

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

**DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES CELLULAIRES POUR LA  
 DÉTECTION DE LA PERTURBATION PROMOTEUR-SPÉCIFIQUE DE  
 L'AROMATASE (CYP19) CHEZ L'HUMAIN PAR DES PESTICIDES  
 NÉONICOTINOÏDES**

Par  
Élyse Caron-Beaudoin

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
*Philosophiae doctor* (Ph.D.)  
en biologie

DÉPÔT FINAL : 6 DÉCEMBRE 2017

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Géraldine Delbès  
INRS Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Michèle Bouchard  
Département de santé  
environnementale et santé au travail  
Université de Montréal

Examineur externe

Jacques J. Tremblay  
Département d'obstétrique, gynécologie  
et reproduction  
Faculté de médecine  
Université Laval

Directeur de recherche

Thomas Sanderson  
INRS Institut Armand-Frappier



"We live in a scientific age, yet we assume that knowledge  
of science is the prerogative of only a small number  
of human beings, isolated and priestlike in their laboratories.  
This is not true. The materials of science are the materials of life itself.  
Science is part of the reality of living; it is the way, the how and the  
why for everything in our experience"

*Rachel Carson*

## REMERCIEMENTS

Cette thèse représente le fruit de cinq années de travail toujours passionnant. Bien que mon nom soit celui en page couverture, cette thèse est pour moi la représentation même du travail d'équipe. C'est grâce à l'implication, professionnelle ou personnelle, d'un bon nombre de personnes généreuses que je peux aujourd'hui être fière de ce document, qui, je l'espère, saura contribuer humblement à l'avancement de la toxicologie.

Je tiens tout d'abord à remercier Thomas Sanderson, mon directeur de thèse. Thomas Sanderson a été un directeur encourageant et rigoureux, tout en me laissant la liberté de recherche, un véritable cadeau tout au long de mon parcours doctoral. De mon directeur de recherche, j'ai ressenti un réel intérêt face à mes idées et propositions. Thomas Sanderson a su allier avec finesse juste ce qu'il faut d'encadrement, d'enseignement, d'encouragement et d'autonomie. En tant que jeune femme en science, cette relation de collaboration et coopération avec mon directeur de recherche m'aura laissée avec une plus grande confiance en moi et je lui en serai toujours reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier toutes les femmes chercheuses qui m'ont beaucoup inspirée durant ces cinq années, par leur passion, rigueur scientifique et critique constructive. Particulièrement, je souhaite remercier chaleureusement Géraldine Delbès, non seulement pour son implication tout au long de ma thèse, mais aussi lors de projets de recherche connexes.

Une thèse comporte évidemment beaucoup de travail d'équipe. J'ai été choyée d'évoluer dans un laboratoire avec les équipes de Thomas Sanderson et Cathy Vaillancourt, où l'esprit de camaraderie a toujours été présent. Merci à tous mes collègues pour votre aide précieuse au laboratoire, tout spécialement lors de ma fraîche arrivée avec peu d'expérience en biologie moléculaire. Andrée-Anne Hudon Thibeault, Hélène Clabaut, Hossam Draz, Joey St-Pierre, Kathy Deroy, Rachel Viau, je ne vous souhaite que le meilleur pour la suite.

Je tiens également à remercier mes autres familles académiques, le centre de recherche TOXEN-UQAM dont je ne peux me résoudre à me séparer, et l'Institut de recherche en santé publique de l'Université de Montréal. Une pensée spéciale à Marc-André Verner qui a largement contribué à mon épanouissement professionnel des deux dernières années.

Le doctorat est une expérience épanouissante et parfois éprouvante. Lors de mes périodes de doute, j'ai toujours pu compter sur le support financier et moral, et l'amour inconditionnel de mes fans #1, mes parents. Ma mère, survivante d'un cancer du sein diagnostiqué au début de mon doctorat, a été ma plus grande inspiration et source de motivation. Par son courage et sa sensibilité, elle a sans équivoque ancré mon travail dans la réalité des patientes atteintes de cette maladie. Je sais que mon père ressent une grande fierté d'assister à l'aboutissement du doctorat de sa petite dernière. Je l'en remercie, mais je suis encore plus fière d'être la fille d'un homme aussi bon et sensible. Je remercie également mes sœurs de cœur, Marline et Émilie.

Je tiens aussi spécialement à remercier mes précieux et précieuses ami(e)s, qui ne m'ont pas harcelé avec cette phrase typique « alors, tu finis quand ta thèse? », paroxysme de l'angoisse de toute doctorante. Merci de votre compréhension lors des longues périodes où je n'étais pas une amie aussi présente que je désirais l'être : Marie-Ève, Marie-Michèle, Charles, Julie, Caro, cette année marque aussi nos 12 ans d'amitié! Un clin d'œil à mes ami(e)s en biologie, en particulier Alexandre et Maxime, pour votre intérêt et curiosité envers mon projet. Nos discussions m'ont inspirées plus que vous ne l'imaginez. Un merci tout spécial à ma complice en biologie depuis 2007, Bernice. Cette année concorde avec TON plus bel accomplissement, Léonard : je suis immensément fière de toi et d'être ton amie depuis tant d'années.

Enfin, je remercie mon partenaire et amoureux, Simon. Lors de cet ardu exercice d'écriture, tu as toujours été une source d'encouragements et de support indéfectible et ce, même lorsque j'étais à 4000 km de distance. Ton amour et ta grande patience ont éclairé les jours sombres. Merci pour ton ouverture, ta compréhension, ta sensibilité et nos discussions sur le sens des mots privilèges et responsabilités. Je suis chanceuse de partager ma vie avec toi.

Je tiens à souligner l'apport non négligeable du métabolisme impressionnant de la caféine, qui m'a permis de m'abreuver de cet élixir sans retenue lors de la rédaction de ma thèse. Je désire aussi verbaliser mon appréciation de la trame sonore d'Harry Potter qui a bercé l'ensemble de ma rédaction, le gangsta rap pour les parties plus relax, et le metal pour l'écriture ardue des analyses de résultats.

Je n'aurais pas pu me consacrer aussi intensément à ce projet sans le soutien financier de nombreux partenaires. Je tiens tout particulièrement à remercier la Fondation Universitaire Armand-Frappier et le Fonds de Recherche Québec-Nature et Technologies pour leurs

généreuses bourses de recherche, ainsi que le *California Breast Cancer Research Program*, la *Society of Toxicology* et la Société de Toxicologie du Canada pour leur appui et reconnaissance. Finalement, je désire mentionner que l'Institut Armand-Frappier, où cette recherche a été effectuée, est située sur le territoire ancestral traditionnel et non-cédé de la nation Mohawk (Kanien'keha :ka), et qu'une partie de ce document a été écrite sur le territoire visé par le traité n°8, territoire traditionnel du peuple Dane Za.

## RÉSUMÉ

L'aromatase (CYP19) est une enzyme clé de la synthèse des œstrogènes, dont le gène est exprimé de façon promoteur-spécifique. Dans la glande mammaire saine, *CYP19* est faiblement exprimé sous la régulation du promoteur I.4. Lors d'un cancer du sein hormono-dépendant, les fibroblastes entourant la tumeur expriment fortement *CYP19* via un changement d'utilisation des promoteurs (inhibition de l'activité du promoteur I.4 et augmentation de l'activité des promoteurs PII, I.3 et I.7). *CYP19* est aussi exprimé dans le placenta via les promoteurs I.1 et I.8. Pendant la grossesse, les œstrogènes sont nécessaires à la formation du syncytiotrophoblaste ainsi qu'au développement de la circulation sanguine utéro-placentaire. Une perturbation de la production d'œstrogènes pendant cette période est associée à certains problèmes de santé chez les nouveau-nés. Cependant, nous détenons peu d'informations sur l'effet des contaminants sur l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase. L'objectif de cette étude était de développer des modèles cellulaires afin de mesurer l'effet de pesticides largement utilisés, les néonicotinoïdes, sur l'expression promoteur-spécifique et l'activité de l'aromatase dans les contextes du cancer du sein et de la grossesse. Les objectifs spécifiques étaient de **1)** développer des méthodes RT-qPCR afin d'identifier les promoteurs impliqués dans l'expression de *CYP19* dans différentes lignées cellulaires (H295R, HUVEC, Hs578t, BeWo) ; **2)** mesurer l'expression promoteur-spécifique et l'activité catalytique de l'aromatase dans ces lignées cellulaires exposées à des néonicotinoïdes; **3)** identifier les voies de signalisation cellulaire impliquées dans le changement d'utilisation des promoteurs, et les effets des néonicotinoïdes sur ce phénomène dans un modèle de cancer du sein ; **4)** mesurer les effets des néonicotinoïdes sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle mimant la stéroïdogenèse fœto-placentaire. Toutes les lignées cellulaires et le modèle de co-culture ont été exposés pendant 24h à des inducteurs de l'expression de *CYP19* via différents promoteurs, ou à des concentrations de néonicotinoïdes semblables à celles retrouvées dans l'environnement et populations d'agriculteurs. Cette étude est la première à démontrer que le promoteur normal I.4, ainsi que les promoteurs « pro-cancers » PII, I.3 et I.7 de *CYP19* sont actifs dans les cellules Hs578t. De plus, l'activité des promoteurs PII, I.3 et I.7 dans les cellules Hs578t est en partie dépendante de l'activation de deux voies de signalisation VEGF (MAPK1/3 et PLC). L'exposition des cellules Hs578t à l'imidaclopride et au thiaclopride a résulté en un changement d'utilisation des promoteurs de *CYP19*, soit une inhibition de l'activité du promoteur I.4 au profit des promoteurs PII, I.3 et I.7, menant à une augmentation de l'activité de l'aromatase. Une exposition au thiaclopride et au thiaméthoxame dans les cellules H295R a également induit l'expression de *CYP19* via l'activité des promoteurs PII et I.3, ainsi que l'activité catalytique de l'aromatase. Dans le modèle fœto-placentaire, les trois néonicotinoïdes ont augmenté l'activité catalytique de l'aromatase et la production de  $17\beta$ -œstradiol et d'œstrone, mais ont inhibé la production d'œstriol par leur action sur l'enzyme CYP3A7. Cette étude démontre que des concentrations environnementales de néonicotinoïdes peuvent perturber l'expression promoteur-spécifique et l'activité catalytique de l'aromatase, ainsi que la production d'œstrogènes dans des modèles *in vitro* pertinents pour l'étude du cancer du sein et de la stéroïdogenèse par l'unité fœto-placentaire. Finalement, nous avons démontré que ces pesticides largement utilisés sont de potentiels perturbateurs endocriniens.

**Mots clés :** aromatase, expression promoteur-spécifique, œstrogènes, cancer du sein hormono-dépendant, unité fœto-placentaire, perturbateurs endocriniens, néonicotinoïdes, Hs578t, H295R.

## ABSTRACT

Aromatase (CYP19) is a key enzyme in the biosynthesis of estrogen and is expressed in a promoter-specific manner. In the healthy mammary gland, *CYP19* is expressed at low levels under the regulation of its I.4 promoter. In hormone-dependent breast cancer, fibroblasts surrounding the tumor express increased levels of *CYP19* due to a switch in promoter usage (decrease of I.4 promoter activity and an increase in the usage of the PII, I.3 and I.7-promoters of *CYP19*). *CYP19* is also highly expressed in the placenta under the regulation of the I.1 and I.8 promoters. During pregnancy, estrogen production is necessary to ensure the formation of the syncytiotrophoblast and the development of the utero-placental blood flow. Disruption of estrogen during pregnancy is associated with birth and pregnancy outcomes. Little is known about the effects of environmental chemicals on the promoter-specific expression of *CYP19*. The general aim of this thesis was to develop screening bioassays to measure effects of widely-used neonicotinoid insecticides on the promoter-specific expression and activity of aromatase in cellular models relevant to breast cancer and pregnancy. The specific objectives were to **1)** develop RT-qPCR methods to identify the promoters implicated in *CYP19* expression in various cellular models (H295R, HUVEC, Hs578t, BeWo); **2)** measure the promoter-specific expression and catalytic activity of aromatase in these cell lines exposed to widely-used neonicotinoids; **3)** identify the signalling pathways implicated in the switch of promoter usage, and the effects of neonicotinoids on this process in a breast cancer-relevant cellular model; **4)** measure the effects of neonicotinoids on aromatase catalytic activity and hormone production in a feto-placental co-culture model. All cell lines and co-culture model were exposed for 24h to inducers of specific *CYP19* promoters, or environmentally-relevant concentration of neonicotinoids. This study is the first to demonstrate that the normal I.4 promoter of *CYP19* as well as the breast cancer-relevant PII, I.3 and I.7 promoters are active in Hs578t cells. We found that the expression of *CYP19* via the PII, I.3 and I.7 promoters in Hs578t is, in part, dependent on the activation of two VEGF signaling pathways, those of mitogen activated protein kinase (MAPK) 1/3 and phospholipase C (PLC). Exposure of Hs578t cells to environmentally relevant concentrations of imidacloprid and thiacloprid resulted in a switch in promoter usage for *CYP19* expression, involving an inhibition of normal I.4 promoter activity, whereas PII, I.3 and I.7 promoter-derived *CYP19* expression was strongly increased, leading to overall induction of aromatase catalytic activity. We determined that thiacloprid and imidacloprid exerted their effects by inducing the MAPK 1/3 and/or PLC pathways. Thiacloprid and thiamethoxam also induced *CYP19* expression via PII and I.3 promoters, as well as aromatase catalytic activity in H295R cells. Thiacloprid, imidacloprid and thiamethoxam induced aromatase catalytic activity, as well as 17 $\beta$ -estradiol and estrone production in the feto-placental co-culture model. These neonicotinoids interestingly inhibited estrone production (estrogen uniquely produced during pregnancy) by potentially binding to the CYP3A7 enzyme. This research shows that environmentally-relevant concentrations of neonicotinoids can alter the promoter-specific expression of *CYP19*, its catalytic activity and estrogen production in *in vitro* models relevant to breast-cancer and feto-placental steroidogenesis. Overall, we have highlighted the endocrine disrupting potential of these widely-used insecticides.

**Key words:** aromatase, promoter-specific expression, estrogen, hormone-dependant breast cancer, feto-placental unit, endocrine disruptors, neonicotinoids, Hs578t, H295R



# TABLE DES MATIÈRES

<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>22</b>
1.1 LES ŒSTROGÈNES .....	22
1.1.1 Synthèse des œstrogènes .....	23
1.1.1.1 Chez les femmes pré et post-ménopausées.....	23
1.1.1.2 Chez les femmes enceintes.....	26
1.1.1.2.1 L'unité foeto-placentaire .....	28
1.1.1.2.2 Stéroïdogénèse par l'unité foeto-placentaire.....	28
1.1.2 L'aromatase.....	30
1.1.2.1 Enzyme clé de la biosynthèse des œstrogènes.....	30
1.1.2.2 Expression de l'aromatase chez les femmes pré et post-ménopausées .....	33
1.1.2.3 Expression de l'aromatase pendant la grossesse.....	35
1.1.3 Régulation de la synthèse des oestrogènes chez la femme.....	35
1.1.4 Mécanismes d'action des œstrogènes .....	37
1.1.5 Rôle des œstrogènes pendant la grossesse.....	41
1.2 CANCER DU SEIN.....	42
1.2.1 Développement mammaire et rôle des œstrogènes .....	42
1.2.2 Facteurs de risque .....	45
1.2.3 Le cancer du sein hormono-dépendant et les œstrogènes.....	46
1.2.4 Initiation, promotion et progression du cancer du sein.....	47
1.2.5 Interactions cellulaires dans le cancer du sein.....	48
1.2.6 L'aromatase et cancer du sein.....	50
1.3 PERTURBATEURS ENDOCRINIENS .....	54
1.3.1 Contaminants environnementaux et cancer du sein.....	54
1.3.2 Contaminants environnementaux et incidences sur la grossesse et le fœtus.....	56
1.3.3 Les pesticides néonicotinoïdes.....	58
1.3.3.1 Présence dans l'environnement .....	60
1.3.3.2 Exposition chez les populations humaines et effets comme perturbateurs endocriniens .....	61
1.4 MODELES D'ETUDE.....	63
1.4.1 Cancer du sein.....	63
1.4.2 Grossesse .....	65
1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....	66
1.5.1 Hypothèse .....	66
1.5.2 Objectifs.....	67
1.6 IMPORTANCE DU PROJET .....	69
1.6.1 Outils de détection existants .....	70

**CHAPITRE 2 : EFFECTS OF NEONICOTINOIDS ON PROMOTER-SPECIFIC EXPRESSION AND ACTIVITY OF AROMATASE (CYP19) IN HUMAN ADRENOCORTICAL CARCINOMA (H295R) AND PRIMARY UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL (HUVEC) CELLS .....72**

2.1	CONTRIBUTION DE L'ETUDIANTE ET DES CO-AUTEURS .....	73
2.2	RÉSUMÉ.....	73
2.3	ABSTRACT .....	75
2.4	INTRODUCTION .....	76
2.5	MATERIALS AND METHODS.....	78
2.5.1	<i>Pesticides</i> .....	78
2.5.2	<i>In vitro models</i> .....	78
2.5.3	<i>Cell culture</i> .....	79
2.5.4	<i>Cell viability</i> .....	79
2.5.5	<i>RNA isolation and amplification by quantitative RT-PCR</i> .....	80
2.5.6	<i>Aromatase catalytic activity</i> .....	84
2.5.7	<i>Statistical analysis</i> .....	84
2.6	RESULTS .....	85
2.6.1	<i>Effects of neonicotinoids on cell viability of H295R and primary HUVEC cells</i> .....	85
2.6.2	<i>Effects of atrazine and neonicotinoids on promoter-specific CYP19 expression in H295R cells</i> .....	87
2.6.3	<i>Effects of atrazine and neonicotinoids on promoter-specific CYP19 expression in HUVEC cells</i> .....	89
2.6.4	<i>Effects of atrazine and neonicotinoids on CYP19 catalytic activity in H295R and HUVEC cells</i> .....	91
2.7	DISCUSSION .....	93
2.7.1	<i>Effects of pesticides on the promoter-specific regulation of CYP19 in H295R cells</i> .....	93
2.7.2	<i>Effects of pesticides on the promoter-specific regulation of CYP19 in primary HUVEC cells</i> .....	96
2.7.3	<i>Relevance of disruption of promoter-specific CYP19 expression in health and disease</i> .....	97
2.8	CONCLUSIONS.....	98
2.9	FUNDING.....	99
2.10	ACKNOWLEDGEMENTS .....	99
2.11	BIBLIOGRAPHY .....	99

**CHAPITRE 3 : THE USE OF A UNIQUE FETOPLACENTAL STEROIDOGENESIS CO-CULTURE MODEL AS A SCREENING TOOL FOR ENDOCRINE DISRUPTORS: THE EFFECTS OF NEONICOTINOIDS ON AROMATASE ACTIVITY AND HORMONE PRODUCTION.....108**

3.1	CONTRIBUTION DE L'ETUDIANTE ET DES CO-AUTEURS .....	109
3.2	RÉSUMÉ.....	109
3.3	ABSTRACT .....	111
3.4	INTRODUCTION .....	112
3.5	MATERIAL AND METHODS .....	116

3.5.1	<i>Chemicals</i> .....	116
3.5.2	<i>Feto-placental co-culture</i> .....	116
3.5.3	<i>CYP19 catalytic activity</i> .....	117
3.5.4	<i>Hormone quantification</i> .....	118
3.5.5	<i>RNA isolation and quantitative RT-PCR</i> .....	118
3.5.6	<i>Statistical analysis</i> .....	120
3.6	RESULTS .....	120
3.6.1	<i>Effects of neonicotinoids on CYP19 catalytic activity</i> .....	120
3.6.2	<i>Effects of neonicotinoids on hormone production</i> .....	122
3.6.3	<i>Effects of neonicotinoids on mRNA levels of CYP3A7 and SULT2A</i> .....	125
3.7	DISCUSSION .....	128
3.7.1	<i>Fetoplacental co-culture as a screening tool for endocrine disrupting chemicals</i> .....	128
3.7.2	<i>Disruption of fetoplacental steroidogenesis by neonicotinoid insecticides</i> .....	129
3.7.3	<i>Possible metabolism of neonicotinoids by fetal CYP3A7</i> .....	131
3.7.4	<i>Implications for human health</i> .....	134
3.8	CONCLUSION .....	135
3.9	ACKNOWLEDGEMENTS .....	135
3.10	REFERENCES .....	136

**CHAPITRE 4 NEONICOTINOID PESTICIDES INDUCE A SWITCH IN PROMOTER-SPECIFIC AROMATASE (CYP19) EXPRESSION IN BREAST CANCER CELLS BY ACTIVATING THE VEGF SIGNALLING PATHWAY .....143**

4.1	CONTRIBUTION DE L'ETUDIANTE ET DES CO-AUTEURS .....	144
4.2	RÉSUMÉ.....	145
4.3	ABSTRACT .....	146
4.4	ACKNOWLEDGMENTS .....	147
4.5	INTRODUCTION .....	147
	<i>Background</i> .....	147
4.6	MATERIAL AND METHODS .....	151
4.6.1	<i>Reagents</i> .....	151
4.6.2	<i>Cell culture</i> .....	152
4.6.3	<i>Cell viability</i> .....	153
4.6.4	<i>RNA isolation and amplification by quantitative RT-PCR</i> .....	153
4.6.5	<i>Aromatase catalytic activity</i> .....	156
4.6.6	<i>Statistical analysis</i> .....	156
4.7	RESULTS .....	157
4.7.1	<i>Promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells</i> .....	157
4.7.2	<i>VEGF-mediated signalling pathways implicated in CYP19 expression in Hs578t cells</i> .....	159

4.7.3	<i>Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression of CYP19 in Hs578t cells</i> .....	161
4.7.4	<i>VEGF pathways implicated in promoter-switch of CYP19 expression in Hs578t cells exposed to neonicotinoids</i> .....	164
4.8	DISCUSSION .....	167
4.8.1	<i>Hs578t cells as a suitable model to study the promoter-specific expression of CYP19 in hormone-dependent breast cancer</i> .....	167
4.8.2	<i>Neonicotinoids induce a switch in CYP19 promoter usage in Hs578t cells</i> .....	169
4.8.3	<i>Limitations and perspectives</i> .....	170
4.9	CONCLUSION .....	171
4.10	REFERENCES .....	172
<b>CHAPITRE 5 CONCLUSION GENERALE .....</b>		<b>179</b>
5.1	COMPREHENSION DU CHANGEMENT D'UTILISATION DES PROMOTEURS DE L'AROMATASE : DEVELOPPEMENT DU MODELE CELLULAIRE Hs578T .....	179
5.2	PERTURBATION PROMOTEUR-SPECIFIQUE DE L'AROMATASE PAR LES NEONICOTINOÏDES .....	181
5.2.1	<i>Implication pour le cancer du sein</i> .....	181
5.2.1.1	Effets à faibles concentrations et courbes dose-réponse non-monotones .....	185
5.2.2	<i>Implication pour la grossesse</i> .....	187
5.3	PERSPECTIVES .....	191
5.3.1	<i>Modèle co-culture cancer du sein</i> .....	191
5.3.2	<i>Études d'affinité entre néonicotinoïdes et protéines</i> .....	194
5.4	RETOMBÉES DU PROJET .....	195
<b>CHAPITRE 6 REFERENCES GENERALES .....</b>		<b>197</b>
<b>ANNEXE 1: RESEARCH HIGHLIGHT .....</b>		<b>224</b>
A1.1	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE ET DES CO-AUTEURS .....	225
A1.2	RÉSUMÉ.....	225
A1.3	ABSTRACT .....	226
A1.4	RESEARCH HIGHLIGHT .....	227
A1.5	CONFLICTING INTERESTS .....	234
A1.6	ACKNOWLEDGMENTS .....	234
A1.7	REFERENCES.....	234
<b>ANNEXE 2 : EFFETS DE TROIS NEONICOTINOÏDES SUR L'ACTIVITE DU PROMOTEUR I.4 DE L'AROMATASE (CYP19) DANS DES CELLULES D'ADENOCARCINOMES DU SEIN (SKBR3) TRANSFECTÉES AVEC UN GENE RAPPORTEUR DE LUCIFÉRASE.....</b>		<b>239</b>
A2.1	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE.....	239
A2.2	INTRODUCTION.....	240

A2.3 MATRIELS ET METHODES .....	241
A2.4 RESULTATS .....	243
A2.5 DISCUSSION .....	244
A2.6 RÉFÉRENCES .....	246
<b>ANNEXE 3 : EFFETS DU GLYPHOSATE ET DE LA FORMULATION ROUNDUP SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'AROMATASE ET LA PRODUCTION HORMONALE DANS UN MODELE DE CO-CULTURE DE L'UNITE FŒTO-PLACENTAIRE .....</b>	<b>248</b>
A3.1 CONTRIBUTION DE L'ETUDIANTE .....	248
A3.2 INTRODUCTION .....	249
A3.3 MATRIELS ET METHODES .....	250
A3.4 RESULTATS .....	251
A3.5 DISCUSSION .....	254
A3.6 RÉFÉRENCES .....	257



# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : LES DIFFERENTS PROMOTEURS DE L'AROMATASE ACTIFS DE FAÇON TISSU-SPECIFIQUE. ADAPTE DE (BULUN <i>ET AL.</i> , 2005, DEMURA <i>ET AL.</i> , 2008).....	33
TABLEAU 1.2 : ESTIMATIF DU NOMBRE DE NOUVEAUX CAS EN 2017 DE CANCER DE LA PROSTATE, DU POUMON, DU COLON ET RECTUM, ET DU SEIN CHEZ LES HOMMES ET LES FEMMES AU CANADA .....	45
TABLEAU 1.3 : CARACTERISTIQUES, TISSU ET PATHOLOGIE DE PROVENANCE, TYPE CELLULAIRE ET EXPRESSION PROMOTEUR-SPECIFIQUE DE L'AROMATASE DANS TROIS LIGNEES CELLULAIRES SELECTIONNEES COMME MODELES PERTINENTS DANS LE CONTEXTE DU CANCER DU SEIN HORMONO-DEPENDANT .....	65
TABLEAU 1.4 : CARACTERISTIQUES, TISSU ET PATHOLOGIE DE PROVENANCE, TYPE CELLULAIRE ET EXPRESSION DE L'AROMATASE ET DE CYP3A7 DANS LES LIGNEES CELLULAIRES H295R ET BeWo FORMANT LE MODELE DE CO-CULTURE FŒTO-PLACENTAIRE, UTILISEE MODELE PERTINENT DANS LE CONTEXTE DE LA STEROÏDOGENESE PENDANT LA GROSSESSE .....	66
TABLEAU 5.1 RESULTATS PRINCIPAUX DE CETTE THESE PORTANT SUR L'ACTIVITE ET L'EXPRESSION PROMOTEUR-SPECIFIQUE DE L'AROMATASE DANS DES MODELES CELLULAIRES REPRESENTATIFS DU CANCER DU SEIN.....	183
TABLEAU 5.2 RESULTATS PRINCIPAUX DE CETTE THESE PORTANT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'AROMATASE ET LA PRODUCTION HORMONALE DANS UN MODELE DE CO-CULTURE MIMANT LA STEROÏDOGENESE DANS L'UNITE FŒTO-PLACENTAIRE.....	188
TABLE 2.1: PRIMER PAIRS SEQUENCES USED FOR AMPLIFICATION OF PROMOTER-SPECIFIC CYP19 EXPRESSION AND THEIR AMPLIFICATION CHARACTERISTICS IN H295R AND PRIMARY HUVEC CELLS.....	82
TABLE 2.2 : PRIMER PAIR SEQUENCES OF REFERENCE GENES USED TO NORMALIZE CYP19 GENE EXPRESSION FOR EACH PESTICIDE TREATMENT IN H295R AND PRIMARY HUVEC CELLS .....	83
TABLE 3.1 : SEQUENCES OF THE PRIMER PAIRS AND THEIR AMPLIFICATION CHARACTERISTICS FOR CYP3A7 AND SULT2A1 TRANSCRIPTS AND THAT OF TWO REFERENCE GENES (UBC AND RPII), IN H295R CELLS.....	119
TABLE 4.1 : PRIMER PAIR SEQUENCES USED FOR AMPLIFICATION OF PROMOTER-SPECIFIC CYP19 EXPRESSION AND THEIR AMPLIFICATION CHARACTERISTICS IN Hs578T CELLS .....	155





# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1: STRUCTURE CHIMIQUES DES TROIS ŒSTROGENES NATURELS (17β-ŒSTRADIOL, ŒSTRONE ET ŒSTRIOL) ..	23
FIGURE 1-2: VOIE DE LA SYNTHÈSE DES ŒSTROGENES A PARTIR DU CHOLESTEROL CHEZ LES FEMMES PRE-MENOPAUSEES. ....	25
FIGURE 1-3 : STRUCTURES <i>IN VIVO</i> ET CELLULAIRES DU PLACENTA. ....	27
FIGURE 1-4 : VOIE DE LA SYNTHÈSE DES ŒSTROGENES PAR L'UNITÉ FŒTO-PLACENTAIRE A PARTIR DU CHOLESTEROL CHEZ LES FEMMES ENCEINTES. ....	29
FIGURE 1-5 : EXPRESSION PROMOTEUR-SPECIFIQUE DE L'AROMATASE ( <i>CYP19</i> ) SELON LES TISSUS .....	31
FIGURE 1-6 : REGULATION DE LA PRODUCTION D'ŒSTROGENES PAR L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE .....	37
FIGURE 1-7 : REPRESENTATION DES DOMAINES D'UN RECEPTEUR NUCLEAIRE TYPIQUE .....	39
FIGURE 1-8 : MECANISMES D'ACTION LIGAND-DEPENDANT DES RECEPTEURS DES ŒSTROGENES.....	40
FIGURE 1-9 : PRODUCTION D'HORMONE CHORIONIQUE GONADOTROPE HUMAINE (hCG), DE PROGESTERONE ET D'ŒSTROGENES PENDANT LA GROSSESSE.....	42
FIGURE 1-10 : DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE SOUS CONTROLE HORMONAL, A LA NAISSANCE, PENDANT LA PUBERTE AINSI QUE LA VIE ADULTE .....	43
FIGURE 1-11 : STRUCTURE ET TYPES CELLULAIRES DE LA GLANDE MAMMAIRE .....	44
FIGURE 1-12 : INTERACTIONS CELLULAIRES ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES CANCEREUSES DU SEIN, LES FIBROBLASTES ET LES ADIPOCYTES DANS LE MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL.....	52
FIGURE 1-13 STRUCTURES CHIMIQUES DE TROIS PESTICIDES NEONICOTINOÏDES (THIACLOPRIDE, THIAMETHOXAME ET IMIDACLOPRIDE) .....	59
FIGURE 2-1 : VIABILITY OF H295R (A) AND HUVEC (B) CELLS EXPOSED FOR 24 H TO VARIOUS CONCENTRATIONS OF ATRAZINE, THIACLOPRID, THIAMETHOXAM OR IMIDACLOPRID AS A PERCENTAGE OF DMSO CONTROL. ....	86
FIGURE 2-2 : RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> (CODING REGION) OR PII- AND I.3 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24 H TO VARIOUS CONCENTRATIONS OF ATRAZINE (A), THIACLOPRID (B), THIAMETHOXAM (C), OR IMIDACLOPRID (D).....	88
FIGURE 2-3 : RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> (CODING REGION) OR I.1 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN PRIMARY HUVEC CELLS EXPOSED FOR 24 H TO VARIOUS CONCENTRATIONS OF ATRAZINE (A), THIACLOPRID (B), THIAMETHOXAM (C), OR IMIDACLOPRID (D).....	90
FIGURE 2-4 : EFFECT OF ATRAZINE, THIACLOPRID, THIAMETHOXAM AND IMIDACLOPRID ON AROMATASE ACTIVITY IN H295R (A) AND PRIMARY HUVEC (B) CELLS.....	92
FIGURE 3-1 : CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF THIACLOPRID (A), THIAMETHOXAM (B) AND IMIDACLOPRID (C) ON AROMATASE ACTIVITY IN H295R AND BeWo CELLS IN CO-CULTURE .....	121
FIGURE 3-2 : CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF THIACLOPRID ON DHEA (A), ANDROSTENEDIONE (B), β-hCG (C), ESTRADIOL (D), ESTRONE (E) AND ESTRIOL (F) PRODUCTION BY A CO-CULTURE OF H295R AND BeWo CELLS.....	123

FIGURE 3-3 : CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF THIAMETHOXAM ON DHEA (A), ANDROSTENEDIONE (B), B-HCG (C), ESTRADIOL (D), ESTRONE (E) AND ESTRIOL (F) PRODUCTION BY A CO-CULTURE OF H295R AND BEWO CELLS.....	124
FIGURE 3-4 : CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF IMIDACLOPRID (ON DHEA (A), ANDROSTENEDIONE (B), B-HCG (C), ESTRADIOL (D), ESTRONE (E) AND ESTRIOL (F) PRODUCTION BY H295R AND BEWO CELLS IN CO-CULTURE.....	125
FIGURE 3-5 : RELATIVE EXPRESSION LEVELS OF CYP3A7 IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24-H TO 3 OR 10 $\mu$ M OF THIACLOPRID, THIAMETHOXAM OR IMIDACLOPRID. DMSO WAS USED AS A NEGATIVE CONTROL .....	127
FIGURE 3-6 : RELATIVE EXPRESSION OF CYP3A7 IN H295R CELLS EXPOSED FOR 24-H TO 3 $\mu$ M OF THIACLOPRID, THIAMETHOXAM OR IMIDACLOPRID ('INDUCERS'), WITH OR WITHOUT CO-TREATMENT WITH ESTRIOL (5NG/ML) .....	128
FIGURE 3-7 : STEROIDOGENIC PATHWAYS IN THE CO-CULTURE MODEL OF FETOPLACENTAL STEROIDOGENESIS, AND THE PROPOSED TARGETS OF NEONICOTINOID INSECTICIDES (IN RED) LEADING TO DECREASED ESTRIOL PRODUCTION AND INCREASED LEVELS OF DHEA .....	132
FIGURE 4-1 : A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON-PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND I.4, PII, I.3 AND I.7 PROMOTERS-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS, AND B) AROMATASE CATALYTIC ACTIVITY IN Hs578T CELLS EXPOSED FOR 24H TO DEXAMETHASONE (DEX) 100 nM, FORSKOLIN (FRSK) 10 nM OR VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) 2.5 ng/mL .....	158
FIGURE 4-2 : A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON-PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), B) PII-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS, C) I.3-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS, D) I.7-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS (FOLD CONTROL).....	160
FIGURE 4-3 : A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON-PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND I.4, PII, I.3 AND I.7 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS, AND B) AROMATASE CATALYTIC ACTIVITY IN Hs578T CELLS EXPOSED FOR 24H TO THIACLOPRID (0.03, 0.1, 0.3, 3 AND 10 nM).....	162
FIGURE 4-4 : A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON-PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL), AND I.4, PII, I.3 AND I.7 PROMOTER-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS, AND B) AROMATASE CATALYTIC ACTIVITY IN Hs578T CELLS EXPOSED FOR 24H TO IMIDACLOPRID (0.03, 0.1, 0.3 AND 3 nM).....	163
FIGURE 4-5 : A) RELATIVE EXPRESSION OF <i>CYP19</i> CODING REGION (NON-PROMOTER-SPECIFIC OR TOTAL) B) PII-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS, C) I.3-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS, D) I.7-DERIVED <i>CYP19</i> TRANSCRIPTS IN Hs578T CELLS (% INDUCER).....	166
FIGURE 4-6 : PROPOSED SIGNALLING PATHWAYS IMPLICATED IN THE PROMOTER-SPECIFIC EXPRESSION OF <i>CYP19</i> IN Hs578T CELLS. ....	170
FIGURE 5-1 : MODELE DE CO-CULTURE PROPOSE MIMANT LA STEROÏDOGENESE DANS LE CANCER DU SEIN HORMONO-DEPENDANT .....	192

FIGURE A1-1: TISSUE AND PROMOTER-SPECIFIC ORGANIZATION OF THE CYP19 GENE.....	227
FIGURE A1-2: CELL-TO-CELL INTERACTIONS IN HORMONE-DEPENDENT BREAST CANCER .....	229
FIGURE A2-1 : EFFET DE A) L'ATRAZINE (0.3, 3, 10 MM), B) LE THIAACLOPRIDE (0.1, 0.3, 3, 10 MM), C) LE THIAMÉTHOXAME (0.1, 0.3, 3, 10 MM) AND D) IMIDACLOPRIDE (0.3, 3, 30 MM) SUR L'ACTIVITÉ DE LA LUCIFÉRISE DANS DES CELLULES SKBR3 TRANSFECTÉES AVEC UN GÈNE RAPPORTEUR SOUS LE CONTRÔLE DU PROMOTEUR I.4 DE L'AROMATASE .....	247
FIGURE A3-1 : EFFET DU A) GLYPHOSATE SEUL (0.3, 1, 3, 10, 30 MM), ET DU B) ROUNDUP (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) SUR L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DE L'AROMATASE DANS LES CELLULES H295R ET BEWO EN CO-CULTURE.....	257
FIGURE A3-2 : EFFET DU A) GLYPHOSATE SEUL (0.3, 1, 3, 10, 30 MM), ET DU B) ROUNDUP (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) SUR LA PRODUCTION DE 17B-ŒSTRADIOL PAR LA CO-CULTURE FŒTO-PLACENTAIRE.....	258
FIGURE A3-3 : EFFET DU A) GLYPHOSATE SEUL (0.3, 1, 3, 10, 30 MM), ET DU B) ROUNDUP (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) SUR LA PRODUCTION D'ŒSTRONE PAR LA CO-CULTURE FŒTO-PLACENTAIRE.....	259
FIGURE A3-4 : EFFET DU A) GLYPHOSATE SEUL (0.3, 1, 3, 10, 30 MM), ET DU B) ROUNDUP (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) SUR LA PRODUCTION D'ANDROSTÉNEDEIONE PAR LA CO-CULTURE FŒTO-PLACENTAIRE.....	260

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\beta$ -hormone chorionique gonadotrope humaine ( $\beta$ -hCG)	<i>Chemical-Activated Luciferase Gene Expression</i> (CALUX)
16 $\alpha$ -Hydroxy-déhydroépiandrostérone-sulfaté (16 $\alpha$ -OH-DHEA-S)	Coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ )
17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17)	Cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2)
2,2',4,4'-tétrabromodiphényl éther (BDE-47)	Cytochrome P450 (CYP450)
2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)	Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)
3 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (3 $\beta$ -HSD)	Cytochrome P450 3A7 (CYP3A7)
3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD)	Déhydroépiandrostérone (DHEA)
4-nonylphenol (NP)	Dexaméthasone (DEX)
60S acidic ribosomal protein P0 (RPLP0)	Diéthylstilbestrol (DES)
Activation Function- 1 (AF-1)	Élément de réponse (HRE)
Adénosine monophosphate cyclique (AMPC)	Enzyme de scission de la chaîne latérale du cholestérol (P-450 <sub>ssc</sub> )
Aromatase (CYP19)	Enzyme de scission (CYP11A)
Biphényles polychlorés (BPC)	<i>Extracellular signal-retulated kinase</i> (ERK)
Bisphénol A (BPA)	Facteur de nécrose tumorale (TNF)
<i>CCAT/enhancer-binding protein alpha</i> (C/EBP $\alpha$ )	Fetal bovine serum (FBS)
	Forskolin (Frsk)
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH)
	Guanosine triphosphate (GTP)
	Hormone folliculo-stimulante (FSH)

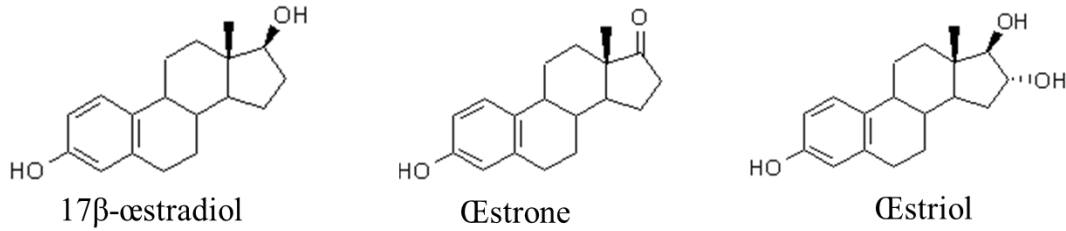
Hormone gonadotrophine (GnRH)	Récepteur aryl hydrocarboné (AhR)
Hormone lutéinisante (LH)	Récepteur aux œstrogènes alpha (RE $\alpha$ )
Interleukine-11 (IL-11)	Récepteur aux œstrogènes beta (RE $\beta$ )
Interleukines-1 (IL-1)	Récepteur spécifique (EP)
Lipoprotéines de basse densité (LDL)	Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR $\gamma$ )
<i>Liver receptor homolog 1</i> (LRH-1)	Récepteurs des œstrogènes (ERs)
Métalloprotéinases (MMP)	RNA polymérase II (RP $_{II}$ )
<i>Mitogen-activated protein kinase 1 &amp; 3</i> (MAPK1/3)	Steroid 16 $\alpha$ -hydroxylase ( <i>CYP3A7</i> )
<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> (MEK)	<i>Steroidogenic factor-1</i> (SF-1)
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sulfotransférase 2A1 (SULT2A1)
Polybromodiphényléthers (PBDEs)	Sulfotransférase sous-famille 2A1 (SULT2A1)
Porphobilinogen déaminase (PBGD)	Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-qPCR)
<i>Programmed Cell Death 4</i> (PDCD 4)	Ubiquitin C (UBC)
Prostaglandine E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)
Protéine kinase A (PKA)	
Protéine kinase C (PKC)	
Protéines de choc thermique (HSP)	

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1 LES ŒSTROGÈNES

Les œstrogènes sont des hormones majoritairement produites par les ovaires et responsables d'un grand nombre de processus physiologiques et réactions métaboliques chez la femme. Entre autres, ces hormones sont responsables du développement des glandes mammaires, des organes génitaux féminins et du maintien de l'homéostasie phosphocalcique (Hennen, 2001). Les œstrogènes, stéroïdes C18, existent sous trois formes naturelles, soit le  $17\beta$ -œstradiol, l'œstrone et l'œstriol (Falcone *et al.*, 2007) (Figure 1.1). C'est en 1929 que Dr. Edward Adelbert Doisy, en collaboration avec le biologiste Edgar Allen, isole pour la première fois l'œstrone. Après un travail colossal, l'isolation de l'œstriol et de l'œstradiol suivra en 1934. La découverte et l'isolation des œstrogènes furent déterminantes dans la création du domaine de l'endocrinologie.

Le  $17\beta$ -œstradiol, œstrogène le plus actif, est sécrété en grande partie par les ovaires et atteint des concentrations maximales lors de la libération de l'ovule. Chez les femmes ménopausées, le taux de  $17\beta$ -œstradiol diminue drastiquement : une faible quantité est produite alors dans le tissu adipeux. L'œstrone, chez les femmes en âge de reproduction, est essentiellement produit dans les cellules de la granulosa par la conversion de l'androsténone produit par les glandes surrénales. Chez les femmes ménopausées, l'œstrone est la principale source d'œstrogène circulant. L'œstriol est, quant à lui, produit massivement pendant une grossesse grâce à la collaboration du fœtus et du placenta (Becker, 2001, Letombe *et al.*, 2012).



**Figure 1-1: Structure chimiques des trois œstrogènes naturels (17β-œstradiol, œstrone et œstriol)**

Les œstrogènes sont des stéroïdes C18. Le 17β-œstradiol est caractérisé par deux groupes hydroxyles en position C3 et C17. L'œstrone, quant à elle, comporte un groupe hydroxyle en position C3 et un groupe cétone en C17. Finalement, l'œstriol, produit massivement pendant la grossesse, est caractérisé par la présence de trois groupes hydroxyles en position C3, C16 et C17.

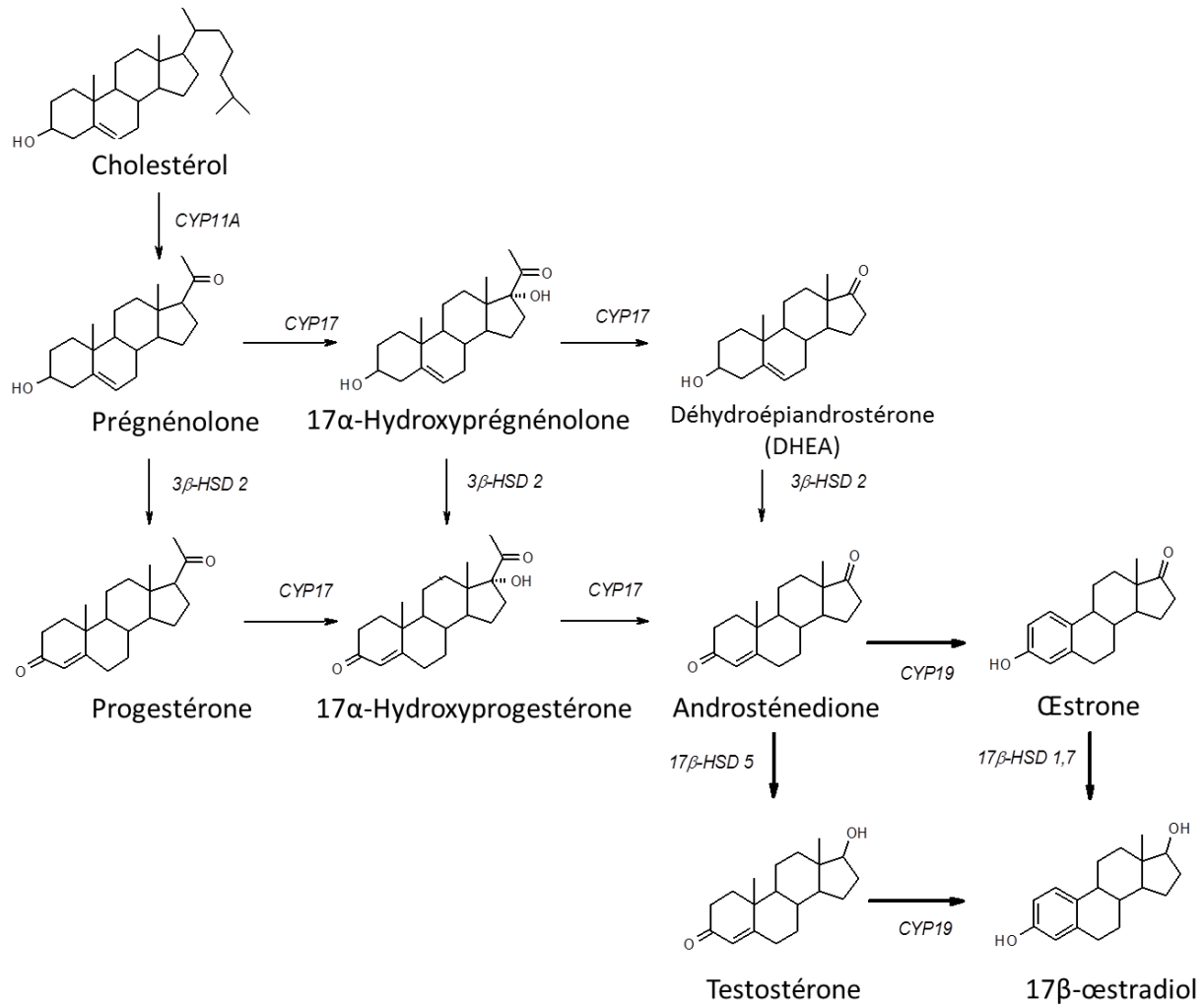
### 1.1.1 Synthèse des œstrogènes

#### 1.1.1.1 Chez les femmes pré et post-ménopausées

L'œstrogène le plus actif chez la femme est le 17β-œstradiol. En effet, l'œstrone et l'œstriol ont moins d'affinité avec les récepteurs des œstrogènes (ERs), ce qui diminue considérablement la portée de leurs actions (Blair *et al.*, 2000, Falcone *et al.*, 2007, Loomis *et al.*, 1999). L'apport majoritaire d'œstrogènes circulants provient des ovaires (follicules et *corpus luteum* (corps jaune ; formation temporaire formée suite à l'ovulation)) chez les femmes pré-ménopausées. La biosynthèse des œstrogènes, et de toutes les hormones stéroïdes, se fait à partir du cholestérol par plusieurs enzymes du cytochrome P450 (CYP450) (Figure 1-2) (revue dans Miller (1988)). Les transporteurs du cholestérol circulant, les lipoprotéines de basse densité (LDL), sont captés par des récepteurs se trouvant sur la surface membranaire des cellules stéroïdogéniques (Heffner, 2003). Ces récepteurs sont en mesure de reconnaître les apoprotéines, protéines spécifiques aux LDL. Une série de transformations du cholestérol à l'intérieur de la cellule s'effectue alors par plusieurs enzymes stéroïdogéniques afin de catalyser la production d'œstrogènes. Tout d'abord, l'enzyme de scission de la chaîne latérale du cholestérol (P-450<sub>ssc</sub>, ou CYP11A) catalyse la transformation du cholestérol en prégnénolone. S'ensuit la

transformation en androgènes, qui peut s'effectuer selon deux voies : la voie de la progestérone, catalysée par l'enzyme 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD), ou la voie de la 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénone. L'enzyme aromatasase (CYP19) est finalement responsable de la dernière étape de la synthèse des œstrogènes (œstrone et 17 $\beta$ -œstradiol) à partir de l'androsténone et de la testostérone (Figure 1-2) (Heffner, 2003). Chez les femmes post-ménopausées, les ovaires ne sont plus fonctionnels, ce qui engendre une baisse de production de 17 $\beta$ -œstradiol et l'apparition des symptômes liés à la ménopause. Une faible synthèse d'œstrogènes est tout de même assurée lors de la ménopause, majoritairement via l'aromatase de l'androsténone, synthétisée par les glandes surrénales, en œstrone (Figure 1-2). Après la ménopause, la production d'œstrone est assurée dans le foie, les reins ainsi que le tissu adipeux (Becker, 2001).





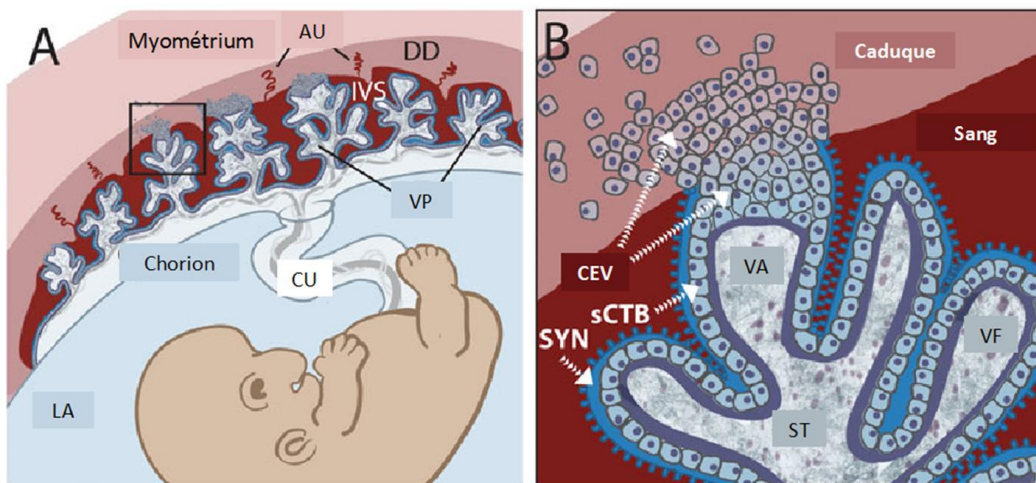
**Figure 1-2: Voie de la synthèse des œstrogènes à partir du cholestérol chez les femmes pré-ménopausées.**

La synthèse des œstrogènes se fait à partir du cholestérol circulant, qui est clivé en prégnénolone dans les mitochondries par l'action de l'enzyme de scission (CYP11A). Deux voies de synthèse des œstrogènes sont alors possibles. En outre, l'action de l'enzyme CYP17 permet de former l'androgène surrénalien DHEA, puis l'action de l'enzyme 3β-HSD2 catalyse une réaction d'oxydoréduction menant à la formation d'androsténedione. L'androsténedione peut également être produit à partir de la progéstérone via l'action de l'enzyme CYP17. À partir de l'androsténedione, la première voie de synthèse des œstrogènes implique l'aromatase (CYP19). L'androsténedione peut également être converti en testostérone via sa réduction par l'enzyme 17β-HSD5. La testostérone, un androgène fort, est alors convertie en 17β-œstradiol également par l'action de CYP19. Dans les deux cas, CYP19 catalyse l'oxydation et la perte d'un groupement méthyle situé sur un cycle aromatique. Adaptée de Sanderson (2009b)

### 1.1.1.2 Chez les femmes enceintes

Chez les femmes enceintes, l'essentiel de la production des hormones stéroïdiennes s'effectue par le placenta, qui est formé à partir du fœtus et de la mère. Cet organe éphémère remplit plusieurs autres rôles, entre autres d'acheminer les nutriments, l'eau et l'oxygène au fœtus et évacuer ses déchets, sans que le sang du fœtus et de la mère ne se mélangent (revu dans Gude *et al.* (2004)). Après la fécondation, l'embryon, alors un blastocyste, est constitué d'un amas de cellules internes (futur embryon), d'une couche de cellules externes (trophoblastes) et d'une cavité appelée blastocèle (Marieb, 2005). De six à sept jours après la fécondation, la sécrétion d'œstrogènes et de progestérone provenant du *corpus luteum* prépare l'endomètre à l'implantation du blastocyste, en stimulant entre autres l'expression de glycoprotéines de surface (Marieb, 2005). L'implantation du blastocyste s'effectue par l'adhésion des trophoblastes dans le haut de l'utérus. S'ensuit alors l'expression de plusieurs facteurs, comme des cytokines, qui sont des médiateurs favorisant les interactions cellulaires entre les tissus maternels et fœtaux (revue dans Minas *et al.* (2005)). Par exemple, l'expression des peptides de la famille des interleukines-1 (IL-1) régule de façon paracrine l'implantation. Plus précisément, les peptides de la famille IL-1 stimulent l'expression des métalloprotéinases (MMPs) 1 et 9 dans les fibroblastes et les trophoblastes, respectivement (Meisser *et al.*, 1999, Singer *et al.*, 1999). Les MMPs ont comme fonction de dégrader la matrice extracellulaire afin de permettre l'invasion des trophoblastes lors de la formation du placenta (revue dans Minas *et al.* (2005)). La sécrétion de facteurs de croissance par les trophoblastes est également importante à ce moment, permettant l'épaississement de l'endomètre, caractérisé par la perméabilisation des vaisseaux sanguins de l'utérus et une réaction inflammatoire aiguë (Marieb, 2005). Une fois le blastocyste implanté sur l'épithélium utérin, le trophoblaste se différencie alors en une couche cellulaire interne, appelée le cytotrophoblaste. Certains cytotrophoblastes fusionnent pour former une couche cellulaire

externe et plurinucléée, le syncytiotrophoblaste. Ce dernier envahit et digère l'endomètre, permettant l'implantation profonde du blastocyste. Après l'implantation, le *corpus luteum* se dégrade et la production hormonale est alors prise en charge par le chorion, développé à partir des trophoblastes (revu dans Kallen (2004)). Le chorion se développe en villosités, unités fonctionnelles très vascularisées du placenta, qui sont en contact avec le sang maternel. Suite à l'implantation de l'embryon dans l'endomètre, ce dernier se transforme en décidue : c'est la partie maternelle du placenta (revu dans Lüllmann-Rauch *et al.* (2008)) (Figure 1-3). Les sangs fœtaux et maternels ne sont jamais en contact direct grâce à la barrière placentaire. Afin d'être fonctionnel et de remplir tous ses rôles, une période d'environ trois mois est nécessaire pour permettre le développement placentaire (Marieb, 2005). À terme, le placenta humain mesure de 15 à 20 cm de diamètre pour un poids d'environ 500g.



**Figure 1-3 : Structures *in vivo* et cellulaires du placenta.**

**A)** Structure et orientation du fœtus et du placenta à environ 6 semaines de gestation. Structures maternelles : Myomètre ; AU, artères utérines ; DD, décidue ; IVS, espace intervilloux. Structures fœtales : VP, villosités ; Chorion ; CU, cordon ombilical ; LA, liquide amniotique. **B)** agrandissement de l'interface materno-fœtale, indiquée par l'encadré noir présenté en A). Le sang maternel entoure les villosités, qui sont composées des villosités ancrées (VA) et flottantes (VF), toutes deux recouvertes du syncytiotrophoblaste (SYN), qui est lui-même situé autour des cellules cytotrophoblastes subsyncytiales (sCTB) ainsi qu'une membrane basale. Les échanges

avec le sang maternel s'effectuent par le syncytiotrophoblaste qui alimente les capillaires fœtaux (non présentés dans la figure) situés dans le stroma villositaire (ST). À la paroi utérine, les cytotrophoblastes extravilloux (CEV) encroûtent les villosités dans la décidue. Certains CEV envahissent la décidue afin de remodeler les artères maternelles. Adaptée de Robbins *et al.* (2012).

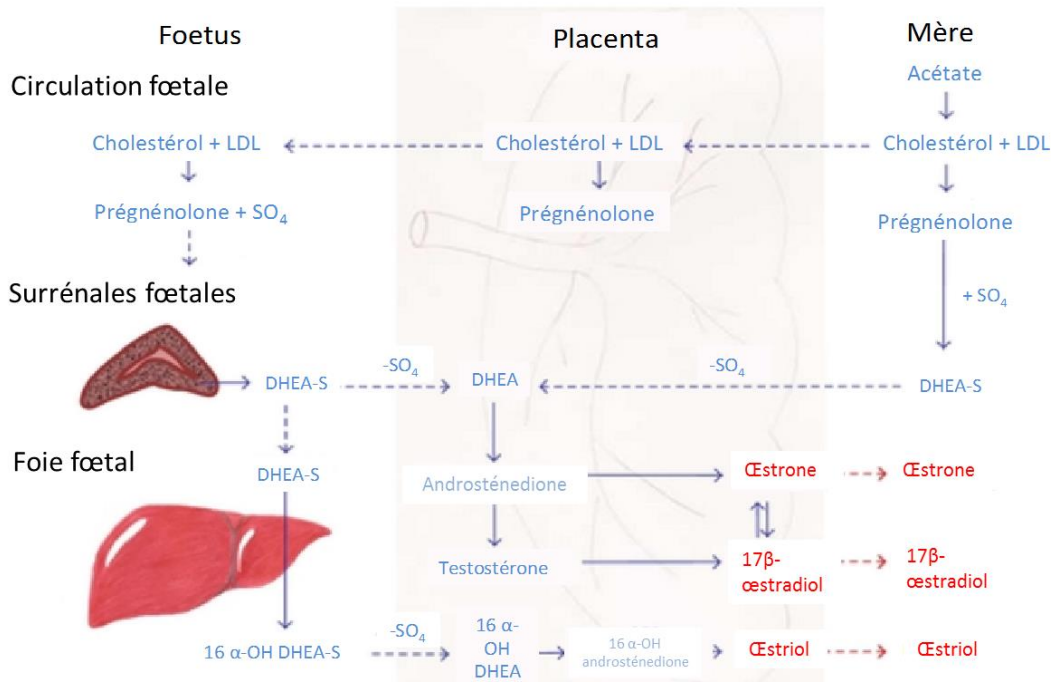
#### 1.1.1.2.1 L'unité foeto-placentaire

Pendant la grossesse, la production d'œstrogènes est possible grâce à la collaboration entre le fœtus, le placenta et la mère. Par exemple, le placenta exprime fortement l'aromatase (CYP19) (Osawa *et al.*, 1993, Osawa *et al.*, 1987, Yoshida *et al.*, 1991), enzyme responsable de la dernière étape de formation des œstrogènes (Figure 1-2), mais n'exprime pas la 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17), enzyme clé dans la synthèse des précurseurs des œstrogènes, soient la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androsténone (Melmed *et al.*, 2015), un substrat important de l'aromatase (Figure 1-2). CYP17 est cependant présente dans les surrénales fœtales (revue dans Rainey *et al.* (2002) et Rainey *et al.* (2004)). Un apport suffisant de cholestérol maternel, de précurseurs des œstrogènes produits par le fœtus ainsi que l'expression de l'aromatase dans le placenta illustrent bien la coopération finement régulée qui existe au sein de l'unité foeto-placentaire.

#### 1.1.1.2.2 Stéroïdogénèse par l'unité foeto-placentaire

Premièrement, le cholestérol dérivé de la circulation maternelle, produit *de novo* par le placenta ou par les glandes surrénales fœtales est converti en prégnénone et progestérone par l'action de la P450<sub>ssc</sub> et de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (3 $\beta$ -HSD), enzymes exprimées dans le placenta. La production de DHEA sulfatée s'effectue par la suite grâce à l'action de CYP17 et de la sulfotransférase sous-famille 2A1 (SULT2A1) dans les surrénales fœtales. La DHEA sulfatée est ensuite convertie dans le placenta en androsténone et testostérone, qui sont les substrats de l'aromatase nécessaires à la synthèse d'œstrone et de 17 $\beta$ -œstradiol. Cependant, lors de la

grossesse, la majorité de la DHEA sulfatée est hydroxylée en 16 $\alpha$ -Hydroxy-déhydroépiandrostérone-sulfatée (16 $\alpha$ -OH-DHEA-S) par l'enzyme CYP3A7, présente dans le foie fœtal, pour finalement être convertie en œstriol dans le placenta (Figure 1-4). L'œstriol est l'œstrogène produit en plus grande concentration pendant la grossesse.



