausse importante de cellules germinales en apoptose.

Des malformations ont également été observées au niveau des tissus neuronaux. Une diminution du diamètre du sac vitellin et de la longueur du fœtus, chez les embryons de rats mis en présence du pesticide a également été constatée (Kim, Seok et al., 2009). Des études effectuées chez des poissons zébrés, ont démontré que le bénomyl affectait aussi le rythme cardiaque et augmentait l'incidence de malformations telles que l'œdème du péricarde, un allongement du cœur, la lordose et la disparition de la nageoire dorsale. Malheureusement, les problèmes les plus souvent rencontrés suite à une exposition au bénomyl sont l'hydrocéphalie, qui se caractérise en une accumulation anormale de liquide céphalo-rachidien, augmentant la pression à l'intérieur des ventricules, ce qui peut causer des dommages irréversibles du cerveau et des malformations du squelette. Au niveau des yeux, le bénomyl peut entraîner la dysplasie de la rétine, des cataractes, de la microphthalmie et l'anophtalmie (Kim, Seok et al., 2009). Des tests *in vitro* ont aussi démontrés que le bénomyl provoque une hypoxie à l'intérieur d'une grande variété de tissus et génère un stress oxydatif (Laryea, Gullbo et al., 2010). Il peut également altérer la synthèse de protéines, la différenciation cellulaire, la formation du cytosquelette et favoriser le développement de maladies telles que la trisomie 13 (Hewitt, Mutch et al., 2005).

5.0 Modèles expérimentaux pour l'étude des perturbateurs endocriniens

5.1 Modèle *In vitro*

5.1.1 L'étude des composés pro ou anti-androgéniques

Plusieurs modèles *in vitro* ont été utilisés dans le but d'étudier les différents effets des perturbateurs endocriniens. Comme mentionné précédemment, certaines substances peuvent agir en tant que pro ou anti-androgéniques. Il est donc essentiel que les lignées cellulaires employées possèdent des caractéristiques spécifiques. Plusieurs d'entre-elles peuvent être utilisées telles que les cellules 22rv1, qui expriment les récepteurs des androgènes (Deep, Gangar et al., 2010), les MDA-kb2 (Rivest, Renaud et al., 2010), les cellules LNCaP et plusieurs autres.

5.1.1.1 Le modèle LNCaP

Les cellules LNCaP sont des cellules sensibles aux androgènes et proviennent d'adénocarcinome de la prostate (humain) (Horoszewicz, Leong et al., 1983). En effet, elles viennent plus précisément d'une lésion métastatique du ganglion lymphatique sous-claviculaire gauche de métastase d'un homme caucasien de 50 ans (Kim, Park et al., 2006).

Ce sont des cellules épithéliales adhérentes qui nécessitent la présence d'androgènes pour bien se diviser dans des conditions *in vitro*. Par contre, leur vitesse de croissance n'est pas très élevée, puisqu'elles possèdent un temps de dédoublement de 60 heures (Horoszewicz, Leong et al., 1983). Les cellules LNCaP se caractérisent comme un modèle *in vitro* sensible aux hormones. Elles possèdent des récepteurs des androgènes dans le cytoplasme ainsi qu'au niveau du noyau. Il est donc possible d'utiliser des hormones afin de moduler le taux de croissance des cellules LNCaP. De plus, les cellules cancéreuses de la prostate sécrètent l'antigène spécifique de la prostate (PSA) (Kim, Park et al., 2006), souvent utilisé comme marqueur d'un développement pathologique au

niveau de cette dernière. C'est la 5 α -réductase qui est partiellement responsable de la régulation de la croissance des cellules suite à la conversion de la testostérone en DHT (Horoszewicz, Leong et al., 1983).

La culture de ces cellules nécessite beaucoup de précautions puisqu'elles peuvent facilement se détacher de la paroi du flacon qui les contient. Ce sont uniquement 70 % des cellules LNCaP détachées qui adhéreront de nouveau, et ce après 40 heures. Ce faible potentiel d'adhérence cause également la perte de 10 à 20 % des cellules lors d'un changement de milieu de culture. Le dépassement d'une densité de 8×10^5 cellules/cm² peut également provoquer le détachement spontané des LNCaP (Horoszewicz, Leong et al., 1983).

Les cellules LNCaP ont la capacité de rendre leur milieu de culture acide et elles ne deviennent pas confluentes. En effet, au lieu de former une monocouche, elles se lient les unes sur les autres en formant de petits agrégats (Gibas, Becher et al., 1984). La croissance des cellules LNCaP est optimisée dans un milieu RPMI-1640 contenant un supplément de FBS pouvant varier de 2.5% à 15 % (Flores et Burnstein, 2010).

La lignée cellulaire est assez stable et est très utile pour la recherche dans le domaine de l'oncologie, plus particulièrement pour l'étude de l'adénocarcinome de la prostate, étant donné que la qualité des cellules malignes reste toujours la même. La lignée cellulaire LNCaP est la seule lignée disponible qui exprime la phosphatase acide de la prostate humaine (hPAP) (van Steenbrugge, Groen et al., 1989). Il s'agit donc d'un bon modèle pour étudier la régulation transcriptionnelle du gène de l'enzyme hPAP et de plusieurs autres gènes de la prostate.

5.1.2 L'étude de la stéroïdogénèse et de l'aromatase

Lors de la stéroïdogénèse, plusieurs enzymes doivent travailler de concert à la formation d'un grand nombre d'hormones. Par exemple, la SRD5A assure le maintien de plusieurs fonctions sexuelles et rôles physiologiques importants par la formation de DHT

à partir de la testostérone à l'intérieur de la prostate et des épидидymes. La 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase et l'aromatase sont également essentielles à la conversion de l'estrone en oestradiol à l'intérieur des ovaires. De plus, l'aromatase joue un rôle important à l'intérieur des testicules. En effet, cette dernière convertit la testostérone en oestradiol, permettant ainsi l'initiation de la spermatogénèse de même que la mitose des spermatogonies (Sanderson, 2006). Étant donné que l'aromatase est exprimée dans un grand nombre de tissus et qu'elle demeure une enzyme primordiale à la stéroïdogénèse, plusieurs modèles *in vitro* peuvent être utilisés dans le but d'étudier les effets des perturbateurs sur cette enzyme.

Le modèle cellulaire LNCaP, en plus d'être utile pour l'étude des effets pro/ et anti-androgénique, peut également être employé dans diverses études de la stéroïdogénèse. En effet, les cellules cancéreuses de la prostate humaine expriment l'enzyme SRD5A1. Les cellules JEG-3 (Letcher, van Holsteijn et al., 1999; Sanderson, Letcher et al., 2001), les cellules de carcinome (humains) (Ciolino, Dai et al., 2010), les cellules de la granu osa (humains) (Khalaf, Mitre et al., 2010) et les cellules H295R (Sanderson, Seinen et al., 2000; Sanderson, Letcher et al., 2001; Sanderson, Boerma et al., 2002) sont également des exemples de lignées cellulaires couramment utilisées pour ce type de recherche.

5.1.2.1 Le modèle H295R

Les cellules H295R sont des cellules de carcinome surrénalien humaines, provenant d'une femme de race noire âgée de 48 ans (Gazdar, Oie et al., 1990). En plus d'exprimer la totalité des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, elles détiennent toujours la capacité de synthétiser l'ensemble des hormones stéroïdiennes du système corticosurrénal chez les fœtus de même que chez les adultes (Staels, Hum et al., 1993; Rainey, Bird et al., 1994). En effet, elles peuvent produire de l'aldostérone, du cortisol ainsi que le stéroïde C19 (Rainey, Bird et al., 1993). En plus de produire des androgènes et des oestrogènes, les cellules H295R sont sensibles à l'angiotensine II ainsi qu'au potassium (Bird, Hanley et al., 1993).

Ce sont des cellules adhérentes, dont leur population double après deux jours en culture. Ces dernières ont également été adaptées afin de croître sous forme de monocouche. Leurs conditions de mise en culture restent standards: 95 % d'air et 5% de dioxyde de carbone. Le milieu de culture est constitué de milieu DMEM et contient de l'insuline, de la transferrine, du sélénium, du sérum bovin, de l'acide linoléique et finalement du Nu-sérum (Gazdar, Oie et al., 1990).

Grâce à l'ensemble de ses caractéristiques, la lignée cellulaire H295R permet de déterminer si une substance peut intervenir dans le processus de la synthèse des hormones stéroïdiennes.

5.2 Modèle *In vivo*

Les études *in vivo* sont très utiles afin de constater les effets immédiats ou à long terme de différentes substances à l'intérieur de tout l'organisme. Elles permettent également de vérifier ou de confirmer la possibilité d'interactions avec d'autres voies de signalisation à l'intérieur d'un même ou d'autres tissus. Les études *in vivo* prennent également en considération les effets toxicocinétiques tels que le métabolisme.

Certaines études sur les perturbateurs endocriniens comme le vinclozoline, l'atrazine et le bénomyl (utilisés dans cette étude) ont été faites chez des reptiles et des poissons, étant donné que les trois pesticides mentionnés précédemment peuvent se retrouver à l'intérieur de la nappe phréatique et dans l'eau potable (Cummings, Rhodes et al., 2000). Plusieurs études ont également été faites chez différentes espèces de rongeurs, telles que les rats et les souris, et ce, à différents stades de développement. En effet, diverses expériences ont été pratiquées au stade embryonnaire, à la puberté, à l'âge adulte, plus précisément chez les animaux sujets à la ménopause et chez les femelles enceintes (Eustache, Mondon et al., 2009). Les modèles utilisés peuvent être de type sauvage, mais peuvent aussi avoir subi des modifications transgéniques (souris knockout), par exemple

un ajout ou un retrait d'un gène permettant de connaître d'avantage d'informations sur le composé administré, de même que sur le rôle du gène ciblé dans la toxicité du composé.

Par ailleurs, l'étude des perturbateurs endocriniens peut également se faire grâce à l'utilisation de souris transgéniques bioluminescentes. L'utilisation de ces souris dans le domaine de la recherche offre plusieurs avantages. En effet, elles sont très sensibles, permettent de suivre *in vivo* le développement de plusieurs pathologies, de constater l'effet de divers xénobiotiques au niveau physiologique et le tout, sans devoir sacrifier l'animal. Les souris bioluminescentes permettent également de suivre la progression et le développement de métastases lorsqu'il y a présence d'un cancer (Lyons, Lim et al., 2006).

5.2.1 L'étude des composés pro- ou anti-androgéniques

Comme mentionné précédemment, les perturbateurs endocriniens peuvent agir à différents niveaux dans la régulation des androgènes. Il existe donc sur le marché différents modèles de souris permettant ces études. Il est possible de retrouver, entre autres, le Hershberger assay, couramment utilisé (Hershberger, Shipley et al., 1953). Ce modèle a été mis au point afin de détecter à court terme les composés anti- ou androgéniques ou capables d'inhiber la 5 α -réductase. Dans ce modèle, l'obtention d'un résultat positif se caractérise par un changement de poids significatif d'au moins deux tissus (Yamada, Kunimatsu et al., 2004).

Toutefois, l'évolution scientifique a faite place à de nouveaux modèles bioluminescents *in vivo*. En effet, sont apparus sur le marché les modèles *Kap-Luc* (kidney androgen regulated protein), *Mup1-Luc* (major urinary protein-1, ou alpha-2u globulin) et plusieurs autres.

Kap est en fait le gène le plus abondant et le plus spécifiquement exprimé à l'intérieur des cellules épithéliales du tubule proximal. Il est aussi régulé uniquement par la glande thyroïde et les hormones stéroïdiennes sexuelles (Tornavaca, Pascual et al., 2009). Les

souris transgéniques ont donc un promoteur de 1.5 kb de la protéine murine Kap et de l'ADNc modifié de luciférase. Son expression basale se situe principalement au niveau des reins, mais également à l'intérieur de l'épididyme, des testicules et des la vésicule séminale chez les mâles. Chez les femelles, en plus des reins, il est possible de retrouver l'expression du gène de kap au niveau des ovaires et de l'utérus (Fiche technique Caliper LifeScience).

Mup1, une protéine urinaire majeure 1, fait partie de la famille des protéines sécrétrices à faible poids moléculaire. On en dénombre six, ayant toutes une séquence d'ARNm spécifique. Les Mups peuvent être synthétisées par différents tissus sécréteurs. Mup1, dans ce cas-ci, la protéine d'intérêt, est synthétisée uniquement par le foie (Son, Shahan et al., 1991). Elle jouerait un rôle très important dans la régulation du glucose et le métabolisme des lipides (Zhou, Jiang et al., 2009). Ce modèle bioluminescent est très intéressant puisqu'il est androgène dépendant.

Les deux modèles de souris mentionnés précédemment sont principalement utiles pour étudier la régulation hormonale par les androgènes et les composés anti-androgéniques, les changements possibles sur le taux de testostérone et finalement la régulation de leurs gènes spécifiques, le Kap et le Mup1 (Internet 1).

5.2.2 L'étude de la *Cyp 19* (souris bioluminescentes)

L'aromatase est également une cible potentielle des différents pesticides capables de perturber le système endocrinien. C'est pourquoi, il y a quelques années, la compagnie Caliper LifeSciences a mis sur le marché un nouveau modèle de souris transgéniques (LPTA® CD-1-Tg (*Cyp19-luc*)-Xen). Ce modèle murin contient, à l'intérieur de son génome, le gène modifié de la luciférase de luciole, sous le contrôle du promoteur murin pII de l'aromatase. Chez la souris, tout comme chez l'humain, le promoteur pII est spécifique aux gonades (ovaires, testicules et épидидymes) (Bulun, Chen et al., 2007). Le gène modifié, implanté par micro injection à l'intérieur de l'embryon murin, est d'une longueur de 400 paires de bases et contient tous les éléments nécessaires à la transcription

de l'aromatase. Suite à la croissance de l'animal, le transgène se localise uniquement au niveau des gonades.

En laboratoire, les souris transgéniques doivent être injectées à la D-luciférine de manière intrapéritonéale afin de visualiser leur bioluminescence. La présence de la luciférine va créer une réaction d'oxydation sur la luciférine, qui sera alors convertie en oxyluciférine. Cette oxydation se produit sous le contrôle de l'enzyme luciférase et permet ainsi, en présence d'ATP, l'émission de photons (Hastings, 1983) (Figure 10). L'utilisation d'un appareil d'imagerie spécialisé, le IvisImager, permet de capter le signal bioluminescent émis sous forme de photo. Il est ensuite possible de procéder à l'analyse par imagerie et ce, dans le but de comparer l'intensité de la bioluminescence avant et après l'exposition de l'animal à un perturbateur endocrinien. Mis à part la souche *Cyp-Luc-125* utilisée pour l'ensemble des expériences de la présente étude, la compagnie Caliper LifeScience a également mis au point une seconde lignée de souris transgéniques: la souche *Cyp-Luc-128*. Cette dernière n'avait toutefois pas une localisation de la bioluminescence spécifique requise à des fins expérimentales. Cette seconde lignée nous démontre donc l'importance de choisir un modèle, qui représente une situation normale à l'intérieur d'un organisme.

Grâce à ce modèle de souris, les scientifiques ont la possibilité de tester plusieurs composés susceptibles ou connus d'être responsable de la perturbation de plusieurs fonctions endocrines.

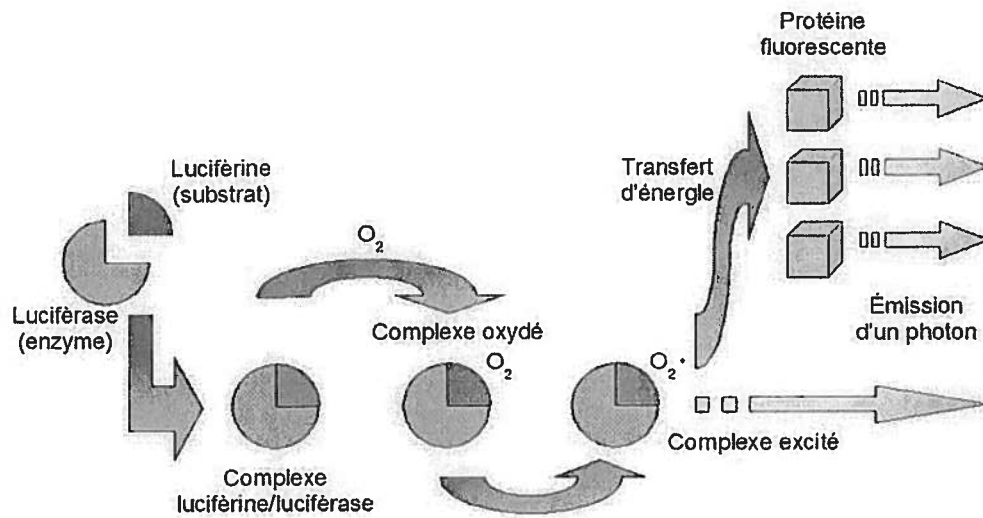


Figure 10 : Réaction d'oxydation de la luciférine par l'enzyme de la luciférase.

Auteur : [ElfeJediBiochimiste](#) [GNU Free Documentation License](#)

6.0 Hypothèses et objectifs

Suite aux résultats antérieurs démontrant que l'atrazine augmente l'expression de l'aromatase chez plusieurs lignées cellulaires telles que les cellules corticosurrénales humaines H295R, via un mécanisme impliquant la stimulation de l'AMPc et de la protéine kinase A, il est possible de proposer que le pesticide induira l'expression de l'enzyme *Cyp19* à l'intérieur d'un modèle animal vivant. Il est également possible d'émettre comme hypothèse que le modèle de souris transgénique sera très utile pour différents types de recherches, permettant ainsi de faire des études en temps réel sans avoir recours au sacrifice de l'animal. L'objectif majeur de la première partie de ce mémoire est donc de déterminer le potentiel d'un nouveau modèle de souris transgéniques pour l'étude des effets *in vivo* de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase (*Cyp19*).

Première Partie

Article: Evaluation of a Bioluminescent Mouse Model Expressing Aromatase pII-Promoter-Controlled Luciferase as a Tool for the Study of Endocrine Disrupting Chemicals

Toxicology and Applied Pharmacology (2010) 249:33-40

Résumé de l'article

Le dysfonctionnement de l'enzyme aromatase (CYP19) est associé à diverses pathologies endocriniennes telles que l'ostéoporose, des problèmes de fertilité et le développement de certains cancers hormono-dépendants. Certains perturbateurs endocriniens chimiques affectent l'expression et l'activité *in vitro* de l'aromatase, mais très peu est connu sur leurs effets *in vivo*. Nous avons évalué un modèle de souris bioluminescentes (LPTA®)CD-1-Tg(*Cyp19-luc*)-Xen), qui expriment la luciférase sous le contrôle du promoteur pII de l'aromatase (souris *Cyp-luc*) afin de déterminer son potentiel comme outil de travail *in vivo* et par le fait même, cibler les produits chimiques qui pourraient affecter l'expression de l'aromatase. Nous avons étudié les effets de la forskoline, de la pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) et de l'atrazine dans le modèle (il a déjà été démontré que l'atrazine induisait l'expression du promoteur pII de l'aromatase dans les cellules du carcinome adénocortical humaines H295R). La bioluminescence au niveau des gonades était augmentée après 3-5 jours, chez environ 2-4 souris *Cyp19-luc* de chaque groupe de 10 mâles et femelles injectées de manière intra-péritonéale avec 10 mg/kg de forskoline, comparativement aux témoins; les autres ne répondent pas au traitement. De plus, environ 4 souris par groupe de 9 femelles injectées avec le pregnant mare serum gonadotropin ont montré une augmentation de la bioluminescence au niveau des ovaires après 24 heures. Les mâles exposés à une simple dose de 100 mg/kg ou les mâles et les femelles exposés à tous les jours pendant 5 jours avec 30 mg/kg d'atrazine ne démontrent aucun changement de bioluminescence au niveau des gonades et ce, sur une période de plus de 7 jours. Par contre, il est possible d'observer une augmentation de la bioluminescence en fonction du temps, suite à l'injection de l'atrazine (100 mg/kg) chez les femelles (p 0.05;two-way ANOVA). L'activité ex vivo de la luciférase à l'intérieur des organes prélevés sur les souris traitées augmente de manière significative en présence de forskoline à l'intérieur des testicules (51%), des épидидymes (19 %) et des ovaires (72%). L'atrazine (30 mg/kg/jour) augmente significativement l'activité de la luciférase (30 %) à l'intérieur des épидидymes uniquement. Il est possible de conclure que certaines souris *Cyp19-luc* sont plus sensibles aux différents inducteurs de l'aromatase testés, ce

qui suggère que ce modèle, avec une optimisation plus poussée, pourrait avoir un certain potentiel comme outil de dépistage *in vivo* des contaminants environnementaux.

Contribution de l'étudiante à l'article

Evaluation of a Bioluminescent Mouse Model Expressing Aromatase pII-Promoter-Controlled Luciferase as a Tool for the Study of Endocrine Disrupting Chemicals

Toxicology and Applied Pharmacology (2010) 249:33-40

J'ai procédé à toutes les manipulations et à la planification de mon protocole expérimental (soit le maintien de la colonie de souris transgéniques, les injections ip et scans des souris, les dissections des animaux, etc.). J'ai également fait toutes les collectes de données, de même que la compilation, l'analyse et l'interprétation des résultats. J'ai moi-même rédigé le présent article, qui a été vérifié et corrigé par mon directeur de recherche Dr Thomas Sanderson. Le Dr Thomas Sanderson est le chercheur principal du projet, tandis que le Dr Patrick Devine a contribué à l'expérience traitant sur les effets du PMSG sur l'expression de l'aromatase chez les femelles (figure 5).



Evaluation of a bioluminescent mouse model expressing aromatase PII-promoter-controlled luciferase as a tool for the study of endocrine disrupting chemicals

Patricia Rivest, Patrick J. Devine, J. Thomas Sanderson *

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 blv des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2010

Revised 6 August 2010

Accepted 10 August 2010

Available online 17 August 2010

Keywords:

Bioluminescence

Aromatase (CYP19)

pII promoter

Atrazine

Endocrine disruption

In vivo imaging

ABSTRACT

Dysfunction of the enzyme aromatase (CYP19) is associated with endocrine pathologies such as osteoporosis, impaired fertility and development of hormone-dependent cancers. Certain endocrine disrupting chemicals affect aromatase expression and activity *in vitro*, but little is known about their ability to do so *in vivo*. We evaluated a bioluminescent mouse model (LPTA®)CD-1-Tg(Cyp19-luc)-Xen expressing luciferase under control of the gonadal aromatase pII promoter as an *in vivo* screening tool for chemicals that may affect aromatase expression. We studied the effects of forskolin, pregnant mare serum gonadotropin and atrazine in this model (atrazine was previously shown to induced pII-promoter-driven aromatase expression in H295R human adrenocortical carcinoma cells). About 2–4 out of every group of 10 male or female Cyp19-luc mice injected i.p. with 10 mg/kg forskolin had increased gonadal bioluminescence after 3–5 days compared to controls; the others appeared non-responsive. Similarly, about 4 per group of 9 individual females injected with pregnant mare serum gonadotropin had increased ovarian bioluminescence after 24 h. There was a statistically significant correlation between ovarian bioluminescence and plasma estradiol concentrations ($n=14$; $p=0.022$). Males exposed to a single dose of 100 mg/kg or males and females exposed to 5 daily injections of 30 mg/kg atrazine showed no change in gonadal bioluminescence over a 7 day period, but a significant interaction was found between atrazine (100 mg/kg) and time in female mice ($p<0.05$; two-way ANOVA). *Ex vivo* luciferase activity in dissected organs was increased by forskolin in testis, epididymis and ovaries. Atrazine (30 mg/kg/day) increased (30%) luciferase activity significantly in epididymis only. In conclusion, certain individual Cyp19-luc mice are highly responsive to aromatase inducers, suggesting this model, with further optimization, may have potential as an *in vivo* screening tool for environmental contaminants.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Bioluminescence-based tools have become increasingly available to the scientific community in the form of bioluminescent transgenic mice and cell lines as well as affordable imaging equipment. Transgenic mice transfected genomically with a luciferase gene under the control of various promoters of toxicological interest may offer highly sensitive research tools for the *in vivo* study of effects of disease states and xenobiotics on important physiological processes. One potential target for environmentally and toxicologically relevant chemicals, such as endocrine disruptors, is the enzyme aromatase (cytochrome P450 19; CYP19), which catalyzes the conversion of androgens to estrogens. Over-expression of aromatase has been associated with diseases such as breast and uterine cancer, and

endometriosis, whereas reduced expression has been implicated in osteoporosis and disruption of estrus and sperm quality (Pasqualini et al., 1996; Bulun, 2000).

Current approaches to the screening of effects of chemicals on steroidogenesis use mostly *in vitro* models. Human placental microsomes and various human cell lines and cells in primary culture or co-culture have been used for the investigation of effects of xenobiotics on aromatase activity and/or gene expression, each with its advantages and disadvantages (reviewed in (Sanderson, 2006). Microsomal fractions are limited to the identification of inhibitors and do not account for cytotoxicity. Studies with cell lines have as advantage that they have the potential to identify inducers in addition to inhibitors, and further detailed studies of mechanisms of aromatase induction are possible. Primary cell cultures, although more relevant for mechanistic studies and environmental/species relevance than cancer cell lines, have as disadvantage that they are difficult to obtain, maintain and standardize, and loss of gene expression may occur over time. *In vitro* studies in human placental microsomes or cell lines have shown that aromatase may be inhibited or induced by various

* Corresponding author. INRS-Institut Armand-Frappier, Édifice 18-PRF-K110, 531 blv des Prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7. Fax: +1 514 686 5309.

E-mail addresses: patricia.rivest@iaf.inrs.ca (P. Rivest), patrick.devine@iaf.inrs.ca (P.J. Devine), thomas.sanderson@iaf.inrs.ca (J.T. Sanderson).

