

EFFET DES PESTICIDES RETROUVÉS DANS L'EAU POTABLE DU QUÉBEC SUR
DEUX VOIES DE SIGNALISATIONS CELLULAIRES

par

Myriam Fauteux

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

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Juin 2017

Le 30 juin 2017

*le jury a accepté le mémoire de Madame Myriam Fauteux
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Luc Gaudreau
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Pedro A. Segura
Codirecteur de recherche
Département de chimie

Professeur Benoît Leblanc
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Pierre-Étienne Jacques
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Puisque l'utilisation des pesticides augmente dans la pratique agricole (Gorse, 2015), il est inévitable que nous allons retrouver ces contaminants dans l'eau de surface qui se trouve à proximité des zones d'épandage. Il est certain que les pesticides ont plusieurs manières d'affecter notre organisme. Cependant, l'effet de ces pesticides sur les différents mécanismes cellulaires est peu étudié. En effet, il est connu que certains pesticides permettent l'activation de gènes régulés par le récepteur à l'hydrocarbure d'aryle (AhR), mais il n'y a peu de documentation par rapport à leur effet sur les dommages à l'ADN. De plus, ces pesticides sont la plupart du temps utilisés en combinaison lors de leur utilisation agricole, mais il n'y a quasiment aucune étude qui est faite sur leurs effets lorsqu'ils sont en combinaison. Ainsi, mon projet de maîtrise se base sur l'hypothèse que certains contaminants présents dans l'environnement ainsi que dans les eaux de surface peuvent, à court et à long terme, perturber deux voies cellulaires, soit celle du récepteur à l'hydrocarbure d'aryle et celle de p53.

Pour la première partie de mon projet, je me suis intéressée principalement aux gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, deux enzymes impliquées dans le métabolisme de ces contaminants environnementaux dont l'expression est régulée par AhR. L'activation de ces deux gènes a été mesurée suite à un traitement avec différents ingrédients actifs seuls à haute concentration ou en combinaison à faible concentration. Nous avons démontré que chacun des ingrédients actifs séparément permettent l'activation d'AhR. En plus, lorsque nous les combinons, nous observons une activation synergique d'AhR pour la plupart des combinaisons. Ainsi, leur effet en combinaison est beaucoup plus grand que celui qu'ils ont lorsqu'ils sont seuls. Nous avons aussi déterminé que les pesticides seuls ainsi que les combinaisons permettaient l'observation de l'interaction croisée entre AhR et le récepteur à l'oestrogène (ER α).

Pour la deuxième partie de mon projet, j'ai vérifié si les pesticides utilisés à haute concentration ainsi que les différentes combinaisons à faible concentration entraînent l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN. Le carbaryl, le linuron et le bromoxynil sont les trois seuls pesticides permettant l'activation de ce point de contrôle à haute concentration. Toutes les combinaisons de pesticides à faibles concentrations ne permettent pas l'activation de ce point de contrôle. Ainsi, tous les pesticides testés à haute concentration permettent l'activation d'AhR, mais seulement certains d'entre eux permettent l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN. Cela montre donc que les pesticides ont plusieurs cibles dans la cellule et que selon le pesticide étudié, les cibles changent.

La dernière partie de mon projet consistait à vérifier l'impact sur AhR des contaminants environnementaux présents dans la rivière Saint-François le 26 septembre 2016 sur AhR. Les contaminants ont été extraits et concentrés avant d'être testés sur des cellules en culture. Les contaminants présents dans l'eau de rivière permettent l'activation d'AhR.

En conclusion, mes études permettent de mieux comprendre l'effet de ces cinq pesticides sur ces deux mécanismes cellulaires. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de comprendre l'ensemble des mécanismes affectés par ces pesticides.

Mots clés : Pesticides, AhR, Cancer du sein, p53, dommage à l'ADN

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier Luc Gaudreau pour m'avoir acceptée dans son laboratoire pour que je puisse y faire ma maîtrise et poursuivre le projet que j'avais commencé en stage. Dans le cadre de ma maîtrise, il m'a offert plein d'opportunités que j'ai toutes appréciées. L'une d'entre elles a été de m'impliquer dans le projet des contaminants environnementaux où j'ai pu collaborer avec des personnes de la faculté de Génie et du département de chimie.

De plus, j'aimerais remercier Pedro Segura pour m'avoir permis d'ajouter un côté chimie analytique à mon projet. Il a su répondre à toutes mes interrogations et me guider lors de mon apprentissage. J'aimerais aussi remercier Benoit Leblanc pour ses conseils, les discussions toujours très intéressantes sur l'heure du dîner ainsi que ses figures qui figurent dans ce mémoire.

Je voudrais remercier Manon Dufresne pour tout le travail qu'elle a fait pour nous en s'occupant des cellules ainsi que pour tous ses conseils sur la culture cellulaire.

Finalement, je dois aussi remercier tous les membres actuels et anciens du laboratoire. Merci à Anahita pour toute ton aide et tes réponses qui m'ont beaucoup aidée. Un merci tout spécial à Sandra, ma voisine de paillasse et coéquipière dans le projet sur les pesticides, pour tout le support apporté, mais aussi les moments de rigolades après toutes nos heures de culture cellulaire. Merci à Joannie, Hannah, Inès et Kathy pour l'aide, mais surtout pour tous les moments de folie avec une petite bière!

TABLE DES MATIERES

Sommaire.....	iv
Remerciements	vi
Table des matières	vii
Liste des abréviations	x
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Chapitre 1	13
Introduction générale.....	13
1.1 Les pesticides	13
1.1.1 Règlementation	14
1.1.2 Utilisation agricole.....	16
1.1.3 Les méthodes utilisées pour étudier les pesticides	19
1.2 Le récepteur à l'hydrocarbure d'aryle.....	20
1.2.1. Mécanisme d'action	20
1.2.2. Les ligands	22
1.2.2.1 Les ligands exogènes	22
1.2.2.2 Les ligands endogènes.....	23
1.2.3. Les gènes de la famille I des cytochromes P450	24
1.2.4. Rôle de CYP1A1 et CYP1B1 dans le métabolisme de l'œstrogène	25
1.2.5 Interaction croisée entre AhR et ER α	25
1.3 La voie de signalisation de p53.....	27
1.3.1 Mécanisme d'action	27
1.3.1.1 Cellule sans stress.....	27
1.3.1.2 Cellules avec stress.....	28
1.3.2 Les protéines impliquées dans ce point de contrôle.....	28

1.3.2.1 γ H2A.X	28
1.3.2.2 La kinase ataxia-telangiectasia mutée (ATM).....	29
1.3.2.3 p53.....	30
1.3.2.4 p21.....	31
1.4 Pesticides étudiés.....	31
1.4.1 Chlorpyrifos	32
1.4.2 Carbaryl	33
1.4.3 Linuron	34
1.4.4 Bromoxynil	35
1.4.5 Thiabendazole	36
1.5 Description du projet de recherche	36
Chapitre 2	38
Description de l'article et contribution	38
Potentiating and differential effects of pesticides on dioxin receptor signaling and p53 activation	39
Abstract.....	40
Introduction	41
Materiel and methods.....	46
Chemicals and reagents	46
Cell culture and treatments	46
qRT-PCR.....	47
Immunoblotting	47
Immunofluorescence	48
Results.....	49
Induction of <i>CYP1A1</i> by active ingredients found in pesticides.....	49
A combination of active ingredients can activate <i>CYP1A1</i> synergistically	49
ER α represses <i>CYP1A1</i> in the presence of estradiol in cells treated with active ingredients either alone or in combination	54
Specific pesticides can activate the p53-dependant cellular stress pathway	56
Carbaryl, linuron, and bromoxynil can cause DNA damage.....	57

Discussion.....	60
References.....	62
Supporting information.....	70
Chapitre 3	79
Matériels et méthodes	79
3.1 SPE	79
3.2 Culture cellulaire	80
3.3 Extraction d'ARN	80
3.4 Transcription inverse et PCR quantitative.....	81
Chapitre 4	82
Activation des gènes CYP par les pesticides présents dans l'eau de la rivière Saint-	
François	82
Chapitre 5	84
Discussion générale et conclusion.....	84
Chapitre 6	89
Perspectives.....	89
BIBLIOGRAPHIE	91

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AhR	Récepteur à l'hydrocarbure d'aryle
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Arnt	<i>AhR nuclear translocator</i>
ATM	Ataxia-telangiectasia mutée
bHLH-PAS	Famille basique Hélice-Boucle-Hélice/PER-ARNT-SIM
CO ₂	Dioxyde de carbone
CYP	Enzyme de la famille du cytochrome P450
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E ₂	Estradiol
ER α	Récepteur à l'œstrogène α
ERE	<i>Estrogen Response Element</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MeOH	Méthanol
RT	Transcription inverse
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
XRE	<i>Xenobiotic Responsive Element</i>
2-OHE ₂	2-hydroxyestradiol
4-OHE ₂	4-hydroxyestradiol
°C	degrés Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Table 1	qRT-PCR primers	48
Table 2	Antibodies	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Les différents moyens de dissémination des pesticides lorsqu'ils sont appliqués en champs ainsi que les différentes dégradations possibles	16
Figure 1.2	Mécanisme d'action d'AhrR	21
Figure 1.3	Structure du TCDD	22
Figure 1.4	Structure du chlorpyrifos	32
Figure 1.5	Structure du carbaryl	33
Figure 1.6	Structure du linuron	34
Figure 1.7	Structure du bromoxynil	35
Figure 1.8	Structure du thiabendazole	36
Figure 2.1	Pesticides activate <i>CYP1A1</i> expression in MCF-7 cells	50
Figure 2.2	Combination of pesticides can have a synergistic effect on the expression of <i>CYP1A1</i>	51
Figure 2.3	ER α specifically represses <i>CYP1A1</i> expression in MCF-7 cells treated with pesticides	55
Figure 2.4	Carbaryl, linuron and bromoxynil activate <i>p21</i> expression in MCF-7 cells	58
Figure 2.5	Carbaryl, linuron and bromoxynil cause DNA damage	59
Figure 2.S1	Pesticides activate <i>CYP1A1</i> expression in MCF-7 cells	70
Figure 2.S2	Combination of pesticides can have a synergistic effect on the expression of <i>CYP1A1</i>	71
Figure 2.S3	ER α specifically represses <i>CYP1A1</i> expression in MCF-7 cells treated with single pesticides	72
Figure 2.S4	Estrogen specifically represses <i>CYP1A1</i> expression in MCF-7 cells treated with pesticides combinations	73
Figure 2.S5	Carbaryl, linuron and bromoxynil can activate the p53-dependent cellular stress pathway	74
Figure 2.S6	Carbaryl, linuron and bromoxynil activate <i>p21</i> expression in MCF-7 cells	75
Figure 2.S7	Combination of pesticides at low concentrations cannot activate <i>p21</i> expression in MCF-7 cells	76
Figure 2.S8	Carbaryl, linuron and bromoxynil cause DNA damage	77
Figure 2.S9	Chlorpyrifos, thiabendazole and every combinaison do not cause DNA damage	78
Figure 4.1	Les contaminants environnementaux activent l'expression de <i>CYP1A1</i> et <i>CYP1B1</i> dans les cellules MCF-7	82

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GENERALE

Il y a plusieurs processus qui sont impliqués dans la réponse cellulaire suite à une exposition à différentes concentrations de pesticides. Dans cette introduction se trouve un résumé de deux de ces réponses, soit la voie du récepteur à l'hydrocarbure d'aryle (AhR) ainsi que la voie du suppresseur de tumeur p53. De plus, il y aura une partie sur l'utilisation des pesticides au Québec.

1.1 Les pesticides

Un pesticide est une substance utilisée pour contrôler les organismes nuisibles (Abass et al., 2012). Ils sont principalement utilisés dans les milieux agricoles, mais on les retrouve aussi dans les parcs urbains et les quartiers résidentiels (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2014b). Ils sont classés dans différentes catégories selon leur mécanisme d'action ainsi que les espèces qu'ils ciblent (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2014a). Les plus connus et les plus utilisés sont les herbicides, les insecticides et les fongicides. Les herbicides permettent de contrôler les plantes nuisibles par l'inhibition de la photosynthèse ou en reproduisant des hormones de croissance. Les insecticides permettent quant à eux de contrôler les insectes en interférant avec leur système nerveux ou en empêchant leur mue. Finalement, les fongicides permettent de contrôler les champignons en inhibant leur synthèse d'acides aminés ou en interférant avec leur division cellulaire (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2014a).

Les formulations commerciales des pesticides contiennent différents ingrédients afin d'obtenir les effets désirés. En effet, les mélanges contiennent les ingrédients actifs, mais aussi des adjuvants, des surfactants et des diluants. Chacun de ses ingrédients a un effet propre qui est nécessaire au bon fonctionnement du pesticide. L'ingrédient actif permet de produire l'effet observé, par exemple, l'inhibition de la photosynthèse si c'est un herbicide. Les adjuvants, surfactants et diluants permettent tous d'améliorer les propriétés de l'ingrédient actif, soit en augmentant sa solubilité ou sa stabilité par exemple. Ils sont essentiels au bon fonctionnement du pesticide.

Les pesticides sont utilisés principalement dans deux milieux différents; soit le milieu urbain et le milieu agricole. C'est dans ce dernier milieu que les pesticides sont le plus utilisés (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2014b). L'utilisation en milieu agricole regroupe tout ce qui est en rapport avec la production agricole et l'élevage alors que l'utilisation dans le milieu urbain regroupe l'utilisation domestique, l'entretien des espaces verts et les exterminations (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2013).

1.1.1 Règlementation

Les pesticides sont réglementés au Québec tant au niveau fédéral qu'au niveau provincial (Gouvernement du Québec, 1987; Ministre de la Justice, 2006). Il y a des règlements sur leurs utilisations, mais aussi sur leur présence dans les eaux potables. En effet, selon l'alinéa 19 de la loi sur la qualité de l'environnement, les municipalités ayant plus de 5000 habitants doivent prélever des échantillons d'eau potable qu'ils distribuent chaque trimestre, pour des fins d'analyses de présences de pesticides ainsi que d'autres substances organiques. Cependant,

lorsque la concentration des pesticides retrouvés dans les eaux potables n'est pas supérieure à 20% de la valeur maximale pour chacun d'entre eux, la municipalité peut faire les analyses seulement au trois ans tant et aussi longtemps que la concentration des pesticides respecte ce critère (Gouvernement du Québec, 1978). Ainsi, s'il y a une contamination qui survient entre les deux analyses, celle-ci ne sera jamais détectée si celle-ci se résout avant la prochaine analyse. De plus, selon le moment de l'analyse des eaux, la quantité de pesticides retrouvés dans celle-ci ne sera pas la même. Comme les pesticides sont appliqués surtout au printemps et à l'été, la concentration des pesticides retrouvée dans les eaux potables sera plus élevée à ces deux moments de l'année. Donc, si les analyses se font à l'automne ou à l'hiver, il est possible qu'il y ait beaucoup moins de pesticides détectés et donc que la concentration des pesticides ne dépasse pas la limite établie par le gouvernement.

De plus, il y a aussi une réglementation par rapport à la distance qui doit séparer l'endroit d'application d'un pesticide et un cours d'eau lorsque l'application est faite pour des fins agricoles (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2003). Lors d'une application terrestre, la distance minimale est de 1 mètre pour un cours d'eau ayant une aire d'écoulement de moins de 2m^2 et de 3 mètres pour un cours d'eau ayant une aire d'écoulement de plus de 2m^2 . Les mêmes distances s'appliquent pour une application aérienne, mais le cours d'eau doit avoir une largeur de moins de 4 mètres. S'il mesure plus de 4 mètres, la distance d'application doit être de 30 mètres si le dispositif est à moins de 5 mètres de hauteur et de 60 mètres si le dispositif est à plus de 5 mètres de hauteur (Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques, 2003). Ainsi, la distance entre la zone d'épandage et le cours d'eau est petite. S'il y a moins de vent, il est très possible que les pesticides puissent se retrouver dans le cours d'eau et ainsi le contaminer.