**Figure 1-4 : Voie de la synthèse des œstrogènes par l'unité fœto-placentaire à partir du cholestérol chez les femmes enceintes**

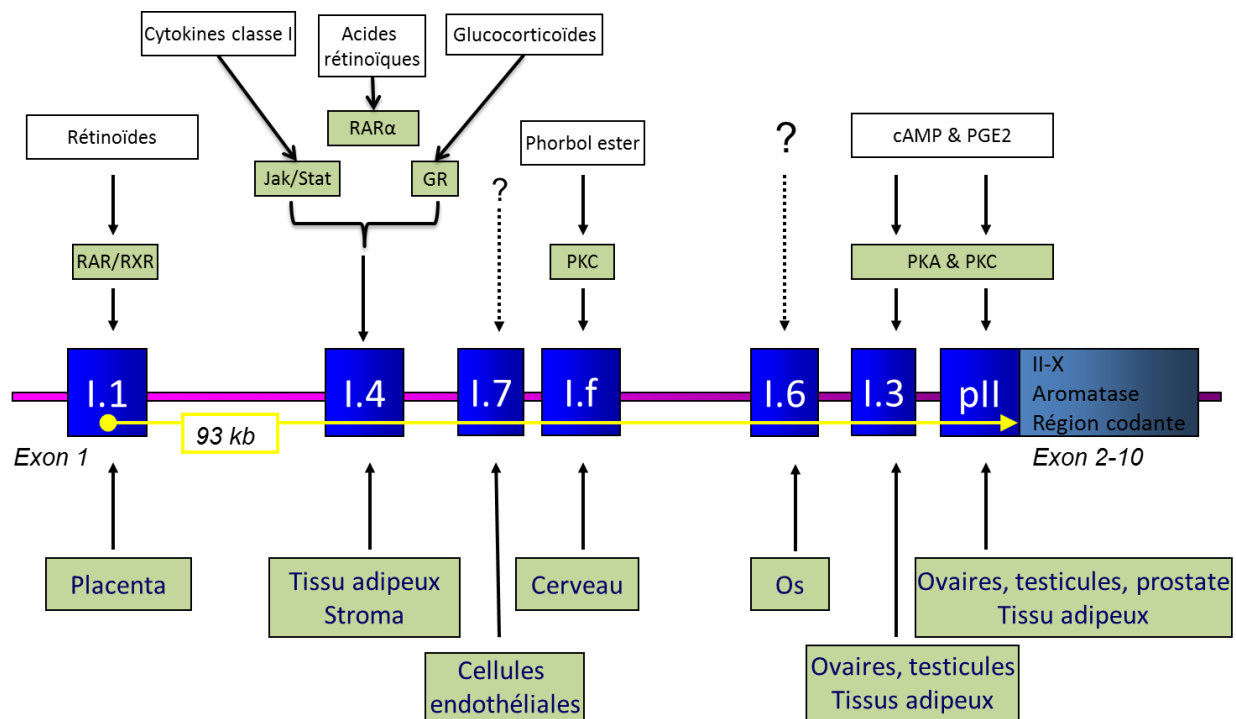
La synthèse des œstrogènes par l'unité fœto-placentaire débute par la conversion du cholestérol, en prégnénolone par l'enzyme CYP11A présente dans le placenta. Les glandes surrénales fœtales expriment l'enzyme CYP17, catalysant la formation de la DHEA sulfatée. À partir de ce précurseur, deux voies de synthèse des œstrogènes sont possibles. Premièrement, il peut y avoir formation de DHEA, androsténedione et testostérone dans le placenta. La CYP19, fortement exprimée dans cet organe, convertit alors ces deux précurseurs en œstrone et 17 $\beta$ -œstradiol. Deuxièmement, il peut y avoir formation du métabolite sulfaté hydroxylé en 16 $\alpha$  de la DHEA (16 $\alpha$ -OH-DHEA-S) dans le foie fœtal via l'action de l'enzyme CYP3A7, menant à la formation d'androsténedione hydroxylé en 16 $\alpha$  puis, finalement, à la synthèse d'œstriol dans le placenta grâce à la CYP19. Adaptée de Kaludjerovic *et al.* (2012)

## 1.1.2 L'aromatase

### 1.1.2.1 Enzyme clé de la biosynthèse des œstrogènes

L'aromatase, produit du gène *CYP19A1* situé sur le chromosome 15q21.1 (revue dans Ghosh *et al.* (2009)), est l'enzyme qui catalyse la dernière étape de la synthèse des œstrogènes. L'aromatase est formée de l'aromatase cytochrome P450 ainsi que de la NADPH-cytochrome P450-réductase, une flavoprotéine exprimée chez la presque totalité des cellules (revue dans Bulun *et al.* (2007) et Simpson *et al.* (2002)). Plus précisément, l'aromatase est responsable de la synthèse de l'œstrone à partir de l'androsténone et de la synthèse du 17 $\beta$ -œstradiol à partir de la testostérone. L'œstrone sulfatase permet l'hydrolyse de l'œstrone sulfate en œstrone, tandis que la 17 $\beta$ -HSD catalyse la conversion de l'œstrone en 17 $\beta$ -œstradiol (Simpson *et al.*, 2002) (Figure 1-2).

L'enzyme aromatase est exprimée dans plusieurs tissus de façon promoteur-spécifique. On retrouve l'aromatase dans les follicules ovariens, le syncytiotrophoblaste placentaire, le cerveau, le tissu adipeux, les glandes mammaires, les os, la peau, les testicules et les spermatozoïdes (Figure 1-5) (Bulun *et al.*, 2007, Carreau *et al.*, 2001, Lambard *et al.*, 2005, Mahendroo *et al.*, 1993, PAYNE *et al.*, 1976, Sebastian *et al.*, 2001). La région codante de l'aromatase (exons 2 à 10) demeure identique, mais la région promotrice (non-traduite) est distincte (Figure 1-5).



**Figure 1-5 : Expression promoteur-spécifique de l'aromatase (CYP19) selon les tissus**

L'activation des promoteurs de l'aromatase spécifiques au tissu est guidée par différentes voies de signalisation. Le promoteur I.1 est actif dans le placenta et l'expression de l'aromatase via le promoteur I.1 est activée entre autres par les rétinoïdes. Le promoteur I.4 est normalement actif dans les fibroblastes du tissu adipeux et guide l'expression de l'aromatase via 1) la voie JAK/STAT en réponse aux cytokines de classe I ; 2) la liaison du récepteur nucléaire RAR $\alpha$  à un élément de réponse spécifique aux acides rétinoïques ; 3) la liaison du récepteur des glucocorticoïdes (GR) à l'élément de réponse aux glucocorticoïdes. Le promoteur I.7, anormalement activé dans le cancer du sein hormono-dépendant, est habituellement actif dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. La ou les voies de signalisation de ce promoteur ne sont pas connues. Les promoteurs majoritairement ovariens PII/I.3, situés près de la région codante (exons II-X) du gène de l'aromatase et dont les boîtes TATA sont rapprochées, partagent des éléments régulateurs guidant leur activation via les voies PKA et PKC. Ces deux promoteurs sont activés lors du développement du cancer du sein hormono-dépendant. Adaptée de Bulun *et al.* (2007), Sun *et al.* (1998) et To *et al.* (2015).

Les promoteurs de l'aromatase sont situés en amont de la région codante et sont distribués sur une région régulatrice de 93 kilobases (revue dans Bulun *et al.* (2012)). Jusqu'à ce jour, 10 promoteurs de l'aromatase ont été identifiés (Tableau 1.1) (revue dans Bulun *et al.* (2012), Bulun *et al.* (2005) et Santen *et al.* (2009)). Le gène de l'aromatase est constitué d'une région codante

de 9 exons (II à X) d'une longueur de 30 kb et d'une région non codante située en amont. Cette section du gène est caractérisée par plusieurs promoteurs activés de façon spécifique au tissu (Tableau 1.1). De ce fait, chacun de ces tissus sont caractérisés par une région non-codante unique (exon I). Le site d'épissage du gène de l'aromatase est situé à proximité de l'exon II de la région codante, ce qui engendre la traduction de produits identiques, peu importe le tissu et le ou les promoteurs activés. Comme les promoteurs de l'aromatase contiennent différents éléments de réponse (Figure 1-5), la régulation de l'activation de ces régions promotrices est unique à chaque tissu (revue dans Meinhardt *et al.* (2002), Sebastian *et al.* (2001) et Simpson *et al.* (2001)).



**Tableau 1.1 : Les différents promoteurs de l'aromatase actifs de façon tissu-spécifique. Adapté de (Bulun *et al.*, 2005, Demura *et al.*, 2008)**

<b>Promoteur</b>	<b>Tissu(s) où le promoteur est actif</b>
<b>I.1</b>	Placenta
<b>2a</b>	Placenta
<b>I.2</b>	Placenta
<b>I.8</b>	Placenta, moelle épinière, thyroïde
<b>I.4</b>	Tissu adipeux (sein), peau, os, tissus fœtaux
<b>I.5</b>	Tissus fœtaux
<b>I.f</b>	Cerveau
<b>I.7</b>	Cellules endothéliales, cancer du sein
<b>I.6</b>	Os
<b>I.3</b>	Tissu adipeux, cancer du sein
<b>PII</b>	Ovaires, cancer du sein, endométriose

#### *1.1.2.2 Expression de l'aromatase chez les femmes pré et post-ménopausées*

Les voies de signalisation responsables de l'activation des promoteurs de l'aromatase ne sont pas toutes élucidées, et cette thèse est en partie humblement dédiée à l'élucidation de certaines de ces voies. À ce jour, nous savons que chez les femmes pré-ménopausées, ce sont les promoteurs de

l'aromatase PII et I.3, spécifiques aux ovaires, qui sont les plus actifs. L'expression de l'aromatase dans les cellules de la granulosa via l'activation des promoteurs PII et I.3 varie selon le stade de maturation des follicules ovariens (revue dans Richards (1994) et Stocco (2008)). Pendant le stade pré-ovulatoire, l'expression de l'aromatase via PII et I.3 est régulée par la FSH et, qui permet l'induction de la voie de signalisation par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Plus précisément, dans les cellules de la granulosa du follicule ovarien, la FSH produite par l'hypophyse antérieure se fixe au récepteur cellulaire couplé à une protéine G. Cette liaison permet l'activation par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G liée au guanosine triphosphate (GTP) de l'adénylate cyclase, l'enzyme responsable de la formation d'AMPC (revue dans Richards (1994) et Stocco (2008)). L'AMPC agit alors comme second messenger et active différentes voies de signalisation, dont la voie de la protéine kinase A (PKA), en s'y fixant et en y libérant la sous-unité catalytique. PKA peut se transloquer au noyau et entre autres phosphoryler le facteur de transcription *Steroidogenic factor-1* (SF-1), afin d'induire l'expression génique de l'aromatase en se liant directement à la séquence du promoteur PII (revue dans Bulun *et al.* (2007) et Stocco (2008)). L'action de SF-1 est amplifiée par son interaction avec le coactivateur  $\beta$ -catenin (Parakh *et al.*, 2006). L'hormone FSH augmente aussi la phosphorylation du facteur de transcription GATA-4 par PKA. Une fois phosphorylé, GATA-4 recrute des coactivateurs comme CREB-binding protein (CBP), permettant la liaison du complexe sur la région du promoteur PII (Kwintkiewicz *et al.*, 2007, Tremblay *et al.*, 2001, Tremblay *et al.*, 2003b). PKA phosphoryle aussi le facteur de transcription CREB en position Ser133, ce qui engendre la liaison des coactivateurs p300 et CREB-binding protein (CBP). Ce complexe se lie alors à la *cAMP response element like sequence* (CLS) située sur le promoteur PII (revue dans Mayr *et al.* (2001)). Après la phase pré-ovulatoire, la production importante de LH est associée à une baisse des

niveaux d'expression de *CYP19* (Fitzpatrick et al., 1997). Il est connu l'augmentation des niveaux de LH est associée à la présence plus importante des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et ICER qui participent à l'inhibition de l'expression de *CYP19* dans les cellules de la granulosa (Morales *et al.*, 2003, Sterneck *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 2002). De plus, les niveaux protéiques de SF-1, plus élevés dans les ovaires comparativement à d'autres tissus, diminuent drastiquement en réponse à l'augmentation des niveaux de LH (Falender *et al.*, 2003). Dans le tissu adipeux, par exemple, l'expression de l'aromatase se fait via le promoteur I.4, et est activée par la présence de cytokines (IL-6, IL-11) et de glucocorticoïdes qui vont activer la voie de signalisation JAK-STAT (Bulun *et al.*, 2007).

#### *1.1.2.3 Expression de l'aromatase pendant la grossesse*

Pendant la grossesse, l'aromatase est exprimée via le promoteur I.1 majoritairement, et de façon plus marginale par l'activité du promoteur I.8. La synthèse d'œstrogènes chez la femme enceinte augmente de façon drastique, jusqu'à 1000 fois les taux circulants normaux. Le promoteur I.1, très actif dans le placenta et découvert par l'équipe de Simpson et collègues, est le promoteur situé le plus en amont de la région codante et est régulé par l'action des rétinoïdes (Simpson, 2003). Le promoteur I.8, dont la séquence a été identifiée plus récemment par Demura et collègues, est situé en amont du promoteur I.4 avec qui il partage d'ailleurs des sites variants d'épissage, est régulé par l'action des glucocorticoïdes (Demura *et al.*, 2008).

### **1.1.3 Régulation de la synthèse des oestrogènes chez la femme**

Le cycle menstruel ainsi que la synthèse des œstrogènes et de la progestérone sont régulés par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Lors d'une baisse de progestérone et d'œstrogènes, l'hypothalamus provoque la sécrétion de l'hormone de libération des gonadotrophines

hypophysaires (GnRH), qui a pour cible l'hypophyse antérieure. Cette dernière, en réponse à cette stimulation, sécrète l'hormone folliculo-stimulante (FSH) qui permet le développement et la maturation du follicule ovarien. Il y a alors synthèse des œstrogènes qui déclenchent la production de l'hormone lutéinisante (LH), signal nécessaire à l'ovulation et, conséquemment, à la formation du *corpus luteum* à partir du follicule : c'est la fin de la phase folliculaire du cycle menstruel. En absence de fécondation, le *corpus luteum* sécrète une quantité importante d'œstrogènes et de progestérone avant de se détériorer : c'est la phase lutéale du cycle menstruel. À ce moment du cycle, les niveaux élevés de FSH, LH, progestérone et œstrogènes inhibent la sécrétion de GnRH (Figure 1-6) (revue dans Cornil (2009)) (Eckert, 1999). Les œstrogènes assument donc le contrôle de leur propre synthèse, par une boucle de rétro-contrôle précise (Figure 1-6).

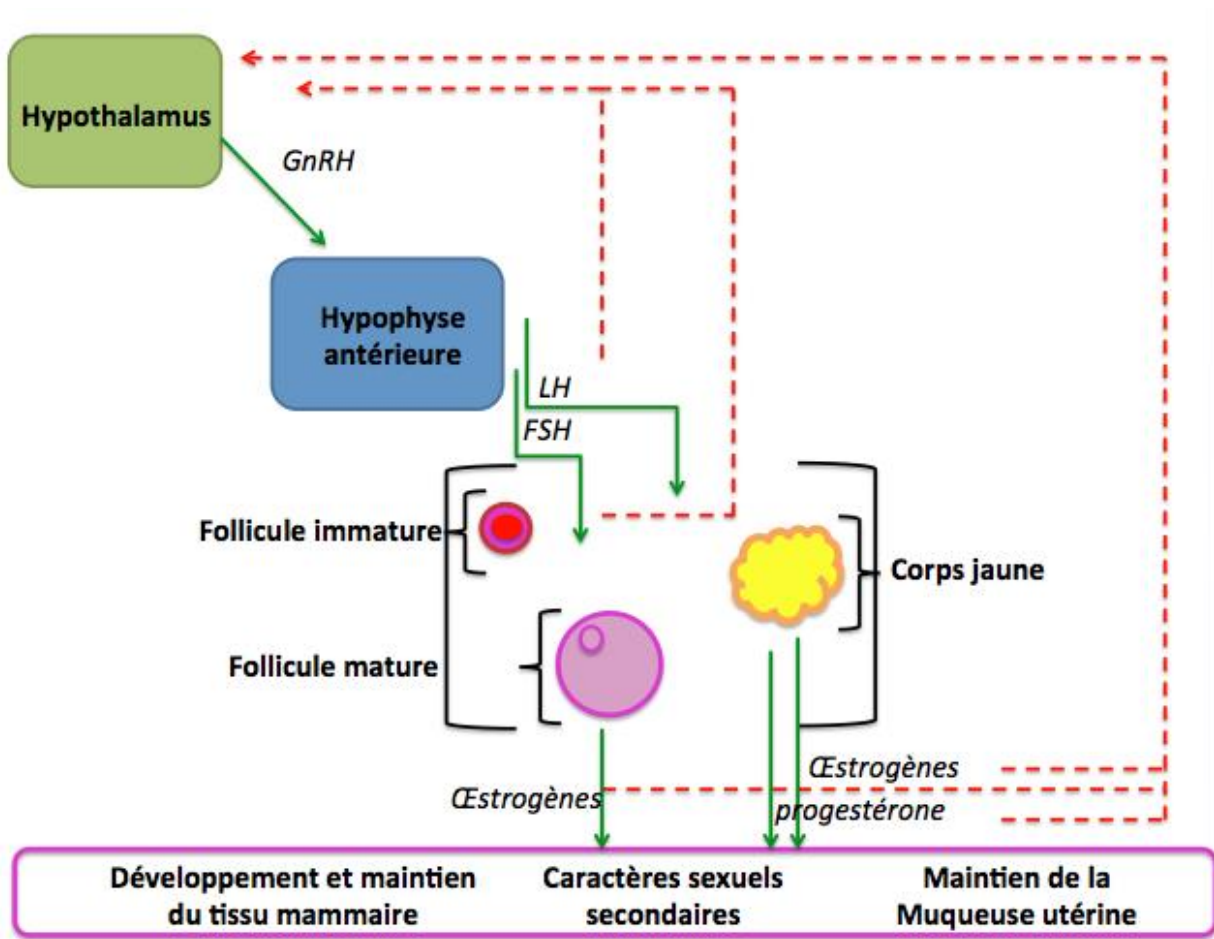


Figure 1-6 : Régulation de la production d'œstrogènes par l'axe hypothalamo-hypophysaire

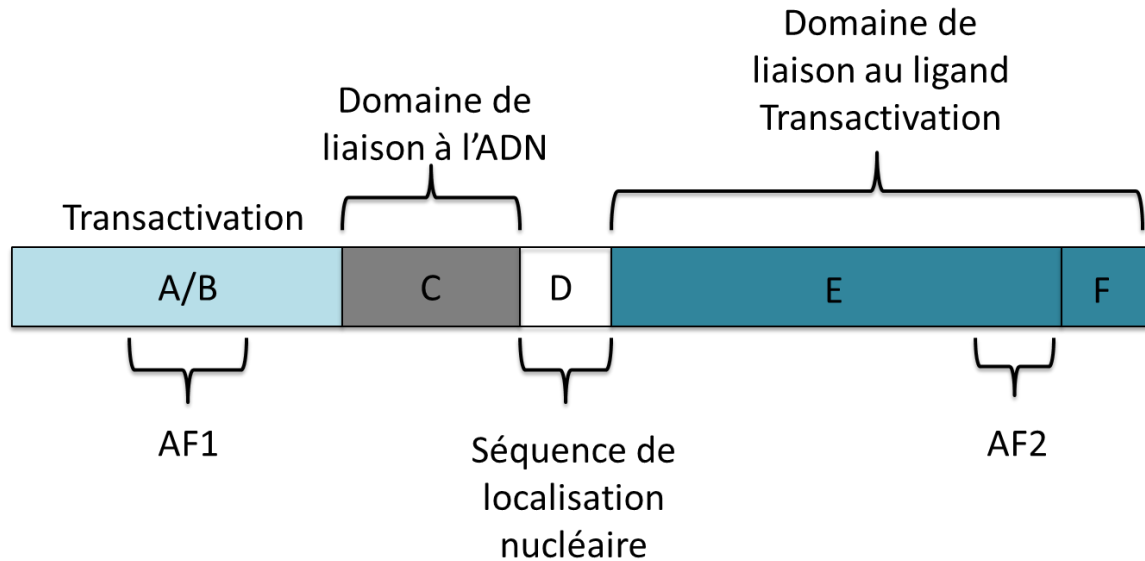
La production de LH et FSH par l'hypophyse antérieure est sous le contrôle de l'hypothalamus, via la sécrétion de GnRH. Les hormones hypophysaires LH et FSH stimulent alors la synthèse d'œstrogènes et progestérone par les ovaires qui, à leur tour, exercent un rétrocontrôle négatif en inhibant la synthèse de LH et FSH par l'hypophyse. Cette boucle de rétrocontrôle explique les sécrétions cycliques d'œstrogènes et progestérone, caractérisant le cycle menstruel où l'augmentation importante de LH déclenche l'ovulation. © Caron-Beaudoin, E. (2017)

#### 1.1.4 Mécanismes d'action des œstrogènes

Afin d'enclencher leurs effets sur les cellules, les œstrogènes se lient à des récepteurs spécifiques situés dans le cytoplasme. Ces récepteurs sont des récepteurs nucléaires semblables aux récepteurs des glucocorticoïdes et des androgènes (revue dans Levin (2001)). Plus globalement, les œstrogènes libres sont captés par deux types de récepteurs, soit le récepteur aux œstrogènes

alpha (RE $\alpha$ ) et le récepteur aux œstrogènes beta (RE $\beta$ ). Le récepteur RE $\alpha$  est exprimé chez la femme dans les ovaires, l'utérus, l'hypophyse, le rein, la glande mammaire, et certaines parties du cerveau. Le récepteur RE $\beta$ , quant à lui, est exprimé dans les ovaires, l'utérus, le poumon, la rate, la glande mammaire et également dans plusieurs parties du cerveau (revue dans Dupont (2011) et Palmieri *et al.* (2002))

Des voies ligand-dépendants et ligand-indépendants peuvent activer les REs (revue dans Björnström *et al.* (2005) et Levin *et al.* (2008)). Les récepteurs RE $\alpha$  et RE $\beta$  sont similaires au niveau de leur structure et comprennent six principaux domaines. Le domaine A/B permet la liaison non ligand-dépendante de co-régulateurs grâce à son motif *Activation Function-1* (AF-1) (Moussard, 2005). Ce motif AF-1 est également responsable de la propriété promoteur-spécifique des récepteurs REs (revue dans Kushner *et al.* (2000)). Le domaine C, fortement conservé d'un récepteur à l'autre, est le lieu de liaison à l'ADN. Une séquence spécifique, l'élément de réponse (HRE), permet effectivement cette liaison (Moussard 2005). Le domaine D, quant à lui, détient la séquence de localisation nucléaire (Moussard 2005). Finalement, le domaine E/F permet la liaison au ligand (Moussard 2005) (Figure 1-7).

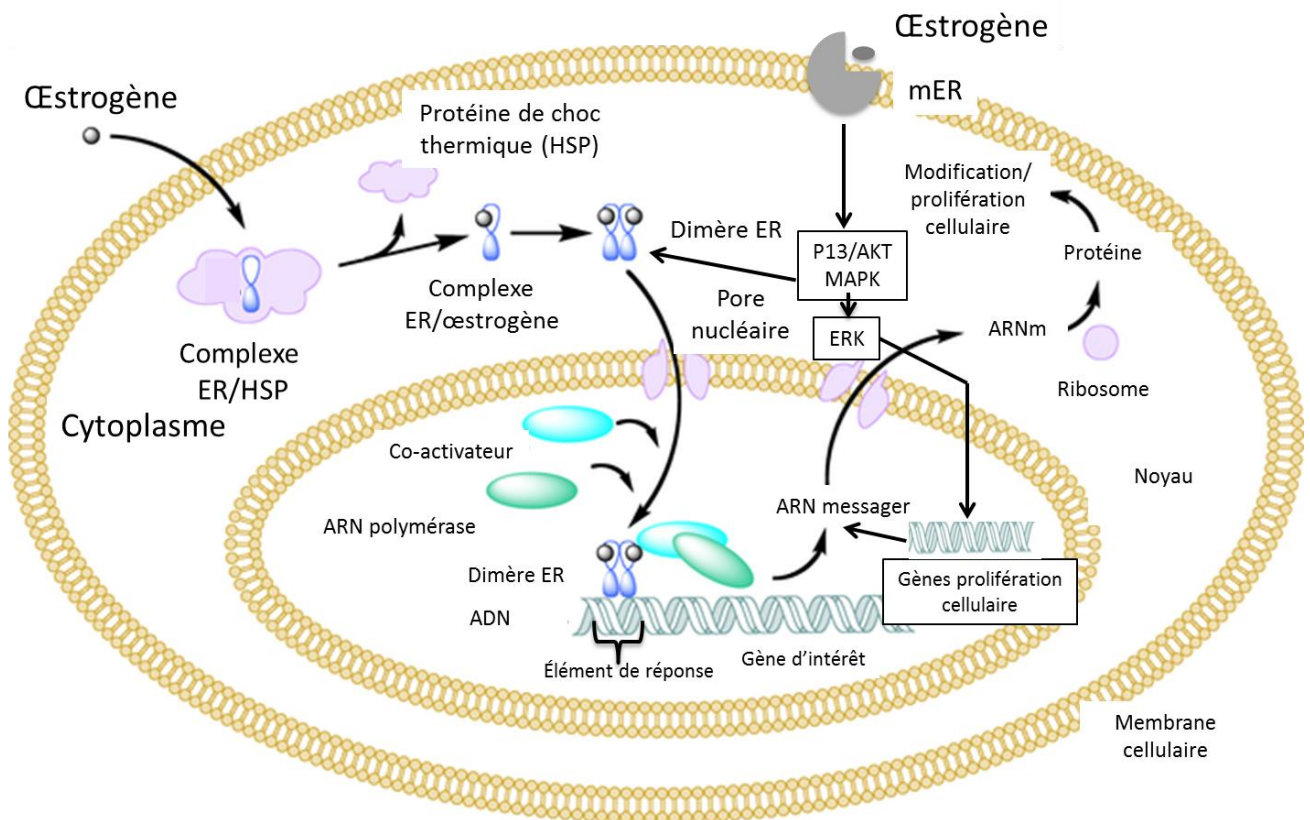


**Figure 1-7 : Représentation des domaines d'un récepteur nucléaire typique**

Plusieurs domaines fonctionnels forment un récepteur nucléaire typique. Le domaine A/B est de longueur variable et est caractérisé par une extrémité N-terminale (terminaison NH<sub>2</sub> : acide aminé avec fonction amine). Cette région contient une région d'activation ligand-indépendante (AF-1) et permet l'interaction avec divers cofacteurs. Le domaine C en doigt de zinc contient la séquence HRE permettant la liaison à l'ADN. Le domaine D, permettant le changement de conformation du récepteur ainsi que sa dimérisation, est lié au domaine E/F qui pour sa part contient le domaine de liaison du ligand ainsi que la région d'activation ligand-dépendante (AF-2). Adaptée de Hart (2002)

La voie ligand-dépendant est la voie classique menant à l'activation des ERs (revue dans Björnström *et al.* (2005)). En absence d'hormone (ligand), le récepteur associé à des protéines de choc thermique (HSP) est maintenu inactif dans le cytoplasme. Ce complexe récepteur-HSP ne permet pas la translocation nucléaire. En présence du ligand, comme l'œstrogène, le récepteur relâche les protéines de choc thermique, permettant alors la dimérisation du complexe hormone-récepteur, ce qui en permet la migration vers le noyau (Moussard, 2005). L'élément de réponse du récepteur se lie ensuite à la région promotrice du gène cible. De plus, la liaison de l'hormone avec son récepteur provoque un changement de conformation du domaine de liaison au ligand, ce qui permet le recrutement des co-activateurs. Finalement, les co-activateurs et le recrutement

d'ARN polymérase permet la transcription du gène, qui pourra alors engendrer des modifications physiologiques (Figure 1-8) (revue dans Björnström *et al.* (2005), Dupont (2011) et Thomas *et al.* (2011)). Les œstrogènes peuvent également se lier au récepteur membranaire permettant l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, notamment la voie *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) / *Extracellular signal-retulated kinase* (ERK) (Figure 1-8) (revue dans Zhang *et al.* (2014)).



**Figure 1-8 : Mécanismes d'action ligand-dépendant des récepteurs des œstrogènes**

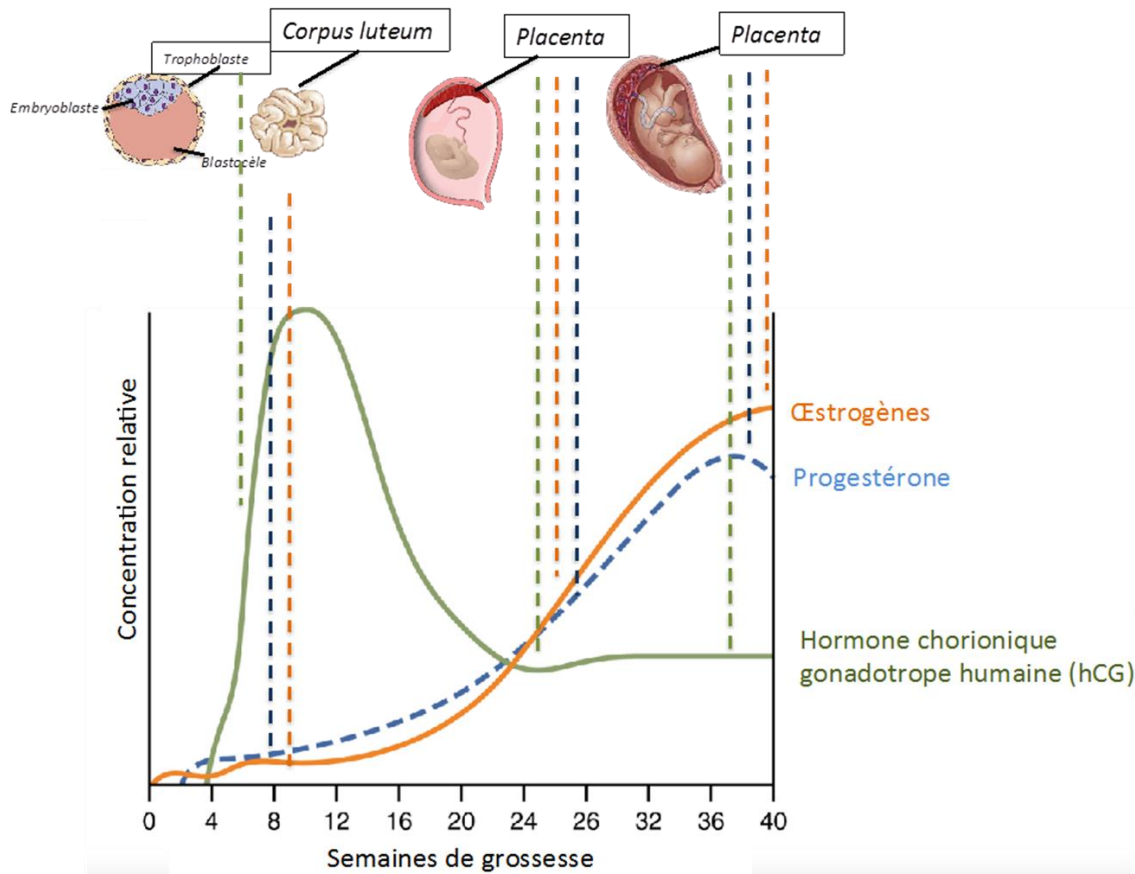
En l'absence du ligand, le récepteur des œstrogènes (RE) est inactif de par son association avec des protéines de choc thermique (HSP). Les œstrogènes diffusent à travers la membrane plasmique, et se lient alors au RE, libérant les HSP. La conformation du RE se modifie et permet la dimérisation du complexe RE/œstrogène, puis sa translocation dans le noyau. Le dimère peut se lier aux éléments de réponse du gène placés dans la région promotrice de celui-ci. Finalement, il y a recrutement de co-activateurs et de l'ARN polymérase, permettant alors la transcription de la région codante du gène en ARN messager. Les œstrogènes peuvent aussi se lier au récepteur membranaire (mER), permettant l'activation des voies P13/AKT, ainsi que MAPK/ERK, guidant



l'expression de gènes favorisant la prolifération cellulaire. Adaptée de Thomas *et al.* (2011) et Zhang *et al.* (2014)

### **1.1.5 Rôle des œstrogènes pendant la grossesse**

Les hormones stéroïdes telles les œstrogènes jouent également plusieurs rôles primordiaux pendant la grossesse. Lors du premier trimestre, les œstrogènes et la progestérone sont capitales dans l'implantation du blastocyste, c'est-à-dire son adhérence à la paroi de l'utérus. À ce stade précoce de la grossesse, le placenta n'est pas en mesure de remplir son rôle endocrinien, et la production d'œstrogènes provient du *corpus luteum* (Figure 1-9), une structure endocrine éphémère formée à la fin du cycle menstruel par l'action de l'hormone lutéinisante (LH). La production d'œstrogènes et de progestérone par le *corpus luteum* est nécessaire au maintien de l'endomètre, ce qui permet l'implantation du blastocyste. De plus, les œstrogènes produits pendant les premières semaines de grossesse sont impliqués dans le non-rejet de l'embryon par le système immunitaire de la mère. Également, les œstrogènes jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire du trophoblaste, afin de permettre le développement du syncytiotrophoblaste dans les premières semaines de grossesse. Après la huitième semaine de grossesse, le placenta est bien formé et peut remplir son rôle endocrinien (Figure 1-9) (Kaludjerovic *et al.*, 2012, Mesiano *et al.*, 1997). La production d'œstrogènes pendant la grossesse est notamment impliquée dans le développement de la circulation sanguine utéro-placentaire, la syncytialisation et l'invasion des trophoblastes (Albrecht *et al.*, 1999, Svedas *et al.*, 2002, Yashwanth *et al.*, 2006).



**Figure 1-9 : Production d'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), de progestérone et d'œstrogènes pendant la grossesse**

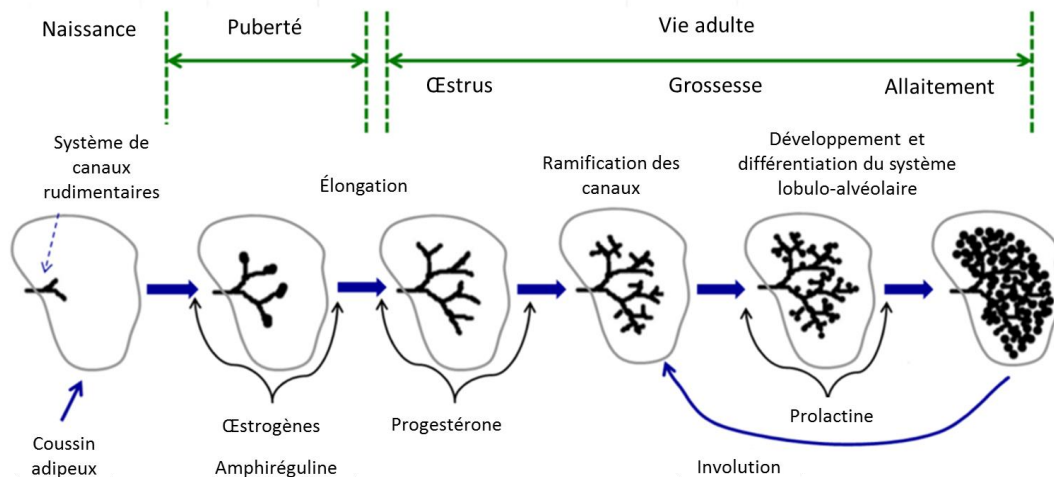
Le tout début de la grossesse est caractérisé par une augmentation importante de la sécrétion de  $\beta$ -HCG par le corps jaune, ou *corpus luteum*, ce qui permet à cette structure d'assurer également la synthèse d'œstrogènes et de progestérone pendant les premières semaines suivant la conception. Au 3<sup>e</sup> mois de la grossesse, le placenta produit lui-même de la progestérone et des œstrogènes, qui augmentent graduellement pendant toute la grossesse. Adaptée de (Betts *et al.*, 2013, Corton *et al.*, 2009, Kumar *et al.*, 2012)

## 1.2 Cancer du sein

### 1.2.1 Développement mammaire et rôle des œstrogènes

La glande mammaire est une structure tubulo-alvéolaire (Heffner, 2003). Chaque lobe, au nombre de 15 à 25, est divisé en lobules. Ces derniers sont connectés au mamelon par les canaux lactifères (Heffner, 2003). Pendant la puberté, les ovaires commencent à produire des œstrogènes

qui engendrent, entre autres, la croissance des structures épithéliales, du système lactifère et la vascularisation. Le développement mammaire est également influencé par l'action de plusieurs hormones, notamment la progestérone et les hormones hypophysaires, soient l'hormone folliculo-stimulante (FSH), l'hormone lutéinisante (LH) et la prolactine. Les œstrogènes jouent également un rôle important dans le développement et le maintien de la glande mammaire et de ses structures (Figure 1-10). Lors de la puberté, le développement des canaux mammaires est régulée par les œstrogènes et leur action via le RE $\alpha$  (Korach *et al.*, 1996, LaMarca *et al.*, 2007). De plus, il est maintenant reconnu que les œstrogènes sont primordiaux dans la prolifération des cellules épithéliales de la glande mammaire. Plus précisément, l'augmentation de la synthèse d'œstrogènes stimule la production d'amphiréguline par les cellules épithéliales de la glande mammaire. L'amphiréguline aurait une action paracrine en stimulant leur prolifération et, ultimement, le développement des canaux lactifères (Ciarloni *et al.*, 2007, LaMarca *et al.*, 2007).

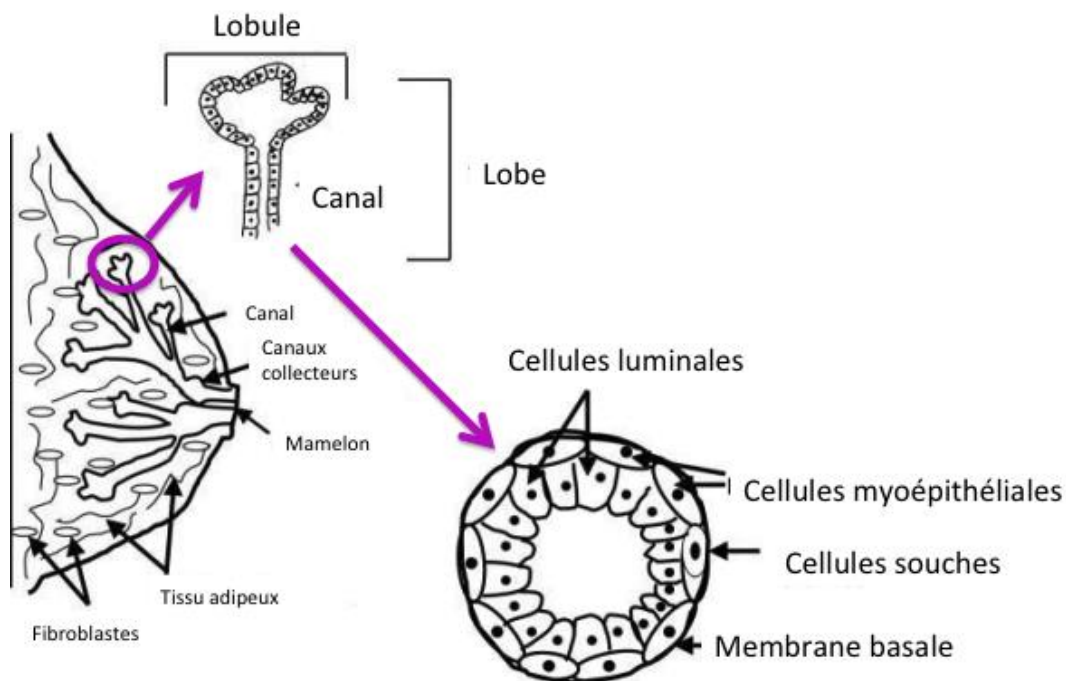


**Figure 1-10 : Développement de la glande mammaire sous contrôle hormonal, à la naissance, pendant la puberté ainsi que la vie adulte**

À la naissance, le système de canaux lactifères est rudimentaire. Pendant la puberté, les œstrogènes et l'amphiréguline permettent l'élongation des canaux lactifères. Pendant la vie adulte et période fertile (œstrus) et en vue d'une possible grossesse, la progestérone permet l'élongation des canaux lactifères et leur ramification. Si une fécondation a lieu, la synthèse de

prolactine pendant la grossesse permettra le développement du système lobulo-alvéolaire afin de préparer l'allaitement. Adaptée de Brisken *et al.* (2010) et Ciarloni *et al.* (2007)

À maturité, la glande mammaire est constituée d'un système de canaux lactifères supportés par du tissu adipeux (Ali *et al.*, 2002, Tan *et al.*, 2011). Les canaux lactifères sont constitués de cellules épithéliales et myoépithéliales. Ces dernières sont séparées des cellules fibroblastiques et des adipocytes par une membrane basale (Figure 1-11). Ce sont les cellules épithéliales qui, dans les alvéoles, sont responsables de la production de lait. Les cellules épithéliales expriment également en plus grande proportion le récepteur des œstrogènes.



**Figure 1-11 : Structure et types cellulaires de la glande mammaire**

Le stroma est la partie de la glande mammaire composée par les cellules adipeuses et les fibroblastes. Le lobe est constitué d'environ 20 à 40 lobules dont les petits canaux se déversent vers un canal lactifère. Chaque lobule est constitué de plusieurs alvéoles entourées par des cellules myoépithéliales qui sous l'effet de l'ocytocine, se contractent et permettent l'éjection du lait. La couche sous-jacente est formée de cellules luminales sécrétrices du lait. Adaptée de Dimri *et al.* (2005)

### 1.2.2 Facteurs de risque

Le cancer du sein représente 25% des diagnostics de cancer chez les Canadiennes, et est le troisième plus important au Canada quant au nombre estimatif de nouveaux cas (Comité directeur des statistiques sur le cancer, 2017) (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2 : Estimatif du nombre de nouveaux cas en 2017 de cancer de la prostate, du poumon, du côlon et rectum, et du sein chez les hommes et les femmes au Canada**

<b>Nouveaux cas</b>			
	<i>Total</i>	<i>Homme</i>	<i>Femme</i>
<b>Prostate</b>	21 300	21 300	-
<b>Poumon et bronches</b>	28 600	14 400	14 200
<b>Côlon et rectum</b>	26 800	14 900	11 900
<b>Sein</b>	26 500	230	26 300

La mortalité reliée à ce cancer a nettement diminué, grâce à un meilleur dépistage de cette maladie chez les femmes canadiennes ainsi que par l'utilisation de traitements efficaces comme l'hormonothérapie. En contrepartie, l'incidence de ce cancer ne semble pas diminuer chez les populations occidentales. En général, les femmes de 50 à 59 ans sont les plus à risques (Comité directeur des statistiques sur le cancer, 2017). Les facteurs de risque les plus notables sont les facteurs génétiques, comme les antécédents familiaux. Une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* constitue également un important facteur de risque pour les femmes plus jeunes, âgées

entre 30 et 35 ans. En effet, les femmes possédant ces mutations ont de 80% à 90% de risques de développer un cancer du sein (revue dans de Jong *et al.* (2002)) (Ford *et al.*, 1998). Le gène *BRCA1* est un suppresseur de tumeur et le gène *BRCA2* est actif au niveau de la réparation de l'ADN (Moynahan *et al.*, 1999, Patel *et al.*, 1998).

Le mode de vie ainsi que la région géographique semble guider l'incidence de cancer du sein. Les femmes vivant en milieu urbain en Amérique du Nord et en Europe sont plus susceptibles de développer cette maladie (Jemal *et al.*, 2011). Les facteurs hormonaux constituent un facteur de risque important quant au développement du cancer du sein. La prise de contraceptifs hormonaux, l'hormonothérapie de remplacement, l'obésité et l'exposition à des substances œstrogéniques sont à considérer (revue dans Kelsey *et al.* (1993) et Martin *et al.* (2000)).

### **1.2.3 Le cancer du sein hormono-dépendant et les œstrogènes**

Le développement et le maintien de la glande mammaire sont dépendants des signaux hormonaux. Il a été démontré qu'une exposition prolongée à des substances œstrogéniques constitue un risque aggravant de cancer du sein (Dupont, 2011, Feigelson *et al.*, 1996, Rae *et al.*, 2005). Plus précisément, le complexe œstrogène-récepteur enclenche l'expression de certains promoteurs du cycle cellulaire (exemple : c-Myc) (Dubik *et al.*, 1987). Les œstrogènes seraient également responsables d'une augmentation du risque de dommages causés à l'ADN, précisément sur des gènes régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la réparation d'ADN (revue dans Roy *et al.* (1999)). Dans le cas de cancer du sein hormono-dépendant, l'hormonothérapie est le traitement privilégié. Ce type de traitement a pour objectif d'enrayer la prolifération cellulaire en diminuant le taux d'œstrogènes disponibles, en bloquant l'activité des récepteurs aux œstrogènes ou encore en inhibant l'activité et l'expression de l'enzyme aromatase (revue dans Goldhirsch *et al.* (2009)).

#### **1.2.4 Initiation, promotion et progression du cancer du sein**

Le processus de développement du cancer peut se diviser en trois étapes, soient l'initiation, la promotion et la progression. Un dommage irréversible à l'ADN (mutations, délétions) peut être à l'origine de l'initiation d'une tumeur (revue dans Pitot (1993)). Ces dommages peuvent causer, entre autres, une activation de proto-oncogène ou encore la perte de gènes suppresseurs de tumeurs. Contrairement à l'initiation, le stade de la promotion est réversible et n'implique pas de changements structurels à l'ADN, mais plutôt des changements au niveau de l'expression génique en réponse à des stimuli environnementaux (revue dans Pitot (1993)). La promotion de la tumeur, processus long et graduel, résulte alors en la prolifération des cellules ayant subies des mutations ou endommagées (Ruddon, 2007). La promotion de la tumeur est, à ce moment, intimement dépendante de la relation entre les cellules « initiées » et leur micro-environnement. C'est également lors du stade de la promotion que plusieurs acteurs de l'inflammation (cytokines, chemokines, macrophages) contribueront à la prolifération des cellules dites « initiées » (Balkwill *et al.*, 2001, He *et al.*, 2010, Mantovani, 2010). Le troisième et dernier stade de la carcinogenèse est la progression de la tumeur. Ce stade est caractérisé par la croissance rapide de la tumeur, ainsi que son invasion à d'autres tissus : le cancer est alors métastasé (Majno *et al.*, 2004).

Par leur action directe sur les cellules de la glande mammaire, les œstrogènes peuvent jouer un rôle lors de l'initiation et la promotion du cancer du sein. En effet, il a été démontré que les œstrogènes ainsi que leurs métabolites peuvent induire des mutations sur l'ADN, générer des radicaux libres et créer de l'instabilité au niveau des gènes (revue dans Hilakivi-Clarke (2000)). Également, une exposition à des substances œstrogéniques pendant la gestation représente un facteur de risque de cancer du sein chez les mères et leur descendance (revu dans Hilakivi-Clarke

(2000) et Potischman *et al.* (1999)). C'est le cas notamment de certains herbicides comme l'atrazine (revu dans Fenton (2006)), ou composés œstrogéniques comme le diéthylstilbestrol (Hoover *et al.*, 2011, Palmer *et al.*, 2006).

### **1.2.5 Interactions cellulaires dans le cancer du sein**

Chez les femmes qui ne sont pas enceintes, les fibroblastes, précurseurs des cellules adipocytes, constituent la majorité du tissu mammaire (environ 90%). Les cellules épithéliales, quant à elles, constituent 7% de ce tissu (revue dans Bulun *et al.* (2007)). Comme les cellules épithéliales sont celles qui expriment de façon plus importante les récepteurs aux œstrogènes, on impute à ces dernières la plus grande responsabilité dans le développement des cancers du sein hormono-dépendants (revue dans Ali *et al.* (2002)).

Une partie importante du sein est composée du stroma, qui comprend la matrice extracellulaire ainsi qu'une variété de types cellulaires (revue dans Tan *et al.* (2011)). Ces cellules évoluent dans un micro-environnement complexe où elles interagissent avec d'autres types cellulaires comme les cellules vasculaires, les fibroblastes, les adipocytes et les cellules immunitaires (revue dans Bhowmick *et al.* (2004)). À ce jour, il est connu que ce micro-environnement joue un rôle crucial dans le développement et la progression du cancer du sein (revue dans Tan *et al.* (2011)). Plus précisément, les interactions cellulaires semblent contribuer activement au maintien et à la progression des tumeurs de plusieurs types de cancers (revue dans Tan *et al.* (2011)). Les fibroblastes, qui jouent un rôle majeur dans le maintien et l'équilibre de la matrice extracellulaire, sont impliqués dans la synthèse du collagène de type I, III, V, IV et la lameline (Kalluri *et al.*, 2006). Les cellules myoépithéliales sont également impliquées dans la stabilisation de la matrice extracellulaire (Sternlicht *et al.*, 1997).



Dans le cas de cancer du sein, des composés sécrétés par le mésenchyme au sein de la matrice extracellulaire induisent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Au même rythme, les fibroblastes présents dans le stroma adjacent aux cellules épithéliales se multiplient et expriment alors une série de facteurs de croissance. En réponse à cette stimulation, les cellules épithéliales malignes produisent des cytokines (facteur de nécrose tumorale (TNF) et Interleukine-11 (IL-11)) qui permettent de maintenir l'activité des fibroblastes (revue dans Bulun *et al.* (2007)). Ces cytokines bloquent également la différenciation des fibroblastes en adipocytes matures en inhibant l'expression de facteurs de transcription adipogéniques essentiels chez les fibroblastes (*CCAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP $\alpha$ ) et récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR $\gamma$ )), et enclenchent une réaction desmoplastique caractérisée par une accumulation importante des fibroblastes autour des cellules épithéliales cancéreuses (revue dans Bulun *et al.* (2007)). Contrairement aux adipocytes, les fibroblastes expriment fortement le gène de l'aromatase, responsable de la synthèse des œstrogènes. Dans le micro-environnement de la tumeur mammaire, il y a donc une augmentation de la sécrétion d'œstrogènes, amplifiée entre autres par la sécrétion de TNF et IL-11 par les cellules épithéliales (revue dans Bulun *et al.* (2007)). Il existe alors une relation étroite entre ces types cellulaires, ce qui stimule la croissance des tumeurs (revue dans Bhowmick *et al.* (2004)). Par leur action paracrine avec les cellules épithéliales, les fibroblastes jouent un rôle primordial dans la carcinogénèse (revue dans Bhowmick *et al.* (2004)).

Les adipocytes matures semblent également être des acteurs importants dans la progression des tumeurs. Lors de la différenciation des adipocytes, les collagènes de types V et VI sont produits en grande quantité, ce qui permet la création d'une membrane séparant les cellules épithéliales des adipocytes et limite ainsi les interactions entre ces deux types cellulaires (revue dans Tan *et*

*al.* (2011)). À certaines périodes de développement, la glande mammaire subit une restructuration importante. Par exemple, lors de la période suivant l'allaitement, l'involution de la glande mammaire se produit. Cette restructuration entraîne un contact entre les adipocytes et les cellules épithéliales. Cette brève connexion semblerait être suffisante pour, dans certains cas, contribuer au développement de tumeurs (revue dans Tan *et al.* (2011)). En effet, des études *in vitro* et *in vivo* (souris) ont démontré que les cellules adipocytes contribuent à la migration de cellules cancéreuses n'exprimant pas le récepteur œstrogène (Iyengar *et al.*, 2003). Les adipocytes sembleraient également agir directement sur l'équilibre de la matrice extracellulaire en exprimant des enzymes MMPs qui sont impliquées dans la différenciation des adipocytes (Egeblad *et al.*, 2002). La surexpression de ces enzymes MMPs par les adipocytes contribuerait au maintien des fibroblastes, impliqués dans le développement et maintien des tumeurs (Andarawewa *et al.*, 2005).

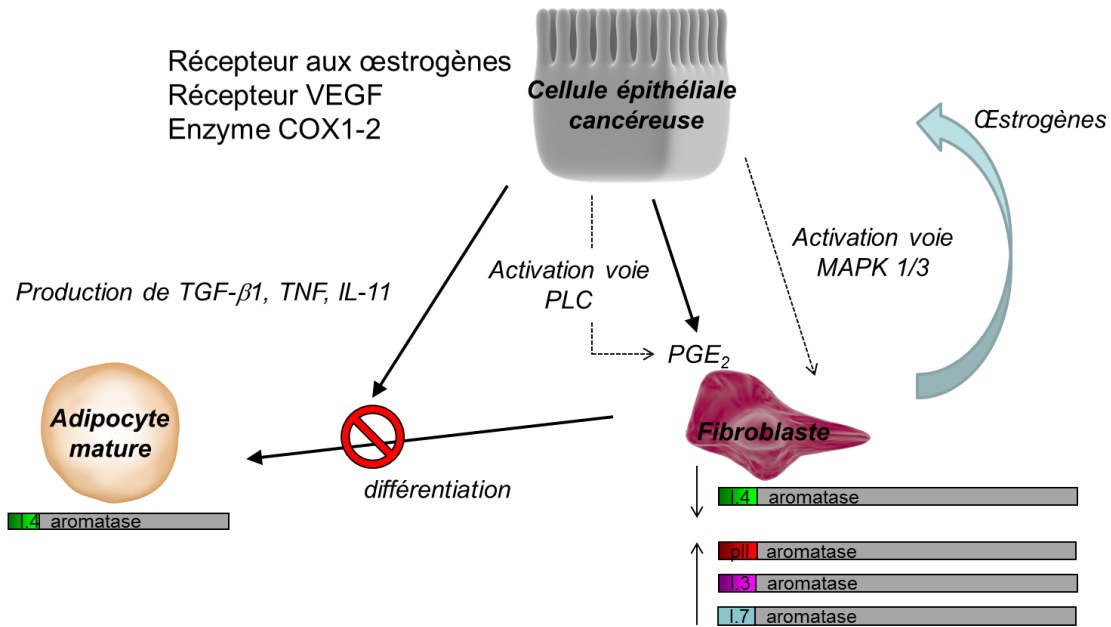
Les cellules myoépithéliales sont de plus en plus étudiées quant à leur implication dans le développement du cancer du sein. Dans la glande mammaire normale, les cellules myoépithéliales sont responsables de la formation de la membrane basale (Gudjonsson *et al.*, 2002). Il a été démontré que plusieurs protéines, sécrétées par les cellules myoépithéliales, agissent comme suppresseurs de tumeurs. En effet, les cellules myoépithéliales synthétisent entre autres des inhibiteurs de protéase, de l'actine et, de la relaxine (Gudjonsson *et al.*, 2002).

### **1.2.6 L'aromatase et cancer du sein**

Lors du développement d'un cancer du sein hormono-dépendant, l'enzyme aromatase est surexprimée dans le micro-environnement de la tumeur (revue dans Bulun *et al.* (2012)), ce qui entraîne une augmentation de la synthèse d'œstrogènes. Plusieurs promoteurs peuvent intervenir dans l'expression de l'aromatase, et ces derniers sont particulièrement actifs dans le cas du

cancer du sein hormono-dépendant. Dans le tissu mammaire sain, le promoteur I.4 est actif de façon modeste (Agarwal *et al.*, 1996). Dans le cas d'un cancer du sein, la production locale d'œstrogènes se voit augmentée dans le micro-environnement tumoral (Simpson *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2005) par un changement drastique au niveau de l'expression de l'aromatase via l'inhibition de l'activité du promoteur normal I.4, et la soudaine activation des promoteurs pII, I.3 et I.7 (Agarwal *et al.*, 1996, Irahara *et al.*, 2006, Subbaramaiah *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2005). En outre, nous détenons somme toute peu d'informations quant au promoteur I.7. Ce dernier, caractérisé par l'équipe de Sebastian et collègues (2002), est activé dans les cellules vasculaires cancéreuses du sein. La même équipe de recherche s'est penchée sur les voies de signalisation menant à l'activation de ce promoteur, et ces dernières semblent impliquer des facteurs de transcription vasculaire tels que GATA-2 (Bulun *et al.*, 2003, Sebastian *et al.*, 2002). Les mécanismes entourant l'activation des promoteurs de l'aromatase dans le micro-environnement tumoral ne sont pas donc pas totalement élucidés, quoi que des hypothèses aient toutefois été proposées. Par exemple, une inflammation du tissu mammaire conduirait à une plus grande production de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), synthétisée à partir de l'acide arachidonique par les cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) (Brueggemeier *et al.*, 2007). La PGE<sub>2</sub> enclenche des effets biologiques en se liant à son récepteur spécifique (EP), un récepteur membranaire couplé à la protéine G. La liaison de la PGE<sub>2</sub> avec son récepteur stimulerait la voie signalétique de l'AMPC- protéine kinase A (PKA) et AMPC- protéine kinase C (PKC), conduisant à une surexpression de l'aromatase via plusieurs promoteurs normalement inactifs (Subbaramaiah *et al.*, 2012, To *et al.*, 2015). L'activation des voies PKA et PKC permet la liaison du récepteur nucléaire orphelin *liver receptor homolog 1* (LRH-1) à la région des promoteurs PII/I.3 (Chand

*et al.*, 2011). Cette relation entre l'expression d'aromatase et l'enzyme COX suggère que les contrôles paracrines et autocrines stimulent la prolifération cellulaire des tumeurs (Figure 1-12).



**Figure 1-12 : Interactions cellulaires entre les cellules épithéliales cancéreuses du sein, les fibroblastes et les adipocytes dans le micro-environnement tumoral**

La réaction desmoplastique est caractérisée par l'accumulation de fibroblastes via l'action des cytokines produites par les cellules cancéreuses épithéliales bloquant la différenciation normale des fibroblastes en adipocytes. Les cellules fibroblastiques expriment fortement l'aromatase dans le micro-environnement tumoral, par le changement d'utilisation des promoteurs de l'aromatase expliqué entre autres par la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules cancéreuses épithéliales. La surexpression de l'aromatase dans les fibroblastes mène à une production importante d'œstrogènes, ce qui stimule la prolifération des cellules cancéreuses épithéliales. Les lignes en pointillées désignent l'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation PLC et MAPK 1/3, potentiellement induites par le récepteur au VEGF, soient impliquées dans l'activation des promoteurs de l'aromatase PII, I.3 et I.7 dans les fibroblastes. Adaptée de (Bulun *et al.*, 2012, Krishnan *et al.*, 2012)

De plus, les cellules cancéreuses épithéliales ont la capacité de sécréter de grandes quantités de cytokines (TNF et IL-11), qui inhibent la maturation normale des fibroblastes en adipocytes. Les fibroblastes, qui produisent des œstrogènes, contribuent donc au maintien des cellules tumorales (Balkwill, 2009, Bulun *et al.*, 2007, Meng *et al.*, 2001).

Tel que mentionné précédemment, la production de PGE<sub>2</sub> par entre autres les cellules épithéliales cancéreuses est une des explications avancées par la littérature scientifique afin d'expliquer la surexpression de l'aromatase via l'activité des promoteurs PII et I.3. La surexpression de l'aromatase dans le cancer du sein est aussi caractérisée par une activité importante du promoteur endothélial I.7, dont les voies de signalisation sont peu connues à ce jour. Parallèlement à la découverte de l'implication de ce promoteur, certains groupes de recherche se sont penchés sur l'enjeu du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dans l'angiogenèse, processus primordial dans le développement et l'agressivité du cancer du sein hormono-dépendant et caractérisée par la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. VEGF est un facteur déterminant contribuant à la vascularisation des tumeurs du sein et il contribue grandement à la prolifération des cellules endothéliales composant les tissus vasculaires (revue dans Schneider *et al.* (2007)). Il est connu que les récepteurs de VEGF sont surexprimés dans les cellules cancéreuses du sein (Adams *et al.*, 2000, Konecny *et al.*, 2004), et que la perméabilité des cellules endothéliales cancéreuses s'effectue via certaines voies de signalisation, notamment *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK) / MAPK1/3, et PLC/PKC (Cross *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2015). Cette dernière mène entre autres à la production de PGE<sub>2</sub>, un médiateur connu de l'expression des promoteurs PII et I.3 (Chen *et al.*, 2007). La voie de signalisation MEK/MAPK1/3 pourrait être une voie potentielle menant à la surexpression de l'aromatase via le promoteur endothélial I.7, ce qui constitue une piste à explorer afin de caractériser les événements menant à l'activation de ce promoteur, jusqu'à maintenant peu étudiés.