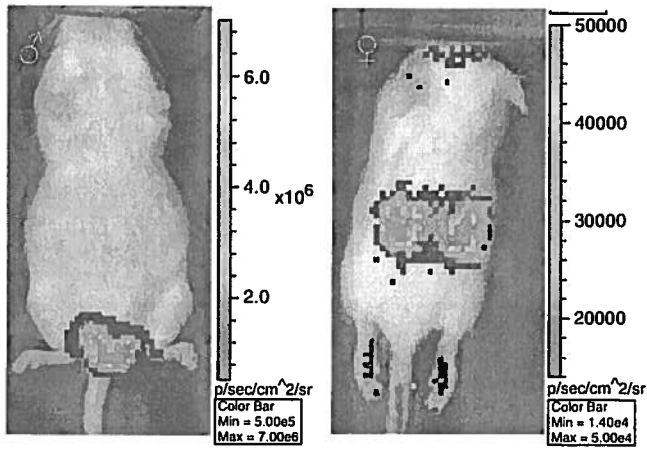


Fig. 1. Localized expression of aromatase gonadal pII promoter-mediated luciferase expression in 21-day old male (σ^7 , left) and female (ν , right) *Cyp19-luc* mice. Bioluminescence was monitored exactly 15 min after intraperitoneal injection with 150 mg/kg D-luciferin. Basal *in vivo* luminescence from the gonads was about 50-fold greater in males than females.

environmental chemicals, medications or naturally occurring dietary compounds (Mason et al., 1987; Ibrahim and Abul-Hajj, 1990; Campbell and Kurzer, 1993; Yue and Brodie, 1997; Drenth et al., 1998; Le Bail et al., 1998; Vinggaard et al., 2000; Saarinen et al., 2001; Andersen et al., 2002; Sanderson et al., 2002, 2004; Fernandez-Canton et al., 2003; Ohno et al., 2004; Heneweer et al., 2005; Letcher et al., 2005; Sanderson, 2006; He et al., 2008). For example, various dietary (iso)flavonoids induce (genistein, quercetin) or inhibit (chrysin, apigenin) human aromatase activity (Sanderson et al., 2004) and anti-breast cancer medications, such as fadrozole, letrozole and anastrozole (Miller and Dixon, 2000), as well as various pesticides (Vinggaard et al., 2000; Sanderson et al., 2002), are highly potent inhibitors of its catalytic activity. The pesticide atrazine has been shown to induce the catalytic activity of aromatase and pII promoter-mediated *CYP19* gene expression in H295R human adrenocortical cells (Sanderson et al., 2000, 2001, 2002). Atrazine also induced aromatase activity in JEG-3 human placental choriocarcinoma and luteinized ovarian granulosa cells (Sanderson et al., 2001; Holloway et al., 2008). Atrazine has further been associated with disturbances in the balance between androgens and estrogens in environmentally exposed wildlife (Guillette et al., 1994; Crain et al., 1997; Crain et al., 1999; Guillette and Gunderson, 2001); Similarly, an increased estrogen-to-androgen ratio was observed *in vivo* with rats (Babic-Gojmerac et al., 1989; Laws et al., 2000; Stoker et al., 2000, 2002) and African clawed (*Xenopus laevis*) frogs (Coady et al., 2005; Hecker et al., 2005),

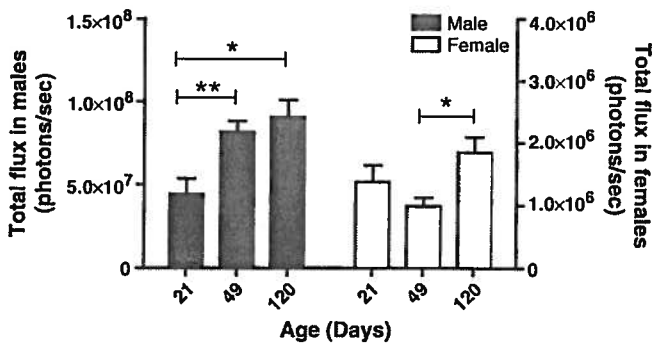


Fig. 2. Age-dependent bioluminescence (mean \pm SD) in untreated male (solid bars) and female (open bars) *Cyp19-luc* mice ($n=20$ per group). * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$); statistically significant difference between indicated age-groups (one-way ANOVA; Tukey *posteriori* test).

although in *X. laevis* no association with altered aromatase activity could be made.

The commercially available bioluminescent mouse model LPTA@CD-1-Tg(*Cyp19-luc*)-Xen (line 125) contains in its genome a modified firefly luciferase gene (Promega pGL-3) under control of the murine gonad-specific aromatase pII-promoter region. This 400 bp promoter region contains all the regulatory elements required for aromatase expression. We characterized this transgenic mouse model to evaluate its potential as an *in vivo* screening tool for chemicals that may alter *CYP19* gene expression.

Materials and methods

Transgenic mice, treatments and imaging. Two breeding pairs of LPTA@CD-1-Tg(*Cyp19-luc*)-Xen mice (founder line 125; transgenic males; CD-1 wild-type females) were a kind gift from Caliper-LifeSciences, Cranbury, NJ. A colony was maintained by crossing transgenic males with wild-type CD-1 females to produce 8 generations of experimental animals over a two-year period (2008–2009). Mice were housed in a 12-h light/dark cycle at 21 °C and treated according to the rules of our animal care facility and the requirements of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). At 21-days of age animals were separated by sex, weighed and held 5 mice per cage. Presence of the transgene in the offspring was verified by injecting the mice intraperitoneally (i.p.) with 150 mg/kg D-luciferin (optimized for *in vivo* imaging, Caliper-LifeSciences) dissolved in 0.9% saline solution, followed 15 min later by scanning for 60 s under isoflurane anesthesia in an IVIS 100 Imager (Caliper LifeSciences). Males were scanned ventrally (on their backs with belly up) and females dorsally for an optimal view of gonadal bioluminescence. Groups of 5 mice per sex and per treatment were then injected i.p. with either forskolin (10 mg/kg; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), atrazine (100 mg/kg; Sigma-Aldrich) or with saline solution containing 5% DMSO (Sigma-Aldrich) as vehicle control and assigned to treatment day 1. A repeated-dose experiment was also performed with atrazine by injecting mice with 30 mg/kg atrazine for 5 days. All animals were scanned daily for assessment of gonadal bioluminescence intensity until day 5 (forskolin) or day 7 (atrazine) after initial treatment. A hormonal stimulation (super-ovulation) experiment (three independent times) was carried out in both sexes by injecting 5 mice per experiment with 5 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) or vehicle control ($n=2$) on day 1 and hCG (human choriongonadotropin) on day 3; these animals were scanned daily until day 5. A further experiment was carried out by injecting mice ($n=9$) with PMSG, or vehicle control ($n=9$) and monitoring them for 2 days. In these mice plasma estradiol levels were determined by radioimmunoassay (DSL4800, Diagnostics Systems Laboratories, Webster, TX). Gonadal bioluminescence intensities were quantified using Living Image software version 3.0.4 (Caliper-LifeSciences). To ensure consistency and objectivity in quantifying gonadal bioluminescent intensities, a fixed integration area (determined by the mouse with the greatest response) was used to quantify bioluminescence in all mice per experiment. This same integration area was also applied to an area of each mouse where there was no bioluminescence (background). This background was subtracted from the bioluminescence values for each mouse to reduce potential overestimation of gonadal bioluminescence in mice where the integration area was larger than the response. This approach resulted in highly reproducible bioluminescence values.

Luciferase expression *ex vivo*. Testes, epididymides and liver (negative control) of the males, and ovaries, salivary gland, brain and liver of the females were isolated on day 5 of treatment. Tissues were homogenized and assayed for luciferase activity using the Luciferase Assay System (#E1500; Promega, Madison, WI) in the

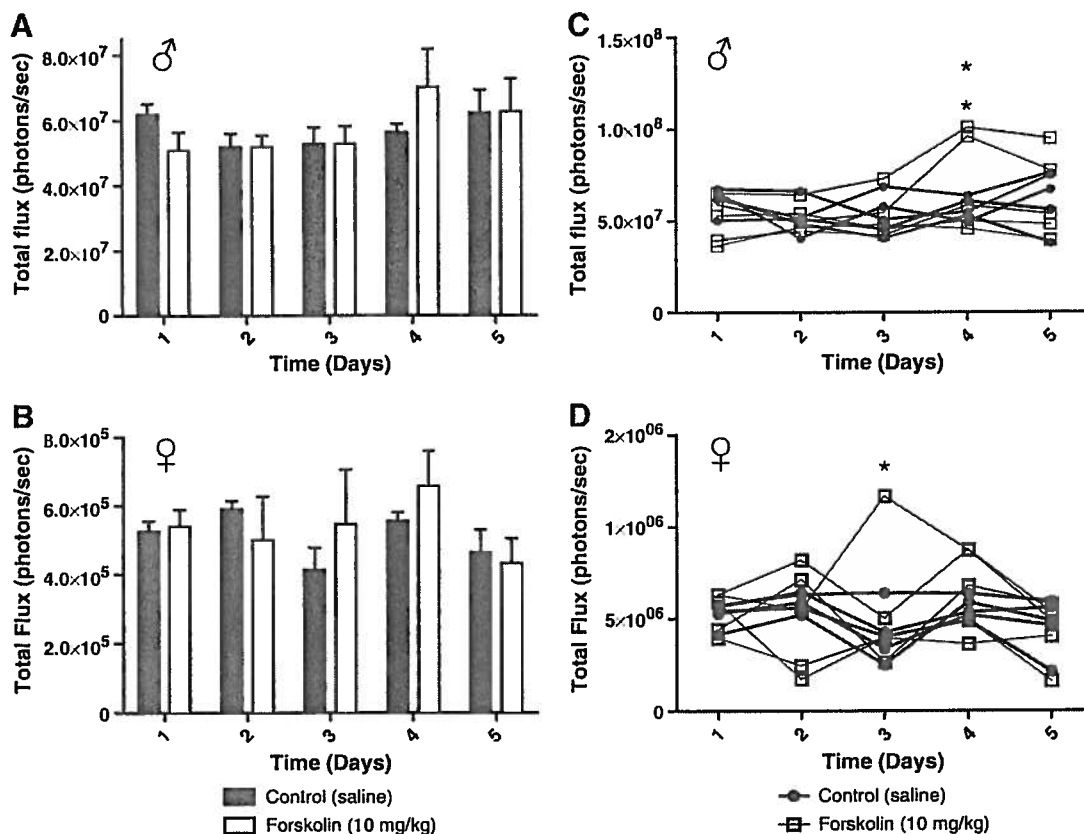


Fig. 3. Gonadal bioluminescence (mean \pm SD) in *Cyp19-luc* mice treated with a single dose of forskolin (10 mg/kg on day 1). (A) Average male and (B) female response, (C) individual male and (D) female responses ($n = 5$ per dose group). One of three experiments is shown. * Significantly different from other values on the same day (z -test for outliers; $p < 0.05$).

presence of a protease inhibitor. After 10 min of incubation on ice, the homogenates were vortexed for 30 s and underwent centrifugation for 5 min at 6000 rpm. Supernatants were kept at -80°C until analysis. Protein concentrations of the supernatants were determined by a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, IL, USA, kit #23225) and equal amounts of protein were added to 96-well opaque white plates, together with 50 μL of luciferin reagent for determination of bioluminescence using a SpectraMax M5 multifunctional plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Luminescence was monitored using an integration time of 1250 ms.

Statistical analyses. Means were presented with standard deviations (SD). Statistically significant ($p < 0.05$) differences from control were determined by Student t -test or one-way ANOVA with Tukey *posteriori* test (GraphPad Prism, GraphPad Software v5.03, San Diego CA). Statistically significant effects of treatment compared to control over time were determined by two-way ANOVA with Bonferroni *posteriori* test (GraphPad Prism). Statistically significant deviations of individual responses from the mean response of the experimental sample population were determined using a z -test for outliers (Zar, 1999).

Results

Localization and age-dependency of luciferase expression in vivo

Cyp19-luc mice had identical weight gain over time to wild-type CD-1 mice (not shown). Aromatase pII-promoter-mediated luciferase expression, as measured by bioluminescence, was restricted to the testes and epididymis in males (Fig. 1) and to the ovaries, brain and salivary glands (Fig. 1) in females. This was

confirmed by injecting a small number of male and female mice with D-luciferin followed 15 min later by euthanasia, rapid dissection and scanning of bioluminescence (not shown). Bioluminescence almost doubled between 21 and 49 days and stabilized between 49 and 120 days of age in the gonads of males (Fig. 2). In the ovaries of females there was a statistically significant increase (40%) in bioluminescence between 49 and 120 days of age, although not between these time points and 21-day old mice (Fig. 2). Basal *in vivo* luminescence from the gonads was about 50-fold greater in males than females.

Effects of pharmacological aromatase inducers and atrazine on luciferase expression in vivo

Forskolin, a stimulant of adenylate cyclase, given once at 10 mg/kg, did not increase average gonadal luciferase activity in 21-day old male ($n = 5$) or female ($n = 5$) *Cyp19-luc* mice (Figs. 3A and B) compared to control ($n = 5$ per sex) (saline with 5% DMSO), although when individually analyzed several mice appeared to respond with about a two-fold induction (Figs. 3C and D). Out of three experiments, 6/15 male and 5/15 female mice responded to forskolin with a statistically significant increase above controls ($p < 0.05$). *Cyp19-luc* mice of either sex treated with forskolin at a more mature age (49 and 60 days) did not differ in individual responsiveness from 21-d old mice (not shown). Several, but not all (9/20 over 4 experiments), 21-d old female mice that underwent a treatment protocol to induce super-ovulation responded to PMSG (an FSH substitute) with a statistically significant increase in ovarian bioluminescence after 24 h. This response returned to basal levels 24 h later, once the mice were injected with hCG (Fig. 4A). In males that underwent the same treatment no statistically significant changes in gonadal bioluminescence were observed compared to control at any time point (Fig. 4B).

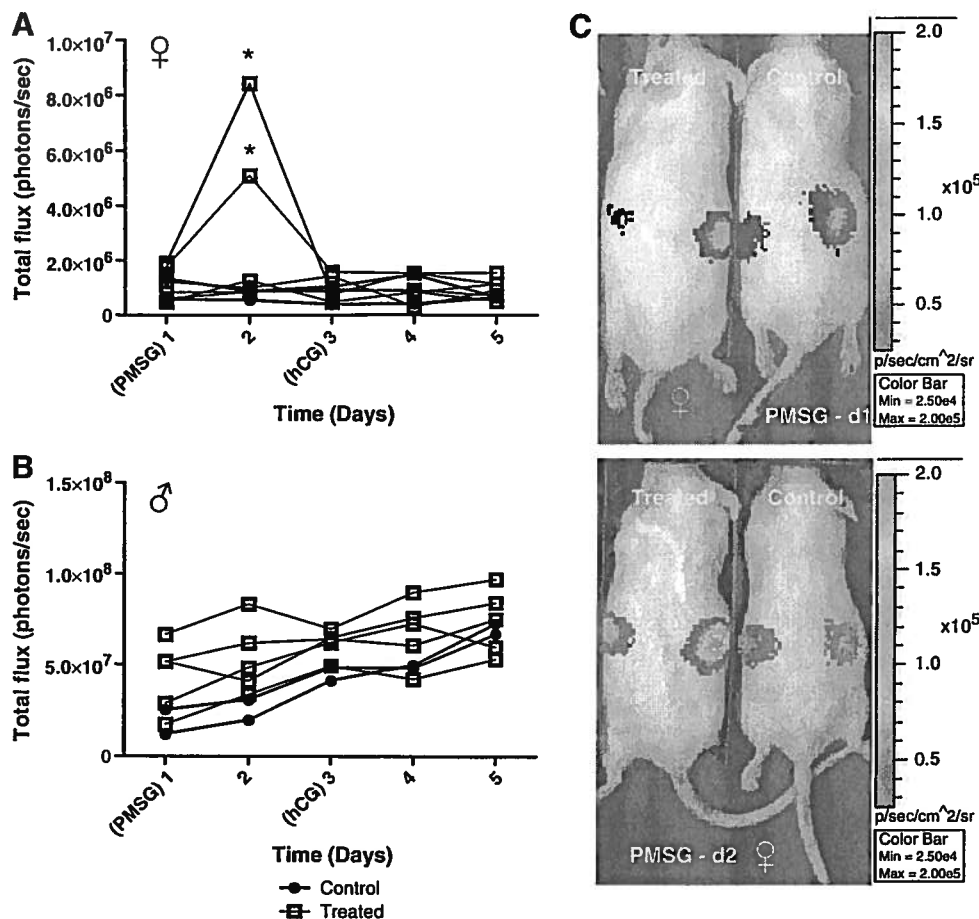


Fig. 4. Gonadal bioluminescence in individual male (A, ♂) and female (B, ♀) *Cyp19-luc* mice treated with pregnant mare serum gonadotropin on day 1 and hCG on day 3. Treatment ($n = 5$) and control ($n = 2$). One of 2 typical experiments is shown for the males and one of 4 experiments for the females. * Significant difference from control (z-test; $p < 0.05$). A scan of a female PMSG-treated (left) and control (right) *Cyp19-luc* mouse on day 1 (d1 or just before PMSG injection) and day 2 (d2 or 24 h after PMSG injection) (C).

To examine the response to PMSG alone, female *Cyp19-luc* mice were scanned before being exposed on day 0, and then scanned again 24 and 48 h later. PMSG caused a statistically significant increase (two-way ANOVA, $p < 0.01$) in mean ovarian bioluminescence in the treated animals compared to controls on day 1 and 2 (only the individual responses are shown in Fig. 5). Control bioluminescence values (mean \pm SD) on day 0 ($n = 9$), 1 ($n = 9$) and 2 ($n = 7$) were $8.6 \pm 0.52 \times 10^5$, $9.5 \pm 1.1 \times 10^5$ and $6.2 \pm 0.71 \times 10^5$ photons/s, respectively; bioluminescence values of PMSG-treated mice were $10.1 \pm 0.61 \times 10^5$, $22.7 \pm 4.35 \times 10^5$ and $21.0 \pm 4.58 \times 10^5$, respectively. Graphical presentation of the ovarian bioluminescent response of individual animals clearly demonstrated that of the females treated with PMSG, 4 out of 9 mice on days 1 and 5 out of 7 on day 2 had a response that was between 2 and 5 times greater than the average control response (Fig. 5A). Mice were sacrificed on the final day and plasma estradiol levels were determined. There was a statistically significant correlation between ovarian bioluminescence and estradiol levels ($p = 0.022$) (Fig. 5B).

Male and female mice exposed to a single dose of 100 mg/kg or 5 daily doses of 30 mg/kg atrazine did not demonstrate any differences in mean gonadal bioluminescence compared to control (5% DMSO in saline) over a 7-day period (Fig. 6). However, in females exposed to 100 mg/kg atrazine, two-way ANOVA revealed a statistically significant time-dependent increase in bioluminescence of treated, but not control mice ($p < 0.05$), but not quite a significant difference between atrazine-treated and control mice at any given time-point ($p = 0.071$). Dexamethasone had no effect on pII-promoter-mediated bioluminescence in mice of either sex (not shown).

Ex vivo analysis of luciferase expression after in vivo exposure to pharmacological aromatase inducers and atrazine

Bioluminescence was measured in tissues from *Cyp19-luc* mice 5 days after start of the treatments described above. Forskolin (10 mg/kg) caused a statistically significant increase in pII promoter-mediated luciferase activity in testis and epididymis in males, and ovary, but not brain or salivary gland, in females (Fig. 7). Atrazine (30 mg/kg/d for 5 days) caused a statistically significant induction of luciferase activity in epididymis (the main site of luciferase expression in male *Cyp19-luc* mice), but no effect in any other tissues in either sex (Fig. 8).

Discussion

Patho-toxicological relevance of pII promoter-mediated aromatase expression

Aromatase is regulated in a highly tissue-specific way in humans (Mahendroo et al., 1993; Agarwal et al., 1996; Zhao et al., 1997; Kamat et al., 2002; Bulun et al., 2003). In ovaries and testes the *CYP19* aromatase gene is mainly under the control of the gonadal proximal pII promoter, which is cAMP-responsive via activation of the protein kinase A pathway. This pathway is activated by gonadotropins such as FSH and LH via their respective G_s -protein-coupled receptors (Simpson, 2003). In other aromatase-expressing tissues, such as breast adipose, skin fibroblast, brain, and placenta, the pII promoter is normally silent, and other promoters in the intron 1 regulatory region

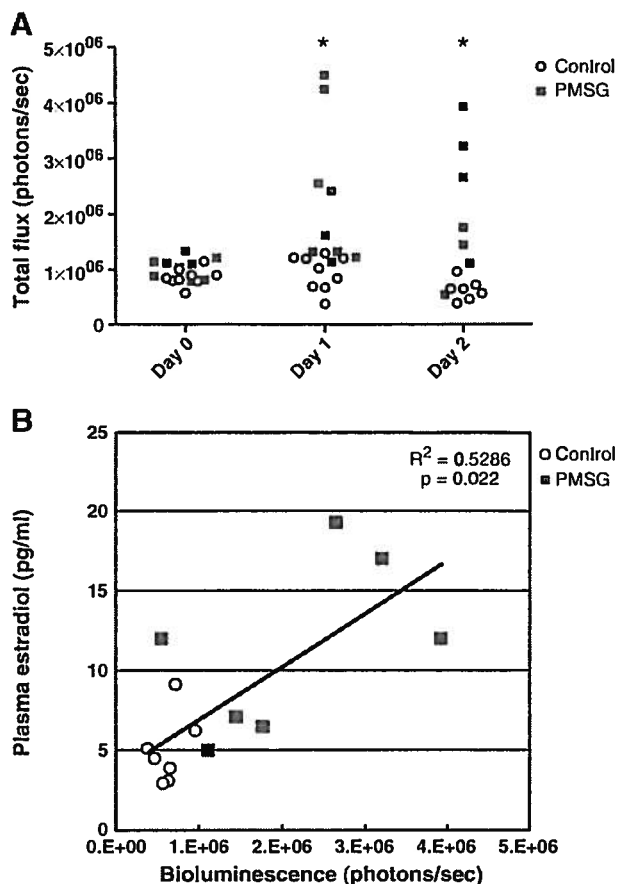


Fig. 5. (A) Ovarian bioluminescence over a 48 h period in individual female *Cyp19*-luc mice treated with saline (control) or 5 IU PMSG on day 0. * Significantly different mean response from the experimental control population (two-way ANOVA: Bonferroni *posteriori* test; $p < 0.01$). (B) Correlation between estradiol levels and ovarian bioluminescence in mice exposed to PMSG after 48 h ($p = 0.022$).

control its expression. In breast adipose tissue, for example, aromatase is regulated by the relatively weak glucocorticoid-responsive 1.4 promoter (Bulun et al., 2005), with minimal contribution from the pII promoter (Mahendroo et al., 1993). However, in certain disease states such as breast cancer and endometriosis, a “promoter switch” occurs and the tissues become responsive to hormones and other signaling factors that stimulate aromatase expression via multiple promoters, most notably the highly efficient proximal pII promoter (Harada et al., 1993; Agarwal et al., 1996; Zhou et al., 2001). The sudden contribution of multiple promoters to aromatase expression results in local over-expression of the enzyme and increased *in situ* synthesis of estrogens, which stimulate hormone-dependent growth of proximal tumor cells and contribute to tumor progression. Certain chemicals have been shown to induce aromatase in human cancer cells *in vitro* (Sanderson et al., 2000, 2001, 2002, 2004; Heneweer et al., 2004; Morinaga et al., 2004; Canton et al., 2005) and in several studies this has been shown to occur via activation of pII promoter-mediated *CYP19* gene expression (Heneweer et al., 2004; Sanderson et al., 2004; Fan et al., 2007a,b). Thus, the inappropriate activation of the aromatase pII promoter is of pathophysiological and toxicological importance; however, the relevance and/or significance of the reported *in vitro* effects for the *in vivo* situation are poorly, if at all, understood.

In vivo responsiveness of *Cyp19*-luc transgenic mice to pharmacological inducers and atrazine

The present study has aimed to evaluate an *in vivo* bioluminescent transgenic mouse model for its ability to identify compounds that may

induce pII-promoter-mediated expression of *Cyp19* gene expression. The (LP7A®)CD-1-Tg(*Cyp19*-luc)-Xen bioluminescent mouse model demonstrated physiologically relevant localized *Cyp19* pII-promoter regulated luciferase expression in male and female gonadal tissues (Fig. 1). Forskolin, an established potent inducer of pII promoter-mediated aromatase gene expression *in vitro* by stimulating cAMP generation (Agarwal et al., 1995; Sanderson et al., 2004; Watanabe and Nakajin, 2004), caused only a modest increase of *in vivo* pII-mediated bioluminescence (Fig. 3) and *ex vivo* luciferase activity (Fig. 7) in *Cyp19*-luc mice. We noted in our experiments that out of every 10 mice exposed to forskolin only about 2–4 mice would respond with increased bioluminescence, whereas most mice appeared non-responsive; the mice that did respond, responded well with a statistically significant 2- to 3-fold increase in bioluminescence. A similar phenomenon was observed when female mice underwent a super-ovulation protocol; in each experiment, approximately 2 out of every 5 mice treated would respond with a marked (>2-fold) increase in bioluminescence 24 h after PMSG injection (Fig. 4). When female mice were injected with PMSG alone (avoiding the influence of hCG, which abolishes increased aromatase expression by inducing ovulation and loss of aromatase expressing granulosa cells) and were monitored for 2 days does clearly indicate that there is a subpopulation of female *Cyp19*-luc mice that is highly responsive (up to 5 fold increased bioluminescence above control) (Fig. 5). Given the fact that atrazine has been shown to be a weaker inducer of aromatase *in vitro* than forskolin, FSH analogs and/or analogs of their downstream effector cAMP (Sanderson et al., 2000, 2001, 2002), it is not surprising that atrazine exposures in our study showed weaker responses and fewer statistically significant increases in bioluminescence *in vivo* (Fig. 6) or *ex vivo* (Fig. 8) compared to controls in this transgenic mouse model. We decisively used doses of atrazine that were toxicologically relevant, although at the higher end of the spectrum of environmental exposures. The lack of response to dexamethasone which stimulates adipose aromatase 1.4 promoter activity (Mahendroo et al., 1993; Zhao et al., 1995; Agarwal et al., 1996) is consistent with the lack of this promoter activity in gonadal tissues (Bulun et al., 2003).

Limitations of the *in vivo* *Cyp*-luc bioluminescent mouse model

There are several variables to consider that may affect bioluminescent signal when working with bioluminescent mammals, most notably physical factors such as fat content, fur thickness and position of the animal when scanning, which probably contribute to some of the variability we observed. However, the sporadic (individual-dependent) response to the prototype aromatase inducer forskolin observed with our transgenic mice requires a different explanation. One possibility is that the mice differ in responsiveness because they are in different phases of their estrus cycle. However, when the mice underwent a super-ovulation protocol, which synchronizes estrus cycle, a similar frequency of non-responsiveness was observed to treatment with forskolin.