1.1.2 Utilisation agricole

Lors de leur application en champ, les pesticides ont plusieurs moyens de dissémination hors de la zone de traitement. Aussi, suite à leur application, ils ont aussi plusieurs façons de se rendre à l'extérieur du champ ou encore de modifier leur propriété ce qui amène un changement dans l'effet qu'ils ont (Figure 1.1). Cette dissémination non voulue peut avoir plusieurs effets sur les espèces végétales non ciblées, les animaux et les humains, mais aussi sur le champ traité puisque l'efficacité du pesticide sera diminuée. (Davie-Martin et al., 2013)

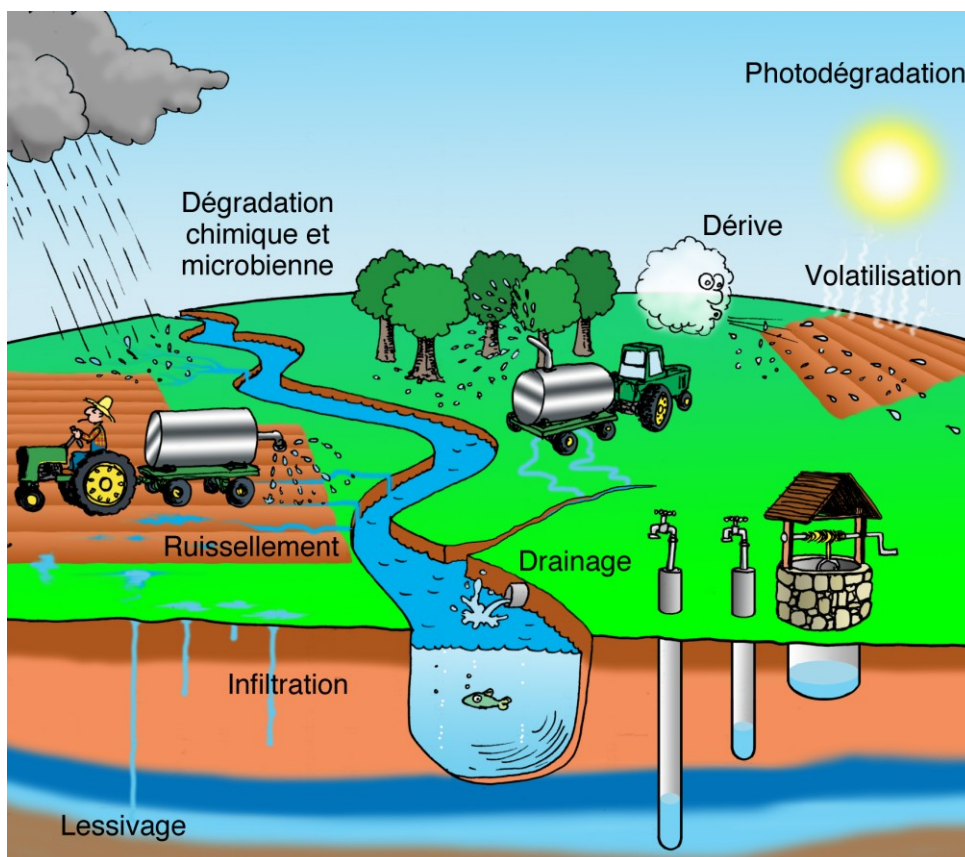


Figure 1.1, Les différents moyens de dissémination des pesticides lorsqu'ils sont appliqués en champs ainsi que les différentes dégradations possibles (Image dessinée par Benoit Leblanc)

Tout d'abord, il y a la dérive qui se produit lorsque le pesticide est pulvérisé à l'aide du vent plus loin que son endroit d'épandage (Otto et al., 2015). Le niveau de dérive dépend de plusieurs facteurs tels que les caractéristiques des plants visés, de l'équipement utilisé, la grandeur du champ ainsi que son inclinaison. De plus, la dérive se produit lorsque le pesticide est présent en gouttelettes dans l'air. Deux façons qu'un pesticide puisse être présent en gouttelettes est lors de la pulvérisation du pesticide sous pression sur le champ ou par la volatilisation. La volatilisation est le passage de l'état liquide à l'état gazeux. Il y a trois facteurs principaux qui contrôlent la volatilisation des pesticides; les propriétés physicochimiques du pesticide, la température et la culture sur laquelle le pesticide est étendu (De Schamphelaere et al., 2008). En effet, une haute température favorise la volatilisation et sa dégradation (description plus loin dans le chapitre) alors que la faible température favorise la persistance du pesticide dans l'environnement (Lima et al., 2014).

L'infiltration se produit lorsque l'eau qui se trouve sur la surface du sol entre dans le sol par les interstices qui s'y trouve. (Mansilha et al., 2011) Ainsi, les pesticides ayant été appliqués en champ pourront être entraînés dans le sol avec l'eau et pourront atteindre l'eau souterraine. Le ruissellement, au contraire, se produit lorsque le volume de pluie tombée en un temps donné dépasse le taux d'infiltration du sol. (Ma et al., 2004) Dans ce cas, l'eau s'écoulera en suivant la pente naturelle du sol en y apportant les pesticides. Ceux-ci pourront ainsi atteindre le ou les cours d'eau les plus proches.

Le drainage de l'eau souterraine est important en agriculture, car si le sol accumule trop d'eau, la mise en terre des graines pourrait être retardée et donc la saison pourrait être écourtée (Fox et al., 2004). Ainsi, beaucoup de fermes utilisent les drains. Cependant, avec l'utilisation des drains, l'eau présente en trop grande quantité dans le champ sera transportée vers le cours d'eau le plus proche. Ainsi, s'il y a un trop-plein d'eau dans le champ quelque temps après une

application de pesticides, ceux-ci pourront être transportés avec l'eau vers le cours d'eau le plus près.

Le lessivage est l'entraînement des pesticides à travers le sol à cause de l'écoulement de l'eau. Il y a plusieurs facteurs qui influencent le lessivage des pesticides tels que la composition du sol ainsi que l'emplacement de l'endroit où le lessivage aura lieu. En effet, plus un sol a un pourcentage élevé en matière organique, moins il y aura du lessivage puisque les pesticides pourront se lier à cette matière organique. De plus, la pente du sol présente va influencer le lessivage puisque s'il y a une pente élevée, les pesticides vont plutôt subir du ruissellement alors que si la pente est nulle, les pesticides vont entrer dans le sol et subir du lessivage (Barette, 2006).

La photodégradation permet la dégradation de l'ingrédient actif du pesticide en une nouvelle molécule lorsqu'il est exposé à la lumière. Plusieurs facteurs viennent influencer cette dégradation tels que le pH, la nature de l'ingrédient actif, l'environnement dans lequel le composé se trouve (Eyheraguibel et al., 2009). La photodégradation se produit principalement sur la surface de la feuille (Wild et al., 2005). Dès que le composé se trouve à l'intérieur de la plante, la photodégradation est quasi inexistante à cause du métabolisme de la plante et du manque de lumière. Ces nouvelles molécules qui proviennent de la photodégradation peuvent avoir des effets différents que l'ingrédient actif initial et c'est pourquoi il est important de les prendre en considération. (Quivet et al., 2006) De plus, les sous-produits de la photodégradation peuvent s'accumuler et leurs effets ne sont pas toujours connus (Eyheraguibel et al., 2009). La dégradation chimique et microbienne est comme son nom l'indique la dégradation de l'ingrédient actif par une molécule chimique ou un microorganisme.

1.1.3 Les méthodes utilisées pour étudier les pesticides

Lorsque le gouvernement homologue les pesticides, il doit effectuer certains tests afin de s'assurer que ceux-ci ne causeront pas de dommages aux animaux, à l'environnement ainsi qu'à la santé humaine. Lors de ces études, le gouvernement étudie l'effet d'un seul ingrédient actif à la fois (Santé Canada, 2004). Cependant, lors de leur utilisation en champs, les pesticides sont la plupart du temps utilisés en combinaison afin de combiner leurs effets. Ainsi, il serait beaucoup plus représentatif de la réalité que les tests soient effectués avec une combinaison de pesticides. Pour le moment, il n'y a aucune référence dans les documents du gouvernement sur l'utilisation des pesticides en combinaison. Donc, leurs effets sont encore inconnus pour le moment.

Il y a beaucoup de recherche qui s'effectue sur les pesticides par les laboratoires académiques. Dans les journaux scientifiques, la plupart des recherches sont aussi effectuées avec les ingrédients actifs seuls. Certains laboratoires ont étudié l'effet de deux ingrédients actifs ensemble. Par exemple, Coumoul et al. (2001) ont testé l'effet de la combinaison de l'endosulfan avec le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) sur les gènes *CYP*. Cependant l'endosulfan seul n'active pas l'expression de *CYP1A1* et de *CYP1B1*. Donc, l'effet observé avec la combinaison semble être dû seulement au TCDD et non à la combinaison entre les deux contaminants. Il y a aussi Pisani et al. (2016) qui ont étudié l'effet de la combinaison du carbendazim et l'iprodione, deux fongicides (Pisani et al., 2016). Ils ont fait une étude de transcriptomique et ils ont démontré qu'il y a un effet synergique pour la combinaison des deux pesticides pour le traitement de 7 et 14 jours sur des rats Sprague-Dawley. En effet, il y a une grande augmentation dans le nombre de gènes qui sont sur- et sous-exprimés pour ses deux durées de traitements, comparativement aux résultats pour les traitements avec les deux pesticides séparés. Pour ce qui est du traitement qui durait 21 jours, il y a eu une diminution dans le nombre de gènes sur- et sous-exprimés par la combinaison de pesticides par rapport aux deux pesticides seuls. Cela démontre bien qu'il semble que l'effet

des pesticides, lorsqu'ils sont en combinaisons, est plus élevé que lorsqu'ils sont étudiés seuls. Ainsi, il serait plus représentatif de la réalité de les étudier en combinaison puisqu'ils sont, pour la plupart du temps, utilisés comme cela.

1.2 Le récepteur à l'hydrocarbure d'aryle

Le récepteur à l'hydrocarbure d'aryle (AhR) est un facteur de transcription faisant partie de la famille basique hélice-boucle-hélice/PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) (Murray et al., 2014; Stockinger et al., 2014). Il est codé par un gène localisé sur le chromosome 7 (Micka et al., 1997) ayant une longueur de 50kb et sa protéine fait 96kDa (Bennett et al., 1996). AhR est exprimé ubiquitairement chez le fœtus ainsi que chez l'adulte (Stejskalova et al., 2011). Il est principalement retrouvé dans le foie, le placenta et la rate (Dolwick et al., 1993). AhR est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que le cycle cellulaire (Akahoshi et al., 2006; Marlowe and Puga, 2005), la migration cellulaire (Murray et al., 2014), les fonctions immunitaires (Stockinger et al., 2014), la progression des tumeurs (Gasiewicz et al., 2008; Ray and Swanson, 2009) et l'expression des gènes pour le métabolisme des lipides (Stejskalova et al., 2011). De plus, ce récepteur contribue à l'un des mécanismes les plus connus pour la détoxification de l'organisme face aux xénobiotiques, ce qui inclut les pesticides (Hankinson, 1995).

1.2.1. Mécanisme d'action

AhR est séquestré dans le cytoplasme par un complexe composé de deux chaperonnes HSP90, une co-chaperonne p23 et une co-chaperonne XAP2 (Figure 1.2) (Gasiewicz et al., 2008). Lorsqu'un ligand se lie à AhR, le récepteur subit un changement de conformation et il se libère du complexe de protéines (Nguyen and Bradfield, 2008). Il transloque alors dans le

noyau où il se lie au translocateur nucléaire d'AhR (ARNT) (Englert et al., 2012). ARNT est un facteur de transcription et il est aussi un membre de la famille basique hélice-loop-hélice (bHLH) comme AhR (Swanson, 2002). Le dimère AhR/ARNT peut alors aller lier sur l'ADN. Une des séquences spécifiques de l'ADN où ce dimère se lit se nomme XRE (*xenobiotic responsive element*). La séquence consensus de ce domaine est 5'-(T/G)NGCGTG(A/C)(G/C)A-3' où le cœur de cette séquence (5'-GCGTG-3') est le plus important (Lo and Matthews, 2012; Stejskalova et al., 2011; Swanson et al., 1995). Cependant, il a été prouvé que seulement 60% des régions où le dimère se lie contiennent au moins une fois cette séquence consensus (Lo and Matthews, 2012). Ces XRE se retrouvent au promoteur de gènes cibles d'AhR. Dans l'ensemble de ces gènes se trouvent les enzymes de la famille 1 des cytochromes P450 (*CYP*), tels que *CYP1A1* et *CYP1B1* (Englert et al., 2012).

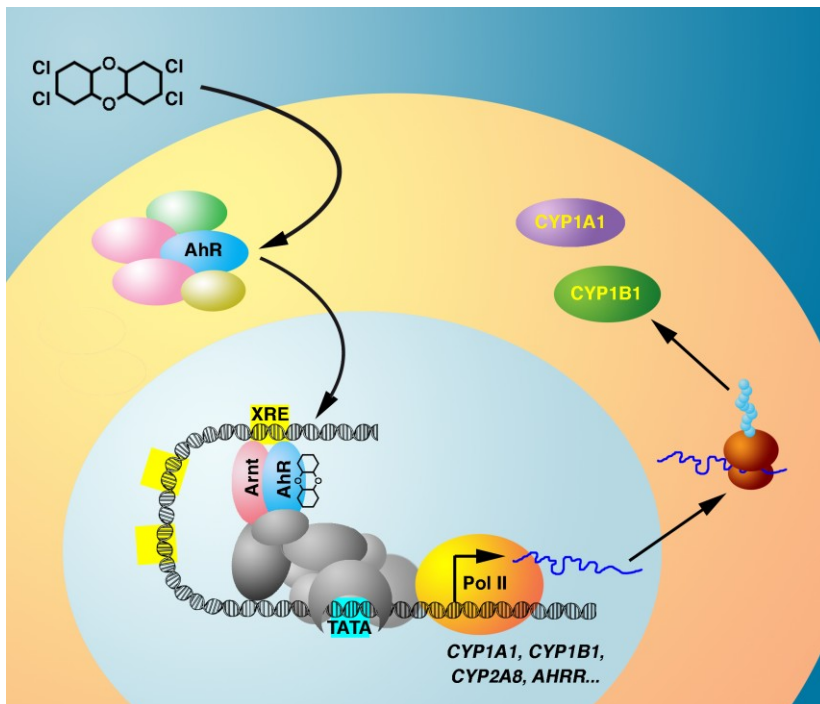


Figure 1.2, Mécanisme d'action d'AhR. (Image dessinée par Benoit Leblanc)

1.2.2. Les ligands

AhR lie plusieurs types de molécules qui peuvent être autant exogènes qu'endogènes. La plupart des composés qui s'y lient sont hydrophobiques. De plus, la majorité des agonistes ont une structure plane et sont aromatiques. Cependant, ce n'est pas une caractéristique nécessaire pour activer ce récepteur. Un modèle de la liaison entre le complexe AhR et ses ligands a montré que les ligands avaient une interaction avec la phénylalanine 318, l'isoleucine 319 et l'histidine 320 d'AhR (Stejskalova et al., 2011).

1.2.2.1 Les ligands exogènes

La plupart des ligands exogènes d'AhR proviennent tous de l'activité humaine que ce soit par des procédés de combustion ou industriels. En effet, tous ces ligands font partie de plusieurs catégories telles que les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs), les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs) et les biphényles polychlorés (BCPs). (Nguyen and Bradfield, 2008; Stejskalova et al., 2011). Le TCDD, qui est le ligand le plus utilisé d'AhR, fait partie des HAH (Figure 1.3). Puisqu'il permet une grande expression des gènes cibles d'AhR et qu'il possède une très grande affinité pour ce récepteur, il est considéré comme son ligand modèle (Denison and Nagy, 2003) .

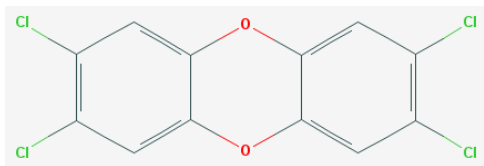


Figure 1.3, Structure du TCDD. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dioxin>)

Il y a aussi plusieurs composés naturels qui permettent l'activation d'AhR. La plupart de ceux-ci proviennent de notre alimentation, par exemple les flavonoïdes, la curcumine et les caroténoïdes (Stejskalova et al., 2011). De plus, il y a plusieurs pesticides qui possèdent une structure similaire au TCDD. Plusieurs équipes de recherches ont caractérisé la capacité de plusieurs pesticides à lier le récepteur AhR et ils ont conclu que certains pesticides avaient une activité agoniste. (Kojima et al., 2004; Long et al., 2003; Takeuchi et al., 2008).

1.2.2.2 Les ligands endogènes

Le récepteur AhR est présent dans les cellules depuis plusieurs millénaires. Puisqu'il a été conservé dans le génome et à travers les espèces, cela montre qu'AhR est nécessaire non seulement pour la détoxification cellulaire, mais qu'il a plusieurs rôles importants dans la fonction physiologique. En effet, il a été démontré chez des souris ^{AhR}⁻/⁻, qu'elles avaient des retards de croissance ainsi qu'un retard dans le développement du foie et un système immunitaire défaillant (Fernandez-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996). Cela implique donc qu'il y ait des molécules synthétisées dans nos cellules qui sont capables de lier AhR. Parmi celles-ci, il est possible d'y retrouver les indigoïdes, les métabolites de l'hème, les métabolites de l'acide arachidonique, les photoproduits UV du tryptophane, les eicosanoïdes, les dérivés du tryptophane et l'équilénine (Denison and Nagy, 2003; Murray et al., 1997; Nguyen and Bradfield, 2008). Un groupe de recherche a démontré récemment qu'un dérivé du tryptophane, la L-kynurénine, est produit par les cellules tumorales via le tryptophane-2,3-dioxygénase. Cette molécule permet l'activation d'AhR et permet aux cellules cancéreuses d'échapper à la réponse immunitaire pour ainsi survivre (Opitz et al., 2011).

1.2.3. Les gènes de la famille I des cytochromes P450

Les enzymes du cytochrome P450 font parties de différentes familles et elles catalysent différentes réactions telles que l'hydroxylation, la déhalogénéation et la décarboxylation (Munro et al., 2013). Plus spécifiquement, les enzymes de la famille I des cytochromes P450 sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que le métabolisme des hormones stéroïdiennes, des prostaglandines, ainsi que le métabolisme de plusieurs polluants environnementaux comme les pesticides. Les enzymes impliqués dans le métabolisme des polluants environnementaux se divisent en deux phases; les enzymes de phases I qui vont ajouter un oxygène au substrat et les enzymes de phase II qui vont utiliser cet oxygène pour poursuivre la métabolisation du substrat (Monteiro and Boxall, 2010). Les CYP1 font partie des enzymes de la phase I (Hankinson, 1995). Il y a trois enzymes qui font partie de la famille I du cytochrome P450, soit CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 (Dong et al., 2016; Mikstacka et al., 2008).

Les gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* sont localisés sur le chromosome 15q24. CYP1A1 est présent entre autres dans les poumons, la peau, les intestins et les glandes mammaires alors que CYP1A2 est présent principalement dans le foie (Dong et al., 2016; Raccor and Kaspera, 2013). Ces deux gènes se retrouvent dans la même région génique en direction opposée l'un de l'autre avec une région 5' commune. Une région de 20kb les sépare l'un de l'autre (Kohle and Bock, 2007). Dans cette région promotrices se trouvent les 12 XREs connus pour ces deux gènes (Wong et al., 2014; Yoshinari et al., 2008).

Le gène *CYP1B1* quant à lui est localisé sur le chromosome 2p22. Il est retrouvé dans plusieurs organes tels que le coeur, la prostate, les reins, les ovaires et les glandes mammaires

(Peter Guengerich et al., 2003). En amont du gène *CYP1B1*, on retrouve 8 XRE ainsi qu'un site de liaisons du récepteur à l'œstrogène (ERE) (Tsuchiya et al., 2004; Wong et al., 2014).