## 1.3 Perturbateurs endocriniens

### 1.3.1 Contaminants environnementaux et cancer du sein

Un perturbateur endocrinien est une substance qui peut être d'origine naturelle ou synthétique et qui a la capacité d'interférer avec les fonctions du système endocrinien (OMS, 2013). Les perturbateurs endocriniens peuvent agir de façon agoniste, c'est-à-dire en ayant un effet similaire à l'hormone naturelle; de façon antagoniste, en bloquant l'effet de l'hormone naturelle; en perturbant la synthèse ou la dégradation de l'hormone naturelle (Lauwerys *et al.*, 2007). Plusieurs études ont démontré, tant dans des modèles animaux que dans des études épidémiologiques, qu'une exposition prénatale à des substances chimiques était associée au développement de tumeurs au cerveau et de leucémie (revue dans Birnbaum *et al.* (2003)). Les œstrogènes ont été également pointés du doigt et classés comme substances cancérogènes. En effet, une exposition à des œstrogènes naturels ou synthétiques est associée, dans les modèles animaux, avec une augmentation de l'incidence de cancers du sein, de l'utérus et des ovaires (Newbold *et al.*, 1990, Rodriguez *et al.*, 2001, Steinberg *et al.*, 1991, Weiss *et al.*, 1997). Un exemple tristement célèbre est l'utilisation du diéthylstilbestrol (DES) chez les femmes enceintes dans les années 1950 et 1960. Cet œstrogène synthétique était prescrit aux femmes enceintes afin de diminuer le risque de fausses couches. Or, il s'est avéré que les femmes ayant consommé ce médicament, ainsi que leurs filles ayant été exposées à celui-ci *in utero* ont des risques plus élevés de développer un cancer du sein (Palmer *et al.*, 2006). D'autres contaminants environnementaux semblent également avoir le même effet. Des expositions aux biphényles polychlorés (BPC), aux pesticides organochlorés et aux composés perfluorés sont associées à une augmentation du risque de cancer du sein dans des populations humaines (Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2011, Demers *et al.*, 2000, Demers *et al.*, 2002). Sachant que les populations humaines sont

exposées quotidiennement à des substances chimiques de par leur mode de vie et leur alimentation, il est primordial de se questionner sur le potentiel de perturbateur endocrinien de ces substances.

L'atrazine est un bon exemple de perturbateur endocrinien. L'atrazine, un contaminant persistant, est un des herbicides les plus utilisés dans le monde. L'inquiétude autour de cet herbicide a débuté lorsque des études ont démontré que des femelles rates exposées à cet herbicide développaient des tumeurs mammaires (Eldridge *et al.*, 1998, Fenton, 2006). Plus tard, Cooper *et al.* (2000) ont démontré qu'une exposition à l'atrazine était associée à une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Dans plusieurs lignées cellulaires humaines, l'atrazine, ayant peu d'affinité avec les récepteurs des œstrogènes (Fan *et al.*, 2007a, Fan *et al.*, 2007b, Roberge *et al.*, 2004), augmente l'expression de l'aromatase via une stimulation de la voie de l'AMPc en inhibant l'activité de la phosphodiesterase, enzyme responsable de la dégradation de l'AMPc (Fan *et al.*, 2007b, Roberge *et al.*, 2004, Sanderson *et al.*, 2000). Cette stimulation de l'aromatase entraîne donc une augmentation de la synthèse d'œstrogènes, notamment dans les cellules de carcinome surrénalien humain (H295R) (Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001, Sanderson *et al.*, 2000). Une exposition à l'atrazine des cellules H295R a causé une augmentation de l'activité de l'aromatase de façon dose-dépendante jusqu'à un maximum de 2,5 fois par rapport au contrôle (Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001, Sanderson *et al.*, 2000). Il a été également démontré que l'atrazine augmente l'expression de l'aromatase via le promoteur PII en agissant comme ligand pour SF-1, un facteur indispensable à l'induction de l'aromatase par PII en permettant l'activation de ce dernier par la voie de l'AMPc-PKA (Fan *et al.*, 2007a).

Si l'action de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase est démontrée, plusieurs autres contaminants environnementaux sont susceptibles d'être de potentiels perturbateurs endocriniens au niveau de cette enzyme. Par exemple, les retardateurs de flammes bromés (polybromodiphényléthers (PBDEs)) sont des additifs retrouvés dans les produits d'usage courant et ayant pour fonction de retarder la propagation des flammes lors d'un incendie. Depuis plusieurs années, les concentrations de PBDEs sont en hausse partout au monde, entre autres au Québec et plus précisément dans la région urbaine de Montréal (Gentes *et al.*, 2012). À ce jour, certaines études ont démontré le potentiel de perturbateur endocrinien de plusieurs métabolites des PBDEs. Par exemple la production d'estradiol ainsi que l'activité de l'aromatase ont été significativement augmentées dans les cellules H295R exposées à des métabolites du 2,2',4,4'-tétrabromodiphényl éther (BDE-47) (He *et al.*, 2008). Pour d'autres substances, comme les néonicotinoïdes, peu, voire aucune étude ne s'est penchée sur leurs effets sur l'expression de l'aromatase.

### **1.3.2 Contaminants environnementaux et incidences sur la grossesse et le fœtus**

L'utilisation mondiale de composés chimiques dans les produits d'usage courant, en agriculture ou dans le secteur énergétique est en croissance. Plusieurs études ont aussi démontré une hausse significative des naissances prématurées et des bébés de petits poids à la naissance (Butler *et al.*, 2007, Hamilton *et al.*, 2005, Hamilton *et al.*, 2007). La hausse des retards de croissance intra-utérins est également observée (Martin *et al.*, 2007, Martin *et al.*, 2005). De façon intéressante, un lien entre le poids à la naissance et la concentration d'œstrogène dans le sang maternel et du cordon ombilical, en particulier l'œstriol a été démontrée (Nagata *et al.*, 2006, Petridou *et al.*, 1990). Une baisse significative de  $17\beta$ -œstradiol dans le plasma des mères ayant reçu un diagnostic de pré-éclampsie ou ayant accouché de bébés souffrant d'un retard de croissance

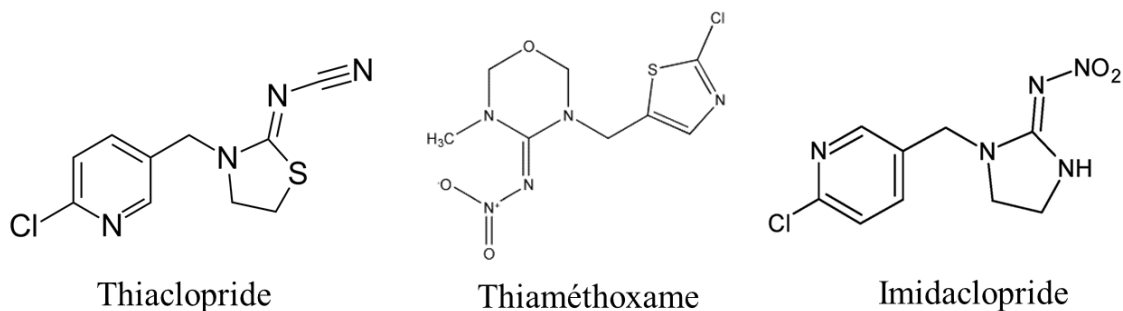


intra-utérin a également été observé (Salas *et al.*, 2006, Zeisler *et al.*, 2002). De plus, nous savons que le poids à la naissance et la durée de la grossesse sont d'importants prédicteurs de la santé de l'enfant à long terme. Il est donc primordial que la communauté scientifique s'intéresse aux perturbateurs endocriniens, leur exposition *in utero*, ainsi qu'à leurs impacts potentiels sur la grossesse et la santé des nourrissons. L'exposition *in utero* pour un grand nombre de contaminants environnementaux par leur passage via la barrière placentaire n'est plus à démontrer. C'est le cas pour de nombreux métaux lourds (Gundacker *et al.*, 2012, Stillerman *et al.*, 2008), les biphényles polychlorés (BPC) (Jacobson *et al.*, 1984, Jacobson *et al.*, 1990), ainsi que certains pesticides comme l'atrazine (Wickerham *et al.*, 2012). Deux études ont également fortement suggéré que des pesticides néonicotinoïdes pourraient traverser la barrière fœto-placentaire (Abou-Donia *et al.*, 2008, Taira, 2014). De plus, la communauté scientifique s'entend sur le fait que le fœtus en développement est particulièrement vulnérable aux contaminants. En effet, la grossesse constitue une période de susceptibilité particulière, de par le développement de plusieurs systèmes physiologiques majeurs chez le fœtus tel le système respiratoire, immunitaire, reproducteur, nerveux, cardiovasculaire et endocrinien (Stillerman *et al.*, 2008). Plusieurs études se sont penchées sur cette problématique et ont démontré des liens entre l'exposition *in utero* à des pesticides, par exemple, et des retards de croissance intra-utérins (Dąbrowski *et al.*, 2003, Levario-Carrillo *et al.*, 2004, Munger *et al.*, 1997, Perera *et al.*, 2003, Villanueva *et al.*, 2005) et des malformations congénitales (Basso *et al.*, 1999, Garry *et al.*, 2002, Garry *et al.*, 1996, Rull *et al.*, 2006, Schreinemachers, 2003). Le rôle important de la synthèse d'œstrogènes pendant la grossesse en fait une cible de choix pour l'étude des effets de perturbateurs endocriniens sur la stéroïdogénèse pendant la grossesse.

### 1.3.3 Les pesticides néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont des insecticides agissant sur le système nerveux central des insectes en se fixant au récepteur de l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR). Ils sont notamment caractérisés par leur grande ressemblance à la nicotine, isolée du tabac et ayant servi pendant de nombreuses années d'insecticide (Millar *et al.*, 2007). À l'heure actuelle, les néonicotinoïdes représentent 20% du marché total mondial des insecticides (Marrs, 2012), et deux de leurs congénères, le thiaméthoxame et le clothianidine, se retrouvaient dans le top 10 des insecticides les plus vendus au Canada en 2010. Ce sont 11 million d'hectares de terres arables canadiennes, représentant 216 000 kg d'ingrédients actifs, qui étaient traitées à cette classe d'insecticides en 2012 (Main *et al.*, 2014). De par les différents modes d'application de ces pesticides (au sol, enrobage de semences), avoir accès aux données sur les ventes et utilisation de ces insecticides représente un défi de taille. Les données les plus récentes au Canada ne concernent que l'Ontario, où un peu plus de 3 million d'acres de terres agricoles étaient plantées avec des semences de maïs ou soja traitées aux néonicotinoïdes en 2016 (Ontario Ministry of the Environment and Climate Change, 2017). Ces insecticides sont pointés du doigt dans le phénomène d'effondrement des colonies d'abeilles, et le lien de causalité entre l'exposition aux néonicotinoïdes et le déclin mondial de l'abeille domestique, et également d'autres pollinisateurs, fait de plus en plus consensus (Decourtye *et al.*, 2004, Goulson, 2013, Henry *et al.*, 2012b, Lu *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2008). Une des voies d'intoxication suggère l'assimilation de dose létale de ces insecticides, appliqués en enrobage de semence, par l'eau de guttation de laquelle les abeilles s'abreuvent (Girolami *et al.*, 2009).

Il est possible de se procurer de façon commerciale sept différents pesticides néonicotinoïdes, dont le thiaclopride, l'imidaclopride et le thiaméthoxame (Figure 1-13).



**Figure 1-13 Structures chimiques de trois pesticides néonicotinoïdes (thiaclopride, thiaméthoxame et imidaclopride)**

Les pesticides néonicotinoïdes sont structurellement similaires à la nicotine. Leur mode d'action cible les récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique exprimés dans le système nerveux central des insectes.

Leur métabolisme, comportant des particularités pour chaque congénère, est caractérisé par l'implication importante du cytochrome P450 et ce chez les plantes, insectes et mammifères (revue dans Simon-Delso *et al.* (2015)). Le métabolisme de ces pesticides est complexe et donne lieu à la production de plusieurs métabolites différents. Chez l'humain, l'enzyme CYP3A4 fortement exprimée dans le foie, est particulièrement impliquée dans le métabolisme de ces pesticides. En effet, CYP3A4 assure efficacement la conversion du thiaméthoxame en clothianidine, son métabolite principal (Shi *et al.*, 2009). De façon plus marginale, les enzymes CYP2C19 et 2B6 peuvent également participer au métabolisme de ce congénère (Shi *et al.*, 2009). L'enzyme CYP2C19 permet notamment la conversion du thiaméthoxame en N-desméthyl-thiaméthoxame, un métabolite hépatotoxique chez la souris (Shi *et al.*, 2009).

Dans le cas de l'imidaclopride, ce dernier est principalement métabolisé chez l'humain en 5-hydroxy-imidaclopride et en imidaclopride-olefin (Schulz-Jander *et al.*, 2002). Les enzymes CYP3A4, CYP2C19, CYP2A6 et CYP2C9 sont entre autres impliquées dans ces réactions (Schulz-Jander *et al.*, 2002).

Quoi que l'implication de l'enzyme CYP3A4 dans le métabolisme du thiaclopride soit encore nébuleuse, la présence d'inhibiteurs du CYP450 a en partie bloqué le métabolisme de ce néonicotinoïde chez la souris (Shi *et al.*, 2009).

#### 1.3.3.1 *Présence dans l'environnement*

Les pesticides néonicotinoïdes sont systémiques, c'est-à-dire qu'ils se retrouvent dans toutes les parties de la plante. Cette caractéristique est expliquée entre autres par l'utilisation en enrobage de semence qui est une méthode populaire dans le milieu agricole. De plus, les propriétés physicochimiques des néonicotinoïdes, telles le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ), confèrent aux néonicotinoïdes leur systémicité et persistance dans l'environnement. Le coefficient de partage octanol/eau est une mesure de la capacité d'une substance à pénétrer des membranes biologiques. Cette capacité est notamment illustrée par le  $K_{ow}$ , qui, compris entre 0.1 et 5,4 environ, dénote un caractère systémique significatif chez les composés lipophiles neutres (Bonmatin *et al.*, 2015, Trapp, 2004). Dans le cas de l'imidaclopride et du thiaclopride, par exemple, les valeurs de  $K_{ow}$  sont de 0,57 et 1,26, respectivement (Bonmatin *et al.*, 2015). Ce caractère systémique pourrait expliquer les résultats d'une étude récente menée à Boston aux États-Unis, qui a démontré qu'au moins un néonicotinoïde est détecté dans tous les fruits et légumes achetés en supermarchés, et qu'au moins deux néonicotinoïdes étaient présents dans 72% des aliments achetés (Chen *et al.*, 2014). Une seconde caractéristique physico-chimique démontrant la persistance des néonicotinoïdes est leur demi-vie. Pour l'imidaclopride, la demi-vie dans le sol peut atteindre 1250 jours (Main *et al.*, 2014). L'application répétée des néonicotinoïdes ou leur utilisation en enrobage de semence explique l'accumulation de ces composés dans le sol et les eaux de surfaces (Main *et al.*, 2014, Stokstad, 2013).

### 1.3.3.2 Exposition chez les populations humaines et effets comme perturbateurs endocriniens

De par la supposée toxicité sélective des pesticides néonicotinoïdes pour les invertébrés, mise de l'avant par l'industrie agro-chimique, la toxicité de ces composés chez les populations humaines a été largement sous-étudiée. Cette constatation est encore plus parlante puisque la grande majorité des études s'étant penchées sur l'effet des néonicotinoïdes chez l'humain l'ont étudiée dans un contexte d'intoxication aiguë et d'empoisonnement (David *et al.*, 2007, Mohamed *et al.*, 2009). Les études démontrant les mécanismes d'action et le potentiel de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes à des concentrations retrouvées dans l'environnement manquent cruellement, et ne sont donc pas prises en considération dans l'établissement des politiques entourant la production, la vente et l'utilisation de ces insecticides.

Les seules études de biomonitoring des néonicotinoïdes chez l'humain ont été effectuées au Japon. L'étude de Nomura et collègues (2013) s'est faite grâce à la participation d'une cohorte de 147 agriculteurs. Chez ces derniers, des métabolites des néonicotinoïdes ont été détectés dans 100% des échantillons (Nomura *et al.*, 2013), ce qui démontre l'exposition des populations humaines aux néonicotinoïdes, tout spécialement dans les régions agricoles. Une seconde étude parue en 2015 a mesuré plusieurs néonicotinoïdes dans l'urine de 95 femmes japonaises (âgées entre 45 et 75 ans) entre 1994 et 2011. Cette étude a démontré que les concentrations de néonicotinoïdes ont augmenté significativement durant cette période. Dans le cas du thiaclopride, du thiaméthoxame et de l'imidaclopride, les concentrations urinaires en 2011 atteignaient un maximum d'environ 0,01 µM, 0,02 µM et 0,01 µM, respectivement (Ueyama *et al.*, 2015). Le peu d'études qui ont investigué les effets des néonicotinoïdes sur le système endocrinien ont démontré leurs effets sur l'apoptose et la fragmentation de l'ADN séminal chez des rats mâles exposés via l'alimentation à 2 mg/kg/jour d'imidaclopride pendant 90 jours (Bal *et al.*, 2012). Chez des rats femelles exposées à l'imidaclopride via l'alimentation à une concentration de 20

mg/kg/jour, un effet significatif sur le poids des ovaires et sur les niveaux de plusieurs hormones sexuelles clés ont été dénotés (Kapoor *et al.*, 2011). Il a également été démontré par simulation *Docking* que l'imidaclopride pouvait se lier au site actif des récepteurs de l'hormone thyroïdienne en formant des ponts hydrogènes et ainsi altérer son fonctionnement (Bhaskar *et al.*, 2014). De plus, des souris exposées à l'imidaclopride et au fongicide mancozeb présentaient des niveaux plasmatiques plus bas d'hormones thyroïdiennes et une augmentation du cholestérol (Bhaskar *et al.*, 2014). L'équipe de Bhaskar et collègues (2014) a utilisé de faibles concentrations d'imidaclopride et de mancozeb, soit 0,5% de la dose létale médiane (LD<sub>50</sub>) établie à 131 mg/kg et 8000 mg/kg, respectivement (Cox, 2001). Des résultats similaires ont également été observés chez l'oiseau *Amandava amandava*, où les niveaux plasmatiques d'hormone thyroïdienne T3 et de thyrostimuline TSH étaient aussi diminués suite à une exposition à l'imidaclopride via l'alimentation à une concentration de 0,5% de la LD<sub>50</sub> pendant 30 jours (Pandey *et al.*, 2015).

Il serait possible que les néonicotinoïdes soient de potentiels carcinogènes et perturbateurs endocriniens grâce à leur ressemblance structurale avec la nicotine. En effet, il a été démontré que la nicotine et le 17β-œstradiol avaient tous les deux la capacité d'activer le récepteur aux œstrogènes dans des modèles cellulaires de cancer du sein (Lee *et al.*, 2011). Ce dernier se liait ensuite au site de liaison AP1 du promoteur du récepteur de l'acétylcholine de type nicotinique α9-nAChR, ce qui avait pour effet d'en augmenter l'expression (Ho *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2011). Finalement, les rôles du récepteur nAChR dans la carcinogenèse ont été soulignés, notamment par son effet sur la prolifération cellulaire, l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que la promotion de l'angiogenèse (Pepper *et al.*, 2017, Schuller, 2009, Zhao, 2016). Il se

pourrait donc que les néonicotinoïdes aient des effets similaires à la nicotine et au 17 $\beta$ -œstradiol sur le récepteur  $\alpha$ 9-nAChR.

## 1.4 Modèles d'étude

### 1.4.1 Cancer du sein

Trois modèles *in vitro* sont utilisés afin d'étudier l'expression de l'aromatase via des promoteurs impliqués dans le cancer du sein. Le premier modèle est la lignée cellulaire H295R, largement utilisée dans l'étude de la stéroïdogénèse. Cette lignée d'adénocarcinome surrénalien est un excellent modèle dans l'étude de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans le contexte du cancer du sein hormono-dépendant, puisqu'elle exprime toutes les enzymes de la stéroïdogénèse (Gazdar *et al.*, 1990, Hilscherova *et al.*, 2004, Rainey *et al.*, 1994, Sanderson, 2009a, Zhang *et al.*, 2005). De plus, les promoteurs PII et I.3 de l'aromatase, activés dans cette pathologie, sont présents dans les cellules H295R (Sanderson *et al.*, 2004) (voir section 1.3.1 et 1.3.2). Les cellules H295R sont également un modèle approuvé par l'*Organization for Economic Cooperation and Development* comme outil de détection des contaminants altérant la stéroïdogénèse (OECD, 2011).

Deuxièmement, les cellules endothéliales primaires de cordon ombilical HUVEC ont été sélectionnées comme modèle potentiel puisqu'il a été stipulé que ces cellules expriment l'aromatase via le promoteur endothélial I.7 (Alvarez-Garcia *et al.*, 2013), promoteur activé dans le cancer du sein hormono-dépendant et qui pourrait être impliqué dans l'angiogenèse de cette pathologie (voir section 1.3.2). Ce modèle a également été sélectionné puisque les cellules primaires représentent souvent de façon plus réaliste l'expression génique.

Troisièmement, la lignée cellulaire cancéreuse du sein triple-négative Hs578t a été sélectionnée comme modèle *in vitro* de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase. Ces cellules sont dérivées d'une tumeur épithéliale d'une patiente de 74 ans (Hackett *et al.*, 1977). Il est connu que les cellules épithéliales cancéreuses du sein n'expriment normalement pas, ou très peu, l'aromatase (voir sections 1.2.4, 1.3.1 et 1.3.2). Or, l'expression de l'aromatase a été précédemment observée dans des cellules cancéreuses triple-négative, plus particulièrement dans la lignée MDA-MB-231. Précisément, l'aromatase est exprimé dans ces cellules majoritairement via le promoteur I.4 normalement actif dans les cellules fibroblastiques et adipeuses de la glande mammaire (voir section 1.3.2) (Holloway *et al.*, 2013, Su *et al.*, 2008). Comme la lignée Hs578t est aussi triple-négative, nous l'avons sélectionné afin de pouvoir investiguer l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase via le promoteur normal I.4, et possiblement via les promoteurs impliqués dans la surexpression de l'aromatase dans le micro-environnement tumoral (PII, I.3 et I.7) (Figure 1-12). L'utilisation de ces trois modèles cellulaires a pour objectif de mesurer l'effet de concentrations retrouvées dans l'environnement de pesticides néonicotinoïdes sur l'activité de tous les promoteurs impliqués dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant. Les caractéristiques de chacune des trois lignées cellulaires ainsi que l'état de la littérature scientifique sur l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans ces lignées sont résumées au tableau 1.3.



**Tableau 1.3 : Caractéristiques, tissu et pathologie de provenance, type cellulaire et expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans trois lignées cellulaires sélectionnées comme modèles pertinents dans le contexte du cancer du sein hormono-dépendant**

<b>Modèle in vitro</b>	<b>H295R</b>	<b>HUVEC</b>	<b>Hs578t</b>
<b>Tissu</b>	Glandes surrénales	Cordon ombilical	Glande mammaire
<b>Pathologie et type cellulaire</b>	Adénocarcinome/ épithéliale	Aucune/ endothéliale	Carcinome/ épithéliale
<b>Expression de CYP19</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Promoteurs de CYP19</b>	PII, I.3	I.7 (selon une étude d'Alvarez-Garcia <i>et al.</i> )	Aucune donnée dans la littérature

#### 1.4.2 Grossesse

Afin de déterminer l'effet des pesticides néonicotinoïdes sur l'activité de l'aromatase et la production hormonale durant la grossesse, nous avons utilisé un modèle de co-culture mimant l'unité fœto-placentaire, développé par Andrée-Anne Hudon-Thibeault sous la direction de Cathy Vaillancourt et Thomas Sanderson. Cette co-culture est constituée de cellules placentaires trophoblastiques BeWo et des cellules H295R, qui possèdent certaines caractéristiques fœtales (Hecker *et al.*, 2008, Sanderson, 2009b, Sanderson *et al.*, 2000). Ce modèle de co-culture produit *de novo* toutes les hormones de la stéroïdogénèse, ainsi que certaines hormones associées à la grossesse telles la  $\beta$ -hormone chorionique gonadotrope humaine ( $\beta$ -hCG) et l'œstriol, œstrogène uniquement produit pendant la grossesse (voir section 1.1.1.2) (Hudon Thibeault *et al.*, 2014). L'utilisation de cette co-culture fœto-placentaire en tant qu'outil de criblage pour la détection de la perturbation de l'activité de l'aromatase et de la production hormonale a également été validée (Hudon Thibeault *et al.*, 2017), ce qui en fait un outil de choix dans le contexte présent. Les caractéristiques de la co-culture fœto-placentaire et des deux lignées cellulaires la constituant,

ainsi que l'état de littérature scientifique sur l'expression de l'aromatase et de l'enzyme Cytochrome P450 3A7 (CYP3A7), nécessaire à la production d'œstriol, sont résumées au tableau 1.4.

**Tableau 1.4 : Caractéristiques, tissu et pathologie de provenance, type cellulaire et expression de l'aromatase et de CYP3A7 dans les lignées cellulaires H295R et BeWo formant le modèle de co-culture fœto-placentaire, utilisée modèle pertinent dans le contexte de la stéroïdogénèse pendant la grossesse**

<b>Modèle in vitro</b>	<b>H295R</b>	<b>BeWo</b>	<b>Co-culture</b>
<b>Tissu</b>	Glandes surrénales	Placenta	Unité fœto-placentaire
<b>Pathologie et type cellulaire</b>	Adénocarcinome/ Epithéliale, caractéristiques fœtales	Choriocarcinome/ trophoblaste	
<b>Expression de CYP19</b>	Oui Via PII et I.3	Oui Via I.1 et I.8	Oui
<b>Expression de CYP3A7</b>	Potentiellement, mais aucune donnée dans la littérature	Aucune donnée dans la littérature	Potentiellement, de par la production d'œstriol

## 1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

### 1.5.1 Hypothèse

Il est connu que les promoteurs PII, I.3, et I.7 sont activés et induisent une surexpression de l'aromatase, et donc une synthèse importante d'œstrogènes, dans le micro-environnement de la tumeur mammaire (Bulun *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2009). La liaison au récepteur de VEGF, surexprimé dans les cellules cancéreuses du sein, pourrait mener à l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'activité anormale de ces promoteurs (Cross *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2015). Il est aussi connu que l'activité du promoteur I.4, normalement présente dans les

fibroblastes de la glande mammaire saine, est inhibée lors du développement du cancer du sein hormono-dépendant (Agarwal *et al.*, 1996, Harada *et al.*, 1993).

De plus, nous savons que l'expression de l'aromatase, en particulier via les promoteurs I.1 et I.8, est présente dans le placenta et que la production d'œstrogènes durant la grossesse est au cœur de plusieurs processus physiologiques clés, tels la différenciation cellulaire du syncytiotrophoblaste ainsi que la mise en place de la circulation utéro-placentaire (Yashwanth *et al.*, 2006). Dans les contextes du cancer du sein hormono-dépendant et de la grossesse, l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase joue un rôle clé dans le maintien d'une synthèse adéquate d'œstrogènes.

Conséquemment, notre hypothèse de recherche est que certains pesticides néonicotinoïdes, dont le potentiel de perturbateur endocrinien a déjà été démontré lors d'étude *in vivo* (Bal *et al.*, 2012, Kapoor *et al.*, 2011) perturbent l'expression de l'aromatase via ces mêmes promoteurs. Nous croyons que l'exposition des populations humaines aux pesticides néonicotinoïdes, démontrée dans la récente littérature, pourrait constituer un facteur de risque non-négligeable 1) lors du développement de pathologie hormono-dépendante comme le cancer du sein, et/ou 2) influencer le développement placentaire ou fœtal lors de la grossesse, où la synthèse des œstrogènes jouent un rôle clé.

### **1.5.2 Objectifs**

Notre **objectif général** est de créer des outils de détection sensibles de la perturbation de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase en présence de concentrations retrouvées dans l'environnement de pesticides néonicotinoïdes.

Nous avons comme objectifs spécifiques de :

- 1) Mettre au point des méthodes de Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-qPCR) afin de caractériser l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans plusieurs lignées cellulaires humaines (H295R, HUVEC, Hs578t, BeWo);
- 2) Caractériser l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans plusieurs lignées cellulaires humaines (H295R, HUVEC, Hs578t, BeWo) exposées à des pesticides néonicotinoïdes dont nous ne détenons pas d'information quant à leurs effets sur l'expression de l'aromatase
- 3) Caractériser l'effet des pesticides néonicotinoïdes sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle de co-culture mimant l'unité fœto-placentaire
- 4) Déterminer les voies de signalisations impliquées dans la perturbation de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase

Deux objectifs spécifiques de moindre importance sont également investigués et sont présentés aux annexes 2 et 3:

- 5) Caractériser l'activation des promoteurs de l'aromatase individuellement, dans une lignée cellulaires transfectée avec le gène rapporteur de luciférase non-exposée et exposée à des pesticides néonicotinoïdes
- 6) Déterminer l'effet du glyphosate et de sa formulation commerciale Roundup sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle de co-culture mimant l'unité fœto-placentaire

## 1.6 Importance du projet

Une compréhension plus approfondie du comportement de pesticides néonicotinoïdes pourrait mener, par exemple, à de meilleures prises de décisions quant aux niveaux acceptables d'exposition à ces substances et leur utilisation en agriculture. De plus, puisque l'aromatase est un enzyme clé dans le développement de cancer du sein de type hormono-dépendant et que son expression dans le placenta est au cœur de plusieurs processus physiologiques importants durant la grossesse, une connaissance fondamentale de son expression permettra sans doute une compréhension plus exhaustive de son rôle dans ces différents contextes. Finalement, l'impact des contaminants environnementaux sur l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase n'a été que peu étudié, quoi que cet événement génique en soit un de première importance dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant et dans le bon fonctionnement du placenta.

Il est également à noter qu'au Canada, les politiques entourant l'homologation des pesticides chimiques n'incluent pas l'évaluation de la perturbation endocrinienne de ces composés. La toxicité développementale est évaluée en mesurant l'incidence de malformations chez des rongeurs. Quant au pouvoir cancérogène de ces substances, il est évalué à l'aide de tests *in vitro* permettant d'identifier les mutations induites par une exposition à la substance d'intérêt (Gouvernement du Canada, 2005).

À ce jour, il n'existe pas d'outils biologiques de détection de la perturbation de l'expression promoteur-spécifique l'aromatase. Plus précisément, un outil de détection permettant d'observer le profil d'activation des promoteurs de l'aromatase, en particulier le changement d'utilisation des promoteurs observé lors de cancer du sein hormono-dépendant, serait une avancée intéressante en toxicologie aussi bien qu'en oncologie. Le développement et

la validation de ce genre d'outils sont donc particulièrement intéressants, et permettront d'analyser les effets de plusieurs contaminants émergents auxquels nous sommes exposés de façon quotidienne.

### **1.6.1 Outils de détection existants**

Certains contaminants environnementaux ont la capacité de modifier la synthèse d'œstrogènes par divers mécanismes, par exemple en stimulant l'activité d'enzymes de la stéroïdogénèse, comme l'aromatase (Fan *et al.*, 2007a, Maffini *et al.*, 2006, Mavridis *et al.*, 2010, Sanderson *et al.*, 2001). Plusieurs bioessais ont été développés afin d'identifier des substances interagissant avec les récepteurs des œstrogènes (Huovinen *et al.*, 2013, Rogers *et al.*, 2000, Wehmas *et al.*, 2011). Par exemple, des bioessais développés par un de nos collaborateurs, Dr. Denison (Université de Californie à Davis) permettent de cibler les contaminants perturbant l'activité des certains récepteurs. Notamment, son laboratoire a publié de nombreux articles sur des techniques tels les bioessais *Chemical-Activated Luciferase Gene Expression* (CALUX). Cet outil de détection permet d'identifier le potentiel toxique de certains composés pouvant activer les récepteurs des hydrocarbures aromatiques (récepteur aryl hydrocarbure (AhR)) (Murk *et al.*, 1996, Windal *et al.*, 2005). Également, des systèmes de gènes rapporteurs de luciférase sont couramment utilisés pour déterminer l'effet de plusieurs contaminants sur l'activité de récepteurs clés, comme les REs ou AhR (Rogers *et al.*, 2000, Wilson *et al.*, 2004). Grâce à ces systèmes de gène rapporteur, il a été démontré que le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) avait la capacité d'induire des changements cellulaires en se liant et en activant le récepteur AhR (He *et al.*, 2011). Le système de gène rapporteur de luciférase a été utilisé dans plusieurs lignées cellulaires humaines afin de déterminer le potentiel de certaines substances à induire l'activité de la luciférase étant contrôlée par des éléments de l'ADN spécifiques aux œstrogènes. Ces travaux

ont pu démontrer l'effet œstrogénique des BPC (Rogers *et al.*, 2000). Notre laboratoire a également développé un modèle de souris bioluminescente exprimant le gène de luciférase sous le contrôle du promoteur de l'aromatase PII. Cet outil efficace a permis de déterminer que l'atrazine semblait induire l'activité du promoteur PII chez certains individus mâles, en particulier dans l'épididyme (Rivest *et al.*, 2010). Il est possible de constater qu'un certain nombre d'outils de détection de la perturbation de récepteurs sont efficaces. Par contre, peu d'outils sont disponibles afin d'identifier les contaminants pouvant stimuler l'expression de l'aromatase. La complexité de l'expression de l'aromatase, régulée par plusieurs promoteurs spécifiques à chaque tissu, demeure un défi de taille à la création de ces outils.

**CHAPITRE 2 : EFFECTS OF NEONICOTINOIDS ON PROMOTER-SPECIFIC EXPRESSION AND ACTIVITY OF AROMATASE (CYP19) IN HUMAN ADRENOCORTICAL CARCINOMA (H295R) AND PRIMARY UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL (HUVEC) CELLS**

**Effets des pesticides néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique et l'activité de l'aromatase (CYP19) dans des cellules humaines d'adénocarcinome surrénalien (H295R) et dans des cellules endothéliales primaires provenant de cordon ombilical (HUVEC)**

*Élyse Caron-Beaudoin<sup>a</sup>, Michael S. Denison<sup>b</sup> and J. Thomas Sanderson<sup>a\*</sup>*

<sup>a</sup> INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, CANADA

<sup>b</sup> Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis, CA

\* Auteur-ressource

L'article a été soumis à la revue **Toxicological Sciences** le 11 juin 2015. Il a été publié électroniquement le 12 octobre 2015.



## 2.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs

Élyse Caron-Beaudoin : L'étudiante a contribué à l'élaboration du projet de recherche ainsi qu'à l'établissement des méthodologies. L'étudiante a réalisé toutes les expériences en laboratoire ainsi que l'analyse des résultats. Elle a rédigé l'article et les corrections subséquentes.

Michael Denison : Dr. Denison est le chercheur principal d'un projet de recherche financé par le California Breast Cancer Research Program qui a financé une partie de la recherche présentée dans cet article. Il a également contribué à l'élaboration du projet de recherche.

Thomas Sanderson : Dr. Sanderson a contribué à l'élaboration du projet de recherche ainsi qu'à son financement. Avec l'étudiante, il a travaillé à l'élaboration des méthodes et a révisé l'article ainsi que les corrections.

## 2.2 Résumé

L'expression de l'enzyme aromatase (CYP19 ; cytochrome P450 19) chez les humains est régulée de façon tissu et promoteur-spécifique. Dans le cancer du sein hormono-dépendant, l'aromatase est surexprimée via l'activation de plusieurs promoteurs normalement inactifs dans la glande mammaire (PII, I.3 et I.7). L'aromatase est une enzyme clé de la synthèse des œstrogènes, qui stimulent la prolifération des cellules cancéreuses du sein. L'aromatase est également exprimée dans le placenta via le promoteur I.1, où les œstrogènes sont primordiaux pour le maintien de la grossesse. L'exposition à certains pesticides, comme l'atrazine, augmente l'expression de *CYP19*, mais peu d'étude se sont penchées sur les effets des pesticides néonicotinoïdes sur cette enzyme. Nous avons développé une méthode sensible de PCR quantitatif en temps réel afin de détecter l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* dans des

cellules humaines d'adénocarcinome surrénalien (H295R) ainsi que dans des cellules endothéliales primaires du cordon ombilical (HUVEC). Par cette méthode, nous avons déterminé l'effet de l'atrazine et de trois néonicotinoïdes couramment utilisés (imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxame), sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19*. Dans les cellules H295R, l'atrazine a augmenté de façon dose-dépendante l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII et I.3, ainsi que l'activité catalytique de l'aromatase. Le thiaclopride et le thiaméthoxame ont induit l'expression de *CYP19* via PII et I.3 ainsi que l'activité catalytique de l'aromatase à des concentrations relativement basses (0.1-1.0  $\mu\text{M}$ ) de façon non-monotone, démontrant peu d'effet sur l'expression et l'activité de *CYP19* à des concentrations plus élevées. Dans les cellules HUVEC, l'atrazine a induit de façon modeste l'expression de *CYP19* (30 $\mu\text{M}$ ) ainsi que l'activité de l'aromatase ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ), sans toutefois que cet effet ne soit médié par une action sur le promoteur placentaire I.1. Aucun des pesticides néonicotinoïdes testés n'a augmenté l'expression ou l'activité de l'aromatase dans les cellules HUVEC. Considérant l'importance de la (sur)expression de l'aromatase de façon promoteur-spécifique dans certaines maladies hormono-dépendantes (cancer du sein) ou pendant la grossesse, nos outils de détection précis utilisant la PCR quantitative en temps réel seront utiles afin de mesurer les risques que peuvent poser les néonicotinoïdes et autres contaminants chez les femmes.

**Mots clés:** néonicotinoïdes, aromatase, promoteur-spécifique, *CYP19*, H295R, HUVEC

## 2.3 Abstract

The enzyme aromatase (CYP19; cytochrome P450 19) in humans undergoes highly tissue- and promoter-specific regulation. In hormone-dependent breast cancer, aromatase is over-expressed via several normally inactive promoters (PII, I.3, I.7). Aromatase biosynthesizes estrogens, which stimulate breast cancer cell proliferation. The placenta produces estrogens required for healthy pregnancy and the major placental *CYP19* promoter is I.1. Exposure to certain pesticides, such as atrazine, is associated with increased *CYP19* expression, but little is known about the effects of neonicotinoid insecticides on *CYP19*. We developed sensitive and robust RT-qPCR methods to detect the promoter-specific expression of *CYP19* in human adrenocortical carcinoma (H295R) and primary umbilical vein endothelial (HUVEC) cells, and determined the potential promoter-specific disruption of *CYP19* expression by atrazine and the commonly used neonicotinoids imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam. In H295R cells, atrazine concentration-dependently increased PII- and I.3-mediated *CYP19* expression and aromatase catalytic activity. Thiacloprid and thiamethoxam induced PII and I.3-mediated *CYP19* expression and aromatase activity at relatively low concentrations (0.1-1.0  $\mu\text{M}$ ), exhibiting non-monotonic concentration-response curves with a decline in gene induction and catalytic activity at higher concentrations. In HUVEC cells, atrazine slightly induced overall (promoter-indistinct) *CYP19* expression (30  $\mu\text{M}$ ) and aromatase activity ( $\geq 3$   $\mu\text{M}$ ), without increasing I.1 promoter activity. None of the neonicotinoids increased *CYP19* expression or aromatase activity in HUVEC cells. Considering the importance of promoter-specific (over)expression of *CYP19* in disease (breast cancer) or during sensitive developmental periods (pregnancy), our newly developed RT-qPCR methods will be helpful tools in assessing the risk that neonicotinoids and other chemicals may pose to exposed women.

**Keywords:** neonicotinoids, aromatase, promoter-specific, CYP19, H295R, HUVEC

## 2.4 Introduction

Neonicotinoids are members of a relatively new class of neuro-active insecticides that are used as seed coatings in large quantities to protect crops against pest (Tomizawa *et al.*, 2005). Neonicotinoids are registered in 120 countries and their use is steadily increasing (Jeschke *et al.*, 2010), especially in corn, canola, soybeans and the majority of fruits and vegetables. The insecticidal action of neonicotinoids is based on their relatively high selectivity for nicotinic receptors in insects, where they act as an agonist of the postsynaptic acetylcholine receptor (Matsuda *et al.*, 2001). Among the most commonly used neonicotinoids are imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam (Jeschke *et al.*, 2010).

Neonicotinoids have been associated with *Colony Collapse Disorder* of honey bees (Girolami *et al.*, 2009, Henry *et al.*, 2012b). Neonicotinoids are systemic insecticides, which means they are soluble in water and absorbed by the tissues of the plant, and bees can be exposed to these chemicals through nectar and pollen (Rortais *et al.*, 2005). An exposure to a non-acutely lethal dose of thiamethoxam and imidacloprid causes a delayed onset of increased mortality in honey bees (Henry *et al.*, 2012) and a decrease in their foraging activity (Decourtye *et al.*, 2004). Neonicotinoids are also toxic to birds and mammals. For example, imidacloprid (2 and 8 mg/kg/day) adversely affects the reproductive system of male rats, by inducing DNA fragmentation, antioxidant imbalance and apoptosis (Bal *et al.*, 2012). Moreover, epididymal weight and sperm concentration were lower in imidacloprid exposed rats (Bal *et al.*, 2012). An exposure of female rats to imidacloprid (20 mg/kg/day) caused a decrease in ovarian weight, induced changes in granulosa cells of follicles (cytoplasmic clumping, lipofuscin accumulation)

and altered levels of luteinizing and follicle stimulating hormones and progesterone (Kapoor *et al.*, 2011). Daily oral administration of the neonicotinoid clothianidin to female quails caused abnormal ovarian histology of the granulosa cells and a decrease in glutathione peroxidase 4 and manganese superoxide dismutase, two enzymes that protect against oxidative stress (Hoshi *et al.*, 2014). Furthermore, a 30-day exposure to thiacloprid (112.5 mg/kg) increased the serum levels of free thyroxine and triiodothyronine in rats (Sekeroglu *et al.*, 2014), demonstrating the endocrine disrupting potential of this class of pesticides. Given these observations and the increasing use of neonicotinoids, a much better understanding of their potential effects on human health is needed.

In North America, breast cancer represents a third of all female cancer diagnoses (OMS, 2013) and 70 % of breast cancers are estrogen-dependent. In the majority of these cancers, the enzyme aromatase (CYP19) is over-expressed. CYP19 is responsible for the biosynthesis of estrogens, which stimulate the proliferation of estrogen-dependent breast cancer cells (Ghosh *et al.*, 2009). CYP19 is present in a variety of tissues and its gene expression is regulated by different tissue-specific promoters. In normal breast tissue, aromatase is expressed at a low level via the *CYP19* promoter I.4. However, in breast cancer, *CYP19* promoters pII, I.3 and I.7 become active, whereas they are silent in the healthy mammary gland (Bulun *et al.*, 2007). There is evidence that exposure to endocrine disruptors may increase the risk of developing hormone-dependent breast cancer via pro-estrogenic mechanisms (Birnbaum *et al.*, 2003), although focus has been mainly on estrogen receptor activation (Bouskine *et al.*, 2009, Lemaire *et al.*, 2006). Effects on aromatase and consequences for human health are less well understood. It has been demonstrated that exposure to atrazine, a widely used herbicide, induces aromatase expression and estrogen biosynthesis in certain human cell lines (Hudon Thibeault *et al.*, 2014, Sanderson *et*

*al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001), but the effects of chemicals on the promoter- and tissue-specific expression of aromatase are largely unknown. In placenta, *CYP19* is expressed mainly via the placenta-specific promoter I.1, and the estrogens produced are essential for proper development of placenta and foetus (Albrecht *et al.*, 2010, Bukovsky *et al.*, 2003).

In this study we developed quantitative real-time PCR techniques to determine the effects of neonicotinoids on *CYP19* gene expression via the breast cancer-relevant promoters PII and I.3, and the pregnancy-relevant placental promoter I.1, using two model human cell lines, adrenocortical carcinoma cells (H295R) and primary umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

## **2.5 Materials and methods**

### **2.5.1 Pesticides**

All pesticides were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO) (atrazine Pestanal® #45330, purity > 99 %; thiacloprid Pestanal® #37905 purity > 99 %; thiamethoxam Pestanal® #37924, purity > 99 %; imidacloprid Pestanal® #37894, purity > 99 %) and were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) as 100 mM stock solutions.

### **2.5.2 *In vitro* models**

The H295R cell line was selected for this study since it expresses all enzymes required for steroidogenesis *de novo* (Gazdar *et al.*, 1990, Hilscherova *et al.*, 2004, Rainey *et al.*, 1994, Sanderson, 2009a, Zhang *et al.*, 2005) and the expression of *CYP19* in this cell line is regulated by two breast cancer-relevant promoters (PII and I.3) (Sanderson *et al.*, 2004), making it a suitable model for the study of *CYP19* expression and aromatase activity. It is also approved by the Organization for Economic Cooperation and Development as a tier 1 screening tool for

chemically induced disruption of steroidogenesis (OECD). HUVEC cells were selected, because they were reported to express *CYP19* by its endothelial promoter I.7 (Alvarez-Garcia *et al.*, 2013) and have never been evaluated for additional *CYP19* promoter activities. Moreover, HUVEC are primary cells and are more likely to have a realistic regulation of promoter-specific *CYP19* expression.

### **2.5.3 Cell culture**

H295R cells (ATCC no. CRL-2128) were obtained from the American Type Culture Collection. H295R cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F-12 nutrient mix (DMEM/F12) containing 365 mg/ml of L-glutamine. Medium was completed with ITS+ Premix (Fisher Scientific, Waltham, MA) (final concentration in medium: 6.25 µg/ml insulin; 6.25 µg/ml transferrin; 6.25 ng/ml selenium; 1.25 mg/ml bovine serum albumin; 5.35 µg/ml linoleic acid) and Nu-serum (VWR International, Radnor, PA) at a final concentration of 2.5 %. Primary HUVEC (ATCC no. PCS-100-010) cells were obtained from the American Type Culture Collection. Primary HUVEC cells were cultured in Vascular Cell Basal Medium completed with the Endothelial Cell Growth Kit-VEGF (ATCC no. PCS-100-041). Complete growth medium contained 5 ng/ml recombinant human (rh) VEGF, 5 ng/ml rh EGF, 5 ng/ml rh-FGF basic, 15 ng/ml rh-IGF-1, 10 mM L-glutamine, 0.75 units/ml heparin sulfate, 1 µg/ml hydrocortisone, 2 % fetal bovine serum and 50 µg/ml ascorbic acid.

### **2.5.4 Cell viability**

The toxicity of atrazine and the neonicotinoids to H295R and HUVEC was determined using a WST-1 kit (Roche, Basel, Switzerland) which measures mitochondrial reductase activity of viable cells. H295R and primary HUVEC cells were plated in 96-well plates ( $5 \times 10^3$  cells/well) in

their appropriate culture medium for 24 h. After this acclimatization period, cells were exposed to fresh medium containing increasing concentrations of atrazine, thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid for another 24 h. Cells were then incubated with WST-1 substrate for 1.5 h and the formation of formezan was then measured using the absorbance at 440 nm with SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Each experiment was conducted in triplicate and repeated twice using different cell passages.

### **2.5.5 RNA isolation and amplification by quantitative RT-PCR**

Real-time quantitative PCR (qPCR) is a well-established method used to determine gene expression levels. Strong RNA quality control, primer design and choice of reference genes (Taylor *et al.*, 2010) are the key to achieving valid results. Therefore, careful consideration was given to the experimental design and qPCR validation. H295R and primary HUVEC cells were cultured in CellBind 6-well plates (Corning Incorporated, Corning, NY) (750,000 cells/well) containing 2 ml medium/well for 24 h. Cells were then exposed for 24 h to the various pesticides. Forskolin (Sigma-Aldrich) was used as a positive control for activation of PII- and I.3 promoter-mediated *CYP19* gene expression and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) for I.1 promoter activation. DMSO vehicle (0.1 %) was used as negative control. The 24 h exposure time was selected based on preliminary time-response experiments (0, 12, 24, 48 and 72 h) using forskolin, PMA, atrazine and imidacloprid, which demonstrated that maximal (promoter-specific and promoter-indistinct) *CYP19* gene expression occurred at 24 h. RNA was isolated using an RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, ON) according to the enclosed instruction, and stored at -80 °C. Purity of the RNA samples was determined using the 260 nm/280 nm absorbance ratio. Reverse transcription was performed using 0.5 µg of RNA with an



iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) and T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany); resultant cDNA was stored at -20 °C.

Primer pairs were designed to amplify mRNA species containing an untranslated 5' region uniquely derived from each of the promoters (pII, I.3, I.4 and I.7) utilized for *CYP19* gene expression; a primer pair designed to recognize only the coding region (exons II-X) was used to amplify overall (promoter non-distinct) *CYP19* transcript. All the primer pairs were analyzed with Blast and Primer-Blast to ensure that the target sequences were unique to the gene or promoter region in question and that the product length was between 75-150 bp (Taylor *et al.*, 2010). Real-time quantitative PCR was performed using EvaGreen MasterMix (BioRad) with CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad) (95 °C for 5 min; 40 cycles of 95 °C for 5 sec and 60 °C for 15 sec). Standard curves for amplification by each primer pair to ensure an efficiency between 90 % and 110 % and  $r^2$  value greater than 0.95 (Table 2.1; only PII, I.3 and I.1 promoter activity was detected in our cell models). Each experiment was conducted in triplicate and repeated twice using different cell passages.

**Table 2.1: Primer pairs sequences used for amplification of promoter-specific *CYP19* expression and their amplification characteristics in H295R and primary HUVEC cells**

<i>CYP19</i> promoter	Primer pairs (5'-3')	Amplification characteristics	Tissue-specific expression	Reference and accession number
<b><i>CYP19</i>-coding region</b>	Fw: TGTCTCTTTGTTCTTCATGCTATTTCTC Rv: TCACCAATAACAGTCTGGATTTCC	H295R cells: Standard curve: $r^2 = 0.980$ Efficiency: 101.0 % HUVEC cells: Standard curve: $r^2 = 0.995$ Efficiency: 110.0 %	Detects all aromatase transcripts regardless of promoter utilized.	(Sanderson <i>et al.</i> , 2000) <i>M22246</i>
<b><i>CYP19</i>-I.1</b>	Fw: GGATCTTCCAGACGTCGCGA Rv: CATGGCTTCAGGCACGATGC	HUVEC cells: $r^2: 0.966$ Efficiency: 94.3 %	Placenta-specific aromatase transcript.	Klempan <i>et al.</i> (2011) <i>NM_000103</i>
<b><i>CYP19</i>-PII</b>	Fw: TCTGTCCCTTTGATTTCCACAG Rv: GCACGATGCTGGTGATGTTATA	H295R cells: Standard curve: $r^2 = 0.977$ Efficiency: 108.5 %	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients	Heneweer <i>et al.</i> (2004) <i>S52794</i>
<b><i>CYP19</i>-I.3</b>	Fw: GGGCTTCCTTGTTTTGACTTGTA Rv: AGAGGGGGCAAT TTAGAGTCTGTT	H295R cells Standard curve: $r^2 = 0.960$ Efficiency: 102.7 %	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients	Wang <i>et al.</i> (2008) <i>D30796</i>

For each pesticide and cell line, two suitable reference genes were included for normalization of *CYP19* gene expression (Table 2.2). Widely used reference genes such as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH), 18S or  $\beta$ -actin are not always suitable, since their expression can be highly variable dependent on experimental conditions (Aerts *et al.*, 2004, Radonić *et al.*, 2004). In our case, it is crucial to evaluate the stability of the expression of different potential reference genes in each cell type and for each treatment. We determined suitable reference genes using the geNorm algorithm method (Biogazelle qbase Plus software, Zwijnaarde, Belgium) to calculate the target stability for each given condition (Taylor *et al.*, 2010). All reference genes met the criterion for gene expression stability of having an (*M*) value below 0.5.

**Table 2.2 : Primer pair sequences of reference genes used to normalize *CYP19* gene expression for each pesticide treatment in H295R and primary HUVEC cells**

Cell type	Reference genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<b><u>Atrazine</u></b>			
H295R	UBC	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT
	PBGD	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
HUVEC	RPII	GCACCACGTCCAATGACAT	GTGCGGCTGCTTCCATAA
	PBGD	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
<b><u>Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam</u></b>			
H295R	RPII	GCACCACGTCCAATGACAT	GTGCGGCTGCTTCCATAA
	RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACCACAGCCTTC
HUVEC	UBC	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT
	RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACCACAGCCTTC

Ubiquitin C (UBC); Porphobilinogen deaminase (PBGD); RNA polymerase II (RPII); 60S acidic ribosomal protein P0 (RPLP0).

### **2.5.6 Aromatase catalytic activity**

Aromatase activity was measured using a tritiated water-release assay as described previously (Lephart *et al.*, 1991, Sanderson *et al.*, 2000). Briefly, H295R and primary HUVEC cells were cultured in 24-well plates (250,000 or 400,000 cells/well, respectively) containing 1 ml of the appropriate culture medium. After 24 h, cells were exposed to various concentrations of pesticides and incubated for 24 h. The treated medium was then removed and cells were washed twice with 500  $\mu$ L PBS 1X. A volume of 250  $\mu$ L of culture medium (without phenol red) containing 54 nM  $1\beta$ - $^3$ H-androstenedione was added to each well, and cells were incubated for 90 (H295R) or 150 (HUVEC) minutes at 37°C (5 % CO<sub>2</sub>). Further steps were as described previously (Sanderson *et al.*, 2000). Tritiated water was counted in 24-well plates containing liquid scintillation cocktail using a Microbeta Trilux (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Counts per minute produced by each sample were corrected for quenching to determine disintegrations per minute, which were then converted into aromatase activity (fg/h/100,000 cells) and then expressed as a percent of control activity (DMSO). Formestane (1  $\mu$ M), a selective and irreversible aromatase inhibitor, was used to ensure specificity for the aromatase reaction.

### **2.5.7 Statistical analysis**

Results are presented as means with standard errors of three independent experiments using different cell passages; per experiment, each concentration was tested in triplicate. The normal distribution of the residuals and the homoscedasticity of the data were verified for each analysis using JMP Software (SAS, Cary, NC). Statistically significant differences (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ) from control were determined by one-way ANOVA followed by a Dunnett post-

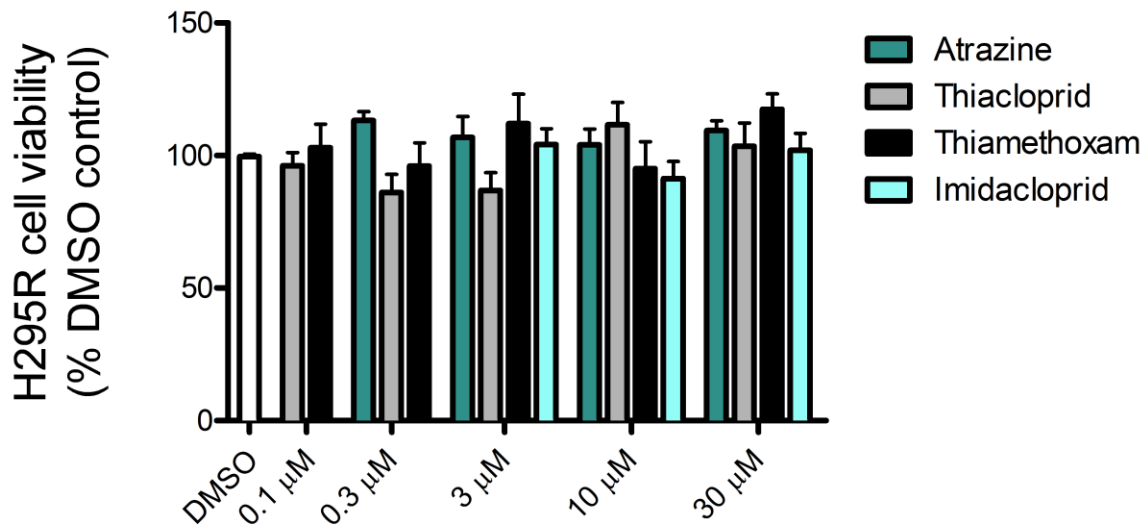
hoc test to correct for multiple comparisons to control using GraphPad Prism v5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **2.6 Results**

### **2.6.1 Effects of neonicotinoids on cell viability of H295R and primary HUVEC cells**

A 24 h exposure to increasing concentrations of atrazine (0.3, 3, 10, 30  $\mu\text{M}$ ), imidacloprid (3, 10, 30  $\mu\text{M}$ ), thiacloprid or thiamethoxam (0.1, 0.3, 3, 10, 30  $\mu\text{M}$ ) did not statistically affect the viability of H295R (Figure 2-1 A) or primary HUVEC cells (Figure 2-1 B) based on mitochondrial reductase activity.

A)



B)

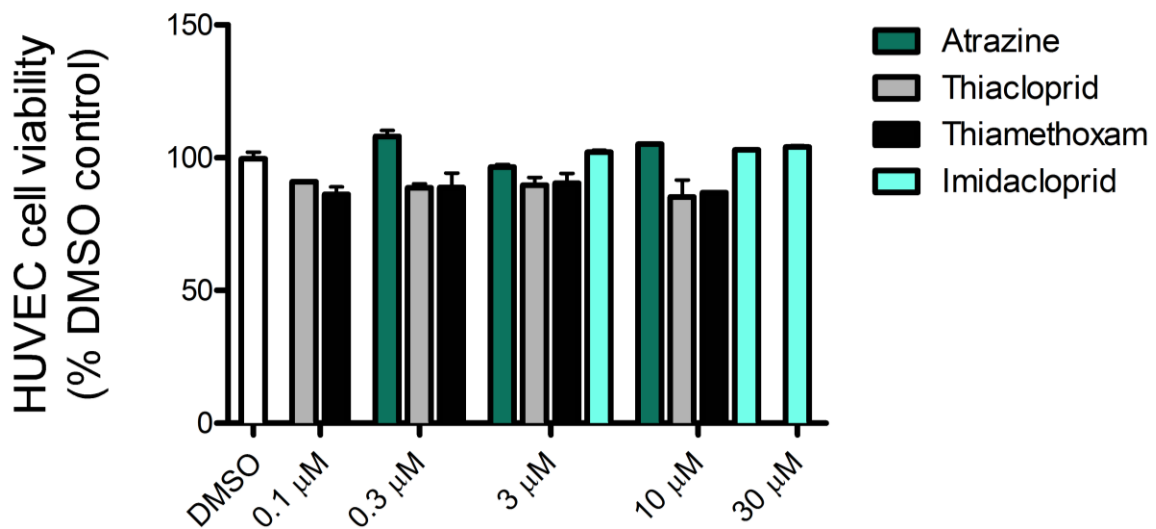
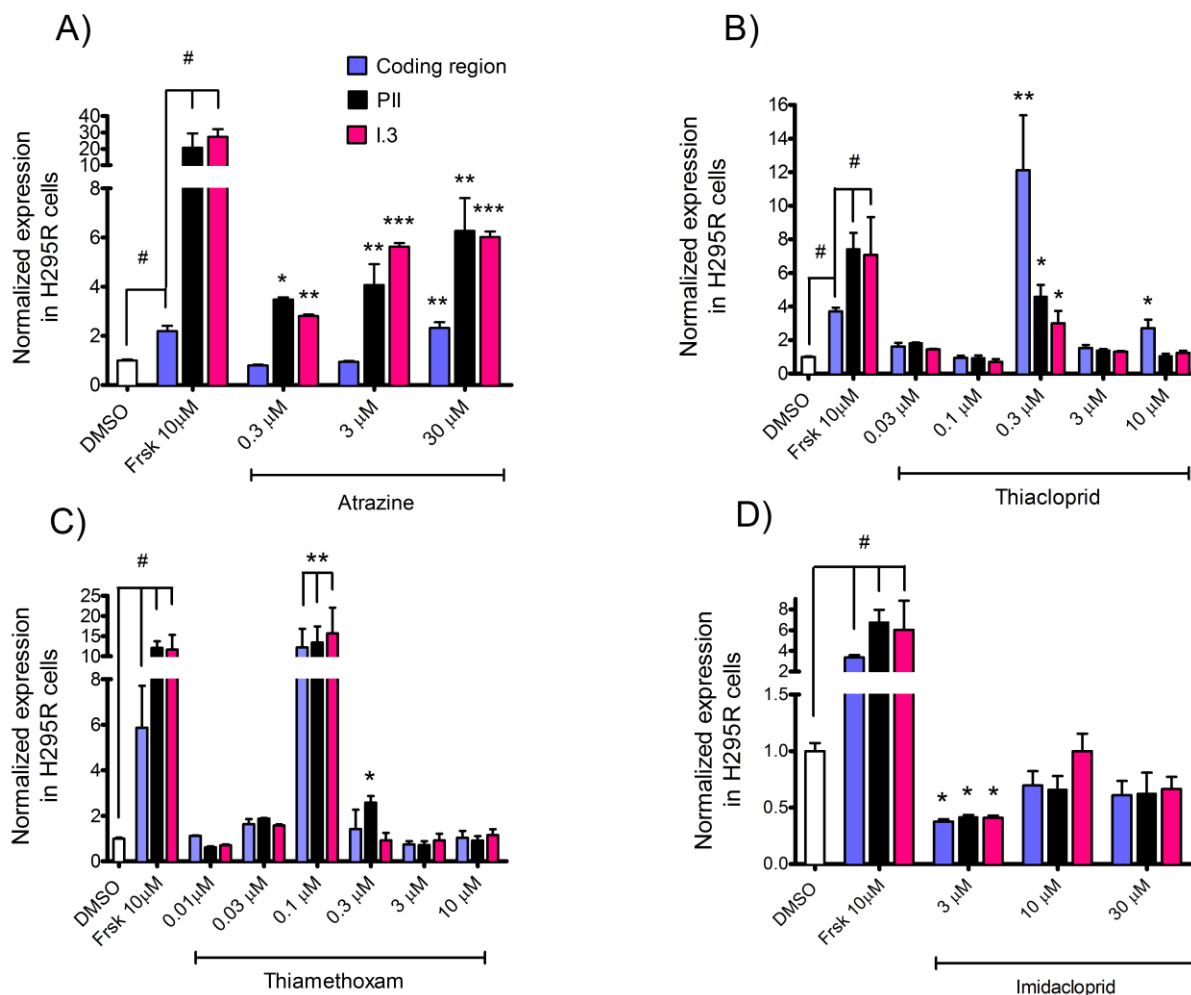


Figure 2-1 : Viability of H295R (A) and HUVEC (B) cells exposed for 24 h to various concentrations of atrazine, thiachloprid, thiamethoxam or imidacloprid as a percentage of DMSO control.