Founder line 125 was created by introducing the transgene construct to CD-1 donor embryos by a microinjection technique (personal communication Caliper-LifeSciences). The genomic environment of the transgene construct will likely be different from the actual aromatase gene and its upstream pII-promoter region. This may have an influence on the effectiveness of various transcription factors that are required for successful usage of the gonadal *Cyp19*-pII promoter, such as SF-1/NR5A1 (steroidogenic factor 1/nuclear receptor 5A1) and LRH-1/NR5A2 (liver receptor homologue-1) (Sirianni et al., 2002; Pezzi et al., 2004). Another aspect of the influence of location on the pII-promoter activity is the potential for alterations in methylation state of the newly introduced DNA construct, which can be individual dependent (Demura and Bulun, 2008). The pII promoter region contains two cAMP-responsive

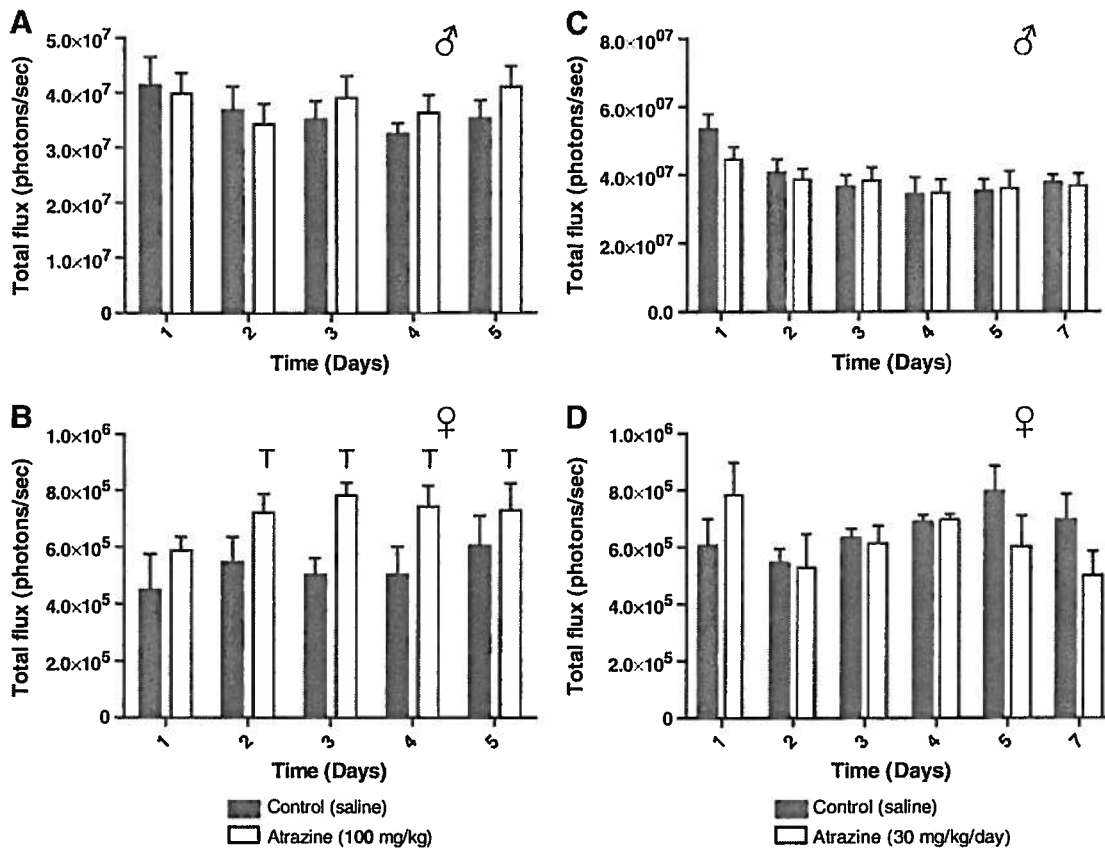


Fig. 6. Gonadal bioluminescence (mean \pm SD) monitored over 5 days in (A) male or (B) female *Cyp19-luc* mice treated with a single dose of atrazine (100 mg/kg on day 1), and bioluminescence monitored over 7 days in (C) male and (D) female *Cyp19-luc* mice treated with atrazine (30 mg/kg/day for 5 days). One of three typical experiments is shown for each treatment regime ($n=5$ per dose group). † Two-way ANOVA detected a significant positive (increased bioluminescence) interaction (or trend) between treatment and time in female mice exposed to 100 mg/kg atrazine ($p<0.05$).

elements (CREs) that are important for promoter activation (Demura and Bulun, 2008). These CREs contain CpG dinucleotides which are targets for DNA methylation, with methylated sites reducing CREB binding and inhibiting pII-promoter activity, an important epigenetic mechanism used to silence promoter activity of unnecessary or unwanted genes in tissues (Siegfried and Cedar, 1997). Differential responsiveness to cAMP-stimulated aromatase induction has been observed in skin fibroblasts from individual human volunteers (Demura and Bulun, 2008). In the individuals whose fibroblasts were responsive to cAMP stimulation of pII-promoter-derived CYP19 transcripts, four out of six CpG sites were unmethylated, whereas in non-responsive fibroblasts all six positions were methylated. These observed differences in individual degree of hypermethylation may play a role in the selective responsiveness of individual *Cyp19-luc* mice to forskolin and other inducers of *Cyp19* pII-promoter-mediated luciferase expression.

Conclusions and perspectives

We evaluated the (LPTA®)CD-1-Tg(*Cyp19-luc*)-Xen) bioluminescent mouse model as an *in vivo* screening tool for the identification of endocrine disrupting chemicals that may alter pII-promoter-mediated *Cyp19* expression. Within the population, certain individuals responded well to known pharmacological inducers of aromatase activity, but about half the mice appeared poorly or non-responsive. The herbicide atrazine, which has been shown to induce pII promoter-mediated aromatase activity *in vitro* (Heneweer et al., 2004), had a weak, but statistically significant effect on pII promoter-mediated bioluminescence *in vivo* (females at 100 mg/kg) and increased bioluminescence *ex vivo* with statistical significance only in the

male epididymis. The *Cyp19-luc* mouse model may, in the future, be optimized for our intended purpose by breeding highly-responsive individuals to obtain a sub-population that responds well to aromatase-inducing chemicals. Overall, we conclude this mouse model has potential, but that in its current form it is of limited use for our intended purpose. Nevertheless, this model may be useful for other types of reproductive studies involving aromatase expression.

Conflict of interest statement

Funding for this research was from NSERC grants to Patrick Devine and Thomas Sanderson, and Caliper-LifeSciences. The financial contribution from Caliper-LifeSciences was entirely without restrictions or requirements that would influence experimental design, interpretation of results or any other impairment to freely publishing this study regardless of outcome. There were no competing financial interests for any of the authors.

Acknowledgments

This work was supported financially by Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada grants to Thomas Sanderson (313313-2005) and Patrick Devine (288304-2009), a financial contribution from Caliper-LifeSciences, and a Fondation Armand-Frappier graduate student bursary to Patricia Rivest. We thank Stephanie Petrillo and To-Quyen Truong for their technical assistance. Patrick Devine currently works at Novartis, Cambridge, MA (patrick.devine@novartis.com).

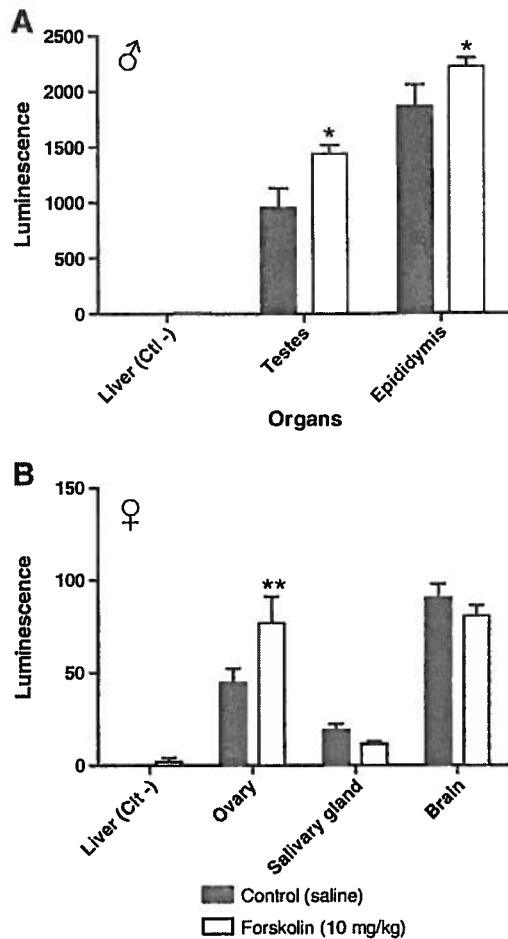


Fig. 7. *Ex vivo* luminescence (mean \pm SD) on day 5 in luciferase-expressing tissues dissected from male (A) and female (B) *Cyp19-luc* mice after *in vivo* treatment with 10 mg/kg forskolin ($n = 15$ per tissue). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$); statistically significant difference from control (Student *t*-test).

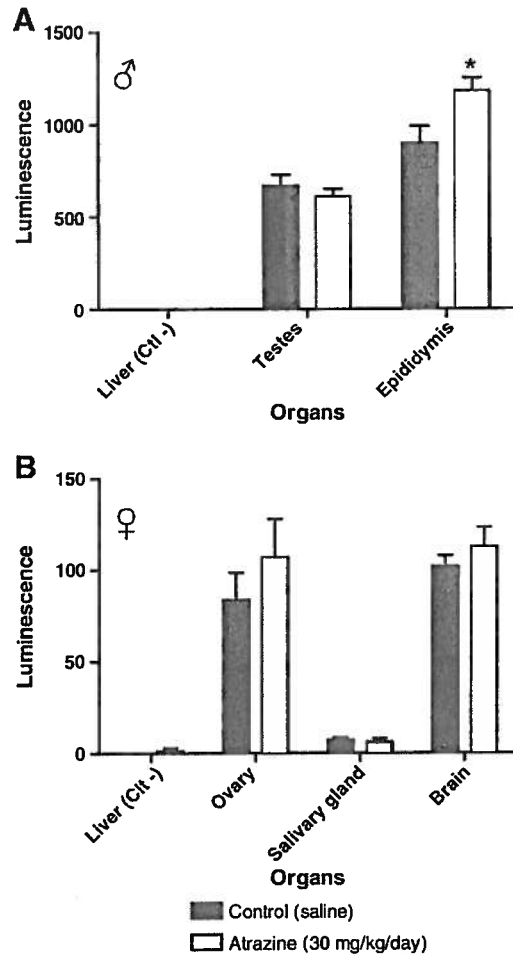


Fig. 8. *Ex vivo* luminescence (mean \pm SD) on day 5 in luciferase-expressing tissues of male (A) and female (B) *Cyp19-luc* mice after *in vivo* treatment with 30 mg/kg/day atrazine ($n = 15$ per tissue). * Statistically significant difference from control (Student *t*-test; $p < 0.05$).

References

- Agarwal, V.R., Bulun, S.E., Simpson, E.R., 1995. Quantitative detection of alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in aromatase-expressing human cells by competitive RT-PCR. *Mol. Cell. Probes* 9, 453–464.
- Agarwal, V.R., Bulun, S.E., Leitch, M., Rohrich, R., Simpson, E.R., 1996. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3843–3849.
- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonfeld-Jorgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1–12.
- Babic-Gojmerac, T., Kniewald, Z., Kniewald, J., 1989. Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. *J. Steroid Biochem.* 33, 141–146.
- Bulun, S.E., 2000. Aromatase deficiency and estrogen resistance: from molecular genetics to clinic. *Semin. Reprod. Med.* 18, 31–39.
- Bulun, S.E., Sebastian, S., Takayama, K., Suzuki, T., Sasano, H., Shozu, M., 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 219–224.
- Bulun, S.E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B., Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Gurates, B., Tamura, M., Langoi, D., Deb, S., 2005. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol. Rev.* 57, 359–383.
- Campbell, D.R., Kurzer, M.S., 1993. Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 381–388.
- Canton, R.F., Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Bergman, A., van den Berg, M., 2005. Inhibition and induction of aromatase (CYP19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 88, 447–455.
- Coady, K.K., Murphy, M.B., Villeneuve, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Solomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy, J.P., 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 160–173.

- Crain, D.A., Guillette Jr., L.J., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect.* 105, 528–533.
- Crain, D.A., Spiteri, I.D., Guillette Jr., L.J., 1999. The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed in ovo to atrazine, 2, 4-D, or estradiol. *Toxicol. Ind. Health* 15, 180–185.
- Demura, M., Bulun, S.E., 2008. CpG dinucleotide methylation of the CYP19 1.3/II promoter modulates cAMP-stimulated aromatase activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 283, 127–132.
- Drenth, H.-J., Bouwman, C.A., Seinen, W., Van den Berg, M., 1998. Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148, 50–55.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H., 2007a. Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 1012–1018.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H., 2007b. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ. Health Perspect.* 115, 720–727.
- Fernandez-Canton, R., Letcher, R.J., Sanderson, J.T., Bergman, A., van den Berg, M., 2003. Effects of brominated flame retardants on activity of the steroidogenic enzyme aromatase (CYP19) in H295R human adrenocortical carcinoma cells in culture. *Organohalogen Compd.* 61, 104–107.
- Guillette Jr., L.J., Gunderson, M.P., 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* 122, 857–864.
- Guillette Jr., L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102, 680–688.

- Harada, N., Utsumi, T., Takagi, Y., 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11312–11316.
- He, Y., Murphy, M.B., Yu, R.M., Lam, M.H., Hecker, M., Giesy, J.P., Wu, R.S., Lam, P.K., 2008. Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. *Toxicol. Lett.* 176, 230–238.
- Hecker, M., Park, J.W., Murphy, M.B., Jones, P.D., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G., Carr, J.A., Smith, E.E., du Preez, L., Kendall, R.J., Giesy, J.P., 2005. Effects of atrazine on CYP19 gene expression and aromatase activity in testes and on plasma sex steroid concentrations of male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicol. Sci.* 86, 273–280.
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2004. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Lett.* 146, 183–194.
- Heneweer, M., van den Berg, M., de Geest, M.C., de Jong, P.C., Bergman, A., Sanderson, J.T., 2005. Inhibition of aromatase activity by methyl sulfonyl PCB metabolites in primary culture of human mammary fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 50–58.
- Holloway, A.C., Anger, D.A., Crankshaw, D.J., Wu, M., Foster, W.G., 2008. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. *J. Appl. Toxicol.* 28, 260–270.
- Ibrahim, A.R., Abul-Hajj, Y.J., 1990. Aromatase inhibition by flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 257–260.
- Kamat, A., Hinshelwood, M.M., Murry, J.A., Mendelson, C.R., 2002. Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 122–128.
- Laws, S.C., Ferrell, J.M., Stoker, T.E., Schmid, J., Cooper, R.L., 2000. The effects of atrazine on female wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicol. Sci.* 58, 366–376.
- Le Bail, J.C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., Habrioux, G., 1998. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Lett.* 133, 101–106.
- Letcher, R.J., Sanderson, J.T., Bokkers, A., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2005. Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 95–104.
- Mahendroo, M.S., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1993. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 268, 19463–19470.
- Mason, J.I., Carr, B.R., Murry, B.A., 1987. Imidazole antimycotics: selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids* 50, 179–189.
- Miller, W.R., Dixon, J.M., 2000. Antiaromatase agents: preclinical data and neoadjuvant therapy. *Clin. Breast Cancer* 1 (Suppl 1), S9–S14.
- 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, 1860–1869.
- Ohno, K., Araki, N., Yanase, T., Nawata, H., Iida, M., 2004. A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. *Toxicol. Sci.* 82, 443–450.
- Pasqualini, J.R., Chetrite, G., Blacker, C., Feinstein, M.C., Delalande, L., Talbi, M., Maloche, C., 1996. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1460–1464.
- Pezzi, V., Sirianni, R., Chimento, A., Maggiolini, M., Bourguiba, S., Delalande, C., Carreau, S., Ando, S., Simpson, E.R., Clyne, C.D., 2004. Differential expression of steroidogenic factor-1/adrenal 4 binding protein and liver receptor homolog-1 (LRH-1)/fetoprotein transcription factor in the rat testis: LRH-1 as a potential regulator of testicular aromatase expression. *Endocrinology* 145, 2186–2196.
- Saarinén, N., Joshi, S.C., Ahotupa, M., Li, X., Ammala, J., Makela, S., Santti, R., 2001. No evidence for the in vivo activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 231–239.
- Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.* 94, 3–21.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2000. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121–127.
- Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 109, 1027–1031.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W., van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44–54.
- Sanderson, J.T., Hordijk, J., Denison, M.S., Springsteel, M.F., Nantz, M.H., Van Den Berg, M., 2004. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 82, 70–79.
- Siegfried, Z., Cedar, H., 1997. DNA methylation: a molecular lock. *Curr. Biol.* 7, R305–R307.
- Simpson, E.R., 2003. Sources of estrogen and their importance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 225–230.
- Sirianni, R., Seely, J.B., Attia, G., Stocco, D.M., Carr, B.R., Pezzi, V., Rainey, W.E., 2002. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* 174, R13–R17.
- Stoker, T.E., Laws, S.C., Guidici, D.L., Cooper, R.L., 2000. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol. Sci.* 58, 50–59.
- Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L., 2002. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol. Sci.* 67, 198–206.
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. In Vitro* 14, 227–234.
- Watanabe, M., Nakajin, S., 2004. Forskolin up-regulates aromatase (CYP19) activity and gene transcripts in the human adrenocortical carcinoma cell line H295R. *J. Endocrinol.* 180, 125–133.
- Yue, W., Brodie, A.M., 1997. Mechanisms of the actions of aromatase inhibitors 4-hydroxyandrostenedione, fadrozole, and aminoglutethimide on aromatase in JEG-3 cell culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63, 317–328.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, N.J.
- Zhao, Y., Nichols, J.E., Bulun, S.E., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1995. Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 16449–16457.
- Zhao, Y., Agarwal, V.R., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1997. Transcriptional regulation of CYP19 gene (aromatase) expression in adipose stromal cells in primary culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 203–210.
- Zhou, J., Gurates, B., Yang, S., Sebastian, S., Bulun, S.E., 2001. Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: an epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta. *Cancer Res.* 61, 2328–2334.

Deuxième Partie

Effets antiandrogéniques des pesticides dans les cellules cancéreuses LNCaP hormono-dépendantes de la prostate

7.0 Résumé

Certains pesticides tels que l'atrazine, le vinclozoline et le bénomyl, connus comme étant responsables de la détérioration du système endocrinien, peuvent jouer un rôle important dans le développement de certaines pathologies dont le cancer de la prostate.

Au cours du développement de la maladie, les cellules cancéreuses peuvent se multiplier par l'entremise de deux voies de signalisation : la voie hormono-dépendante et celle non hormono-dépendante. Le récepteur aux androgènes étant considéré comme une des composantes cibles de la voie de signalisation hormono-dépendante, il peut intervenir dans le développement du cancer de la prostate. En effet, la liaison de la dihydrotestostérone (DHT) au récepteur aux androgènes permet, une fois à l'intérieur du noyau, la transcription de gènes inducteurs de la prolifération cellulaire (Bulter et *al*, 2008) de même que la sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). La présence de cet antigène à un taux élevé dans le sang indique une haute probabilité de la présence d'un cancer ou d'autres pathologies de la prostate.

Étant donné que l'humain est encore aujourd'hui exposé à plusieurs pesticides, tels que l'atrazine, le bénomyl, et le vinclozoline, nous avons donc mené des études plus approfondies au sujet de leur impact sur la santé humaine. L'ensemble des expérimentations a été fait sur les cellules de la prostate cancéreuses LNCaP dans le but de vérifier les effets potentiels de ces trois composés sur le développement d'un cancer au niveau de la prostate. Nous nous sommes concentrés sur la voie de signalisation dite androgène-dépendante, la prolifération cellulaire de même que sur le taux de sécrétion de PSA.

Les résultats de notre étude démontrent que l'atrazine, à des concentrations de 1 et 10 μM , n'affecte pas la translocation des récepteurs des androgènes vers le noyau, de même que le taux de sécrétion de PSA. Par contre, les analyses faites sur les cellules LNCaP

prouvent que leur taux de viabilité diminue après avoir été exposées au composé (1, 3, 10 et 30 μM). La translocation des récepteurs des androgènes vers le noyau est inhibée suite à une exposition au bénomyl (10 μM), tout comme le vinclozoline, à des concentrations de 1 et 10 μM . Il est également possible d'observer pour chacun de ces deux pesticides, une diminution significative de la viabilité des cellules cancéreuses de la prostate exposées à des concentrations spécifiques de 3, 10 et 30 μM . Finalement, le bénomyl et le vinclozoline, en présence de dihydrotestostérone (0,03 μM), ont des effets inhibiteurs sur le taux de sécrétion de PSA.

Il est donc possible de conclure que l'atrazine, le bénomyl et le vinclozoline peuvent, à certains niveaux, retarder le développement d'un cancer tel que le cancer de la prostate.

8.0 Introduction

Le fait que les produits chimiques soient encore largement utilisés dans plusieurs domaines tels que l'agriculture, est très préoccupant et suscite beaucoup de questionnement. En effet, certains pesticides sont connus comme étant responsables de la perturbation du système endocrinien chez l'humain. En plus de détériorer la faune, ils sont soupçonnés d'être à l'origine de l'augmentation de l'incidence de diverses maladies, dont la réduction de la fécondité, des troubles de développement chez le fœtus et durant l'enfance. Ces perturbateurs endocriniens peuvent également être impliqués dans le développement de divers cancers hormono-dépendants : du sein, de l'utérus, de l'endomètre, des testicules, de même que de la prostate.

Le développement de certains cancers peut aussi avoir lieu suite à une hausse/diminution de l'expression de la stéroïde 5 α -réductase. Cette dernière a pour fonction de transformer la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), une hormone d'une grande importance de la voie de signalisation hormono-dépendante que l'on trouve par exemple au niveau de la prostate. En effet, c'est la liaison de la DHT au récepteur aux androgènes (AR), qui une fois passé du cytoplasme vers le noyau, permet la transcription de plusieurs gènes. La présence accrue de 5 α -réductase entraînerait une augmentation de DHT et par le fait même, une induction de la prolifération cellulaire et de la sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). En plus d'interférer sur cette voie de signalisation, les perturbateurs endocriniens peuvent agir au niveau de plusieurs autres récepteurs stéroïdiens de même que sur la stéroïdogénèse.

9.0 Hypothèses et objectifs

En se basant sur le fait qu'un grand nombre de pesticides, après plusieurs analyses, se sont avérés néfastes pour la santé humaine, nous sommes en mesure de croire que le vinclozoline, l'atrazine et le bénomyl vont perturber la voie de signalisation des récepteurs des androgènes en augmentant ainsi les risques de formation de cancer, tel que le cancer de la prostate. Comme objectif, nous voulions évaluer les effets de ces trois perturbateurs endocriniens connus, sur des cellules cancéreuses de la prostate LNCaP. Nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur les impacts de ces pesticides au niveau de la liaison de la DHT aux récepteurs des androgènes, de la prolifération cellulaire et au niveau de la sécrétion de PSA.

10.0 Matériel et méthodes

10.1 Culture cellulaire

Les cellules de la prostate cancéreuses LNCaP proviennent de la compagnie ATCC. Elles sont mises en culture dans des flacons de 75 cm² contenant un milieu de culture RPMI 1640 pourvus d'un supplément de phénol rouge. Le milieu de culture comprend également 1% d'HEPES, de sodium pyruvate, de penicilline/streptomycine (100 µg/ml) et de L-glutamine. Les cellules sont incubées à une température de 37 °C et aux conditions atmosphériques correspondant à 5% CO₂ et 95 % d'air, afin d'obtenir une confluence de 80 %.

10.2 Immunobuvardage de type western

Avant de procéder aux traitements les cellules sont transférées dans un milieu de culture dépourvu de stéroïdes (RPMI 1640 sans phénol rouge, 10% FBS traité au dextran/charbon activé, Pen/Strept, HEPES, sodium pyruvate et L-glutamine pour des concentrations identiques à celles mentionnées précédemment). Les cellules, soit 2x10⁶ cellules/puits sont mises en culture dans des plaques de 6 puits, 24 heures avant d'être exposées aux différents composés. Suite à une exposition de 24 heures aux trois pesticides testés (atrazine, bénomyl et vinclozoline), ayant tous des concentrations finales de 1 et 10 µM et au contrôle positif (DHT 10 ηM), l'extraction, de même que le dosage des protéines sont faits.

L'immunobuvardage de type western a été fait de manière standard. Une quantité de 25 µg de protéines de cellules exposées aux différents composés, ont été chargées dans un gel de polyacrylamide 10%. La migration se fait à 140 volts pour une durée d'une heure et demie, tandis que le transfert est réalisé à 100 volts pendant 45 minutes. Le blocage (1 heure) ainsi que l'anticorps primaire (toute la nuit) ont été faits dans une solution de BSA 3 %, contrairement à l'anticorps secondaire (1 heure) qui a été mis en solution dans du lait 3%. Deux anticorps primaires ont été utilisés, soient un anti-récepteur aux androgènes et l'anti β-actine (SantaCruz). Les anticorps secondaires employés sont respectivement

des anti-lapins et anti-souris. L'ensemble des anticorps secondaires de même que la solution de révélation «Immobilon Western HRP Substrate» proviennent de la compagnie Millipore. La membrane de PVDF est révélée à l'aide de l'appareil Fluor Chem HD2 (Alpha Inotech) suite à des expositions variant entre 1 et 2 minutes selon la protéine recherchée. La densitométrie se fait à l'aide du logiciel AlphaEase FC et permet d'obtenir des valeurs IDV, qui représentent la somme de toutes les valeurs en pixel après la correction du bruit de fond.

10.3 Prolifération cellulaire

Le test de prolifération cellulaire s'échelonne sur une période de 7 jours. Lors de la première journée d'expérimentation, 100 µl de suspension cellulaire dans un milieu sans stéroïde sont mis en culture dans une plaque de 96 puits afin d'obtenir une concentration de 5×10^3 cellules/puit. Par la suite, les cellules sont exposées à deux reprises, soit dans un intervalle de 48 heures, aux différents composés (1, 3, 10 et 30 µM) en présence ou non de DHT (0,1, 0,3, 1 et 3 nM). 72 heures après la deuxième exposition faite sur les cellules, 10 µl de réactif WST-1 sont ajoutés à l'intérieur de chaque puits et incubés dans un environnement humide de 37° C et de 5 % CO₂ pendant 2 heures. La lecture de l'absorbance se fait à 440 nm à l'aide du SpectraMax M5 (Molecular devices/MDS Inc., ON, Canada).

10.4 Détermination du taux de sécrétion de PSA

Les cellules en confluence sont mises dans une plaque de 12 puits à raison de 300×10^3 cellules/puits. Elles sont ensuite exposées aux composés testés (vinclozoline, atrazine et bénomyl) pendant 24 heures. 500 µL du milieu des cellules exposées sont recueillis et centrifugés 3 minutes à 500 RPM. À partir du surnageant obtenu, des dilutions de 1:10 pour les cellules exposées aux composés uniquement et 1:20 pour les cellules exposées aux composés et à la DHT sont faites. La suite de l'expérience se fait selon le protocole fourni dans le kit de chez Anogen. Après avoir obtenu les valeurs de PSA sécrété, un dosage de protéines est requis dans le but d'obtenir la quantité de PSA sur une quantité de protéines spécifiques (PSA/100 ng de protéines).