1.2.4. Rôle de CYP1A1 et CYP1B1 dans le métabolisme de l'œstrogène

Le métabolisme de l'œstrogène est, en partie, fait par des enzymes de la famille des cytochromes P450 tels que CYP1A1 et CYP1B1. En effet, CYP1A1 permet de métaboliser le 17 β -estradiol en 2-hydroxyestradiol (2-OHE2), alors que CYP1B1 le convertit principalement en 4-hydroxyestradiol (4-OHE2) (Lee et al., 2003; Liehr and Ricci, 1996). Cependant, le 4-OHE2 est le métabolite le plus toxique puisqu'il cause des adduits à l'ADN ainsi que des radicaux libres et donc induit des dommages à l'ADN (Coumoul et al., 2001; Liehr and Ricci, 1996; Parl et al., 2009). Cela fait de CYP1B1 un marqueur potentiel pour le développement du cancer du sein (Murray et al., 1997). Au contraire, le 2-OHE2 est non cancérogène et serait un inhibiteur de croissance tumorale (Tsuchiya et al., 2005). Dans le foie, il y a environ 80% de l'estradiol qui est transformé en 2-OHE2 et 20% en 4-OHE2 (Tsuchiya et al., 2005). Cependant, pour le sein et l'utérus, la formation du 4-OHE2 est plus importante que celle du 2-OHE2 (Tsuchiya et al., 2005). Ainsi, il a été proposé que le ratio entre les enzymes CYP1A1/CYP1B1 et par le même fait, le ratio entre les métabolites 2-OHE2/4-OHE2, puisse avoir un rôle dans le développement du cancer du sein (Coumoul et al., 2001).

1.2.5 Interaction croisée entre AhR et ER α

Le récepteur à l'œstrogène alpha (ER α) fait partie de la superfamille de type 1 des récepteurs nucléaires plus spécifiquement dans la classe des récepteurs stéroïdiens. Le ligand principal d'ER α est l'estradiol (E2). Lorsqu'ER α n'est pas lié par un ligand, il est lié à des protéines

HSP. Lors de sa liaison avec un ligand, il subit un changement de conformation, ce qui fait qu'il peut s'homodimériser et se lier sur les EREs situés en amont des gènes régulés par l'œstrogène (Tecalco-Cruz and Ramirez-Jarquin, 2016). À ce moment, cela permet de recruter toute la machinerie de transcription et ainsi activer la transcription des gènes régulés par ce récepteur (Kulkoyluoglu and Madak-Erdogan, 2016).

Il a été démontré qu'il existe une interaction croisée entre AhR et ER α . En effet, lorsque les deux récepteurs sont activés en même temps, l'expression de *CYP1A1* est diminuée alors que celle de *CYP1B1* reste inchangée (Coumoul et al., 2001; Ricci et al., 1999). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce changement. Premièrement, notre laboratoire a démontré que Dnmt3B, une méthyltransférase, va méthyliser l'ADN au XRE3 en amont de *CYP1A1* ce qui influence le niveau de transcription de ce gène. En effet, lorsque la méthylation est inhibée par du 5-azacytidine, l'effet observé sur l'expression de *CYP1A1* est renversé. Cette méthyltransférase n'a aucun effet sur *CYP1B1* (Marques et al., 2013). Deuxièmement, il a été démontré qu'AhR permet la dégradation d'ER α via la voie des E3 ubiquitine ligase ainsi que par la voie des ubiquitine-protéasomes (Harris et al., 1990; Ohtake et al., 2007; Wormke et al., 2003). Troisièmement, lorsque les deux récepteurs sont activés en même temps, il a été proposé qu'il y a une compétition entre AhR et ER α pour le même facteur de transcription, soit NF-1. Cela n'affecte que le gène *CYP1A1*, puisque ce facteur de transcription est nécessaire seulement en amont de ce gène et n'est pas nécessaire pour l'expression de *CYP1B1* (Ricci et al., 1999). Quatrièmement, il est proposé qu'AhR puisse aller se lier au XRE, appelé iXRE (inhibitory xenobiotic responsive element), présent au promoteur de certains gènes cibles d'ER α , et ainsi réprimer leur expression et par le fait même influencer l'expression de *CYP1A1* (Duan et al., 1999; Gillesby et al., 1997; Porter et al., 2001; Wang et al., 2001).

1.3 La voie de signalisation de p53

Dans le cycle cellulaire, il y a plusieurs points de contrôle qui permettent à la cellule de garder son intégrité. Une des façons de faire est par l'activation de la voie cellulaire de p53, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire dans deux des majeurs points de contrôle cellulaire; soit celui entre les phases G1 et S ainsi que celui entre les phases G2 et M (Appella and Anderson, 2001; Meek, 2004). Il permet aussi d'autres réponses telles que l'apoptose, la sénescence et la réparation des dommages à l'ADN (Dasika et al., 1999; Meek, 2015; Smith et al., 2000; Vousden and Lu, 2002).

1.3.1 Mécanisme d'action

1.3.1.1 Cellule sans stress

Lorsque la cellule n'est soumise à aucun stress, p53 est présent dans le noyau en faible quantité, grâce à MDM2, une E3 ubiquitine ligase (Michael and Oren, 2003; Mirzayans et al., 2012; Wohak et al., 2016). MDM2 va se lier sur p53 et ajouter des ubiquitines sur ses lysines. C'est une marque reconnue par le protéasome. En ajoutant cette marque, p53 sera reconnu et dégradé par le protéasome (Ashcroft et al., 2000; Michael and Oren, 2003; Vousden and Lu, 2002). Cependant, p53 est le facteur de transcription qui régule la transcription de MDM2 (Sun and Cui, 2015; Wu et al., 1993). Donc, lorsqu'il y a une augmentation de la quantité de p53 dans la cellule, il y aura aussi une augmentation dans la transcription de MDM2. MDM2 peut ainsi contrôler la dégradation de p53 et diminuer sa concentration dans la cellule (Ashcroft et al., 2000; Michael and Oren, 2003; Sun and Cui, 2015; Wohak et al., 2016).

1.3.1.2 Cellules avec stress

Lors de traitement avec des agents génotoxiques, p53 est stabilisé et cela permet son accumulation dans le noyau (Appella and Anderson, 2001; Meek, 2009). La stabilisation de p53 se fait par des perturbations dans sa liaison avec MDM2 (Hu et al., 2012; Prives and Hall, 1999). En effet, la phosphorylation de certains résidus tels que les sérines 15, 20, 33, 37 et 46 dans la partie N-terminale de p53 ainsi que l'acétylation des certains résidus tel que les lysines 320, 371, 371, 372, 381, 382, 386 dans la partie C-terminale de p53 affaiblies l'interaction entre MDM2 et p53 (Ashcroft et al., 2000; Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Gu et al., 2001; Li et al., 2002; Meek, 2009; Rodriguez et al., 2000; Shieh et al., 1997). Ainsi, p53 n'est plus dégradé et peut donc s'accumuler dans le noyau. La phosphorylation de la sérine 15 de la partie N-terminale de p53 se fait principalement par les kinases ATM et ATR (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998). Lorsqu'il y a une accumulation de p53 dans le noyau, la réponse au stress cellulaire est enclenchée.

1.3.2 Les protéines impliquées dans ce point de contrôle

Il y a plusieurs protéines impliquées dans la détection des dommages à l'ADN. Je me suis intéressée à quelques-unes d'entre elles, tels que γ H2A.X, ATM, p53 et p21.

1.3.2.1 γ H2A.X

Lors d'un dommage à l'ADN double brin, il y a une phosphorylation rapide de la sérine 139 sur le variant d'histone H2A.X par ATM, ATR ainsi que DNA-PK, qui sont toutes des kinases, ce qui génère γ H2A.X (Kinner et al., 2008; Mah et al., 2010). γ H2A.X est un bon

marqueur de bris double brin sur l'ADN, car il est produit en seulement quelques minutes lorsque le bris survient alors que certaines protéines associées à la réparation des dommages sont tout de même présentes lorsque l'ADN n'est pas endommagé (Ayoub et al., 2008). C'est aussi une voie de signalisation qui est indépendante de la voie de signalisation de p53. γ H2A.X a un rôle à jouer dans la réponse des dommages à l'ADN en signalant et initiant la réparation du dommage (Mah et al., 2010). En effet, la phosphorylation de la sérine 139 présente dans la queue de l'histone permet à celle-ci de recruter les facteurs permettant la réparation des bris doubles brins (Kinner et al., 2008). Par exemple, cela permet le recrutement des cohésines afin de garder les extrémités d'ADN proches durant la réparation. Cela évite donc la perte ou la modification de grandes sections de chromosome (Celeste et al., 2002; Unal et al., 2004). De plus, il y a une interaction entre MDC1 et γ H2A.X (Chapman and Jackson, 2008). Suite à cette interaction, MDC1 peut interagir directement avec 53PB1, BRCA1 et Nbs1 (Stewart et al., 2003). Lorsque Nbs1 est présent aux bris doubles brins en complexe avec Mre11 et Rad50, ce qui forme le complexe MRN, cela permet le recrutement d'ATM. La présence du complexe MRN aux extrémités des brins d'ADN endommagé augmente la stabilité de l'interaction entre Nbs1 et ATM (Falck et al., 2005). De plus, ce mécanisme semble contribuer à l'activation d'ATM en détectant le dommage à l'ADN, en amplifiant le signal engendré par ATM ainsi qu'en stabilisant la forme phosphorylée d'ATM (You et al., 2005). Dans la même optique que pour ATM, DNA-PK et ATR sont aussi recrutés aux bris d'ADN par Ku80 et ATRIP respectivement (Falck et al., 2005) Ainsi, les trois kinases se retrouvent aux bris d'ADN et peuvent enclencher une réponse aux dommages à l'ADN.

1.3.2.2 La kinase ataxia-telangiectasia mutée (ATM)

ATM joue un rôle important dans la réponse des dommages doubles brins (Meek, 2009; Sun and Cui, 2015). ATM permet l'activation de p53 lors d'un bris double brin à l'ADN ainsi que la dégradation de MDM2 (Meek, 2009; Sun and Cui, 2015). Pour ce faire, ATM va

rapidement s'autophosphoryler sur la sérine 1981 ce qui permet son activation (Bakkenist and Kastan, 2003; Geric et al., 2014). Ainsi, lors d'un dommage double brins, ATM va être recruter à l'ADN endommagé en se liant à la partie C-terminale de Nbs1 (Falck et al., 2005). Il est important de noter qu'ATM n'a pas besoin d'être en complexe avec Nbs1 pour s'autophosphoryler. Par contre, cette association permet l'accumulation de la forme activée d'ATM aux bris doubles brins et ainsi permettre l'activation des voies de signalisation subséquentes régulées par ATM. Lorsqu'elle est activée, la kinase est impliquée dans la phosphorylation de la sérine 15 de la protéine p53 (Appella and Anderson, 2001; Banin et al., 1998; Canman et al., 1998). De plus, ATM permet la phosphorylation sur H2A.X sur la sérine 139 permettant d'augmenter la production de γ H2A.X (Mah et al., 2010; Paull et al., 2000). En fait, elle est la principale kinase qui phosphoryle H2A.X (Mah et al., 2010).

1.3.2.3 p53

p53 est un suppresseur de tumeurs (Vousden and Lu, 2002). Il est une barrière contre le développement des cancers en bloquant la prolifération et en éliminant les cellules cancéreuses (Meek, 2015). p53 est une protéine ayant une courte vie et elle est maintenue à un niveau bas lorsque la cellule n'est pas stressée (Meek, 2009). Cependant, lorsqu'il y a des dommages à l'ADN ou tout autre stress génotoxique, p53 s'accumule dans le noyau et devient un facteur de transcription en réponse au stress (Prives and Hall, 1999). p53 doit former un homotétramère afin d'être fonctionnel (Michael and Oren, 2003). Il y a des phosphorylations de p53 qui sont faites en réponse aux rayons UV et au rayonnement ionisant. C'est le cas de la phosphorylation à la sérine 15 (Appella and Anderson, 2001). Cette phosphorylation semble avoir un rôle important dans la voie de signalisation de p53. En effet, il semble qu'elle soit responsable, avec la phosphorylation sur la sérine 20, de l'accumulation de p53 au noyau. Ces deux mutations empêcheraient l'exportation de p53 hors du noyau par le signal d'exportation nucléaire (Meek, 2004; Zhang and Xiong, 2001). Il est connu qu'il y a une augmentation de la

phosphorylation de la sérine 15 de p53 lors d'un traitement de cellules avec la camptothécine et la daunorubicine (Appella and Anderson, 2001; Ashcroft et al., 2000; Seong and Ha, 2012). La phosphorylation de la sérine 15 de p53 est rapidement faite par ATM. Cependant, elle est maintenue pendant plusieurs heures par ATR qui est plus lente (Meek, 2004).

1.3.2.4 p21

p21, aussi appelé CDKN1A, est situé dans la région 6p21.2 du chromosome 6 (Dutto et al., 2015). p21 est le gène le plus souvent activé lors d'une réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules mammaliennes (Sakai et al., 2014). Il fait partie de la voie de signalisation de p53 et il est en aval de p53. L'activation de la transcription du gène p21 est très sensible. Ainsi, p21 sera activé même lorsque p53 est présent en petite quantité (Vousden and Prives, 2009). Il est considéré comme l'inhibiteur universel du cycle cellulaire (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993). p21 permet l'inhibition du cycle cellulaire, mais aussi dans la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la transcription, la mort programmée cellulaire et les fonctions de motilités cellulaires (Dutto et al., 2015). p21 peut inhiber le cycle cellulaire par plusieurs moyens, tel que l'inhibition des complexes cyclines/CDK, l'inhibition de PCNA, la dégradation de pRB et l'inhibition de la cycline B1 (Mirzayans et al., 2012).

1.4 Pesticides étudiés

Le choix des pesticides utilisés a été basé sur quelques critères tels que leur homologation au Canada, leur bannissement dans au moins un pays de l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), les résultats préliminaires établis dans le laboratoire au début du projet ainsi que leurs structures. En effet, nous voulions une molécule ressemblant au ligand connu pour le récepteur à l'hydrocarbure d'aryle; soit une molécule qui contient au

moins un cycle aromatique ainsi qu'un halogène et ayant une structure majoritairement planaire. Ainsi, le thiabendazole, le carbaryl, le chlorpyrifos, le linuron et le bromoxynil ont été principalement utilisés.

1.4.1 Chlorpyrifos

Le chlorpyrifos, présenté dans la figure 1.4, est un insecticide de la classe des organophosphorés (Tang et al., 2001; Ventura et al., 2012). Il inhibe l'acétylcholinestérase lorsqu'il entre en contact ou lorsqu'il est ingéré par les insectes (Gorse et al., 2002; Ventura et al., 2012). Sa demi-vie dans l'eau est de 1,5 jour à un pH de 8 et à une température de 8,25°C et de 100 jours à un pH de 7 et à 15 °C. Il est persistant dans le sol; il a une durée de vie variant habituellement entre 60 et 120 jours. Le chlorpyrifos absorbé dans le sol peut être dégradé par photolyse, hydrolyse et par biodégradation. La volatilisation est le mode d'élimination principale du chlorpyrifos dans l'eau. Lorsqu'il se retrouve dans un environnement humide, sa demi-vie avant d'être volatilisé est de 45 à 163 heures. Il est immobile dans les sols et donc n'est pas susceptible de contaminer les eaux souterraines. Les

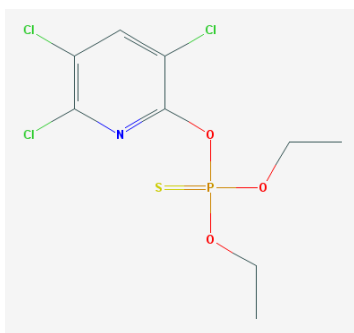


Figure 1.4, Structure du chlorpyrifos.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorpyrifos>)

métabolites du chlorpyrifos sont le 3,5,6-trichloro-2-pyridinol et le chlorpyrifos-oxon (Tang et al., 2001). L'humain peut être en contact avec le chlorpyrifos par l'ingestion d'aliments contaminés, la respiration de particules présentes dans l'air et le contact avec des résidus dans l'environnement (Mullins et al., 2013).

1.4.2 Carbaryl

Le carbaryl, présenté dans la figure 1.5, est un insecticide qui inhibe faiblement l'acétylcholinestérase (Gorse et al., 2002). Le carbaryl est stable à la chaleur et à la lumière. Sa demi-vie est de 12 jours à pH 7 et de 3,2 heures à pH 9. Il a une faible persistance dans le sol. Sa dégradation dans le sol est principalement due à la biodégradation et à la photodégradation. Selon le type de sol, sa demi-vie varie entre 7 jours et 1 mois. Il est possible que le carbaryl puisse contaminer les eaux souterraines. La volatilisation dans un milieu humide est très lente. Sa dégradation lorsqu'il est présent dans l'eau varie entre 52 et 264 heures. Le carbaryl présent dans l'air peut être photolysé et sa demi-vie est estimée à 12,6 heures. Les métabolites du carbaryl sont le 4-hydroxy-carbaryl, le carbaryl méthylol et le 5-hydroxy-carbaryl (Rose et al., 2005; Tang et al., 2002). Le carbaryl peut entrer dans le corps humain par la peau, le système digestif ainsi que le système respiratoire (Sun et al., 2014).