No statistically significant difference between pesticide treatments and DMSO control were detected (Kruskal-Wallis test;  $p > 0.05$ ). Each experiment was performed twice using a different cell passage; per experiment each concentration was tested in triplicate.

## 2.6.2 Effects of atrazine and neonicotinoids on promoter-specific *CYP19* expression in H295R cells

We determined the effects of a 24 h exposure to atrazine and three neonicotinoids on the PII and I.3 promoter-specific expression of *CYP19* in H295R cells. Our positive control forskolin (10  $\mu$ M) increased PII- and I.3-derived *CYP19* mRNA levels by  $11.6 \pm 2.6$  and  $13.0 \pm 3.0$  fold, respectively, and promoter-indistinct *CYP19* mRNA levels by  $3.8 \pm 0.6$  fold. No evidence of I.4 or I.1 promoter activity was found in H295R cells (not shown). Atrazine increased levels of PII and I.3 promoter-derived *CYP19* transcript levels in a concentration-dependent manner, resulting in a 6-fold induction at 30  $\mu$ M (Figure 2-2 A), as has been described previously (Fan *et al.*, 2007b, Heneweer *et al.*, 2004). A 24 h exposure of H295R cells to thiacloprid resulted in a statistically significant increase in relative levels of promoter-indistinct *CYP19* mRNA at 0.3 and 10  $\mu$ M (12.1 and 2.7 fold, respectively) as well as statistically significant increases in relative levels of PII- and I.3-derived *CYP19* transcript (4.6 and 3.0 fold, respectively) at 0.3  $\mu$ M (Figure 2-2 B). Thiamethoxam at 0.1  $\mu$ M strongly increased promoter-indistinct *CYP19* expression and expression via promoters PII and I.3 (Figure 2-2 C) by almost equal extents (between 12.2 and 15.7 fold). PII-derived mRNA levels were also significantly elevated (2.6 fold) at 0.3  $\mu$ M (Figure 2-2 C). A 24 h exposure to 3  $\mu$ M imidacloprid caused a statistically significant decrease of about 60 % in the expression of promoter-indistinct *CYP19* mRNA levels as well as the levels of PII- and I.3-derived *CYP19* transcript (Figure 2-2 D).



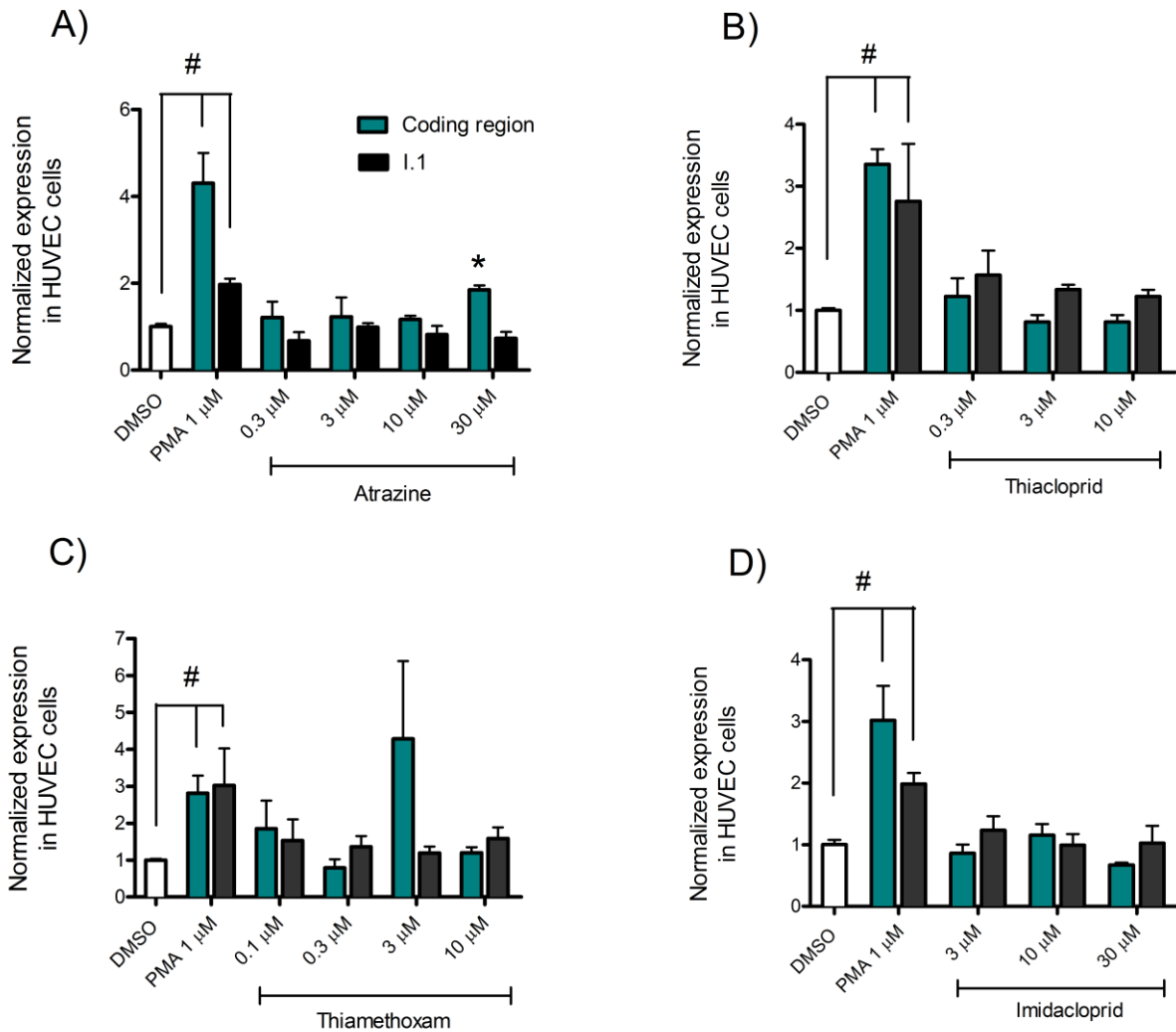
**Figure 2-2 : Relative expression of *CYP19* (coding region) or PII- and I.3 promoter-derived *CYP19* transcripts in H295R cells exposed for 24 h to various concentrations of atrazine (A), thiacloprid (B), thiamethoxam (C), or imidacloprid (D).**

Forskolin (Frsk) was used as a positive control for PII/I.3-mediated induction of *CYP19* expression. (#) A statistically significant difference between Frsk and DMSO control (Student t-test;  $p < 0.05$ ). (\*, \*\*, \*\*\*) A statistically significant difference between pesticide treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Experiments were performed in triplicate using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.



### **2.6.3 Effects of atrazine and neonicotinoids on promoter-specific *CYP19* expression in HUVEC cells**

HUVEC cells, which are primary cells of endothelial origin derived from human umbilical cord, were found to express aromatase via the major placental *CYP19* promoter I.1. Neither PII, I.3, I.4 nor I.7 *CYP19* promoter activity was detected in HUVEC cells. We also did not detect endothelial I.7 *CYP19* promoter activity in primary HUVEC cells using our qPCR method, neither with published primer pairs that were reported to detect I.7 promoter activity in these cells (Alvarez-Garcia *et al.*, 2013), nor with our own primer designs. On average, PMA induced levels of promoter-indistinct (coding region) *CYP19* mRNA by  $3.3 \pm 0.3$  fold and levels of I.1 promoter-derived mRNA by  $2.5 \pm 0.3$  fold (Figure 2-3 A-D). Atrazine slightly induced the expression of promoter non-distinct *CYP19* transcript, with a statistically significant increase of  $1.9 \pm 0.2$  fold at 30  $\mu$ M, but had had no statistically significant effects on I.1 promoter activity (Figure 2-3 A). The neonicotinoids did not affect overall or I.1 promoter-mediated *CYP19* expression in HUVEC cells at any tested concentrations (Figure 2-3 B-D).



**Figure 2-3 : Relative expression of *CYP19* (coding region) or I.1 promoter-derived *CYP19* transcripts in primary HUVEC cells exposed for 24 h to various concentrations of atrazine (A), thiacloprid (B), thiamethoxam (C), or imidacloprid (D).**

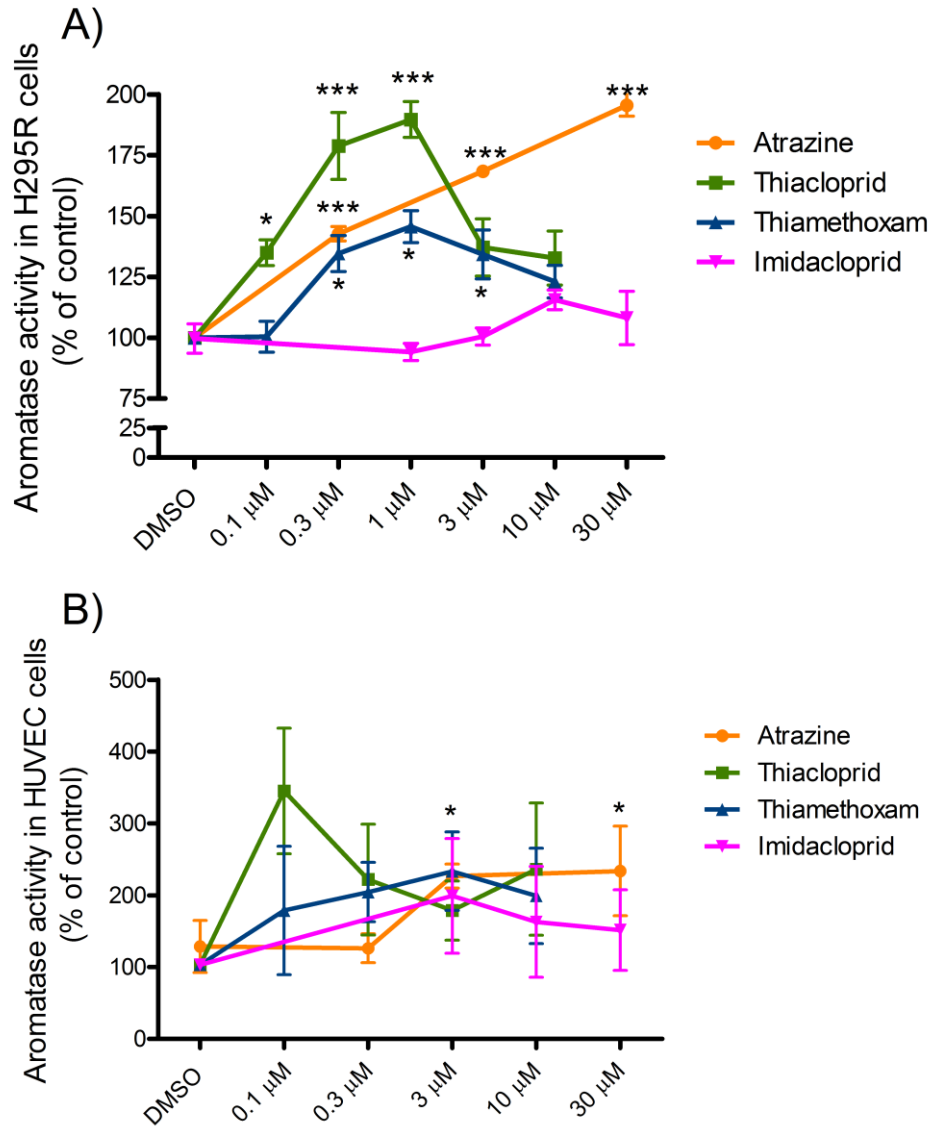
PMA was used as a positive control for induction of I.1-mediated induction of *CYP19* expression. (#) A statistically significant difference between PMA treatment and DMSO control (Student t-test;  $p < 0.05$ ). (\*, \*\*, \*\*\*) A statistically significant difference between pesticide treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Experiments were performed in triplicate using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

#### 2.6.4 Effects of atrazine and neonicotinoids on CYP19 catalytic activity in H295R and HUVEC cells

To confirm whether the pesticide-induced changes in promoter-specific *CYP19* gene expression observed in H295R and primary HUVEC cells resulted in similar changes in catalytic activity of the final enzyme product, we measured the concentration-dependent effects of each pesticide on aromatase activity in each cell type. In H295R cells, forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control for induction of CYP19 and increased aromatase activity by  $5.3 \pm 2.2$  fold compared to DMSO control, whereas formestane (1  $\mu\text{M}$ ), a positive control for inhibition of aromatase activity, reduced activity by about 77 to 90 % (not shown). In H295R cells, atrazine concentration-dependently induced aromatase activity, increasing it by about 2 fold at 30  $\mu\text{M}$  (Fig 4A); this is consistent with the observed increase in the promoter-specific expression of *CYP19* transcript in these cells (Figure 2-2 A). Thiacloprid and thiamethoxam induced aromatase activity statistically significantly at concentrations between 0.1 and 3  $\mu\text{M}$ , producing biphasic concentration-response curves, with each pesticide having maximal effect at about 1  $\mu\text{M}$  (Figure 2-4 A). Imidacloprid had no effect on aromatase activity in H295R cells within the tested concentration range (Figure 2-4 A).

In primary HUVEC cells, PMA (1  $\mu\text{M}$ ), a positive control for promoter I.1-controlled induction of *CYP19* gene expression, induced aromatase activity, on average, by  $2.4 \pm 0.3$  fold compared to DMSO control, whereas formestane (1  $\mu\text{M}$ ) inhibited aromatase activity by 80 to 100 % (not shown). In primary HUVEC cells, atrazine induced aromatase activity concentration-dependently with statistically significant increases at 3 and 30  $\mu\text{M}$  (Figure 2-4 B). Neither imidacloprid nor thiamethoxam induced aromatase activity in a statistically significant manner

(Figure 2-4 B). At 0.1  $\mu\text{M}$ , thiacloprid induced aromatase activity by 3.5 fold, which was statistically significant (Figure 2-4 B).



**Figure 2-4 : Effect of atrazine, thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid on aromatase activity in H295R (A) and primary HUVEC (B) cells**

(\* , \*\* , \*\*\*) A statistically significant difference between pesticide treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Note: the asterisks (\*) in (B) apply to atrazine only. Experiments were performed in triplicate using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate

## 2.7 Discussion

### 2.7.1 Effects of pesticides on the promoter-specific regulation of CYP19 in H295R cells

Using atrazine as a positive control, our results confirm that this widely used herbicide is an effective inducer of aromatase via the promoters pII and I.3 in H295R cells. These effects are well documented and consistent with other studies (Fan *et al.*, 2007b, Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2000). Atrazine, at concentrations higher than those currently found in the environment, also disrupted ovarian and hypothalamic function in rats, causing altered LH and prolactin synthesis (Cooper *et al.*, 2000), and induced aromatase expression via a steroidogenic factor-1 (SF-1) dependent pathway in H295R cells (Fan *et al.*, 2007a). At environmentally relevant levels, atrazine exposure reduced growth rate in red drum larvae (*Sciaenops ocellatus*) exposed to 40 and 80 µg/L for 96 h (del Carmen Alvarez, 2005). Moreover, a study conducted in Texas coast demonstrated that atrazine levels in runoff water can reach 40 to 65 µg/L (Pennington *et al.*, 2001). Therefore, the observed induction of *CYP19* expression and activity by atrazine at a concentration as low as 300 nM (H295R cells), lies within an environmentally relevant range.

To our knowledge, we are the first to document the *in vitro* effects of neonicotinoids on the promoter-specific expression of *CYP19* and the catalytic activity of aromatase. In our study, thiacloprid and thiamethoxam strongly induced the expression of PII and I.3 promoter-derived *CYP19* mRNA in H295R cells, which is a well-established *in vitro* model for the study of steroidogenesis (OECD). The strong increase in expression of total (coding region) *CYP19* transcript in H295R cells exposed to 0.3 µM thiacloprid relative to the weaker increase in PII- and I.3-derived transcript levels appears to suggest the presence of other, possibly unknown, aromatase promoters or promoter-independent mechanisms of transactivation in these cells. (We

confirmed that neither I.1-, I.4- nor I.7-promoter activity was present in H295R cells under our experimental conditions.) Among the neonicotinoids, thiacloprid and thiamethoxam had the greatest effects on pII- and I.3-promoter-specific *CYP19* expression in H295R cells. These effects occurred at relatively low concentrations, producing biphasic or non-monotonic concentration-response curves. Although an alteration in mRNA expression does not necessarily result in a change in protein expression or enzyme activity, we show that thiacloprid and thiamethoxam altered promoter-specific *CYP19* mRNA expression as well as catalytic activity (which we consider a more relevant endpoint in an *in vivo* context) in a non-monotonic manner. In toxicologically studies of endocrine disrupting chemicals, this type of biphasic response is not uncommon (Calabrese *et al.*, 2001, Giesy *et al.*, 2000, Jobling *et al.*, 2003, Kennedy *et al.*, 1993, Rivest *et al.*, 2011, Sanderson *et al.*, 1998, Vandenberg *et al.*, 2012). For example, bisphenol A binds the estrogen receptor at low concentrations, but also acts as an antiandrogen at higher ones (Sohoni *et al.*, 1998) and we have recently shown that androgen receptors are expressed in H295R cells (Robitaille *et al.*, 2014). This concentration-dependent selectivity of bisphenol A for several hormone receptors was suggested to explain the non-monotonic shape of the resultant concentration-estrogenic response curve (Vandenberg *et al.*, 2012). Also, exposure of rats to phthalates leads to a biphasic effect on aromatase activity. This was partially explained by a change in testosterone availability and by the inhibitory action of phthalate metabolites on *CYP19* transcript levels (Andrade *et al.*, 2006). Moreover, Jobling *et al.* (2003) demonstrated that a three week exposure to ethinylestradiol and bisphenol A in prosobranch mollusc (*Potamopyrgus antipodarum*) stimulated embryo production in an inverted U-shaped dose-response manner, where lower concentrations had a greater effect (Jobling *et al.*, 2003). Another study conducted on fathead minnow (*Pimophales promelas*) exposed to 4-nonylphenol (NP) demonstrated an

effect of this chemical on egg production and plasma vitellogenin levels, resulting in an inverted U-shape dose-response curve (Giesy *et al.*, 2000). It remains unclear how thiacloprid and thiamethoxam produced a non-monotonic response on CYP19 expression and aromatase activity in H295R cells, but it may activate (or deactivate) different intracellular signalling factors that affect *CYP19* promoter activity at different concentrations. The action of atrazine on PII/I.3-mediated CYP19 expression occurs by increasing intracellular levels of cAMP (Sanderson *et al.*, 2002) and possibly by interacting with SF-1 (Fan *et al.*, 2007a). It is further known that cAMP-mediated phosphorylation of GATA-4 is involved in SF-1 activation and subsequent stimulation of the CYP19 PII promoter (Tremblay *et al.*, 2003a). It is not known whether atrazine activates GATA-4 and it remains to be studied whether thiacloprid and thiamethoxam act as potent inducers via these signalling pathways or by other yet to be delineated mechanisms. Further insight into the mechanisms of induction of CYP19 by neonicotinoids is important in understanding their promoter-specificity and explaining the non-monotonicity of their concentration-response curves. This will be addressed in further studies.

Evidence of other adverse or endocrine disruptive effects of neonicotinoids has been observed in recent studies, with imidacloprid inducing apoptosis and fragmentation of seminal DNA in rats (Bal *et al.*, 2012), and causing oxidative stress and hormone disruption in female rats (Kapoor *et al.*, 2011). Moreover, few studies demonstrated that half-lives of certain neonicotinoids, like imidacloprid, may exceed 1000 days and that around 90 % of the active ingredient in neonicotinoid formulations enters the soil (Goulson, 2013). These characteristics indicate that bioaccumulation of these pesticides may occur and eventually cause sub-chronic toxicities, which re-enforce the need of toxicological studies on neonicotinoids.

### 2.7.2 Effects of pesticides on the promoter-specific regulation of CYP19 in primary HUVEC cells

We are the first to evaluate the effects of atrazine and neonicotinoids on *CYP19* expression and aromatase activity in primary endothelial HUVEC cells. RT-qPCR analyses showed that HUVEC cells express *CYP19* (Mukherjee *et al.*, 2002) via the placental PKC-driven I.1 promoter and is stimulated by the phorbol ester PMA. Atrazine increased promoter non-distinct *CYP19* mRNA expression statistically significantly, but this increase in transcript was not derived from the I.1 promoter as its activity remained unchanged (Fig 3A). A possible explanation could be the presence of another *CYP19* promoter that drives the observed changes in *CYP19* expression levels, possibly the endothelium-specific I.7 promoter (Bulun *et al.*, 2003) or an unknown one, although we could not detect any transcript using the currently published sequence for the 5'-untranslated region of I.7 promoter-derived mRNA that was discovered in breast cancer tissues (Sebastian *et al.*, 2002). Other mechanisms such as inhibition of mRNA degradation could also play a role. The absence of statistically significant effects of the neonicotinoids on aromatase activity in HUVEC cells was consistent with the lack of effects on *CYP19* expression at the mRNA level (Fig 3B-D and 4B). We note that basal aromatase activity in HUVEC cells (2 fmole/h/10<sup>5</sup> cells) is considerably lower than in H295R cells (118 fmole/h/10<sup>5</sup> cells) and less inducible by its positive control PMA (2.4 fold) than by forskolin in H295R cells (5.3 fold). However, given the induction of *CYP19* expression and aromatase activity observed with atrazine, endothelial cells (such as HUVEC) should not be ignored as a potential target for endocrine disrupting pesticides and other environmental contaminants. For example, HUVEC cells exposed to environmentally relevant doses of bisphenol A have higher expression of proangiogenic genes such as VEGFR (Andersson *et al.*, 2012) and exhibit mitotic abnormalities during cell division (Ribeiro-Varandas *et al.*, 2013).



### 2.7.3 Relevance of disruption of promoter-specific *CYP19* expression in health and disease

The H295R cell line is a useful *in vitro* model for the study of the effects of chemicals on the PII- and I.3-promoter-specific expression of *CYP19*. The activity of the PII and I.3 promoters of *CYP19* are associated with the over-expression of aromatase in the adipose stromal cells surrounding hormone-dependent breast tumors (Bulun *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2009). The consequence of induction of *CYP19* via these two promoters would be an increased local production of estrogens in close proximity to the tumor, increasing the likelihood of cancer cell proliferation. The involvement of the PII promoter in *CYP19* over-expression has also been established in ovarian cancer (Bulun *et al.*, 2007) and endometriosis, where the adipose-specific I.4 promoter also appears to be involved (Zeitoun *et al.*, 1999). Moreover, obesity is associated with higher expression of aromatase in breast fibroblasts via promoters PII/I.3, and women suffering from obesity have greater risk of developing breast cancer (Bulun *et al.*, 2012). One of the suggested pathways linking obesity with breast cancer and aromatase over-expression is the increased production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), known to induce aromatase expression via promoters pII and I.3 (Chen *et al.*, 2007). Considering the importance of the promoter-specific character of *CYP19* expression in various tissues and disease states as well as during pregnancy, our finding that atrazine and certain neonicotinoid pesticides can modulate *CYP19* in a promoter-specific manner emphasizes the need for further study of the potential disruptive effects of environmental contaminants on steroidogenesis.

Whether human exposures to environmental contaminants that disrupt *CYP19* expression and aromatase activity are sufficiently high to cause or contribute to human disease is an important question that remains to be answered. Atrazine is found in surface waters (Smalling *et al.*, 2015) and in agricultural products (Viden *et al.*, 1987) at concentrations that have been

linked to reproductive abnormalities in amphibians (Hayes *et al.*, 2003) and effects on *CYP19* expression in the brains of tadpoles of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) (Gunderson *et al.*, 2011). Furthermore, atrazine is detected in breast milk (Balduini *et al.*, 2003) confirming that infant exposures may occur during a critical developmental period. With regards to the neonicotinoids, levels of clothianidin and thiamethoxam have been steadily increasing since 2012 in water samples from wetlands and agricultural areas in United States and Canada (concentrations ranging from 0.002 µg/L to 3.6 µg/L) (Anderson *et al.*, 2013, Main *et al.*, 2014, Smalling *et al.*, 2015). Since a large number of studies demonstrate a link between exposures to environmental contaminants and increased risk of breast cancer (Birnbaum *et al.*, 2003, Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2011, Dewailly *et al.*, 1994, Fenton, 2006) or adverse birth outcomes (Rinsky *et al.*, 2012, Vafeiadi *et al.*, 2014), the increasing use and reliance on chemicals such as pesticides remains a cause of concern.

## **2.8 Conclusions**

We have successfully developed RT-qPCR methods for the quantitative determination of the promoter-specific expression of *CYP19*. We have shown that the H295R cell line is a useful *in vitro* model for the study of chemicals that may interfere with the PII- and I.3 promoter-specific expression of *CYP19* and that primary HUVEC cells express *CYP19* via the placenta-type I.1 promoter. To fully understand the promoter-specific regulation of *CYP19* in HUVEC or other endothelial cells, further studies would be helpful to assess the activation pathway(s) of the endothelial I.7 promoter. Finally, we are the first to show that neonicotinoid insecticides have the potential to increase the expression of *CYP19* in a promoter-specific manner. Given the importance of the promoter-specific expression of *CYP19* in breast cancer or during pregnancy,

it is important to study how endocrine disrupting chemicals may affect the activity of individual *CYP19* promoters in order to better understand and predict the potential risk to exposed women.

## **2.9 Funding**

This work was supported financially by the California Breast Cancer Research Program (CBCRP grant no. 17UB-8703) to MSD and JTS, and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery grant no. 313313-2012) to JTS. ECB was the recipient of a scholarship from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT).

Declaration of conflict of interest: We declare to have no financial conflicts of interest.

## **2.10 Acknowledgements**

We thank Andr ee-Anne Hudon-Thibault, Joey St-Pierre and the laboratory of Cathy Vaillancourt for assistance with the RT-qPCR methodology.

## **2.11 Bibliography**

- Aerts, J. L., Gonzales, M. I., and Topalian, S. L. (2004). Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* **36**, 84-86, 88, 90-81.
- Albrecht, E. D., and Pepe, G. J. (2010). Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *The International journal of developmental biology* **54**, 397-408.
- Alvarez-Garcia, V., Gonzalez, A., Martinez-Campa, C., Alonso-Gonzalez, C., and Cos, S. (2013). Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncology reports* **29**, 2058-2064.

- Anderson, T. A., Salice, C. J., Erickson, R. A., McMurry, S. T., Cox, S. B., and Smith, L. M. (2013). Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* **92**, 84-90.
- Andersson, H., and Brittebo, E. (2012). Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. *Archives of Toxicology* **86**, 465-474.
- Andrade, A. J., Grande, S. W., Talsness, C. E., Grote, K., and Chahoud, I. (2006). A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* **227**, 185-192.
- Bal, R., Naziroğlu, M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E., and Baydas, G. (2012). Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* **30**, 492-499.
- Balduini, L., Matoga, M., Cavalli, E., Seilles, E., Riethmuller, D., Thomassin, M., and Guillaume, Y. C. (2003). Triazinic herbicide determination by gas chromatography–mass spectrometry in breast milk. *Journal of Chromatography B* **794**, 389-395.
- Birnbaum, L. S., and Fenton, S. E. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* **111**, 389-394.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., Long, M., Bossi, R., Ayotte, P., Asmund, G., Kruger, T., Ghisari, M., Mulvad, G., Kern, P., Nzulumiki, P., and Dewailly, E. (2011). Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study. *Environ Health* **10**, 88.
- Bouskine, A., Nebout, M., Brucker-Davis, F., Benahmed, M., and Fenichel, P. (2009). Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* **117**, 1053-1058.
- Bukovsky, A., Cekanova, M., Caudle, M., Wimalasena, J., Foster, J., Henley, D., and Elder, R. (2003). Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and

- abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**, 13.
- Bulun, S. E., Chen, D., Lu, M., Zhao, H., Cheng, Y., Demura, M., Yilmaz, B., Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Su, E., Marsh, E., Hakim, A., Yin, P., Ishikawa, H., Amin, S., Imir, G., Gurates, B., Attar, E., Reierstad, S., Innes, J., and Lin, Z. (2007). Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* **106**, 81-96.
- Bulun, S. E., Chen, D., Moy, I., Brooks, D. C., and Zhao, H. (2012). Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 83-89.
- Bulun, S. E., Sebastian, S., Takayama, K., Suzuki, T., Sasano, H., and 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.
- Calabrese, E. J., and Baldwin, L. A. (2001a). The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol Sci* **62**, 330-338.
- Calabrese, E. J., and Baldwin, L. A. (2001b). Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in pharmacological sciences* **22**, 285-291.
- Chen, D., Reierstad, S., Lin, Z., Lu, M., Brooks, C., Li, N., Innes, J., and Bulun, S. E. (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**, 8914-8922.
- Chen, D., Reierstad, S., Lu, M., Lin, Z., Ishikawa, H., and Bulun, S. E. (2009). Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett* **273**, 15-27.
- Cooper, R. L., Stoker, T. E., Tyrey, L., Goldman, J. M., and McElroy, W. K. (2000). Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* **53**, 297-307.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., and Pham-Delègue, M.-H. (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and environmental safety* **57**, 410-419.

- Dewailly, E., Dodin, S., Verreault, R., Ayotte, P., Sauve, L., Morin, J., and Brisson, J. (1994). High organochlorine body burden in women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **86**, 232-234.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Hayes, T. B., Takayanagi, R., and Nawata, H. (2007). 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.
- Fenton, S. E. (2006). Endocrine-Disrupting Compounds and Mammary Gland Development: Early Exposure and Later Life Consequences. *Endocrinology* **147**, s18-s24.
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A., and La Rocca, R. V. (1990). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* **50**, 5488-5496.
- Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., and Pangborn, W. (2009). Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* **457**, 219-223.
- Giesy, J. P., Pierens, S. L., Snyder, E. M., Miles-Richardson, S., Kramer, V. J., Snyder, S. A., Nichols, K. M., and Villeneuve, D. A. (2000). Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 1368-1377.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Bernardo, A. D., Greatti, M., Giorio, C., and Tapparo, A. (2009). Translocation of Neonicotinoid Insecticides from Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. *Journal of Economic Entomology* **102**, 1808-1815.
- Gunderson, M. P., Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Macnab, M. K., Ding, W., van Aggelen, G., and Helbing, C. C. (2011). Effect of low dose exposure to the herbicide atrazine and its metabolite on cytochrome P450 aromatase and steroidogenic factor-1 mRNA levels in the brain of premetamorphic bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Aquatic toxicology* **102**, 31-38.

- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., and Vonk, A. (2003). Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ Health Perspect* **111**, 568-575.
- Heneweer, M., van den Berg, M., and 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.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., and Decourtye, A. (2012). A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* **336**, 348-350.
- Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M., Wu, R. S., and Giesy, J. P. (2004). Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. *Toxicol Sci* **81**, 78-89.
- Hoshi, N., Hirano, T., Omotehara, T., Tokumoto, J., Umemura, Y., Mantani, Y., Tanida, T., Warita, K., Tabuchi, Y., Yokoyama, T., and Kitagawa, H. (2014). Insight into the Mechanism of Reproductive Dysfunction Caused by Neonicotinoid Pesticides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **37**, 1439-1443.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., and Elbert, A. (2010). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 2897-2908.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., and Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic toxicology* **65**, 205-220.
- Kapoor, U., Srivastava, M. K., and Srivastava, L. P. (2011). Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 3086-3089.
- Kennedy, S. W., Lorenzen, A., James, C. A., and Collins, B. T. (1993). Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. *Anal Biochem* **211**, 102-112.

- Klempan, T., Hudon-Thibeault, A. A., Oufkir, T., Vaillancourt, C., and Sanderson, J. T. (2011). Stimulation of serotonergic 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta* **32**, 651-656.
- Lemaire, G., Mnif, W., Mauvais, P., Balaguer, P., and Rahmani, R. (2006). Activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life sciences* **79**, 1160-1169.
- Lephart, E. D., and Simpson, E. R. (1991). Assay of aromatase activity. *Methods in enzymology* **206**, 477-483.
- Main, A. R., Headley, J. V., Peru, K. M., Michel, N. L., Cessna, A. J., and Morrissey, C. A. (2014). Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PloS one* **9**, e92821.
- Matsuda, K., Ihara, M., Nishimura, K., Sattelle, D. B., and Komai, K. (2001). Insecticidal and neural activities of candidate photoaffinity probes for neonicotinoid binding sites. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **65**, 1534-1541.
- Mukherjee, T. K., Dinh, H., Chaudhuri, G., and Nathan, L. (2002). Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: Implications in atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4055-4060.
- OECD (2011). Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris.
- OMS (2013). Organisation mondiale de la Santé: Rapport historique sur les effets pour l'homme de l'exposition aux perturbateurs endocriniens chimiques.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., and Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 856-862.
- Rainey, W. E., Bird, I. M., and Mason, J. I. (1994). The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol* **100**, 45-50.



- Ribeiro-Varandas, E., Viegas, W., Sofia Pereira, H., and Delgado, M. (2013). Bisphenol A at concentrations found in human serum induces aneugenic effects in endothelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **751**, 27-33.
- Rinsky, J. L., Hopenhayn, C., Golla, V., Browning, S., and Bush, H. M. (2012). Atrazine exposure in public drinking water and preterm birth. *Public health reports* **127**, 72-80.
- Rivest, P., Renaud, M., and Sanderson, J. T. (2011). Proliferative and androgenic effects of indirubin derivatives in LNCaP human prostate cancer cells at sub-apoptotic concentrations. *Chem Biol Interact* **189**, 177-185.
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., and Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **36**, 71-83.
- Sanderson, J. T. (2009). Adrenocortical toxicology in vitro: Assessment of steroidogenic enzyme expression and steroid production in H295R cells. In *Adrenal Toxicology* (P. W. Harvey, D. J. Everett, and C. J. Springall, Eds.), pp. 175-182. Informa Healthcare, New York, NY.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W., and 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., and 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.
- Sanderson, J. T., Kennedy, S. W., and Giesy, J. P. (1998). In vitro induction of ethoxyresorufin O-deethylase activity and porphyrins by polyhalogenated aromatic hydrocarbons in avian primary hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 2006-2018.
- Sanderson, J. T., Letcher, R. J., Heneweer, M., Giesy, J. P., and 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., Seinen, W., Giesy, J. P., and 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.
- Sebastian, S., Takayama, K., Shozu, M., and Bulun, S. E. (2002). Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. *Mol Endocrinol* **16**, 2243-2254.
- Sekeroglu, V., Sekeroglu, Z. A., and Demirhan, E. (2014). Effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on thyroid hormone levels in rat serum. *Toxicol Ind Health* **30**, 40-46.
- Smalling, K. L., Reeves, R., Muths, E., Vandever, M., Battaglin, W. A., Hladik, M. L., and Pierce, C. L. (2015). Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Science of The Total Environment* **502**, 80-90.
- Sohoni, P., and Sumpter, J. P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* **158**, 327-339.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., and Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* **50**, S1-5.
- Thibeault, A. A., Deroy, K., Vaillancourt, C., and Sanderson, J. T. (2014). A unique co-culture model for fundamental and applied studies of human fetoplacental steroidogenesis and interference by environmental chemicals. *Environ Health Perspect* **122**, 371-377.
- Tomizawa, M., and Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**, 247-268.
- Tremblay, J. J., and Viger, R. S. (2003). Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 291-298.
- Vafeiadi, M., Vrijheid, M., Fthenou, E., Chalkiadaki, G., Rantakokko, P., Kiviranta, H., Kyrtopoulos, S. A., Chatzi, L., and Kogevinas, M. (2014). Persistent organic pollutants exposure during pregnancy, maternal gestational weight gain, and birth outcomes in the mother-child cohort in Crete, Greece (RHEA study). *Environment International* **64**, 116-123.

- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., and Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* **33**, 378-455.
- Viden, I., Rathouska, Z., Davidek, J., and Hajslova, J. (1987). Use of gas liquid chromatography/mass spectrometry for triazine herbicide residues analysis in forage and milk. *Z. Lebensmitt. Untersuch Forsch.* **185**, 98-105.
- Wang, Y., Man Gho, W., Chan, F. L., Chen, S., and Leung, L. K. (2008). The red clover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *Br J Nutr* **99**, 303-310.
- Zeitoun, K., Takayama, K., Michael, M. D., and Bulun, S. E. (1999). Stimulation of aromatase P450 promoter (II) activity in endometriosis and its inhibition in endometrium are regulated by competitive binding of steroidogenic factor-1 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor to the same cis-acting element. *Mol Endocrinol* **13**, 239-253.
- Zhang, X., Yu, R. M., Jones, P. D., Lam, G. K., Newsted, J. L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, T., Wu, R. S., and Giesy, J. P. (2005). Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line. *Environ Sci Technol* **39**, 2777-278

**CHAPITRE 3 : THE USE OF A UNIQUE FETOPLACENTAL  
STEROIDOGENESIS CO-CULTURE MODEL AS A SCREENING  
TOOL FOR ENDOCRINE DISRUPTORS: THE EFFECTS OF  
NEONICOTINOIDS ON AROMATASE ACTIVITY AND HORMONE  
PRODUCTION**

**Utilisation d'un modèle unique de co-culture fœto-placentaire comme outil de détection des  
perturbateurs endocriniens : les effets de pesticides néonicotinoïdes sur l'activité de  
l'aromatase et la production hormonale**

*Élyse Caron-Beaudoin<sup>a\*</sup>, Rachel Viau<sup>a</sup>, Andrée-Anne Hudon-Thibeault<sup>a</sup>, Cathy Vaillancourt<sup>a</sup>  
and J. Thomas Sanderson<sup>a</sup>*

<sup>a</sup> INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, CANADA

\* Auteur-ressource

L'article a été soumis à la revue **Toxicology and Applied Pharmacology** le 11 mars 2017. Il a  
été accepté le 23 juillet 2017 et publié en ligne le 24 juillet 2017.

### **3.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs**

Élyse Caron-Beaudoin : L'étudiante a contribué à l'élaboration du projet de recherche ainsi qu'à l'établissement des méthodologies. L'étudiante a réalisé toutes les expériences en laboratoire ainsi que l'analyse des résultats. Elle a rédigé l'article et les corrections subséquentes. La candidate a également utilisé la co-culture fœto-placentaire pour tester l'effet du glyphosate et de sa formulation commerciale Roundup. Ces résultats préliminaires sont présentés à l'annexe 3.

Rachel Viau : Rachel Viau a travaillé sur ce projet en tant que stagiaire d'été. Elle a participé à la mesure des hormones stéroïdes en utilisant différents tests *ELISA*.

Andrée-Anne Hudon-Thibeault : Andrée-Anne Hudon-Thibeault a mis au point le modèle de co-culture en 2014 dans le cadre de sa maîtrise, en co-direction avec Cathy Vaillancourt et Thomas Sanderson. Elle a également révisé l'article.

Cathy Vaillancourt : Cathy Vaillancourt a participé à l'élaboration du modèle de co-culture et a révisé l'article.

Thomas Sanderson : Thomas Sanderson a participé à l'élaboration du modèle de co-culture et a contribué à l'élaboration du projet et à l'analyse des résultats. Il a également révisé l'article et les corrections subséquentes.

### **3.2 Résumé**

La synthèse d'œstrogènes pendant la grossesse dépend de la collaboration entre le fœtus produisant les précurseurs androgènes, et le placenta exprimant l'enzyme aromatasase (CYP19). Une altération de la production d'œstrogènes par des contaminants environnementaux peut mener à des problèmes de développement et des grossesses à risques. Nous avons utilisé un

modèle *in vitro* nouvellement développé de co-culture mimant la stéroïdogénèse fœto-placentaire afin d'évaluer les effets de trois pesticides néonicotinoïdes sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production d'hormones stéroïdes. Des cellules humaines H295R de carcinome surrénalien avec des caractéristiques fœtales ont été mises en culture avec des cellules humaines BeWo de choriocarcinomes, qui ont un comportement similaire au cytotrophoblaste villos. La co-culture a été exposée pendant 24h à des concentrations croissantes de trois néonicotinoïdes : thiaclopride, thiamethoxam ou imidaclopride. L'activité catalytique de l'aromatase a été mesurée dans les deux lignées cellulaires par la méthode de l'eau tritiée. La production hormonale a été déterminée par tests *ELISA*. Les trois néonicotinoïdes ont induit l'activité catalytique de l'aromatase dans la co-culture fœto-placentaire, induisant une augmentation de la production de  $17\beta$ -œstradiol et d'œstrone. Au contraire, la production d'œstriol a été fortement inhibée par l'exposition aux néonicotinoïdes. Les trois pesticides ont induit l'expression de *CYP3A7* dans les cellules H295R, et cette induction a été renversée par un co-traitement des cellules H295R avec de l'œstriol exogène. *CYP3A7*, dont nous sommes les premiers à déterminer l'expression dans les cellules H295R, est normalement exprimée dans le foie fœtal et est l'enzyme clé de la synthèse de l'œstriol. Notre hypothèse est que les néonicotinoïdes sont métabolisés par *CYP3A7*, bloquant ainsi la liaison du précurseur  $16\alpha$ -hydroxylation DHEA(-sulfate), qui est normalement converti en œstriol par l'aromatase placentaire. Nous avons utilisé avec succès un modèle de co-culture mimant la stéroïdogénèse fœto-placentaire en tant qu'outil de criblage pour investiguer les effets des néonicotinoïdes sur la production d'œstrogènes, l'activité de l'aromatase et l'expression de *CYP3A7*.

**Mots-clés :** unité fœto-placentaire ; *CYP3A7* ; aromatase ; néonicotinoïdes ; co-culture ; œstriol

### 3.3 Abstract

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

**Keywords:** Fetoplacental unit; steroid 16 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP3A7*); aromatase; neonicotinoids; co-culture; estriol.

### 3.4 Introduction

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

During pregnancy, the fetoplacental unit plays an important endocrine role, ensuring, amongst others, estrogen (estrone, estradiol and estriol) biosynthesis. Estrogens are required in several physiological processes during pregnancy, such as the formation of the syncytiotrophoblast and regulation of uteroplacental blood flow (Yashwanth *et al.*, 2006). Maternal cholesterol is converted to androgen precursors in the fetus by the action of several enzymes, such as cytochrome P450 17 (CYP17), sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) and steroid 16 $\alpha$ -hydroxylase (CYP3A7). In the placenta, CYP19 (aromatase) is responsible for the final step in estrone, estradiol and estriol biosynthesis (Leeder *et al.*, 2005; Rainey *et al.*, 2004). Alone, the placenta cannot produce estrogens *de novo*, as it needs the steroid precursors synthesized by the fetus (for complete steroidogenesis pathway, see Fig 3-7 in Discussion section). Estriol is uniquely produced during pregnancy, and its synthesis requires correct functioning of the fetoplacental



unit (Mucci *et al.*, 2003). Thus, a disruption in biosynthesis of estrogens such as that of estriol may adversely alter development and influence important indicators of fetal health like birth weight and head circumference (Kaijser *et al.*, 2000, Troisi *et al.*, 2003). Moreover, decreased free estriol in maternal serum has been associated with growth retardation, reduced Apgar scores and postnatal complications in a control study of 869 women (Gerhard *et al.*, 1986).

Exposure during pregnancy to contaminants such as heavy metals, pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs) and phthalates have been linked to fetal growth retardation (Siddiqui *et al.*, 2003), spontaneous abortions, learning disabilities (Abadin *et al.*, 1997, Hu, 1991), reduced birth weight, preterm birth (Jacobson *et al.*, 1990) and disruption of reproductive development (Foster, 2006, Honma *et al.*, 2002, Mylchreest *et al.*, 2000). It is not surprising that exposure to certain chemicals during pregnancy can lead to adverse pregnancy and birth outcomes, since *in utero* development is a critical window of vulnerability of the embryo (Bellinger, 2013). The fetoplacental co-culture model of steroidogenesis developed in our laboratory (Hudon Thibeault *et al.*, 2014) allows us to study chemicals that may impair estrogen biosynthesis or that of other key placental hormones such as  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG), potentially leading to serious pregnancy complications (Albrecht *et al.*, 2000, Albrecht *et al.*, 1999, Svedas *et al.*, 2002). We have reported earlier that prochloraz, a widely-used fungicide, and norfluoxetine, a selective serotonin-reuptake inhibitor, strongly inhibited aromatase activity and estrogen production in our fetoplacental co-culture model (Hudon Thibeault *et al.*, 2014); Hudon Thibeault *et al.*, 2017).

Neonicotinoids are some of the most widely used insecticides in the world. For example, thiamethoxam and clothianidin were both in the top 10 most sold insecticides in Canada in 2010 (Health Canada, 2010). By 2012, neonicotinoids were applied to 11 million hectares in Canada,

representing more than 216,000 kg of active neonicotinoid (Main *et al.*, 2014). Neonicotinoids are mostly used as seed coatings on the vast majority of crops, fruits and vegetables. Moreover, their physicochemical characteristics ( $K_{ow}$  and  $pK_a$ ) explain their systemic properties and their distribution throughout the entire plant (Bonmatin *et al.*, 2015). For this reason, neonicotinoid insecticides also target pollinators, mammals and humans. The scientific community is increasingly accepting that exposure to these insecticides partially explains the worldwide decline in honeybees populations (Decourtye *et al.*, 2004, Girolami *et al.*, 2009, Goulson, 2013, Henry *et al.*, 2012b). Neonicotinoid insecticides are also persistent in the environment. Half-lives in soil vary and can reach 1250 days for imidacloprid (Main *et al.*, 2014). Because of their persistence and repeated application, it is expected that neonicotinoids will continue to accumulate in soil (Stokstad, 2013). A recent study analyzed neonicotinoid levels in surface waters from 136 wetlands across Saskatchewan, Canada. Clothianidin and thiamethoxam concentrations were detected in the majority of water samples, reaching concentrations as high as 3110 ng/L (Main *et al.*, 2014). Moreover, human populations are also exposed to neonicotinoids through diet. A study conducted in Boston, Massachusetts, analyzed neonicotinoid residues in honey, fruits and vegetables purchased in local grocery stores. Imidacloprid was the most frequently detected neonicotinoid in the samples. At least one neonicotinoid was detected in all the tested fruits and vegetables. Also, in 72% of fruits and 45% of the tested vegetables, two or more neonicotinoids were detected, with concentrations reaching 100.7 ng/g (Chen *et al.*, 2014). Furthermore, a study conducted with a cohort of 147 farm workers from northeastern Japan evaluated the presence of neonicotinoid metabolites in urine. A metabolite of the neonicotinoid dinotefuran, 3-furoic acid, was detected in 100% of the samples at concentrations as high as 0.13

$\mu\text{M}$  (Nomura *et al.*, 2013). Moreover, the concentrations of 6-chloronicotinic acid, a metabolite of imidacloprid and thiacloprid, reached concentrations of  $0.05 \mu\text{M}$  (Nomura *et al.*, 2013).

In recent years, a growing number of studies have evaluated the endocrine disrupting potential of neonicotinoid insecticides. We demonstrated that two neonicotinoids (thiacloprid and thiamethoxam) induce aromatase expression in a promoter-specific manner *in vitro*, targeting promoters known to be overexpressed in breast cancer (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016). Moreover, Bal *et al.* (2012) found that male rats exposed to imidacloprid (2 mg/kg/day) through diet showed increased apoptosis and fragmentation of seminal DNA. In female rats exposed to the same neonicotinoid (20 mg/kg/day), Kapoor *et al.* (2011) noted decreased ovarian weight and altered levels of follicle stimulating hormone and progesterone.

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

## 3.5 Material and methods

### 3.5.1 Chemicals

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

### 3.5.2 Feto-placental co-culture

The feto-placental co-culture (Hudon Thibeault *et al.*, 2014) consists of H295R adrenocortical carcinoma and BeWo choriocarcinoma cells. H295R cells have the characteristics of the fetal adrenocortex (Gazdar *et al.*, 1990, Staels *et al.*, 1993) as well as that of fetal liver (Hudon Thibeault *et al.*, 2014) and reflect the steroidogenesis that would occur in the fetal compartment. BeWo cells are a well documented model of the placental trophoblast (Ellis *et al.*, 1990, Nampoothiri LP, 2007). This co-culture model of the fetoplacental unit is capable of *de novo* production of estrogens, including the unique pregnancy estrogen estriol, under our experimental conditions (Hudon Thibeault *et al.*, 2014). Briefly, BeWo (ATCC no. CCL-98) and H295R (ATCC no. CRL-2128) cells were cultured separately in their respective recommended media. BeWo cells were cultured in DMEM/F-12 without phenol red (Catalog no. 11039021, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Tempe, AZ). H295R were cultured in DMEM/F-12 (Catalog no. 11039021, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), supplemented with 2.5% Nu Serum (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and 1% ITS + Premix (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Once confluent, BeWo and H295R cells were trypsinized, and H295R cells were seeded in 24-well plates at a concentration of  $2.5 \times 10^4$  cells/well, whereas BeWo cells were seeded in

transwell inserts (Corning Life Sciences, Corning, NY) at a concentration of  $1.25 \times 10^4$  cells/insert. After 24 h, the co-culture was assembled by adding the inserts containing BeWo cells to the 24-well plates containing H295R cells. The original culture media were removed and replaced with co-culture media which contained DMEM/F-12 without phenol red, supplemented with 2.5% stripped NuSerum, 1% ITS+Premix and 1% stripped FBS, and the various concentrations of the neonicotinoids or vehicle control (DMSO at a final concentration of 0.1%). Neonicotinoid concentrations were chosen based on our previous study that determined their effects on *CYP19* expression in H295R cells and an absence of cytotoxicity (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016). Moreover, the selected concentrations are environmentally relevant as our lower range is similar to what is measured in urine samples from farm workers (Nomura *et al.*, 2013). Exposures were for 24h in an incubator at 37°C with a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.5.3 CYP19 catalytic activity**

Aromatase activity was determined as previously described (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016, Hudon Thibeault *et al.*, 2014, Sanderson *et al.*, 2000). Briefly, after the 24-h exposure period, the treated media in the insert and well were combined and removed (and stored at -80°C for hormone quantification), and H295R and BeWo cells were washed twice with 1x PBS. The inserts containing BeWo cells were removed from the wells containing H295R cells and placed in 12-well plates for further steps. A volume of 250 µL of serum and additive-free culture medium containing 54 nM 1β-<sup>3</sup>H-androstenedione (Perkin Elmer, Wellesley, MA) was added to H295R cells. This volume was 50 µL for BeWo cells. Cells were incubated for 90 minutes at 37°C, during which there was a linear conversion of 1β-<sup>3</sup>H-androstenedione (and release of tritiated

water). Tritiated water was extracted from the reaction medium of each of the cell types, and counted in plates containing liquid scintillation cocktail using a Microbeta Trilux (Perkin Elmer). Formestane (1 $\mu$ M), an irreversible *CYP19* inhibitor, was used to ensure the specificity of the aromatase reaction. Forskolin (10  $\mu$ M) was used as a positive control for the induction of aromatase activity.

### **3.5.4 Hormone quantification**

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

### **3.5.5 RNA isolation and quantitative RT-PCR**

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

using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) and T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany): cDNA was stored at -20°C for quantitative PCR.

Primer pair sequences and standard curves characteristics for the reference genes (*UBC* and *RPII*), as well as *CYP3A7* and *SULT2A1*, are described in Table 3.1. Real-time quantitative PCR was performed using EvaGreen MasterMix (BioRad) with CFX96 real-time PCR Detection System (BioRad). Housekeeping genes were selected based on their stability for each pesticide treatment (gene expression stability (M) value below 0.5) using the geNorm algorithm method (Biogazelle qbase Plus Software, Zwijnaarde, Belgium).

**Table 3.1 :** Sequences of the primer pairs and their amplification characteristics for *CYP3A7* and *SULT2A1* transcripts and that of two reference genes (*UBC* and *RPII*), in H295R cells.

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

### 3.5.6 Statistical analysis

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

## 3.6 Results

### 3.6.1 Effects of neonicotinoids on CYP19 catalytic activity

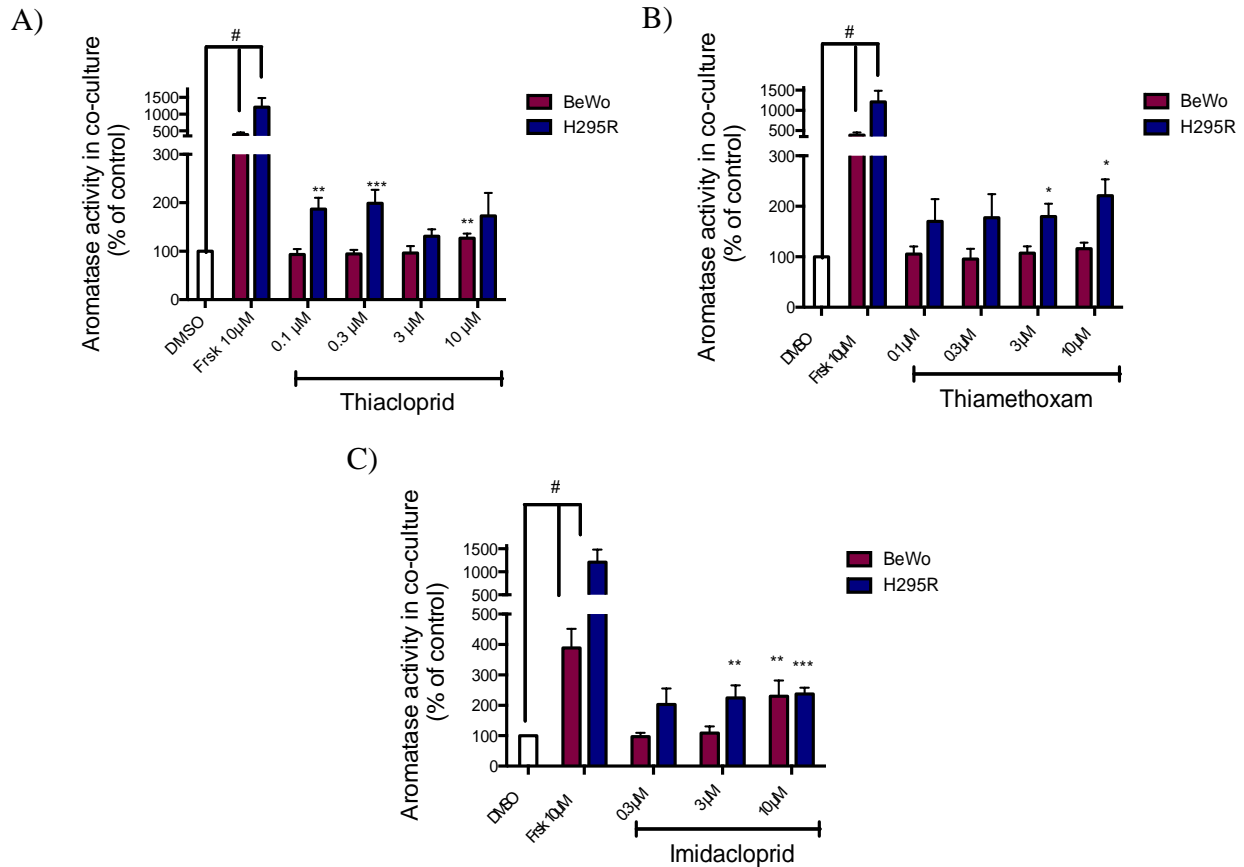
In this study, we determined the effects of three widely used neonicotinoids (thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid) on the catalytic activity of *CYP19* in a co-culture of H295R and BeWo cells. Forskolin increased aromatase activity by 3.9 and 12-fold in BeWo and H295R cells, respectively (Fig 3-1). Formestane (1  $\mu$ M) decreased its activity by 80-90% in both cell lines (not shown).

A 24-h exposure to increasing concentrations of thiacloprid induced aromatase activity in both cell types in co-culture (Fig 3-1A). In BeWo cells, thiacloprid induced aromatase activity by 1.3-fold at 10  $\mu$ M, which was statistically significant. In H295R cells, thiacloprid increased aromatase activity by 1.9- and 2.0-fold above control at a concentration of 0.1 and 0.3  $\mu$ M, respectively. At greater concentrations this increase was no longer apparent.

A 24-h exposure of the co-culture to various concentrations of thiamethoxam induced aromatase activity in H295R cells by 1.8- and 2.2-fold above control, at 3 and 10  $\mu$ M, respectively (Fig 3-1B). Thiamethoxam did not affect the catalytic activity of *CYP19* in the BeWo cell compartment of the co-culture (Fig 1B). Finally, a 24-h exposure of the co-culture to 3 and 10  $\mu$ M



imidacloprid induced the aromatase activity in H295R cells by 2.2- and 2.4-fold, respectively (Fig 3-1C), whereas in BeWo cells it was induced significantly by 2.3-fold at 10  $\mu$ M only (Fig 3-1C).



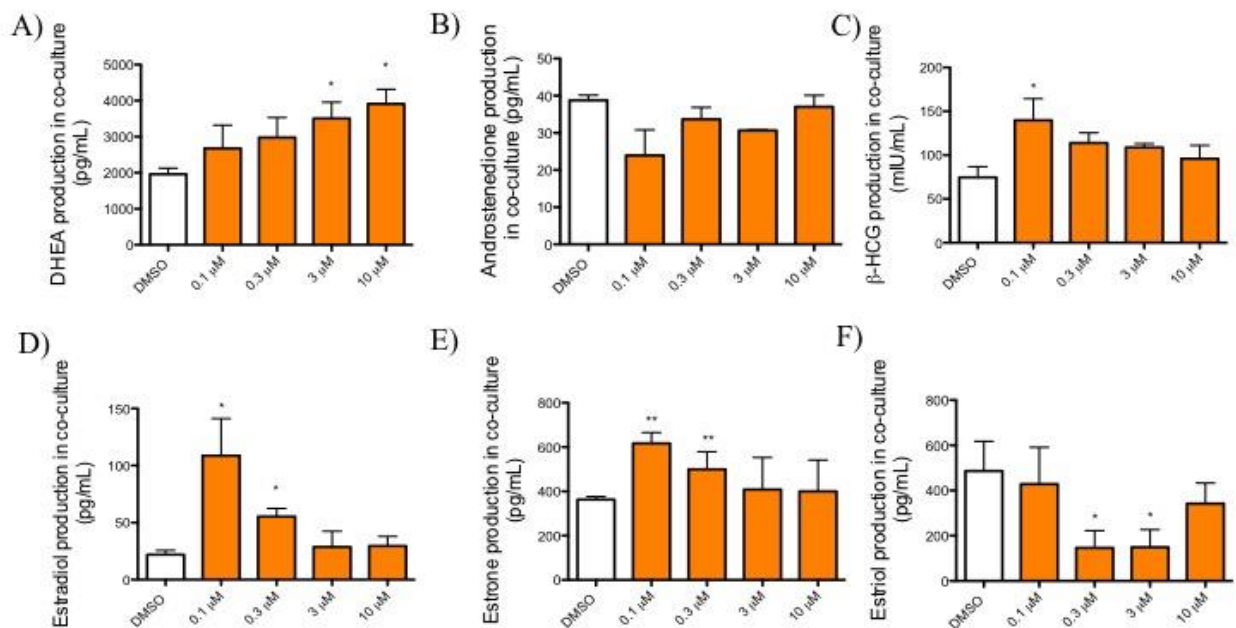
**Figure 3-1 : Concentration-dependent effects of thiacloprid (A), thiamethoxam (B) and imidacloprid (C) on aromatase activity in H295R and BeWo cells in co-culture**

Forskolin (Frsk) was used as a positive control for induction of aromatase activity. (#) A statistically significant difference between Frsk treatment and DMSO control (Student t-test;  $P < .05$ ). (\*, \*\*, \*\*\*) A statistically significant difference between neonicotinoid treatment and DMSO control (one-way ANOVA and Dunnett post hoc test; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Experiments were performed 4 times using different cell passages; per experiment each concentration was tested in triplicate.

### 3.6.2 Effects of neonicotinoids on hormone production

Basal production of dehydroepiandrosterone (DHEA) ( $1962 \pm 166$  pg/mL), androstenedione ( $38.8 \pm 1.4$  pg/mL), estriol ( $486.2 \pm 131.8$  pg/mL), estradiol ( $21.9 \pm 3.7$  pg/mL) and estrone ( $363.1 \pm 13.3$  pg/mL) by the co-culture was similar to that found in our previous study (Hudon Thibeault *et al.*, 2014) which initially characterized the model, although estrone and  $\beta$ -HCG production in our study was slightly higher than previously reported.