10.5 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés selon le test one-way analysis of variance (ANOVA) du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, SanDiego, CA). La différence entre les valeurs contrôles et expérimentales est considérée comme étant significative selon l'échelle suivante : * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.005$).

11.0 Résultats

11.1 Localisation des récepteurs des androgènes

Les résultats obtenus par immunobuvardage de type Western démontrent que l'atrazine, à des concentrations de 1 et 10 μM , n'a aucun effet sur la translocation des AR en absence ou en présence de DHT 10 nM (figure 11). De même, le vinclozoline (figure 12) et le bénomyl (figure 13), n'ont pour leur part aucun effet sur la translocation des récepteurs des androgènes comparativement au DMSO. Par contre, le mélange pesticides/DHT inhibe la translocation des AR vers le noyau à des concentrations de 1 et 10 μM (figures 12 et 13).

11.2 Viabilité cellulaire

Suite au test de viabilité cellulaire fait sur les cellules LNCaP, il est possible d'observer que la DHT à des concentrations de 0.03, 0.1 et 0.3 μM , comparativement au DMSO, augmente de manière significative la viabilité cellulaire (figures 14, 15 et 16). L'atrazine, en présence des différentes concentrations de DHT, réduit de manière significative la viabilité des cellules cancéreuses de la prostate, et ce, pour chacune des concentrations testées (1, 3, 10, 30 μM) (figure 14). Cette réduction est également observée lorsque les cellules sont exposées à de fortes concentrations de vinclozoline (30 μM) (figure 15) et de bénomyl (30 μM) (figure 16) uniquement lorsqu'ils sont tous les deux mis en présence de DHT. À noter que pour la plus haute dose de DHT, toutes les concentrations de vinclozoline (1, 3, 10 et 30 μM) causent une diminution de la viabilité cellulaire (figure 15). Pour le bénomyl, cette diminution est observée à une concentration de 3 μM (figure 16).

11.3 Détermination du taux de sécrétion de PSA

Suite au test permettant de déterminer le taux de sécrétion de PSA, il est possible de constater que l'atrazine seule et en présence de DHT n'a aucun effet (figure 17). Par ailleurs, le taux de PSA n'augmente pas significativement suite à une exposition des cellules LNCaP au vinclozoline (figure 18) ainsi qu'au bénomyl (figure 19) seul. La DHT augmente le taux de PSA, tandis que le vinclozoline et le bénomyl, pour chacune des

concentrations testées, causent une baisse de l'antigène spécifique de la prostate en présence de dihydrotestostérone.

Figures

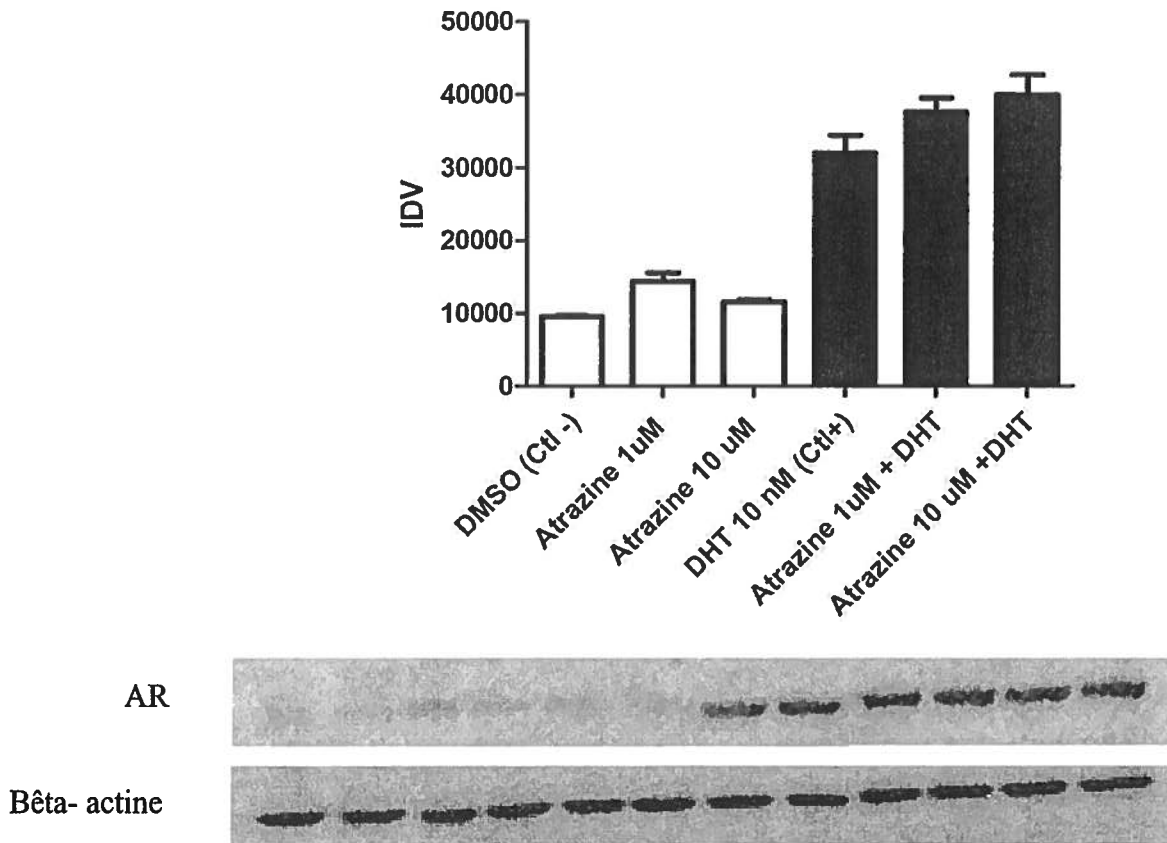


Figure 11 : Présence des récepteurs des androgènes (AR) à l'intérieur du noyau des cellules LNCaP après 24 heures d'exposition à l'atrazine (1 et 10 μ M) et à la DHT (10 nM). Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif (Ctl-) et la DHT en tant que contrôle positif (Ctl+). L'expression de β -actine a été utilisée comme contrôle de protéines chargées (n = 3).

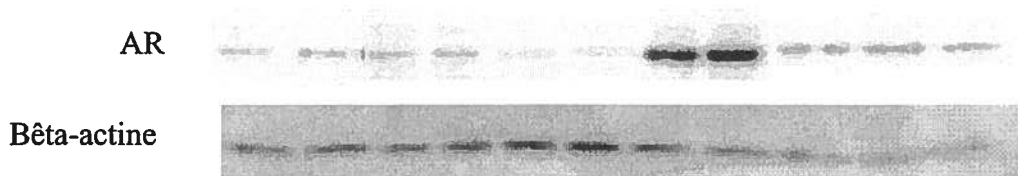
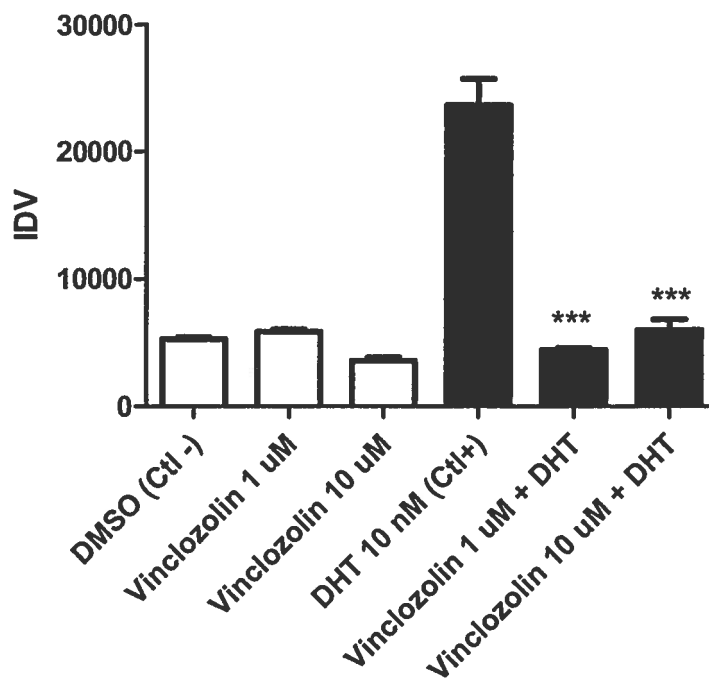


Figure 12 : Présence des récepteurs des androgènes (AR) à l'intérieur du noyau des cellules LNCaP après 24 heures d'exposition au vinclozoline (1 et 10 μ M) et à la DHT (10 nM). Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif (Ctl-) et la DHT en tant que contrôle positif (Ctl+). L'expression de β -actine a été utilisée comme contrôle de protéines chargées (n = 3). *** (p<0.005); différence significative avec le contrôle positif (ANOVA).

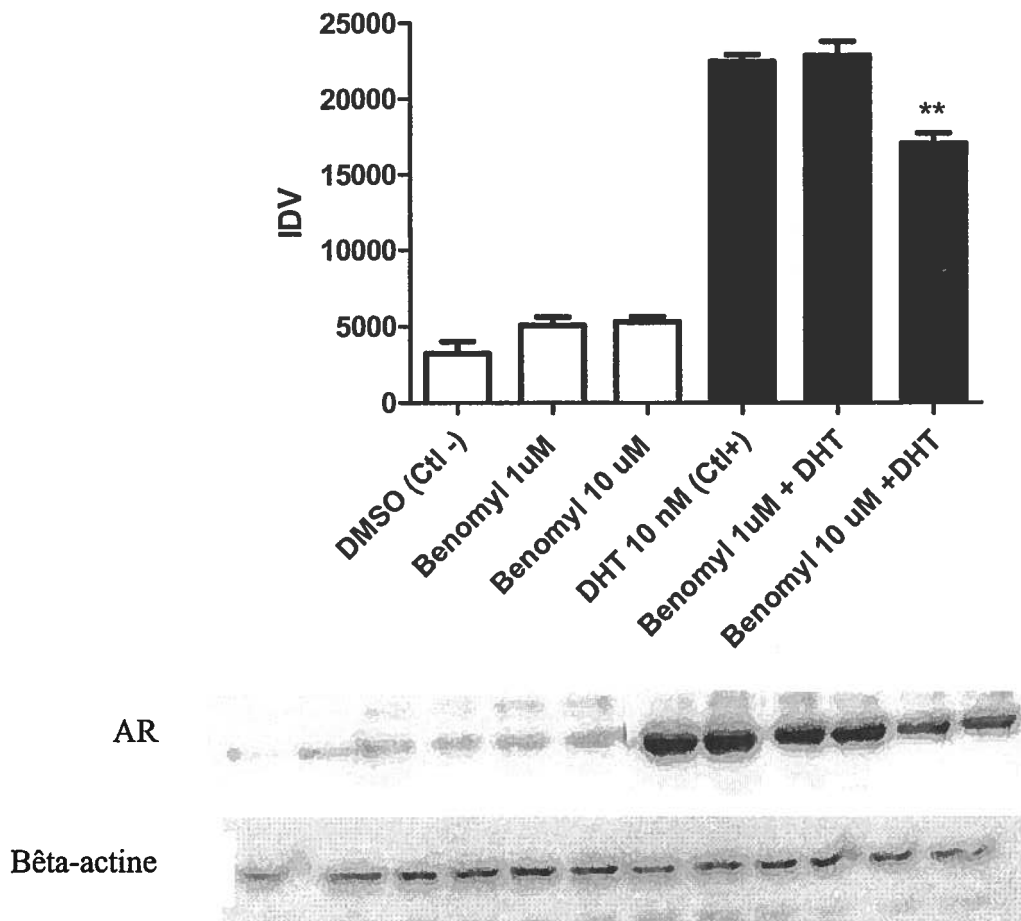


Figure 13 : Localisation des récepteurs des androgènes (AR) à l'intérieur du noyau des cellules LNCaP après 24 heures d'exposition au benomyl (1 et 10 μ M) et à la DHT (10 nM). Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif (Ctl-) et la DHT en tant que contrôle positif (Ctl+). L'expression de β -actine a été utilisée comme contrôle de protéines chargées (n = 3). ** (p<0.01); différence significative avec le contrôle positif (ANOVA).

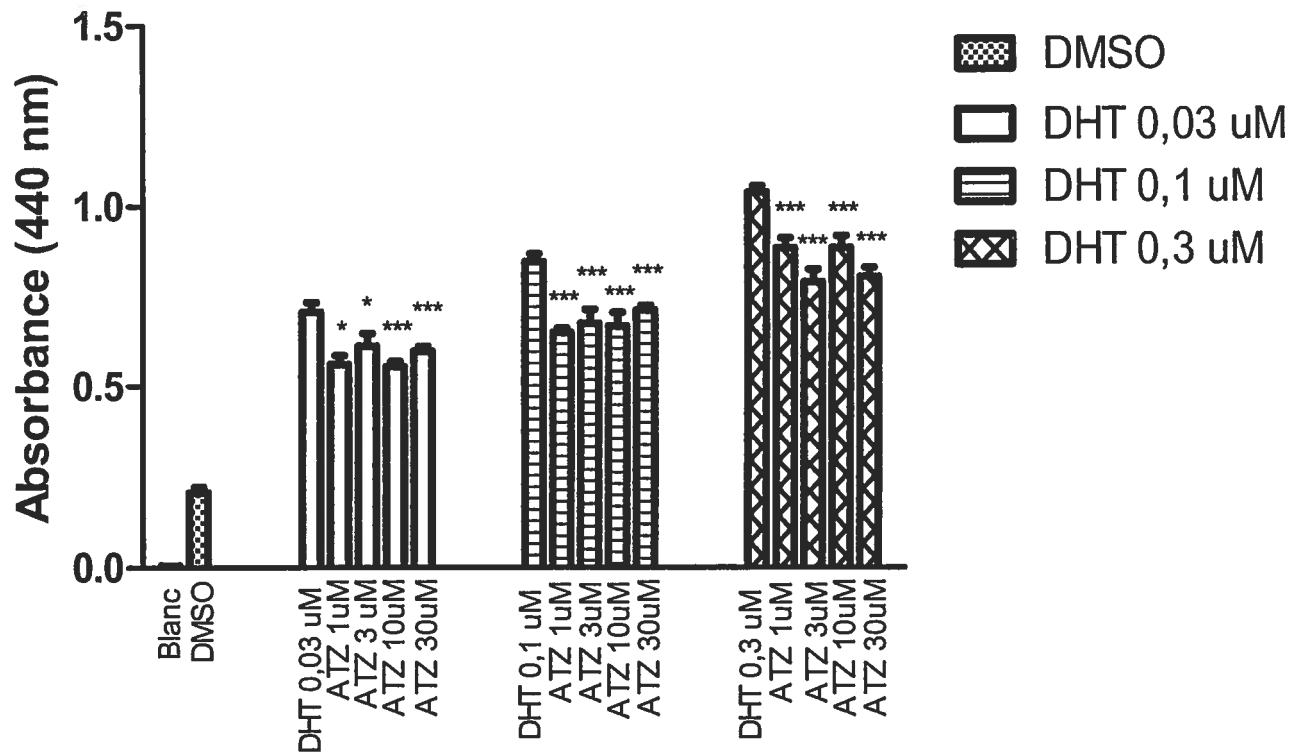


Figure 14 : Détermination de la prolifération des cellules LNCaP exposées à deux reprises, pendant 24 heures, dans un intervalle de 48 heures à l'atrazine (1, 3, 10 et 30 μM) et à la DHT (0.03, 0.1 et 0.3 μM). L'absorbance, d'une longueur d'onde de 440 nm, représente le nombre de cellules vivantes. Le blanc (milieu de culture sans cellule) et les cellules traitées avec la DHT sont utilisés comme contrôles négatif et positif (n=3). * ($p < 0.05$); *** ($p < 0.005$) différence significative avec la DHT (ANOVA).

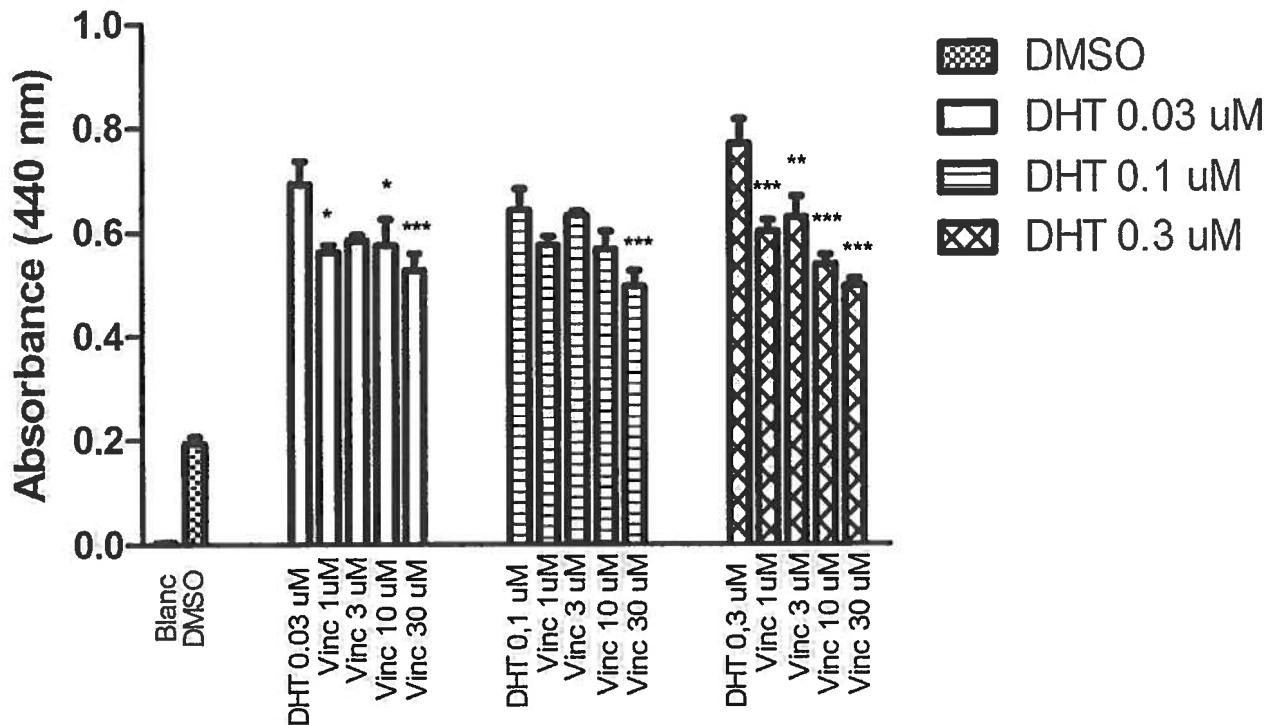


Figure 15 : Détermination de la prolifération des cellules LNCaP exposées à deux reprises, pendant 24 heures, dans un intervalle de 48 heures au vinclozoline (1, 3, 10 et 30 μM) et à la DHT (0.03, 0.1 et 0.3 μM). L'absorbance, d'une longueur d'onde de 440 nm, représente le nombre de cellules vivantes. Le blanc (milieu de culture sans cellule) et les cellules traitées avec la DHT sont utilisés comme contrôles négatif et positif (n=3). * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.005$); différence significative avec la DHT (ANOVA).

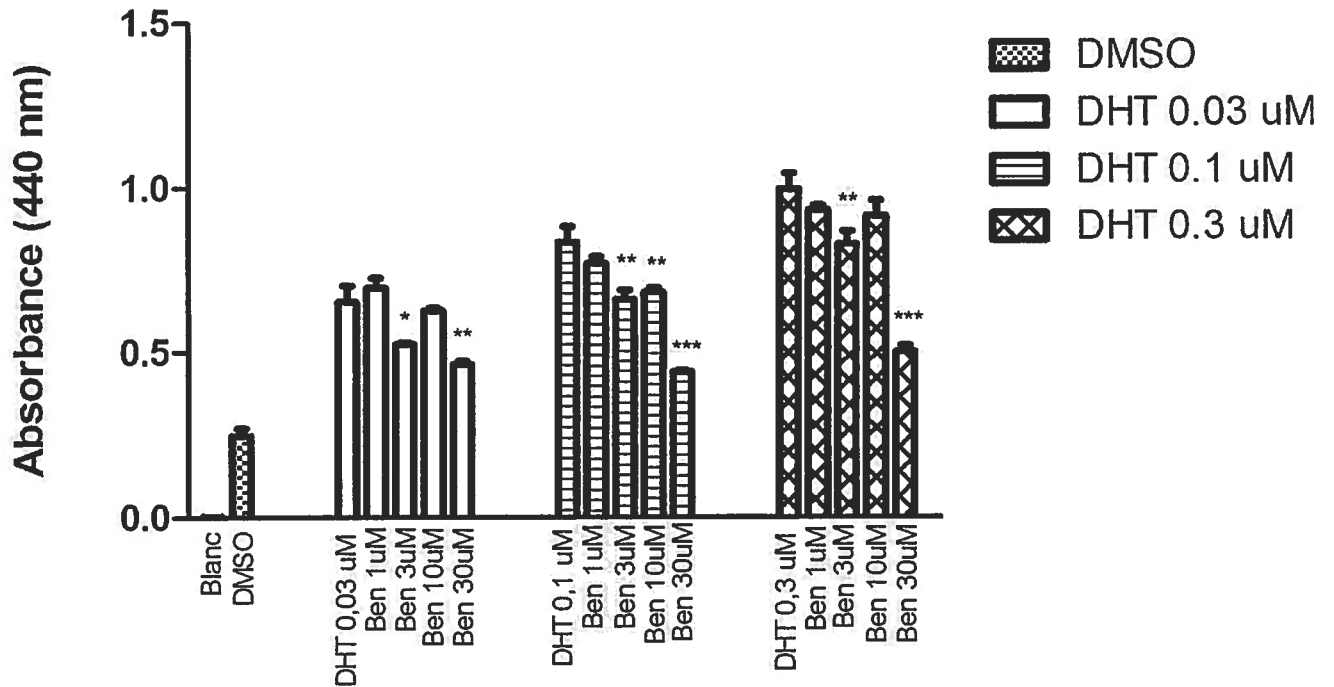


Figure 16 : Détermination de la prolifération des cellules LNCaP exposées à deux reprises, pendant 24 heures, dans un intervalle de 48 heures au bénomyl (1, 3, 10 et 30 μM) et à la DHT (0.03, 0.1 et 0.3 μM). L'absorbance, d'une longueur d'onde de 440 nm, représente le nombre de cellules vivantes. Le blanc (milieu de culture sans cellule) et les cellules traitées avec la DHT sont utilisés comme contrôles négatif et positif (n=3). * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.005$); différence significative avec la DHT (ANOVA).

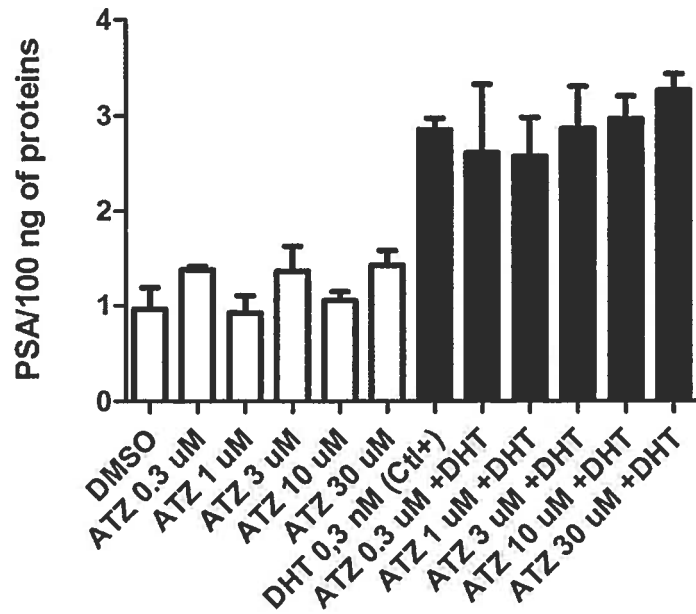


Figure 17 : Détermination du taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), après une exposition de 24 heures à l'atrazine (0.3, 1, 3, 10 et 30 μM) et à la DHT (0,3 nM). La DHT est utilisée comme contrôle positif (Ctl+) et le DMSO comme contrôle négatif (Ctl-) (n=3).

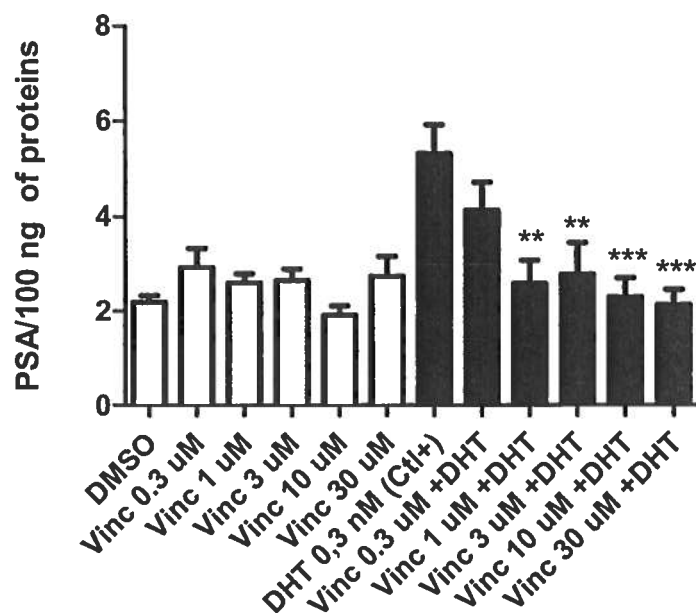


Figure 18 : Détermination du taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), après une exposition de 24 heures au vinclozoline (0,3, 1, 3, 10 et 30 μ M) et à la DHT (0,3 nM). La DHT est utilisée comme contrôle positif (Ctl+) et le DMSO comme contrôle négatif (Ctl-) (n=3). ** (p<0.01); *** (p<0.005); différence significative avec le contrôle positif (ANOVA).