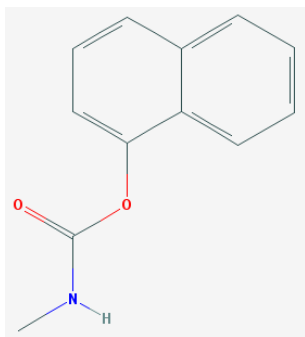


Figure 1.5, Structure du carbaryl. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carbaryl>)

1.4.3 Linuron

Le linuron, présenté dans la figure 1.6, est un herbicide qui inhibe la photosynthèse. Il est principalement absorbé par les racines, mais peut aussi être absorbé par les feuilles (Tomlin and British Crop Protection Council., 1997). Il a une demi-vie de 945 jours lorsqu'il est dans une solution aqueuse à pH 5, 7 ou 9. Le linuron est modérément persistant dans le sol, puisque qu'il a une demi-vie entre 30 et 150 jours lorsqu'il s'y trouve. Sa dégradation se fait surtout par la biodégradation. Ses métabolites sont le 3,4-dichloroaniline et le CO_2 . Dans l'eau, le linuron est adsorbé par les solides en suspension et les sédiments. Il peut subir de la photolyse lorsqu'il se trouve en surface de l'eau. Dans l'air, le linuron a une demi-vie de 11,4 heures, car il subit une dégradation photochimique. Le linuron peut être absorbé par le tractus gastro-intestinal. Les principaux métabolites urinaires sont l'urée, le 2-amino-4,5-dichlorophénol ainsi que le 3,4-dichloroaniline.

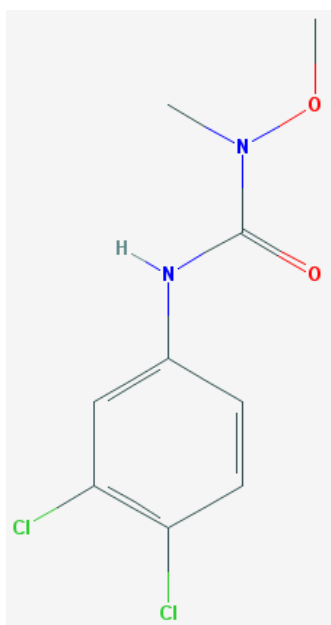


Figure 1.6, Structure du linuron. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linuron>)

1.4.4 Bromoxynil

Le bromoxynil, présenté dans la figure 1.7, est un herbicide qui inhibe la photosynthèse et qui découple la phosphorylation oxydative (Gorse et al., 2002). Il est absorbé par les feuilles (Tomlin and British Crop Protection Council., 1997). Le bromoxynil est stable aux rayons ultraviolets ainsi qu'à une température en dessous de 195 °C. Il a un potentiel élevé de contaminations des eaux souterraines puisque dans un sol au pH neutre et basique, il peut être entraîné dans l'eau. Cependant, dans un sol au pH acide, il va s'adsorber aux particules l'environnant. Le bromoxynil peut être dégradé par photolyse et par la biodégradation. Le bromoxynil n'existe pas sous forme de vapeur. Il se dépose au sol par gravité. Ses métabolites sont l'acide 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoïque, le 3,5-dibromo-4-hydroxybenzamide, 4-hydroxybenzoïque, 3-bromo-4-hydroxybenzonitrile, 4-hydroxy-benzonitrile (Gorse et al., 2002).

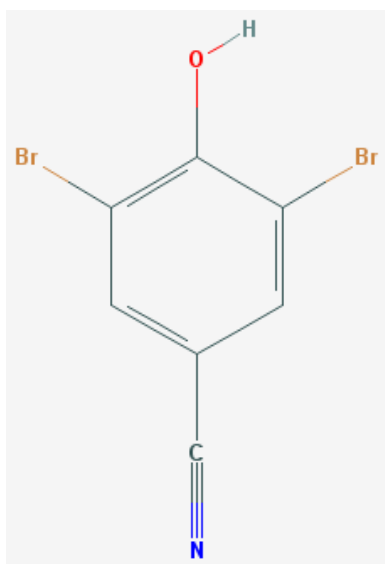


Figure 1.7, Structure du bromoxynil.

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bromoxynil>)

1.4.5 Thiabendazole

Le thiabendazole, présenté dans la figure 1.8, est un fongicide et il est absorbé par les racines et les feuilles des plantes (Gorse et al., 2002). Il est souvent retrouvé autour des graines de maïs ainsi que les agrumes afin de prévenir leurs putréfactions. Cette molécule est stable à la chaleur et à la lumière. Le thiabendazole est très persistant sur le sol; il a une durée de vie de 403 jours. De plus, sa dégradation est surtout assurée par les microorganismes présents dans le sol. Le thiabendazole présent dans l'air est dégradé rapidement par des radicaux hydroxyles, ce qui fait en sorte que sa vie dans ce milieu est de 6 heures (Gorse et al., 2002). Son principal métabolite est le 5-hydroxythiabendazole (Price et al., 2004).

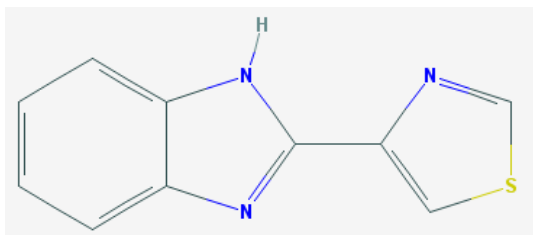


Figure 1.8, Structure du thiabendazole.

(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thiabendazole>)

1.5 Description du projet de recherche

Dans le laboratoire, nous nous intéressons depuis quelques années à l'impact que les pesticides peuvent avoir sur AhR, plus spécifiquement sur les gènes de la famille *CYP1*, soit *CYP1A1* et *CYP1B1*. Il a été démontré préliminairement par le laboratoire que certains pesticides permettaient une forte activation de ces deux gènes. De plus, il a été démontré récemment que les combinaisons de pesticides à faibles concentrations permettent une activation additive ou

synergique du gène *CYP1A1*. À partir de ces informations, nous avons émis l'hypothèse que ces contaminants peuvent, à court et à long terme, perturber différentes voies cellulaires. Ma maîtrise s'est déroulée sous trois objectifs. Pour mon premier objectif, j'ai vérifié que le thiabendazole permet l'activation de la voie de signalisation d'AhR. Dans mon deuxième objectif, avec le thiabendazole mais aussi le chlorpyrifos, le carbaryl, le linuron et le bromoxynil ainsi que différentes combinaisons les contenant, j'ai étudié leur potentiel à causer des dommages à l'ADN en observant l'activation de la voie de signalisation de p53. Finalement, pour le troisième objectif, j'ai observé les effets des contaminants présents dans l'eau de surface sur la voie de signalisation d'AhR. Les résultats présentés dans ce mémoire amènent une meilleure connaissance sur l'effet des pesticides, mais surtout des combinaisons des pesticides sur deux voies de signalisation cellulaire importantes ; soit AhR et p53.

Ainsi, l'objectif un et deux seront présentés dans le chapitre 2 sous forme d'article qui a été soumis à PLoS ONE, alors que l'objectif trois est présenté dans les chapitres 3 et 4. Finalement, le chapitre 5 mettra tous les résultats en perspectives avec une discussion et une conclusion. Finalement, le chapitre 6 consistera à identifier les perspectives du projet.

CHAPITRE 2

Potentiating and differential effects of pesticides on dioxin receptor signaling and p53 activation

Description de l'article et contribution

Dans cet article, nous apportons de nouvelles connaissances sur les effets des pesticides lorsqu'ils sont en combinaison. Ainsi, nous avons vérifié l'activation des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, mais aussi la présence des dommages à l'ADN ainsi que l'activation de la voie de signalisation de p53. Nous avons démontré que cinq pesticides, bromoxynil, chlorpyrifos, carbaryl, linuron et thiabendazole, permettaient l'activation du gène CYP1A1 lorsqu'ils sont à haute concentration. Aussi, nous avons montré que les pesticides ont un effet synergique sur l'activation du gène CYP1A1 lorsqu'ils sont en combinaison à faibles concentrations. Par la suite, par immunofluorescence, nous avons confirmé que le carbaryl et le linuron permettent de faire des dommages à l'ADN, alors que le chlorpyrifos, le bromoxynil, le thiabendazole ainsi que toutes les combinaisons n'en font pas. Ces résultats ont été confirmés par western blot où il y a seulement le carbaryl et le linuron qui permettent l'activation de la voie de signalisation de p53, soit l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN.

Pour ma part, j'ai effectué les expériences portant sur les dommages à l'ADN et la voie de signalisation de p53 en plus de celles sur le thiabendazole et le cross-talk. Sandra Bergeron a fait les expériences portant sur l'activation de *CYP1A1* par le chlorpyrifos, carbaryl, linuron et bromoxynil et les combinaisons. L'article a été soumis au journal PLoS ONE.

Potentiating and differential effects of pesticides on dioxin receptor signaling and p53 activation

Myriam Fauteux, Sandra Bergeron, Alexandre Maréchal, and Luc Gaudreau*

Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.,

Author to whom correspondence should be addressed:

E-Mail: Luc.Gaudreau@usherbrooke.ca

Key words: Pesticides, Aryl hydrocarbon receptor, Gene expression, p53

Abstract

As modern agricultural practices increase their use of chemical pesticides, it is inevitable that we will find a number of these xenobiotics within drinking water supplies and disseminated throughout the food chain. A major problem that arises from this pollution is that the effects of most of these pesticides on cellular mechanisms in general, and how they interact with each other and affect human cells are still poorly understood. In the current study, we evaluate the potential of five widely used pesticides to activate the dioxin receptor pathway and affect its crosstalk with estrogen receptor signalling. We also quantify the impact of these chemicals on the p53-dependent cellular stress response. We find that, not only can the different pesticides activate the dioxin receptor pathway, most of them have synergistic effects on this pathway when combined at low doses. We also show that different pesticides have the ability to trigger crosstalk events that may generate genotoxic estrogen metabolites. Finally, we show that some, but not all of the tested pesticides can induce a p53-dependent stress response. Taken together our results provide evidence that several xenobiotics found within the environment have the potential to interact together to elicit significant effects on cell systems. Our data warrants caution when the toxicity of substances are assessed simply for individual chemicals, since important biological effects could be observed only in the presence of other compounds, and that even at very low concentrations.

Introduction

Pesticides are a group of chemicals that are widely used in agriculture to prevent the infestation of fields with unwanted weeds, insects, or fungi [1]. These chemicals are often used in combination, resulting in a cocktail of pesticides being released in the environment. In fact, there are several ways through which pesticides can spread from their initial site of intended usage: wind drift [2], runoff of water contaminated by pesticides [3], volatilization [4], drainage [5], and infiltration [6]. Consequently, humans become inadvertently exposed to pesticides through food and water consumption. Moreover, when pesticides are evaluated for their toxicity, they are mostly evaluated as single agents. However, in the environment, they are almost always found in combination. Their effect(s) while in combination are thus not well known.

Mammals are affected at the cellular and organismal levels by the presence of xenobiotics in their environment. These responses include changes in DNA methylation patterns and telomere length as well as changes in hormonal levels [7-10]. At the cellular level, one of the first molecular consequences of xenobiotics is the activation of the dioxin receptor, also known as the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [11, 12]. Since many xenobiotics can produce DNA lesions, it is conceivable that a second pathway that would be triggered when cells are exposed to certain of these chemicals, is the DNA damage response [13].

Many environmental pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs), and pesticides are metabolized by cytochrome P450 enzymes such as CYP1A1 and CYP1B1 [11, 14]. The major transcription factor involved in the regulation of *CYP1* gene expression upon exposure to xenobiotics is AhR [15]. It is a ligand-activated receptor of the basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) family [16, 17]. Typically, AhR is sequestered in the cytoplasm and upon ligand binding, [14],

is translocated into the nucleus where it heterodimerizes with its partner ARNT. The complex then recognizes xenobiotic response elements (XREs) within the regulatory regions of target genes in order to activate transcription [18, 19].

A number of active ingredients within pesticide formulations act as ligands for AhR [20, 21]. For instance, Takeuchi and al. (2008) have characterized the AhR agonistic activity of more than 200 pesticides using a cell line that stably expresses an AhR responsive luciferase reporter gene. They showed that 11 pesticides (chlorpyrifos, diuron, prochloraz, acifluorfen-methyl, bifenoxy, isoxanthion, quinalphos, chlorpropham, diethofencarb, propanil, and linuron) behaved as AhR agonists. Similarly, a screen for putative activators of AhR using a chemical-activated luciferase gene expression (CALUX) assay confirmed that chlorpyrifos but also prochloraz and iprodione are *bona fide* AhR agonists since they were all capable of activating *CYP1A1* transcription [21].

Some xenobiotics, for example benzo(a)pyrene, are metabolized by CYP1A1 and CYP1B1, two cytochrome P450 enzymes, as well as an epoxide hydrolase that converts the compound into an even more toxic molecule, benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide [22]. This compound can cause adducts in DNA by binding the exocyclic N2-position of guanine. If these DNA adducts remain unrepaired, they can block cell division and cause mutations [23].

Another way through which CYP1 enzymes induced by the AhR pathway may cause DNA damage is through the enzymatic modification of estrogens. Indeed, CYP1A1 and CYP1B1 [24-26] can metabolize 17 β -estradiol (E2) into 2-hydroxyestradiol (2-OHE₂), and 4-hydroxyestradiol (4-OHE₂), respectively [27]. Previous reports have shown that 2-OHE₂ can inhibit cell cycle progression by activating, amongst others, p53 or the CHK1 checkpoint kinase whereas 4-OHE₂ possesses genotoxic properties [28-33]. Interestingly, studies have

shown that the estrogen-regulated transcription factor ER α is involved in a crosstalk with the AhR xenobiotic-response pathway at the level of transcriptional regulation of cytochrome p450 genes. ER α is a member of the nuclear receptors which are ligand-activated transcription factors [34]. It regulates the expression of genes in response to estrogen [35, 36]. Thus, ER α selectively represses *CYP1A1* but not the *CYP1B1* gene in cells treated with TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), a dioxin that is a well-established ligand for AhR [34, 37-40]. Our laboratory has further shown that Dnmt3B, a DNA methyltransferase, is involved in the specific repression of *CYP1A1*. In fact, Dnmt3B specifically methylates the XRE3 response element upstream of the *CYP1A1* gene, which causes its transcriptional repression [41]. As a result, the cellular CYP1B1/CYP1A1 ratio is modified, and consequently the ratio of the estrogen metabolites is also modified leading to an accumulation of genotoxic 4-OHE₂.

Thus, when exposed to xenobiotics such as dioxins, and potentially a large number of pesticides, cells activate the AhR pathway, which promotes detoxification but it could also paradoxically create DNA damage, either directly or indirectly. Accordingly, another potential cellular response to xenobiotics exposure could be the DNA damage response. When cells are insulted by genotoxic agents, they will activate pathways that block cell cycle progression and repair DNA damage [42]. If the damage is too extensive, cells will undergo programmed cell death [43]. One of the cellular responses to DNA damage is the activation of a checkpoint that is controlled by the p53 tumor suppressor [44-46]. This pathway can regulate the expression of genes involved in major cellular pathways such as cell cycle control, apoptosis and DNA repair in order to maintain proper genome integrity [45, 47, 48]. For instance, to investigate how the cell cycle is affected by DNA damage, one can investigate levels of certain marker proteins such as ATM (p-S1981), p53(p-S15), and p21 that are all involved in the p53 pathway, as well as γ -H2A.X, which marks DNA damage foci (38). ATM (p-S1981) is an autophosphorylation mark that is rapidly triggered by DNA damage. The ATM kinase is also responsible, to a certain extent, of the phosphorylation of serine 15 on p53 [49-51], which is a

phosphorylation mark typical of p53 activation [52, 53]. p21 is a major cyclin-dependent kinase inhibitor implicated in cell cycle arrest [13, 46].

In this work we wanted to evaluate the propensity of different pesticides to interact positively or negatively with each other to activate the AhR and p53 signalling pathways. To achieve this, five active ingredients found within commercially sold pesticides were chosen based on two criteria: (1) their chemical structure, and (2) their use in agricultural practices. For the structures, we chose pesticides having at least one aromatic cycle, which may bind to the AhR ligand-binding domain [54, 55]. We also chose pesticides that are currently banned in the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) countries but still widely used in Canada and the US. The first one, bromoxynil, is an herbicide that inhibits photosynthesis and affects oxidative phosphorylation. It is typically used on wheat, barley and oat cultures [56]. LD50 for bromoxynil in rats is 190 mg/kg for an oral absorption [57]. The second and the third one, carbaryl and chlorpyrifos, are both insecticides that inhibit acetylcholinesterase. They are both widely used on some cultures such as corn and apples [56]. LD50 for chlorpyrifos in rats is 135 mg/kg for an oral absorption and LD50 for carbaryl in rats is 300 mg/kg for an oral absorption [57]. The fourth one, linuron, is an herbicide that inhibits photosynthesis. It is commonly used on potatoes, oats, carrots, and soya [56]. LD50 for linuron in rats is 4000 mg/kg for an oral absorption [57]. The last one, thiabendazole, is a fungicide that inhibits fungal microtubular function [58]. It is usually used on citrus fruits and corn seeds to prevent putrefaction [56]. LD50 for thiabendazole in rats is over 3330 mg/kg for an oral absorption [57].

Pesticides are commonly used in combination, however there are very few studies that have addressed the effects of these combinations on cells. Using these pesticides in combination, we were able to show that all of the pesticides could activate the AhR pathway, while only a few could activate p53. Most of the pesticides, in combination, exhibit a strong synergistic effect on the induction of the *CYP1A1* gene, while no significant effects could be observed on

the DNA damage response when combined together at low concentrations. The significance of these findings are discussed.

Materiel and methods

Chemicals and reagents

17 β -Estradiol (E2), daunorubicin, camptothecin, Tween-20, paraformaldehyde and all active ingredients of pesticides, bromoxynil, carbaryl, chlorpyrifos, linuron and thiabendazole, were purchased from Sigma-Aldrich. Bovine serum albumin (BSA) and sucrose were purchased from Bioshop.

Cell culture and treatments

MCF-7 cells were maintained in DMEM medium (Wisent) supplemented with 10% FBS (Wisent) and 1% Pen/Strep (Invitrogen) at 37°C in a humid environment containing 5% CO₂. For chemical treatment of cells, cells were transferred into 6-well plates with 500 000 cells per well with 2mL of DMEM medium. After 24 hours of culture, medium was replaced with DMEM medium containing active ingredients of pesticides diluted in DMSO. After 24 hours of treatment, cells were lysed and lysates kept at -20°C until further processing.