Thiacloprid increased DHEA production statistically significantly at 3  $\mu$ M ( $3506 \pm 450$  pg/mL) and 10  $\mu$ M ( $3912 \pm 402$  pg/mL), compared to vehicle control ( $1961 \pm 166$  pg/mL) (Fig 3-2A), although it had no effect on androstenedione production (Fig 2B). Thiacloprid increased  $\beta$ -hCG production to a statistically significant extent at 0.1  $\mu$ M ( $140.8 \pm 24.6$  mIU/mL) compared to DMSO ( $74.5 \pm 12.3$  mIU/mL), but not at greater concentrations (Fig 3-2C). Thiacloprid significantly increased estradiol and estrone production by the co-culture at 0.1 and 0.3  $\mu$ M, resulting in estradiol concentrations of  $108.7 \pm 32.6$  and  $55.4 \pm 7.1$  pg/mL, and estrone concentrations of  $617.2 \pm 48.6$  and  $499.7 \pm 79.4$  pg/mL, respectively, compared to vehicle control (estradiol:  $21.9 \pm 3.7$  pg/mL; estrone:  $363.1 \pm 13.3$  pg/mL) (Fig 3-2D-E). Strikingly, estriol production in the co-culture was strongly inhibited by 0.3 and 3  $\mu$ M thiacloprid ( $146.5 \pm 76.0$  and  $148.8 \pm 78.3$  pg/mL, decreasing production to about 30% of DMSO control ( $486.2 \pm 131.8$  pg/mL) (Fig 3-2F).

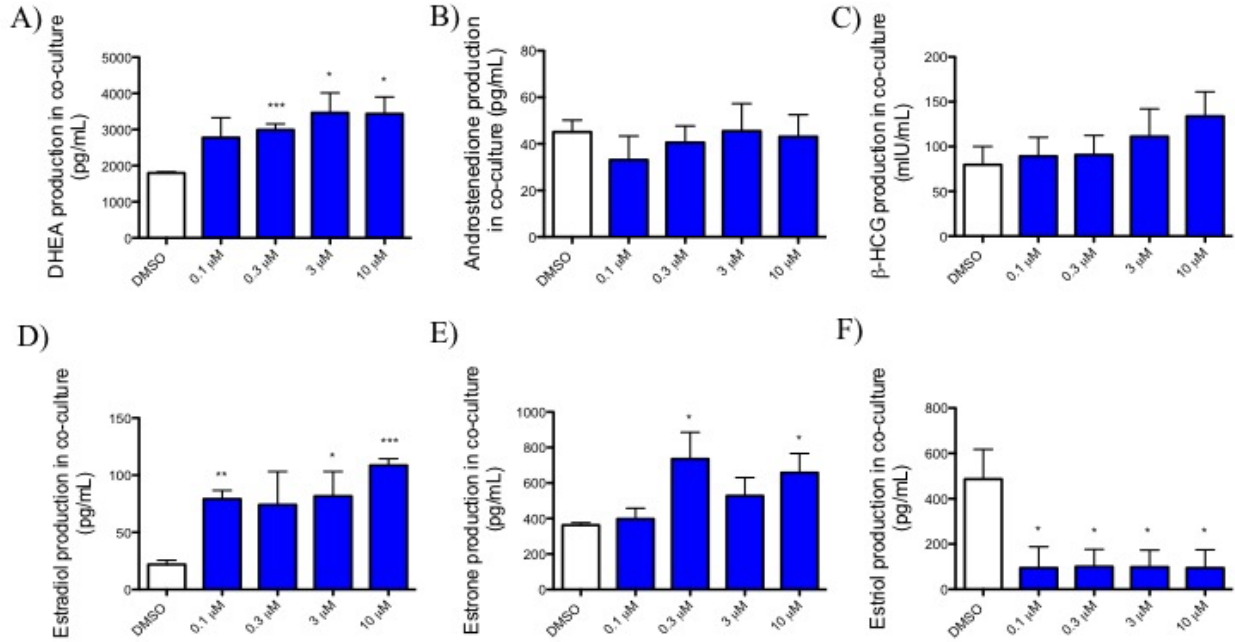


**Figure 3-2 : Concentration-dependent effects of thiamethoxam on DHEA (A), androstenedione (B), β-hCG (C), estradiol (D), estrone (E) and estriol (F) production by a co-culture of H295R and BeWo cells**

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

In the co-culture exposed to thiamethoxam, DHEA production was increased concentration-dependently and was significantly greater than control ( $1790 \pm 29.5$  pg/mL) by 1.67-fold at 0.3 μM ( $2992 \pm 166$  pg/mL), by 1.9-fold at 3 μM ( $3464 \pm 550$  pg/mL) as well as at 10 μM ( $3436 \pm 466$  pg/mL) (Fig 3-3A). The production of androstenedione and β-hCG remained unchanged (Fig 3-3B-C). Thiamethoxam concentration-dependently increased estradiol production with a 5.0-fold increase at 10 μM ( $108.6$  pg/mL) compared to DMSO control ( $21.9 \pm 3.7$  pg/mL) (Fig 3-3D). Estrone production was increased by 2-fold ( $735.2$  pg/mL) at 10 μM thiamethoxam compared to control production ( $363.1 \pm 13.3$  pg/mL) (Fig 3-3E). Estriol production was

inhibited by about 80% at all tested concentrations of thiamethoxam compared to DMSO control (Fig 3-3F).

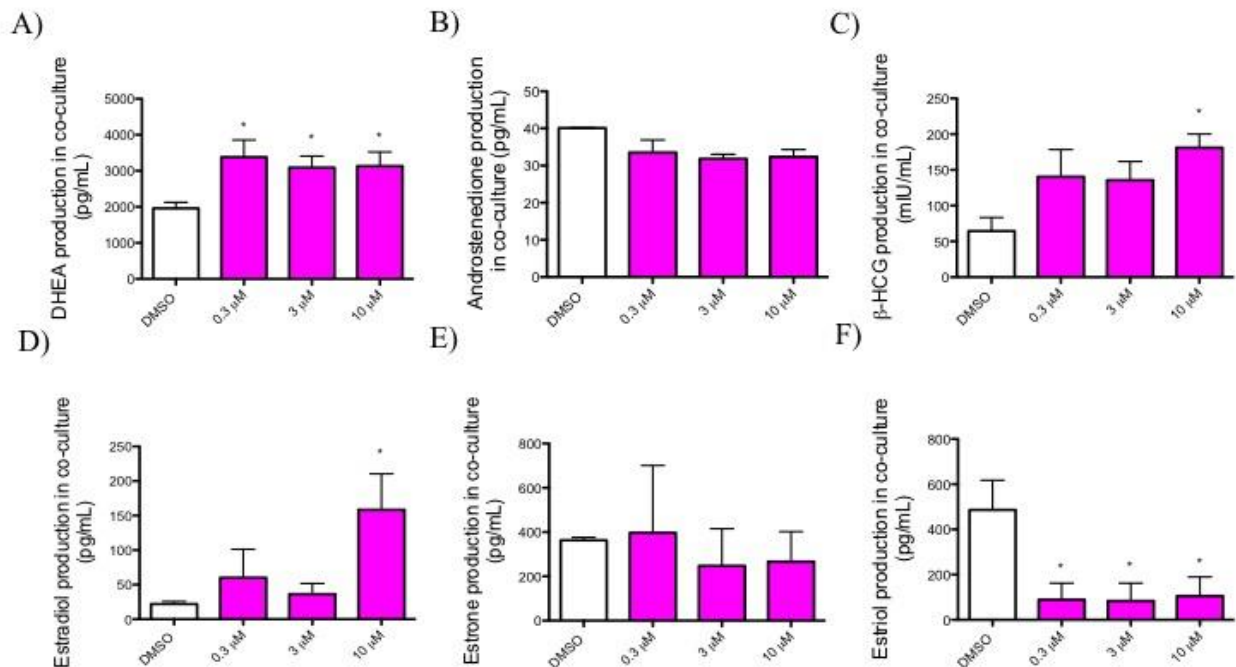


**Figure 3-3 : Concentration-dependent effects of thiamethoxam on DHEA (A), androstenedione (B), β-hCG (C), estradiol (D), estrone (E) and estriol (F) production by a co-culture of H295R and BeWo cells**

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

In the co-culture exposed to imidacloprid, DHEA production was significantly increased at all concentrations by about 1.7-fold ( $3088 \pm 325$  to  $3381 \pm 475$  pg/mL) compared to control ( $1962 \pm 166$  pg/mL) (Fig 3-4A), whereas androstenedione production was not affected (Fig 3-4B-E). The production of β-hCG was increased statistically significantly at an imidacloprid concentration of 10 μM ( $181.1 \pm 19.0$  mIU/mL) by about 2.8-fold above control ( $64.5 \pm 18.9$  mIU/mL) (Fig 3-4C). Estradiol production was strongly elevated at 10 μM imidacloprid ( $158.4 \pm 51.9$  pg/mL) and

was about 7.2-fold greater than control (Fig 4D). Imidacloprid at all concentrations inhibited estriol production by about 80% compared to DMSO control (Fig 3-4F).



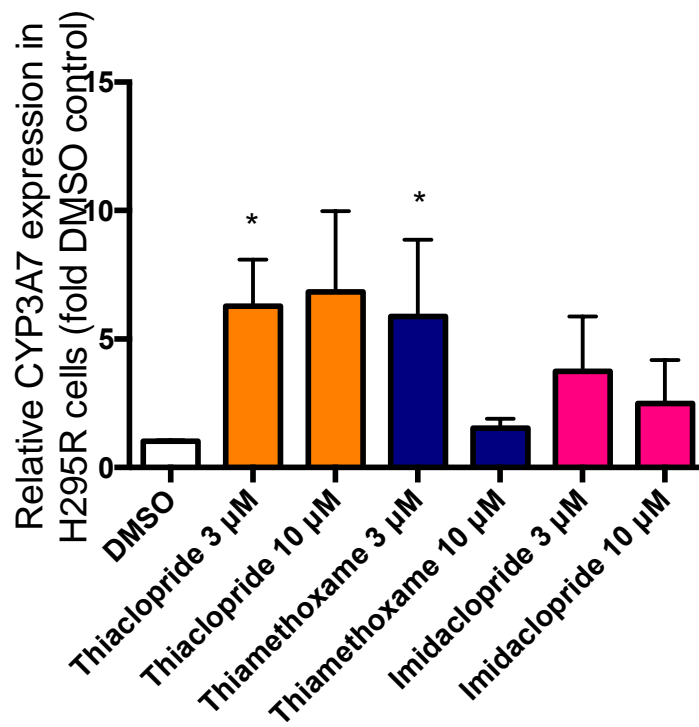
**Figure 3-4 : Concentration-dependent effects of imidacloprid (on DHEA (A), androstenedione (B),  $\beta$ -hCG (C), Estradiol (D), Estrone (E) and Estriol (F) production by H295R and BeWo cells in co-culture.**

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

### 3.6.3 Effects of neonicotinoids on mRNA levels of CYP3A7 and SULT2A

In the co-culture exposed to each of the three neonicotinoids, a significant decrease in estriol production was observed. *SULT2A1*, expressed in the fetal adrenal, and *CYP3A7*, expressed in the fetal liver, are key enzymes in the biosynthesis of the precursor for estriol, which is produced predominantly in placenta. Therefore, we wished to confirm the presence of *SULT2A1* and *CYP3A7* in H295R cells by RT-qPCR and then determine the potential effects of neonicotinoids

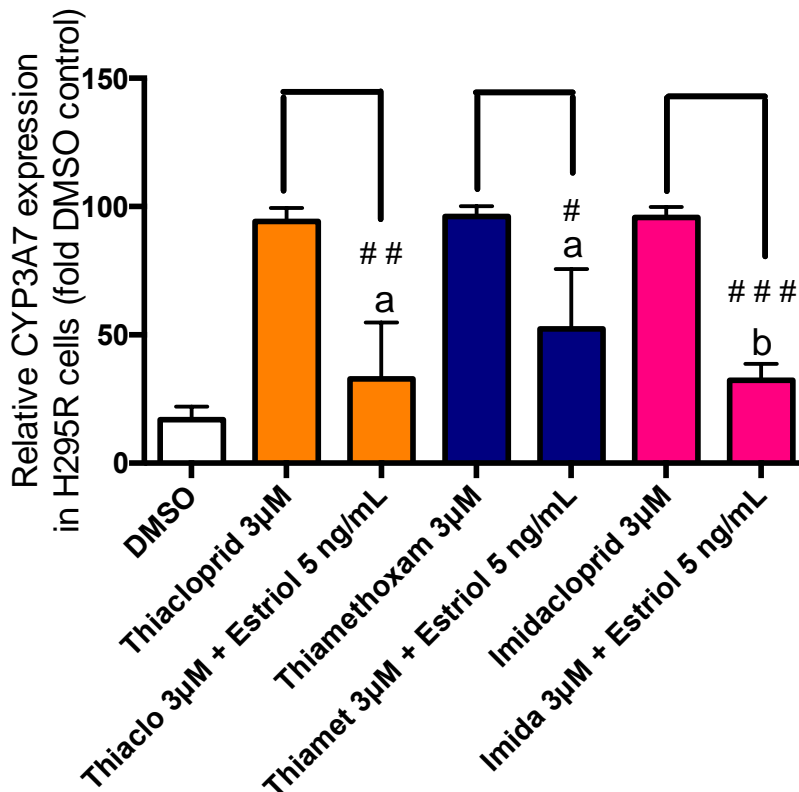
on their expression. As a novel finding, we were able to detect *SULT2A1* and *CYP3A7* expression in H295R cells, confirming our previous suggestion that H295R cells act as the fetal adrenocortical as well as liver compartment of the co-culture model. *SULT2A1* expression was not affected by exposure to thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid at 3 or 10  $\mu\text{M}$  (data not shown). A 24-h exposure of H295R cells to thiacloprid at 3 and 10  $\mu\text{M}$  resulted in a statistically significant increase in levels of *CYP3A7* expression by 6.29 and 6.83-fold, respectively, compared to DMSO control (Fig 3-5). Thiamethoxam at 3  $\mu\text{M}$  induced *CYP3A7* mRNA levels statistically significantly by 5.88-fold compared to DMSO control. A 24-h exposure to 3  $\mu\text{M}$  imidacloprid increased *CYP3A7* expression in H295R cells by 3.75-fold compared to DMSO control, although this induction was not statistically significant (Fig 3-5).



**Figure 3-5 : Relative expression levels of CYP3A7 in H295R cells exposed for 24-h to 3 or 10 µM of thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid. DMSO was used as a negative control**

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

To determine whether the increased *CYP3A7* gene expression was related to the decreased estriol levels in response to the neonicotinoids, we determined the effect of estriol supplementation (using a concentration normally found in the co-culture under basal conditions) on the expression of *CYP3A7* in response to thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid. Co-treatment of H295R cells with estriol (5 ng/mL) prior to a 24-h exposure to thiacloprid, thiamethoxam or imidacloprid at 3 µM resulted in significantly reduced levels of *CYP3A7* expression compared to the neonicotinoid treatments alone, which all increased *CYP3A7* levels significantly above DMSO control (Fig 3-6).



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

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

## 3.7 Discussion

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

We have successfully applied our previously developed fetoplacental co-culture model as a unique screening tool to evaluate the potential endocrine disrupting effects of a series of neonicotinoids on steroidogenesis during pregnancy. Naturally, our co-culture system has some limitations –it uses cancer cells, not primary cells and cannot fully describe the complex



interactions that occur *in vivo*, but as a model of fetoplacental steroidogenesis it is capable of producing a variety of hormones important during pregnancy. We measured aromatase activity in both the fetal (H295R) and placental (BeWo) compartments of the co-culture model with basal activity being at least 15 times higher in BeWo cells than in H295R cells (Fig 3-1A-C), as previously demonstrated (Hudon Thibeault *et al.*, 2014). This corresponds well with the *in vivo* situation where the placenta is responsible for the majority of *CYP19* expression and estrogen biosynthesis (Hanley *et al.*, 2001, Mesiano *et al.*, 1997, Pezzi *et al.*, 2003, Rainey *et al.*, 2002).

It is well understood that estrogen production in the fetoplacental unit is dependent upon a close collaboration between the fetus and the placenta. As the human placenta does not express significant levels of *CYP17* or its associated catalytic activities, it is, despite high levels of aromatase activity, incapable of producing significant amounts of estrogens *de novo* and is dependent on androgen precursors produced by the fetal adrenal and liver. During pregnancy, up to 90% of the unique pregnancy estrogen estriol is derived from fetal precursors (Gerhard *et al.*, 1986). As previously shown, our fetoplacental co-culture model produces significant quantities of estriol (Fig 3-2F, 3-3F, 3-4F), whereas each cell type in monoculture produces negligible amounts (Hudon Thibeault *et al.*, 2014), further supporting the physiological relevance of our co-culture as a representative model of the fetoplacental steroidogenic unit and justifying its use as a meaningful screening tool for the effects of potential endocrine disrupting chemicals during pregnancy (Hudon Thibeault *et al.*, 2017).

### **3.7.2 Disruption of fetoplacental steroidogenesis by neonicotinoid insecticides**

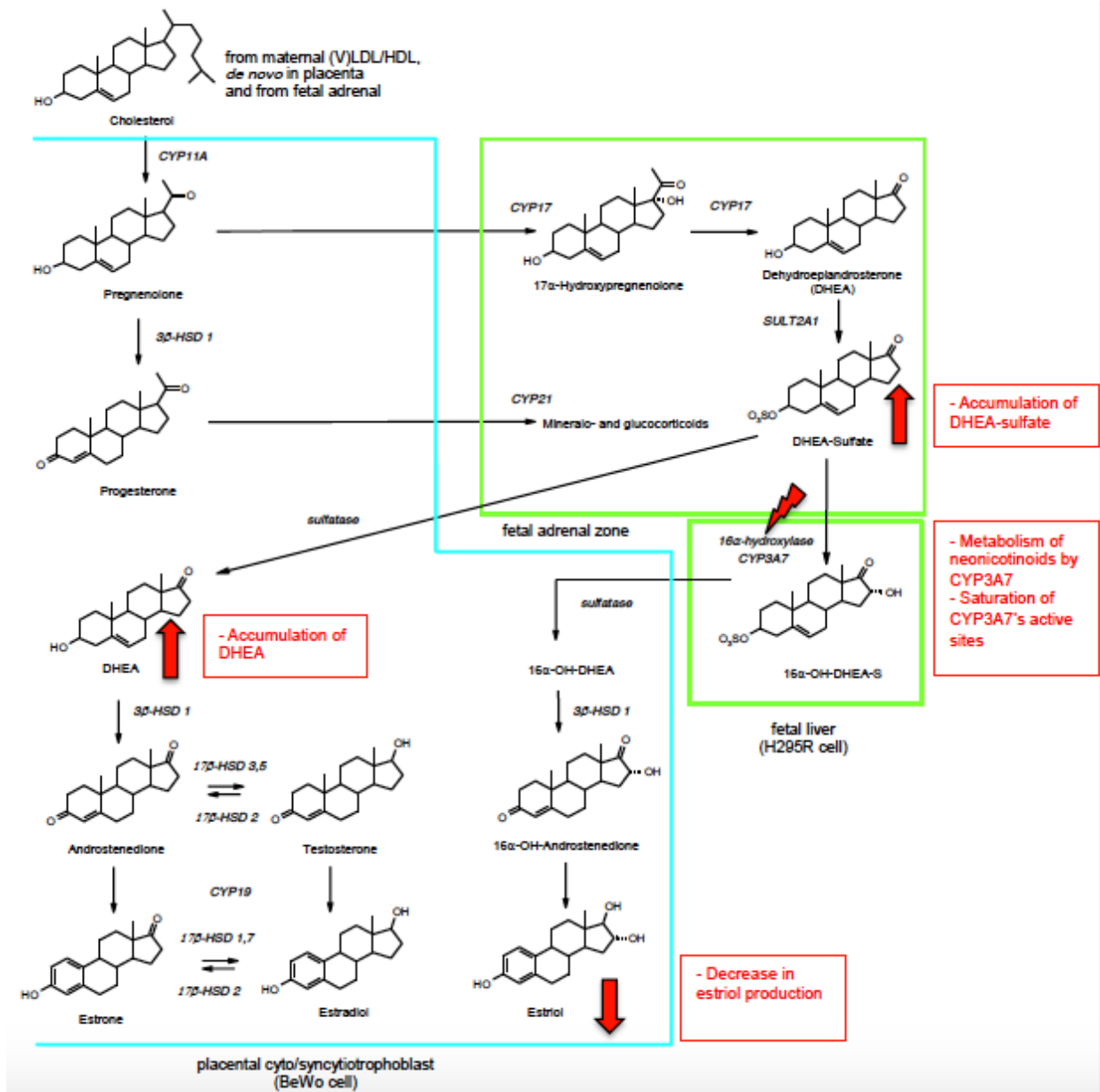
It is widely accepted that an important number of environmental contaminants have estrogen-like activity. The most commonly studied mechanism for estrogenic effects is the binding of chemicals to the estrogen receptor, whereby they act as (partial) agonists. This mechanism has

been demonstrated for several contaminants to which pregnant women may be exposed, such as bisphenol A (Chou *et al.*, 2011, Diel *et al.*, 2002, Heneweer *et al.*, 2005, Vivacqua *et al.*, 2003, Wetherill *et al.*, 2007). However, estrogen receptor activation is not the only possible mechanism by which environmental contaminants may exert pro- or antiestrogenic activity. For example, atrazine, an herbicide widely used in North America, induces aromatase activity and expression in various human cell lines (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016, Fan *et al.*, 2007b, Sanderson, 2006, Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001, Sanderson *et al.*, 2000). A growing number of studies have determined that neonicotinoid insecticides are potential endocrine disruptors. A recent study showed that clothianidin, a neonicotinoid and metabolite of thiamethoxam, caused DNA fragmentation in germ cells of male quails (Hoshi *et al.*, 2014). Kapoor *et al.* (2011) showed that female rats exposed to neonicotinoids had lower ovarian weight, as well as LH and progesterone levels. We also previously demonstrated that two neonicotinoids, thiacloprid and thiamethoxam, induced *CYP19* expression and aromatase activity in H295R cells at environmentally relevant concentrations (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016). In the present study, the neonicotinoids thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid induced aromatase activity in H295R and BeWo cells in co-culture (Fig 3-1), highlighting the tissue- and promoter-specific differences in the effects of neonicotinoids on *CYP19* expression, aromatase activity and estrogen biosynthesis. Beside the potential direct effects of neonicotinoids on *CYP19* expression, the tested pesticides also increased the synthesis of DHEA and  $\beta$ -hCG (the latter an important early indicator of pregnancy), resulting in the increased production of estradiol and estrone that we observed in the co-culture. It is known that hCG induces cAMP intracellular levels, which we have shown can increase aromatase expression and activity (Sanderson *et al.*, 2002). Estrogen

biosynthesis is, therefore, complex and cannot be explained simply by the production of precursors like DHEA or androstenedione.

### **3.7.3 Possible metabolism of neonicotinoids by fetal CYP3A7**

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



**Figure 3-7 : Steroidogenic pathways in the co-culture model of fetoplacental steroidogenesis, and the proposed targets of neonicotinoid insecticides (in red) leading to decreased estriol production and increased levels of DHEA**

This would explain the decreased estriol biosynthesis and the accumulation of DHEA in our co-culture when exposed to neonicotinoids. The excess androgen precursors would result in the

overproduction of estrone and estradiol by the placental compartment of the co-culture, resulting in the increased levels of these two estrogens we observed (Fig 3-2D, E, 3-3D, E, 3-4D, E).

We further suggest that the strong decrease in estriol levels triggers a positive feedback mechanism that increases *CYP3A7* gene expression, thus explaining the *CYP3A7* overexpression in H295R cells (the fetal compartment of the co-culture). To provide evidence for this hypothesis, we determined the effects of thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid on *CYP3A7* expression in H295R cells supplemented with a normalizing concentration of estriol to overcome the strong suppression of estriol synthesis by the neonicotinoids (Fig 3-6). Estriol reversed the neonicotinoid-mediated induction of *CYP3A7* mRNA expression, suggesting such a positive feedback mechanism may exist. During pregnancy, levels of circulating estrone and estradiol increase by 100-fold. This induction reaches 1000-fold for estriol, bringing its concentration up to similar levels as the other estrogens, compared to non-pregnant women (Blackburn, 2007). To reach these levels, placental estrogens use a positive feedback mechanism, consisting of upregulating DHEA(-S) production by the fetal adrenal zone. The final result of this positive feedback is the induction of placental estrogen, including estriol (Albrecht *et al.*, 1999; Kaludjerovic and Ward, 2011). The decrease in estriol levels in the fetoplacental co-culture model exposed to neonicotinoids may activate this positive feedback mechanism, leading to overexpression of *CYP3A7* in H295R cells (Fig 3-5). The control of placental estrogen production by this positive feedback mechanism would also explain why neonicotinoid-induced *CYP3A7* expression is reversed by a co-treatment with estriol (Fig 3-6).

### 3.7.4 Implications for human health

During pregnancy, estrogens regulate uteroplacental blood flow, trophoblast invasion and cellular differentiation (Yashwanth *et al.*, 2006). Disruption of estrogen biosynthesis during this critical period may impact the development of the fetus and placenta, as well as affect the mother's health (Kaijser *et al.*, 2000). For example, disruption of estrogen production has been associated with negative birth outcomes (Gerhard *et al.*, 1986, Kaijser *et al.*, 2000, Troisi *et al.*, 2003). It remains unclear if environmental concentrations of neonicotinoids are sufficient to disrupt aromatase activity or hormone production (specifically estriol) in pregnant women. Nevertheless, neonicotinoids are frequently detected in vegetables and fruits (Chen *et al.*, 2014) and their concentrations are steadily increasing in water samples in agricultural areas in North America, with concentrations up to 3.6 µg/L (about 0.012 µM for thiamethoxam) having been measured (Anderson *et al.*, 2013, Main *et al.*, 2014, Smalling *et al.*, 2015). These widely used insecticides' metabolites are also detected in the urine of farm workers at concentrations similar to those used in our experiments (up to 0.05 µM for metabolite of thiacloprid and imidacloprid) (Nomura *et al.*, 2013). Importantly, it is suspected that ingested neonicotinoids can pass through the placental barrier (Taira, 2014), since neurobehavioral deficits were measured in rat offspring exposed *in utero* to these insecticides (Abou-Donia *et al.*, 2008). Therefore, the steadily increasing use of neonicotinoid pesticides is a cause of concern for the health of pregnant women.

### **3.8 Conclusion**

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

### **Conflicts of interest**

The authors declare to have no conflicts of interest.

### **3.9 Acknowledgements**

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

### 3.10 References

- Abadin, H.G., Hibbs, B.F., Pohl, H.R., 1997. Breast-Feeding Exposure of Infants To Cadmium, Lead, and Mercury: a Public Health Viewpoint. *Toxicology and Industrial Health* **13**, 495-517.
- Abou-Donia, M.B., Goldstein, L.B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M., Abdel-Rahman, A.A., 2008. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **71**, 119-130.
- Albrecht, E.D., Aberdeen, G.W., Pepe, G.J., 2000. The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **182**, 432-438.
- Albrecht, E.D., Pepe, G.J., 1999. Central Integrative Role of Oestrogen in Modulating the Communication between the Placenta and Fetus that Results in Primate Fetal-placental Development. *Placenta* **20**, 129-139.
- Anderson, T.A., Salice, C.J., Erickson, R.A., McMurry, S.T., Cox, S.B., Smith, L.M., 2013. Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* **92**, 84-90.
- Bal, R., Naziroğlu, M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E., Baydas, G., 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* **30**, 492-499.
- Bellinger, D.C., 2013. Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment: An Update. *Safety and Health at Work* **4**, 1-11.
- Blackburn, S., 2007. Reproductive and developmental processes. *Maternal, Fetal and Neonatal Physiology*, 100-102.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 35-67.
- Caron-Beaudoin, É., Denison, M.S., Sanderson, J.T., 2016. Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase (CYP19) in Human Adrenocortical Carcinoma (H295R) and Primary Umbilical Vein Endothelial (HUVEC) Cells. *Toxicological Sciences* **149**, 134-144.
- Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms, and Relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 2923-2931.
- Chen, M., Tao, L., McLean, J., Lu, C., 2014. Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 6082-6090.
- Chou, W.-C., Chen, J.-L., Lin, C.-F., Chen, Y.-C., Shih, F.-C., Chuang, C.-Y., 2011. Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in



- regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environmental Health* **10**, 94.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M.-H., 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**, 410-419.
- Diel, P., Olf, S., Schmidt, S., Michna, H., 2002. Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **80**, 61-70.
- Dorne, J.L.C.M., Walton, K., Renwick, A.G., 2005. Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review. *Food and Chemical Toxicology* **43**, 203-216.
- Ellis, S.A., Palmer, M.S., McMichael, A.J., 1990. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *The Journal of Immunology* **144**, 731-735.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Komatsu, T., Morohashi, K., Hayes, T.B., Takayanagi, R., Nawata, H., 2007. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect* **115**, 720-727.
- Foster, P.M.D., 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *International Journal of Andrology* **29**, 140-147.
- Gazdar, A.F., Oie, H.K., Shackleton, C.H., Chen, T.R., Triche, T.J., Myers, C.E., Chrousos, G.P., Brennan, M.F., Stein, C.A., La Rocca, R.V., 1990. Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis. *Cancer Research* **50**, 5488-5496.
- Gerhard, I., Fitzer, C., Klinga, K., Rahman, N., Runnebaum, B., 1986. Estrogen screening in evaluation of fetal outcome and infant's development. *Journal of Perinatal Medicine-Official Journal of the WAPM* **14**, 279-291.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Bernardo, A.D., Greatti, M., Giorio, C., Tapparo, A., 2009. Translocation of Neonicotinoid Insecticides from Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. *Journal of Economic Entomology* **102**, 1808-1815.
- Goulson, D., 2013. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* **50**, 977-987.
- Hanley, N.A., Rainey, W.E., Wilson, D.I., Ball, S.G., Parker, K.L., 2001. Expression Profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the Human Fetal Adrenal Gland: Potential Interactions in Gene Regulation. *Molecular Endocrinology* **15**, 57-68.
- Heneweer, M., Muusse, M., Dingemans, M., de Jong, P.C., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2005. Co-culture of Primary Human Mammary Fibroblasts and MCF-7 Cells as an In Vitro Breast Cancer Model. *Toxicological Sciences* **83**, 257-263.

- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* **336**, 348-350.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T., 2002. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* **16**, 117-122.
- Hoshi, N., Hirano, T., Omotehara, T., Tokumoto, J., Umemura, Y., Mantani, Y., Tanida, T., Warita, K., Tabuchi, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., 2014. Insight into the Mechanism of Reproductive Dysfunction Caused by Neonicotinoid Pesticides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **37**, 1439-1443.
- Hu, H., 1991. Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *American Journal of Public Health* **81**, 1070-1072.
- Hudon Thibeault, A.-A., Deroy, K., Vaillancourt, C., Sanderson, J.T., 2014. A Unique Co-culture Model for Fundamental and Applied Studies of Human Fetoplacental Steroidogenesis and Interference by Environmental Chemicals. *Environmental Health Perspectives* **122**, 371-377.
- Hudon Thibeault, A.-A., Laurent, L., Duy, S.V., Sauvé, S., Caron, P., Guillemette, C., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C., 2017. Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the fetoplacental unit. *Molecular and Cellular Endocrinology* **442**, 32-39.
- Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Humphrey, H.E.B., 1990. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *The Journal of Pediatrics* **116**, 38-45.
- Kajser, M., Granath, F., Jacobsen, G., Cnattingius, S., Ekblom, A., 2000. Maternal Pregnancy Estriol Levels in Relation to Anamnestic and Fetal Anthropometric Data. *Epidemiology* **11**, 315-319.
- Kaludjerovic, J., Ward, W.E., 2012. The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *J Nutr Metab* **2012**, 837901.
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Srivastava, L.P., 2011. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 3086-3089.
- Komori, M., Nishio, K., Kitada, M., Shiramatsu, K., Muroya, K., Soma, M., Nagashima, K., Kamataki, T., 1990. Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry* **29**, 4430-4433.
- Komori, M., Nishio, K., Ohi, H., Kitada, M., Kamataki, T., 1989. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing the entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450. *J Biochem* **105**, 161-163.
- Kondoh, N., Wakatsuki, T., Ryo, A., Hada, A., Aihara, T., Horiuchi, S., Goseki, N., Matsubara, O., Takenaka, K., Shichita, M., 1999. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. *Cancer research* **59**, 4990-4996.

- Lacroix, D., Sonnier, M., Moncion, A., Cheron, G., Cresteil, T., 1997. Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem* **247**, 625-634.
- Leeder, J.S., Gaedigk, R., Marcucci, K.A., Gaedigk, A., Vyhlidal, C.A., Schindel, B.P., Pearce, R.E., 2005. Variability of CYP3A7 Expression in Human Fetal Liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **314**, 626-635.
- Main, A.R., Headley, J.V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., Morrissey, C.A., 2014. Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PLoS ONE* **9**, e92821.
- Massicotte, J., Borgus, J.-P., Lachance, R., Labrie, F., 1981. Inhibition of hCG-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in rat luteal cells by an LHRH agonist. *Journal of steroid biochemistry* **14**, 239-242.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997. Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocrine Reviews* **18**, 378-403.
- Mucci, L.A., Lagiou, P., Tamimi, R.M., Hsieh, C.-C., Adami, H.-O., Trichopoulos, D., 2003. Pregnancy estriol, estradiol, progesterone and prolactin in relation to birth weight and other birth size variables (United States). *Cancer Causes and Control* **14**, 311-318.
- Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 2000. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. *Toxicological Sciences* **55**, 143-151.
- Nampoothiri LP, N.P., Rao AJ, 2007. Proteomic profiling of forskolin-induced differentiated BeWo cells: an in-vitro model of cytotrophoblast differentiation. *Reprod Biomed Online* **14**, 477-487.
- Nomura, H., Ueyama, J., Kondo, T., Saito, I., Murata, K., Iwata, T., Wakusawa, S., Kamijima, M., 2013. Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using GC-MS. *Journal of Chromatography B* **941**, 109-115..
- Oskarsson, A., Ullerås, E., Plant, K.E., Hinson, J.P., Goldfarb, P.S., 2006. Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro. *Journal of Applied Toxicology* **26**, 484-492.
- Pezzi, V., Mathis, J.M., Rainey, W.E., Carr, B.R., 2003. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **87**, 181-189.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* **313**, 856-862.
- Rainey, W.E., Carr, B.R., Sasano, H., Suzuki, T., Mason, J.I., 2002. Dissecting human adrenal androgen production. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **13**, 234-239.
- Sanderson, J.T., 2006. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicological Sciences* **94**, 3-21.

- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **182**, 44-54.
- 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., 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? *Toxicological Sciences* **54**, 121-127.
- Schuetz, J.D., Molowa, D.T., Guzelian, P.S., 1989. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys* **274**, 355-365.
- Schulz-Jander, D.A., Casida, J.E., 2002. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters* **132**, 65-70.
- Shi, X., Dick, R.A., Ford, K.A., Casida, J.E., 2009. Enzymes and Inhibitors in Neonicotinoid Insecticide Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4861-4866.
- Shiraki, N., Yamazoe, T., Qin, Z., Ohgomori, K., Mochitate, K., Kume, K., Kume, S., 2011. Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells in vitro using a feeder-free basement membrane substratum. *PLoS one* **6**, e24228.
- Siddiqui, M., Srivastava, S., Mehrotra, P., Mathur, N., Tandon, I., 2003. Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **76**, 75-80.
- Smalling, K.L., Reeves, R., Muths, E., Vandever, M., Battaglin, W.A., Hladik, M.L., Pierce, C.L., 2015. Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Science of The Total Environment* **502**, 80-90.
- Staels, B., Hum, D.W., Miller, W.L., 1993. Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol. Endocrinol.* **7**, 423-433.
- Stokstad, E., 2013. Pesticides Under Fire for Risks to Pollinators. *Science* **340**, 674-676.
- Svedas, E., Nisell, H., VanWijk, M.J., Nikas, Y., Kublickiene, K.R., 2002. Endothelial dysfunction in uterine circulation in preeclampsia: Can estrogens improve it? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **187**, 1608-1616.
- Taira, K., 2014. Human neonicotinoids exposure in Japan. *Japanese Journal of Clinical Ecology* **23**, 14-24.
- Troisi, R., Potischman, N., Roberts, J., Siiteri, P., Daftary, A., Sims, C., Hoover, R.N., 2003. Associations of maternal and umbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States). *Cancer Causes and Control* **14**, 347-355.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**, research0034. 0031.
- Vivacqua, A., Recchia, A.G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Di Gioia, M.L., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A., Maggiolini, M., 2003. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor  $\alpha$  in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* **22**, 275-284.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M., 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology* **24**, 178-198.
- Yashwanth, R., Rama, S., Anbalagan, M., Rao, A.J., 2006. Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: A study using human placental and rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **246**, 114-120.



**CHAPITRE 4 NEONICOTINOID PESTICIDES INDUCE A SWITCH IN PROMOTER-SPECIFIC AROMATASE (CYP19) EXPRESSION IN BREAST CANCER CELLS BY ACTIVATING THE VEGF SIGNALLING PATHWAY**

**Les pesticides néonicotinoïdes induisent un changement d'utilisation des promoteurs lors de l'expression de l'aromatase (CYP19) en activant des voies de signalisation induites par le VEGF dans des cellules de cancer du sein**

*Élyse Caron-Beaudoin<sup>a\*</sup>, Rachel Viau<sup>a</sup> and J. Thomas Sanderson<sup>a</sup>*

<sup>a</sup> INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, CANADA

\* Auteur-ressource

L'article a été soumis à la revue **Environmental Health Perspectives** le 15 août 2017, et a été accepté conditionnellement à des révisions. La version corrigée a été resoumise le 22 novembre 2017.

## 4.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs

Élyse Caron-Beaudoin : L'étudiante a contribué à l'élaboration du projet de recherche ainsi qu'à l'établissement des méthodologies. Plus précisément, l'étudiante a mis au point les amorces utilisées pour mesurer l'expression promoteur-spécifique de *CYP19*, ainsi que la méthode de RT-qPCR nécessitant une pré-amplification. L'étudiante a réalisé les expériences en laboratoire ainsi que l'analyse des résultats. Elle a rédigé l'article et les corrections subséquentes.

Rachel Viau : Rachel Viau a travaillé sur ce projet en tant que stagiaire d'été. Elle a participé à la mesure de l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* dans les cellules de cancer du sein.

Thomas Sanderson : Thomas Sanderson a participé à l'élaboration du projet et à l'analyse des résultats. Il a également révisé l'article et les corrections subséquentes.

Les résultats préliminaires obtenus au début de cette section du projet de recherche ont mené à une courte publication dans la revue *Cancer cell and microenvironment* (annexe 1). Dans le cadre du travail présenté au chapitre 2, Dr. Denison avait conçu une lignée cellulaire SKBR3 transfectée avec un gène rapporteur de luciférase sous le contrôle du promoteur I.4 de l'aromatase. La pertinence de cette lignée cellulaire transfectée ne s'est pas avérée excellente (annexe 2) et les résultats présentés dans le présent chapitre sont plus intéressants pour étudier l'expression de l'aromatase via l'activité de certains promoteurs.



## 4.2 Résumé

L'aromatase (CYP19) est une enzyme clé de la synthèse des œstrogènes et est exprimée de façon promoteur-spécifique. Dans la glande mammaire saine, *CYP19* est exprimée à de bas niveaux sous la régulation du promoteur I.4. Dans le cancer du sein hormono-dépendant, les fibroblastes situés autour de la tumeur expriment fortement *CYP19* suite à un changement d'utilisation des promoteurs, résultant en une diminution de l'activité du promoteur normal I.4 au profit d'une augmentation de l'activité des promoteurs PII, I.3 et I.7. Le résultat final est une augmentation de la production d'œstrogènes dans le micro-environnement de la tumeur. Nous avons peu d'informations quant aux effets des contaminants environnementaux sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19*. Nous avons déterminé les effets de deux pesticides néonicotinoïdes largement utilisés (thiaclopride et imidaclopride) sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* dans les cellules de cancer du sein Hs578t. Nous sommes les premiers à démontrer que le promoteur normal I.4 et les promoteurs suractivés dans le cancer du sein PII, I.3 et I.7 sont actifs dans cette lignée cellulaire. Nous avons trouvé que l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII, I.3 et I.7 dans les cellules Hs578t semble être en partie dépendante de l'activation de deux voies de signalisation du VEGF, soit celles de la *mitogen activated protein kinase* (MAPK) 1/3 et de la phospholipase C (PLC). Une exposition des cellules Hs578t à des concentrations environnementales d'imidaclopride et de thiaclopride a engendré un changement d'utilisation des promoteurs guidant l'expression de *CYP19*, soit une inhibition de l'activité du promoteur normal I.4 alors que l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII, I.3 et I.7 s'est vue fortement augmentée, engendrant une induction de l'activité catalytique de l'aromatase. Ces effets étaient plus marqués aux concentrations les plus basses. Nos résultats indiquent que le thiaclopride et

l'imidaclopride induisent potentiellement les voies de signalisation MAPK 1/3 et PLC. Ce changement unique d'utilisation des promoteurs est fréquemment observé chez les patientes atteintes de cancer du sein hormone-dépendant, et nous sommes les premiers à démontrer que certains néonicotinoïdes pourraient déclencher ou stimuler ce processus.

### **4.3 Abstract**

Aromatase (*CYP19*) is a key enzyme in the biosynthesis of estrogens and is expressed in a promoter-specific manner. In the mammary gland, *CYP19* gene is poorly expressed under the regulation of its I.4 promoter. In hormone-dependent breast cancer, fibroblast cells surrounding the tumor express increased levels of *CYP19* mRNA due to a decrease of I.4 promoter activity and an increase of PII, I.3 and I.7-promoters activity. Little is known about the effects of environmental chemicals on the promoter-specific *CYP19* expression. We determined the effects of two neonicotinoids (thiacloprid and imidacloprid) on the promoter-specific *CYP19* expression in Hs578t breast cancer cells. We are the first to demonstrate that the normal *CYP19* I.4 promoter and the breast cancer-relevant PII, I.3 and I.7 promoters are active in these cells. We found that the expression of *CYP19* via PII, I.3 and I.7 promoters in Hs578t cells is, in part, dependent on the activation of two VEGF signalling pathways: mitogen activated protein kinase (MAPK) 1/3 and phospholipase C (PLC). Exposure of Hs578t cells to environmental concentrations of imidacloprid and thiacloprid resulted in a switch in promoter usage for *CYP19* expression, involving an inhibition of normal I.4 promoter activity, whereas PII, I.3 and I.7 promoter-mediated *CYP19* expression and aromatase catalytic activity were increased. These responses were non-monotonic with greater effects seen at lower concentrations. We determined that thiacloprid and imidacloprid exerted their effects by inducing the MAPK 1/3 and/or PLC

pathways. This change in promoter usage is observed in patients with hormone-dependent breast cancer and we are the first to show, *in vitro*, that neonicotinoids may trigger or stimulate this process.

#### **4.4 Acknowledgments**

This research was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery grant (NSERC; no. 313313-2012) and an Alternatives Research and Development Foundation (ARDF) grant to JTS and doctoral studentships from the *Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT)* and *Fondation universitaire Armand-Frappier INRS* to ECB. This study is part of Rachel Viau's internship that was funded by the *Fondation universitaire Armand-Frappier INRS*. The authors would like to thank Joey St-Pierre for his expertise in preamplified quantitative PCR.

#### **4.5 Introduction**

*Background.* In 2015, 25 000 women were diagnosed with breast cancer in Canada (Canadian Cancer Society, 2015). In the United States, it was expected that 246 660 new cases of breast cancer would be diagnosed in 2016 (Siegel *et al.*, 2016). Of these, 70% of diagnosed breast cancers are hormone-dependent. In this type of cancer, increased local estrogen is produced, resulting in greater concentrations in the tumor microenvironment, which stimulates the proliferation of breast cancer epithelial cells (Ghosh *et al.*, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2009). Aromatase (CYP19) is a key enzyme in the biosynthesis of estrogen, since it is responsible of the final conversion of androstenedione to estrone, and testosterone to estradiol (Bulun *et al.*, 2003). *CYP19* gene is expressed in a tissue-specific manner by the activation of various promoters

located in the non-coding region of the gene. For example, in premenopausal women, *CYP19* is mostly expressed in ovaries by the activity of promoters PII and I.3. In pregnant women, the placenta expresses *CYP19* via the I.1 and, to a lesser extent, I.8 promoter (Demura *et al.*, 2008, Simpson *et al.*, 1994). In the breast, *CYP19* is expressed at low levels in fibroblast cells (stromal preadipocytes) and driven by the I.4 promoter. In breast cancer, a series of unknown events leads to the inhibition of I.4 promoter activity, and the activation of several promoters that are normally inactive in the stromal cells of the mammary gland, namely PII, I.3 and I.7 (Agarwal *et al.*, 1996, Bulun *et al.*, 2012, Harada *et al.*, 1993, Subbaramaiah *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2005). This unique switch in promoter usage results in an increase of overall *CYP19* gene expression, aromatase catalytic activity and subsequent estrogen biosynthesis. In addition, malignant breast epithelial cells secrete a number of cytokines into the tumor microenvironment, such as tumor necrosis factor 1-alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin-11 (IL-11). These cytokines are involved in triggering a desmoplastic reaction, which is characterized by a blockade of the normal differentiation of fibroblast cells expressing high levels of aromatase, into adipocytes, which express lower enzyme levels, resulting in the accumulation of undifferentiated estrogen-producing fibroblast cells surrounding the malignant epithelial cells (Meng *et al.*, 2001). Moreover, malignant epithelial cells synthesize prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), which binds to its G-protein-coupled PGE<sub>2</sub> receptor to stimulate the production of cyclic AMP (cAMP), which increases *CYP19* expression by activating promoters PII and I.3 (Chen *et al.*, 2007, Subbaramaiah *et al.*, 2012). PGE<sub>2</sub> can also activate the orphan nuclear receptor homologue-1 (LRH-1), known to induce *CYP19* expression in breast tissue (Zhou *et al.*, 2005). Increased levels of PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and IL-11 in the tumor microenvironment only partially explain the promoter-switch in regulation of *CYP19* expression that occurs in hormone-dependent breast

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

Given the importance of aromatase in hormone-dependent breast cancer, understanding the regulation of promoter-specific expression of *CYP19* is paramount to assess potential impacts of environmental contaminants on the development of this disease. Indeed, there is growing evidence that exposure to contaminants, such as pesticides, is a risk factor for hormone-dependent breast cancer (Cohn *et al.*, 2007, Fernández *et al.*, 2004, Mathur *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2010). A lot of research has focused on effects of endocrine disruptors on the estrogen receptor (Bouskine *et al.*, 2009, Roy *et al.*, 2009, Rubin *et al.*, 2001). The enzyme aromatase has been identified as a target for endocrine disrupting chemicals including environmental pesticides. However, we have little information on the roles that environmentally relevant levels of chemicals may play in these events. It was demonstrated that atrazine, an herbicide, induces estradiol synthesis in human cell lines by the activation of PII/I.3-mediated *CYP19* expression (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016, Sanderson *et al.*, 2002). More precisely, atrazine induces the synthesis of cAMP, which can have a direct effect on the signalling pathways implicated in the activation of the PII and I.3 promoters of *CYP19* (Fan *et al.*, 2007b, Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001). Furthermore, our laboratory recently demonstrated that the

neonicotinoids thiacloprid and thiamethoxam induce PII/I.3-mediated *CYP19* expression as well as aromatase catalytic activity in a non-monotonic manner in H295R adrenocortical carcinoma cells, at relatively low concentrations (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016). We also demonstrated that three neonicotinoids (thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid) increased the production of estrone and estradiol, yet strongly inhibited the production of estriol, in a fetoplacental co-culture model of steroidogenesis during pregnancy (Caron-Beaudoin *et al.*, 2017). The impacts of neonicotinoid insecticides on human health have not been studied in any detail, but an increasing body of evidence suggests they have the potential to disrupt endocrine functions (Bal *et al.*, 2012, Hoshi *et al.*, 2014, Kapoor *et al.*, 2011, Sekeroglu *et al.*, 2014). For example, female rats exposed to imidacloprid through diet (20 mg/kg/day) showed decreased ovarian weights and alterations in progesterone and follicle-stimulating hormone levels (Kapoor *et al.*, 2011).

Neonicotinoids are widely used pesticides that have been linked to *Honey Bee Colony Collapse Disorder* (Goulson, 2013, Henry *et al.*, 2012a). In 2012, 216 000 kg of active neonicotinoids were applied on 11 million hectares in Canada (Main *et al.*, 2014). These insecticides exert their effects by binding to nicotinic acetylcholine receptors, and they are used as seed coating in a variety of crops, fruits and vegetables. Neonicotinoids' half-lives can reach 1250 days for imidacloprid (Main *et al.*, 2014), and these insecticides are detected in surface water and soil (Schaafsma *et al.*, 2015, Starner *et al.*, 2012, Stokstad, 2013). Due to their relative persistence in the environment, and because neonicotinoids are used as seed treatments and repeatedly applied, concerns regarding human exposure have been raised. Imidacloprid has been detected in 89% of water samples in California, and concentrations were exceeding the United States Environmental Protection Agency's aquatic life benchmark dose in 19% of samples (Starner *et al.*, 2012). In wetlands in Saskatchewan, Canada, concentrations of clothianidin and thiamethoxam were found

to be as high as 3110 ng/L (Main *et al.*, 2014). Furthermore, it was recently demonstrated that residues from at least one neonicotinoid were detected in vegetables and fruits purchased from grocery stores in Boston, United States, with concentrations reaching 100.7 ng/g. In this study, at least two different neonicotinoids were detected in 72% of fruits and 45% of vegetables (Chen *et al.*, 2014). Finally, a study conducted in Japan analyzed neonicotinoids metabolites in urine samples of farmers. 3-furoic acid, the major metabolite of the neonicotinoid dinotefuran, was detected in all urine samples with concentrations reaching 0.13  $\mu\text{M}$  (Nomura *et al.*, 2013). Ueyama *et al.* (2015) also measured urinary neonicotinoid levels in females from the general Japanese population. Thiacloprid and imidacloprid were detected at concentrations up to 0.01  $\mu\text{M}$ . The human exposure to neonicotinoid insecticides highlights the need to investigate their potential endocrine disrupting effects, especially at environmentally relevant concentrations.

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

## **4.6 Material and methods**

### **4.6.1 Reagents**

Thiacloprid (Pestanal® #37905, purity>99%) and imidacloprid (Pestanal® #37894, purity>99%) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO) and dissolved in sterile dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) as 100 mM stock solutions. The selective MAPK 1/3 pathway inhibitor PD98059 was purchased from Fisher Scientific (Waltham, MA) and dissolved in DMSO as a 50 mM stock solution. The phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 (Calbiochem,

LaJolla, CA) was dissolved in DMSO as a 2 mM stock solution. Forskolin and dexamethasone were dissolved in DMSO as 10 mM and 100  $\mu$ M stock solutions, respectively. VEGF was purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) at a concentration of 5.0  $\mu$ g/mL.

#### **4.6.2 Cell culture**

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



### 4.6.3 Cell viability

The cytotoxicity of thiacloprid and imidacloprid was determined using a WST-1 kit (Roche, Basel, Switzerland), which measures mitochondrial reductase activity in viable cells. Hs578t cells were incubated for 24 hours in 96-well plates ( $5 \times 10^3$  cells/well) in their culture medium (see section 2.2). After this period, cells were exposed for 24 hours to fresh medium containing various concentrations of thiacloprid or imidacloprid. Cells were then incubated with WST-1 substrate for 1.5 hour after which the formation of formazan was measured at an absorbance wavelength of 440 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### 4.6.4 RNA isolation and amplification by quantitative RT-PCR

Real-time quantitative PCR (qPCR) is a well-established method used to determine gene expression levels. Our method, insuring strong RNA quality, primer design and choice of reference genes was previously published (Caron-Beaudoin et al., 2016) following recommendations from Taylor *et al.* (2010). Hs578t cells were cultured for 24 hours in 6-well plates (CellBind, Corning Incorporated, Corning, NY) ( $7.5 \times 10^5$  cells/well) containing 2 ml medium/well. To investigate signalling pathways implicated in *CYP19* expression in Hs578t cells, cells were exposed to various potential inducers and inhibitors of signalling pathways implicated in the activation of specific promoter (see section 2.2).

Dexamethasone (100 nM), a glucocorticoid known to induce I.4 promoter-mediated *CYP19* expression (Sigma-Aldrich), and forskolin (10  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich), a known inducer of PII/I.3-mediated *CYP19* expression, were used as positive controls. VEGF (2.5 ng/mL) was used as a positive control for the induction of *CYP19* expression via its endothelial I.7 promoter. U73122

(2  $\mu$ M) and PD98059 (50  $\mu$ M), inhibitors of PLC and MAPK 1/3 pathways, respectively, were used to determine the role of these pathways in the promoter-specific expression of *CYP19*. DMSO (0.1% or 0.2% for co-exposures) was used as vehicle control. RNA was isolated using an RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, ON) according to the enclosed instruction, and stored at -80°C. Purity of the RNA samples was determined by measuring the 260nm/280nm absorbance ratio. Reverse transcription was performed using 0.5  $\mu$ g of RNA with an iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) and T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany); resultant cDNA was stored at -20°C. Preamplification of the obtained cDNA was performed using a PreAmp Kit (BioRad, Hercules, CA). Briefly, preamplification is a supplemental step that amplifies cDNA for 10 cycles using classic PCR, along with the necessary primer pairs (for reference genes and genes of interest). This method is useful to determine the level of expression of genes that are expressed at endogenously low levels, which is the case for *CYP19* in the mammary gland. The preamplified cDNA obtained after this step was stored at -20°C and used to perform real-time quantitative PCR.

Primer pairs were designed to amplify mRNA species containing an untranslated 5' region uniquely derived from the promoters I.4, PII, I.3 or I.7 of *CYP19*; a primer pair designed to recognize only the coding region (exons II-X) was used to amplify overall (promoter non-distinct) *CYP19* transcript. All the primer pairs were analyzed with Blast and Primer-Blast (NCBI) to ensure their specificity. Real-time quantitative PCR was performed with EvaGreen MasterMix (BioRad) using a CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad) (95°C for 5 min; 40 cycles of 95°C for 5 sec and 60°C for 15 sec) (Table 4.1). For each pesticide treatment, a minimum of two suitable reference genes was determined using the geNorm algorithm method (Biogazelle qbase Plus software, Zwijnaarde, Belgium).

**Table 4.1 : Primer pair sequences used for amplification of promoter-specific *CYP19* expression and their amplification characteristics in Hs578t cells**

<b><i>CYP19</i> promoter</b>	<b>Primer pairs (5'-3')</b>	<b>Amplification characteristics in Hs578t</b>	<b>Tissue-specific expression</b>	<b>Reference and NCBI accession number</b>
<b><i>CYP19</i>-coding region</b>	Fw: TGTCTCTTTGTTCTTCATGCTATTTCTC Rv: TCACCAATAACAGTCTGGATTTCC	Standard curve: $r^2 = 0.991$ Efficiency: 92.8%	Detects all aromatase transcripts regardless of promoter utilized.	Sanderson et al. (2000) <i>M22246</i>
<b><i>CYP19</i>-I.4</b>	Fw: GGCTCCAAGTAGAACGTGACCAACTG Rv: CAGCCCAAGTTTGCTGCCGAA	Standard curve: $r^2 = 0.941$ Efficiency: 101.9%	Expressed in fibroblasts in the normal mammary gland	Heneweer <i>et al.</i> (2004) <i>S52794</i>
<b><i>CYP19</i>-PII</b>	Fw: TCTGTCCCTTTGATTTCCACAG Rv: GCACGATGCTGGTGATGTTATA	Standard curve: $r^2 = 0.937$ Efficiency: 108.9%	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients	Heneweer <i>et al.</i> (2004) <i>S52794</i>
<b><i>CYP19</i>-I.3</b>	Fw: GGGCTTCCTTGTTTTGACTTGTA Rv: AGAGGGGGCAAT TTAGAGTCTGTT	Standard curve: $r^2 = 0.969$ Efficiency: 95.7%	Expressed in ovaries, testes and stroma of breast cancer patients	Wang <i>et al.</i> (2008) <i>D30796</i>
<b><i>CYP19</i>-I.7</b>	Fw: AACTCAGCTTTTTCCCAACA Rv: TTTCACCCCTTTCTCCGGTC	Standard curve: $r^2 = 0.983$ Efficiency: 90.7%	Expressed in endothelial cells and stroma of breast cancer patients	<i>NM_001347251</i>

#### **4.6.5 Aromatase catalytic activity**

Aromatase activity was measured using a tritiated water-release assay as described previously (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016, Sanderson *et al.*, 2000). Briefly, Hs578t cells were cultured in 24-well plates (400,000 cells/well) containing 1 ml of culture medium. After 24 hours, cells were exposed to various concentrations of pesticides for another 24 hours. The treated medium was then removed and cells were washed twice with 500  $\mu$ L PBS (1X). A volume of 250  $\mu$ L of culture medium (without phenol red) containing 54 nM  $1\beta$ - $^3$ H-androstenedione was added to each well, and cells were incubated for 150 minutes at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Further steps were as described previously (Sanderson *et al.*, 2000) . Tritiated water was counted in 24-well plates containing liquid scintillation cocktail using a Microbeta Trilux (PerkinElmer, Waltham, MA). Counts per minute emitted from each sample were corrected for quenching to determine disintegrations per minute, which were then converted into aromatase activity (fg/h/100,000 cells) and then expressed as a percent of control activity (DMSO). Formestane (1  $\mu$ M), a selective and irreversible aromatase inhibitor, was used to ensure specificity for the aromatase reaction.

#### **4.6.6 Statistical analysis**

Results are presented as means with standard errors of three independent experiments using different cell passages; per experiment, each treatment was tested in triplicate. The normal distribution of the residuals and the homoscedasticity of the data were verified for each analysis using JMP Software (SAS, Cary, NC). Statistically significant differences (\* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001) from control were determined by one-way analysis of variance (ANOVA)

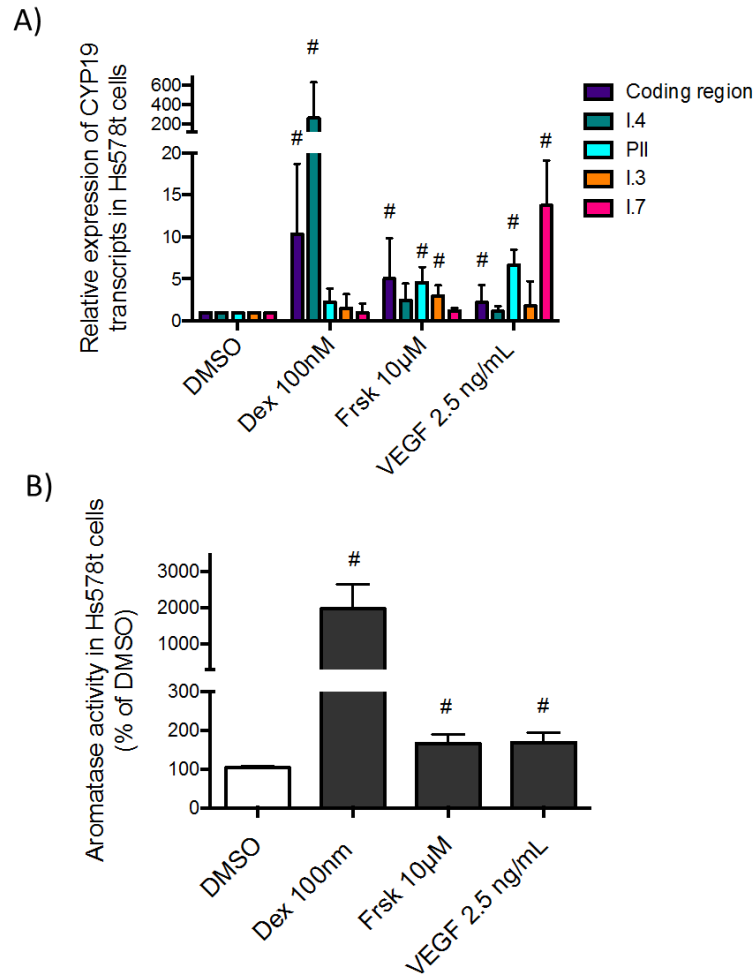
followed by a Dunnett post-hoc test to correct for multiple comparisons to control using GraphPad Prism v5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 4.7 Results

### 4.7.1 Promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t cells

None of the tested neonicotinoid insecticides (0.03, 0.1, 0.3, 3 and 10  $\mu\text{M}$ ) was cytotoxic (data not shown). We determined the effects of a 24 hours exposure to various pharmacological compounds on the promoter-specific induction of *CYP19* gene expression in Hs578t cells (Fig 1). Dexamethasone (100 nM) was used as an inducer of I.4-mediated *CYP19* expression, while forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) was used to induce PII/I.3-mediated *CYP19* expression. VEGF (2.5 ng/mL) was used as a potential inducer of I.7-mediated *CYP19* expression (Kalluri *et al.*, 2006). In Hs578t cells exposed to vehicle control (0.1% DMSO), basal *CYP19* expression appeared to be driven by the I.4 promoter ( $C_q = 31$ ; quantification cycle; the amplification cycle at which accurate quantification of expression levels can be made), the PII ( $C_q = 32$ ), I.7 ( $C_q = 33.5$ ) and I.3 ( $C_q = 36$ ) promoters of aromatase. In Hs578t cells exposed to 100 nM dexamethasone, I.4 promoter-derived *CYP19* mRNA levels were induced  $264 \pm 85$  fold compared to DMSO control, whereas no changes were observed in PII, I.3 and I.7 promoter-derived *CYP19* mRNA levels. Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) induced PII and I.3 promoter-mediated *CYP19* expression by  $4.6 \pm 0.4$  and  $2.3 \pm 0.3$  fold, respectively, with no effects observed on transcripts derived from the I.7 promoter activity (Fig 4-1A). Finally, VEGF significantly induced I.7 and PII-mediated *CYP19* expression by  $13.7 \pm 1.2$  and  $6.6 \pm 0.4$  fold, respectively, in Hs578t cells (Fig 4-1A). I.3 promoter-mediated *CYP19* expression was also slightly increased by VEGF, but this was not statistically significant. To determine if the observed changes in promoter-derived transcripts levels translated into

changes in aromatase activity, we measured the catalytic activity of aromatase in Hs578t cells exposed to dexamethasone, forskolin and VEGF. Dexamethasone (100 nM), forskolin (10  $\mu$ M) and VEGF (2.5 ng/mL) induced aromatase catalytic activity by  $1973 \pm 673$ ,  $166 \pm 23$  and  $169 \pm 25$  fold respectively, compared to DMSO control (Fig 4-1B).