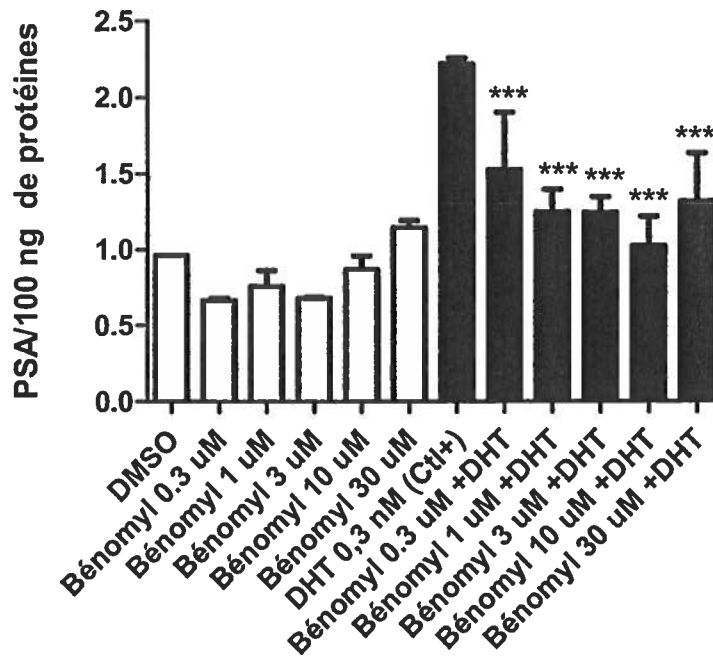


Figure 19 : Détermination du taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), après une exposition de 24 heures au bénomyl (0.3, 1, 3, 10 et 30 μ M) et à la DHT (0,3 nM). La DHT est utilisée comme contrôle positif (Ctl+) et le DMSO comme contrôle négatif (Ctl-). Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes (n=3).); *** ($p < 0.005$); différence significative avec le contrôle positif (ANOVA).

12.0 Discussion et Conclusion

Ce n'est pas la première fois que la localisation des récepteurs des androgènes dans un modèle cellulaire est l'objet de différentes recherches. À l'instar de nos expériences, il est connu que le vinclozoline (Wong, Kelce et al., 1995; Kjaerstad, Taxvig et al., 2010) et le bénomyl (Lorenzetti, Marcoccia et al., 2010) ont un effet anti-androgène, qui se résume à l'inhibition de la translocation des AR vers le noyau. De plus, l'inhibition de la viabilité cellulaire observée est également conforme à la littérature. En effet, les deux composés se sont révélés cytotoxiques à partir d'une concentration de 0,01 mg/ml (Lorenzetti, Marcoccia et al., 2010). Il est de même pour les résultats obtenus suite à l'évaluation des effets du bénomyl sur le taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate. Il a antérieurement été démontré que ce pesticide inhibe de manière dose dépendante le taux de sécrétion de PSA (Lorenzetti, Marcoccia et al., 2010). Par ailleurs, lors de la présente étude, les résultats obtenus sur le taux de sécrétion de PSA pour le pesticide vinclozoline ne sont pas totalement conformes à la littérature. En effet, les études du Dr. Lorenzetti (Lorenzetti, Marcoccia et al., 2010) démontrent que les cellules LNCaP exposées au vinclozoline sécrètent trois fois plus de PSA comparativement au contrôle. Ces résultats confirment que le fongicide, à des concentrations allant de 0.001µg/ml à 10 µg/ml, possède à la fois des effets anti- et pro-androgènes. Toutefois, dans cette même étude, il est possible de constater, à des concentrations supérieures ou égales à 0.01 mg/ml de vinclozoline, la présence d'une réduction du taux de sécrétion de PSA par les cellules. Le même phénomène aurait pu être observé dans la présente étude par une exposition à des concentrations supérieures de pesticides.

Des études réalisées par d'autres chercheurs ont démontré que l'atrazine n'avait aucun effet sur la viabilité des oocytes *in vitro* (Casas, Bonilla et al., 2010). Par contre à l'intérieur des cellules dendritiques, l'atrazine diminue considérablement le taux de cellule viable à des concentrations inférieures au seuil de toxicité (Pinchuk, Lee et al., 2007). Les effets de l'atrazine sont donc variables d'un modèle cellulaire à un autre (Bocher, Boldicke et al., 1993). Les expériences du laboratoire du Dr. Hessel et

collaborateurs démontrent qu'aucun lien n'a été établi entre une exposition à l'atrazine et le développement d'un cancer de la prostate (Hessel, Kalmes et al., 2004). Il est donc possible d'en déduire que cet herbicide n'a aucun effet sur le taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate.

Suite aux différentes analyses, il est possible de conclure que le vinclozoline et le bénomyl possèdent des propriétés capables de retarder le développement des cellules cancéreuses de la prostate. Toutefois, le cas de l'atrazine n'est pas aussi évident. D'autres analyses seraient nécessaires afin de classer cet herbicide.

En perspective, il serait intéressant de voir les effets des trois composés testés, le vinclozoline, l'atrazine et le bénomyl, sur l'expression de l'enzyme 5 alpha-réductase. Si les composés testés s'avèrent être des inhibiteurs de l'enzyme, il serait possible de constater une diminution de la conversion de la testostérone en DHT, réduisant ainsi la transcription de différents gènes tel que celui de la prolifération cellulaire. Cette inhibition serait bénéfique pour stopper le développement d'un cancer. De plus, il serait pertinent d'étudier les effets des pesticides sur la voie apoptotique de Bad/Bax et PARP toujours sur les cellules cancéreuses de la prostate LNCaP.

Discussion et conclusion générale

Le point commun des deux parties, qui composent ce mémoire, est l'étude de l'atrazine. En résumé, nos études démontrent que l'atrazine augmente l'expression de l'aromatase à l'intérieur de l'épididyme *ex vivo* et diminue la viabilité des cellules LNCaP. Comme le démontrent les résultats de diverses études, les effets de l'herbicide varient d'un modèle à l'autre. Par exemple, à l'intérieur des oocytes *in vitro*, l'atrazine n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire (Casas, Bonilla et al., 2010), contrairement aux cellules dendritiques, pour lesquelles une diminution de leur viabilité est observée après une exposition au pesticide (Pinchuk, Lee et al., 2007). Il est donc possible de conclure que l'atrazine n'est pas le composé possédant les propriétés les plus marquées.

Les pesticides peuvent moduler l'expression d'une multitude de gènes à différents niveaux. Cette modulation peut avoir lieu sur l'expression de l'aromatase via ses promoteurs spécifiques à différents tissus et par les différentes composantes de la voie de signalisation hormono-dépendante. Quelques études à ce sujet ont été faites *in vitro*, mais très peu sont connues quant aux effets des différents perturbateurs endocriniens à l'intérieur d'un modèle vivant. Il devient donc primordial, pour l'avancement de la recherche, d'avoir un modèle efficace permettant une bonne étude des perturbateurs endocriniens. L'évaluation du modèle de souris transgénique *Cyp19* permettrait donc d'avoir sur le marché une lignée de souris transgéniques utiles afin de suivre en temps réel, les effets de différents composés sur l'expression de l'aromatase.

Le modèle de souris transgéniques de Caliper LifeSciences semblait à prime à bord avoir tous les avantages d'un bon outil de recherche *in vivo*. Le fait qu'elles soient bioluminescentes permet aux chercheurs de suivre en temps réel les effets de différents composés sur l'expression d'une enzyme ciblée. En effet, si le transgène de la luciférase situé au niveau de l'aromatase avait été efficace à l'intérieur de notre modèle, il aurait été possible d'évaluer l'expression de l'aromatase à l'intérieur de plusieurs autres organes

capables de l'exprimer. D'autres enzymes auraient également pu être ciblées, augmentant ainsi l'étendue des recherches possibles.

Malheureusement, comme démontré dans l'article, le modèle n'est pas tout à fait au point, puisqu'un nombre insuffisant de souris répondent de manière significative au contrôle positif. En plus de cette réponse non spécifique, le maintien de la colonie des souris transgéniques était quelque peu laborieux. Étant donné que la compagnie avait uniquement les embryons transgéniques congelés, nous devions initier et maintenir nous même la colonie. De plus, étant donné que le croisement des souris se faisait entre une femelle transgénique et un mâle non-transgénique, seulement 50 % des souriceaux d'une portée avait le transgène de la luciférase. Plusieurs accouplements étaient donc nécessaires afin d'obtenir un nombre de souris bioluminescentes suffisant pour faire une expérience. Le maintien des colonies demandait également une attention particulière, soit des visites quotidiennes afin de connaître la journée exacte de la naissance des souriceaux, puisque toutes les expériences se faisaient chez des souris âgées de 21 jours. Une bonne organisation était également de mise pour bien planifier chacune des manipulations.

Le modèle de souris bioluminescentes, récent sur le marché, n'avait jamais été employé auparavant. Un grand nombre de tests préliminaires était donc requis. En effet, nous devions en premier lieu établir la concentration idéale de luciférine à injecter, nous permettant d'observer tout changement au niveau de l'expression de la luciférase. Par la suite, nous devions déterminer le temps d'incubation optimal entre l'injection de la luciférine et le scan. Un des problèmes que nous avons rencontré, a été le choix du diluant de l'atrazine, puisqu'un grand nombre de décès était observé. Il nous a donc fallu déterminer quel diluant et quelle concentration n'étaient pas toxique et n'entraînaient pas la mort des souris.

L'ensemble des expériences pratiquées démontre que le modèle de souris transgéniques bioluminescentes de la compagnie Caliper LifeSciences ne s'est pas avéré aussi efficace que nous l'espérions. Cependant, il a été démontré avec les résultats obtenus, que le

modèle fonctionne tout de même bien. En effet, les données recueillies démontrent que la bioluminescence observée chez les souris transgéniques résulte précisément de l'activation du promoteur pII de l'aromatase. Ces résultats sont donc conformes à ceux obtenus par la compagnie mère du modèle de souris. Ce dernier se caractérise principalement par une régulation de l'expression de la luciférase à l'intérieur des gonades mâles et femelles, suite à l'activation de leur promoteur spécifique de la *Cyp19*. Toutefois, la réponse face aux différents composés testés étant variable d'une souris à l'autre, il n'est pas possible de le considérer comme un outil de travail efficace pour différentes études *in vivo*.

Le traitement aigu à l'atrazine n'a quant à lui, aucun effet sur l'expression de l'aromatase, comparativement à l'exposition chronique, qui induit l'expression de la luciférase de manière *ex vivo* à l'intérieur des épидидymes. Les résultats *in vivo* sont donc conformes à la littérature, puisque différentes études ont démontré que l'atrazine n'avait aucun effet inducteur sur l'expression du gène de l'aromatase. Ces études ont été faites à l'aide de différents modèles tels que chez les poissons et amphibiens (Rohr et McCoy, 2010). Les données *ex vivo* recueillies à partir de nos expériences démontrent uniquement que l'atrazine pourrait avoir des effets sur l'expression de l'aromatase selon le modèle utilisé. Ceci nous permet de mentionner que les résultats *in vivo* obtenus avec le modèle à l'étude ne sont pas suffisants et tout à fait fiables pour déterminer spécifiquement les effets de l'atrazine.

Afin d'améliorer le modèle, il serait intéressant de créer une nouvelle colonie de souris bioluminescentes, faite uniquement à partir des souris qui répondent de manière significative aux inducteurs connus de l'aromatase. Cette dernière pourrait s'avérer plus performante que le modèle présentement disponible et nous permettrait d'analyser les effets de différents composés sur l'expression de l'aromatase *in vivo*.

Selon santé Canada, l'atrazine est de moins en moins utilisé, mais étant donné sa faible absorption par les particules du sol, sa présence sera encore détectable dans l'environnement après plusieurs années. L'atrazine est également l'un des pesticides que

l'on retrouve le plus fréquemment dans les eaux de surface de même que dans les puits à proximité des zones où son utilisation est importante (Santé Canada, 1993). Il est donc très important de prendre en considération tous les risques que peut causer une exposition à long terme à l'atrazine.

L'ensemble des expériences que nous avons faites sur l'atrazine ne permet pas de déterminer si le pesticide est néfaste ou non pour la santé humaine. En effet, l'atrazine *ex vivo* a pour effet d'augmenter l'expression de l'aromatase au niveau de l'épididyme. Une augmentation de l'aromatase, comme m'entionné précédemment, change les androgènes en oestrogènes (Kazmierczak, Skalba et al., 2006). Au niveau des épидидymes, un débalancement du ratio androgènes/oestrogènes peut diminuer la qualité du sperme, entraîner une malformation et un mauvais fonctionnement du système reproducteur (Benachour, Moslemi et al., 2007) et peut augmenter les risques de développer un cancer de la prostate (Benachour, Moslemi et al., 2007). D'autre part, les expériences faites sur des cellules cancéreuses de la prostate humaine démontrent que l'atrazine n'a pas d'effet sur les récepteurs des androgènes et sur le taux de sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate. Ceci signifie qu'il n'y aurait aucune augmentation du risque de développer certaines pathologies suite à une exposition à l'atrazine, et même que l'atrazine réduirait la prolifération des cellules cancéreuses, selon les résultats obtenus (figure 14).

Il est toutefois nécessaire de porter une attention particulière au niveau du modèle utilisé. Dans les expériences *in vivo*, les souris utilisées sont en parfaite santé, tandis que ce sont des cellules de prostate cancéreuse, qui sont utilisées comme modèle *in vitro*. Il est donc possible d'approfondir le raisonnement et de dire que chez un humain sain, l'atrazine pourrait entraîner le développement de diverses pathologies, tandis que chez une personne diagnostiquée comme ayant une pathologie au niveau de la prostate, l'herbicide pourrait retarder ou inhiber la prolifération des cellules cancéreuses.

Aucune difficulté majeure n'est survenue tout au long des expériences *in vitro*, contrairement à l'étude du modèle de souris transgéniques. En effet, plusieurs études sur le vinclozolin et le bénomyl ont été faites auparavant, nous permettant de choisir dans la

littérature les concentrations à employer pour nos expériences. Quelques mises au point ont dû être faites, afin de déterminer les anticorps primaires donnant les résultats les plus précis. De plus, avec l'aide d'une collègue de laboratoire, j'ai dû mettre en place le protocole du test permettant de déterminer le taux de prolifération cellulaire. En effet, les cellules LNCaP nécessitent deux expositions consécutives aux pesticides avant de percevoir un effet. L'emploi de l'xCELLigence de Roche, un appareil permettant de visualiser en temps réel la prolifération cellulaire, aurait été une technique plus précise et aurait facilité notre étude sur les effets de différents pesticides sur la prolifération des cellules LNCaP. Nous aurions également pu évaluer les effets du vinclozoline, du bénomyl et de l'atrazine sur l'expression des récepteurs des androgènes par PCR en temps réel. Notre étude aurait alors été complète puisque les effets auraient été observés au niveau de l'ARN et des protéines. Certains composés peuvent interférer au niveau des deux processus soient la transcription et la traduction. Il est toutefois possible qu'ils interfèrent qu'à un seul endroit, par différentes voies de signalisation.

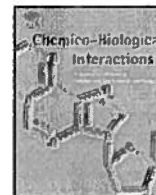
Certaines études ont démontré que diverses pathologies au niveau de la prostate pouvaient se développer selon un mécanisme indépendant aux androgènes. En effet, la transcription des récepteurs des androgènes se voyait augmenter suite à l'activation de la voie de signalisation GSK-3 β / β -catenin (Wang, Kreisberg et al., 2007). Il serait donc intéressant de tester les effets des trois pesticides sur l'expression des différents gènes de la voie d'Akt.

Après l'analyse de l'ensemble des résultats obtenus, il est possible de conclure qu'une optimisation du modèle de souris bioluminescentes est nécessaire, dans le but d'approfondir nos connaissances sur les effets de différents pesticides, toujours disponibles sur le marché et dans la nature, sur l'expression de l'aromatase. De plus, d'autres expérimentations, doivent être faites pour mieux connaître les effets des différents perturbateurs endocriniens, tels que l'atrazine, au niveau de l'expression de l'aromatase *in vivo* et sur la voie de signalisation dite hormono-dépendante *in vitro*. Il est également possible de conclure, suite aux expériences sur le modèle de cellule LNCaP que les pesticides (atrazine, vinclozoline et bénomyl) retardent à certains niveaux le développement de cancers androgènes dépendants. En approfondissant ainsi nos

connaissances sur les effets de différents perturbateurs endocriniens, il sera alors possible de réglementer l'utilisation de ces substances. De plus, l'observation d'effets bénéfiques, nous permettrait de créer une ouverture sur la mise en place de nouveaux produits thérapeutiques contre différents cancers hormono-dépendants.

Annexe A

Article: Proliferative and Androgenic Effects of Indurubin Derivatives in LNCaP Human Prostate Cancer Cells at Sub-Apoptotic Concentrations.



Proliferative and androgenic effects of indirubin derivatives in LNCaP human prostate cancer cells at sub-apoptotic concentrations

Patricia Rivest, Martin Renaud, J. Thomas Sanderson*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2010

Received in revised form

16 November 2010

Accepted 18 November 2010

Available online 25 November 2010

Keywords:

LNCaP cells
MDA-kb2 cells
GSK-3 β
Androgenic
 β -Catenin
Indirubins

ABSTRACT

Certain indirubin derivatives are potent cyclin-dependent kinase (CDK) and glycogen synthase kinase (GSK-3 β) inhibitors and may be effective against various cancers. We evaluated the effects of aloisine A, alsterpauillone, aminopurvalanol, indirubin-3'-oxime, 6-Br-indirubin-3'-oxime, kenpauillone, olomoucine and roscovitine on cell proliferation, prostate-specific antigen (PSA) expression, androgen receptor (AR) activation, and GSK-3 β and β -catenin expression in androgen-dependent LNCaP human prostate cancer cells. Effects were also evaluated in MDA-kb2 human breast cancer cells containing an AR-responsive luciferase construct. Steroid-deprived LNCaP cells were exposed to indirubins \pm dihydrotestosterone (DHT, 0.1 nM) and cell proliferation was assessed by MTT assay after 120 h. PSA expression was determined by real-time quantitative RT-PCR after 24 h. Cytoplasmic and nuclear GSK-3 β / β -catenin expression and phosphorylation status was determined by Western blotting. Effects on MDA-kb2 luciferase expression were determined after 24 h using Steady-Glo (Promega). Indirubin-3'-oxime, 6-Br-indirubin-3'-oxime, alsterpauillone and kenpauillone increased LNCaP cell proliferation and PSA expression (0.03–1 μ M; apoptosis occurred >1 μ M), whereas aminopurvalanol significantly ($p < 0.05$) reduced DHT-stimulated PSA expression (31%) at 1 nM. The other indirubin derivatives had no effect. The same was observed for induction of AR-dependent MDA-kb2 luciferase expression. Kenpauillone (1, 3 μ M) decreased the active- and increased the inactive form of cytoplasmic GSK-3 β , and increased nuclear AR and β -catenin accumulation. Flutamide (10 μ M), unexpectedly, also strongly increased nuclear β -catenin accumulation. Indirubin derivatives that were potent GSK-3 β inhibitors (relative to CDK1) stimulated LNCaP cell proliferation and other androgenic responses, suggesting (in a cancer treatment context) these compounds may increase AR-dependent prostate cancer growth if not used within an appropriate therapeutic dose-range.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

As far back as Phoenecian times extracts of certain Mediterranean molluscs (*Murex brandaris* and *Hexaplex trunculus*) were used to obtain brilliant purple dyes (Tyrian purple) and for medicinal purposes [1]. It was in 1909 that the rough chemical composition of these dyes became known; a complex mixture of various indigo- and indirubin-like structures [2]. Indirubins and related compounds such as pauillones and aloisines (hereafter referred to as indirubin derivatives) are found in a variety of natural

plant and invertebrate species and several act as relatively selective and highly potent inhibitors of protein-dependent kinases, such as cyclin-dependent kinase-1 (CDK1) and glycogen synthase kinase-3 α/β (GSK-3 α/β). In particular the pauillones, such as the synthetically derived alsterpauillone and kenpauillone, have shown to be highly potent GSK-3 α/β inhibitors [3,4]. Co-crystallisation studies have shown that certain indirubin derivatives appear to inhibit GSK-3 β by competing for the ATP-binding pocket of the enzyme [1]. GSK-3 β inhibitors are being studied intensively for their potential protective effects against various neuronal degenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's, because GSK-3 β inhibition appears to stabilize the loss of critical cells caused by uncontrolled apoptosis [5]. They are also being portrayed as exciting novel antitumor agents, because at certain elevated concentrations they cause apoptosis in various human cancer cell lines [6–10]. They are also used successfully as a Chinese medicinal remedy for the treatment of chronic myelocytic leukemia [11].

Few, if any, studies have evaluated the effects of indirubin derivatives on human prostate cancer. GSK-3 β and the

Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; DEX, dexamethasone; DHT, dihydrotestosterone; FLUT, flutamide; GSK, glycogen synthase kinase; MIF, mifepristone; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl))-2,5-diphenyltetrazolium bromide; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction; qPCR, real-time quantitative PCR.

* Corresponding author. Tel.: +1 514 687 5010x8819; fax: +1 514 686 5309.

E-mail address: thomas.sanderson@iaf.inrs.ca (J. Thomas Sanderson).

upstream Akt- and Wnt-signalling pathways appear to play an important role, both in androgen-dependent and -independent prostate cancer growth, as well as possibly in the progression from androgen-dependence to -independence [12–14]. Among other roles, activated GSK-3 β phosphorylates β -catenin, which is subsequently degraded in the cytoplasm of the cell; inactivated GSK-3 β prevents degradation, resulting in nuclear β -catenin accumulation and increased cell proliferation. There are conflicting reports on the effects of modulation of GSK-3 β activity on androgen signalling and its role in androgen-dependent as well as -independent growth of prostate cancer cells [15,16], although there is accumulating evidence that the two signalling pathways are interconnected [17,18]. Most studies suggest that β -catenin acts as an activator of nuclear androgen receptor (AR) and AR-regulated genes [13,19–21].

We have evaluated the potential pro- or anti-androgenic effects of a number of indirubin derivatives in androgen-dependent LNCaP human prostate cancer cells, which are AR-positive and express GSK-3 β . Our working hypothesis is that at sub-apoptotic concentrations indirubin derivatives, through inhibition of GSK-3 β , may in fact act as stimulants of androgen-dependent prostate cancer cell growth. We examined the effects of eight indirubin derivatives on LNCaP cell proliferation and prostate-specific antigen (PSA) production, as well as the effects of one of the more potent GSK-3 β inhibitors (kenpaullone) on the nuclear accumulation of AR and β -catenin. We also studied the effects of indirubin derivatives on activation of an AR-dependent luciferase reporter gene in a stably constructed MDA-Kb2 human mammary cancer cell line that expresses non-mutated human AR [22].

2. Materials and methods

2.1. Indirubin derivatives

Aloisine A, aminopurvalanol, olomoucine, (R)-roscovitine, indirubin-3'-oxime, 6-bromo-indirubin-3'-oxime, alsterpaullone and kenpaullone (>98% purity) were provided by Dr. L. Meijer at the Station Biologique, Roscoff, France (structures shown in Table 1).

2.2. Cell culture

LNCaP cells were obtained from the American Type Culture Collection (CRL-1740; ATCC, Rockland, MD) and cultured in 75 cm² flasks (CellBind; Corning LifeSciences, Lowell, MA) in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 4500 mg/l glucose, 1500 mg/l sodium bicarbonate, 100 U/l penicillin and 100 mg/l streptomycin (Sigma–Aldrich, St Louis, MO), under an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Early passage numbers were cryogenically cooled to and preserved at –80 °C. MDA-kb2 cells (CRL-2713; ATCC) were maintained in Leibovitz' L-15 medium with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/l streptomycin and 0.25 μ g/ml amphotericin B (Sigma–Aldrich) at 37 °C in an atmosphere without added CO₂. For LNCaP experiments, cells were used with passage numbers between 2 and 25; beyond 25 passages reduced androgen responsiveness was observed. All MDA-kb2 experiments were performed using cells with passage numbers between 2 and 10, as a gradual loss of reporter activity was observed beyond 10 passages.

2.3. Cell proliferation assay

LNCaP cells (5.0 \times 10⁴ cells/ml) were added to 24-well culture plates (CellBind; Corning LifeSciences) in phenol red-free culture medium with 10% dextran-coated charcoal-treated (steroid-free) FBS (Hyclone, Logan, UT) and allowed to acclimatise for 48 h. The cells were then exposed to various concentrations of the indirubin

derivatives, in the presence or absence of 0.1 nM dihydrotestosterone (DHT) for 48 h, after which the medium was refreshed and the cells re-exposed to the same treatments for another 72 h. Medium was then removed, cells washed once with 1 \times phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 1 ml of 0.5 mg/ml MTT [23] in serum-free culture medium without additives at 37 °C in the dark. After 15 min, the reaction medium was removed and the formazan produced by the cells was extracted by adding 1 ml of isopropanol and incubating for 10 min at room temperature (in the dark). The isopropanol extracts were transferred to spectrophotometric multi-well plates (Greiner–One, VWR International, Ville de Mont-Royal, QC) and absorbance was determined at a wavelength of 560 nm (reference wavelength 690 nm), using a SpectroMax M5 multi-mode micro-plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Laval, QC) was used to determine the occurrence of apoptosis (based on the quantitative detection of cytoplasmic histone-associated DNA fragments) when decreased cell proliferation was observed.

2.4. PSA mRNA expression

LNCaP cells in 6-well culture plates (3.0 \times 10⁵ cells/4 ml; deprived of steroids for 24 h by culturing in phenol red- and steroid-free medium) were treated with the indirubin derivatives in the presence or absence of 0.1 nM DHT for 24 h, after which total RNA was extracted using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics). RNA (1 μ g) was reverse transcribed (RT) using a iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). A 2 μ l volume of resultant cDNA was added to the PCR reaction mix (Perfecta SYBR Green SuperMix, Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) containing primers (500 nM) that recognize PSA transcript (forward: 5'-GGA.GGC.ACA.ACG.CAC-3'; reverse: 5'-CCA.GTC.CCT.CTC.CTT.ACT.TC-3') and amplification was carried out using a CFX96 Real-Time PCR System (Bio-rad). GAPDH (forward: 5'-GAA.GGT.GAA.GGT.CGG.AGT.CAA-3'; reverse: 5'-GGA.AGA.TGG.TGA.TGG.GAT.TTC-3') and β -actin (forward: 5'-CCA.ACC.GCG.AGA.AGA. TGA-3'; reverse: 5'-CAG.AGG.CGT.ACA.GGG.ATA.G-3') were amplified as reference genes. Amplification conditions for each gene transcript were: denaturation at 95 °C for 3 min, then 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 30 s at 60 °C. After each amplification a melt-curve was produced by increasing the temperature to 95 °C. PSA mRNA expression levels were calculated using a normalized 2^{– $\Delta\Delta$ Ct} method with correction for the amplification efficiencies of the PSA and reference genes.