Cross-talk experiments were performed as described previously [41] between AhR and ER α , after the first 24 hours of culture, culture media was replaced with phenol red-free DMEM (Wisent) containing 10% FBS that was previously stripped using activated charcoal (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions and 1% Pen/Strep (Invitrogen). After 48

hours in stripped DMEM (Wisent), culture media was replaced with stripped DMEM containing active ingredients of pesticides diluted in DMSO and supplemented or not with 10nM 17 β -estradiol diluted in DMSO. After 24 hours of treatment, cells were lysed and kept at -20°C until further processing.

qRT-PCR

Human *CYP1A1*, *CYP1B1* and *p21* mRNAs were quantified by qRT-PCR using *36B4* as an internal control. Total RNA was extracted from cultured cells using EZ-10 DNAaway RNA Miniprep Kit (BioBasic) and reversed transcribed using M-MuLV reverse transcriptase (Enzymatics). Primers are listed in Table 1.

Table 1. qRT-PCR primers

Fwd 36B4	CGACCTGGAAGTCCAACTAC
Rev 36B4	ATCTGCTGCATCTGCTTG
Fwd CYP1A1	TGAACCCCAGGGTACAGAGA
Rev CYP1A1	GGCCTCCATATAGGGCAGAT
Fwd CYP1B1	AACGTACCGGCCACTATCAC
Rev CYP1B1	CCACGACCTGATCCAATTCT
Fwd p21	GGAGACTCTCAGGGTCGAAA
Rev p21	GGATTAGGGCTTCCTCTTGG

Immunoblotting

MCF-7 cells treated or not with chemicals, washed with cold PBS, harvested and resuspended in RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na-

deoxycholate, 0.2% SDS, 1mM DTT, 1X PMSF) and disrupted by passing five times through a 23G1 needle. Lysis was performed for 1h at 4°C with continuous agitation. The cell solution was then sonicated under 50% power for 5 s. The lysate was cleared by centrifugation at 14 000 rpm for 10 minutes at 4°C. All the antibodies used are listed in Table 2.

Table 2. Antibodies

	Manufacturers	Catalog numbers	Applications
Actin	Sigma	A2066	WB
ATM	Bethyl	A300-299A	WB
ATM-pS1981	Abcam	ab81292	WB
H2A.X-pS139	Cell signaling	9718	IF
p53	Santa Cruz	sc-6243	WB
p53-pS15	Cell signaling	9284S	WB

Immunofluorescence

MCF-7 cells were grown on coverslips. Cells were fixed with 3% paraformaldehyde in 2% sucrose solution for 15 minutes at room temperature. Then, cells were permeabilized with ice-cold 0.5% Triton-X100 in PBS on ice for 5 minutes, blocked in 3% BSA and 0.05% Tween-20 in PBS prior to incubation with primary antibodies. After 4 washes with 0.05% Tween-20 in PBS, cells were incubated with secondary antibodies. DAPI solution (1µg/mL) was used for nuclei staining. Coverslips were mounted onto microscope slides using ProLong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies). All the antibodies used are listed in Table 2.

Images were taken using a Zeiss AxioObserver Z1 with a 63X/1.4 oil objective, a Zeiss AxioCam 506 camera and the Zeiss Zen 2 software. Image pre-processing and segmentation were performed with the open source software CellProfiler (version 2.2) [59].

Results

Induction of *CYP1A1* by active ingredients found in pesticides

Since some active ingredients within pesticides were previously shown to act as AhR ligands [20, 21], we first decided to investigate their ability to activate *CYP1A1* transcription through the AhR pathway in the MCF-7 breast cancer cell line. To assess this, we measured the expression of the *CYP1A1* gene (a commonly used marker to measure the extent of induction of the AhR pathway [11, 60, 61]) by qRT-PCR after treatment of cells with various concentrations of all the active ingredients for 24 hours. The results (Fig 2.1) show that bromoxynil, carbaryl, chlorpyrifos, linuron, and thiabendazole can all significantly activate *CYP1A1* to various extents as their respective concentrations are increased.

A combination of active ingredients can activate *CYP1A1* synergistically

As mentioned previously, pesticides are commonly used in combination in agricultural fields thus leading to a variety of different chemicals in the environment. Some active ingredients have been significantly studied as single agents [20, 62-64], but the effects of a combination of active ingredients are still largely unknown. This led us to investigate how a combination of active ingredients can affect the AhR signalling pathway.

First, a mix of three active ingredients containing 20µM carbaryl, 40 µM chlorpyrifos, 25 µM linuron, and all possible combinations of these active ingredients was tested (Fig 2.2A). As previously shown in Fig 2.1, all active ingredients alone activate *CYP1A1*. In all combinations tested that contained linuron, the induction of *CYP1A1* was lower than the addition of the effect of each pesticide alone. This led us to believe that linuron has a negative effect on the

induction potential of the other pesticides tested. In fact, only the combination without linuron has an additive effect on the activation of the AhR pathway.

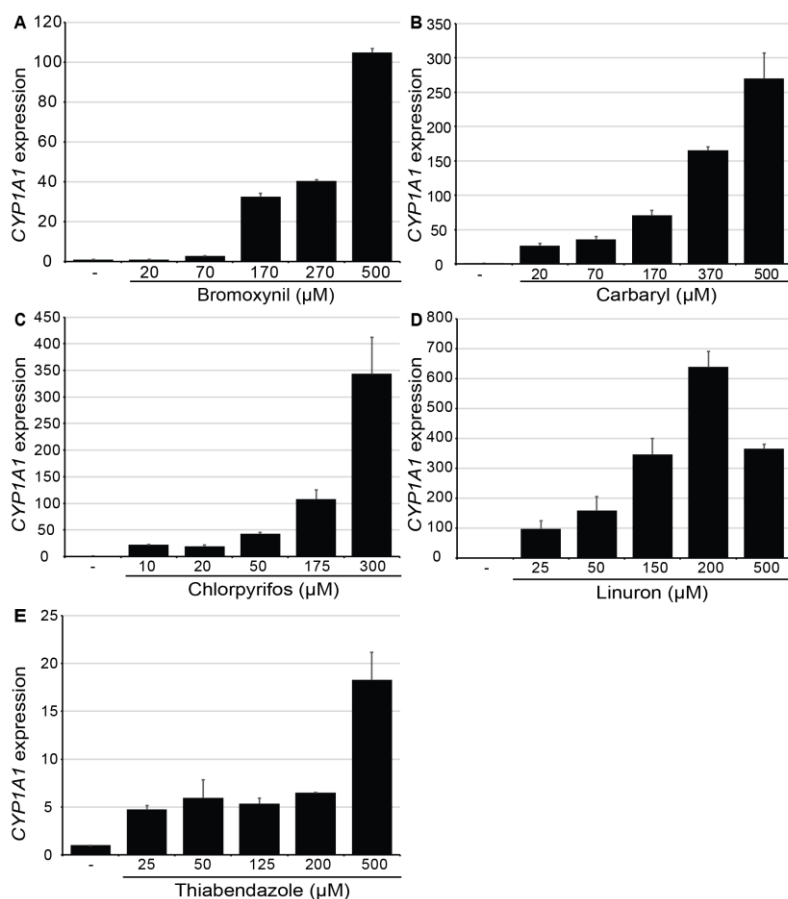


Fig 2.1. Pesticides activates *CYP1A1* expression in MCF-7 cells.

CYP1A1 mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h, and then treated with (A) bromoxynil, (B) carbaryl, (C) chlorpyrifos, (D) linuron and (E) thiabendazole for 24h while "-" corresponds to DMSO treated samples. Single biological replicates are shown here because the activation fold was not constant in that cell type. However, strong activation of *CYP1A1* transcription was observed in all experiments by all active agents of pesticides tested. Experiment were performed 3 times independently and 2 additional biological replicates are represented in S2.1 Fig.

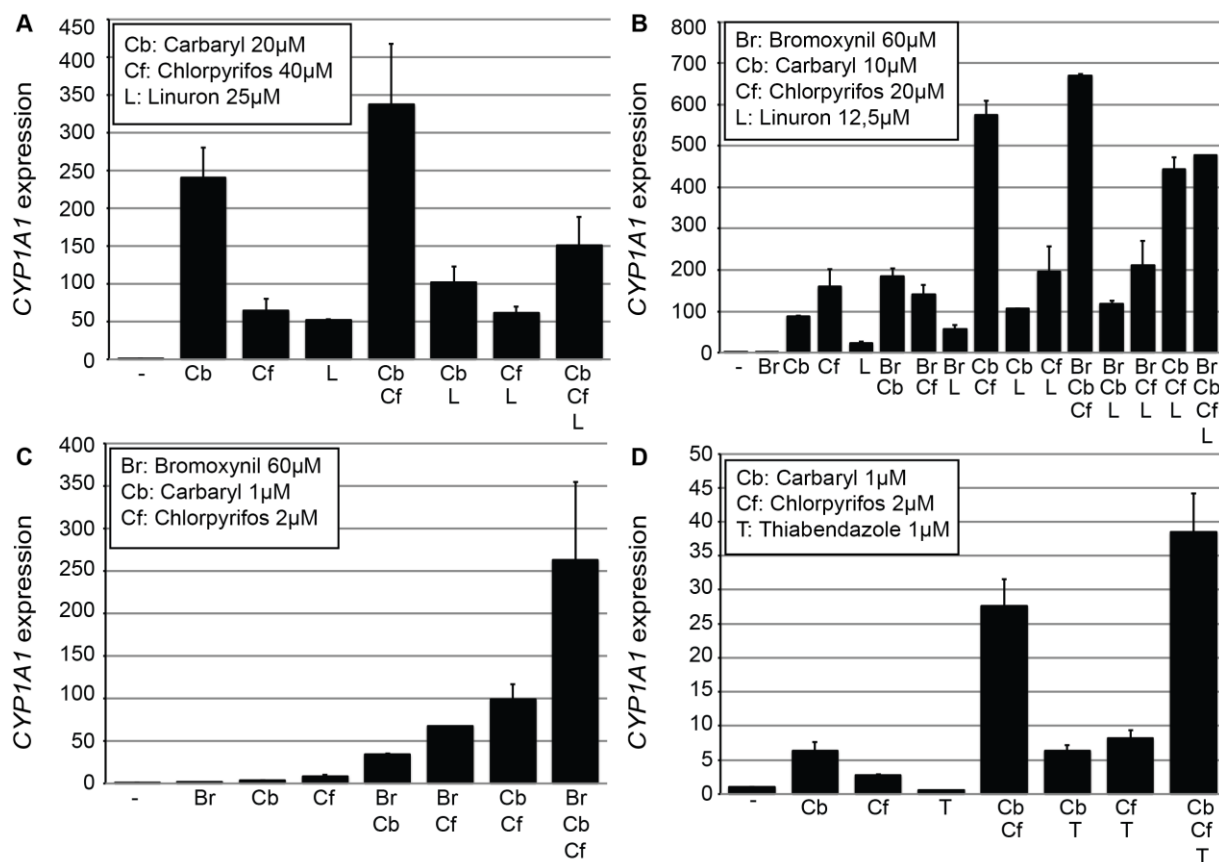


Fig 2.2. Combinations of pesticides can have a synergistic effect on the expression of *CYP1A1*.

CYP1A1 mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h and then treated with every possible combination containing (A) 20μM carbaryl, 40μM chlorpyrifos and 25μM linuron, (B) 60μM bromoxynil, 10μM carbaryl, 20μM chlorpyrifos and 12.5μM linuron, (C) 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 60μM bromoxynil and (D) 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 1μM thiabendazole for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples. Single biological replicates are shown here because the activation fold was not constant in that cell type. However, strong activation of *CYP1A1* transcription was observed in all experiments by all active agents of pesticides tested. Experiment were performed 3 times independently and 2 additional biological replicates are represented in S2.2 Fig.

Since addition of linuron to the other chemicals appeared to cancel out their induction potential on *CYP1A1*, we next aimed to create another experimental setup by adding 60 μ M bromoxynil while halving the concentration of the other components leading to a final mix containing 60 μ M bromoxynil, 10 μ M carbaryl, 20 μ M chlorpyrifos, and 12.5 μ M linuron. Once again, all possible combinations and every active ingredient alone were tested on MCF-7 cells (Fig 2.2B). As expected, all active ingredients alone led to the induction of *CYP1A1*. Our results further demonstrate that some combinations lead to an additive effect whereas other combinations lead to a synergistic effect. In fact, the combination of chlorpyrifos and linuron, chlorpyrifos and bromoxynil, linuron and carbaryl, chlorpyrifos, linuron and bromoxynil and finally linuron, carbaryl and bromoxynil all led to an additive activation of the AhR pathway. Moreover, the combination of chlorpyrifos and carbaryl, linuron and bromoxynil, carbaryl and bromoxynil and finally chlorpyrifos, carbaryl and bromoxynil all led to a synergistic activation of the AhR pathway. However, addition of linuron to the synergistic combinations still had an inhibitory effect on CYP1A1 expression levels. Those two combinations are chlorpyrifos, carbaryl and linuron as well as carbaryl, chlorpyrifos, linuron and bromoxynil. All things considered, we can conclude that linuron still has an inhibitory effect on the other chemicals' ability to activate *CYP1A1*, but this effect is less pronounced when the concentration of linuron is lower. In addition, we were able to demonstrate that no matter what the combination of active ingredients were, the effect on the activation of the AhR pathway is always greater than the effect of a single active ingredient.

Next, we wanted to test what happens when we exclude linuron of the mixture because of its potential inhibitory effect on the other chemicals while lowering the concentrations by 10-fold of the carbaryl and chlorpyrifos chemicals. To achieve this, MCF-7 cells were treated for 24 hours with all possible combinations of 60 μ M bromoxynil, 1 μ M carbaryl and 2 μ M chlorpyrifos and every active ingredient alone (Fig 2.2C). The concentration of bromoxynil was kept the same since its activation potential at a lower concentration would have been lost

in the background during the course of our qRT-PCR assays. While *CYP1A1* induction was virtually undetectable when exposed to single agents, it was strongly enhanced by combinations of two pesticides and this was even more pronounced when cells were treated with a cocktail of the 3 compounds at low concentrations. Our results show that every combination, without exception, all led to synergistic activation of the AhR pathway. Interestingly, combinations that were previously shown to activate AhR in a synergistic manner are even more synergistic when their concentrations are reduced. Likewise, the combination of chlorpyrifos and bromoxynil that was previously shown to activate AhR in an additive manner activates AhR in a strong synergistic manner under these conditions.

Finally, since the concentration of bromoxynil is higher than the concentration used for the other pesticides, we wanted to test what happens when we substitute bromoxynil with thiabendazole. As with our other experiments, MCF-7 cells were treated for 24 hours with all possible combinations of 1 μ M thiabendazole, 1 μ M carbaryl and 2 μ M chlorpyrifos and every active ingredient alone (Fig 2.2D). Again, all combinations led to synergistic activation of the AhR pathway except for the combination of chlorpyrifos and thiabendazole which led to an additive activation of *CYP1A1*, and carbaryl combined to thiabendazole that did not show any significant effect.

Taken together, our results show that several pesticides have the ability not only to act as AhR agonists, but also when at low concentration, can synergize together and strongly induce AhR signalling.

ER α represses *CYP1A1* in the presence of estradiol in cells treated with active ingredients either alone or in combination

It was previously shown that the ER α transcription factor selectively represses *CYP1A1*, but not *CYP1B1* in the presence of estradiol in MCF-7 cells treated with TCDD, a dioxin that is an AhR ligand [40, 41]. That suggests that there is a modification in the *CYP1A1/CYP1B1* ratio and therefore that there is a change in the estrogen metabolite ratio leading to an accumulation of genotoxic 4-OHE2. We aimed to investigate if the pesticides mentioned above would have the same effect as TCDD [28, 40] on the ability to elicit ER α -dependent repression of *CYP1A1*. To test this, we measured the expression of *CYP1A1* and *CYP1B1* by qRT-PCR after treatment of cells with thiabendazole, carbaryl and chlorpyrifos, and a combination of those three pesticides either in presence or absence of estradiol for 24 hours in MCF-7 cells pre-grown in hormone-free media for 48 hours (Fig 2.3). Linuron was not tested because of its inhibitory effect, and bromoxynil also was not tested because of its low activation potential at 20 μ M, the concentration used in pesticide combination experiments.

In the presence of estradiol, *CYP1A1* was repressed in all treatments compared to the cells grown in the absence of estradiol. On the other hand, the levels of *CYP1B1* did not change significantly either in the presence or in the absence of estradiol except for the treatment with thiabendazole and the combination of thiabendazole and carbaryl, where *CYP1B1* was slightly increased. That suggests that thiabendazole affects a different pathway than carbaryl and chlorpyrifos. One explanation could be that thiabendazole, in presence of E2, could activate the expression of an activator of *CYP1B1* that has no effect on *CYP1A1*. It also means that treatment with thiabendazole induces a bigger change in the ratio of *CYP1A1/CYP1B1*, therefore, leading to a higher accumulation of 4-OHE2.