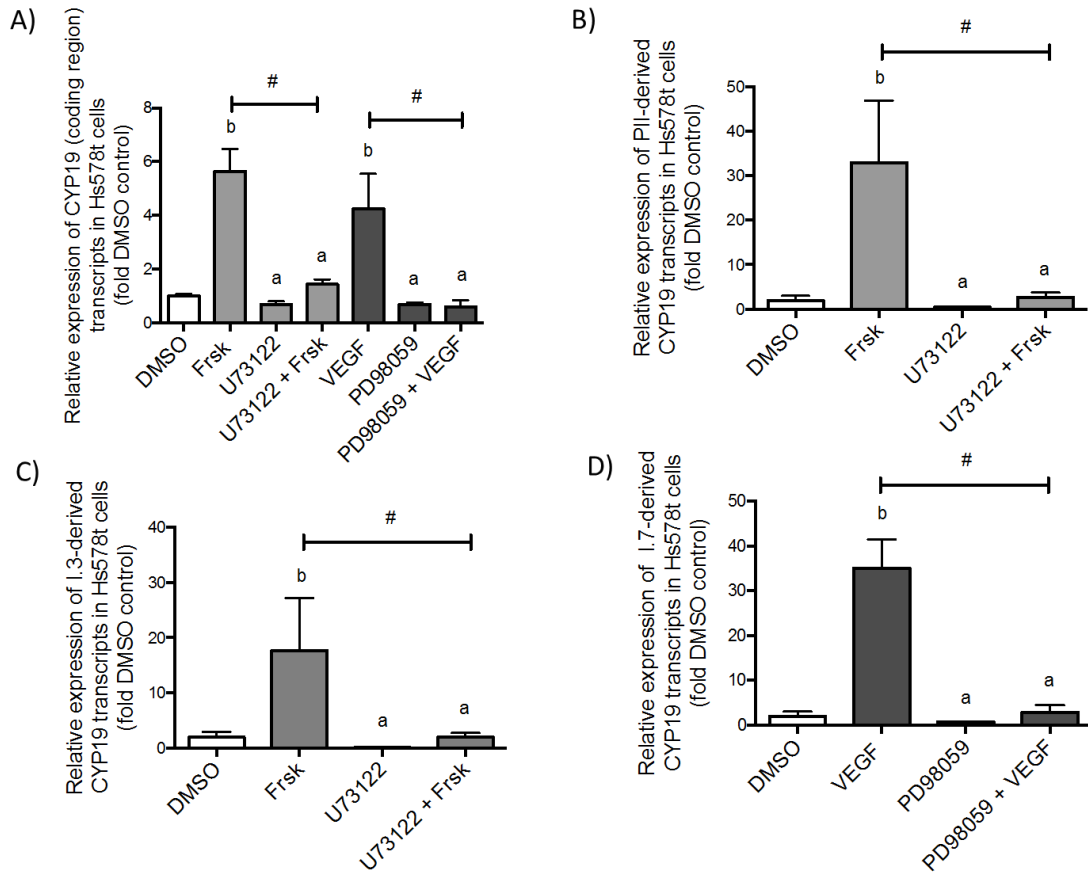


**Figure 4-1 : A) Relative expression of *CYP19* coding region (non-promoter-specific or total), and I.4, PII, I.3 and I.7 promoters-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells, and B) Aromatase catalytic activity in Hs578t cells exposed for 24h to Dexamethasone (DEX) 100 nM, Forskolin (Frsk) 10  $\mu$ M or Vascular endothelial growth factor (VEGF) 2.5 ng/mL.**

(#) A statistically significant difference between treatments and DMSO control; Student t-test;  $p < 0.05$ . Experiments were performed in triplicate with three different cell passages. Cells were exposed to treatments for 24h.

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

To assess the involvement of two VEGF signalling pathways (PLC and MAPK 1/3 pathways) in the promoter-specific expression of *CYP19*, Hs578t cells were co-treated with selective inhibitors of these pathways 4 hours prior to the addition of VEGF or forskolin. Co-treatment of Hs578t cells with the PLC inhibitor U73122 (2  $\mu$ M) and forskolin (10  $\mu$ M) resulted in significantly reduced relative expression levels of *CYP19* (exon II-X:  $1.4 \pm 0.2$  fold) (Fig 4-2A), PII- and I.3 promoter-mediated *CYP19* expression ( $2.7 \pm 1.1$  and  $2.0 \pm 0.8$  fold, respectively) (Fig 4-2B-C) compared to forskolin treatment alone for exon II-X ( $5.7 \pm 0.83$  fold) (Fig 4-2A), PII ( $33 \pm 14$  fold) (Fig 4-2B) and I.3-mediated *CYP19* expression ( $17.7 \pm 9.5$  fold) (Fig 4-2C). Furthermore, co-treatment of Hs578t cells with the MEK/MAPK 1/3 inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) followed by VEGF (2.5 ng/mL) also resulted in a significantly reduced relative expression of *CYP19* exon II-X ( $0.59 \pm 0.25$  fold) (Fig 4-2A) and I.7-mediated *CYP19* expression ( $2.9 \pm 1.6$  fold) (Fig 4-2D) compared to VEGF treatment alone for exon II-X ( $4.3 \pm 1.3$  fold) (Fig 4-2A) and I.7-mediated *CYP19* expression ( $35.0 \pm 6.4$  fold) (Fig 4-2D). Taken together, these results strongly suggest the involvement of two VEGF signalling pathways, namely PLC and MEK/MAPK 1/3, in the promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t breast cancer cells.



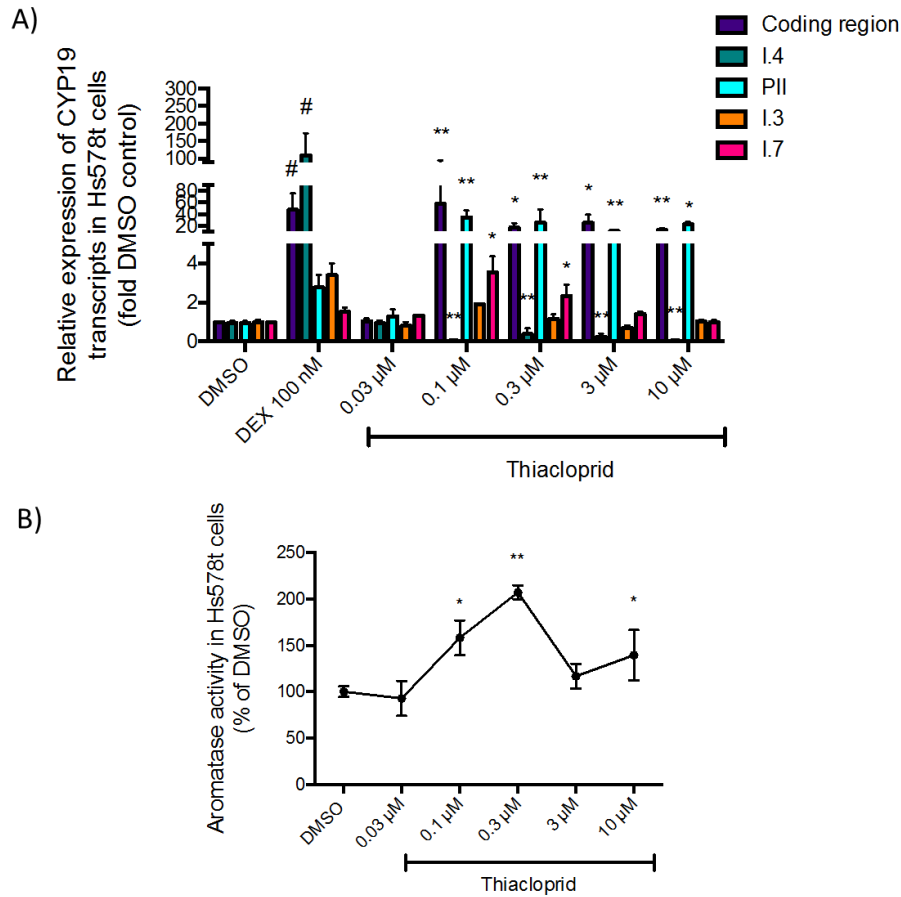
**Figure 4-2 : A) Relative expression of *CYP19* coding region (non-promoter-specific or total), B) PII-derived *CYP19* transcripts, C) I.3-derived *CYP19* transcripts, D) I.7-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells (fold control).**

Cells were exposed for 24 hours to 10  $\mu$ M forskolin (Frsk) or 2.5 ng/mL VEGF, two inducers of PII/I.3- or I.7-mediated *CYP19* expression, in the presence or absence of selective inhibitors of the PLC (U73122; 2  $\mu$ M) or MEK/MAPK 1/3 (PD98059; 50  $\mu$ M) signalling pathways. In the case of PII (B), I.3 (C) and I.7 (D) promoter-mediated expression, only the effects of pathway-relevant inhibitors are shown. (#, ##, ###) A statistically significant difference between Frsk-treated and U73122 + Frsk co-treated Hs578t cells, or between VEGF and PD98059 + VEGF co-treated Hs578t cells. Student t-test; #  $p < 0.05$ . ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ . (a) No statistically significant difference between co-treatment and DMSO control; (b) a statistically significant difference between co-treatment and DMSO control; Student t-test;  $p < 0.05$ . Experiments were performed in triplicate with three different cell passages; per experiment each (co-)treatment was tested in triplicate.



### 4.7.3 Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t cells

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

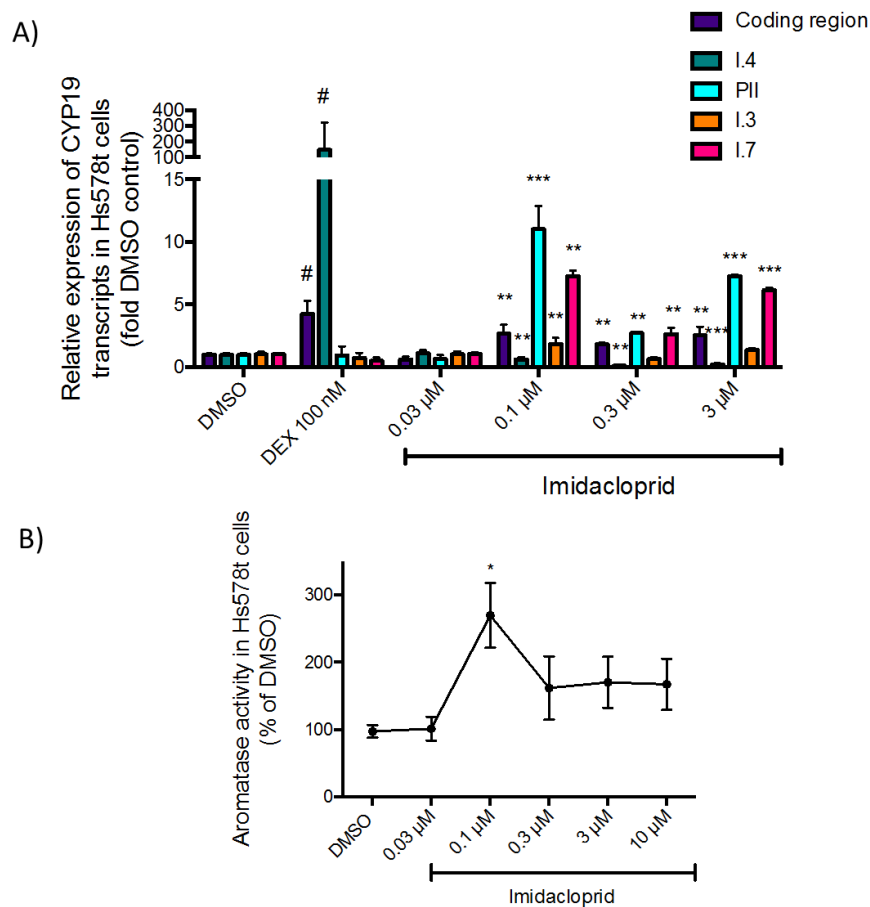


**Figure 4-3 : A) Relative expression of *CYP19* coding region (non-promoter-specific or total), and I.4, PII, I.3 and I.7 promoter-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells, and B) Aromatase catalytic activity in Hs578t cells exposed for 24h to Thiocloprid (0.03, 0.1, 0.3, 3 and 10  $\mu$ M).**

DEX (100 nM) was used as a positive control for I.4-mediated *CYP19* expression. (#) A statistically significant difference between treatments and DMSO control; Student t-test;  $p < 0.05$ . (\*, \*\*, \*\*\*) A statistically significant difference between pesticide treatments and DMSO control; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Experiments were performed in triplicate with three different cell passages. Cells were exposed to thiacloprid and controls for 24h.

In Hs578t cells exposed to imidacloprid, a switch in promoter usage in *CYP19* expression occurred at concentrations above 0.03  $\mu$ M, again with greater effects at lower concentrations. Following a 24 hours exposure to 0.1  $\mu$ M imidacloprid, the relative levels of I.4 promoter-derived *CYP19* transcripts were significantly decreased to  $0.61 \pm 0.10$  fold of DMSO control,

while PII ( $11.0 \pm 1.1$  fold), I.3 ( $1.8 \pm 0.3$  fold) and I.7 promoter-mediated *CYP19* ( $7.3 \pm 0.3$ ) and overall exon II-X expression ( $2.7 \pm 0.4$  fold) were significantly induced compared to DMSO control (Fig 4-4A). The levels of PII-, I.3- and I.7-derived *CYP19* mRNA in Hs578t cells were statistically different among the tested concentrations of imidacloprid. The catalytic activity of aromatase was statistically significantly induced at 0.1  $\mu$ M (Fig 4-4B).



**Figure 4-4 : A) Relative expression of *CYP19* coding region (non-promoter-specific or total), and I.4, PII, I.3 and I.7 promoter-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells, and B) Aromatase catalytic activity in Hs578t cells exposed for 24h to Imidacloprid (0.03, 0.1, 0.3 and 3  $\mu$ M).**

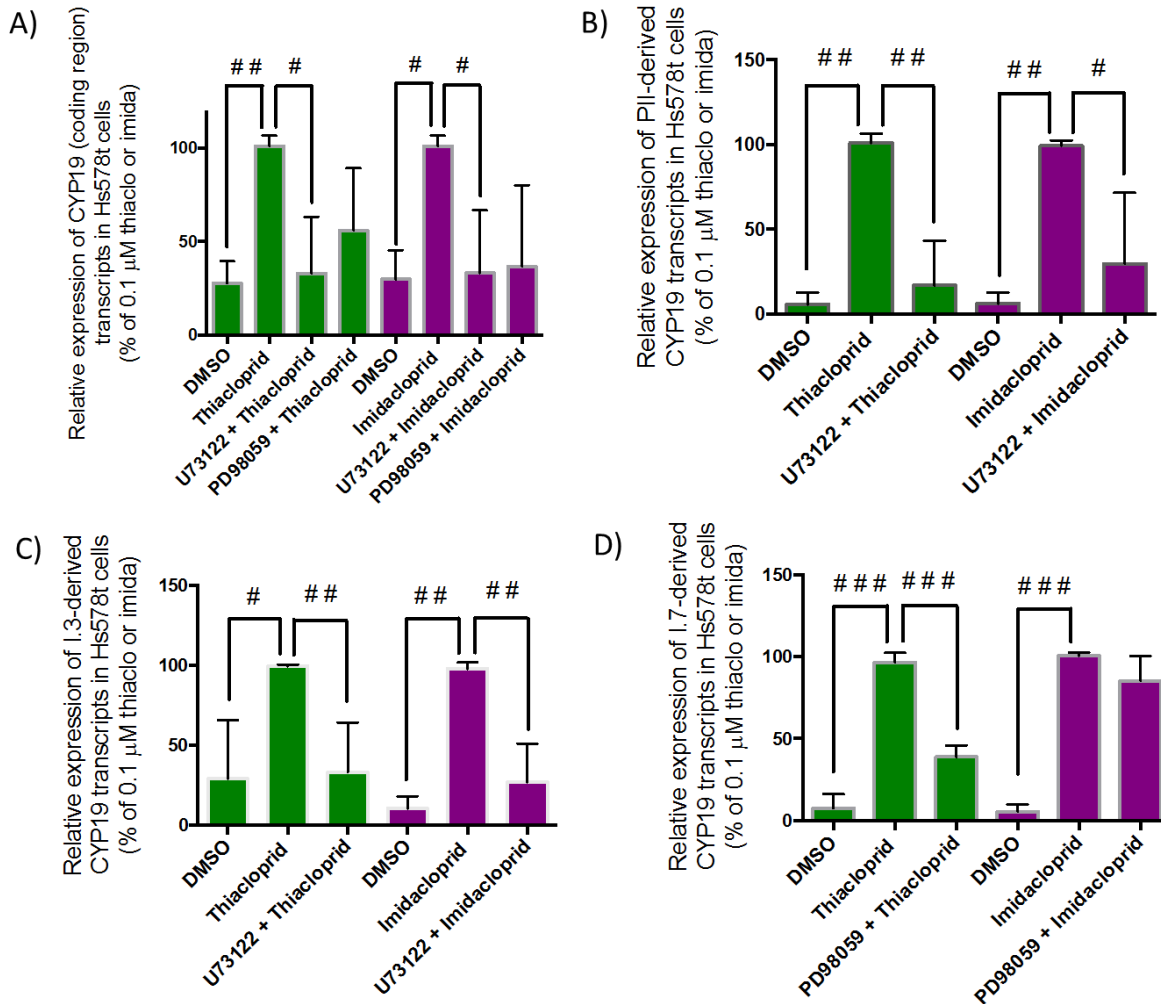
DEX (100 nM) was used as a positive control for I.4-mediated *CYP19* expression. (#) A statistically significant difference between treatments and DMSO control; Student t-test;  $p < 0.05$ . (\*, \*\*, \*\*\*) A statistically significant difference between pesticide treatments and DMSO control; one-way ANOVA and Dunnett post-hoc test; \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Experiments were performed in triplicate with three different cell passages. Cells were exposed to thiacloprid and controls for 24h.

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

To investigate whether this switch in promoter usage may be explained by an action of neonicotinoids on the PLC and/or MEK/MAPK 1/3 pathways, we determined the promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t cells co-treated with either thiacloprid or imidacloprid (0.1 $\mu$ M) and a selective inhibitor of either the PLC (U73122) or MEK/MAPK 1/3 (PD98059) pathways. Co-exposure to thiacloprid 0.1  $\mu$ M and U73122 2  $\mu$ M led to statistically significant inhibition of levels of promoter non-specific *CYP19* (exon II-X) transcripts to  $32.9 \pm 17.8\%$  of the levels in Hs478t cells exposed to thiacloprid alone; when Hs478t cells were co-treated with PD98059, levels of promoter-non-specific *CYP19* transcripts were decreased to  $56.0 \pm 19.2\%$  of the levels in cells exposed to thiacloprid alone, although this inhibition was not statistically significant (Fig 4-5A). Based on the promoter-specific expression of *CYP19*, thiacloprid appears to exert its effects by modulating the PLC pathway, since a co-exposure of thiacloprid and U73122 significantly decreased PII and I.3 promoter-mediated *CYP19* expression to  $17.0 \pm 15.3\%$  and  $33.1 \pm 17.9\%$  of what measured in Hs578t cells exposed to thiacloprid alone (Fig 4-5B-C). Furthermore, co-treatment of Hs578t cells with thiacloprid and PD98059 decreased I.7 promoter-mediated *CYP19* expression significantly to  $39.0 \pm 4.1\%$  of that in Hs578t cells exposed to thiacloprid alone (Fig 4-5D), suggesting an impact of this neonicotinoid on the MEK/MAPK 1/3 signalling pathway.

We observed a similar trend for imidacloprid. In Hs578t cells co-exposed to imidacloprid and U73122, levels of promoter-non-specific *CYP19* (exon II-X) transcripts were decreased to  $33.2 \pm 19.3\%$  of levels in Hs578t cells exposed to imidacloprid alone (Fig 4-5A); levels of PII and I.3-derived *CYP19* mRNA in cells co-treated with imidacloprid and U73122 were decreased to 29.7

$\pm 1.8\%$  and  $26.8 \pm 13.9\%$ , respectively, compared to levels in cells exposed to imidacloprid alone (Fig 4-5B-C). It therefore appears that the PLC pathway, which is implicated in PII/I.3 promoter-driven *CYP19* expression, is targeted by imidacloprid. In Hs578t cells co-treated with imidacloprid and PD98059, we also observed a non-statistically significant decreased in the expression of *CYP19* coding region to  $37 \pm 25\%$  of the response to imidacloprid alone (Fig 4-5A). However, the same co-treatment did not decrease I.7 promoter-mediated *CYP19* expression (Fig 4-5D), suggesting that the MEK/MAPK 1/3 signalling pathway may not be the only one implicated in the I.7 promoter-mediated expression of *CYP19* in Hs578t cells.



**Figure 4-5 : a) Relative expression of *CYP19* coding region (non-promoter-specific or total) B) PII-derived *CYP19* transcripts, C) I.3-derived *CYP19* transcripts, D) I.7-derived *CYP19* transcripts in Hs578t cells (% inducer).**

Hs578t cells were exposed for 24 hours to thiachloprid (0.1  $\mu$ M) or imidacloprid (0.1  $\mu$ M) in the presence or absence of selective inhibitors of the PLC (U73122, 2  $\mu$ M) or MEK/MAPK 1/3 (PD98059, 50 $\mu$ M) signalling pathways,. Relative transcript levels are expressed as a percentage of the response of Hs578t cells exposed to 0.1  $\mu$ M thiachloprid or imidacloprid (100%). In the case of PII (B), I.3 (C) and I.7 (D) promoter-mediated expression, only the effects of pathway-relevant inhibitors are shown. (#, ##, ###) A statistically significant difference between inhibitor co-treatment and neonicotinoid treatment alone; Student t-test; #  $p < 0.05$ . ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ . Experiments were performed in triplicate with three different cell passages.

## 4.8 Discussion

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

In this project, we successfully developed robust and sensitive real-time quantitative PCR methods to evaluate the expression of *CYP19* by the activation of four specific promoters, namely the normally active I.4 promoter and the breast cancer-associated promoters PII, I.3 and I.7 using Hs578t cells as a representative model of the aromatase-expressing and estrogen-producing cells typically found in the hormone-dependent breast tumor environment. Epithelial cells normally do not express aromatase, but it has been previously demonstrated that triple negative breast cancer cells (MDA-MB-231) expressed *CYP19* by the activation of the adipose I.4 promoter and breast cancer-associated proximal PII/I.3 promoters, and that aromatase was catalytically active in this cell line (Knower *et al.*, 2010, Su *et al.*, 2008).

In breast cancer, increased *CYP19* expression and estrogen synthesis is driven by a promoter-switch involving the activation of PII, I.3 and I.7 promoters, and inhibition of normal I.4 promoter activity (Irahara *et al.*, 2006, Sebastian *et al.*, 2001). We are the first to demonstrate that Hs578t cells express *CYP19* through these four breast cancer-relevant promoters, which is key to the relevance of this cell line as an *in vitro* model of the estrogen producing cells that are present in the hormone-dependent breast tumor environment. The mechanisms leading to this change in *CYP19* promoter usage are not fully understood. Breast cancer epithelial cells synthesize prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a potent activator of the protein kinase C (PKC) pathway, leading to production of cAMP. cAMP then activates the protein kinase A (PKA) and PKC pathways, both leading to the phosphorylation of the cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1). CREB1 then translocates to the nucleus and binds to CRE-like sequences in the PII/I.3

promoter region to stimulate their activity, which leads to increased expression of *CYP19* (Sofi *et al.*, 2003, To *et al.*, 2015, Zhao *et al.*, 1996). PKA can also phosphorylate the transcription factor GATA-4, which recruits coactivators such as the CREB-binding protein (CBP). This complex then binds to the PII promoter region (Tremblay *et al.*, 2003b). We know less about the endothelial I.7 promoter of *CYP19*. This promoter, originally characterized by Sebastian *et al.* (2002), may have implications in regulating the effects of estrogens on blood vessels through its main regulator, the transcription factor GATA-2. However, it has also been demonstrated that the I.7 promoter is overactive in breast cancer (Sebastian *et al.*, 2002). As VEGF is involved in angiogenesis in breast cancer and has a role in increasing endothelial permeability (Breslin *et al.*, 2003), we hypothesized that I.7 promoter activation is regulated by the VEGF/MEK/MAPK 1/3 signalling pathway in Hs578t cells. It is known that MEK/MAPK 1/3 is activated by the binding of VEGF to its receptors (VEGFR-1; VEGFR-2) (Breslin *et al.*, 2003, Cross *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 1998). We also know that the activation of VEGFR-2 in endothelial cells stimulates the PLC/PKC pathway (Cario *et al.*, 2004, Cross *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2015), thus explaining the overexpression of PII-derived *CYP19* in Hs578t cells exposed to VEGF (Fig 4-1A).

Angiogenesis is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer (Adams *et al.*, 2000) and increased expression of VEGF and its receptors has been denoted in invasive breast carcinomas (Yoshiji *et al.*, 1996). In our study, VEGF stimulated I.7- and PII-mediated *CYP19* expression, resulting in an increase in overall (non-promoter-specific) expression of *CYP19* (Fig 1A) and aromatase catalytic activity (Fig 4-1B). Using an inhibitor of the MEK/MAPK 1/3 pathway, we also demonstrated that the VEGF-mediated overexpression of I.7 promoter-derived *CYP19* was dependent on the MEK/MAPK 1/3 pathway (Fig 4-2A, D). This result confirms our hypothesis and is consistent with the literature (Breslin *et al.*, 2003, Pai *et al.*, 2001, Xu *et al.*,



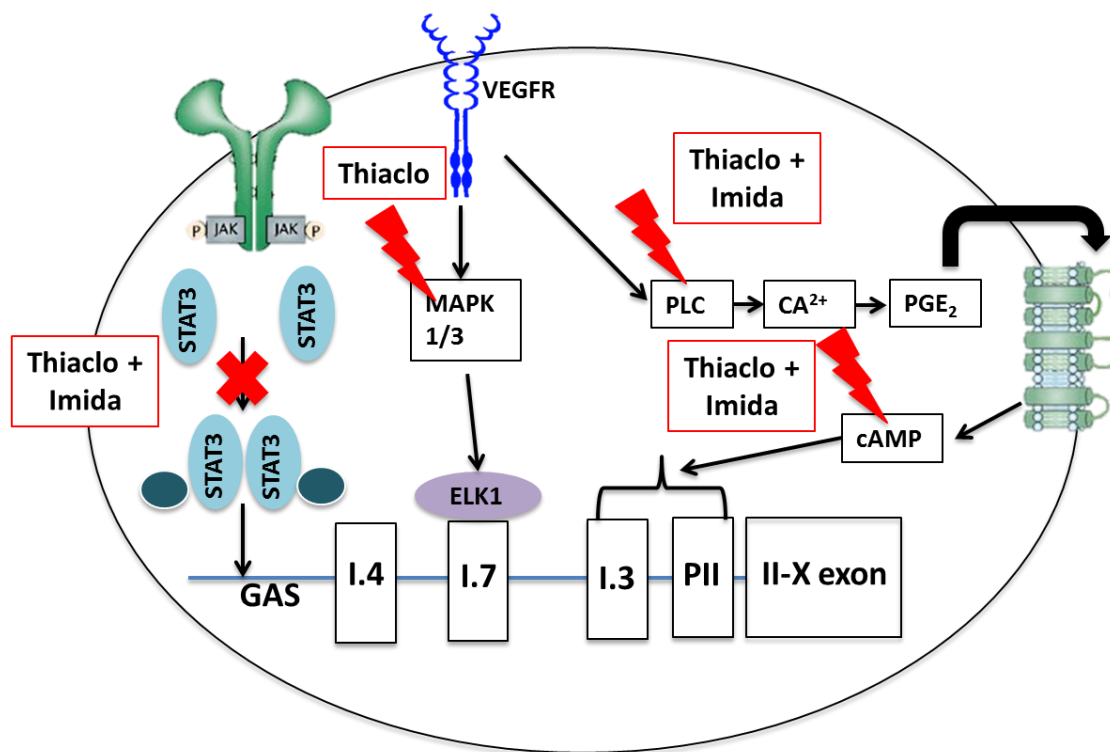
2008). We have also shown that forskolin stimulates PII/I.3-mediated *CYP19* expression and induces aromatase activity (Fig 4-1A-B), and that this effect is mediated through the PLC pathway (Fig 4-2A-B-C). This result is also supported by a study showing that in HEK-293 cells, forskolin induces calcium release (Schmidt *et al.*, 2001), an important component of the PLC pathway. These results suggest that VEGF signalling pathways, and more specifically PLC and MEK/MAPK 1/3 pathways, are implicated in PII/I.3 and I.7-mediated *CYP19* expression in Hs578t breast cancer cells.

#### **4.8.2 Neonicotinoids induce a switch in *CYP19* promoter usage in Hs578t cells**

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

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

observed in primary adipose stromal cells exposed to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), PGE<sub>2</sub> or forskolin (Heneweer *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 1996). We also previously observed a similar response of the PII/I.3 promoters in H295R cells exposed to the neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid and thiamethoxam (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016).



**Figure 4-6 : Proposed signalling pathways implicated in the promoter-specific expression of *CYP19* in Hs578t cells.**

It is proposed that thiacloprid and imidacloprid block the JAK/STAT3 pathway implicated in the activation of the I.4 promoter via a yet unknown mechanism. In addition, based on the effects of pathway inhibitors, the neonicotinoids appear to increase PII/I.3-mediated *CYP19* expression in Hs578t cells via stimulation of the PLC pathway. Thiacloprid may also induce I.7-mediated *CYP19* expression by stimulation of the MEK/MAPK 1/3 pathway in these cells.

### 4.8.3 Limitations and perspectives

Cell-cell communication during hormone-dependent breast cancer progression has been widely studied. For instance, communication between epithelial cancer cells and fibroblastic cells

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

## **4.9 Conclusion**

The present study is the first to describe the promoter-specific expression of *CYP19* via the normal mammary promoter I.4 and the breast cancer relevant promoters PII, I.3 and I.7 in Hs578t cells. We have further shown that exposure of these cells to environmentally relevant concentrations of the neonicotinoid insecticides (similar to what is found in urine of farmers and women from the general population in Japan), thiacloprid and imidacloprid increases *CYP19* expression, by a decrease in the activity of the I.4 promoter and an increase in the activities of PII, I.3 and I.7 promoters. The observed promoter switch appears to involve VEGF-mediated PLC and MAPK 1/3 signalling pathways (Fig 4-6). This unique switch in promoter usage induced by thiacloprid and imidacloprid is a process usually observed in patients with

progressive hormone-dependent breast cancer. However, the molecular targets of thiacloprid and imidacloprid that induce this promoter-switch remain unknown. These findings highlight the need for further research to assess the potential impacts of low-dose and chronic exposure to these insecticides on endocrine processes implicated in women's health.

#### 4.10 References

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

Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. 1996. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome p450 (cyp19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 81:3843-3849.

Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, et al. 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* 30:492-499.

Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. 2009. Low doses of bisphenol a promote human seminoma cell proliferation by activating pka and pkg via a membrane g-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 117:1053-1058.

Breslin JW, Pappas PJ, Cerveira JJ, Hobson RW, Durán WN. 2003. Vegf increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving erk-1/2 and nitric oxide. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 284:H92-H100.

Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. 2003. The human cyp19 (aromatase p450) gene: Update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86:219-224.

Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC, Zhao H. 2012. Aromatase, breast cancer and obesity: A complex interaction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23:83-89.

Cario E, Gerken G, Podolsky DK. 2004. Toll-like receptor 2 enhances zo-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase c. *Gastroenterology* 127:224-238.

Caron-Beaudoin E, Viau R, Hudon Thibeault A-A, Vaillancourt C, Sanderson J. 2017. The use of a unique fetoplacental steroidogenesis co-culture model as a screening tool for endocrine disruptors: The effects of neonicotinoids on aromatase activity and hormone production. *Toxicology and Applied Pharmacology* 332:15-24.

Caron-Beaudoin É, Denison MS, Sanderson JT. 2016. Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (cyp19) in human adrenocortical carcinoma (h295r) and primary umbilical vein endothelial (huvec) cells. *Toxicological Sciences* 149:134-144.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. 2010. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease* 32:35-48.

Chen D, Reierstad S, Lin Z, Lu M, Brooks C, Li N, et al. 2007. Prostaglandin e2 induces breast cancer-related aromatase promoters via activation of p38 and c-jun nh2-terminal kinase in adipose fibroblasts. *Cancer Research* 67:8914-8922.

Chen M, Tao L, McLean J, Lu C. 2014. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: Implication for dietary exposures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:6082-6090.

Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. 2007. Ddt and breast cancer in young women: New data on the significance of age at exposure. *Environmental health perspectives* 115:1406.

Cross MJ, Claesson-Welsh L. 2001. Fgf and vegf function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* 22:201-207.

Demura M, Reierstad S, Innes JE, Bulun SE. 2008. Novel promoter i.8 and promoter usage in the cyp19 (aromatase) gene. *Reproductive Sciences* 15:1044-1053.

Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, et al. 2007. Atrazine-induced aromatase expression is sf-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect* 115:720-727.

Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, Expósito J, et al. 2004. Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes & Control* 15:591-600.

Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. 2009. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457:219-223.

Goulson D. 2013. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50:977-987.

Harada N, Utsumi T, Takagi Y. 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome p-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11312-11316.

Heneweer M, van den Berg M, Sanderson J. 2004. A comparison of human h295r and rat r2c cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicology Letters* 146:183-194.

Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, et al. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336:348-350.

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

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

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

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

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

- Knower KC, To SQ, Simpson ER, Clyne CD. 2010. Epigenetic mechanisms regulating cyp19 transcription in human breast adipose fibroblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 321:123-130.
- Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang H-J, Bauerfeind I, Epstein M, et al. 2004. Association between her-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 10:1706-1716.
- Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulsom R. 1998. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *The Journal of pathology* 185:394-401.
- Main AR, Headley JV, Peru KM, Michel NL, Cessna AJ, Morrissey CA. 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of canada's prairie pothole region. *PLoS ONE* 9:e92821.
- Mathur V, Bhatnagar P, Sharma RG, Acharya V, Sexana R. 2002. Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from jaipur. *Environment international* 28:331-336.
- Meng L, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM, Bulun SE. 2001. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating ccaat/enhancer binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : Mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Research* 61:2250-2255.
- Nomura H, Ueyama J, Kondo T, Saito I, Murata K, Iwata T, et al. 2013. Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using gc-ms. *Journal of Chromatography B* 941:109-115.
- Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H, Tarnawski AS. 2001. Pge2 stimulates vegf expression in endothelial cells via erk2/jnk1 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286:923-928.
- Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit* 15:RA137-145.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Subbaramaiah K, Morris PG, Zhou XK, Morrow M, Du B, Giri D, et al. 2012. Increased levels of cox-2 and prostaglandin e2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. *Cancer Discovery* 2:356-365.

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

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

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

- Ueyama J, Harada KH, Koizumi A, Sugiura Y, Kondo T, Saito I, et al. 2015. Temporal levels of urinary neonicotinoid and dialkylphosphate concentrations in Japanese women between 1994 and 2011. *Environmental science & technology* 49:14522-14528.
- Wang Y, Ye L, Leung LK. 2008. A positive feedback pathway of estrogen biosynthesis in breast cancer cells is contained by resveratrol. *Toxicology* 248:130-135.
- Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, et al. 2008. Mapk/erk signalling mediates vegf-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *Journal of cellular and molecular medicine* 12:2395-2406.
- Xu X, Dailey AB, Talbott EO, Ilacqua VA, Kearney G, Asal NR. 2010. Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in U.S. Adults. *Environ Health Perspect* 118:60-66.
- Yamaguchi Y, Hayashi S. 2009. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocr J* 56:1-7.
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. 1996. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Research* 56:2013-2016.
- Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. 1996. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by pge2 via cyclic amp, leading to activation of promoter ii of the cyp19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 137:5739-5742.
- Zhou D, Zhou C, Chen S. 1997. Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61:273-280.
- Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, et al. 2005. Interactions between prostaglandin e2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Research* 65:657-663.

## CHAPITRE 5 CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans l'ensemble, ce projet de recherche a démontré que des concentrations de pesticides néonicotinoïdes similaires à ce qui est retrouvé dans l'environnement et dans des échantillons d'urine d'agriculteurs altèrent l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase, enzyme clé de la synthèse des œstrogènes. Ce projet de recherche s'est inscrit dans deux contextes différents où la synthèse d'œstrogènes, dépendante de l'expression de l'aromatase via l'activité de certains promoteurs, est primordiale. En effet, nous savons que la surexpression de l'aromatase via certains promoteurs normalement inactifs est un élément clé dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant (Agarwal *et al.*, 1996, Bulun *et al.*, 2007, Subbaramaiah *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2005). Il est aussi connu que l'aromatase est fortement exprimée via d'autres promoteurs dans le placenta (Demura *et al.*, 2008, Simpson, 2003), que la production d'œstrogènes augmente tout au long de la grossesse et contribue à la formation du syncytiotrophoblaste et de la circulation sanguine utéro-placentaire (Albrecht *et al.*, 1999, Corton *et al.*, 2009, Kumar *et al.*, 2012, Svedas *et al.*, 2002, Yashwanth *et al.*, 2006). Ce projet de recherche a également permis de valider et développer des bioessais cellulaires afin de comprendre l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase et de mesurer les effets potentiels des pesticides néonicotinoïdes sur ce processus.

### **5.1 Compréhension du changement d'utilisation des promoteurs de l'aromatase : développement du modèle cellulaire Hs578t**

Les résultats présentés au chapitre 4 ont permis d'explorer plus en détails les voies de signalisation impliquées dans l'activation de certains promoteurs de l'aromatase. La lignée cellulaire Hs578t s'est révélée être un excellent modèle de l'expression de l'aromatase dans les

fibroblastes. En effet, il est connu que les fibroblastes expriment cette enzyme via majoritairement le promoteur I.4 (Bulun *et al.*, 2012, Bulun *et al.*, 1999, Knowler *et al.*, 2010, Zhao *et al.*, 1996), et assurent donc une production minimale d'œstrogènes dans la glande mammaire saine. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant, on observe fréquemment une augmentation de l'expression de l'aromatase via l'inhibition de l'activité du promoteur normal I.4 et une augmentation de l'activité des promoteurs PII, I.3 et I.7 (Agarwal *et al.*, 1996, Irahara *et al.*, 2006, Subbaramaiah *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2005). Les processus expliquant ce changement d'utilisation des promoteurs n'étaient pas élucidés jusqu'à ce jour. Cette étude a démontré que l'utilisation des cellules Hs578t est tout à fait appropriée dans l'étude de la production d'œstrogènes dans le micro-environnement tumoral de par l'activité de tous les promoteurs de l'aromatase impliqués dans cette pathologie. En effet, en exposant les cellules Hs578t à la forskoline et au dexaméthasone, inducteurs connus de l'expression de *CYP19* par l'activité des promoteurs PII/I.3, ainsi que le promoteur I.4 respectivement, nous avons pu démontrer que ces promoteurs sont activés dans cette lignée cellulaire (Figure 4-1). En exposant les cellules au VEGF, nous avons établi que le promoteur I.7 était également actif dans ce modèle cellulaire (Figure 4-1). Cette lignée cellulaire reflète relativement bien l'expression de *CYP19* dans les fibroblastes, ce qui en fait donc un modèle cellulaire tout à fait pertinent dans le contexte de cette étude.

De plus, en exposant les cellules Hs578t à 1) des inhibiteurs des voies de signalisation MEK/MAPK 1/3 et PLC, et en co-exposant les cellules Hs578t avec 2) les inducteurs des différents promoteurs de *CYP19* et ces inhibiteurs, nous avons à ce stade certaines indications qui semblent indiquer que ces voies de signalisation sont impliquées dans l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans les cellules Hs578t. En effet, une exposition à

l'inhibiteur de la voie PLC U73122, et une co-exposition de la forskoline et de U73122, ont résulté en une diminution des niveaux d'ARNm de l'exon codant de *CYP19*, ainsi que de l'expression de *CYP19* via l'activité des promoteurs PII et I.3, démontrant l'implication de cette voie dans l'expression de *CYP19* via ces promoteurs (Figure 4-2). De façon similaire, une exposition des cellules Hs578t à un inhibiteur de l'activation de MEK (PD98059), et une co-exposition de VEGF et de PD98059, ont engendré une diminution de l'expression de *CYP19* via le promoteur I.7. Ces observations appuient notre hypothèse que la voie de signalisation MEK/MAPK 1/3 serait impliquée dans l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase (Figure 4-2). La confirmation de ces résultats pourra être accomplie par l'utilisation d'autres inhibiteurs de ces voies de signalisation.

De façon générale, la publication présentée au chapitre 4 de cette thèse et acceptée avec révisions dans la revue *Environmental Health Perspectives* a permis de démontrer que tous les promoteurs impliqués dans le développement du cancer du sein sont actifs dans une même lignée cellulaire, et suggère certaines voies de signalisation impliquées.

## **5.2 Perturbation promoteur-spécifique de l'aromatase par les néonicotinoïdes**

### **5.2.1 Implication pour le cancer du sein**

Ces travaux sont les premiers à explorer les effets des pesticides néonicotinoïdes sur l'expression de l'aromatase, ce qui rend la comparaison avec d'autres études similaires limitées. Cependant, les concentrations utilisées lors de nos travaux sont similaires à ce qui est retrouvé dans l'environnement (Bonmatin *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2014, Goulson, 2013, Main *et al.*, 2014) et ce qui a été mesuré dans les deux seules études de biomonitoring disponibles dans la littérature (Nomura *et al.*, 2013, Ueyama *et al.*, 2015). Entre autres, une de ces études, réalisée avec une

cohorte d'agriculteurs japonais, a mesuré des concentrations urinaires de métabolites des néonicotinoïdes jusqu'à des concentrations de 0,13  $\mu\text{M}$  (Nomura *et al.*, 2013).

Il est également connu que l'expression de l'aromatase et donc la production d'œstrogènes joue un rôle primordial dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant. De plus, l'utilisation de promoteurs spécifiques est un processus important guidant l'augmentation de l'expression de l'aromatase. Étudier l'effet de concentrations environnementales de pesticides néonicotinoïdes sur ce phénomène est donc tout à fait pertinent afin d'établir des normes d'exposition plus rigoureuses. Les résultats portant sur l'effet des néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans divers modèles cellulaires pertinents dans le contexte du cancer du sein hormono-dépendant sont résumés au tableau 5.1.

**Tableau 5.1 Résultats principaux de cette thèse portant sur l'activité et l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans des modèles cellulaires représentatifs du cancer du sein**

Modèles cellulaires	H295R			HUVEC			Hs578t	
	IMI	THIAC	THIAM	IMI	THIAC	THIAM	IMI	THIAC
<b>Néonicotinoïdes</b>	—	↑ (0.3 µM)	↑ (0.1 µM)	—	—	—	↑ (0.1-3 µM)	↑ (0.1-10 µM)
<b>Promoteurs CYP19</b>	—	↑ (0.3 µM)	↑ (0.1 µM)	X	X	X	↑ (0.1-3 µM)	↑ (0.1-10 µM)
<b>Région codante</b>	—	↑ (0.3 µM)	↑ (0.1 µM)	X	X	X	↑ (3 µM)	—
<b>P11</b>	—	↑ (0.3 µM)	↑ (0.1 µM)	X	X	X	↑ (0.1-3 µM)	↑ (0.1-0.3 µM)
<b>I.3</b>	—	↑ (0.3 µM)	↑ (0.1 µM)	X	X	X	↑ (3 µM)	—
<b>I.7</b>	X	X	X	X	X	X	↑ (0.1-3 µM)	↑ (0.1-0.3 µM)
<b>I.4</b>	X	X	X	X	X	X	↓ (0.1-10 µM)	↓ (0.1-10 µM)
<b>Activité de CYP19</b>	—	↑ (0.3-1 µM)	↑ (0.3-1 µM)	—	—	—	↑ (0.1 µM)	↑ (0.3-10 µM)
<b>Qualité du modèle</b>	bonne			mauvaise			Très bonne	

X Activité du promoteur non-détectée

— Aucun effet significatif

↑ Augmentation significative (p-value ≤ 0,05)

↓ Diminution significative (p-value > 0,05)

Qualité du modèle : mesure subjective, basée sur la comparaison entre l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans le modèle *in vitro* et dans le contexte clinique du cancer du sein hormono-dépendant

Les résultats présentés au chapitre 2 ont confirmé l'utilisation du modèle cellulaire H295R afin d'étudier l'expression de l'aromatase par l'activation de deux promoteurs « pro-cancer », PII et I.3. De plus, cette publication a été la première étude à mesurer l'effet de pesticides néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase. Nous avons démontré dans cet article que deux néonicotinoïdes, le thiaclopride et thiaméthoxame, augmentait l'expression de *CYP19* via PII et I.3 (Figure 2-2), et que cette augmentation des niveaux d'ARNm se traduisait également par une augmentation de l'activité catalytique de l'aromatase (Figure 2-4). De plus, cet article a souligné le fait que la lignée cellulaire HUVEC n'était pas appropriée pour l'étude de l'expression promoteur-spécifique de *CYP19*, puisque nous n'avons pas été en mesure de détecter l'activité du promoteur I.7.

Les résultats de cette publication parue dans la revue *Toxicological Sciences* ont constitué la base des hypothèses émises lors de l'écriture de l'article présenté au chapitre 4. En effet, après avoir observé les effets de pesticides néonicotinoïdes sur l'expression de *CYP19* via des promoteurs impliqués dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant, notre objectif était de développer un bioessai cellulaire où l'observation de l'activité des quatre promoteurs impliqués dans le développement de cette pathologie serait possible, et de mesurer l'effet de concentrations environnementales de néonicotinoïdes sur la délicate utilisation des promoteurs guidant l'expression de l'aromatase. Ce modèle, la lignée cellulaire Hs578t, est présenté en détail au chapitre 4 ainsi qu'à la section 5.1. Nous avons été en mesure d'utiliser ce modèle cellulaire afin de mesurer l'effet des pesticides néonicotinoïdes sur le changement d'utilisation des promoteurs de *CYP19* normalement observé chez des patientes atteintes de cancer du sein hormono-dépendant. Brièvement, nous avons démontré que des concentrations environnementales de deux néonicotinoïdes communs, soit le thiaclopride et l'imidaclopride, induisaient un changement



d'utilisation des promoteurs de l'aromatase dans les cellules Hs578t, caractérisé par une diminution de l'expression de *CYP19* via l'activité du promoteur I.4, et une augmentation des niveaux d'ARNm de *CYP19* via les promoteurs PII, I.3 et I.7 (Figures 4-3 et 4-4). Cette modification de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase a eu comme résultat une augmentation de l'expression globale de *CYP19* et de l'activité catalytique de l'enzyme. Nous avons également déterminé que le thiaclopride induisait ces changements d'utilisation des promoteurs en agissant potentiellement sur les voies de signalisation PLC et MEK/MAPK 1/3, impliquées à tout le moins en partie dans l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII/I.3 et I.7, respectivement (Figures 4-5 et 4-6). Ces travaux ont aussi fourni des données indiquant l'effet potentiel de l'imidaclopride sur la voie de signalisation PLC, ce qui pourrait expliquer l'induction de l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII et I.3 dans les cellules Hs578t exposées à ce pesticide (Figures 4-5 et 4-6). Cette publication, en seconde révision dans la revue *Environmental Health Perspectives*, décrit l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans les cellules Hs578t, et est la première à démontrer le potentiel des pesticides néonicotinoïdes d'induire un changement d'utilisation des promoteurs de l'aromatase tel qu'observé chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant.

#### 5.2.1.1 Effets à faibles concentrations et courbes dose-réponse non-monotones

Les résultats présentés aux chapitres 2 et 4 présentent des effets non-monotones. Les relations concentration-effet qui ne sont pas linéaires font encore l'objet de discordes au sein de la communauté scientifique. Or, ce type de relation biphasique est plutôt commun lors d'études investiguant les effets de contaminants à faibles doses. Discriminer l'intensité d'une dose peut être un défi de taille : une définition qui fait plutôt consensus est celle stipulant qu'une faible dose se situe sous la dose la plus faible ayant un effet biologique significatif (LOAEL) pour un composé spécifique (Vandenberg *et al.*, 2012, Welshons *et al.*, 2006).

Quelques études *in vitro* sur la toxicité des pesticides néonicotinoïdes ont démontré la cytotoxicité de ces composés à diverses concentrations. Par exemple, une concentration de 1,9  $\mu\text{M}$  d'imidaclopride a significativement diminué l'activité mitochondriale dans des cellules de branchies de Cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*) (Su *et al.*, 2007). Dans des cellules de lymphocytes humains, une exposition à 0,39  $\mu\text{M}$  d'imidaclopride a été considérée comme génotoxique (Feng *et al.*, 2005). Sur le même type de cellules, une autre étude a évalué les dommages à l'ADN causés par une exposition à différentes formulations commerciales de thiaclopride et d'imidaclopride. Les concentrations les plus faibles ayant des effets significatifs se situaient entre 9,5  $\mu\text{M}$  pour la formulation commerciale de thiaclopride Calypso, et 0,002 M pour le Gaucho dont l'ingrédient actif est l'imidaclopride (Calderón-Segura *et al.*, 2012). De façon générale, les concentrations de pesticides néonicotinoïdes que nous avons utilisées se situent sous ces concentrations déterminées comme ayant des effets cytotoxiques significatifs, et peuvent donc être considérées comme de relativement faibles doses. L'acceptation des études portant sur les effets de faibles doses de composés chimiques repose sur certains critères qui ont tous été remplis lors de cette thèse. Premièrement, l'utilisation de contrôles négatifs, habituellement les cellules exposées au solvant seul, est primordiale afin de s'assurer que le solvant ne cause pas d'effets qui pourraient être attribués aux contaminants testés. Deuxièmement, Vandenberg et collègues (2012) soulignent l'importance des contrôles positifs dont les effets et voies de signalisation sont bien connus et documentés. Dans cette thèse, plusieurs de ces contrôles positifs appropriés ont été utilisés afin de démontrer que le système expérimental est dans la capacité de détecter une perturbation des niveaux d'ARNm, de l'activité catalytique d'une enzyme ou encore de la production hormonale.

Des effets biologiques à faibles doses ont déjà été répertoriés pour plusieurs perturbateurs endocriniens. Le cas du Bisphénol A (BPA) est particulièrement intéressant, puisque ce composé démontre une sélectivité selon la concentration à laquelle il est testé. À faibles doses, le BPA se lie presque exclusivement au RE, alors qu'à plus fortes concentrations, ce même composé a tendance à se lier aux récepteurs des androgènes ou de l'hormone thyroïdienne (Moriyama *et al.*, 2002, Sohoni *et al.*, 1998). Les mécanismes entourant les effets non-monotones des néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* ainsi que l'activité catalytique de l'aromatase demeurent à élucider.

### **5.2.2 Implication pour la grossesse**

La production d'œstrogènes pendant la grossesse est possible grâce à la collaboration étroite du placenta et du fœtus (section 1.1.1.2). En effet, les glandes surrénales et le foie fœtaux produisent les androgènes précurseurs nécessaires à la formation des œstrogènes dans le placenta par l'enzyme *CYP19* fortement exprimée dans cet organe éphémère (revue dans Kaludjerovic *et al.* (2012) et Rainey *et al.* (2004)). L'étude de l'activité de l'aromatase et de la production hormonale pendant la grossesse est donc tout à fait appropriée.

De plus, les œstrogènes assurent plusieurs rôles physiologiques essentiels pendant la grossesse, par exemple la différenciation cellulaire des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes, ou encore la formation de la circulation sanguine utéro-placentaire (Yashwanth *et al.*, 2006). De ce fait, une exposition *in utero* à des perturbateurs endocriniens soulèvent des inquiétudes. Un des objectifs de cette thèse était de déterminer les effets de pesticides néonicotinoïdes sur la production d'œstrogènes et sur l'activité catalytique d'une enzyme clé dans ce processus, l'aromatase, en utilisant un modèle de co-culture fœto-placentaire mimant la stéroïdogénèse pendant la grossesse et développée dans notre laboratoire (Hudon Thibeault *et al.*, 2014, Hudon

Thibeault *et al.*, 2017). Brièvement, cette co-culture consiste en la culture de cellules surrénales H295R ayant des caractéristiques fœtales avec des cellules cytotrophoblastiques BeWo. Les cellules sont séparées par un insert poreux, qui permet les échanges entre les deux lignées cellulaires via le milieu de co-culture. Cette co-culture produit *de novo* toutes les hormones stéroïdiennes, entre autres l'œstriol, œstrogène uniquement produit pendant la grossesse (Hudon Thibeault *et al.*, 2014). Les résultats les plus pertinents concernant l'impact des pesticides néonicotinoïdes sur la stéroïdogénèse dans ce modèle unique de co-culture sont présentés au chapitre 3, et résumés au tableau 5.2.

**Tableau 5.2 Résultats principaux de cette thèse portant sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle de co-culture mimant la stéroïdogénèse dans l'unité fœto-placentaire**

	Co-culture fœto-placentaire (H295R et BeWo)		
Néonicotinoïdes	IMI	THIAC	THIAM
<b>Activité CYP19</b>			
<b>H295R</b>	↑ (3-10 µM)	↑ (0.1-0.3 µM)	↑ (3-10 µM)
<b>BeWo</b>	↑ (10 µM)	↑ (10 µM)	—
<b>DHEA</b>	↑ (0.3-10 µM)	↑ (3-10 µM)	↑ (0.3-10 µM)
<b>Androstènedione</b>	—	—	—
<b>B-HCG</b>	↑ (10 µM)	↑ (0.1 µM)	—
<b>17-βœstradiol</b>	↑ (10 µM)	↑ (0.1-0.3 µM)	↑ (0.1-0.3 µM)
<b>Œstrone</b>	—	↑ (0.1-0.3 µM)	↑ (0.3 et 10 µM)
<b>Œstriol</b>	↓ (0.3-10 µM)	↓ (0.3-3 µM)	↓ (0.1-10 µM)

— Aucun effet significatif

↑ Augmentation significative (p-value ≤ 0,05)

↓ Diminution significative (p-value > 0,05)

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Toxicology and Applied Pharmacology*. Nous avons démontré la pertinence de ce modèle de co-culture en confirmant certains résultats précédemment obtenus par Hudon-Thibeault et collègues (2014 et 2017) démontrant que l'activité catalytique de l'aromatase est plus importante dans les cellules BeWo que les cellules H295R (Section 3.7.1), ce qui est en accord avec la réalité *in vivo* où la grande majorité de l'expression de l'aromatase provient du placenta (Hanley *et al.*, 2001, Pezzi *et al.*, 2003). Nous avons également pu observer la production d'œstriol dans cette co-culture (Figures 3-1, 3-2, 3-3 ; Section 3.6.2), un œstrogène uniquement produit pendant la grossesse (Kaijser *et al.*, 2000), ce qui démontre une fois de plus que ce modèle de co-culture mime adéquatement les interactions nécessaires entre le compartiment fœtal (cellules H295R) responsable de la synthèse des précurseurs androgènes via la forte expression de l'enzyme *CYP17*, et le compartiment placentaire (cellules BeWo) permettant la transformation finale en œstrogènes via l'action de l'aromatase fortement exprimée dans ce tissu (Leeder *et al.*, 2005, Rainey *et al.*, 2002, Rainey *et al.*, 2004).

Dans cette publication, nous avons démontré qu'une exposition à des concentrations environnementales et similaires à ce qui a été mesuré chez des agriculteurs (Nomura *et al.*, 2013) de néonicotinoïdes (thiaclopride, thiaméthoxame et imidaclopride) augmentait l'activité catalytique de l'aromatase et conséquemment la production de  $17\beta$ -œstradiol et d'œstrone (Figures 3-1, 3-2, 3-3 ; Section 3.6.2). De façon intéressante, la synthèse d'œstriol dans la co-culture exposée à ces trois néonicotinoïdes était fortement inhibée (Figures 3-1, 3-2, 3-3 ; Section 3.6.2). Nous nous sommes alors penchés sur une hypothèse expliquant ce phénomène et avons investigué l'effet de ces trois pesticides néonicotinoïdes sur deux enzymes clés dans la production d'œstriol pendant la grossesse, soit la *SULT2A1* et la *CYP3A7*, responsables de la

formation de DHEA sulfatée dans les surrénales fœtales et de  $16\alpha$ -OH-DHEA-sulfatée dans le foie fœtal, respectivement. Ce dernier est alors converti en œstriol dans le placenta. Il est particulièrement pertinent d'étudier l'enzyme fœtale CYP3A7 non seulement de par son implication dans la synthèse d'œstriol, mais également à cause de son homologie avec l'enzyme Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), exprimée dans le foie adulte et impliquée dans le métabolisme de plusieurs contaminants comme les pesticides néonicotinoïdes (Casida, 2011, Dorne *et al.*, 2005, Schulz-Jander *et al.*, 2002, Shi *et al.*, 2009) L'expression génique de *SULT2A1* et de *CYP3A7* a été mesurée dans les cellules H295R agissant comme compartiment fœtal dans la co-culture, et une exposition aux pesticides néonicotinoïdes augmentait l'expression de *CYP3A7* (Figure 3-5, Section 3.6.3). Une explication probable de ce phénomène est que l'enzyme CYP3A7 aurait des fonctions similaires à la CYP3A4, et que les pesticides néonicotinoïdes seraient métabolisés par cette enzyme, agissant ainsi comme compétiteurs avec le substrat normal (DHEA sulfatée) et ayant comme effet la diminution de la production d'œstriol. Finalement, cette diminution d'œstriol pourrait être à l'origine d'une boucle de rétro-contrôle expliquant l'augmentation de l'expression de *CYP3A7*. Cette hypothèse a également été vérifiée dans la publication présentée au chapitre 3, où nous avons traité des cellules H295R au préalable avec de l'œstriol, puis les pesticides néonicotinoïdes. Le résultat de ces co-expositions fut le même pour les trois néonicotinoïdes testés : la présence d'œstriol dans le milieu de culture a bloqué l'induction de l'expression de *CYP3A7* préalablement observée dans les cellules exposées aux néonicotinoïdes seuls (Figure 3-6, Section 3.6.3). Nous avons donc démontré que dans un modèle de co-culture mimant efficacement la stéroïdogénèse par l'unité fœto-placentaire, les pesticides néonicotinoïdes augmentaient la synthèse de  $17\beta$ -œstradiol et d'œstrone mais diminuaient la production d'œstriol, œstrogène primordial pendant la grossesse.

Cette perturbation de la synthèse d'œstriol semble être en partie expliquée par le métabolisme des néonicotinoïdes par l'enzyme fœtale CYP3A7.