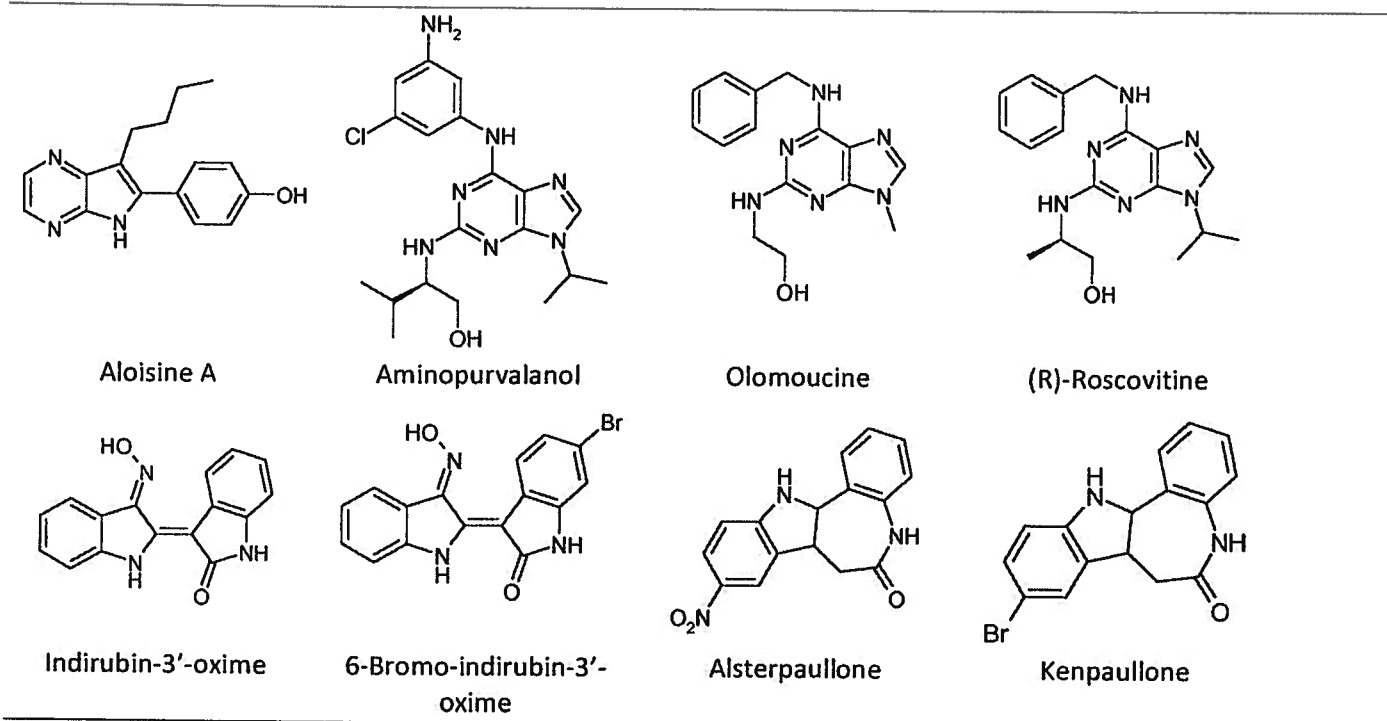
2.5. AR-dependent luciferase reporter assay

MDA-kb2 cells (5000 cells/100 μ l) were added to 96-well plates and incubated for 24 h in phenol- and steroid-free culture medium, after which the medium was replaced with fresh medium containing various concentrations of the indirubin derivatives in the presence or absence of 0.3 nM DHT. After another 24 h, the treated medium was removed and the cells were exposed to 50 μ l of a lysis/luciferase reagent buffer (Steady-Glo, Promega) in the dark. The reaction reagents were mixed using a multi-channel pipettor. After 5 min, 100 μ l of the reaction mixtures was transferred to white 96-well luminometer plates (Bio-One, Greiner, Monroe, NC) and luminescence intensities determined using a SpectraMax M5 spectrophotometer.

2.6. Western blotting

LNCaP cells (2 \times 10⁵ cells/well) in 6-well plates (deprived of steroids for 24 h) underwent exposure to the indirubin derivatives in phenol- and steroid-free culture medium for the following durations: analysis of AR and β -catenin protein, 24 h;

Table 1
Structures of the indirubin derivative used in this study.



analysis of the phosphorylated forms of GSK-3 β and β -catenin, 60 min, as preliminary time-course experiments indicated optimal phosphorylation at this time point. After treatment, medium was removed and cells prepared for nuclear and cytoplasmic protein extraction according to the instructions supplied with the NEPER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Protein fractions (20 μ g cytoplasmic protein/lane, 40 μ g/lane for detection of cytoplasmic AR; 30 μ g nuclear protein/lane) were separated on 10% polyacrylamide gels after migrating through 4% polyacrylamide stacking gels, using a Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System (BioRad, Mississauga, ON), and the separated proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA), using a voltage of 100 V for 45 min at 4°C. Membranes were blotted with primary antibodies raised against AR (Millipore), β -catenin, p-Ser33/37- β -catenin (Abcam, Cambridge, MA), p-Ser9-GSK-3 β (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and p-Tyr216-GSK-3 β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-goat secondary antibodies were obtained from Millipore. We used β -actin staining as protein loading control.

2.7. Statistical analyses

Cell proliferation, AR translational activation and real-time PSA transcript amplification experiments were performed in quadruplicate per test concentration and each experiment was performed three times, independently. Immunoblotting experiments were performed three times. Arithmetic means were calculated and are presented with their standard deviations (error bars). Statistically significant differences ($p < 0.05$) among groups (gene and protein expression studies) were determined using a Kruskal–Wallis analysis of variance followed by a Dunn's *posteriori* test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Effects of indirubin derivatives on LNCaP human prostate cancer cell proliferation

To define the androgen responsiveness of LNCaP cells under our conditions, we exposed steroid-deprived LNCaP cells to increasing concentrations of DHT in the absence or presence of increasing concentrations of a prototype AR antagonist, flutamide (Fig. 1A). DHT stimulated LNCaP cell proliferation concentration-dependently, reaching a maximum 5–6 fold increase above control between 0.1 and 3 nM. Significant decreases of DHT-stimulated LNCaP cell proliferation were observed at 1 μ M flutamide and above ($p < 0.05$). At DHT concentrations of 0.1 and 0.3 nM, 10 μ M flutamide reduced cell proliferation by about 27% and 32%, respectively.

Several indirubin derivatives demonstrated biphasic effects on androgen-deprived LNCaP cell proliferation in the 0.03–10 μ M range (Fig. 1B). In particular, the synthetic indirubin-derivative 6-bromo-indirubin-3'-oxime, as well as alsterpauellone, were strong stimulants of LNCaP cell proliferation in the 0.03–0.3 μ M range, before causing cell toxicity via apoptosis (determined by Cell Death Detection Kit; data not shown) at concentrations above 0.3 μ M. Kenpauellone appeared to cause a consistent concentration-dependent increase of cell proliferation above control up to 3.0 μ M. Under conditions where LNCaP cells were exposed to a stimulatory concentration of DHT (0.1 nM) the potential antiandrogenic effects of the indirubin-derivatives were evaluated (Fig. 1C). In the presence of DHT, indirubin-3'-oxime, 6-bromo-indirubin-3'-oxime, kenpauellone and alsterpauellone caused an additional stimulatory effect above that of DHT (Fig. 1C). Here too, 6-bromo-indirubin-3'-oxime and alsterpauellone caused apoptotic cell death at concentrations above 0.3 μ M. Aminopurvalanol decreased basal LNCaP cell proliferation at 3 nM (Fig. 1B), which was due to apoptosis (not shown), but had little to no effect on DHT-stimulated cell proliferation (Fig. 1C); aloisine A, olomoucine and roscovitine had no effect (not shown).

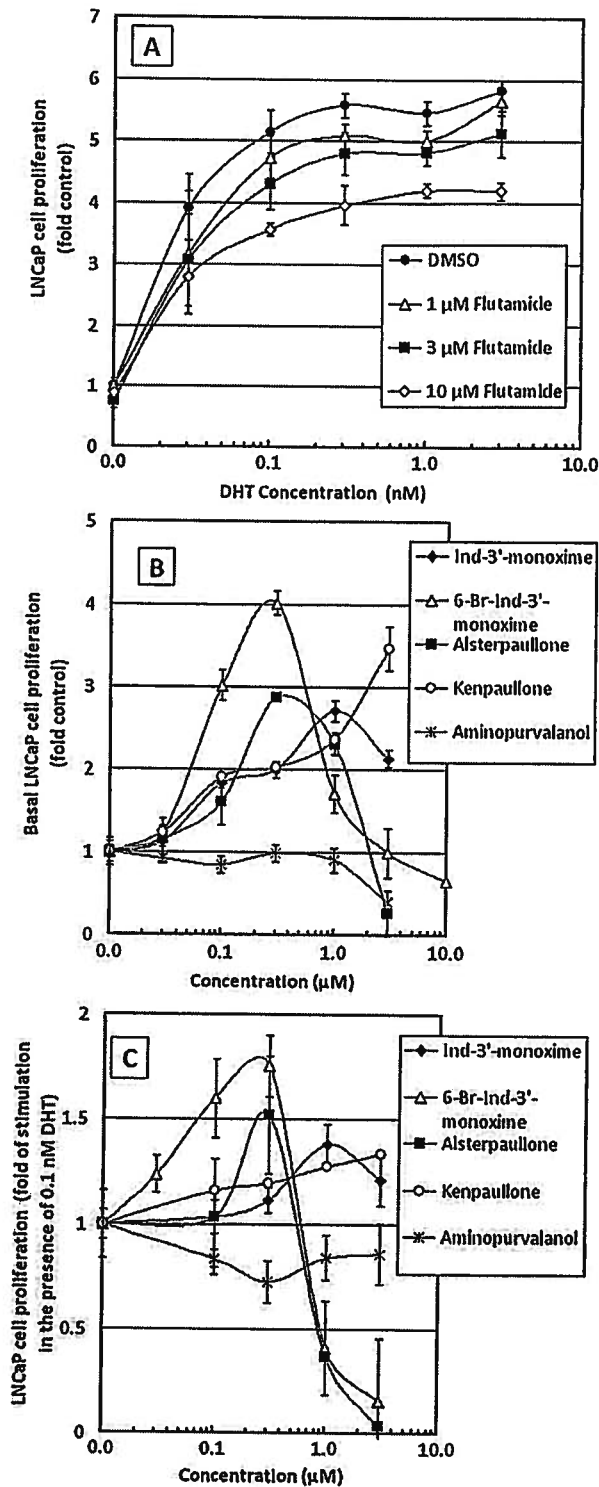


Fig. 1. Concentration-dependent stimulation of steroid-deprived LNCaP human prostate cancer cell proliferation by dihydrotestosterone (DHT) and its concentration-dependent inhibition by the androgen receptor (AR) antagonist flutamide (A). Concentration-dependent effects of indirubin derivatives on steroid-deprived LNCaP cell proliferation in the absence (B) or presence (C) of 0.1 nM DHT are also shown. One of three typical experiments is shown. Exposures as described in Section 2.

3.2. Effects of indirubin derivatives on LNCaP human prostate cancer cell PSA expression

DHT caused a statistically significant ($p < 0.01$), concentration-dependent increase in PSA expression (Fig. 2A), which was

reduced ($p < 0.05$) by the androgen receptor antagonist flutamide at 1.0 and 10 μM (Fig. 2B). A series of experiments with indirubin derivatives (1.0 μM) showed that kenpallone and alsterpallone increased PSA expression significantly ($p < 0.01$) in the absence of DHT, whereas aloisine A, aminopurvalanol, olomoucine, roscovitine, indirubin-3'-oxime and 6-bromo-indirubin-3'-oxime had no statistically significant effect (Fig. 2C). In the presence of an almost maximal stimulatory concentration of DHT (0.1 nM), the stimulatory compounds alsterpallone, kenpallone and 6-bromo-indirubin-3'-oxime increased PSA expression further ($p < 0.05$), suggesting a possible additive mechanism of androgenicity (Fig. 2D). Aminopurvalanol, but not aloisine A, olomoucine or roscovitine, caused a statistically significant ($p < 0.05$) decrease of DHT-stimulated PSA expression compared to DHT alone (Fig. 2D).

3.3. Effects of indirubin derivatives in MDA-kb2a cells

We chose the MDA-kb2a cell line for two reasons: (1) it expresses non-mutated human AR; (2) it is meant to represent a highly responsive cell bioassay for the screening of AR (ant)agonists. We kept in mind that the cell construct is also glucocorticoid responsive [22] and performed several essential validations studies to rule out cross-talk or confusion between AR- and GR-mediated luciferase responses.

We demonstrated that under our conditions MDA-Kb2a cells were considerably more responsive to androgens (DHT), with an EC_{50} of 0.1 nM and maximal response between 0.3 and 3.0 nM, than to glucocorticoids (dexamethasone, DEX), which did not show a response until concentrations above 3.0 nM (Fig. 3A). Flutamide (FLU) at a concentration of 10 μM was able to block DHT-mediated luciferase expression completely up to a concentration of 3 nM DHT. The antiglucocorticoid mifepristone (MIF), at 10 nM, was able to block DEX-mediated luciferase expression in MDA-kb2a cells as high as 10 nM DEX (Fig. 3A).

Kenpallone increased luciferase expression significantly in MDA-Kb2a cells (Fig. 3A). Control experiments demonstrated that this effect was mediated by the AR responsiveness of the cell construct, as flutamide (10 μM) but not mifepristone (10 nM) was able to block the androgenic effect of kenpallone.

Detailed concentration-response experiments showed that several indirubin derivatives were pro-androgenic in MDA-kb2a cells, either in the absence or presence of 0.3 nM DHT (Fig. 3B and C, respectively). Kenpallone and 6-bromo-indirubin-3'-oxime were the most potent and efficacious compounds, although considerably less potent (3 orders of magnitude) than the physiological androgen, DHT.

3.4. Effects of indirubin derivatives on nuclear AR accumulation, and the expression and (de)activation of GSK-3 β and β -catenin in LNCaP cells

DHT caused a concentration-dependent increase of AR protein in the nuclear fraction of steroid-deprived LNCaP cells after a 24 h exposure, which coincided with a decrease in cytoplasmic presence of AR (Fig. 4A). The androgenic indirubin derivative, kenpallone, at 1 and 3 μM , was also shown to cause nuclear AR accumulation (Fig. 4B). At 10 μM , a cytotoxic concentration of kenpallone, AR accumulation decreased.

As several indirubin derivatives are more or less potent inhibitors of GSK-3 β , we examined the effect of one of the more potent inhibitors, kenpallone, on GSK-3 β (in)activation. Kenpallone at 3 μM caused a significant decrease in the active form of cytoplasmic p-GSK-3 β -Tyr216 after a 1 h exposure (Fig. 5A). LY 294002, included as positive control for activation of GSK-3 β , demonstrated a significant increase in p-GSK-3 β -Tyr906. DHT had

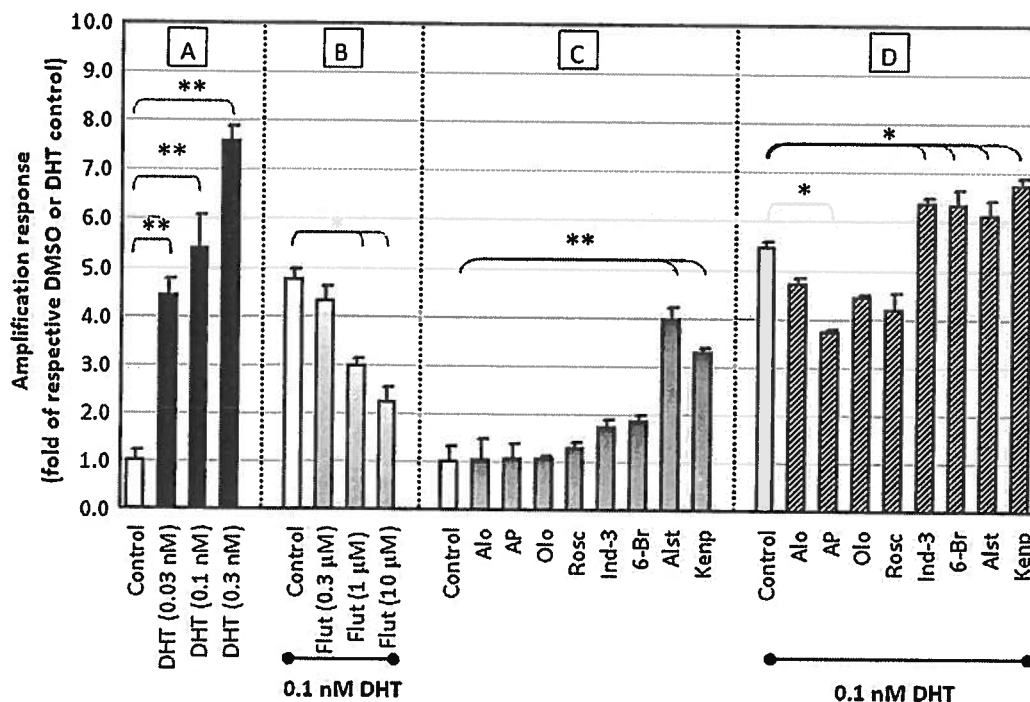


Fig. 2. Concentration-dependent induction of prostate specific antigen (PSA) expression in steroid-deprived LNCaP cells by DHT (A) and its concentration-dependent inhibition by the AR antagonist flutamide (B), followed by the effects of indirubin derivatives (1 μM) on LNCaP cell PSA expression in the absence (C) or presence (D) of 0.1 nM DHT. Levels of mRNA were determined by real-time quantitative PCR as described in Section 2 and were expressed as fold difference from respective DMSO or DHT controls. Exposures were for 24 h in triplicate; the average with standard deviation of three independent experiments is shown. Statistically significant differences from appropriate controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) were determined by non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn's post hoc test.

no significant effect alone, nor in combination, on the effects of LY 294002 or kenpaullone in the cytoplasmic fraction (Fig. 5A). Kenpaullone (3 μM) significantly increased the inactive Ser9-phosphorylated form of GSK-3β in the cytoplasm of LNCaP cells after 1 h, whereas LY 294002, with little effect alone, was able to significantly decrease kenpaullone-stimulated Ser9-phosphorylation (Fig. 5B). DHT did not have any effects on cytoplasmic p-GSK-3β-Ser9. Nuclear p-GSK-3β-Ser9 was detectable but not affected by any of the treatments at 1 or 24 h (not shown). Given the apparent AR-agonistic effects of kenpaullone (increased LNCaP cell proliferation, PSA induction, and AR-mediated MDA-kb2 luciferase expression), we examined the effect of flutamide on the inhibitory effects of kenpaullone on GSK-3β. Interestingly, flutamide significantly ($p < 0.05$) increased cytoplasmic p-GSK-3β-Ser9 (4-fold) compared to control, and acted in an apparently additive way with kenpaullone (8-fold induction) to further increase p-GSK-3β-Ser9 protein levels to 12-fold above control (Fig. 5C). DHT did not significantly increase p-GSK-3β-Ser9 levels, nor was there a statistically significant difference between the effect of flutamide alone or in combination with DHT.

Downstream effects of kenpaullone-mediated GSK-3β inactivation on nuclear β-catenin accumulation were evaluated. Kenpaullone at 3 μM caused an almost 3-fold increase in cytoplasmic β-catenin levels after a 24 h exposure, whereas nuclear β-catenin accumulation was less pronounced at about a 70% increase above control (Fig. 6A). The Ser33/37 phosphorylated form of β-catenin in the cytoplasm of LNCaP cells was decreased statistically significantly by kenpaullone (53%) and flutamide (38%) (Fig. 6B) after a 1 h exposure. A combination of the two compounds decreased p-β-catenin-Ser33/37 by 67%. LY 294,002 increased p-β-catenin-Ser-33/37 levels just under two-fold.

4. Discussion

4.1. Effects of indirubin derivatives on androgen-dependent responses in LNCaP and MDA-kb2 cells

The present study demonstrates that several indirubin derivatives stimulated cell proliferation and activated AR-dependent PSA expression in LNCaP human prostate cancer cells (Figs. 1 and 2). The strongest effects were observed for 6-bromo-indirubin-3'-oxime, kenpaullone and alsterpaullone. They were further shown to activate luciferase expression in MDA-kb2 human mammary cancer cells stably transfected with non-mutated human AR and an androgen receptor-responsive luciferase gene [22] (Fig. 3). These findings indicate that certain indirubin derivatives are capable of either activating the androgen receptor or are capable of directly or indirectly stimulating certain promoters upstream of androgen-responsive genes to increase androgen-responsive gene expression and cell proliferation. The fact that flutamide was capable of blocking the effect of both DHT and kenpaullone in MDA-kb2 cells suggests that, just like DHT, kenpaullone may act as a direct agonist by binding to the AR. The increased accumulation of nuclear AR (in LNCaP cells) caused by kenpaullone corroborates this (Fig. 4). AR binding and nuclear translocation studies would have to confirm this. The lack of activity of olomoucine, roscovitine, aminopurvalanol and aloisine A on PSA expression and cell proliferation in LNCaP cells was also consistent with their lack of response in MDA-kb2 cells. Although relative proandrogenic potencies and efficacies of the indirubin derivatives differed between the two cell lines, this is likely due to differences in AR levels, AR affinities (mutated vs non-mutated receptor), exposure times (120 vs 24 h) and the inherent differences in responsiveness of androgen-mediated gene expression in LNCaP cells vs the luciferase gene construct in MDA-kb2 cells.

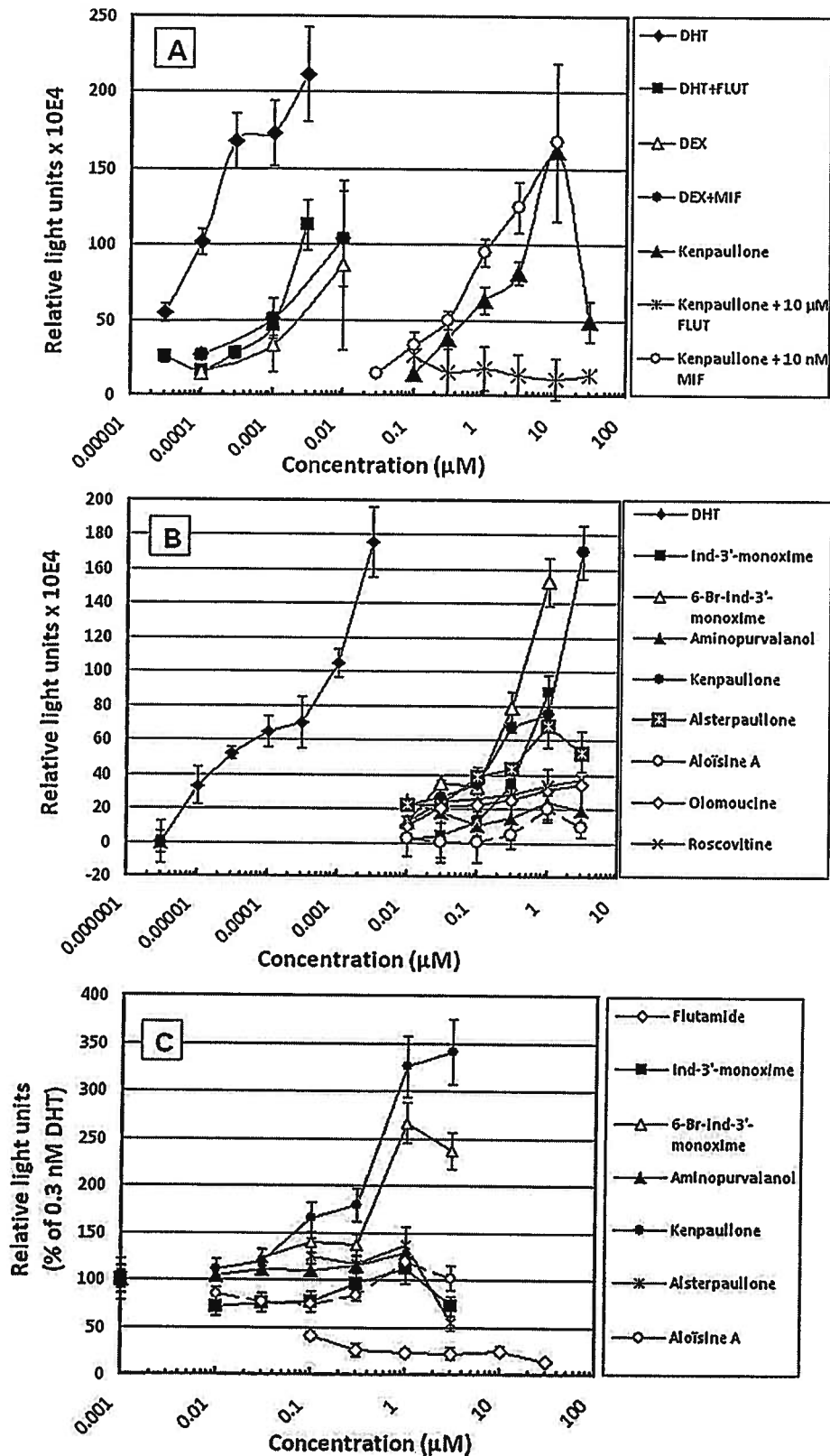


Fig. 3. (A) Luciferase expression induced by dexamethasone (DEX) and DHT in MDA-kb2a human breast cancer cells stably transfected with androgen- and glucocorticoid receptor-responsive luciferase genes, and its inhibition by the respective receptor antagonists, flutamide (FLUT, 10 μM) and mifepristone (MIF, 10 nM). Kenpauillone-Induced luciferase expression was antagonized by FLUT, but not by MIF. Concentration-dependent effects of indirubin derivatives on luciferase expression in MDA-kb2 cells, in the absence (B) or presence (C) of 0.3 nM DHT. One of three typical experiments is shown. Exposures were for 24 h.