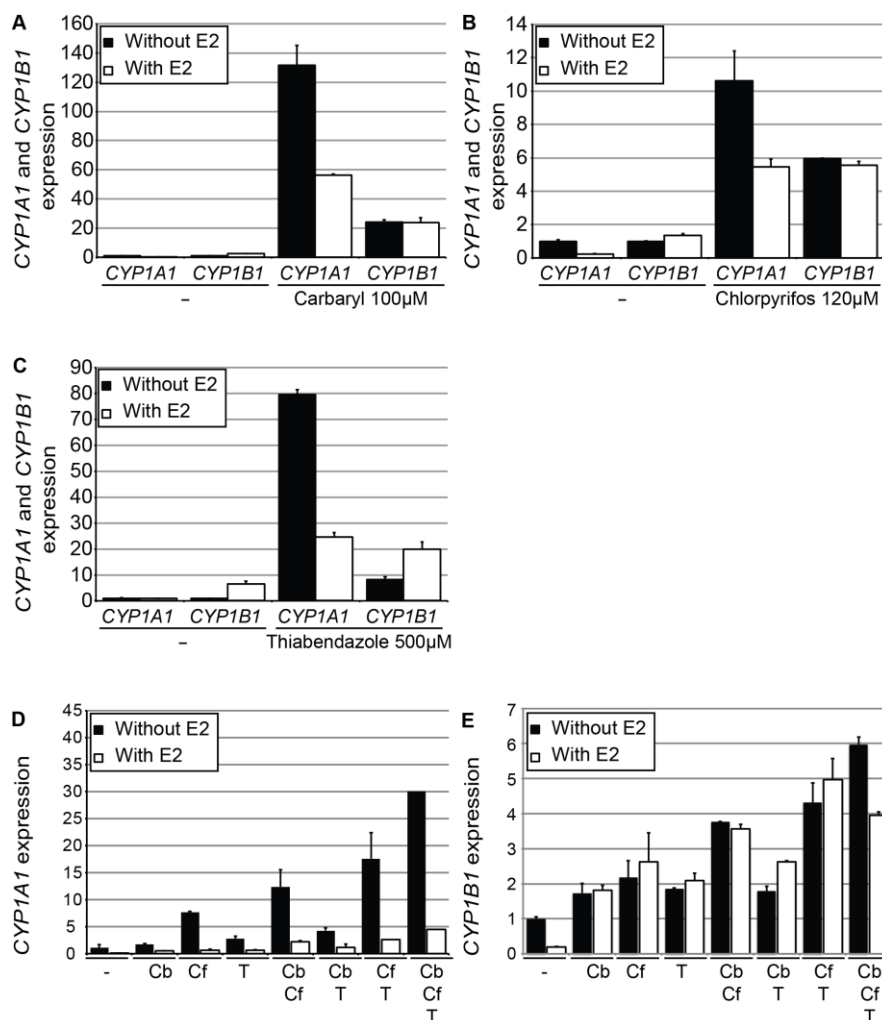


Fig 2.3. ER α specifically represses *CYP1A1* expression in MCF-7 cells treated with pesticides.

CYP1A1 and *CYP1B1* mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in estrogen-free media supplemented with FBS 10 % for 2 days and then treated with (A) 100mM carbaryl, (B) 120mM chlorpyrifos, (C) 500mM thiabendazole, and every possible combination of 1µM carbaryl, 2µM chlorpyrifos and 1µM thiabendazole (D) *CYP1A1* and (E) *CYP1B1* with and without estradiol for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples. Single biological replicates are shown here because the activation fold was not constant in that cell type. However, strong activation of *CYP1A1* transcription was observed in all experiments by all active agents of pesticides tested. Experiment were performed 3 times

independently and 2 additional biological replicates are represented in S2.3 and S2.4 Fig, respectively.

Taken together, our results suggest that the tested active ingredients allow ER α to selectively repress *CYP1A1*, as it does when cells are exposed to the dioxin TCDD [39-41], and they also suggest that a combination of pesticides can mediate similar effects.

Specific pesticides can activate the p53-dependant cellular stress pathway

Certain xenobiotics have previously been documented to induce a p53-dependent cellular stress response [13]. We wanted to test whether our selected pesticides could also individually induce a p53-dependent stress response but also more importantly, we wanted to test if the pesticides, when at low concentrations and in a mixture (conditions that strongly activate the AhR pathway), would also induce that stress response. To address this, we first monitored levels of serine 15 (S15) phosphorylation within p53, which is an event that stabilizes p53 and also serves as a marker for its activation [65]. Levels of ATM serine 1981 (S1981) phosphorylation were also monitored, which is the kinase that phosphorylates p53 at serine 15 in response to DNA damage [49, 50]. Thus, we carried out immunoblotting experiments using protein extracts from MCF-7 cells treated with individual pesticides as indicated at concentrations that efficiently induce *CYP1A1* alone (S2.5 Fig, left panel), or in combination but at much lower concentration where we observe synergy on *CYP1A1* activation (right panel). We also used the DNA damaging agents daunorubicin and camptothecin as positive controls in our experiments since they can both efficiently induce the p53 pathway [53, 66-68]. Our results show that carbaryl, linuron, and bromoxynil can significantly trigger p53 S15 and ATM S1981 phosphorylation, whereas chlorpyrifos and thiabendazole cannot. In contrast, p53 and ATM total protein levels were unchanged by our treatments. None of the mixed pesticides could induce p53 S15 or ATM S1981 phosphorylation.

To further substantiate our results obtained with p53 S15 and ATM S1981 phosphorylation, we next measured expression of the p53 target gene *p21* under the same conditions as in S2.5 Fig by qRT-PCR. The results of Fig 2.4 show that bromoxynil, carbaryl and linuron can all activate *p21* to various extents, whereas chlorpyrifos and thiabendazole cannot (not shown for thiabendazole). We have also tested our mixture of pesticides and were not able to observe significant *p21* induction (Fig 2.4).

Taken together, our results suggest that it is possible to strongly induce the AhR pathway without significantly inducing a p53 cellular stress response when pesticides are at low concentrations.

Carbaryl, linuron, and bromoxynil can cause DNA damage

Since certain active ingredients can induce the p53 cellular stress pathway, we wanted to verify whether they could also cause DNA damage, either alone or combined at low concentrations. To evaluate this, we checked for the presence of histone variant H2A.X phosphorylated on serine residue 139 (γ -H2A.X) foci in the nucleus, a well-established indicator of DNA damage, which is rapidly gaining traction as a biomarker in ecotoxicological assays of water supplies [69-71]. We carried out immunofluorescence experiments using MCF-7 cells treated with individual pesticides at concentrations that efficiently induce *CYP1A1* alone, or in combination but at much lower concentration where we previously observed synergistic *CYP1A1* activation (Fig 2.5). The genotoxic agents daunorubicin and camptothecin were employed as positive controls in our experiment. Our results demonstrate that only carbaryl, linuron and bromoxynil (Fig 2.5, S2.8) cause significant DNA damage whereas chlorpyrifos, thiabendazole and all the mixes of pesticides at low concentrations cannot (S2.9 Fig).

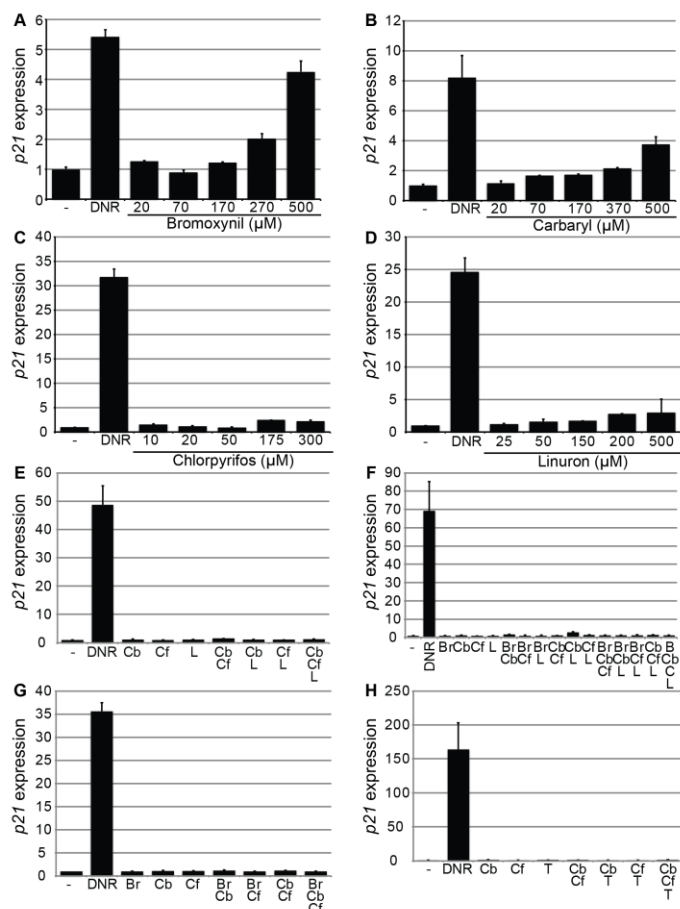


Fig 2.4. Carbaryl, linuron and bromoxynil activate *p21* expression in MCF-7 cells.

p21 mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h and then treated with (A) bromoxynil, (B) carbaryl, (C) chlorpyrifos, (D) linuron, and with every possible combinations containing (E) 20μM carbaryl, 40μM chlorpyrifos and 25μM linuron, (F) 60μM bromoxynil, 10μM carbaryl, 20μM chlorpyrifos and 12.5μM linuron, (G) 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 60μM bromoxynil and (H) 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 1μM thiabendazole for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples. Single biological replicates are shown here because the activation fold was not constant in that cell type. However, strong activation of CYP1A1 transcription was observed in all experiments by all active agents of pesticides tested. Experiment were performed 3 times independently and 2 additional biological replicates are represented in S2.6 and S2.7 Fig, showing the pesticides alone and the combinations respectively.

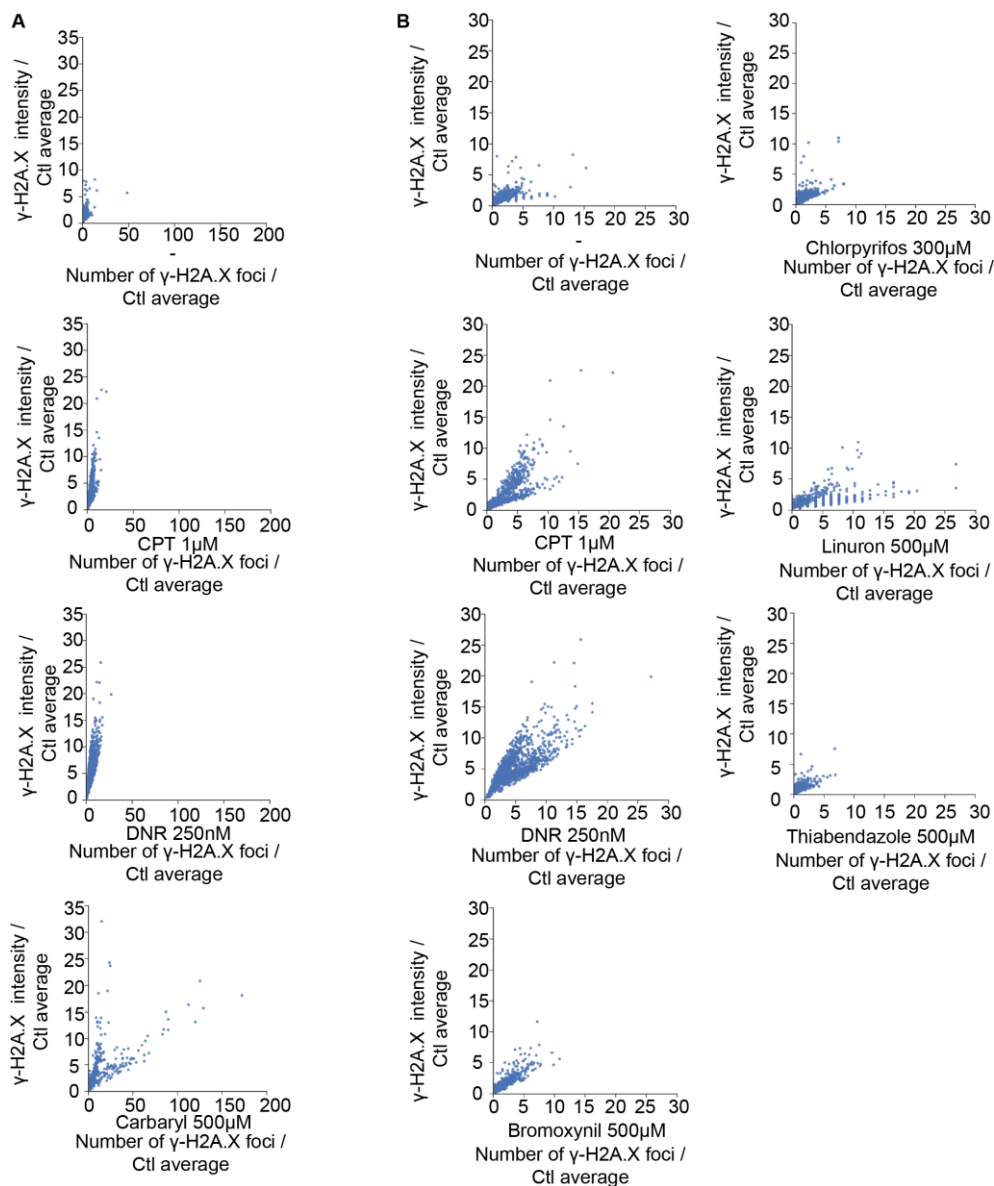


Fig 2.5. Carbaryl, linuron and bromoxynil cause DNA damage.

γ -H2A.X foci were observed by immunofluorescence on MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 48h and treated with (A) DMSO, camptothecin 1 μ M (CPT), daunorubicin 250nM (DNR) and carbaryl 500 μ M, (B) DMSO, camptothecin 1 μ M (CPT), daunorubicin 250nM (DNR), bromoxynil 500 μ M, chlorpyrifos 300 μ M linuron 500 μ M and thiabendazole 500 μ M for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples. Results of DMSO, DNR and CPT are the same on both panels of this figure but with a different scale to facilitate comparison with bromoxynil, chlorpyrifos, linuron and thiabendazole.

Discussion

Our study reveals that five active ingredients found in commonly used pesticides in agricultural practices can efficiently induce *CYP1A1* gene expression. Since all of these chemicals thus constitute potential *bona fide* AhR ligands, we surmised, for example, that the activation potential of *CYP1A1* would be comparable whether we have 5X concentration of one ingredient (ligand), or 1X concentration of five different ingredients. In a more biologically relevant context, this prediction could then signify that tens, even hundreds of AhR ligand found at very low concentrations within the environment could have a very significant effect on AhR signalling when combined together. Accordingly, our results show that, when at low concentrations, several pesticides do not significantly activate AhR – as opposed to when they are at higher concentration – but when combined to other pesticides they can have a very significant effect on AhR activation. Depending on the concentration range that we used with our active ingredients, we either observed additive or synergistic effects on *CYP1A1* induction. However, in most experimental conditions tested, linuron tended to have an inhibitory effect on the potential of the other pesticides to exhibit synergistic effects. The mechanism by which this inhibition occurs remains to be determined, but it is conceivable that linuron somehow binds the ligand-binding domain of AhR more efficiently than the other pesticides, and somehow exhibits a sort of ‘squenching’ effect. Squenching in this case would be defined as saturating the ligand binding domain of AhR with a very weak K_D such as no other pesticide can efficiently compete with that putative ligand, and thus subsequently prevent synergy by allowing multiple interactions between AhR and the transcriptional machinery. This however would need to be addressed in a more formal fashion but remains a worthy future research venue.

Another important issue that we wished to address pertained to whether or not different pesticides (or a mixture thereof) could also have the potential to perturb estrogen metabolism, as TCDD does [39-41]. Our findings reveal that indeed these different chemicals can

inevitably lead to changes in the CYP1A1/CYP1B1 ratio. The impact of this scenario is significant since it suggests that a great deal of different pesticides within the environment have the potential to activate the AhR pathway, and even though certain combinations of these chemicals may not be directly genotoxic themselves, they may still increase the frequency of DNA damaging events by perturbing estrogen metabolism. However, we observe that under conditions where our mixture of pesticides is diluted and acts synergistically to induce the AhR pathway, the p53-dependent cellular stress response is not significantly induced. In fact, even at higher concentrations, only carbaryl, linuron, and bromoxynil produce detectable DNA damage and induce p53 activation. The concentration of pesticides that we used are 1000X greater than what can be detected in surface waters [72]. These results could mean that under conditions that most likely represent concentrations of xenobiotics found within the environment, we would not be able to detect a global and significant stress response within cells. We note however that most current measurement methods of cellular stress (*e.g.* activation of the p53 pathway) rely on massive global changes (such as protein phosphorylation) as measured by immunoblotting techniques etc. Those methods may not be well suited to detect less dramatic changes caused by lower concentrations of pesticides. It is thus likely that DNA damaging events do indeed occur under our experimental conditions but our analytical methods simply are not sensitive enough to detect the damage.

Taken together, we describe a system where different pesticides can have differential effects on cell signalling pathways. Moreover, these different chemicals have the ability to significantly affect cells when they are at low concentration. This paves the way for many future studies where we will focus on defining how xenobiotics contained either within water sources or agricultural soils, have the ability to perturb signalling pathways, such as the AhR pathway.

References

1. Abass K, Lamsa V, Reponen P, Kublbeck J, Honkakoski P, Mattila S, et al. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*. 2012;294(1):17-26. doi: 10.1016/j.tox.2012.01.010. PubMed PMID: 22310298.
2. Otto S, Loddo D, Baldoin C, Zanin G. Spray drift reduction techniques for vineyards in fragmented landscapes. *Journal of environmental management*. 2015;162:290-8. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.07.060. PubMed PMID: 26265598.
3. Ma Q, Wauchope RD, Rojas KW, Ahuja LR, Ma L, Malone RW. The pesticide module of the Root Zone Water Quality Model (RZWQM): testing and sensitivity analysis of selected algorithms for pesticide fate and surface runoff. *Pest management science*. 2004;60(3):240-52. doi: 10.1002/ps.790. PubMed PMID: 15025236.
4. De Schamphelre M, Nuyttens D, De Keyser D, Spanoghe P. Evaporation drift of pesticides active ingredients. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 2008;73(4):739-42. PubMed PMID: 19226822.
5. Fox GA, Malone R, Sabbagh GJ, Rojas K. Interrelationship of macropores and subsurface drainage for conservative tracer and pesticide transport. *Journal of environmental quality*. 2004;33(6):2281-9. PubMed PMID: 15537951.
6. Mansilha C, Melo A, Ferreira IM, Pinho O, Domingues V, Pinho C, et al. Groundwater from infiltration galleries used for small public water supply systems: contamination with pesticides and endocrine disruptors. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2011;87(3):312-8. doi: 10.1007/s00128-011-0337-5. PubMed PMID: 21681400.
7. Xie HQ, Xu T, Chen Y, Li Y, Xia Y, Xu SL, et al. New perspectives for multi-level regulations of neuronal acetylcholinesterase by dioxins. *Chemico-biological interactions*. 2016. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.030. PubMed PMID: 27374124.
8. De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Di Virgilio A, Chiarotti F, et al. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;108(2):311-9. doi: 10.1093/toxsci/kfp017. PubMed PMID: 19190125.
9. Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Rodriguez H, Cao G, et al. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016;156:1-9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.10.010. PubMed PMID: 26518068.