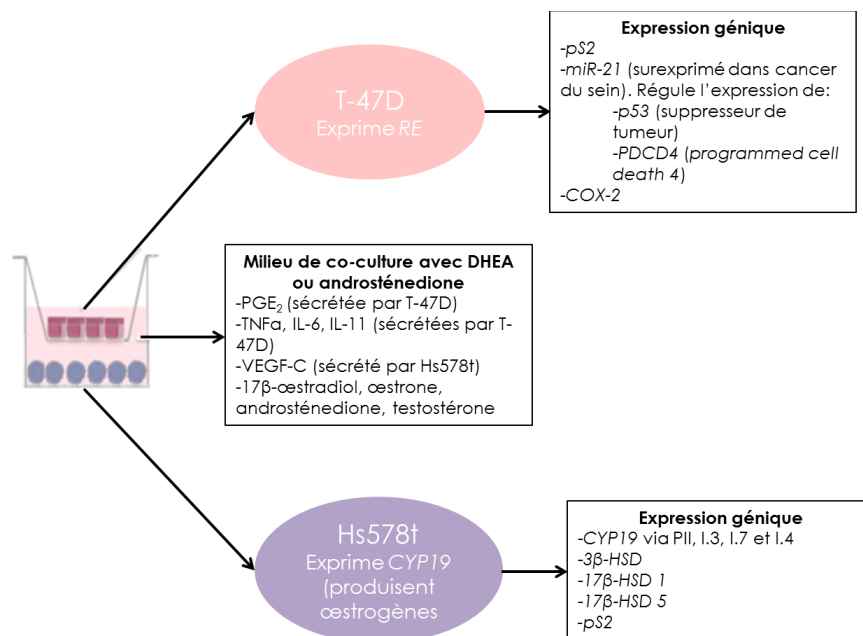
À la lumière de ces résultats et sachant que plusieurs contaminants peuvent traverser la barrière fœto-placentaire, que cela est fortement suggéré pour les pesticides néonicotinoïdes (Abou-Donia *et al.*, 2008, Taira, 2014), et qu'une perturbation de la production d'œstrogènes pendant la grossesse est associée avec des petits poids à la naissance, des plus petites circonférences de la tête des nourrissons, des retards de croissance et des complications post-natales (Gerhard *et al.*, 1986, Kaijser *et al.*, 2000, Troisi *et al.*, 2003), ces résultats soulèvent des préoccupations quant à l'impact des pesticides néonicotinoïdes sur le développement fœtal et remettent en question leur « non-toxicité » chez les humains.

## **5.3 Perspectives**

### **5.3.1 Modèle co-culture cancer du sein**

Les résultats présentés au chapitre 4 ont suscité beaucoup d'intérêt au laboratoire. En effet, nous avons pu mesurer l'expression de l'aromatase via quatre promoteurs impliqués dans le développement du cancer du sein hormono-dépendant (le promoteur adipeux normal I.4, et les trois promoteurs « pro-cancer » PII, I.3 et I.7) dans une même lignée cellulaire. Dans ces cellules Hs578t de cancer du sein, nous avons des résultats expliquant en partie les voies de signalisation impliquées dans l'expression de *CYP19* via les promoteurs PII, I.3 et I.7. De plus, les cellules Hs578t exposées au solvant DMSO seul ont démontré un comportement d'expression de *CYP19* similaire à ce qui est observé chez les fibroblastes normaux. Finalement, nous avons reproduit le changement d'utilisation des promoteurs de *CYP19*, normalement observé chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant, dans les cellules Hs578t exposées à des

concentrations faibles de pesticides néonicotinoïdes. Dans un souci de développer des outils de détection reproduisant plus fidèlement la réalité physiologique de cette pathologie, nous proposons un modèle de co-culture mimant les interactions cellulaires dans le micro-environnement tumoral du sein. Cette co-culture sera composée de cellules épithéliales de cancer du sein T-47D exprimant les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et les cellules Hs578t assurant la production d'œstrogènes dans la co-culture par leur expression de *CYP19* similaire aux fibroblastes. Le principe de co-culture sera le même que présenté au chapitre 3, en utilisant un insert poreux afin que les cellules ne soient pas directement en contact. En effet, les cellules épithéliales cancéreuses sont généralement séparées des fibroblastes par des cellules myoépithéliales (Khamis *et al.*, 2012).



**Figure 5-1 : modèle de co-culture proposé mimant la stéroïdogenèse dans le cancer du sein hormono-dépendant**

Ce modèle de co-culture propose l'utilisation des cellules épithéliales de cancer du sein hormono-dépendant T-47D et les cellules Hs578t, ces dernières ayant un comportement d'expression promoteur-spécifique de *CYP19* similaire aux fibroblastes. © Caron-Beaudoin, E. (2017)



Dans cette co-culture, notre hypothèse est que les cellules Hs578t exprimant l'aromatase assurent la production d'œstrogènes suite à l'ajout de précurseurs androgènes dans le milieu. Les cellules épithéliales cancéreuses T-47D, exprimant le RE et donc en réponse à la stimulation des œstrogènes, devraient voir l'expression de certains marqueurs cancéreux clés augmentée tels la protéine pS2, dont l'expression est induite par une exposition au 17 $\beta$ -œstradiol (Jeltsch *et al.*, 1987, Kim *et al.*, 2000) et le micro-ARN miR-21. Ce dernier est surexprimé dans le cancer du sein hormono-dépendant (Iorio *et al.*, 2005, Si *et al.*, 2007) et semble être potentiellement impliqué dans l'inhibition de l'expression de p53 et de *Programmed Cell Death 4* (PDCD 4), deux suppresseurs de tumeurs (Frankel *et al.*, 2008). Nous proposons également que suite à la stimulation des cellules T-47D par les œstrogènes, l'enzyme COX-2, responsable de la production de PGE<sub>2</sub>, soit également induite dans ces cellules (Neulen *et al.*, 1988). Afin de compléter la caractérisation de cette co-culture, nous proposons de mesurer la production hormonale dans le milieu de co-culture et certaines cytokines impliquées dans la réaction desmoplastique (Meng *et al.*, 2001). Une fois ce modèle de co-culture bien établi, il sera possible de l'utiliser comme outil de détection de la perturbation endocrinienne de contaminants environnementaux, et de mesurer leurs effets sur 1) la production d'hormones et de cytokines dans le milieu de co-culture ; 2) l'activité catalytique de l'aromatase et son expression promoteur-spécifique, les niveaux d'ARNm de diverses enzymes de la stéroïdogénèse et de pS2 dans les cellules Hs578t ; 3) l'expression de pS2, de miR-21, et de COX-2 dans les cellules T-47D. Somme toute, ce modèle devrait reproduire plus fidèlement les interactions cellulaires dans le micro-environnement tumoral ayant un impact important sur la production d'œstrogènes dans le cancer du sein hormono-dépendant. Ce projet de co-culture a d'ailleurs reçu une subvention de recherche de la part de la *Alternatives Research & Development Foundation*.

### 5.3.2 Études d'affinité entre néonicotinoïdes et protéines

Au chapitre 3, nous avons démontré qu'une exposition aux pesticides néonicotinoïdes engendrait une inhibition de la production d'œstriol dans un modèle de co-culture fœto-placentaire. Une hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène serait la métabolisation des néonicotinoïdes par l'enzyme CYP3A7, fortement exprimée dans le foie fœtal (Lacroix *et al.*, 1997). En effet, il a été démontré qu'une enzyme similaire exprimée dans le foie adulte, la CYP3A4, métabolisait certains néonicotinoïdes (Casida, 2011, Schulz-Jander *et al.*, 2002, Shi *et al.*, 2009). Afin de vérifier cette possibilité, la méthode d'amarrage, ou *Docking*, serait à envisager. Cette méthode de modélisation moléculaire consiste en la prédiction de la liaison possible entre molécules, en étudiant les orientations et sites de liaison potentiels afin de former un complexe stable. Pour utiliser la méthode *Docking*, la structure tridimensionnelle de l'enzyme CYP3A7 doit être caractérisée, ce qui a été accompli par l'équipe de Fan *et al.* (2015). Une approche intéressante serait donc de tester l'affinité des néonicotinoïdes thiaclopride, thiaméthoxame et imidaclopride avec les sites de liaison de CYP3A7. Ce type de méthode d'analyse d'interaction enzyme-ligand permet d'obtenir des valeurs d'intensité de l'affinité. Il serait notamment possible de comparer ces valeurs d'intensité d'interaction entre l'enzyme CYP3A7 et les divers néonicotinoïdes avec celles obtenues pour la liaison de cette enzyme avec ces ligands endogènes comme la DHEA sulfatée. La méthode *Docking* nous donnerait également des indications sur les caractéristiques précises des interactions, comme le nombre de ponts hydrogène entre l'enzyme CYP3A7 et les néonicotinoïdes. Ces informations seraient complémentaires à la publication présentée au chapitre 3 et permettraient notamment d'élucider les mécanismes entourant la diminution de la production d'œstriol dans le modèle de co-culture fœto-placentaire exposé à ces pesticides. Des études similaires visant à quantifier l'affinité des pesticides néonicotinoïdes pour divers

récepteurs de l'acétylcholine chez les insectes ont d'ailleurs été réalisées (Okazawa *et al.*, 1998, Rocher *et al.*, 2008). Puisque nous avons démontré l'expression du gène de *CYP3A7* dans les cellules H295R, il serait intéressant d'envisager d'exposer ces cellules aux néonicotinoïdes d'intérêt et de mesurer par GC-MS la concentration des composés ainsi que de leurs métabolites principaux dans le milieu de culture.

Au chapitre 4, nous avons démontré qu'une exposition à deux néonicotinoïdes, soient le thiaclopride et l'imidaclopride, induisait un changement d'utilisation des promoteurs de *CYP19* dans des cellules de cancer du sein Hs578t. De plus, ce changement d'utilisation des promoteurs semble être modulé par la perturbation de voies de signalisation dépendantes de l'activation du récepteur VEGF. Pour obtenir plus d'information sur ces mécanismes, une approche *Docking* similaire pourrait être utilisée afin de quantifier l'affinité des pesticides néonicotinoïdes sur le récepteur VEGF, dont la structure est bien caractérisée (Roskoski, 2008).

## **5.4 Retombées du projet**

L'objectif général de cette thèse de doctorat était de créer des outils de détection efficaces de la perturbation de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase en présence de concentrations retrouvées dans l'environnement de pesticides néonicotinoïdes. Nous avons rempli cet objectif en mettant au point des méthodes de RT-qPCR afin de caractériser l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase dans plusieurs lignées cellulaires humaines, ainsi que de mesurer l'impact de concentrations faibles de pesticides néonicotinoïdes sur l'utilisation des promoteurs de l'aromatase dans ces lignées cellulaires (H295R, HUVEC, Hs578t). Nous avons également investigué l'impact de ces pesticides sur l'activité catalytique de l'aromatase, qui est une mesure plus pertinente dans un contexte *in vivo*. Nous avons notamment découvert certaines voies de

signalisation impliquées dans la perturbation de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase par les pesticides néonicotinoïdes. Ce travail s'est inscrit dans deux contextes distincts ; 1) l'expression de l'aromatase dans le cancer du sein hormono-dépendant, où nous avons travaillé avec trois modèles cellulaires (H295R, HUVEC et Hs578t), dont un s'est particulièrement démarqué de par l'expression de l'aromatase via tous les promoteurs impliqués dans le développement de cette maladie (cellules Hs578t), et 2) l'activité de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle de co-culture mimant l'unité fœto-placentaire.

De façon globale, nous avons démontré que les pesticides néonicotinoïdes ont le potentiel d'être des perturbateurs endocriniens chez l'humain, de par l'altération de l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase, son activité catalytique ainsi que la production d'œstrogènes subséquente dans nos modèles pertinents dans le contexte du cancer du sein ou mimant l'unité fœto-placentaire. Sachant l'importance et l'implication de l'enzyme aromatase et de la synthèse d'œstrogènes dans ces deux contextes physiologiques, ces résultats soulèvent des inquiétudes quant à la non-toxicité de ces composés mise de l'avant par l'industrie agro-chimique.

## CHAPITRE 6 RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

- Abadin HG, Hibbs BF & Pohl HR (1997) Breast-Feeding Exposure of Infants To Cadmium, Lead, and Mercury: a Public Health Viewpoint. *Toxicology and Industrial Health* 13(4):495-517.
- Abou-Donia MB, Goldstein LB, Bullman S, Tu T, Khan WA, Dechkovskaia AM & Abdel-Rahman AA (2008) Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71(2):119-130.
- Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R & Walker JJ (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer research* 60(11):2898-2905.
- Aerts JL, Gonzales Mi Fau - Topalian SL & Topalian SL (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* 36(1).
- Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R & Simpson ER (1996) Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 81(11):3843-3849.
- Alavanja MC, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, Knott C, Thomas K, Hoppin JA & Barker J (2003) Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *American journal of epidemiology* 157(9):800-814.
- Albrecht ED, Aberdeen GW & Pepe GJ (2000) The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182(2):432-438.
- Albrecht ED & Pepe GJ (1999) Central Integrative Role of Oestrogen in Modulating the Communication between the Placenta and Fetus that Results in Primate Fetal-placental Development. *Placenta* 20(2):129-139.
- Albrecht ED & Pepe GJ (2010) Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *The International journal of developmental biology* 54(2-3):397-408.
- Ali S & Coombes RC (2002) Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer* 2(2):101-112.
- Alvarez-Garcia V, Gonzalez A, Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C & Cos S (2013) Melatonin modulates aromatase activity and expression in endothelial cells. *Oncology Reports* 29(5):2058-2064.
- Andarawewa KL, Motrescu ER, Chenard M-P, Gansmuller A, Stoll I, Tomasetto C & Rio M-C (2005) Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer research* 65(23):10862-10871.

- Anderson TA, Salice CJ, Erickson RA, McMurry ST, Cox SB & Smith LM (2013) Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* 92(1):84-90.
- Andersson H & Brittebo E (2012) Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. *Archives of Toxicology* 86(3):465-474.
- Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, Grote K & Chahoud I (2006) A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose–response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227(3):185-192.
- Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yilmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E & Baydas G (2012) Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* 30(6):492-499.
- Balduini L, Matoga M, Cavalli E, Seilles E, Riethmuller D, Thomassin M & Guillaume YC (2003) Triazinic herbicide determination by gas chromatography–mass spectrometry in breast milk. *Journal of Chromatography B* 794(2):389-395.
- Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer* 9(5):361-371.
- Balkwill F & Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357(9255):539-545.
- Basso O, Olsen J & Christensen K (1999) Recurrence risk of congenital anomalies-the impact of paternal, social, and environmental factors: a population-based study in Denmark. *American journal of epidemiology* 150(6):598-604.
- Beard J & Collaboration ARHR (2006) DDT and human health. *Science of the total environment* 355(1):78-89.
- Beard J, Sladden T, Morgan G, Berry G, Brooks L & McMichael A (2003) Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. *Environmental health perspectives* 111(5):724.
- Becker KL (2001) *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://books.google.ca/books?id=FVfzRvauq8C>
- Bellinger DC (2013) Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment: An Update. *Safety and Health at Work* 4(1):1-11.
- Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C & Séralini G (2007) Time-and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of environmental contamination and toxicology* 53(1):126-133.
- Betts JG, Desaix P, Johnson EW, Johnson JE, Korol O, Kruse D, Poe B & Wise J (2013) *Anatomy and Physiology*. OpenStax College. <https://books.google.ca/books?id=jD00ngEACAAJ>
- Bhaskar R & Mohanty B (2014) Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: In silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *General and comparative endocrinology* 205:226-234.

- Bhowmick NA, Neilson EG & Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432(7015):332-337.
- Birnbaum LS & Fenton SE (2003) Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives* 111(4):389-394.
- Björnström L & Sjöberg M (2005) Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology* 19(4):833-842.
- Blair A, Zahm SH, Pearce NE, Heineman EF & Fraumeni Jr JF (1992) Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scandinavian journal of work, environment & health*:209-215.
- Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R & Sheehan DM (2000) The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 54(1):138-153.
- Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Bossi R, Ayotte P, Asmund G, Kruger T, Ghisari M, Mulvad G, Kern P, Nzulumiki P & Dewailly E (2011) Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study. *Environmental Health* 10:88.
- Bonmatin J-M, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EAD, Noome DA, Simon-Delso N & Tapparo A (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):35-67.
- Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M & Fenichel P (2009) Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environmental Health Perspectives* 117(7):1053-1058.
- Breslin JW, Pappas PJ, Cerveira JJ, Hobson RW & Durán WN (2003) VEGF increases endothelial permeability by separate signaling pathways involving ERK-1/2 and nitric oxide. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284(1):H92-H100.
- Brisken C & O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(12):a003178.
- Brueggemeier RW, Su B, Sugimoto Y, Díaz-Cruz ES & Davis DD (2007) Aromatase and COX in breast cancer: Enzyme inhibitors and beyond. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 106(1-5):16-23.
- Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC & Elder RF (2003) Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:13.
- Bulun SE, Chen D, Lu M, Zhao H, Cheng Y, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Su E, Marsh E, Hakim A, Yin P, Ishikawa H, Amin S, Imir G, Gurates B, Attar E, Reierstad S, Innes J & Lin Z (2007) Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 106(1-5):81-96.

- Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC & Zhao H (2012) Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23(2):83-89.
- Bulun SE, 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. *Pharmacological Reviews* 57(3):359-383.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H & Shozu M (2003) The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86(3-5):219-224.
- Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B & Sebastian S (2004) Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Seminars in reproductive medicine* 22(1):5-9.
- Bulun SE, Zeitoun K, Sasano H & Simpson ER (1999) Aromatase in aging women. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 17(4):349-358.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J & Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55(4):611-622.
- Butler AS & Behrman RE (2007) *Preterm birth: causes, consequences, and prevention*. National Academies Press,
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2001) Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences* 22(6):285-291.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Carbajal-López Y, Calderón-Ezquerro MdC, Cortés-Eslava J, García-Martínez R, Flores-Ramírez D & Rodríguez-Romero MI (2012) Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *Journal of toxicology* 2012.
- Cario E, Gerken G & Podolsky DK (2004) Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127(1):224-238.
- Caron-Beaudoin É, Denison MS & Sanderson JT (2016) Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase (CYP19) in Human Adrenocortical Carcinoma (H295R) and Primary Umbilical Vein Endothelial (HUVEC) Cells. *Toxicological Sciences* 149(1):134-144.
- Caron-Beaudoin E, Viau R, Hudon Thibeault A-A, Vaillancourt C & Sanderson J (2017) The use of a unique fetoplacental steroidogenesis co-culture model as a screening tool for endocrine disruptors: the effects of neonicotinoids on aromatase activity and hormone production. *Toxicology and Applied Pharmacology* 332:15-24.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M & Levallet J (2001) Aromatase expression in male germ cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79(1):203-208.



- Casida JE (2011) Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms, and Relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7):2923-2931.
- Chand AL, Herridge KA, Howard TL, Simpson ER & Clyne CD (2011) Tissue-specific regulation of aromatase promoter II by the orphan nuclear receptor LRH-1 in breast adipose stromal fibroblasts. *Steroids* 76(8):741-744.
- Chavez KJ, Garimella SV & Lipkowitz S (2010) Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast disease* 32(1-2):35-48.
- Chen D, Reierstad S, Lin Z, Lu M, Brooks C, Li N, Innes J & Bulun SE (2007) Prostaglandin E2 Induces Breast Cancer-Related Aromatase Promoters via Activation of p38 and c-Jun NH2-Terminal Kinase in Adipose Fibroblasts. *Cancer Research* 67(18):8914-8922.
- Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H & Bulun SE (2009) Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Letters* 273(1):15-27.
- Chen M, Tao L, McLean J & Lu C (2014) Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(26):6082-6090.
- Chou W-C, Chen J-L, Lin C-F, Chen Y-C, Shih F-C & Chuang C-Y (2011) Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environmental Health* 10(1):94.
- Ciarloni L, Mallepell S & Briskin C (2007) Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(13):5455-5460.
- Cirri P & Chiarugi P (2011) Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 31(1):195-208.
- Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM & Sholtz RI (2007) DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environmental health perspectives* 115(10):1406.
- Comité directeur des statistiques sur le cancer (2017) Statistiques canadiennes sur le cancer 2017.).
- Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM & McElroy WK (2000) Atrazine Disrupts the Hypothalamic Control of Pituitary-Ovarian Function. *Toxicological Sciences* 53(2):297-307.
- Cornil CA (2009) Rapid Regulation of Brain Oestrogen Synthesis: The Behavioural Roles of Oestrogens and their Fates. *Journal of Neuroendocrinology* 21(3):217-226.
- Corton MM, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Rouse D & Spong C (2009) *Williams Obstetrics: 23rd Edition.* McGraw-Hill Education.  
[https://books.google.ca/books?id=nWToa\\_87vCEC](https://books.google.ca/books?id=nWToa_87vCEC)
- Cox C (2001) Imidacloprid: Insecticide fact sheet. *Journal of pesticide reform* 21(1):15-21.

- Cross MJ & Claesson-Welsh L (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences* 22(4):201-207.
- Dąbrowski S, Hanke W, Polańska K, Makowiec-Dąbrowska T & Sobala W (2003) Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 16(1):31-39.
- David D, George IA & Peter JV (2007) Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. *Clinical toxicology* 45(5):485-486.
- de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WTA, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M & de Vries EGE (2002) Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *Journal of Medical Genetics* 39(4):225-242.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M & Pham-Delègue M-H (2004) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57(3):410-419.
- Defarge N, Takács E, Lozano VL, Mesnage R, Spiroux de Vendômois J, Séralini G-E & Székács A (2016) Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International journal of environmental research and public health* 13(3):264.
- Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J & Dewailly E (2000) Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(2):161-166.
- Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J & Dewailly E (2002) Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis. *American Journal of Epidemiology* 155(7):629-635.
- Demura M, Reierstad S, Innes JE & Bulun SE (2008) Novel Promoter I.8 and Promoter Usage in the CYP19 (Aromatase) Gene. *Reproductive Sciences* 15(10):1044-1053.
- Dewailly E, Dodin S, Verreault R, Ayotte P, Sauve L, Morin J & Brisson J (1994) High organochlorine body burden in women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 86(3):232-234.
- Diel P, Olf S, Schmidt S & Michna H (2002) Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80(1):61-70.
- Dimri G, Band H & Band V (2005) Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research* 7(4):171-179.
- Dorne JLCM, Walton K & Renwick AG (2005) Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review. *Food and Chemical Toxicology* 43(2):203-216.

- Dubik D, Dembinski TC & Shiu RPC (1987) Stimulation of c-myc Oncogene Expression Associated with Estrogen-induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 47(24 Part 1):6517-6521.
- Dupont V (2011) *Mécanismes de reconnaissance de l'ADN et nouvelles approches pharmacologiques d'inhibition*. PhD (Université de Montréal).
- Eckert R (1999) *Physiologie animale: Mécanismes et adaptations*. 822 p
- Egeblad M & Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2(3):161-174.
- Eldridge JC, McConnell Robert F, Wetzel Lawrence T & Tisdell Merrill O (1998) Appearance of Mammary Tumors in Atrazine-Treated Female Rats: Probable Mode of Action Involving Strain-Related Control of Ovulation and Estrous Cycling. *Triazine Herbicides: Risk Assessment*, (ACS Symposium Series: 683) American Chemical Society, Vol 683. p 414-423.
- Ellis SA, Palmer MS & McMichael AJ (1990) Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *The Journal of Immunology* 144(2):731-735.
- Falcone T & Hurd WW (2007) *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*. Mosby/Elsevier. <https://books.google.ca/books?id=fOPtaEIKvcIC>
- Falender AE, Lanz R, Malenfant D, Belanger L & Richards JS (2003) Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary. *Endocrinology* 144(8):3598-3610.
- Fan J-R, Zheng Q-C, Cui Y-L, Li W-K & Zhang H-X (2015) Investigation of ligand selectivity in CYP3A7 by molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33(11):2360-2367.
- Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Hayes TB, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355(4):1012-1018.
- Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R & Nawata H (2007b) Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives* 115(5):720-727.
- Feigelson HS & Henderson BE (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis* 17(11):2279-2284.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P & Zeng EY (2005) Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61(2):239-246.
- Fenton SE (2006) Endocrine-Disrupting Compounds and Mammary Gland Development: Early Exposure and Later Life Consequences. *Endocrinology* 147(6):s18-s24.

- Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, Expósito J, Lorenzo M, Torné P, Villalobos M & Pedraza V (2004) Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes & Control* 15(6):591-600.
- FIGA-TALAMANCA I, MEARELLI I, VALENTE P & BASCHERINI S (1993) Cancer mortality in a cohort of rural licensed pesticide users in the province of Rome. *International Journal of Epidemiology* 22(4):579-583.
- Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL & Richards JS (1997) Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 62(1):197-206.
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M & et al. (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics* 62(3):676-689.
- Foster PMD (2006) Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *International Journal of Andrology* 29(1):140-147.
- Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A & Lund AH (2008) Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 283(2):1026-1033.
- Garry VF, Harkins ME, Erickson LL, Long-Simpson LK, Holland SE & Burroughs BL (2002) Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environmental health perspectives* 110(Suppl 3):441.
- Garry VF, Schreinemachers D, Harkins ME & Griffith J (1996) Pesticide applicators, biocides, and birth defects in rural Minnesota. *Environmental Health Perspectives* 104(4):394.
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon M-C & Séralini G-E (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262(3):184-191.
- Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA & La Rocca RV (1990) Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis. *Cancer Research* 50(17):5488-5496.
- Gentes M-L, Letcher RJ, Caron-Beaudoin É & Verreault J (2012) Novel Flame Retardants in Urban-Feeding Ring-Billed Gulls from the St. Lawrence River, Canada. *Environmental Science & Technology* 46(17):9735-9744.
- Gerhard I, Fitzer C, Klinga K, Rahman N & Runnebaum B (1986) Estrogen screening in evaluation of fetal outcome and infant's development. *Journal of Perinatal Medicine-Official Journal of the WAPM* 14(5):279-291.
- Ghosh D, Griswold J, Erman M & Pangborn W (2009) Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457(7226):219-223.

- Giesy JP, Pierens SL, Snyder EM, Miles-Richardson S, Kramer VJ, Snyder SA, Nichols KM & Villeneuve DA (2000) Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(5):1368-1377.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Bernardo AD, Greatti M, Giorio C & Tapparo A (2009) Translocation of Neonicotinoid Insecticides from Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. *Journal of Economic Entomology* 102(5):1808-1815.
- Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J & members P (2009) Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology* 20(8):1319-1329.
- Goulson D (2013) REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50(4):977-987.
- Gouvernement du Canada (2005) *Directive d'homologation : Lignes directrices concernant la création d'une base de données toxicologiques sur les produits antiparasitaires chimiques.* <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/secure-produits-consommation/rapports-publications/pesticides-lutte-antiparasitaire/politiques-lignes-directrices/directive-homologation/2005/creation-base-donnees-toxicologiques-produits-antiparasitaires-chimiques-dir2005-01.html>
- Gracia T, Hilscherova K, Jones PD, Newsted JL, Zhang X, Hecker M, Higley EB, Sanderson J, Richard M & Wu RS (2006) The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects. *Ecotoxicology and environmental safety* 65(3):293-305.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B & King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research* 114(5):397-407.
- Gudjonsson T, Rønnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ & Petersen OW (2002) Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of Cell Science* 115(1):39-50.
- Gundacker C & Hengstschläger M (2012) The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals. *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift* 162(9):201-206.
- Gunderson MP, Veldhoen N, Skirrow RC, Macnab MK, Ding W, van Aggelen G & Helbing CC (2011) Effect of low dose exposure to the herbicide atrazine and its metabolite on cytochrome P450 aromatase and steroidogenic factor-1 mRNA levels in the brain of premetamorphic bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Aquatic Toxicology* 102(1-2):31-38.
- Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL & Gardner MB (1977) Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 58(6):1795-1806.
- Hamilton BE, Martin JA & Sutton PD (2005) Births: preliminary data for 2004. *National vital statistics reports* 54(8):1-18.

- Hamilton BE, Martin JA & Ventura SJ (2007) Births: preliminary data for 2006. *National vital statistics reports* 56(7):1-18.
- Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG & Parker KL (2001) Expression Profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the Human Fetal Adrenal Gland: Potential Interactions in Gene Regulation. *Molecular Endocrinology* 15(1):57-68.
- Harada N, Utsumi T & Takagi Y (1993) Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(23):11312-11316.
- Hart SM (2002) Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biological Research* 35:295-303.
- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C & Vonk A (2003) Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111(4):568-575.
- He G, Tsutsumi T, Zhao B, Baston DS, Zhao J, Heath-Pagliuso S & Denison MS (2011) Third-Generation Ah Receptor-Responsive Luciferase Reporter Plasmids: Amplification of Dioxin-Responsive Elements Dramatically Increases CALUX Bioassay Sensitivity and Responsiveness. *Toxicological Sciences* 123(2):511-522.
- He G, Yu G-Y, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Leffert HL & Karin M (2010) Hepatocyte IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B Inhibits Tumor Promotion and Progression by Preventing Oxidative Stress-Driven STAT3 Activation. *Cancer Cell* 17(3):286-297.
- He Y, Murphy MB, Yu RMK, Lam MHW, Hecker M, Giesy JP, Wu RSS & Lam PKS (2008) Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. *Toxicology Letters* 176(3):230-238.
- Hecker M & Giesy J (2008) Novel trends in endocrine disruptor testing: the H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(1):287-291.
- Heffner LJ (2003) *Reproduction humaine*.
- Heneweer M, Muusse M, Dingemans M, de Jong PC, van den Berg M & Sanderson JT (2005) Co-culture of Primary Human Mammary Fibroblasts and MCF-7 Cells as an In Vitro Breast Cancer Model. *Toxicological Sciences* 83(2):257-263.
- Heneweer M, van den Berg M & Sanderson JT (2004) A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicology Letters* 146(2):183-194.
- Hennen G (2001) *Endocrinologie*. 520 p
- Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S & Decourtye A (2012a) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336(6079):348-350.

- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S & Decourtye A (2012b) A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* 336(6079):348-350.
- Hilakivi-Clarke L (2000) Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Research* 60(18):4993-5001.
- Hilscherova K, Jones PD, Gracia T, Newsted JL, Zhang X, Sanderson J, Yu RM, Wu RS & Giesy JP (2004) Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. *Toxicological Sciences* 81(1):78-89.
- Ho Y-S, Lee C-H & Wu C-H (2011) The Alpha 9-Nicotinic Acetylcholine Receptor Serves as a Molecular Target for Breast Cancer Therapy. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* 3(6):246-251.
- Holloway KR, Barbieri A, Malyarchuk S, Saxena M, Nedeljkovic-Kurepa A, Cameron Mehl M, Wang A, Gu X & Pruitt K (2013) SIRT1 Positively Regulates Breast Cancer Associated Human Aromatase (CYP19A1) Expression. *Molecular Endocrinology* 27(3):480-490.
- Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H & Iguchi T (2002) Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 16(2):117-122.
- Hoover RN, Hyer M, Pfeiffer RM, Adam E, Bond B, Cheville AL, Colton T, Hartge P, Hatch EE & Herbst AL (2011) Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine* 365(14):1304-1314.
- Hoshi N, Hirano T, Omotehara T, Tokumoto J, Umemura Y, Mantani Y, Tanida T, Warita K, Tabuchi Y, Yokoyama T & Kitagawa H (2014) Insight into the Mechanism of Reproductive Dysfunction Caused by Neonicotinoid Pesticides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37(9):1439-1443.
- Hu H (1991) Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *American Journal of Public Health* 81(8):1070-1072.
- Hudon Thibeault A-A, Derooy K, Vaillancourt C & Sanderson JT (2014) A Unique Co-culture Model for Fundamental and Applied Studies of Human Fetoplacental Steroidogenesis and Interference by Environmental Chemicals. *Environmental Health Perspectives* 122(4):371-377.
- Hudon Thibeault A-A, Laurent L, Duy SV, Sauvé S, Caron P, Guillemette C, Sanderson JT & Vaillancourt C (2017) Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the fetoplacental unit. *Molecular and Cellular Endocrinology* 442:32-39.
- Huovinen T, Rytönen K, Lamminmäki U & Pellinen T (2013) A simple heterogeneous one-step assay for screening estrogenic compounds. *Biotechnology Letters* 35(1):47-53.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M & Campiglio M (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research* 65(16):7065-7070.

- Irahara N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y & Noguchi S (2006) Quantitative analysis of aromatase mRNA expression derived from various promoters (I.4, I.3, PII and I.7) and its association with expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and COX-2 mRNAs in human breast cancer. *International Journal of Cancer* 118(8):1915-1921.
- Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, Pestell RG & Scherer PE (2003) Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* 22(41):6408-6423.
- Jacobson JL, Fein GG, Jacobson SW, Schwartz PM & Dowler JK (1984) The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *American journal of public health* 74(4):378-379.
- Jacobson JL, Jacobson SW & Humphrey HEB (1990) Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *The Journal of Pediatrics* 116(1):38-45.
- Jeltsch J, Robert M, Schatz C, Garnier J, Brown A & Chambon P (1987) Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. *Nucleic acids research* 15(4):1401-1414.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E & Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(2):69-90.
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M & Elbert A (2010) Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7):2897-2908.
- Jiang M, Qin C & Han M (2015) Primary breast cancer induces pulmonary vascular hyperpermeability and promotes metastasis via the VEGF–PKC pathway. *Molecular carcinogenesis*.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP & Tyler CR (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65(2):205-220.
- Kaijser M, Granath F, Jacobsen G, Cnattingius S & Ekblom A (2000) Maternal Pregnancy Estriol Levels in Relation to Anamnestic and Fetal Anthropometric Data. *Epidemiology* 11(3):315-319.
- Kallen CB (2004) Steroid hormone synthesis in pregnancy. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 31(4):795-816.
- Kalluri R & Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6(5):392-401.
- Kaludjerovic J & Ward WE (2012) The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *Journal of nutrition and metabolism* 2012:837901.
- Kapoor U, Srivastava MK & Srivastava LP (2011) Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology* 49(12):3086-3089.



- Kelsey JL, Gammon MD & John EM (1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews* 15(1):36-47.
- Kennedy S, Lorenzen A, James C & Collins B (1993) Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. *Analytical biochemistry* 211(1):102-112.
- Khamis ZI, Sahab ZJ & Sang Q-XA (2012) Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. *International journal of breast cancer* 2012.
- Kim J, Petz LN, Ziegler YS, Wood JR, Potthoff SJ & Nardulli AM (2000) Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74(4):157-168.
- Klempan T, Hudon-Thibeault AA, Oufkir T, Vaillancourt C & Sanderson JT (2011) Stimulation of serotonergic 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta* 32(9):651-656.
- Knower KC, To SQ, Simpson ER & Clyne CD (2010) Epigenetic mechanisms regulating CYP19 transcription in human breast adipose fibroblasts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 321(2):123-130.
- Komori M, Nishio K, Kitada M, Shiramatsu K, Muroya K, Soma M, Nagashima K & Kamataki T (1990) Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry* 29(18):4430-4433.
- Komori M, Nishio K, Ohi H, Kitada M & Kamataki T (1989) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing the entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450. *Journal of biochemistry* 105(2):161-163.
- Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang H-J, Bauerfeind I, Epstein M, Stieber P, Vernes J-M, Gutierrez J & Hong K (2004) Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 10(5):1706-1716.
- Korach KS, Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Kimbro KS, Eddy EM, Migliaccio S, Snedeker SM, Lubahn DB, Schomberg DW & Smith EP (1996) Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Progress in Hormone Research* 51:159-186; discussion 186-158.
- Krishnan AV, Swami S & Feldman D (2012) The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 77(11):1107-1112.
- Kumar P & Magon N (2012) Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal : Journal of the Nigeria Medical Association* 53(4):179-183.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM & Webb P (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74(5):311-317.
- Kwintkiewicz J, Cai Z & Stocco C (2007) Follicle-stimulating hormone-induced activation of Gata4 contributes in the up-regulation of Cyp19 expression in rat granulosa cells. *Molecular endocrinology* 21(4):933-947.

- Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G & Cresteil T (1997) Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *European journal of biochemistry / FEBS* 247(2):625-634.
- LaMarca HL & Rosen JM (2007) Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage. *Breast cancer research : BCR* 9(4):304-304.
- Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S & Carreau S (2005) Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 95(1):63-69.
- Lauwerys RR & Lauwerys R (2007) *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles* Elsevier Masson, 5. 1252 p
- Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG & Poulsom R (1998) Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *The Journal of pathology* 185(4):394-401.
- Lee C-H, Chang Y-C, Chen C-S, Tu S-H, Wang Y-J, Chen L-C, Chang Y-J, Wei P-L, Chang H-W, Chang C-H, Huang C-S, Wu C-H & Ho Y-S (2011) Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces  $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 129(2):331-345.
- Leeder JS, Gaedigk R, Marcucci KA, Gaedigk A, Vyhlidal CA, Schindel BP & Pearce RE (2005) Variability of CYP3A7 Expression in Human Fetal Liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314(2):626-635.
- Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, Balaguer P & Rahmani R (2006) Activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sciences* 79(12):1160-1169.
- Lephart ED & Simpson ER (1991) [45] Assay of aromatase activity. *Methods in Enzymology*, Michael R. Waterman EFJ (Édit.) Academic Press, Vol Volume 206. p 477-483.
- Letombe B, Cateau-Jonard S & Robin G (2012) *Endocrinologie en gynécologie et obstétrique*. Elsevier Health Sciences France. [https://books.google.ca/books?id=8p\\_zNsEHqBQC](https://books.google.ca/books?id=8p_zNsEHqBQC)
- Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, González-Horta C, Corona Y & Sanin LH (2004) Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere* 55(10):1421-1427.
- Levin E & Pietras R (2008) Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 108(3):351-361.
- Levin ER (2001) Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of Applied Physiology* 91(4):1860-1867.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A & Miller WL (1995) Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267(5205):1828-1831.

- Littorin M, Attewell R, Horstmann V & Möller T (1993) Mortality and tumour morbidity among Swedish market gardeners and orchardists. *International archives of occupational and environmental health* 65(3):163-169.
- Loomis AK & Thomas P (1999) Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER. *Biology of reproduction* 61(1):51-60.
- Lu C, Warchol KM & Callahan RA (2014) Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* 67(1):125-130.
- Lüllmann-Rauch R & Sprumont P (2008) *Histologie*. De Boeck Supérieur. <https://books.google.ca/books?id=ILfgBZxVRZUC>
- Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C & Soto AM (2006) Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology* 254–255(0):179-186.
- Mahendroo MS, Mendelson CR & Simpson ER (1993) Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* 268(26):19463-19470.
- Main AR, Headley JV, Peru KM, Michel NL, Cessna AJ & Morrissey CA (2014) Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PLoS ONE* 9(3):e92821.
- Majno G & Joris I (2004) *Cells, tissues, and disease: Principles of general pathology*. 2
- Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, Zeleznik AJ & Stocco DM (2002) Regulation of Steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory Protein by a Member of the cAMP Response-Element Binding Protein Family. *Molecular Endocrinology* 16(1):184-199.
- Mantovani A (2010) Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Current Molecular Medicine* 10(4):369-373.
- Marieb EN (2005) *Anatomie et physiologie humaines*. ERPI,
- Marrs T (2012) *Mammalian Toxicology of Insecticides*. 490 p
- Martin A-M & Weber BL (2000) Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 92(14):1126-1135.
- Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Kirmeyer S & Munson ML (2007) Births: final data for 2005. *National vital statistics reports* 56(6):1-103.
- Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F & Munson ML (2005) Births: final data for 2003. *National vital statistics reports* 54(2):1-116.
- Mathur V, Bhatnagar P, Sharma RG, Acharya V & Sexana R (2002) Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from Jaipur. *Environment international* 28(5):331-336.

- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M & Sattelle DB (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 22(11):573-580.
- Mavridis SK & Pappas IS (2010) Regulation of aromatase expression by hormones, drugs pesticides and environmental pollutants in canine mammary CMT-U27 cells. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition* 24(2):171-174.
- Mayr B & Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(8):599-609.
- Meinhardt U & Mullis PE (2002) The essential role of the aromatase/p450arom. *Seminars in Reproductive Medicine* 20(3):277-284.
- Meisser A, Chardonnens D, Campana A & Bischof P (1999) Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\alpha$ , macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Molecular Human Reproduction* 5(3):252-260.
- Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR & Kronenberg HM (2015) *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier Health Sciences. <https://books.google.ca/books?id=iPIACwAAQBAJ>
- Meng L, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM & Bulun SE (2001) Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin 11 Secreted by Malignant Breast Epithelial Cells Inhibit Adipocyte Differentiation by Selectively Down-Regulating CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$  and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ : Mechanism of Desmoplastic Reaction. *Cancer Research* 61(5):2250-2255.
- Mesiano S & Jaffe RB (1997) Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocrine Reviews* 18(3):378-403.
- Mesnage R, Bernay B & Séralini GE (2013) Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313(2):122-128.
- Millar NS & Denholm I (2007) Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 7(1):53-66.
- Miller WL (1988) Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews* 9(3).
- Minas V, Loutradis D & Makrigiannakis A (2005) Factors controlling blastocyst implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 10(2):205-216.
- Mohamed F, Gawarammana I, Robertson TA, Roberts MS, Palangasinghe C, Zawahir S, Jayamanne S, Kandasamy J, Eddleston M & Buckley NA (2009) Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PLoS One* 4(4):e5127.
- Morales V, Gonzalez-Robayna I, Hernandez I, Quintana J, Santana P, De Galarreta CR & Fanjul L (2003) The inducible isoform of CREM (inducible cAMP early repressor, ICER) is a repressor of CYP19 rat ovarian promoter. *Journal of endocrinology* 179(3):417-425.

- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H & Nakao K (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(11):5185-5190.
- Moussard C (2005) *Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires*. 328 p
- Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH & Jasin M (1999) Brca1 Controls Homology-Directed DNA Repair. *Molecular Cell* 4(4):511-518.
- Mukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G & Nathan L (2002) Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: Implications in atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(6):4055-4060.
- Munger R, Isacson P, Hu S, Burns T, Hanson J, Lynch CF, Cherryholmes K, Van Dorpe P & Hausler Jr WJ (1997) Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environmental Health Perspectives* 105(3):308.
- Murk AJ, Legler J, Denison MS, Giesy JP, Van De Guchte C & Brouwer A (1996) Chemical-Activated Luciferase Gene Expression (CALUX): A Novel in Vitro Bioassay for Ah Receptor Active Compounds in Sediments and Pore Water. *Toxicological Sciences* 33(1):149-160.
- Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP & Mesnage R (2016) Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health* 15(1):19.
- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC & Foster PMD (2000) Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. *Toxicological Sciences* 55(1):143-151.
- Nagata C, Iwasa S, Shiraki M & Shimizu H (2006) Estrogen and  $\alpha$ -fetoprotein levels in maternal and umbilical cord blood samples in relation to birth weight. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 15(8):1469-1472.
- Nampoothiri LP NP, Rao AJ (2007) Proteomic profiling of forskolin-induced differentiated BeWo cells: an in-vitro model of cytotrophoblast differentiation. *Reproductive BioMedicine Online* 14(4):477-487.
- Neulen J, Zahradnik H, Flecken U & Breckwoldt M (1988) Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on the synthesis of prostaglandin F 2 $\alpha$ , prostaglandin E 2 and prostaglandin I 2 by fibroblasts from human endometrium in vitro. *Prostaglandins* 36(1):17-30.
- Newbold RR, Bullock BC & McLachlan JA (1990) Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis. *Cancer Research* 50(23):7677-7681.
- Nomura H, Ueyama J, Kondo T, Saito I, Murata K, Iwata T, Wakusawa S & Kamijima M (2013) Quantitation of neonicotinoid metabolites in human urine using GC-MS. *Journal of Chromatography B* 941:109-115.

- OECD (2011) *Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. OECD Publishing, Paris. /content/book/9789264122642-en  
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264122642-en>
- Okazawa A, Akamatsu M, Ohoka A, Nishiwaki H, Cho WJ, Nakagawa Y, Nishimura K & Ueno T (1998) Prediction of the binding mode of imidacloprid and related compounds to house-fly head acetylcholine receptors using three-dimensional QSAR analysis. *Pest Management Science* 54(2):134-144.
- OMS (2013) Organisation mondiale de la Santé: Rapport historique sur les effets pour l'homme de l'exposition aux perturbateurs endocriniens chimiques.).
- Ontario Ministry of the Environment and Climate Change (2017) *Neonicotinoid regulations for seed vendors*. Government of Ontario, <https://www.ontario.ca/page/neonicotinoid-regulations-seed-vendors#section-5>
- Osawa Y, Higashiyama T, Shimizu Y & Yarborough C (1993) Multiple functions of aromatase and the active site structure; aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 44(4):469-480.
- Osawa Y, Yoshida N, Fronckowiak M & Kitawaki J (1987) Immunoaffinity purification of aromatase cytochrome P-450 from human placental microsomes, metabolic switching from aromatization to 1 $\beta$  and 2 $\beta$ -monohydroxylation, and recognition of aromatase isozymes. *Steroids* 50(1):11-28.
- Oskarsson A, Ullerås E, Plant KE, Hinson JP & Goldfarb PS (2006) Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro. *Journal of Applied Toxicology* 26(6):484-492.
- Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H & Tarnawski AS (2001) PGE2 Stimulates VEGF Expression in Endothelial Cells via ERK2/JNK1 Signaling Pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286(5):923-928.
- Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M & Hoover RN (2006) Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15(8):1509-1514.
- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, W $\sqrt$ rrri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M & Gustafsson J-A (2002) Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 9(1):1-13.
- Pandey SP & Mohanty B (2015) The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary–thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere* 122:227-234.
- Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, Weck J, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik AJ & Nilson JH (2006) Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires  $\beta$ -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(33):12435-12440.
- Patel KJ, Veronica P, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA & Venkitaraman AR (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Molecular cell* 1(3):347-357.

- PAYNE AH, KELCH RP, MUSICH SS & HALPERN ME (1976) Intratesticular site of aromatization in the human. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 42(6):1081-1087.
- Pepper C, Tu H, Morrill P, Garcia-Rates S, Fegan C & Greenfield S (2017) Tumor cell migration is inhibited by a novel therapeutic strategy antagonizing the alpha-7 receptor. *Oncotarget* 8(7):11414-11424.
- Perera FP, Rauh V, Tsai W-Y, Kinney P, Camann D, Barr D, Bernert T, Garfinkel R, Tu Y-H & Diaz D (2003) Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environmental health perspectives* 111(2):201.
- Petridou E, Panagiotopoulou K, Katsourni K, Spanos E & Trichopoulos D (1990) Tobacco smoking, pregnancy estrogens, and birth weight. *Epidemiology* 1(3):247-250.
- Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE & Carr BR (2003) Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 87(2-3):181-189.
- Pitot HC (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 72(S3):962-970
- Potischman N & Troisi R (1999) In-utero and early life exposures in relation to risk of breast cancer. *Cancer Causes & Control* 10(6):561-573.
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W & Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313(4):856-862.
- Rae J, Johnson M, Scheys J, Cordero K, Larios J & Lippman M (2005) GREB1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Research and Treatment* 92(2):141-149.
- Rainey WE, Bird IM & Mason JI (1994) The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Molecular and Cellular Endocrinology* 100(1-2):45-50.
- Rainey WE, Carr BR, Sasano H, Suzuki T & Mason JI (2002) Dissecting human adrenal androgen production. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13(6):234-239.
- Rainey WE, Rehman KS & Carr BR (2004) Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 31(4):817-835, x.
- Ribeiro-Varandas E, Viegas W, Sofia Pereira H & Delgado M (2013) Bisphenol A at concentrations found in human serum induces aneugenic effects in endothelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 751(1):27-33.
- Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N & Seralini G-E (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental health perspectives* 113(6):716.
- Richards JS (1994) Hormonal Control of Gene Expression in the Ovary. *Endocrine Reviews* 15(6):725-751.
- Rinsky JL, Hopenhayn C, Golla V, Browning S & Bush HM (2012) Atrazine Exposure in Public Drinking Water and Preterm Birth. *Public Health Reports* 127(1):72-80.

- Rivest P, Devine PJ & Sanderson JT (2010) Evaluation of a bioluminescent mouse model expressing aromatase PII-promoter-controlled luciferase as a tool for the study of endocrine disrupting chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 249(1):33-40.
- Rivest P, Renaud M & Sanderson JT (2011) Proliferative and androgenic effects of indirubin derivatives in LNCaP human prostate cancer cells at sub-apoptotic concentrations. *Chemico-biological Interactions* 189(3):177-185.
- Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC & Bakardjiev AI (2012) Tissue Barriers of the Human Placenta to Infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 80(1):418-428.
- Roberge M, Hakk H & Larsen G (2004) Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicology Letters* 154(1–2):61-68.
- Rocher A & Marchand-Geneste N (2008) Homology modelling of the *Apis mellifera* nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and docking of imidacloprid and fipronil insecticides and their metabolites. *SAR and QSAR in Environmental Research* 19(3-4):245-261.
- Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ & Thun MJ (2001) Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *Jama* 285(11):1460-1465.
- Rogers JM & Denison MS (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In vitro & molecular toxicology* 13(1):67-82.
- Rortais A, Arnold G, Halm M-P & Touffet-Briens F (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36(1):71-83.
- Roskoski R (2008) VEGF receptor protein–tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375(3):287-291.
- Roy D & Liehr JG (1999) Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424(1–2):107-115.
- Roy JR, Chakraborty S & Chakraborty TR (2009) Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Medical Science Monitor* 15(6):RA137-145.
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC & Soto AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives* 109(7):675-680.
- Ruddon RW (2007) *Cancer Biology*. Oxford University Press, 4. 568 p
- Rull RP, Ritz B & Shaw GM (2006) Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications. *American journal of epidemiology* 163(8):743-753.
- Salas SP, Marshall G, Gutiérrez BL & Rosso P (2006) Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47(2):203-208.
- Sanderson J (2006) The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicological Sciences* 94(1):3-21.



- Sanderson J (2009a) Adrenocortical toxicology in vitro: assessment of steroidogenic enzyme expression and steroid production in H295R cells. *Adrenal Toxicology* 26:175-182.
- Sanderson J (2009b) Placental and Fetal Steroidogenesis. *Human Embryogenesis*, (Methods in Molecular Biology, Vaillancourt C & Lafond J (Édit.) Humana Press, Vol 550. p 127-136.
- Sanderson J, Boerma J, Lansbergen GWA & van den Berg M (2002) Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182(1):44-54.
- Sanderson J, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP & van den Berg M (2001) Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 109(10):1027-1031.
- Sanderson J, Seinen W, Giesy JP & van den Berg M (2000) 2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity? *Toxicological Sciences* 54(1):121-127.
- Sanderson JT, Hordijk J, Denison MS, Springsteel MF, Nantz MH & Van Den Berg M (2004) Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences* 82(1):70-79.
- Sanderson JT, Kennedy SW & Giesy JP (1998) In vitro induction of ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrins by halogenated aromatic hydrocarbons in avian primary hepatocytes. *Environmental toxicology and chemistry* 17(10):2006-2018.
- Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK & Brodie A (2009) History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. *Endocrine Reviews* 30(4):343-375.
- Santner SJ, Pauley RJ, Tait L, Kaseta J & Santen RJ (1997) Aromatase Activity and Expression in Breast Cancer and Benign Breast Tissue Stromal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82(1):200-208.
- Schaafsma A, Limay-Rios V, Baute T, Smith J & Xue Y (2015) Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario. *PLOS ONE* 10(2):e0118139.
- Schmidt M, Evellin S, Weernink PAO, vom Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW & Jakobs KH (2001) A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nature cell biology* 3(11):1020.
- Schneider BP & Sledge GW (2007) Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer. *Nature clinical practice Oncology* 4(3):181-189.
- Schreinemachers DM (2003) Birth malformations and other adverse perinatal outcomes in four US Wheat-producing states. *Environmental Health Perspectives* 111(9):1259.
- Schuetz JD, Molowa DT & Guzelian PS (1989) Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 274(2):355-365.

- Schuller HM (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nature Reviews Cancer* 9(3).
- Schulz-Jander DA & Casida JE (2002) Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters* 132(1):65-70.
- Sebastian S & Bulun SE (2001) A Highly Complex Organization of the Regulatory Region of the Human CYP19 (Aromatase) Gene Revealed by the Human Genome Project. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(10):4600-4602.
- Sebastian S, Takayama K, Shozu M & Bulun SE (2002) Cloning and characterization of a novel endothelial promoter of the human CYP19 (aromatase P450) gene that is up-regulated in breast cancer tissue. *Molecular Endocrinology* 16(10):2243-2254.
- Sekeroglu V, Sekeroglu ZA & Demirhan E (2014) Effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on thyroid hormone levels in rat serum. *Toxicology and Industrial Health* 30(1):40-46.
- Shi X, Dick RA, Ford KA & Casida JE (2009) Enzymes and Inhibitors in Neonicotinoid Insecticide Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11):4861-4866.
- Si M, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F & Mo Y (2007) miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26(19):2799-2803.
- Siddiqui M, Srivastava S, Mehrotra P, Mathur N & Tandon I (2003) Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 76(1):75-80.
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 66(1):7-30.
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin J-M, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C & Girolami V (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):5-34.
- Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86(3-5):225-230.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C & Jones M (2002) AROMATASE—A BRIEF OVERVIEW. *Annual Review of Physiology* 64(1):93-127.
- Simpson ER & Davis SR (2001) Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology* 142(11):4589-4594.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD & et al. (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews* 15(3):342-355.
- Singer CF, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy PJ & Eeckhout Y (1999) Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts. *European journal of biochemistry / FEBS* 259(1-2):40-45.

- Smalling KL, Reeves R, Muths E, Vandever M, Battaglin WA, Hladik ML & Pierce CL (2015) Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Science of The Total Environment* 502(0):80-90.
- Sofi M, Young MJ, Papamakarios T, Simpson ER & Clyne CD (2003) Role of CRE-binding protein (CREB) in aromatase expression in breast adipose. *Breast cancer research and treatment* 79(3):399-407.
- Sohoni P & Sumpter J (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* 158(3):327-339.
- Staels B, Hum D & Miller W (1993) Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Molecular Endocrinology* 7(3):423-433.
- Starner K & Goh KS (2012) Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88(3):316-321.
- Statistics CCSsACoC (2015) Cancer Statistics *Toronto, ON: Canadian Cancer Society*.
- Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD & Berkelman RL (1991) A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *Jama* 265(15):1985-1990.
- Sterneck E, Tessarollo L & Johnson PF (1997) An essential role for C/EBP $\beta$  in female reproduction. *Genes & development* 11(17):2153-2162.
- Sternlicht MD & Barsky SH (1997) The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Medical Hypotheses* 48(1):37-46.
- Stillerman KP, Mattison DR, Giudice LC & Woodruff TJ (2008) Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: a review of the science. *Reproductive Sciences* 15(7):631-650.
- Stocco C (2008) Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 73(5):473-487.
- Stokstad E (2013) Pesticides Under Fire for Risks to Pollinators. *Science* 340(6133):674-676.
- Su B, Diaz-Cruz ES, Landini S & Brueggemeier RW (2008) Suppression of aromatase in human breast cells by a cyclooxygenase-2 inhibitor and its analog involves multiple mechanisms independent of cyclooxygenase-2 inhibition. *Steroids* 73(1):104-111.
- Su F, Zhang S, Li H & Guo H (2007) In vitro acute cytotoxicity of neonicotinoid insecticide imidacloprid to gill cell line of flounder *Paralichthy olivaceus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 25(2):209-214.
- Subbaramaiah K, Morris PG, Zhou XK, Morrow M, Du B, Giri D, Kopelovich L, Hudis CA & Dannenberg AJ (2012) Increased Levels of COX-2 and Prostaglandin E2 Contribute to Elevated Aromatase Expression in Inflamed Breast Tissue of Obese Women. *Cancer Discovery* 2(4):356-365.
- Svedas E, Nisell H, VanWijk MJ, Nikas Y & Kublickiene KR (2002) Endothelial dysfunction in uterine circulation in preeclampsia: Can estrogens improve it? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187(6):1608-1616.

- Taira K (2014) Human neonicotinoids exposure in Japan. *Japanese Journal of Clinical Ecology* 23:14-24.
- Tan J, Buache E, Chenard MP, Dali-Youcef N & Rio MC (2011) Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *The International Journal of Developmental Biology* 55(7-9):851-859.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M & Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4):S1-S5.
- Thomas C & Gustafsson JA (2011) The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer* 11(8):597-608.
- To SQ, Knowler KC, Cheung V, Simpson ER & Clyne CD (2015) Transcriptional control of local estrogen formation by aromatase in the breast. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 145:179-186.
- Tomizawa M & Casida JE (2005) NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45(1):247-268.
- Trapp S (2004) Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research* 11(1):33-39.
- Tremblay JJ & Viger RS (2001) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142(3):977-986.
- Tremblay JJ & Viger RS (2003a) Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85(2-5):291-298.
- Tremblay JJ & Viger RS (2003b) Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(24):22128-22135.
- Troisi R, Potischman N, Roberts J, Siiteri P, Daftary A, Sims C & Hoover RN (2003) Associations of maternal and umbilical cord hormone concentrations with maternal, gestational and neonatal factors (United States). *Cancer Causes and Control* 14(4):347-355.
- Ueyama J, Harada KH, Koizumi A, Sugiura Y, Kondo T, Saito I & Kamijima M (2015) Temporal levels of urinary neonicotinoid and dialkylphosphate concentrations in Japanese women between 1994 and 2011. *Environmental science & technology* 49(24):14522-14528.
- Vafeiadi M, Vrijheid M, Fthenou E, Chalkiadaki G, Rantakokko P, Kiviranta H, Kyrtopoulos SA, Chatzi L & Kogevinas M (2014) Persistent organic pollutants exposure during pregnancy, maternal gestational weight gain, and birth outcomes in the mother-child cohort in Crete, Greece (RHEA study). *Environment International* 64(0):116-123.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT & Myers JP (2012) Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 33(3):378-455.

- Viden I, Rathouska Z, Davidek J & Hajslova J (1987) Use of gas liquid chromatography/mass spectrometry for triazine herbicide residues analysis in forage and milk. *Z. LEBENSMITT. UNTERSUCH. FORSCH.* 185(2):98-105.
- Villanueva CM, Durand G, Coutté M-B, Chevrier C & Cordier S (2005) Atrazine in municipal drinking water and risk of low birth weight, preterm delivery, and small-for-gestational-age status. *Occupational and environmental medicine* 62(6):400-405.
- Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Gabriele S, Carpino A, Rago V, Di Gioia ML, Leggio A, Bonofiglio D, Liguori A & Maggiolini M (2003) The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor  $\alpha$  in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* 22(3):275-284.
- Walsh LP, McCormick C, Martin C & Stocco DM (2000) Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental health perspectives* 108(8):769.
- Wang X, Sang X, Diorio C, Lin S-X & Doillon CJ (2015) In vitro interactions between mammary fibroblasts (Hs 578Bst) and cancer epithelial cells (MCF-7) modulate aromatase, steroid sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 412:339-348.
- Wang Y, Ye L & Leung LK (2008) A positive feedback pathway of estrogen biosynthesis in breast cancer cells is contained by resveratrol. *Toxicology* 248(2-3):130-135.
- Wehmas LC, Cavallin JE, Durhan EJ, Kahl MD, Martinovic D, Mayasich J, Tuominen T, Villeneuve DL & Ankley GT (2011) Screening complex effluents for estrogenic activity with the T47D-KBluc cell bioassay: Assay optimization and comparison with in vivo responses in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(2):439-445.
- Weiss HA, Potischman NA, Brinton LA, Brogan D, Coates RJ, Gammon MD, Malone KE & Schoenberg JB (1997) Prenatal and perinatal risk factors for breast cancer in young women. *Epidemiology*:181-187.
- Welshons WV, Nagel SC & vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147(6):s56-s69.
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT & Belcher SM (2007) In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 24(2):178-198.
- Wickerham EL, Lozoff B, Shao J, Kaciroti N, Xia Y & Meeker JD (2012) Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. *Environment international* 47:80-85.
- Wilson VS, Bobseine K & Gray LE (2004) Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicological Sciences* 81(1):69-77.
- Windal I, Denison MS, Birnbaum LS, Van Wouwe N, Baeyens W & Goeyens L (2005) Chemically Activated Luciferase Gene Expression (CALUX) Cell Bioassay Analysis for

- the Estimation of Dioxin-Like Activity: Critical Parameters of the CALUX Procedure that Impact Assay Results. *Environmental Science & Technology* 39(19):7357-7364.
- Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, Verfaillie C, Zweier J, Gupta K & Liu Z (2008) MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *Journal of cellular and molecular medicine* 12(6a):2395-2406.
- Xu X, Dailey AB, Talbott EO, Ilacqua VA, Kearney G & Asal NR (2010) Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in U.S. adults. *Environmental Health Perspectives* 118(1):60-66.
- Yamaguchi Y & Hayashi S (2009) Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine Journal* 56(1):1-7.
- Yang E, Chuang Y, Chen Y & Chang L (2008) Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology* 101(6):1743-1748.
- Yang S, Fang Z, Suzuki T, Sasano H, Zhou J, Gurates B, Tamura M, Ferrer K & Bulun S (2002) Regulation of aromatase P450 expression in endometriotic and endometrial stromal cells by CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs): decreased C/EBP $\beta$  in endometriosis is associated with overexpression of aromatase. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(5):2336-2345.
- Yashwanth R, Rama S, Anbalagan M & Rao AJ (2006) Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: A study using human placental and rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246(1-2):114-120.
- Yoshida N & Osawa Y (1991) Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. *Biochemistry* 30(12):3003-3010.
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M & Thorgeirsson UP (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Research* 56(9):2013-2016.
- Zeisler H, Jirecek S, Hohlagschwandtner M, Knofler M, Tempfer C & Livingston JC (2002) Concentrations of estrogens in patients with preeclampsia. *Wiener klinische Wochenschrift* 114(12):458-461.
- Zeitoun K, Takayama K, Michael MD & Bulun SE (1999) Stimulation of Aromatase P450 Promoter (II) Activity in Endometriosis and Its Inhibition in Endometrium Are Regulated by Competitive Binding of Steroidogenic Factor-1 and Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor to the Same cis-Acting Element. *Molecular Endocrinology* 13(2):239-253.
- Zhang MH, Man HT, Zhao XD, Dong N & Ma SL (2014) Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials. *Biomedical reports* 2(1):41-52.
- Zhang X, Yu RM, Jones PD, Lam GK, Newsted JL, Gracia T, Hecker M, Hilscherova K, Sanderson JT & Wu RS (2005) Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line. *Environmental science & technology* 39(8):2777-2785.