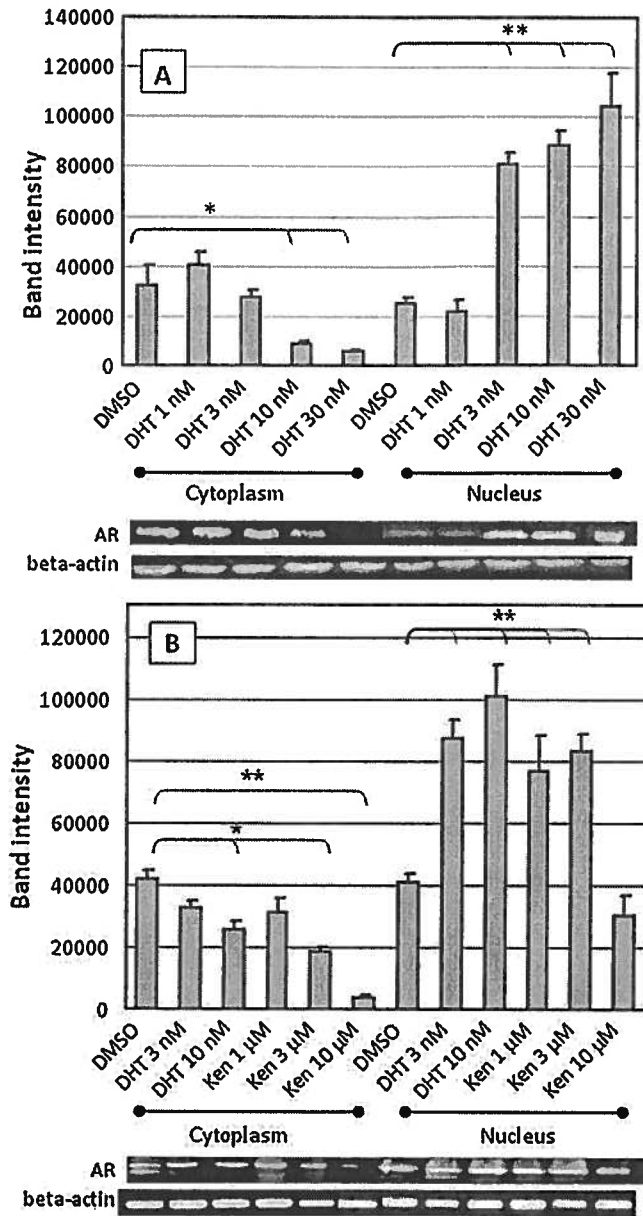


Fig. 4. Concentration-dependent stimulation of nuclear AR accumulation by DHT in steroid-deprived LNCaP human prostate cancer cells (A) and stimulation of nuclear androgen receptor accumulation by kenpaullone (B) at sub-apoptotic concentrations ($\leq 3 \mu\text{M}$). Gels were typical of one of the three experiments; densitometric analyses represent mean and SD of all three. Exposures were for 24 h. Statistically significant differences from appropriate controls ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) were determined by non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn's post hoc test.

4.2. Effects of indirubin derivatives on GSK-3 β / β -catenin signalling in LNCaP cells

This is the first study to show that kenpaullone exposure results in nuclear AR accumulation in LNCaP cells. We also confirmed in LNCaP cells, the findings of other studies that have shown that kenpaullone inactivates (purified) GSK-3 β [24]. We have further shown that kenpaullone not only decreases the active p-GSK-3 β -Tyr216 form, but also increases the inactive p-GSK-3 β -Ser9. Our results suggest that kenpaullone, although it competes with ATP for binding to the ATP binding site of GSK-3 β , does not prevent the ability of GSK-3 β to utilize ATP [25] to autophosphorylate at the Ser9-position. Further studies on the molecular

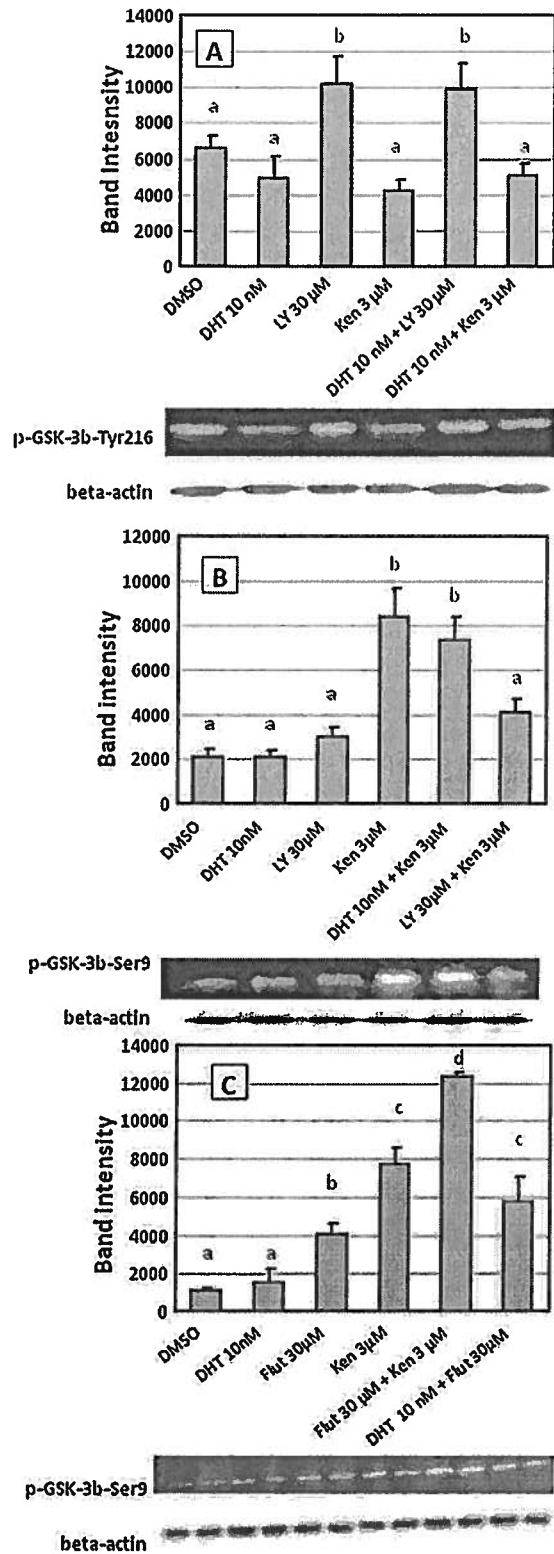


Fig. 5. Effects of DHT, LY 294002, kenpaullone and combinations thereof on cytoplasmic GSK-3 β phosphorylation at tyrosine-216 (A) and at serine-9 (B). Gels were typical of one of two experiments. (C) Effect of DHT, flutamide, kenpaullone and combinations thereof on the phosphorylation of GSK-3 β at serine-9. Proteins were loaded in duplicate; gels were typical of one of three experiments; densitometric analyses represent mean and SD of all three. Exposures were for 1 h. Columns superseded by different letters are significantly different from each other ($p < 0.05$); non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn's post hoc test.

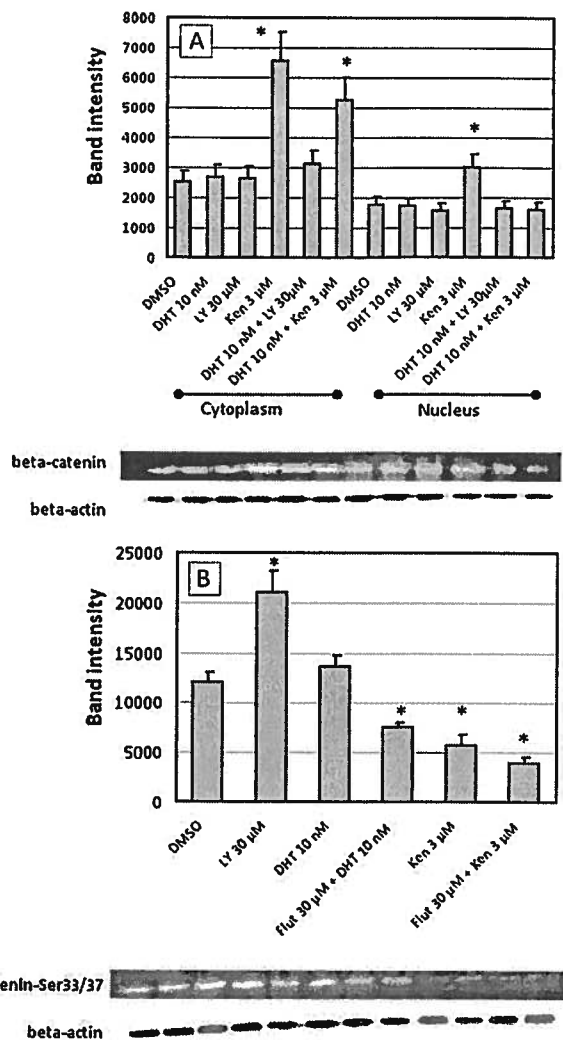


Fig. 6. (A) Effects of DHT, LY 294002, kenpaullone and combinations with DHT on cytoplasmic and nuclear accumulation of β -catenin. (B) Effects of LY 294002, DHT, kenpaullone and combinations with flutamide on cytoplasmic presence of β -catenin phosphorylated at Ser33/37 positions. Gels were typical of one of three experiments, and the densitometric analyses represent mean and SD of all three. Statistically significant differences from controls ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) were determined by non-parametric Kruskal–Wallis and Dunn's post hoc test.

structure of the ATP binding pocket(s) of GSK-3 β may be able to explain this observation. We further demonstrated that kenpaullone decreases the degradable p- β -catenin-Ser33/37 form and increases nuclear β -catenin accumulation in LNCaP cells. Together, these effects on the GSK-3 β / β -catenin pathway can explain, in part, the proliferative effects of kenpaullone (as well as those of the potent GSK-3 β inhibitors alsterpaullone, indirubin-3'-oxime and 6-bromo-indirubin-3'-oxime) in LNCaP cells. These proliferative and anti-apoptotic effects occur at concentrations below those required to inhibit CDKs, such as CDK1 and CDK5 [24], which would result in cell cycle arrest and apoptosis [26,27]. The difference in GSK-3 β and CDK1 inhibitory potencies of the above mentioned compounds ranged from 3-fold to several orders of magnitude [4,28]. This may explain the biphasic effects on LNCaP cell proliferation observed in Fig. 1B and C. The lack of stimulation of cell proliferation by aloisine A, aminopurvalanol olomoucine and roscovitine within the tested concentration range is consistent with their considerably weaker inhibitory effect on GSK-3 β than CDKs [3]. Statistically significant linear correlations were observed between IC_{50} values of the indirubin derivatives for GSK-3 β inhibition [3,29] and the fold increase of either basal cell proliferation ($r = 0.750$; $p = 0.0053$; $n = 8$)

or basal PSA mRNA expression ($r = 0.868$; $p = 0.033$; $n = 8$) by $0.3 \mu\text{M}$ of these compounds; no significant correlations were observed between these androgenic responses and IC_{50} values for inhibition of CDK1 [24,29] ($p > 0.5$). These findings further support a role for the GSK-3 β / β -catenin pathway in the pro-androgenic responses of indirubin derivatives that have potent GSK-3 β inhibitory activities.

To our knowledge this is the first report of the strong accumulation of nuclear β -catenin caused by flutamide. Flutamide also reduced the degradable p- β -catenin-Ser33/37 form in the cytoplasm. Nevertheless, flutamide blocks androgen-dependent cell proliferation and does not have inherent cell proliferative effects in the absence of androgens. One possible explanation could be that if flutamide effectively blocks nuclear AR accumulation, nuclear β -catenin is less capable of exerting its effects because it would not be co-localised with sufficient quantities of AR. The co-localisation of AR and β -catenin appears to be important for AR-dependent cell proliferation in prostate cancer even in the absence of androgens [30]. The mechanism(s) by which flutamide, and possibly other androgen receptor antagonists, such as its potent derivative 4-hydroxyflutamide, increase nuclear β -catenin ask for further detailed studies.

In conclusion, several indirubin derivatives caused pro-androgenic and proliferative effects in LNCaP human prostate cancer cells. The mechanisms of action appear to involve both AR activation (possibly ligand-dependent) and inhibition of GSK-3 β resulting in nuclear β -catenin accumulation. Although indirubin derivatives are effective inducers of apoptosis in cancer cells, it is clear that at least in the case of the prostate, concentrations need to be sufficiently high for androgen-dependent prostate cancer growth to be arrested; if not, it may, in fact, be stimulated.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

We are grateful to Laurent Meijer for providing us with the indirubin derivatives and helpful suggestions on the manuscript. This work was funded by a Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) Discovery grant (no. 313313-2005) to Thomas Sanderson, a Foundation Armand-Frappier (FAF) bursary to Patricia Rivest and NSERC and FAF student bursaries to Martin Renaud.

References

- [1] L. Meijer, A.L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X.P. Ryan, C.A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S.M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins, *Chem. Biol.* 10 (12) (2003) 1255–1266.
- [2] P. Friedlander, Über den Farbstoff des antiken Purpurs aus *Murex brandaris*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 42 (1909) 765–770.
- [3] L. Meijer, M. Flajolet, P. Greengard, Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (9) (2004) 471–480.
- [4] M. Knockaert, P. Greengard, L. Meijer, Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (9) (2002) 417–425.
- [5] V.D. Nair, C.W. Olanow, Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses, *J. Biol. Chem.* 283 (22) (2008) 15469–15478.
- [6] S. Libnow, K. Methling, M. Hein, D. Michalik, M. Harms, K. Wende, A. Flemming, M. Kockerling, H. Reinke, P.J. Bednarski, M. Lalk, P. Langer, Synthesis of indirubin-N-glycosides and their anti-proliferative activity against human cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (10) (2008) 5570–5583.
- [7] S. Nam, R. Buettner, J. Turkson, D. Kim, J.Q. Cheng, S. Muehlbeyer, F. Hippe, S. Vatter, K.H. Merz, G. Eisenbrand, R. Jove, Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (17) (2005) 5998–6003.
- [8] J. Shi, H.M. Shen, Critical role of Bid and Bax in Indirubin-3'-monoxime-induced apoptosis in human cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 75 (9) (2008) 1729–1742.
- [9] T. Lahusen, A. De Siervi, C. Kunick, A.M. Senderowicz, Alsterpaullone, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis by activation of caspase-

- 9 due to perturbation in mitochondrial membrane potential, *Mol. Carcinog.* 36 (4) (2003) 183–194.
- [10] C. Schultz, A. Link, M. Leost, D.W. Zaharevitz, R. Gussio, E.A. Sausville, L. Meijer, C. Kunick, Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity, *J. Med. Chem.* 42 (15) (1999) 2909–2919.
- [11] Z. Xiao, Y. Hao, B. Liu, L. Qian, Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China, *Leuk. Lymphoma* 43 (9) (2002) 1763–1768.
- [12] H. Murillo, H. Huang, L.J. Schmidt, D.J. Smith, D.J. Tindall, Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state, *Endocrinology* 142 (11) (2001) 4795–4805.
- [13] G.W. Yardy, S.F. Brewster, Wnt signalling and prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 8 (2) (2005) 119–126.
- [14] D.J. Mulholland, S. Dedhar, H. Wu, C.C. Nelson, PTEN and GSK3beta: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer, *Oncogene* 25 (3) (2006) 329–337.
- [15] X. Liao, J.B. Thrasher, J. Holzbeierlein, S. Stanley, B. Li, Glycogen synthase kinase-3beta activity is required for androgen-stimulated gene expression in prostate cancer, *Endocrinology* 145 (6) (2004) 2941–2949.
- [16] L. Wang, H.K. Lin, Y.C. Hu, S. Xie, L. Yang, C. Chang, Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells, *J. Biol. Chem.* 279 (31) (2004) 32444–32452.
- [17] G. Wang, J. Wang, M.D. Sadar, Crosstalk between the androgen receptor and beta-catenin in castrate-resistant prostate cancer, *Cancer Res.* 68 (23) (2008) 9918–9927.
- [18] Y. Li, Z. Wang, D. Kong, R. Li, S.H. Sarkar, F.H. Sarkar, Regulation of Akt/FOXO3a/GSK-3beta/AR signaling network by isoflavone in prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.* 283 (41) (2008) 27707–27716.
- [19] X. Yang, M.W. Chen, S. Terry, F. Vacherot, D.L. Bemis, J. Capodice, J. Kitajewski, A. de la Taille, M.C. Benson, Y. Guo, R. Buttyan, Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells, *Oncogene* 25 (24) (2006) 3436–3444.
- [20] D.J. Mulholland, S. Dedhar, G.A. Coetzee, C.C. Nelson, Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr. Rev.* 26 (7) (2005) 898–915.
- [21] C.I. Truica, S. Byers, E.P. Gelmann, Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity, *Cancer Res.* 60 (17) (2000) 4709–4713.
- [22] V.S. Wilson, K. Bobseine, C.R. Lambright, L.E. Gray Jr., A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists, *Toxicol. Sci.* 66 (1) (2002) 69–81.
- [23] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 271–277.
- [24] M. Leost, C. Schultz, A. Link, Y.Z. Wu, J. Biernat, E.M. Mandelkow, J.A. Bibb, G.L. Snyder, P. Greengard, D.W. Zaharevitz, R. Gussio, A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, C. Kunick, L. Meijer, Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25, *Eur. J. Biochem.* 267 (19) (2000) 5983–5994.
- [25] Q.M. Wang, C.J. Fiol, A.A. DePaoli-Roach, P.J. Roach, Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 269 (20) (1994) 14566–14574.
- [26] G.K. Schwartz, CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis, *Cell Cycle* 1 (2) (2002) 122–123.
- [27] C.J. Sherr, J.M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.* 13 (12) (1999) 1501–1512.
- [28] C. Kunick, K. Lauenroth, M. Leost, L. Meijer, T. Lemcke, 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2) (2004) 413–416.
- [29] M. Knockaert, M. Blondel, S. Bach, M. Leost, C. Elbi, G.L. Hager, S.R. Nagy, D. Han, M. Denison, M. Ffrench, X.P. Ryan, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, P. Greengard, L. Skaltsounis, L. Meijer, Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins, *Oncogene* 23 (25) (2004) 4400–4412.
- [30] L. Schweizer, C.A. Rizzo, T.E. Spires, J.S. Platero, Q. Wu, T.A. Lin, M.M. Gottdardis, R.M. Attar, The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens, *BMC Cell Biol.* 9 (2008) 4.

Annexe B

LPTA® CD-1-Tg (*Cyp19-luc*)-Xen



Light Producing Animal Models

These LPTA Animal Models are transgenic mice with a luciferase reporter driven by the promoter listed under the "Animal Model" heading. E-mail BusinessDev@caliperLS.com or call 508.497.6592 for current availability information.

Inflammation

Gadd45b (growth arrest & DNA damage inducible 45-Beta)	CD-1	Cancer – apoptosis; MAP kinase- and NF- κ B-mediated signaling pathways; inflammation
iNos or Nos2 (macrophage nitric oxide synthase)	FVB/N	Inflammation; sepsis
Epx* or Epo (eosinophil peroxidase)	FVB/N	Eosinophilia – parasitism or asthma; bone marrow transplantation
Saa1 (serum amyloid A-1)	BALB/C	Arthritis, amyloidosis, sepsis
IL-2 (interleukin-2)	CD1	Inflammation, cancer
Cox2 or Ptgs2 (cyclooxygenase-2)	BALB/C	Inflammation, pain
TNFα (tumor necrosis factor-alpha)	BALB/C	Inflammation – arthritis or inflammatory bowel disease; cancer – apoptosis; sepsis
NFκB-RE (NF κ B response elements)	BALB/C	Inflammation – arthritis or inflammatory bowel disease; cancer – apoptosis
NFκB-RE (Oslo) (NF κ B response elements)	BALB/C & DBA/1	Inflammation – arthritis or inflammatory bowel disease; cancer – apoptosis
IκBα ([inhibitor of NF κ B] α)	BALB/C	Inflammation – arthritis or inflammatory bowel disease; cancer – apoptosis; sepsis

Oncology/Angiogenesis

Animal Model	Background Strain	Applications
Vegfr2* (vascular endothelial growth factor receptor-2)	FVB/N	Inflammation; angiogenesis processes incl. embryonic or post-natal development, wound healing
Vegfr2-KI* (knock in) (vascular endothelial growth factor receptor-2)	C57/BL6 Albino & Outbred (nu/nu)	Cancer, inflammation; angiogenesis processes incl. embryonic or post-natal development, wound healing
Vegf* (vascular endothelial growth factor)	FVB/N	General angiogenesis reporter
EL1-luc/EL1-TAg (Elastase 1)	FVB/N	Spontaneous and bioluminescent pancreatic tumor model
LucRep (Cre-loxP dependent luciferase)	FVB/N	Enables bioluminescence imaging of other Cre-loxP dependent tumor models

Drug Metabolism / Toxicology

Animal Model	Background Strain	Applications
Ho1 or Hmox1 (heme oxygenase-1)	FVB/N	Hypoxia; heavy metal and chemical toxicity– CdCl ₂ , iron overload, or doxorubicin
CYP3A4 (cytochrome p450 isoform 3A-human promoter)	FVB/N	Drug metabolism; CYP3A4 gene regulation studies; CYP3A4-mediated drug-drug interactions
Cyp3a11* (cytochrome p450 isoform 3a-mouse promoter)	FVB/N	Drug metabolism; Cyp3a11-mediated drug-drug interactions
CYP3A4 RAT* (cytochrome p450, isoform 3A-human promoter)	SD RAT	Drug metabolism; CYP3A4 gene regulation studies; CYP3A4-mediated drug-drug interactions
Cyp1a2 (cytochrome p450, isoform 1a2-mouse promoter)	CD-1	Cyp1a2-mediated drug-drug interactions; toxicity
Cyp19 or Aro (aromatase)	CD-1	Estrogen synthesis; regulation of estrogen production
γGcs-h or Gclc (gamma-glutamylcysteine synthetase)	CD-1	Heavy metal and chemical toxicity – CdCl ₂ , chloroform, or MeHg; chemoprotection
Sod1 (superoxide dismutase)	CD-1	Toxicity including heavy metal and chemical – CdCl ₂
Mdr1 or Abcb1b (multiple drug resistance-1)	Mdr1	Drug transport
Gadd45α (growth arrest & DNA damage inducible 45-alpha)	CD-1	Toxicity – heavy metal and chemical
Gadd153 (growth arrest & DNA damage inducible 153)	CD-1	Toxicity – heavy metal and chemical

Endocrine Disruptor

Animal Model	Background Strain	Applications
Kap (kidney androgen regulated promoter)	FVB/N	Kap gene regulation; androgen regulation; endocrine disruption
pS2/TFF1 (trefoil peptide-1)	FVB/N	Inflammatory bowel disease; colitis; gastric ulcer
Mup1 (major urinary protein-1, or alpha-2u globulin)	FVB/N	Mup gene regulation; androgen regulation; endocrine disruption
Esr1 (estrogen receptor-alpha)	CD-1	Esr1 gene regulation studies

Metabolic Disease

Animal Model	Background Strain	Applications
RIP (rat insulin gene promoter)	FVB/N	Insulin production applications; pancreatic islet transplantation
Retn (resistin)	C57BL/6	Obesity – fasting, high-fat feeding, insulin resistance; obesity – adipose tissue transplantation
mIns2 (mouse insulin promoter)	C57BL/6	Insulin production changes studies resulting from fasting, high-fat feeding, streptozotocin treatment, or pancreatic islet transplantation

Other Disease Areas

Animal Model	Background Strain	Applications
CMV (cytomegalovirus promoter)	FVB/N	Tissue transplantation R&D studies
Bmp4 (bone morphogenetic protein-4)	FVB/N	Wound healing, estrogen modulation of gene expression
Gfap (glial fibrillary acidic protein)	FVB/N	Astrocyte regeneration (primarily CNS), including physical trauma, chemical insult, or meningitis
β-Actin (murine beta actin promoter)	FVB/N	Model may be used as donor animals for studying the transplantation of various tissue types
GAPDH (human Phosphoglyceraldehyde dehydrogenase promoter)	FVB/N	Model may be used as donor animals for studying the transplantation of various tissue types

* Listing Notes

All of the transgenic models are in MICE except for the CYP3A4 which has been developed in both mouse and RAT. The gene abbreviations presented are those most commonly used in NCBI locus link, GENBANK, the Mouse Genome Informatics database, and in the literature. In some cases two alternative abbreviations for the same gene are given. Most of the models consist of the mouse promoter driving the luciferase reporter. These are indicated with gene abbreviation in lower case other than the first letter that is capitalized. For a few of the transgenic models, the human promoter was used. Having the gene abbreviation in all upper case indicates the models using a human promoter.

Availability

Animals are available in limited numbers from our Taconic colonies, Xenogen Biosciences in Cranbury, New Jersey, or Xenogen Corporation in Alameda, California.

For LPTA* animal model lines CYP3a11, CYP3A4 rat, Epx, Vegfr2 and Vegf: these product lines and their use are claimed by pending U.S. and foreign patent applications owned by Xenogen Corporation.

LPTA* animal model lines contain a luciferase gene provided under a license from the Regents of the University of California and Promega Corporation. Under the terms of those licenses, the use of these products and derivatives thereof is strictly limited to that of a research reagent. No right to use these products for any diagnostic, therapeutic, or commercial application will be conveyed to the customer of these products.

In vivo imaging in mammals is covered by one or more U.S. and foreign patents controlled by Xenogen Corporation, including the following: U.S. patent numbers 6,649,143, 6,217,847, 5,650,135, 6,916,462, 6,890,515, and 6,908,605, and European Union patent number 0861093. A license from Xenogen Corporation is required to practice under these patents.



Corporate Headquarters
68 Elm Street
Hopkinton, MA 01748-1668
Tel: 1.508.435.9500
Email: cust.support@caliperLS.com
www.caliperLS.com



©2008 Caliper Life Sciences, Inc. All rights reserved.
Caliper, the Caliper logo, XENOGEN, IVIS, DLIT and
Living Image are tradenames and/or trademarks of
Caliper Life Sciences, Inc.