10. Kahl VF, da Silva J, da Silva FR. Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. *Mutation research*. 2016;791-792:19-26. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2016.08.003. PubMed PMID: 27566293.
11. Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1995;35:307-40. doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.001515. PubMed PMID: 7598497.
12. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(23):23847-50. doi: 10.1074/jbc.R400004200. PubMed PMID: 15028720.
13. Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prosperi E. Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of toxicology*. 2015;89(2):155-78. doi: 10.1007/s00204-014-1430-4. PubMed PMID: 25514883.
14. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2003;43:309-34. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828. PubMed PMID: 12540743.
15. Marlowe JL, Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;96(6):1174-84. doi: 10.1002/jcb.20656. PubMed PMID: 16211578.
16. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(12):801-14. PubMed PMID: 25568920; PubMed Central PMCID: PMC4401080.
17. Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annual review of immunology*. 2014;32:403-32. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245. PubMed PMID: 24655296.
18. Swanson HI. DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chemico-biological interactions*. 2002;141(1-2):63-76. PubMed PMID: 12213385.
19. Gasiewicz TA, Henry EC, Collins LL. Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2008;18(4):279-321. PubMed PMID: 18652561.

20. Takeuchi S, Iida M, Yabushita H, Matsuda T, Kojima H. In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere*. 2008;74(1):155-65. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.08.015. PubMed PMID: 18835618.
21. Long M, Laier P, Vinggaard AM, Andersen HR, Lynggaard J, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology*. 2003;194(1-2):77-93. PubMed PMID: 14636698.
22. Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*. 2007;20(9):1331-41. doi: 10.1021/tx700107z. PubMed PMID: 17702526; PubMed Central PMCID: PMC2423818.
23. Christmann M, Boisseau C, Kitzinger R, Berac C, Allmann S, Sommer T, et al. Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res*. 2016. doi: 10.1093/nar/gkw873. PubMed PMID: 27694624.
24. Belous AR, Hachey DL, Dawling S, Roodi N, Parl FF. Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer research*. 2007;67(2):812-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2133. PubMed PMID: 17234793.
25. Go RE, Hwang KA, Choi KC. Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;147:24-30. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.003. PubMed PMID: 25448748.
26. Dawling S, Hachey DL, Roodi N, Parl FF. In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chemical research in toxicology*. 2004;17(9):1258-64. doi: 10.1021/tx0498657. PubMed PMID: 15377160.
27. Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer letters*. 2005;227(2):115-24. doi: 10.1016/j.canlet.2004.10.007. PubMed PMID: 16112414.
28. Coumoul X, Diry M, Robillot C, Barouki R. Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer research*. 2001;61(10):3942-8. PubMed PMID: 11358810.

29. Newbold RR, Liehr JG. Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer research*. 2000;60(2):235-7. PubMed PMID: 10667565.
30. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine reviews*. 2000;21(1):40-54. doi: 10.1210/edrv.21.1.0386. PubMed PMID: 10696569.
31. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2000;(27):67-73. PubMed PMID: 10963620.
32. Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2000;(27):75-93. PubMed PMID: 10963621.
33. Gong QF, Liu EH, Xin R, Huang X, Gao N. 2ME and 2OHE2 exhibit growth inhibitory effects and cell cycle arrest at G2/M in RL95-2 human endometrial cancer cells through activation of p53 and Chk1. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;352(1-2):221-30. doi: 10.1007/s11010-011-0757-x. PubMed PMID: 21344307.
34. Macpherson L, Matthews J. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription by resveratrol or kaempferol is independent of estrogen receptor alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer letters*. 2010;299(2):119-29. doi: 10.1016/j.canlet.2010.08.010. PubMed PMID: 20846786.
35. Tecalco-Cruz AC, Ramirez-Jarquín JO. Mechanisms that Increase Stability of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer. *Clinical breast cancer*. 2016. doi: 10.1016/j.clbc.2016.07.015. PubMed PMID: 27561704.
36. Kulkoyluoglu E, Madak-Erdogan Z. Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer. *Steroids*. 2016;114:41-7. doi: 10.1016/j.steroids.2016.06.007. PubMed PMID: 27394959.
37. Mandal PK. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*. 2005;175(4):221-30. doi: 10.1007/s00360-005-0483-3. PubMed PMID: 15900503.

38. Whitlock JP, Jr. Induction of cytochrome P4501A1. Annual review of pharmacology and toxicology. 1999;39:103-25. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103. PubMed PMID: 10331078.
39. Kietz S, Feng S, Agoulnik A, Hombach-Klonisch S. Estrogen and TCDD influence RLN2 gene activity in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1160:367-73. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.03836.x. PubMed PMID: 19416221.
40. Kharat I, Saatcioglu F. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. The Journal of biological chemistry. 1996;271(18):10533-7. PubMed PMID: 8631852.
41. Marques M, Laflamme L, Gaudreau L. Estrogen receptor alpha can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2013;41(17):8094-106. doi: 10.1093/nar/gkt595. PubMed PMID: 23828038; PubMed Central PMCID: PMC3783176.
42. Warmerdam DO, Kanaar R. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. Mutation research. 2010;704(1-3):2-11. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.12.001. PubMed PMID: 20006736.
43. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell. 1995;80(2):293-9. PubMed PMID: 7834749.
44. Pflaum J, Schlosser S, Muller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. Frontiers in oncology. 2014;4:285. doi: 10.3389/fonc.2014.00285. PubMed PMID: 25374842; PubMed Central PMCID: PMC4204435.
45. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? Nature reviews Cancer. 2009;9(10):714-23. doi: 10.1038/nrc2716. PubMed PMID: 19730431.
46. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:170325. doi: 10.1155/2012/170325. PubMed PMID: 22911014; PubMed Central PMCID: PMC3403320.
47. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell. 2009;137(3):413-31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037. PubMed PMID: 19410540.

48. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *The Biochemical journal*. 2015;469(3):325-46. doi: 10.1042/BJ20150517. PubMed PMID: 26205489.
49. Lavin MF, Kozlov S. ATM activation and DNA damage response. *Cell cycle*. 2007;6(8):931-42. doi: 10.4161/cc.6.8.4180. PubMed PMID: 17457059.
50. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. 1998;281(5383):1677-9. PubMed PMID: 9733515.
51. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998;281(5383):1674-7. PubMed PMID: 9733514.
52. Meek DW. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1049-56. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.027. PubMed PMID: 15279792.
53. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001;268(10):2764-72. PubMed PMID: 11358490.
54. Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism*. 2011;12(2):198-212. PubMed PMID: 21395538.
55. Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemical research in toxicology*. 2008;21(1):102-16. doi: 10.1021/tx7001965. PubMed PMID: 18076143; PubMed Central PMCID: PMC2572005.
56. Gorse I, Laverdière C, Grégoire F, Québec (Province). Ministère de l'environnement (1998-), Institut national de santé publique du Québec. Direction de la toxicologie humaine. Répertoire des principaux pesticides utilisés au Québec. Sainte-Foy: Publications du Québec; 2002. x, 476 p. p.
57. IPCS - International Programme on Chemical Safety. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. Genève: World Health Organization; 2009. 81 p.

58. Santovito A, Cervella P, Delpero M. In vitro aneugenic effects of the fungicide thiabendazole evaluated in human lymphocytes by the micronucleus assay. *Archives of toxicology*. 2011;85(6):689-93. doi: 10.1007/s00204-010-0606-9. PubMed PMID: 20938648.
59. Kamentsky L, Jones TR, Fraser A, Bray MA, Logan DJ, Madden KL, et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics*. 2011;27(8):1179-80. doi: 10.1093/bioinformatics/btr095. PubMed PMID: 21349861; PubMed Central PMCID: PMC3072555.
60. L'Heritier F, Marques M, Fauteux M, Gaudreau L. Defining molecular sensors to assess long-term effects of pesticides on carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(9):17148-61. doi: 10.3390/ijms150917148. PubMed PMID: 25257533; PubMed Central PMCID: PMC4200861.
61. Safe S, Wormke M. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chemical research in toxicology*. 2003;16(7):807-16. doi: 10.1021/tx034036r. PubMed PMID: 12870882.
62. Tang J, Cao Y, Rose RL, Brimfield AA, Dai D, Goldstein JA, et al. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29(9):1201-4. PubMed PMID: 11502728.
63. Boronat S, Casado S, Navas JM, Pina B. Modulation of aryl hydrocarbon receptor transactivation by carbaryl, a nonconventional ligand. *The FEBS journal*. 2007;274(13):3327-39. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05867.x. PubMed PMID: 17553063.
64. Price RJ, Scott MP, Walters DG, Stierum RH, Groten JP, Meredith C, et al. Effect of thiabendazole on some rat hepatic xenobiotic metabolising enzymes. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2004;42(6):899-908. doi: 10.1016/j.fct.2004.01.013. PubMed PMID: 15110098.
65. Loughery J, Cox M, Smith LM, Meek DW. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(12):7666-80. doi: 10.1093/nar/gku501. PubMed PMID: 24928858; PubMed Central PMCID: PMC4081099.
66. Come MG, Skladanowski A, Larsen AK, Laurent G. Dual mechanism of daunorubicin-induced cell death in both sensitive and MDR-resistant HL-60 cells. *British journal of cancer*.

1999;79(7-8):1090-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6690174. PubMed PMID: 10098741; PubMed Central PMCID: PMCPMC2362243.

67. Stojak M, Lukawska M, Oszczapowicz I, Opydo-Chanek M, Mazur L. Cell-cycle disturbance and induction of programmed death by new formamidine analogs of daunorubicin. *Anticancer research*. 2014;34(12):7151-8. PubMed PMID: 25503143.

68. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(10):789-802. doi: 10.1038/nrc1977. PubMed PMID: 16990856.

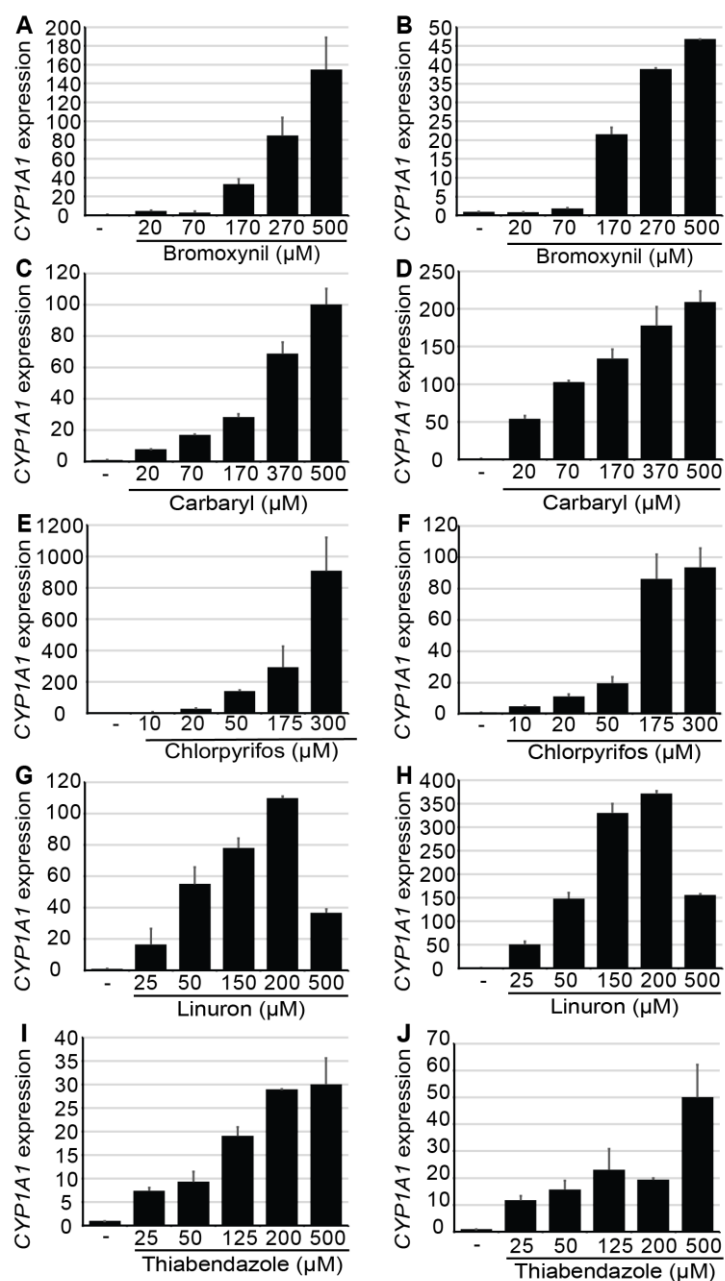
69. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(17):5678-94. doi: 10.1093/nar/gkn550. PubMed PMID: 18772227; PubMed Central PMCID: PMCPMC2553572.

70. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(10):5858-68. PubMed PMID: 9488723.

71. Geric M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V. gamma-H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2014;105:13-21. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.035. PubMed PMID: 24780228.

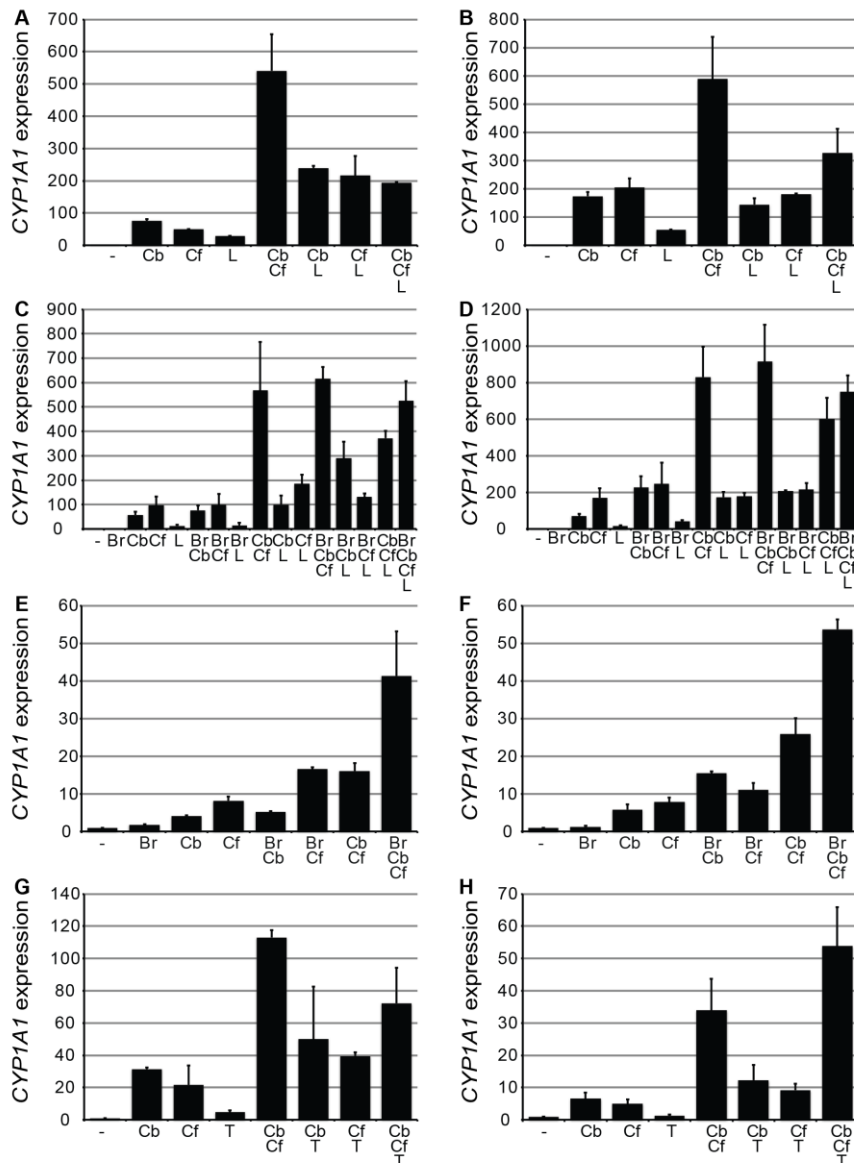
72. Giroux I. Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014: ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement; 2015 [cited 2017 Mars]. Available from: <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/flrivlac/pesticides.htm>.