- Zhao Y (2016) The oncogenic functions of nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of oncology* 2016.
- Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR & Simpson ER (1996) Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE<sub>2</sub> via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 137(12):5739-5742.
- Zhao Y, Mendelson CR & Simpson ER (1995) Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Molecular Endocrinology* 9(3):340-349.
- Zhou D, Zhou C & Chen S (1997) Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61(3-6):273-280.
- Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, Sasano H & Clyne CD (2005) Interactions between Prostaglandin E<sub>2</sub>, Liver Receptor Homologue-1, and Aromatase in Breast Cancer. *Cancer Research* 65(2):657-663.

## ANNEXE 1: RESEARCH HIGHLIGHT

### Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase : Implications for the Development of Hormone-Dependent Breast Cancer

*Élyse Caron-Beaudoin<sup>a\*</sup> and J. Thomas Sanderson<sup>a\*</sup>*

<sup>a</sup> INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, CANADA

\* Auteur-ressource

L'article a été soumis à la revue **Cancer Cell & Microenvironment** le 12 février 2016. Il a été  
accepté pour publication le 14 mars 2016.

Un article sous forme de “research highlight” a été publié par l'étudiante lors de ce doctorat. La revue *Cancer Cell & Microenvironment* a sollicité l'étudiante afin d'écrire cette courte communication à la suite de la publication parue dans **Toxicological Sciences**.



## **A1.1 Contribution de l'étudiante et des co-auteurs**

Élyse Caron-Beaudoin : L'étudiante a écrit l'article et procédé aux corrections.

Thomas Sanderson : Le directeur a révisé l'article écrit par l'étudiante.

## **A1.2 Résumé**

L'aromatase (*CYP19*) est une enzyme clé de la synthèse des œstrogènes. Chez l'humain, *CYP19* est exprimée de façon spécifique au tissu et aux promoteurs. Dans le cancer du sein hormono-dépendant, *CYP19* est surexprimée via l'activation de plusieurs promoteurs additionnels (PII, I.3 et I.7), normalement inactifs dans la glande mammaire saine. Dans la glande mammaire normale, l'expression de *CYP19* est basse et régulée par le promoteur I.4, qui est notamment actif dans le tissu adipeux. Dans cette publication, nous présentons une étude récente que nous avons publié sur les effets des pesticides néonicotinoïdes sur l'expression promoteur-spécifique de *CYP19* dans plusieurs modèles *in vitro* de cellules humaines. Nous discutons également des implications de la perturbation endocrinienne par des contaminants environnementaux sur le développement de maladies hormono-dépendantes comme le cancer du sein.

**Mots clés :** aromatase, néonicotinoïdes, expression promoteur-spécifique, œstrogènes, H295R, cancer du sein

### **A1.3 Abstract**

Aromatase (*CYP19*) is the key enzyme in the biosynthesis of estrogens. In humans, it is expressed in a tissue- and promoter-specific manner. In hormone-dependent breast cancer, *CYP19* is overexpressed through the activation of several additional promoters (PII, I.3 and I.7) that are normally inactive in the healthy mammary gland. In the normal mammary gland, low basal *CYP19* expression is regulated by the I.4 promoter, which is also active in adipose tissue. Here, we highlight our recent study of the effects of neonicotinoid pesticides on the promoter-specific expression of *CYP19* in various human *in vitro* models. We also discuss the implications of endocrine disruption by environmental chemicals for the development of hormone-dependent diseases, such as breast cancer.

**Keywords:** Aromatase, neonicotinoids, promoter-specific expression, estrogen, H295R, breast cancer

## A1.4 Research Highlight

In Canada, breast cancer represents 26% of all cancer diagnosis in females (Statistics, 2015). About 70% of breast cancers are estrogen-dependent, and aromatase (CYP19) is overexpressed in this type of cancer. Aromatase is the key enzyme in the final step of biosynthesis of estrogens. In hormone-dependent breast cancer, estrogens stimulate cancer cell proliferation (Ghosh *et al.*, 2009) by activating estrogen receptor signalling pathways.

CYP19 is present in a variety of tissues and its expression is regulated in a promoter-specific manner (Fig A1-1).

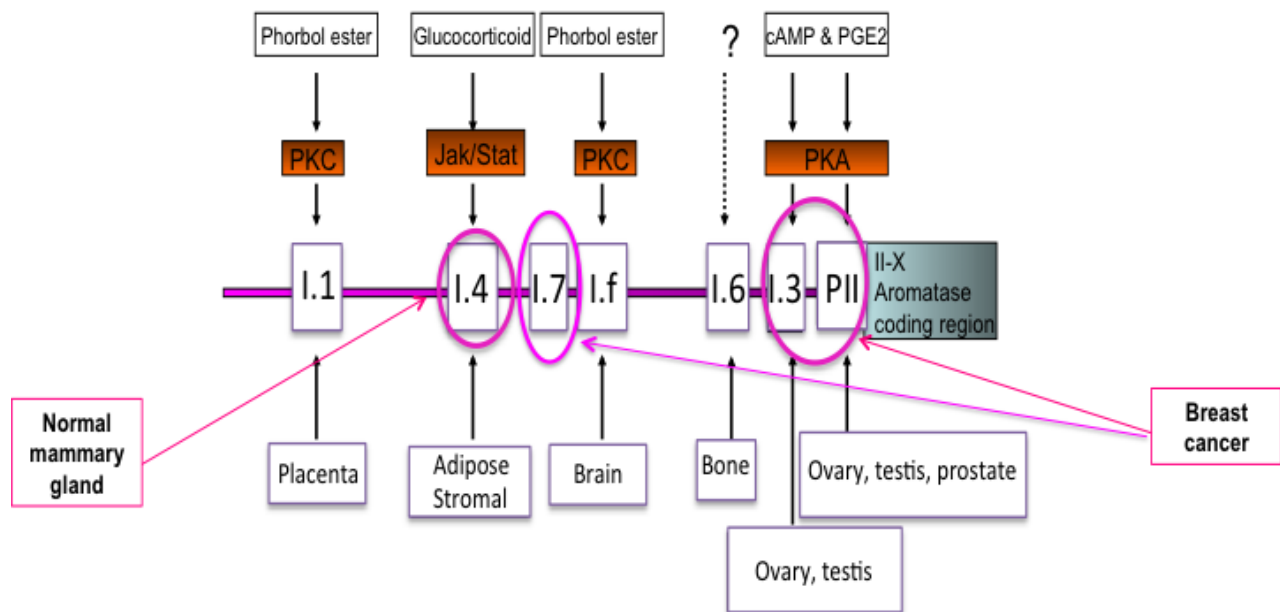


Figure A1-1: Tissue and promoter-specific organization of the CYP19 gene

In pre-menopausal women, estradiol synthesis *de novo* occurs mainly in the ovaries, via the activation of the PII/I.3 promoters of *CYP19*. In post-menopausal women the ovaries are no longer functional and estradiol levels drop dramatically. However, low levels of circulating estrone are produced from adrenal androgen precursors by the adipose tissue, where *CYP19* is

mostly expressed by the I.4 promoter which has low basal activity (Bulun *et al.*, 2007). In hormone-dependent breast cancers, estrogen biosynthesis is critical for an estrogen rich, tumor-promoting microenvironment. More precisely, fibroblast cells in the stroma that surround the epithelial tumor cells, known as cancer-associated fibroblasts (CAFs), are responsible for the majority of estrogen biosynthesis in close proximity to the tumor (Chen *et al.*, 2009, Cirri *et al.*, 2011). Normal fibroblasts express CYP19 via promoter I.4 (Chen *et al.*, 2009). However, in CAFs, a promoter-switch occurs, where I.4 promoter activity is inhibited and promoters PII, I.3 and I.7 are activated (Chen *et al.*, 2009, Zhao *et al.*, 1996). The mechanisms underlying this promoter-switch are still unknown, but it is thought to be partially due to increased prostaglandin E2 (PGE2) production by the epithelial tumor cells (Chen *et al.*, 2009). Moreover, the tumor cells also secrete cytokines, such as TNF $\alpha$  and IL-11 that promote a desmoplastic reaction, which involves the accumulation of CAFs and inhibition of the normal differentiation of CAFs into adipose stromal cells (Meng *et al.*, 2001) (Fig A1-2).

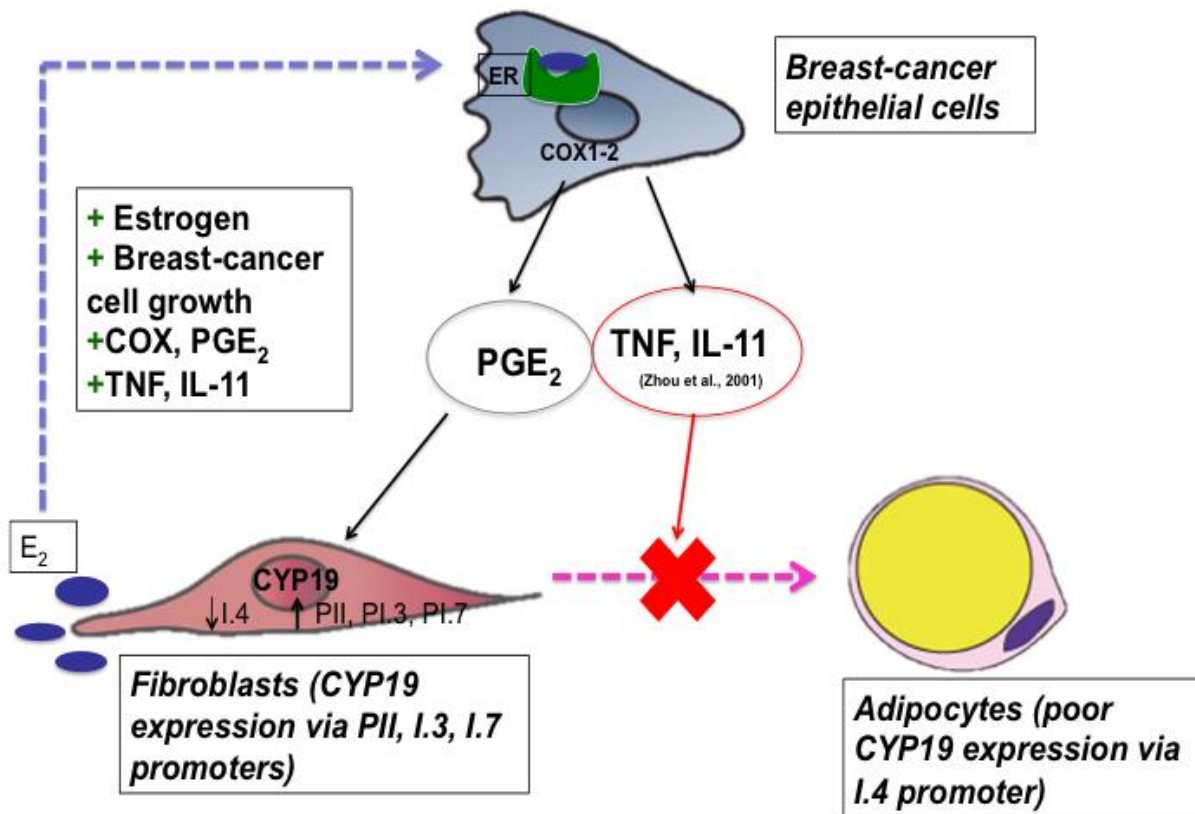


Figure A1-2: Cell-to-cell interactions in hormone-dependent breast cancer

Epithelial cells produce PGE<sub>2</sub>, which may induce a switch in CYP19 promoter usage from I.4 to PII, I.3 and I.7 in fibroblasts, leading to increased local synthesis of estrogens. Epithelial cancer cells also synthesize cytokines (TNF $\alpha$ , IL-11) that contribute to the accumulation of undifferentiated fibroblasts in the tumor microenvironment (desmoplastic reaction). Adapted from Bulun *et al.* (2012) and Krishnan *et al.* (2012)

Endocrine disruptors are chemicals that interfere with the synthesis, transport, metabolism or receptor activation of natural hormones. It is now well established that exposure to environmental contaminants may increase the risk of developing hormone-dependent breast cancer (Birnbaum *et al.*, 2003, Demers *et al.*, 2002) due to their estrogenic activity. However, studies investigating the proestrogenic mechanisms of endocrine disruptors mainly focus on estrogen receptor activation (Bouskine *et al.*, 2009, Lemaire *et al.*, 2006). Far less work has

looked at the potential effects of environmental chemicals on key enzymes of steroidogenesis, such as aromatase. Almost nothing is known about the potential effects of endocrine disruptors on the tissue- and promoter-specific expression of *CYP19*, although such effects would have far reaching implications for human health, such as the development of breast cancer.

Exposure to atrazine, a widely used herbicide, induces *CYP19* expression, aromatase activity and estrogen biosynthesis in human cell lines (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016, Hudon Thibeault *et al.*, 2014, Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001, Sanderson *et al.*, 2000), but little is known about "emerging" contaminants such as neonicotinoid insecticides. Neonicotinoids are the most commonly used insecticides worldwide, and are applied as coatings to the seeds of corn, canola, soybeans and the majority of fruits and vegetables. Neonicotinoid pesticides exert their effect by binding to the nicotinic receptor of insects, where they act as agonist of the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor (Matsuda *et al.*, 2001). While effects of neonicotinoids on natural pollinators, such as honey bees, have been widely studied, little is known about their endocrine disrupting potential in humans. Nonetheless, a number of studies have demonstrated that the neonicotinoid imidacloprid induces fragmentation of seminal DNA and lowers sperm count (Bal *et al.*, 2012) in male rats, whereas in female rats it decreases ovarian weight and alters luteinizing hormone and progesterone levels (Kapoor *et al.*, 2011). Moreover, half-lives of neonicotinoid pesticides in soil may exceed 1000 days (Goulson, 2013). A recent study conducted in Boston, MA, revealed that 100% of fruits and 72% of vegetables purchased from local grocery stores had detectable levels of one or more neonicotinoids (Chen *et al.*, 2014). Given the environmental persistence of neonicotinoids, their potential to bioaccumulate and presence in the human diet, chronic exposure to neonicotinoids and their potential health effects in humans is a real concern.

In our recent study, we investigated the effects of three widely used neonicotinoid pesticides (thiacloprid, thiamethoxam and imidacloprid) as well as the herbicide atrazine on the promoter-specific expression of *CYP19* mRNA and aromatase catalytic activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells. H295R cells are a well established *in vitro* model for the study of steroidogenesis (Gracia *et al.*, 2006, OECD, 2011, Sanderson, 2006, Sanderson, 2009a). Indeed, H295R cells express aromatase regulated by two breast cancer-relevant *CYP19* promoters: PII and I.3. In our study, we developed robust and sensitive real-time quantitative RT-PCR methods to measure the transcript derived from each specific *CYP19* promoter. To do so, we paid particular attention to the validation of primer pairs using standard curves and our choice of reference genes. A series of reference genes were evaluated for each cell line and for each pesticide treatment using the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments or MIQE guidelines (Bustin *et al.*, 2009, Taylor *et al.*, 2010). At least two suitable reference genes were used to normalize levels of promoter-specific *CYP19* mRNA expression. The choice of reference genes is of critical importance since there should be minimal variability in their expression among treatments. We validated previously published results showing that atrazine induces PII/I.3-mediated *CYP19* expression and aromatase catalytic activity in a concentration-dependent manner in H295R cells, by activating the cAMP/protein kinase A signalling pathway (Sanderson *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2001). We also demonstrated that thiacloprid and thiamethoxam, at environmentally-relevant concentrations (0.1-10  $\mu$ M) (Goulson, 2013), induce PII/I.3-mediated *CYP19* expression and aromatase catalytic activity, but unlike atrazine, the neonicotinoids produced biphasic or non-monotonic concentration-response curves. In H295R cells exposed to 0.1 and 0.3  $\mu$ M thiamethoxam, PII/I.3-mediated *CYP19* expression was strongly increased, up to 15-fold compared to control. In

H295R cells exposed to 0.3  $\mu\text{M}$  thiacloprid a strong increase in mRNA levels of the *CYP19* coding region was also observed, whereas the effect on PII/I.3-derived transcript levels was weaker. This suggests the possible presence of other aromatase promoters in H295R cells. In our study, we also determined the effects of atrazine and neonicotinoid pesticides on aromatase catalytic activity, which as functional endpoint is more physiologically relevant than changes in mRNA levels. We found that the changes in mRNA expression corresponded with similar changes in enzyme activity in H295R cells exposed to atrazine, thiacloprid and thiamethoxam; imidacloprid had no effect on either endpoint. To our knowledge, we are the first to assess the endocrine disrupting effects of neonicotinoids related to the promoter-specific regulations of *CYP19* expression and aromatase activity (Caron-Beaudoin *et al.*, 2016). Since aromatase is overexpressed in hormone-dependent breast cancer by a unique *CYP19* promoter usage which contributes greatly to the overproduction of estrogens in the tumor microenvironment, these results highlight the need to further investigate the endocrine-disrupting potential of neonicotinoids, to which we may be exposed chronically at relatively low concentrations.

The biphasic or non-monotonic responses that we observed with the neonicotinoids are not uncommon in toxicological studies. A good example of a biphasic concentration-response effect is typified by the action of bisphenol A, which binds to the estrogen receptor at lower concentrations, but will also bind to the androgen receptor at higher ones (Sohoni *et al.*, 1998). The mechanisms by which neonicotinoids selectively stimulate specific *CYP19* promoters remain unknown and are currently under our investigation. Differential intracellular signalling factors that regulate *CYP19* expression are likely targeted by the neonicotinoids. As example, increased intracellular levels of cAMP are required to phosphorylate cAMP-response element-binding protein (CREB), which can then bind to cAMP-response elements (CREs) located in the



regulatory regions of several genes involved in steroidogenesis, such as the mitochondrial steroidogenic acute regulatory protein (StAR) (Manna *et al.*, 2002). StAR is a transport protein that facilitates entry of cholesterol into the mitochondria, an essential first step in the initiation of all steroidogenesis (Lin *et al.*, 1995). The regulatory region of these CREB-responsive genes may also contain GATA-responsive elements, and phosphorylation of GATA factors such as GATA-4 may also be induced by intracellular cAMP levels, thus further enhancing the activation of factors that promote steroidogenesis (Tremblay *et al.*, 2003a).

In hormone-dependent breast cancer, the overproduction of estrogen is associated with an inhibition of normal I.4 promoter and an overexpression of PII, I.3 and I.7 *CYP19* promoters in the stroma surrounding the epithelial tumor cells. We are currently working on a novel *in vitro* breast cancer model that allows us to determine this unique *CYP19* promoter-switch. Our preliminary results in this cell-based model indicate that environmentally-relevant concentrations of imidacloprid and thiacloprid induce this *CYP19* promoter-switch and result in elevated aromatase catalytic activity. We are also developing a co-culture model by placing this 'promoter-switch capable' cell system in close communication with estrogen-responsive breast cancer cells to reproduce the typical microenvironment of an estrogen-dependent breast tumor. In this co-culture model we will be able to assess the effects of neonicotinoid pesticides on estrogen biosynthesis and promoter-specific *CYP19* expression as well as on other tumor promoting (growth and inflammatory) factors within a physiologically relevant tumor microenvironment. Similar co-cultures have been developed to mimic the tumor microenvironment and cellular interactions between fibroblasts and cancer epithelial cells (Heneweer *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2015), although these models have as draw back that they require freshly isolated human fibroblast or use normal cell lines that propagate more slowly. It

has also never been demonstrated whether these co-culture models are capable of undergoing a *CYP19* promoter-switch in response to chemical exposures.

In conclusion, atrazine and certain neonicotinoid insecticides exert endocrine disrupting effects *in vitro* by altering the promoter/tissue-specific expression of *CYP19* and its catalytic aromatase activity. Our novel *in vitro* screening tools will help in assessing the risk that certain chemicals may pose by causing tissue-specific disruption of estrogen biosynthesis, which is of particularly importance to women's health.

### **A1.5 Conflicting interests**

The authors have declared to have no financial conflicts of interests.

### **A1.6 Acknowledgments**

Financial support for this study was provided by the California Breast Cancer Research Foundation (CBCRF; grant no. 17UB-8703) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; grant no. 313313-2012). ECB was the recipient of a scholarship from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) and the Fondation universitaire Armand-Frappier INRS.

### **A1.7 References**

1. Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, Cancer Statistics Toronto, ON: Canadian Cancer Society, 2015.
2. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 2009; 457:219-223.

3. Bulun SE, Chen D, Lu M, Zhao H, Cheng Y, Demura M, et al. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 106:81-96.
4. Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H, Bulun SE. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett* 2009; 273:15-27.
5. Cirri P and Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Rev* 2011; 31:195-208.
6. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. 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* 1996; 137:5739-5742.
7. Meng L, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM, Bulun SE. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin 11 Secreted by Malignant Breast Epithelial Cells Inhibit Adipocyte Differentiation by Selectively Down-Regulating CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$  and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ : Mechanism of Desmoplastic Reaction. *Cancer Res* 2001; 61:2250-2255.
8. Birnbaum LS, Fenton SE. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 2003; 111:389-394.
9. Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J, Dewailly E. Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis. *Am J Epidemiol* 2002; 155:629-635.
10. Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 2009; 117:1053-1058.
11. Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, Balaguer P, Rahmani R. Activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci* 2006; 79:1160-1169.
12. Caron-Beaudoin É, Denison MS, Sanderson JT. Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase (CYP19) in Human Adrenocortical Carcinoma (H295R) and Primary Umbilical Vein Endothelial (HUVEC) Cells. *Toxicol Sci* 2016; 149:134-144.

13. Thibeault AAH, Deroy K, Vaillancourt C, Sanderson JT. A Unique Co-culture Model for Fundamental and Applied Studies of Human Fetoplacental Steroidogenesis and Interference by Environmental Chemicals. *Environ Health Perspect* 2014; 122:371-377.
14. Sanderson JT, Seinen W, Giesy JP, Van den Berg M. 2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity? *Toxicol Sci* 2000; 54:21-127.
15. Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, Van den Berg M. 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* 2001; 109:1027-1031.
16. Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GWA, Van den Berg M. Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 182:44-54.
17. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:573-580.
18. Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, et al. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem Funct* 2012; 30:492-499.
19. Kapoor U, Srivastava MK, Srivastava LP. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:3086-3089.
20. Goulson D. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J Appl Ecol* 2013; 50:977-987.
21. Chen M, Tao L, McLean J, Lu C. Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *J Agric Food Chem* 2014; 62:6082-6090.
22. OECD. Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2011; Paris: OECD Publishing.
23. Sanderson JT. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicol Sci* 2006; 94:3-21.

24. Sanderson JT. Adrenocortical toxicology in vitro: assessment of steroidogenic enzyme expression and steroid production in H295R cells. *Adrenal Toxicology* 2009; 26:175-182.
25. Gracia T, Hilscherova K, Jones PD, Newsted JL, Zhang X, Hecker M, et al. The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; 65:293-305.
26. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 2009; 55:611-622.
27. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 2010; 50:S1-S5.
28. Sohoni P, Sumpter J. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 1998; 158:327-339.
29. Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, et al. Regulation of Steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory Protein by a Member of the cAMP Response-Element Binding Protein Family. *Mol Endocrinol* 2002; 16:184-199.
30. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, et al. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995; 267:1828-1831.
31. Tremblay JJ, Viger RS. Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85:291-298.
32. Heneweer M, Muusse M, Dingemans M, De Jong PC, Van den Berg M, Sanderson JT. Co-culture of Primary Human Mammary Fibroblasts and MCF-7 Cells as an In Vitro Breast Cancer Model. *Toxicol Sci* 2005; 83:257-263.
33. Wang X, Sang X, Diorio C, Lin SX, Doillon CJ. In vitro interactions between mammary fibroblasts (Hs 578Bst) and cancer epithelial cells (MCF-7) modulate aromatase, steroid sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 412:339-348.

34. Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC, Zhao H. Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23:83-89.
35. Krishnan AV, Swami S, Feldman D. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 2012; 77:1107-1112.

## **Annexe 2 : Effets de trois néonicotinoïdes sur l'activité du promoteur I.4 de l'aromatase (CYP19) dans des cellules d'adénocarcinomes du sein (SKBR3) transfectées avec un gène rapporteur de luciférase**

Lors de ce doctorat, l'étudiante a travaillé sur un projet connexe qui avait pour objectif l'utilisation d'un système de gène rapporteur de luciférase afin de mesurer l'activité du promoteur I.4 de l'aromatase dans une lignée cellulaire de cancer du sein SKBR3. Ces résultats ont été présentés lors de congrès scientifiques et sont présentés ici.

### **A2.1 Contribution de l'étudiante**

Pour ce travail, l'étudiante a reçu les cellules transfectées en provenance du laboratoire de Dr. Denison de l'Université de Californie à Davis. L'étudiante a procédé à toutes les expérimentations de culture cellulaire ainsi que de mesure de l'activité du promoteur I.4 via la mesure de la luciférase.

## A2.2 Introduction

Au Canada, 26% des diagnostics de cancer sont attribués aux différents types de cancers du sein (Statistics, 2015). De ce nombre, environ 70% des cancers du sein sont hormono-dépendants. L'exposition à certains perturbateurs endocriniens comme facteur de risque du cancer du sein hormono-dépendant est une hypothèse largement acceptée par la communauté scientifique (Birnbaum *et al.*, 2003, Demers *et al.*, 2002). Les perturbateurs endocriniens peuvent agir selon différents mécanismes, en interférant avec la synthèse, le transport, le métabolisme ou la liaison avec les récepteurs d'hormones naturelles. En ce qui concerne les composés œstrogéniques, beaucoup d'études se sont penchés sur l'effet de ces perturbateurs endocriniens via leur action sur le récepteur aux œstrogènes. Cependant, l'aromatase, enzyme clé de la synthèse des œstrogènes et exprimée de façon promoteur et tissu spécifique (Sebastian *et al.*, 2001), est également une cible potentielle des perturbateurs endocriniens. Notamment, il a été démontré que l'atrazine, un herbicide couramment utilisé, augmentait l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase ainsi que la production de 17 $\beta$ -œstradiol dans plusieurs lignées cellulaires humaines (Fan *et al.*, 2007b, Sanderson *et al.*, 2001).

Lors du développement d'un cancer du sein hormono-dépendant, l'expression de l'aromatase se voit augmentée par un processus de changement d'utilisation des promoteurs (Bulun *et al.*, 2005, Bulun *et al.*, 2003, Santner *et al.*, 1997). Précisément, le promoteur I.4 normalement activé dans le tissu adipeux est inhibé, alors que des promoteurs actifs dans les ovaires et les vaisseaux sanguins (PII, I.3 et I.7) sont alors activés dans les fibroblastes de la glande mammaire (Irahara *et al.*, 2006). Peu d'outils existent pour mesurer l'effet de contaminants environnementaux sur l'expression promoteur-spécifique de l'aromatase. Dans cet esprit, le laboratoire du Dr. Denison situé à l'Université de Californie à Davis a mis au point une lignée cellulaire de cancer du sein



(SKBR3) transfectée de façon stable avec un gène rapporteur de luciférase sous le contrôle de la séquence du promoteur I.4 de l'aromatase. Puisque mesurer la lumière émise dans une lignée cellulaire transfectée stable est une méthode simple, tant au niveau de la culture cellulaire que de la mesure de la luciférase, cet outil fut testé au laboratoire afin de déterminer l'effet de l'atrazine et de trois néonicotinoïdes sur l'activité de ce promoteur clé de l'aromatase.

### **A2.3 Matériels et méthodes**

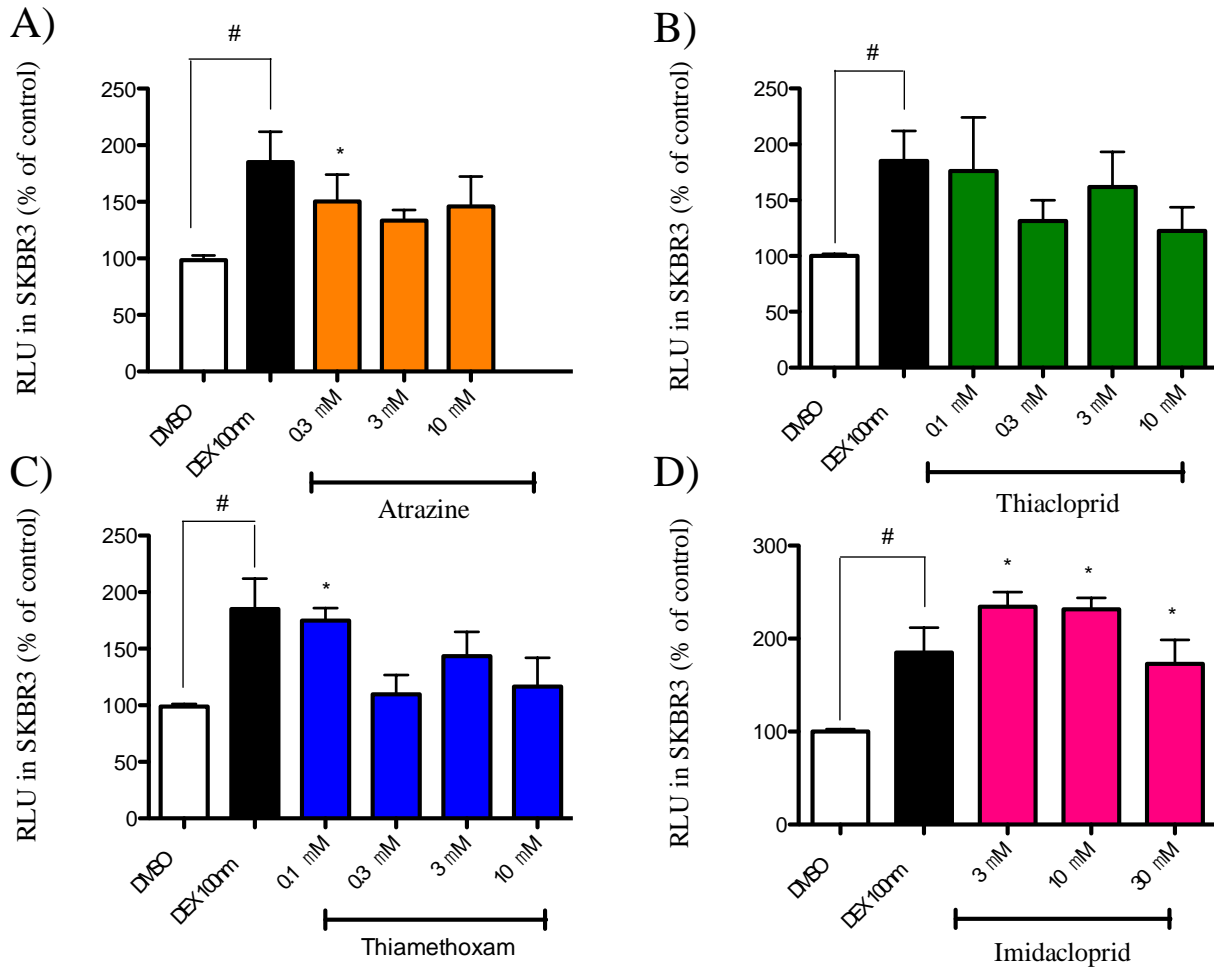
Les cellules SKBR3 ont été transfectées de façon stable avec un gène rapporteur de luciférase sous le contrôle du promoteur I.4 de l'aromatase (laboratoire de Dr. Denison). Les cellules ont été mises en culture dans un milieu Dulbecco's modified eagle avec glucose (Cat. 11965092, Life Technologies, CA, USA) contenant les ingrédients suivants : 10% sérum fœtal bovin, 400 µg/mL d'antibiotique généticine (G418) (Cat. 10131035, Life Technologies, CA, USA). À 80% de confluence, les cellules ont été mises en culture dans des plaques 24 puits à une concentration de 200 000 cellules/puits pendant 24 heures. Par la suite, le milieu a été jeté et les cellules ont été nettoyées avec 500 µL de PBS 1X. 1mL de milieu (sans rouge de phenol) contenant différentes concentrations de pesticides a été ajouté et les cellules y ont été exposées pendant 18 heures. Le dexaméthasone (100 nM) a été utilisé comme contrôle positif de l'induction de l'activité du promoteur I.4. Les cellules exposées à 0.1% DMSO ont été utilisées comme contrôle négatif.

Pour mesurer l'activité du promoteur I.4 dans les cellules SKBR3 transfectées, le test de mesure de la luciférase a été utilisé selon les indications de la compagnie (Cat. E1500, Promega, WI, USA). Brièvement, après la période d'exposition, le milieu de culture a été jeté et les cellules ont été rincées avec 500 µL de PBS 1X. Le PBS a également été jeté, puis 200 µL de tampon de lyse cellulaire (Cat. E153A, Promega, WI, USA) dilué à 1X avec de l'eau ultra pure a été ajouté dans

chaque puits. Les cellules ont été décollées avec un outil stérile, et le lysat cellulaire de chaque traitement a été transféré dans un microtube. Les microtubes ont été centrifugés brièvement à 500g pendant 2:30 minutes, puis les surnageants ont été transférés dans de nouveaux microtubes. À la noirceur, 20 µL de chaque surnageant a été ajouté en duplicat dans un plaque blanche de 96 puits. Dans chaque puits, 100 µL du réactif de luciférase a été ajouté et la lumière produite a immédiatement été mesurée en utilisant un luminomètre (SpectroMax M5; Sunnydale, CA).

Les résultats, exprimés en Relative Light Units (RLU), ont été transformés en pourcentage par rapport au contrôle 0.1% DMSO. Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel JMP (SAS, Toronto, ON). Les résultats sont présentés en moyennes avec leur erreur standard, et chaque expérimentation a été faite trois fois en utilisant des passages cellulaires différents. Par expérimentation, chaque traitement a été testé en duplicata. Les différences statistiquement significatives par rapport au contrôle (\* $p < 0.05$ ) ont été déterminées par test de Student ou analyse de variance ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett. La distribution normale des résidus et l'homoscédasticité des variances ont été vérifiées pour chaque analyse.

## A2.4 Résultats



**Figure A2-1 : Effet de A) l'atrazine (0.3, 3, 10 μM), B) le thiaclopride (0.1, 0.3, 3, 10 μM), C) le thiaméthoxame (0.1, 0.3, 3, 10 μM) and D) imidaclopride (0.3, 3, 30 μM) sur l'activité de la luciférase dans des cellules SKBR3 transfectées avec un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur I.4 de l'aromatase**

Le dexaméthasone (DEX) (100nM) a été utilisé comme contrôle positif de l'induction du promoteur I.4. (#) Une différence significative entre DEX et DMSO ; test de t ;  $p < 0.05$  (\*) Une différence significative entre traitement aux pesticides et DMSO ; test post-hoc de Dunnett ;  $p < 0.05$  ; Les analyses statistiques ont été faites sur les données transformées en log. Les expérimentations ont été faites trois fois en utilisant des passages cellulaires différents, ainsi qu'en triplicata technique.

Le dexaméthasone à 100 nM a significativement augmenté l'activité du promoteur de l'aromatase I.4 d'environ 2 fois par rapport au contrôle DMSO dans ce système de gène

rapporteur (Fig A2-1A-D). Ce résultat était attendu puisque le promoteur I.4 de l'aromatase contient un élément de réponse au glucocorticoïdes (GREs) qui régule l'expression de *CYP19* (Zhao *et al.*, 1995). L'exposition à l'atrazine a provoqué une augmentation de l'expression de *CYP19* via le promoteur I.4 mesurée via l'activité de la luciférase d'environ 1.5 fois par rapport au contrôle et ce, à toutes les concentrations testées (Fig A2-1A). Le thiaclopride n'a pas eu d'effets sur l'activité du promoteur I.4 (Fig A2-1B). Le thiaméthoxame, quant à lui, a significativement augmenté l'activité de la luciférase dans les cellules SKBR3 transfectées avec un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur I.4 de *CYP19*, d'environ 1.5 fois par rapport au contrôle (DMSO 0.1%) (Fig A2-1C). Finalement, les cellules SKBR3 transfectées exposées à l'imidaclopride ont démontré la plus grande induction de l'activité de la luciférase sous le contrôle du promoteur I.4, de 2.3 et 1.9 fois par rapport au contrôle (DMSO 0.1%) aux concentrations de 3 et 10  $\mu$ M, respectivement (Fig A2-1D).

## **A2.5 Discussion**

Dans les fibroblastes du tissu mammaire sain, l'aromatase est exprimée faiblement via l'activité du promoteur I.4, assurant une activité catalytique basale de l'enzyme et peu de synthèse d'œstrogènes dans la glande mammaire (Bulun *et al.*, 2005). Le promoteur I.4 est normalement actif dans la peau et le tissu adipeux (Bulun *et al.*, 2003) et est caractérisé par la présence d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) (Zhao *et al.*, 1995). Dans le cas du cancer du sein hormono-dépendant, les cellules cancéreuses épithéliales produisent une variété de cytokines (incluant IL-11 et TNF $\alpha$ ), inhibant la maturation normale des fibroblastes en adipocytes (Meng *et al.*, 2001). Ce phénomène est appelé la réaction desmoplastique, et est également caractérisé par un changement d'utilisation des promoteurs de *CYP19* dans les

fibroblastes. En effet, le promoteur normal I.4 se voit inhibé, et trois promoteurs normalement inactifs dans la glande mammaire sont activés (PII, I.3 et I.7) (Agarwal *et al.*, 1996, Subbaramaiah *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2005) (Chapitre 4). Par ailleurs, nous avons développé un outil démontrant que ce changement d'utilisation des promoteurs, pouvait également être induit par une exposition à de relativement faibles concentrations de thiaclopride et thiaméthoxame dans un modèle *in vitro* de cellules de cancer du sein Hs578t, démontrant un profil d'expression de l'aromatase très similaire à ce que nous retrouvons normalement dans les fibroblastes (Chapitre 4).

Or, nous ne pouvons observer le même comportement d'activité du promoteur I.4 dans ce modèle de cellules SKBR3 transfectées avec un gène rapporteur de luciférase. En effet, l'exposition au thiaclopride et thiaméthoxame a augmenté l'activité du promoteur I.4, alors que l'expression de *CYP19* via ce même promoteur était fortement inhibée dans les cellules non transfectées Hs578t. Les cellules Hs578t reflètent de façon plus adéquate l'expression réelle de l'aromatase, ainsi que l'utilisation des promoteurs puisqu'au moins quatre de ces derniers sont actifs dans cette lignée cellulaire. En effet, il semble que la dynamique entre les promoteurs soit d'une importance certaine afin d'expliquer l'expression de l'exon codant de l'aromatase et son activité catalytique. De plus, dans les cellules transfectées SKBR3, nous nous attendions à ce que l'activité du promoteur I.4 soit beaucoup plus induite suite au traitement avec le dexaméthasone, tel qu'observé dans notre modèle Hs578t.

Ce manque de réponse au dexaméthasone, ainsi que l'absence des autres régions promotrices dans le gène rapporteur, soulignent les limitations importantes du modèle de cellules SKBR3 transfectées présenté ici.

## A2.6 Références

- Agarwal A, Gupta S & Sharma RK (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3:28.
- Birnbaum LS & Fenton SE (2003) Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect* 111(4):389-394.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H & Shozu M (2003) The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86(3-5):219-224.
- Bulun SE, 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. *Pharmacological Reviews* 57(3):359-383.
- Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J & Dewailly E (2002) Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis. *Am J Epidemiol* 155(7):629-635.
- Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R & Nawata H (2007c) Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect* 115(5):720-727.
- Meng L, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM & Bulun SE (2001) Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin 11 Secreted by Malignant Breast Epithelial Cells Inhibit Adipocyte Differentiation by Selectively Down-Regulating CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$  and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ : Mechanism of Desmoplastic Reaction. *Cancer Research* 61(5):2250-2255.
- Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP & van den Berg M (2001) Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ Health Perspect* 109(10):1027-1031.
- Santner SJ, Pauley RJ, Tait L, Kasetta J & Santen RJ (1997) Aromatase Activity and Expression

- in Breast Cancer and Benign Breast Tissue Stromal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82(1):200-208.
- Sebastian S & Bulun SE (2001) A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10):4600-4602.
- Subbaramaiah K, Morris PG, Zhou XK, Morrow M, Du B, Giri D, Kopelovich L, Hudis CA & Dannenberg AJ (2012) Increased Levels of COX-2 and Prostaglandin E2 Contribute to Elevated Aromatase Expression in Inflamed Breast Tissue of Obese Women. *Cancer Discovery* 2(4):356-365.
- Zhao Y, Mendelson CR & Simpson ER (1995) Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Molecular Endocrinology* 9(3):340-349.
- Zhou D, Zhou C & Chen S (1997) Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61(3-6):273-280.
- Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, Sasano H & Clyne CD (2005) Interactions between Prostaglandin E2, Liver Receptor Homologue-1, and Aromatase in Breast Cancer. *Cancer Research* 65(2):657-663.

### **Annexe 3 : Effets du glyphosate et de la formulation Roundup sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle de co-culture de l'unité fœto-placentaire**

Lors de ce doctorat, l'étudiante a travaillé sur un projet connexe dont l'objectif était de comparer les effets du glyphosate seul versus la formulation commerciale Roundup sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans un modèle de co-culture fœto-placentaire. Ces résultats ont été présentés le 10 février 2017 lors du Grand Débat sur la Stratégie québécoise sur les pesticides 2015-2018 : pour une approche écosanté des enjeux, impacts et défis, organisé par le Collectif de recherche écosanté sur les pesticides, les politiques et les alternatives (CREPPA).

#### **A3.1 Contribution de l'étudiante**

Pour ce travail, l'étudiante a reçu le glyphosate pur ainsi que la formulation commerciale Roundup gracieusement du professeur Gilles-Éric Serralini de l'Université de Caen. L'étudiante a procédé à toutes les expérimentations de co-culture cellulaire ainsi que de mesure de l'activité catalytique de l'aromatase et la mesure des hormones produites.



### A3.2 Introduction

Les perturbateurs endocriniens sont des substances, naturelles ou synthétiques, qui ont la capacité de perturber la synthèse, le transport, le métabolisme ou encore l'excrétion des hormones naturelles. Les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens sont nombreux, et la perturbation de l'expression et de l'activité catalytique de l'aromatase en fait partie. La perturbation hormonale est à l'origine de plusieurs pathologies, et certaines études épidémiologiques ont démontré des associations entre une exposition à des pesticides et le développement du diabète ou de certains cancers (Alavanja *et al.*, 2003, Beard *et al.*, 2006, Beard *et al.*, 2003, Blair *et al.*, 1992, FIGA-TALAMANCA *et al.*, 1993, Littorin *et al.*, 1993).

Les herbicides à base de glyphosate, commercialisés par la multinationale Monsanto, sont vendus aux agriculteurs depuis 1974. Ils sont composés de l'ingrédient « actif », le glyphosate, et d'adjuvants. Entre autres, ce type d'herbicide, commercialisé sous le nom de Roundup, est associé avec la technologie des organismes génétiquement modifiés (OGM). Les semences Roundup Ready sont conçues pour résister à l'application de l'herbicide à base de glyphosate Roundup, qui peut donc être utilisé dans les champs afin de contrôler les plantes indésirables. Il a été démontré que ces herbicides se retrouvent dans les sources d'eau potable et l'air, en particulier dans les régions agricoles (Myers *et al.*, 2016).

La régulation entourant l'utilisation des herbicides à base de glyphosate est basée sur les effets toxiques de l'ingrédient actif seulement, alors que plusieurs études indépendantes ont démontré que les adjuvants, dont le rôle est entre autres d'augmenter la stabilité de l'ingrédient actif et la perméabilité des cellules, sont loin d'être inertes (Mesnage *et al.*, 2013). Par exemple, il a été démontré que la formulation Roundup présentait des effets plus importants sur l'expression de

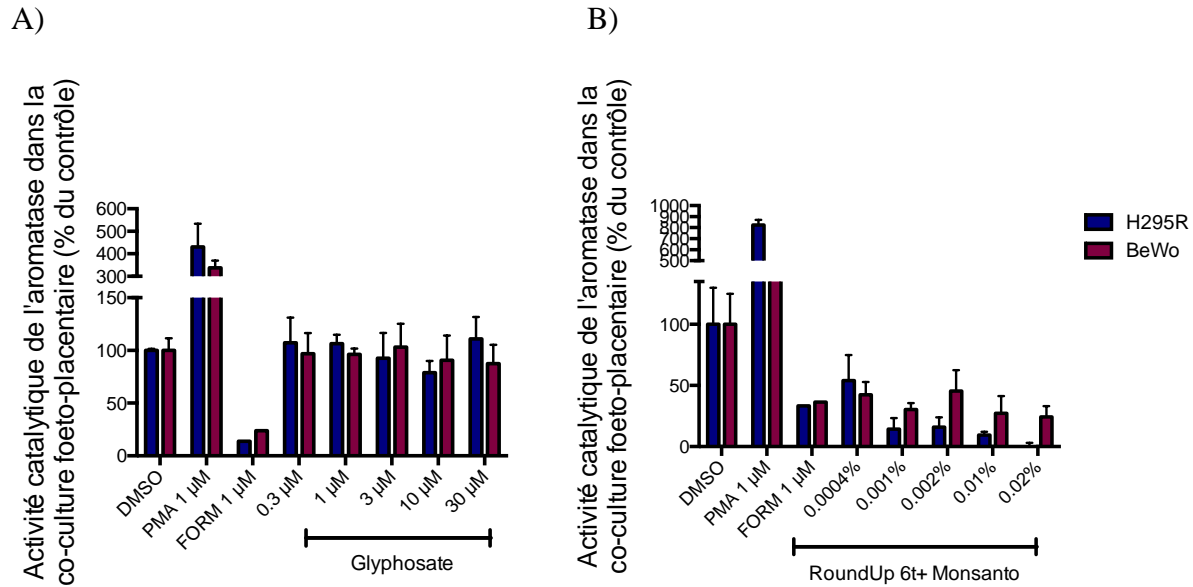
l'aromatase que le glyphosate seul dans des cellules placentaires JEG3. Plus précisément, une exposition de ces cellules au Roundup diminuait l'activité de l'aromatase, alors que la synthèse d'œstrogènes était augmentée d'environ 40% (Richard *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont également été démontrés dans des cellules primaires de placenta humain (Benachour *et al.*, 2007) ainsi que dans des cellules de foie HepG2 (Gasnier *et al.*, 2009).

### **A3.3 Matériels et méthodes**

Les détails méthodologiques de la culture du modèle de co-culture fœto-placentaire, de la mesure de l'activité catalytique de l'aromatase dans les deux compartiments (H295R et BeWo) ainsi que de la mesure des hormones produites sont présentés au chapitre 3, sections 3.5.2, 3.5.3 et 3.5.4, respectivement.

Après une période d'acclimatation de 24h, la co-culture a été exposée à des concentrations croissantes de glyphosate seul (0,3 à 30  $\mu\text{M}$ ) ou de la formulation commerciale Roundup (0,0004 à 0,02%) diluée dans le milieu de co-culture. La co-culture a également été exposée au DMSO 0,1% comme contrôle négatif, ainsi qu'au PMA 1  $\mu\text{M}$  et formestane 1  $\mu\text{M}$  en tant que contrôles positif et négatif de l'activité catalytique de l'aromatase. Toutes les expositions étaient d'une durée de 24h.

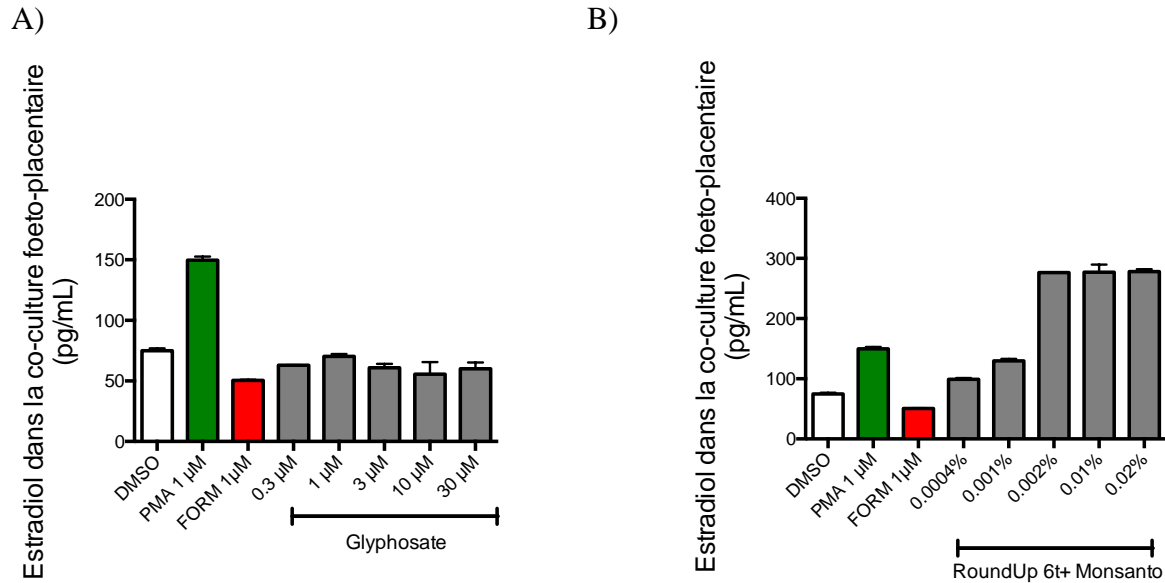
### A3.4 Résultats



**Figure A3-1 : Effet du A) glyphosate seul (0.3, 1, 3, 10, 30 µM), et du B) Roundup (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) sur l'activité catalytique de l'aromatase dans les cellules H295R et BeWo en co-culture**

Le PMA (1 µM) et le formestane (FORM) (1 µM) ont été utilisés comme contrôle positif et négatif de l'activité de l'aromatase, respectivement. Les résultats sont représentés selon la moyenne ± l'erreur standard des triplicatas techniques. N=1.

L'activité catalytique de l'aromatase dans les cellules H295R et BeWo en co-culture n'a pas été perturbée par une exposition de 24h à des concentrations croissantes de glyphosate seul (Fig A3-1 A). Cependant, l'activité catalytique de l'aromatase a été inhibée dans les deux compartiments de la co-culture suite à une exposition au Roundup (Fig A3-1 B).

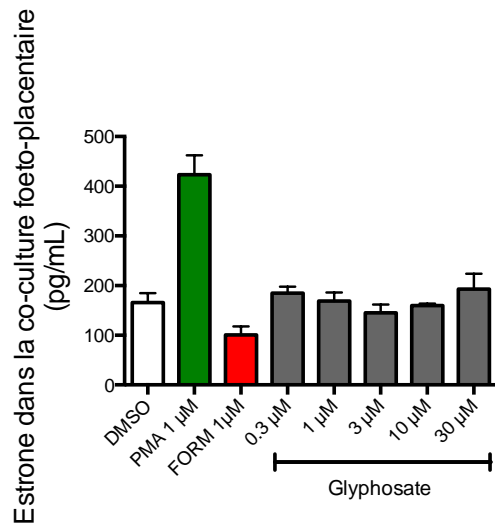


**Figure A3-2 : Effet du A) glyphosate seul (0.3, 1, 3, 10, 30 µM), et du B) Roundup (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) sur la production de 17β-œstradiol par la co-culture fœto-placentaire**

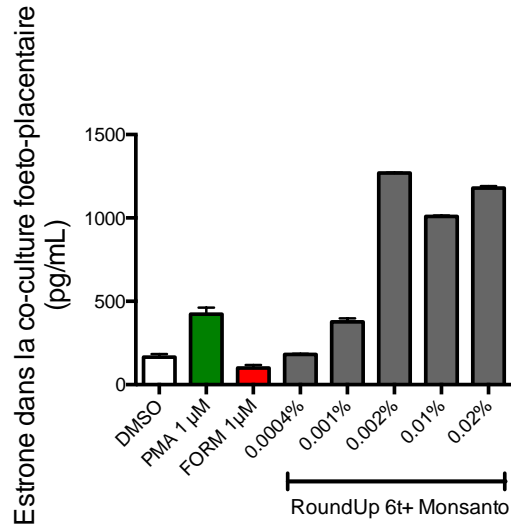
Le PMA (1 µM) et le formestane (FORM) (1 µM) ont été utilisés comme contrôle positif et négatif de la production de 17β-œstradiol, respectivement. Les résultats sont représentés selon la moyenne ± l'erreur standard des triplicatas techniques. N=1.

La production de 17β-œstradiol dans la co-culture fœto-placentaire formée des cellules H295R et BeWo n'a pas été modifiée comparativement au contrôle (0.1% DMSO) par une exposition de 24h à des concentrations croissantes de glyphosate seul (Fig A3-2 A). Cependant, la synthèse de 17β-œstradiol a été augmentée dans la co-culture suite à une exposition au Roundup (Fig A3-2 B).

A)



B)

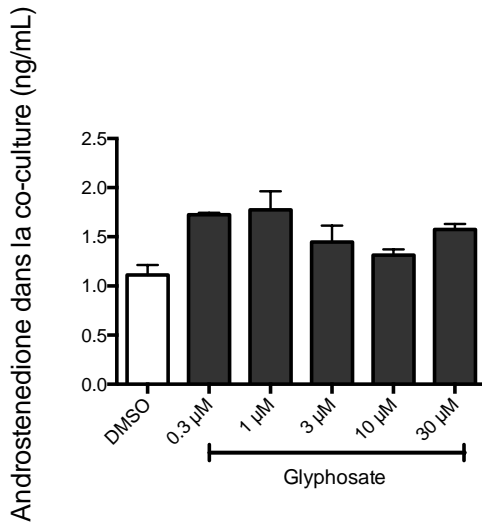


**Figure A3-3 : Effet du A) glyphosate seul (0.3, 1, 3, 10, 30 µM), et du B) Roundup (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) sur la production d'œstrone par la co-culture fœto-placentaire**

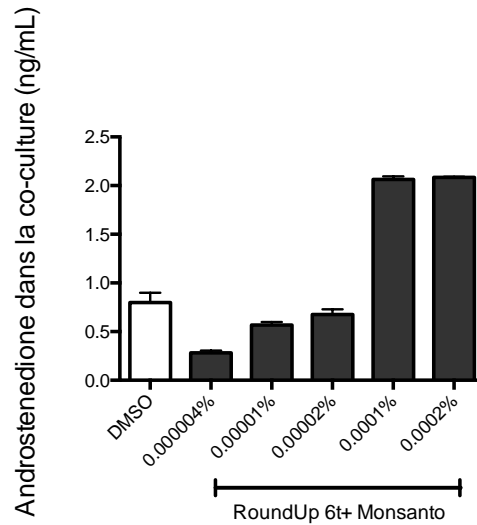
Le PMA (1 µM) et le formestane (FORM) (1 µM) ont été utilisés comme contrôle positif et négatif de la production d'œstrone, respectivement. Les résultats sont représentés selon la moyenne ± l'erreur standard des triplicatas techniques. N=1.

La production d'œstrone dans la co-culture fœto-placentaire formée des cellules H295R et BeWo n'a pas été modifiée comparativement au contrôle (0.1% DMSO) par une exposition de 24h à des concentrations croissantes de glyphosate seul (Fig A3-3 A). Cependant, la synthèse d'œstrone a été augmentée dans la co-culture suite à une exposition au Roundup (Fig A3-3 B).

A)



B)



**Figure A3-4 : Effet du A) glyphosate seul (0.3, 1, 3, 10, 30 µM), et du B) Roundup (0.004, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02%) sur la production d'androsténedione par la co-culture fœto-placentaire**

Les résultats sont représentés selon la moyenne  $\pm$  l'erreur standard des triplicatas techniques. N=1.

La production d'androsténedione dans la co-culture fœto-placentaire formée des cellules H295R et BeWo n'a pas été modifiée comparativement au contrôle (0.1% DMSO) par une exposition de 24h à des concentrations croissantes de glyphosate seul (Fig A3-4 A). Cependant, la synthèse d'androsténedione a été augmentée dans la co-culture suite à une exposition au Roundup (Fig A3-4 B).

### A3.5 Discussion

Les résultats préliminaires présentés dans l'annexe 3 semblent démontrer l'absence de toxicité du glyphosate seul, alors que la formulation commerciale Roundup s'est avérée être un perturbateur de l'activité de l'aromatase et de la production hormonale dans ce modèle de co-culture fœto-placentaire. En effet, il est possible de constater que l'activité de l'aromatase a été inhibée dans

les deux compartiments de la co-culture suite à une exposition de 24h à des concentrations faibles de Roundup (Fig A3-1B), alors qu'une exposition au glyphosate seul n'a pas engendré les mêmes effets (Fig A3-1A). De plus, dans la co-culture fœto-placentaire exposée au Roundup, la production d'androsténone, précurseur important des œstrogènes, s'est vue augmentée (Fig A3-4B), expliquant potentiellement l'augmentation de la production de  $17\beta$ -œstradiol (Fig A3-2B) et d'œstrone (Fig A3-3B) observée dans les mêmes conditions expérimentales. Il est à noter que ces effets n'ont pas été observés dans la co-culture fœto-placentaire exposée au glyphosate seul. Ces observations préliminaires confirment ce qui a été précédemment publié dans la littérature, entre autres par l'équipe de Richard et collègues (2005). Dans cette étude, la production d'œstrogène par des cellules placentaire JEG3 a été induite de 40% alors que l'activité et l'expression de l'aromatase était inhibée suite à une exposition de 18h au Roundup. L'inhibition de l'aromatase était précédée par une augmentation de son activité lors de la première heure d'exposition au Roundup. L'hypothèse des auteurs afin d'expliquer ce phénomène est que l'augmentation de la perméabilité cellulaire causée par les adjuvants du Roundup augmenterait la disponibilité des précurseurs de l'aromatase (ex : androsténone), augmentant ainsi l'activité catalytique de l'enzyme. Par contre, une fois entièrement dans les cellules, le Roundup diminue l'expression et l'activité de l'enzyme. La perméabilisation des membranes cellulaires pourrait donc également être une explication pour l'augmentation des concentrations de  $17\beta$ -œstradiol et d'œstrone observée dans la présente étude.

Un nombre grandissant d'étude se sont penchées sur les effets délétères des herbicides à base de glyphosate, et ont démontré que les herbicides à base de glyphosate comme le Roundup perturbaient l'expression ou l'activité de l'aromatase, alors que ce phénomène n'était pas ou peu

observé avec le glyphosate seul (Benachour *et al.*, 2007, Defarge *et al.*, 2016, Gasnier *et al.*, 2009).

À la lumière de ces résultats préliminaires, il n'est toutefois pas possible d'affirmer que le Roundup perturbe l'activité de l'aromatase et la production hormonale. Ces expérimentations devront être répétées afin de confirmer ces observations préliminaires. Les perspectives de ce projet sont multiples, et il serait intéressant d'investiguer l'impact du glyphosate seul et de ses formulations commerciales sur l'expression de la protéine StAR, responsable du transfert du cholestérol dans les mitochondries. Walsh et collègues (2000) ont démontré qu'une exposition de cellules de Leydig au Roundup causait une inhibition dramatique de 90% de l'expression de StAR (Walsh *et al.*, 2000). Il serait aussi pertinent de vérifier l'effet des adjuvants seuls sur l'activité catalytique de l'aromatase et la production hormonale dans ce modèle de co-culture fœto-placentaire, afin de discriminer les effets du glyphosate seul pour être en mesure d'évaluer l'impact des adjuvants dits « inertes ». Or, les adjuvants sont classés comme informations commerciales à caractère confidentiel, ce qui rend leur identification et évaluation ardue. Les résultats préliminaires présentés dans cette annexe, ainsi que l'ensemble de la littérature à ce sujet, confrontent la présomption des ingrédients « actifs » et « inertes » sur laquelle la régulation actuelle est basée. En effet, les données disponibles sur les effets du glyphosate versus les formulations avec adjuvants démontrent que les doses journalières admissibles pour cette classe de pesticides ne sont peut-être pas basées sur des données toxicologiques pertinentes.



### A3.6 Références

- Alavanja MC, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, Knott C, Thomas K, Hoppin JA & Barker J (2003) Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *American journal of epidemiology* 157(9):800-814.
- Beard J, Sladden T, Morgan G, Berry G, Brooks L & McMichael A (2003) Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. *Environmental health perspectives* 111(5):724.
- Beard J & Collaboration ARHR (2006) DDT and human health. *Science of the total environment* 355(1):78-89.
- Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C & Séralini G (2007) Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(1):126-133.
- Blair A, Zahm SH, Pearce NE, Heineman EF & Fraumeni Jr JF (1992) Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scandinavian journal of work, environment & health* :209-215.
- Defarge N, Takács E, Lozano VL, Mesnage R, Spiroux de Vendômois J, Séralini G-E & Székács A (2016) Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International journal of environmental research and public health* 13(3):264.
- FIGA-TALAMANCA I, MEARELLI I, VALENTE P & BASCHERINI S (1993) Cancer mortality in a cohort of rural licensed pesticide users in the province of Rome. *International Journal of Epidemiology* 22(4):579-583.
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon M-C & Séralini G-E (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262(3):184-191.
- Littorin M, Attewell R, Horstmann V & Möller T (1993) Mortality and tumour morbidity among Swedish market gardeners and orchardists. *International archives of occupational and environmental health* 65(3):163-169.
- Mesnage R, Bernay B & Séralini GE (2013) Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313(2):122-128.
- Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP & Mesnage R (2016) Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health* 15(1):19.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N & Seralini G-E (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental health perspectives* 113(6):716.

Walsh LP, McCormick C, Martin C & Stocco DM (2000) Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental health perspectives* 108(8):769.