99
REA-DS-02 Jan08

Liste des references

- Ait-Aissa, S., S. Laskowski, N. Laville, J. M. Porcher and F. Brion (2010). "Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line." Toxicol In Vitro.
- Albanito, L., R. Lappano, A. Madeo, A. Chimento, E. R. Prossnitz, A. R. Cappello, V. Dolce, S. Abonante, V. Pezzi and M. Maggiolini (2008). "G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells." Environ Health Perspect **116**(12): 1648-1655.
- Anderson, E. and R. B. Clarke (2004). "Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium." J Mammary Gland Biol Neoplasia **9**(1): 3-13.
- Ankley, G. T., K. M. Jensen, E. J. Durhan, E. A. Makynen, B. C. Butterworth, M. D. Kahl, D. L. Villeneuve, A. Linnum, L. E. Gray, M. Cardon and V. S. Wilson (2005). "Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)." Toxicol Sci **86**(2): 300-308.
- Barenholz, Y. (2002). "Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts"." Prog Lipid Res **41**(1): 1-5.
- Baulieu, E. E. (1991). "[Mechanism of action of steroid hormones and anti-hormones: a mini-review on associated proteins not binding steroids]." C R Seances Soc Biol Fil **185**(6): 384-390.
- Baulieu, E. E. (1991). "Neurosteroids: a new function in the brain." Biol Cell **71**(1-2): 3-10.
- Benachour, N., S. Moslemi, H. Sipahutar and G. E. Seralini (2007). "Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination." Toxicol Appl Pharmacol **222**(2): 129-140.
- Bilinska, B., B. Wiszniewska, K. Kosiniak-Kamysz, M. Kotula-Balak, M. Gancarczyk, A. Hejmej, J. Sadowska, M. Marchlewicz, A. Kolasa and L. Wenda-Rozewicka (2006). "Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches." Reprod Biol **6 Suppl 1**: 43-58.
- Bird, I. M., N. A. Hanley, R. A. Word, J. M. Mathis, J. L. McCarthy, J. I. Mason and W. E. Rainey (1993). "Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for

- angiotensin-II-responsive aldosterone secretion." Endocrinology 133(4): 1555-1561.
- Blanchard, Y., S. Seenundun and B. Robaire (2007). "The promoter of the rat 5alpha-reductase type 1 gene is bidirectional and Sp1-dependent." Mol Cell Endocrinol 264(1-2): 171-183.
- Bloch, K. E. (1979). "Speculations on the evolution of sterol structure and function." CRC Crit Rev Biochem 7(1): 1-5.
- Blystone, C. R., C. S. Lambright, M. C. Cardon, J. Furr, C. V. Rider, P. C. Hartig, V. S. Wilson and L. E. Gray, Jr. (2009). "Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat." Toxicol Sci 111(1): 179-188.
- Bocher, M., T. Boldicke and F. Sasse (1993). "Cytotoxic effect of atrazine on murine B-lymphocytes in vitro." Sci Total Environ 132(2-3): 429-433.
- Brodie, A. M. and V. C. Njar (1998). "Aromatase inhibitors in advanced breast cancer: mechanism of action and clinical implications." J Steroid Biochem Mol Biol 66(1-2): 1-10.
- Bulun, S. E., D. Chen, M. Lu, H. Zhao, Y. Cheng, M. Demura, B. Yilmaz, R. Martin, H. Utsunomiya, S. Thung, E. Su, E. Marsh, A. Hakim, P. Yin, H. Ishikawa, S. Amin, G. Imir, B. Gurates, E. Attar, S. Reierstad, J. Innes and Z. Lin (2007). "Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary." J Steroid Biochem Mol Biol 106(1-5): 81-96.
- Bulun, S. E., Z. Lin, H. Zhao, M. Lu, S. Amin, S. Reierstad and D. Chen (2009). "Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue." Ann N Y Acad Sci 1155: 121-131.
- Bulun, S. E., S. Sebastian, K. Takayama, T. Suzuki, H. Sasano and M. Shozu (2003). "The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters." J Steroid Biochem Mol Biol 86(3-5): 219-224.
- Carruba, G. (2006). "Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression." Ann N Y Acad Sci 1089: 201-217.
- Casas, E., E. Bonilla, Y. Ducolomb and M. Betancourt (2010). "Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro." Toxicol In Vitro 24(1): 224-230.

- Chang, W. Y. and G. S. Prins (1999). "Estrogen receptor-beta: implications for the prostate gland." Prostate **40**(2): 115-124.
- Chen, D., S. Reierstad, Z. Lin, M. Lu, C. Brooks, N. Li, J. Innes and S. E. Bulun (2007). "Prostaglandin E(2) induces breast cancer related aromatase promoters via activation of p38 and c-Jun NH(2)-terminal kinase in adipose fibroblasts." Cancer Res **67**(18): 8914-8922.
- Chen, G. G., Q. Zeng and G. M. Tse (2008). "Estrogen and its receptors in cancer." Med Res Rev **28**(6): 954-974.
- Ciolino, H. P., Z. Dai and V. Nair (2010). "Retinol inhibits aromatase activity and expression in vitro." J Nutr Biochem.
- Clarke, R. B., E. Anderson and A. Howell (2004). "Steroid receptors in human breast cancer." Trends Endocrinol Metab **15**(7): 316-323.
- Clement, M. J., K. Rathinasamy, E. Adjadj, F. Toma, P. A. Curmi and D. Panda (2008). "Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin." Biochemistry **47**(49): 13016-13025.
- Clement, T. M., M. I. Savenkova, M. Settles, M. D. Anway and M. K. Skinner (2010). "Alterations in the developing testis transcriptome following embryonic vinclozolin exposure." Reprod Toxicol **30**(3): 353-364.
- Connor, K., J. Howell, I. Chen, H. Liu, K. Berhane, C. Sciarretta, S. Safe and T. Zacharewski (1996). "Failure of chloro-S-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated responses in vivo and in vitro." Fundam Appl Toxicol **30**(1): 93-101.
- Cooper, G. S., F. W. Miller and J. P. Pandey (1999). "The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research." Environ Health Perspect **107 Suppl 5**: 693-700.
- Cowin, P. A., E. Gold, J. Aleksova, M. K. O'Bryan, P. M. Foster, H. S. Scott and G. P. Risbridger (2010). "Vinclozolin exposure in utero induces postpubertal prostatitis and reduces sperm production via a reversible hormone-regulated mechanism." Endocrinology **151**(2): 783-792.
- Cummings, A. M., B. E. Rhodes and R. L. Cooper (2000). "Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in 4 strains of rats." Toxicol Sci **58**(1): 135-143.
- Deep, G., S. C. Gangar, N. H. Oberlies, D. J. Kroll and R. Agarwal (2010). "Isosilybin A induces apoptosis in human prostate cancer cells via targeting Akt, NF-kappaB, and androgen receptor signaling." Mol Carcinog **49**(10): 902-912.

- Demura, M., S. Reierstad, J. E. Innes and S. E. Bulun (2008). "Novel promoter I.8 and promoter usage in the CYP19 (Aromatase) gene." Reprod Sci 15(10): 1044-1053.
- Diel, P. (2002). "Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms." Toxicol Lett 127(1-3): 217-224.
- Eick, G. N. and J. W. Thornton (2010). "Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor." Mol Cell Endocrinol.
- Ellem, S. J. and G. P. Risbridger (2006). "Aromatase and prostate cancer." Minerva Endocrinol 31(1): 1-12.
- Eustache, F., F. Mondon, M. C. Canivenc-Lavier, C. Lesaffre, Y. Fulla, R. Berges, J. P. Cravedi, D. Vaiman and J. Auger (2009). "Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility." Environ Health Perspect 117(8): 1272-1279.
- Fagan, D. H. and D. Yee (2008). "Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia 13(4): 423-429.
- Filipov, N. M., M. A. Stewart, R. L. Carr and S. C. Sistrunk (2007). "Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices." Toxicology 232(1-2): 68-78.
- Flores, O. and K. L. Burnstein (2010). "GADD45 {gamma}: a New Vitamin D-Regulated Gene that Is Antiproliferative in Prostate Cancer Cells." Endocrinology.
- Fowler, A. M. and E. T. Alarid (2007). "Amping up estrogen receptors in breast cancer." Breast Cancer Res 9(4): 305.
- Fox, E. M., R. J. Davis and M. A. Shupnik (2008). "ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector?" Steroids 73(11): 1039-1051.
- Galikova, M., P. Klepsatel, G. Senti and T. Flatt (2010). "Steroid hormone regulation of *C. elegans* and *Drosophila* aging and life history." Exp Gerontol.
- Garcia-Segura, L. M. (2008). "Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore." J Neuroendocrinol 20(6): 705-712.
- Gardiner, J. A., J. J. Kirkland, H. L. Klopping and H. Sherman (1974). "Fate of benomyl in animals." J Agric Food Chem 22(3): 419-427.
- Gazdar, A. F., H. K. Oie, C. H. Shackleton, T. R. Chen, T. J. Triche, C. E. Myers, G. P. Chrousos, M. F. Brennan, C. A. Stein and R. V. La Rocca (1990). "Establishment

- and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis." Cancer Res **50**(17): 5488-5496.
- Gibas, Z., R. Becher, E. Kawinski, J. Horoszewicz and A. A. Sandberg (1984). "A high-resolution study of chromosome changes in a human prostatic carcinoma cell line (LNCaP)." Cancer Genet Cytogenet **11**(4): 399-404.
- Gooren, L. J., F. Saad, A. Haide and A. Yassin (2008). "Decline of plasma 5alpha-dihydrotestosterone (DHT) levels upon testosterone administration to elderly men with subnormal plasma testosterone and high DHT levels." Andrologia **40**(5): 298-302.
- Hastings, J. W. (1983). "Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems." J Mol Evol **19**(5): 309-321.
- Hayes, T. B., V. Khoury, A. Narayan, M. Nazir, A. Park, T. Brown, L. Adame, E. Chan, D. Buchholz, T. Stueve and S. Gallipeau (2010). "Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*)." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(10): 4612-4617.
- Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner and J. A. Gustafsson (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.
- Hershberger, L. G., E. G. Shipley and R. K. Meyer (1953). "Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method." Proc Soc Exp Biol Med **83**(1): 175-180.
- Hessel, P. A., R. Kalmes, T. J. Smith, E. Lau, P. J. Mink and J. Mandel (2004). "A nested case-control study of prostate cancer and atrazine exposure." J Occup Environ Med **46**(4): 379-385.
- Hewitt, M. J., P. Mutch and M. K. Pratten (2005). "Potential teratogenic effects of benomyl in rat embryos cultured in vitro." Reprod Toxicol **20**(2): 271-280.
- Hoffmann, F. and W. Kloas (2010). "An environmentally relevant endocrine-disrupting antiandrogen, vinclozolin, affects calling behavior of male *Xenopus laevis*." Horm Behav **58**(4): 653-659.
- Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, E. Kawinski, J. P. Karr, H. Rosenthal, T. M. Chu, E. A. Mirand and G. P. Murphy (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." Cancer Res **43**(4): 1809-1818.
- Imir, A. G., Z. Lin, P. Yin, S. Deb, B. Yilmaz, M. Cetin, A. Cetin and S. E. Bulun (2007). "Aromatase expression in uterine leiomyomata is regulated primarily by proximal promoters I.3/II." J Clin Endocrinol Metab **92**(5): 1979-1982.

- Inawaka, K., M. Kawabe, S. Takahashi, Y. Doi, Y. Tomigahara, H. Tarui, J. Abe, S. Kawamura and T. Shirai (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." Toxicol Appl Pharmacol **237**(2): 178-187.
- Kazmierczak, W., P. Skalba, A. Dabkowska-Huc and A. Samojedny (2006). "Expression of aromatase and 5-alpha-reductase genes in endometrial adenocarcinoma." Pathol Res Pract **202**(11): 789-791.
- Kelce, W. R., E. Monosson, M. P. Gamcsik, S. C. Laws and L. E. Gray, Jr. (1994). "Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites." Toxicol Appl Pharmacol **126**(2): 276-285.
- Kelce, W. R. and E. M. Wilson (1997). "Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications." J Mol Med **75**(3): 198-207.
- Khalaf, M., H. Mitre, J. Levallet, V. Hanoux, C. Denoual, M. Herlicoviez, P. J. Bonnamy and A. Benhaim (2010). "GnRH agonist and GnRH antagonist protocols in ovarian stimulation: differential regulation pathway of aromatase expression in human granulosa cells." Reprod Biomed Online **21**(1): 56-65.
- Kilmartin, J. V. (1981). "Purification of yeast tubulin by self-assembly in vitro." Biochemistry **20**(12): 3629-3633.
- Kim, D. J., S. H. Seok, M. W. Baek, H. Y. Lee, Y. R. Na, S. H. Park, H. K. Lee, N. K. Dutta, K. Kawakami and J. H. Park (2009). "Benomyl induction of brain aromatase and toxic effects in the zebrafish embryo." J Appl Toxicol **29**(4): 289-294.
- Kim, H. J., Y. I. Park and M. S. Dong (2006). "Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays." Toxicol In Vitro **20**(7): 1159-1167.
- Kjaerstad, M. B., C. Taxvig, H. R. Andersen and C. Nellemann (2010). "Mixture effects of endocrine disrupting compounds in vitro." Int J Androl **33**(2): 425-433.
- Kniewald, J., M. Jakominic, A. Tomljenovic, B. Simic, P. Romac, D. Vranesic and Z. Kniewald (2000). "Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine." J Appl Toxicol **20**(1): 61-68.
- Laing, L., M. G. Smith, K. C. Calman, D. C. Smith and R. E. Leake (1977). "Nuclear oestrogen receptors and treatment of breast cancer." Lancet **2**(8030): 168-169.

- Lambard, S., D. Silandre, C. Delalande, I. Denis-Galeraud, S. Bourguiba and S. Carreau (2005). "Aromatase in testis: expression and role in male reproduction." J Steroid Biochem Mol Biol **95**(1-5): 63-69.
- Laryea, D., J. Gullbo, A. Isaksson, R. Larsson and P. Nygren (2010). "Characterization of the cytotoxic properties of the benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, in human tumour cell lines and primary cultures of patient tumour cells." Anticancer Drugs **21**(1): 33-42.
- Leder, B. Z., C. Longcope, D. H. Catlin, B. Ahrens, D. A. Schoenfeld and J. S. Finkelstein (2000). "Oral androstenedione administration and serum testosterone concentrations in young men." JAMA **283**(6): 779-782.
- Lephart, E. D., T. D. Lund and T. L. Horvath (2001). "Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 25-37.
- Letcher, R. J., I. van Holsteijn, H. J. Drenth, R. J. Norstrom, A. Bergman, S. Safe, R. Pieters and M. van den Berg (1999). "Cytotoxicity and aromatase (CYP19) activity modulation by organochlorines in human placental JEG-3 and JAR choriocarcinoma cells." Toxicol Appl Pharmacol **160**(1): 10-20.
- Levin, E. R. (2010). "Minireview: Extranuclear Steroid Receptors: Roles in Modulation of Cell Functions." Mol Endocrinol.
- Lim, J. and M. G. Miller (1997). "The role of the benomyl metabolite carbendazim in benomyl-induced testicular toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **142**(2): 401-410.
- Livingstone, D. E., G. C. Jones, K. Smith, P. M. Jamieson, R. Andrew, C. J. Kenyon and B. R. Walker (2000). "Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats." Endocrinology **141**(2): 560-563.
- Lo, S., I. King, A. Allera and D. Klingmuller (2007). "Effects of various pesticides on human 5alpha-reductase activity in prostate and LNCaP cells." Toxicol In Vitro **21**(3): 502-508.
- Lorenzetti, S., D. Marcoccia, L. Narciso and A. Mantovani (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.
- Lu, M., D. Chen, Z. Lin, S. Reierstad, A. M. Trauernicht, T. G. Boyer and S. E. Bulun (2006). "BRCA1 negatively regulates the cancer-associated aromatase promoters

- I.3 and II in breast adipose fibroblasts and malignant epithelial cells." J Clin Endocrinol Metab **91**(11): 4514-4519.
- Lyons, S. K., E. Lim, A. O. Clermont, J. Dusich, L. Zhu, K. D. Campbell, R. J. Coffee, D. S. Grass, J. Hunter, T. Purchio and D. Jenkins (2006). "Noninvasive bioluminescence imaging of normal and spontaneously transformed prostate tissue in mice." Cancer Res **66**(9): 4701-4707.
- McCarroll, N. E., A. Protzel, Y. Ioannou, H. F. Frank Stack, M. A. Jackson, M. D. Waters and K. L. Dearfield (2002). "A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim." Mutat Res **512**(1): 1-35.
- McLachlan, J. A., E. Simpson and M. Martin (2006). "Endocrine disrupters and female reproductive health." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **20**(1): 63-75.
- McMullin, T. S., M. E. Andersen, A. Nagahara, T. D. Lund, T. Pak, R. J. Handa and W. H. Hanneman (2004). "Evidence that atrazine and diaminochlorotriazine inhibit the estrogen/progesterone induced surge of luteinizing hormone in female Sprague-Dawley rats without changing estrogen receptor action." Toxicol Sci **79**(2): 278-286.
- Melcangi, R. C., A. Poletti, I. Cavarretta, F. Celotti, A. Colciago, V. Magnaghi, M. Motta, P. Negri-Cesi and L. Martini (1998). "The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control." J Steroid Biochem Mol Biol **65**(1-6): 295-299.
- Mendelson, C. R., B. Jiang, J. M. Shelton, J. A. Richardson and M. M. Hinshelwood (2005). "Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary." J Steroid Biochem Mol Biol **95**(1-5): 25-33.
- Mendelson, C. R. and A. Kamat (2007). "Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta." J Steroid Biochem Mol Biol **106**(1-5): 62-70.
- Miao, L., J. Shi, C. Y. Wang, Y. Zhu, X. Du, H. Jiao, Z. Mo, H. Klocker, C. Lee and J. Zhang (2010). "Estrogen receptor-related receptor alpha mediates up-regulation of aromatase expression by prostaglandin E2 in prostate stromal cells." Mol Endocrinol **24**(6): 1175-1186.
- Mo, Q., S. F. Lu and N. G. Simon (2006). "Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity." J Steroid Biochem Mol Biol **99**(1): 50-58.
- Mooradian, A. D., J. E. Morley and S. G. Korenman (1987). "Biological actions of androgens." Endocr Rev **8**(1): 1-28.

- Morinaga, H., T. Yanase, M. Nomura, T. Okabe, K. Goto, N. Harada and H. Nawata (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.
- Notelovitz, M. (2002). "Androgen effects on bone and muscle." Fertil Steril **77 Suppl 4**: S34-41.
- O'Connor, P., M. Manjarrez and S. E. Smith (2009). "The fate and efficacy of benomyl applied to field soils to suppress activity of arbuscular mycorrhizal fungi." Can J Microbiol **55**(7): 901-904.
- Ohno, K., N. Araki, T. Yanase, H. Nawata and M. Iida (2004). "A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA." Toxicol Sci **82**(2): 443-450.
- Pepe, G. J. and E. D. Albrecht (1999). "Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy." Steroids **64**(9): 624-627.
- Pinchuk, L. M., S. R. Lee and N. M. Filipov (2007). "In vitro atrazine exposure affects the phenotypic and functional maturation of dendritic cells." Toxicol Appl Pharmacol **223**(3): 206-217.
- Poletti, A., A. Coscarella, P. Negri-Cesi, A. Colciago, F. Celotti and L. Martini (1998). "5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system." Steroids **63**(5-6): 246-251.
- Potocnik, I., J. Vukojevic, M. Stajic, E. Rekanovic, S. Miliijasevic, B. Todorovic and M. Stepanovic (2009). "In vitro toxicity of selected fungicides from the groups of benzimidazoles and demethylation inhibitors to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*." J Environ Sci Health B **44**(4): 365-370.
- Rainey, W. E., I. M. Bird and J. I. Mason (1994). "The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies." Mol Cell Endocrinol **100**(1-2): 45-50.
- Rainey, W. E., I. M. Bird, C. Sawetawan, N. A. Hanley, J. L. McCarthy, E. A. McGee, R. Wester and J. I. Mason (1993). "Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids." J Clin Endocrinol Metab **77**(3): 731-737.
- Randall, V. A., N. A. Hibberts, M. J. Thornton, K. Hamada, A. E. Merrick, S. Kato, T. J. Jenner, I. De Oliveira and A. G. Messenger (2000). "The hair follicle: a paradoxical androgen target organ." Horm Res **54**(5-6): 243-250.

- Rathinasamy, K. and D. Panda (2006). "Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells." FEBS J **273**(17): 4114-4128.
- Richards, J. A. and R. W. Brueggemeier (2003). "Prostaglandin E2 regulates aromatase activity and expression in human adipose stromal cells via two distinct receptor subtypes." J Clin Endocrinol Metab **88**(6): 2810-2816.
- Rivest, P., M. Renaud and J. Thomas Sanderson (2010). "Proliferative and androgenic effects of indirubin derivatives in LNCaP human prostate cancer cells at sub-apoptotic concentrations." Chem Biol Interact.
- Rohr, J. R. and K. A. McCoy (2010). "A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians." Environ Health Perspect **118**(1): 20-32.
- Roy, J. R., S. Chakraborty and T. R. Chakraborty (2009). "Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review." Med Sci Monit **15**(6): RA137-145.
- Russell, D. W. and J. D. Wilson (1994). "Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes." Annu Rev Biochem **63**: 25-61.
- Sanderson, J. T. (2006). "The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals." Toxicol Sci **94**(1): 3-21.
- Sanderson, J. T., J. Boerma, G. W. Lansbergen and M. van den Berg (2002). "Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells." Toxicol Appl Pharmacol **182**(1): 44-54.
- Sanderson, J. T., R. J. Letcher, M. Heneweer, J. P. Giesy and M. van den Berg (2001). "Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes." Environ Health Perspect **109**(10): 1027-1031.
- Sanderson, J. T., W. Seinen, J. P. Giesy and M. van den Berg (2000). "2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity?" Toxicol Sci **54**(1): 121-127.
- Sebastian, S., K. Takayama, M. Shozu and S. E. Bulun (2002). "Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue." Mol Endocrinol **16**(10): 2243-2254.

- Sierra-Santoyo, A., H. A. Barton and M. F. Hughes (2004). "Liquid chromatography determination of the anti-androgen vinclozolin and its metabolites in rat serum." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **809**(1): 105-110.
- Simpson, E. R. (2000). "Role of aromatase in sex steroid action." J Mol Endocrinol **25**(2): 149-156.
- Singh, R. R. and R. Kumar (2005). "Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis." J Cell Biochem **96**(3): 490-505.
- Smith, E. P., J. Boyd, G. R. Frank, H. Takahashi, R. M. Cohen, B. Specker, T. C. Williams, D. B. Lubahn and K. S. Korach (1994). "Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man." N Engl J Med **331**(16): 1056-1061.
- Smolinsky, A. N., J. M. Doughman, L. T. Kratzke and C. S. Lassiter (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.
- Solomon, K. R., J. A. Carr, L. H. Du Preez, J. P. Giesy, R. J. Kendall, E. E. Smith and G. J. Van Der Kraak (2008). "Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review." Crit Rev Toxicol **38**(9): 721-772.
- Son, H. J., K. Shahan, M. Rodriguez, E. Derman and F. Costantini (1991). "Identification of an enhancer required for the expression of a mouse major urinary protein gene in the submaxillary gland." Mol Cell Biol **11**(8): 4244-4252.
- Song, R. X., P. Fan, W. Yue, Y. Chen and R. J. Santen (2006). "Role of receptor complexes in the extranuclear actions of estrogen receptor alpha in breast cancer." Endocr Relat Cancer **13 Suppl 1**: S3-13.
- Sorour, J. and O. Larink (2001). "Toxic effects of benomyl on the ultrastructure during spermatogenesis of the earthworm *Eisenia fetida*." Ecotoxicol Environ Saf **50**(3): 180-188.
- Staels, B., D. W. Hum and W. L. Miller (1993). "Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal." Mol Endocrinol **7**(3): 423-433.
- Stocco, C. (2008). "Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation." Steroids **73**(5): 473-487.
- Stoker, T. E., D. L. Guidici, S. C. Laws and R. L. Cooper (2002). "The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat." Toxicol Sci **67**(2): 198-206.

- Stoker, T. E., S. C. Laws, D. L. Guidici and R. L. Cooper (2000). "The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function." Toxicol Sci **58**(1): 50-59.
- Strom, A., J. Hartman, J. S. Foster, S. Kietz, J. Wimalasena and J. A. Gustafsson (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1566-1571.
- Suzawa, M. and H. A. Ingraham (2008). "The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells." PLoS One **3**(5): e2117.
- Tennant, M. K., D. S. Hill, J. C. Eldridge, L. T. Wetzel, C. B. Breckenridge and J. T. Stevens (1994). "Possible antiestrogenic properties of chloro-s-triazines in rat uterus." J Toxicol Environ Health **43**(2): 183-196.
- Thomas, L. N., R. C. Douglas, C. B. Lazier, C. K. Too, R. S. Rittmaster and D. J. Tindall (2008). "Type 1 and type 2 5alpha-reductase expression in the development and progression of prostate cancer." Eur Urol **53**(2): 244-252.
- Thomas, L. N., R. C. Douglas, R. S. Rittmaster and C. K. Too (2009). "Overexpression of 5 alpha-reductase type 1 increases sensitivity of prostate cancer cells to low concentrations of testosterone." Prostate **69**(6): 595-602.
- Toorians, A. W., S. Kelleher, L. J. Gooren, M. Jimenez and D. J. Handelsman (2003). "Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5207-5211.
- Tornavaca, O., G. Pascual, M. L. Barreiro, M. T. Grande, A. Carretero, M. Riera, E. Garcia-Arumi, B. Bardaji, M. Gonzalez-Nunez, M. A. Montero, J. M. Lopez-Novoa and A. Meseguer (2009). "Kidney androgen-regulated protein transgenic mice show hypertension and renal alterations mediated by oxidative stress." Circulation **119**(14): 1908-1917.
- van Steenbrugge, G. J., M. Groen, J. W. van Dongen, J. Bolt, H. van der Korput, J. Trapman, M. Hasenson and J. Horoszewicz (1989). "The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivatives. An overview." Urol Res **17**(2): 71-77.
- Wadas, B. C., C. A. Hartshorn, E. R. Aurand, J. S. Palmer, C. E. Roselli, M. L. Noel, A. C. Gore, D. N. Veeramachaneni and S. A. Tobet (2010). "Prenatal exposure to vinclozolin disrupts selective aspects of the gonadotrophin-releasing hormone neuronal system of the rabbit." J Neuroendocrinol **22**(6): 518-526.

- Wang, Y., J. I. Kreisberg and P. M. Ghosh (2007). "Cross-talk between the androgen receptor and the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in prostate cancer." Current Cancer Drug Targets 7(6): 591-604.
- Wetzel, L. T., L. G. Luempert, 3rd, C. B. Breckenridge, M. O. Tisdell, J. T. Stevens, A. K. Thakur, P. J. Extrom and J. C. Eldridge (1994). "Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats." J Toxicol Environ Health 43(2): 169-182.
- Wilson, J. D. (1999). "The role of androgens in male gender role behavior." Endocr Rev 20(5): 726-737.
- Wilson, J. D. (2001). "The role of 5alpha-reduction in steroid hormone physiology." Reprod Fertil Dev 13(7-8): 673-678.
- Wong, C., W. R. Kelce, M. Sar and E. M. Wilson (1995). "Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide." J Biol Chem 270(34): 19998-20003.
- Xu, Y., S. L. Dalrymple, R. E. Becker, S. R. Denmeade and J. T. Isaacs (2006). "Pharmacologic basis for the enhanced efficacy of dutasteride against prostatic cancers." Clin Cancer Res 12(13): 4072-4079.
- Yamada, T., T. Kunimatsu, K. Miyata, S. Yabushita, T. Sukata, S. Kawamura, T. Seki, Y. Okuno and N. Mikami (2004). "Enhanced rat Hershberger assay appears reliable for detection of not only (anti-)androgenic chemicals but also thyroid hormone modulators." Toxicol Sci 79(1): 64-74.
- Zhao, Y., V. R. Agarwal, C. R. Mendelson and E. R. Simpson (1996). "Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene." Endocrinology 137(12): 5739-5742.
- Zhou, Y., L. Jiang and L. Rui (2009). "Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice." J Biol Chem 284(17): 11152-11159.
- Zouboulis, C. C., W. C. Chen, M. J. Thornton, K. Qin and R. Rosenfield (2007). "Sexual hormones in human skin." Horm Metab Res 39(2): 85-95.