Supporting information



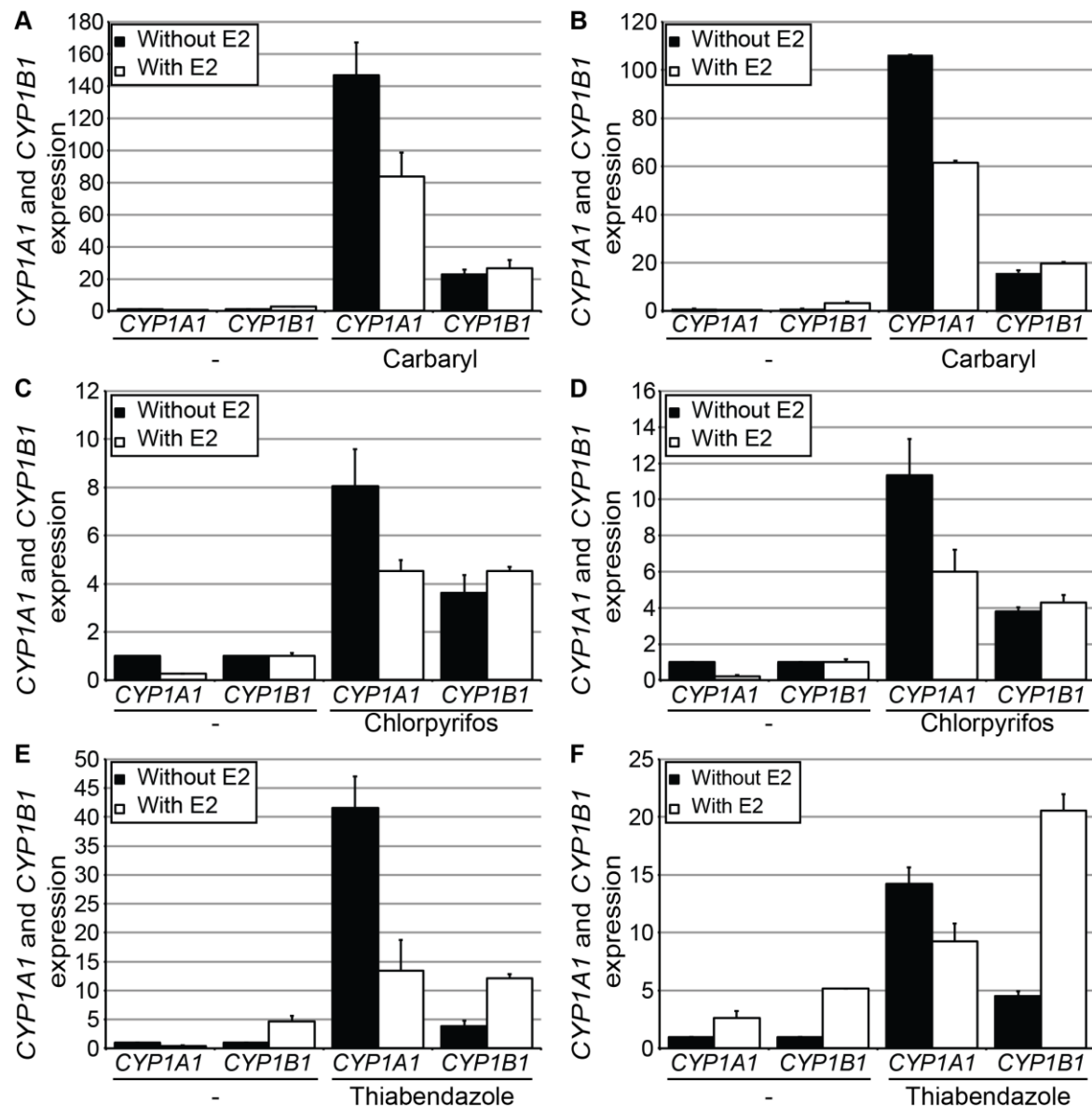
S2.1 Fig. Pesticides activate *CYP1A1* expression in MCF-7 cells.

CYP1A1 mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h, and then treated with (A,B) bromoxynil, (C,D) carbaryl, (E,F) chlorpyrifos, (G,H) linuron and (I,J) thiabendazole for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples.



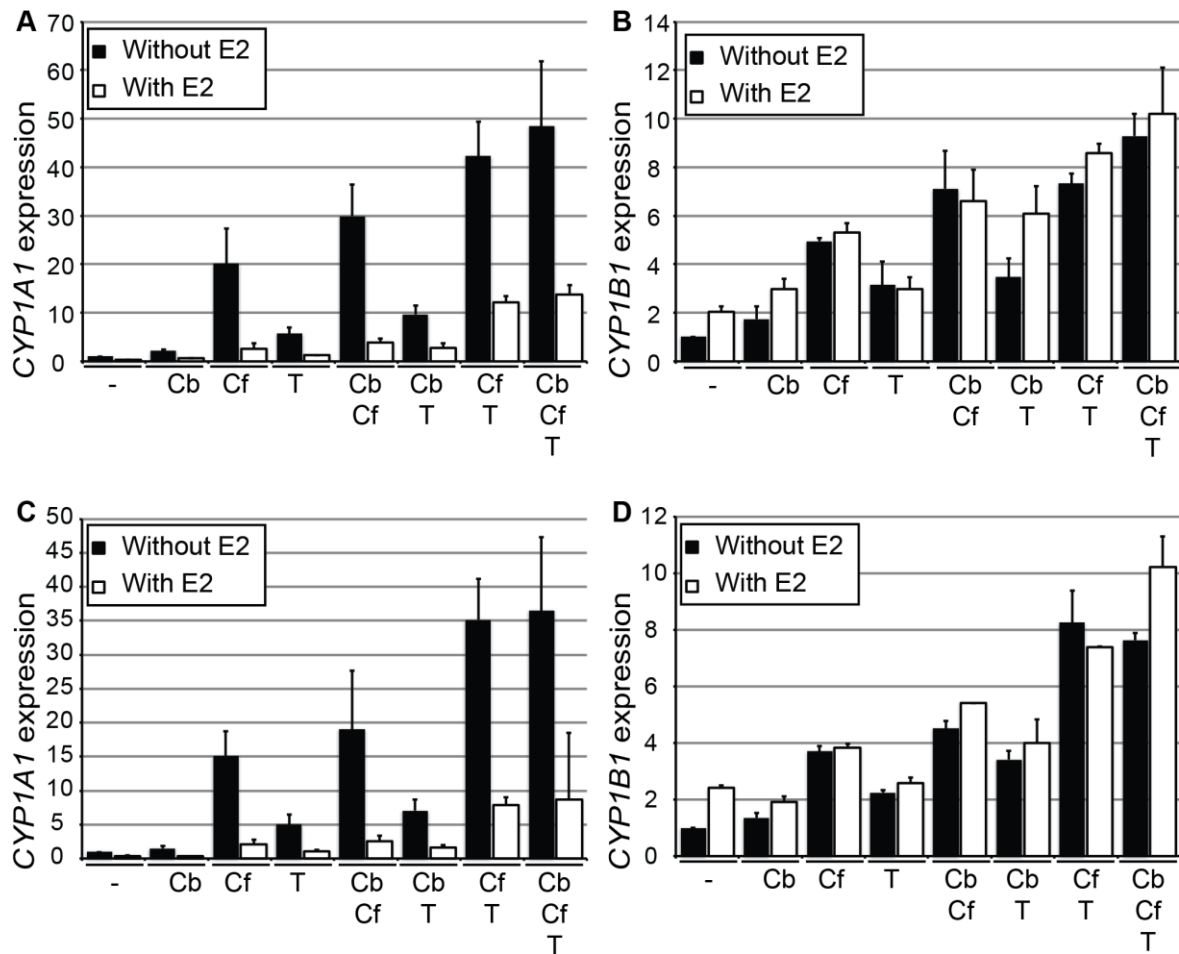
S2.2 Fig. Combination of pesticides can have a synergistic effect on the expression of *CYP1A1*.

CYP1A1 mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h and then treated with every possible combinations containing (A,B) 20μM carbaryl, 40μM chlorpyrifos and 25μM linuron, (C,D) 60μM bromoxynil, 10μM carbaryl, 20μM chlorpyrifos and 12.5μM linuron, (E,F) 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 60μM bromoxynil and (G,H) 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 1μM thiabendazole for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples.



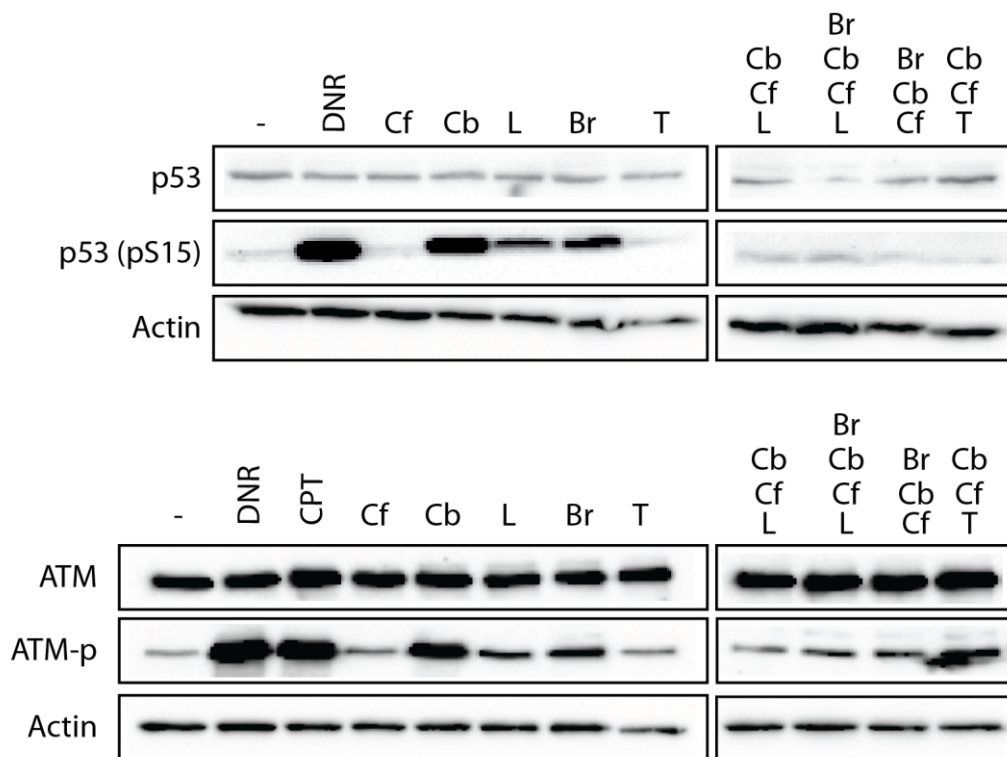
S2.3 Fig. ER α specifically represses *CYP1A1* expression in MCF-7 cells treated with single pesticides.

CYP1A1 and *CYP1B1* mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in estrogen-free media supplemented with FBS 10 % for 2 days and then treated with (A,B) 100mM carbaryl, (C,D) 120mM chlorpyrifos, (E,F) 500mM thiabendazole with and without estradiol for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples.



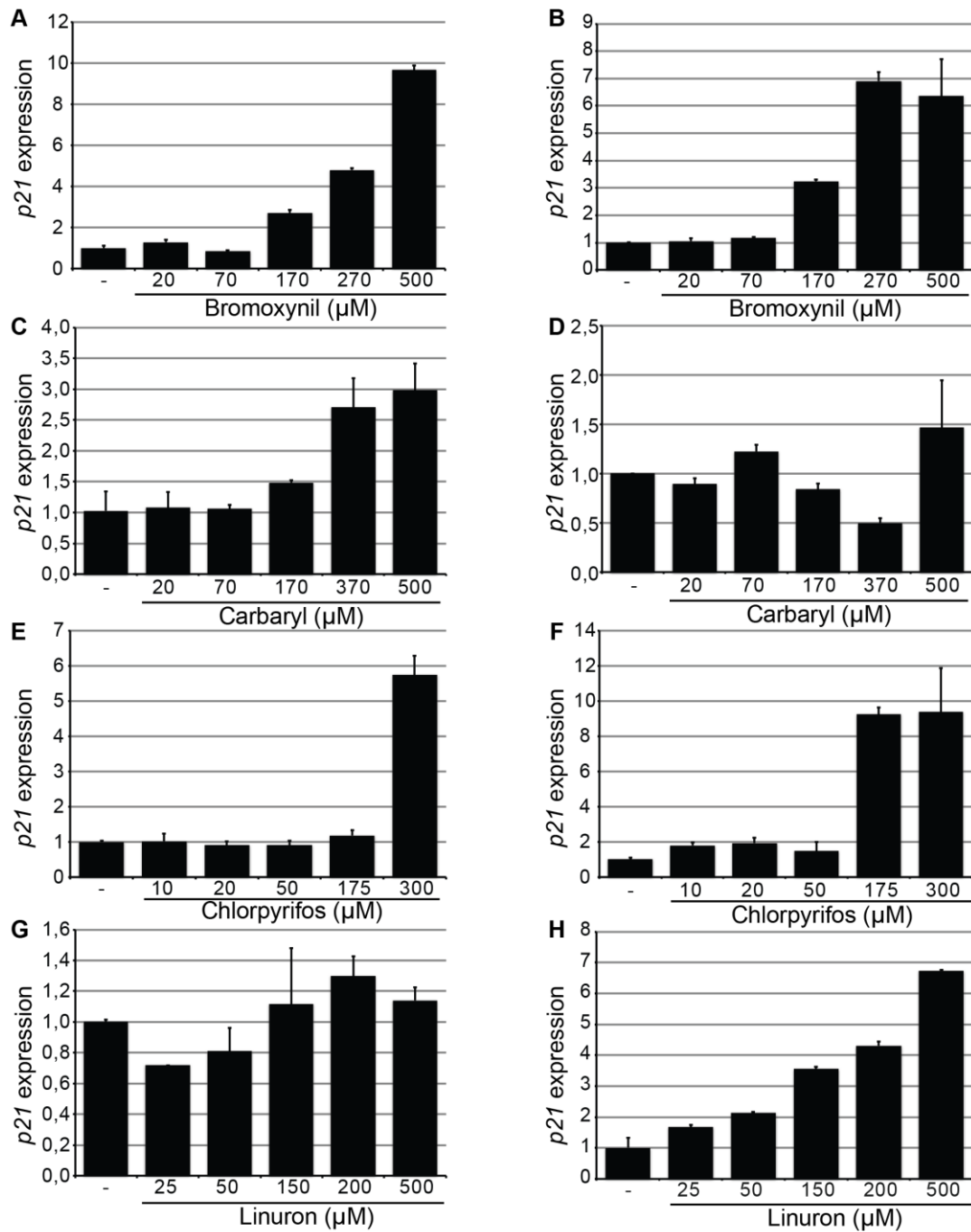
S2.4 Fig. Estrogen specifically represses *CYP1A1* expression in MCF-7 cells treated with pesticides combinations.

CYP1A1 and *CYP1B1* mRNA levels were quantified by RT-qPCR in MCF-7 cells grown in estrogen-free media supplemented with FBS 10 % for 2 days and then treated with every possible combination of 1 μ M carbaryl, 2 μ M chlorpyrifos and 1 μ M thiabendazole (A,C) *CYP1A1* and (B,D) *CYP1B1* with and without estradiol for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples.



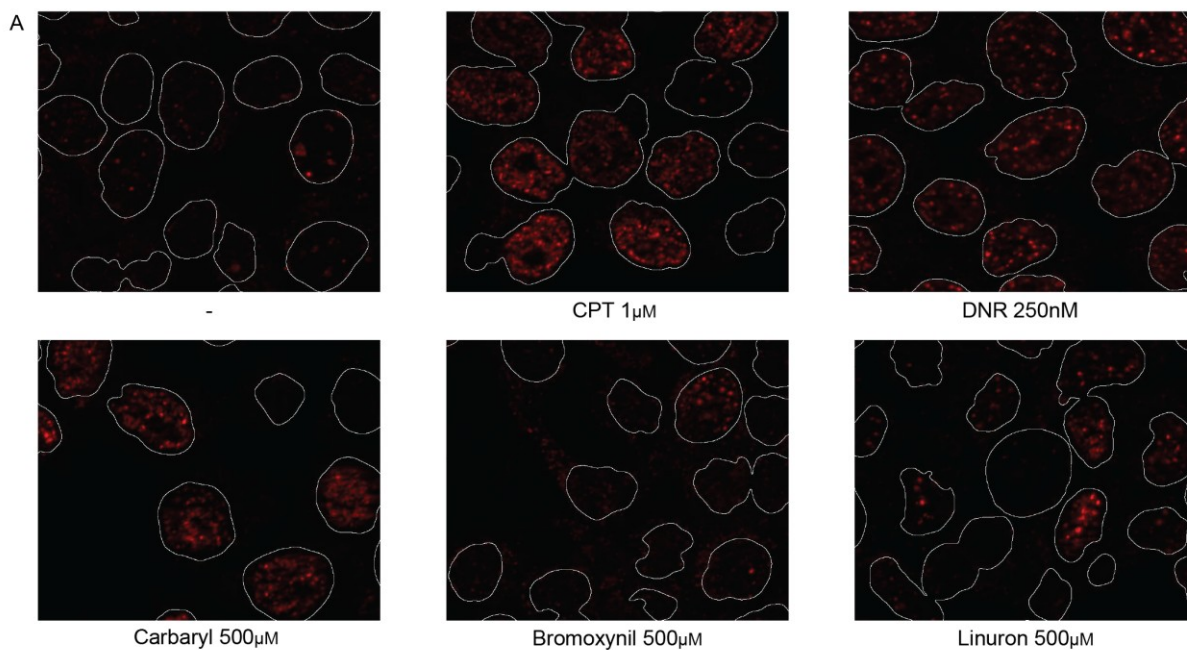
S2.5 Figure. Carbaryl, linuron and bromoxynil can activate the p53-dependent cellular stress pathway.

MCF-7 cells were grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h and then treated with daunorubicin 250nM (DNR), camptothecin 1 μ M (CPT), chlorpyrifos 300 μ M (Cf), carbaryl 500 μ M (Cb), linuron 500 μ M (L), bromoxynil 500 μ M (B), thiabendazole 500 μ M (T) and four combinations containing 20 μ M carbaryl, 40 μ M chlorpyrifos and 25 μ M linuron (Cf,Cb,L), or 60 μ M bromoxynil, 10 μ M carbaryl, 20 μ M chlorpyrifos and 12.5 μ M linuron (Cf,Cb,L,B), or 1 μ M carbaryl, 2 μ M chlorpyrifos and 60 μ M bromoxynil (Cf, Cb, B) and 1 μ M carbaryl, 2 μ M chlorpyrifos and 1 μ M thiabendazole (Cf, Cb,T) for 24h. Cells were subsequently lysed and protein extracts were analyzed by immunoblotting against the indicated proteins while "-" correspond to DMSO treated samples.



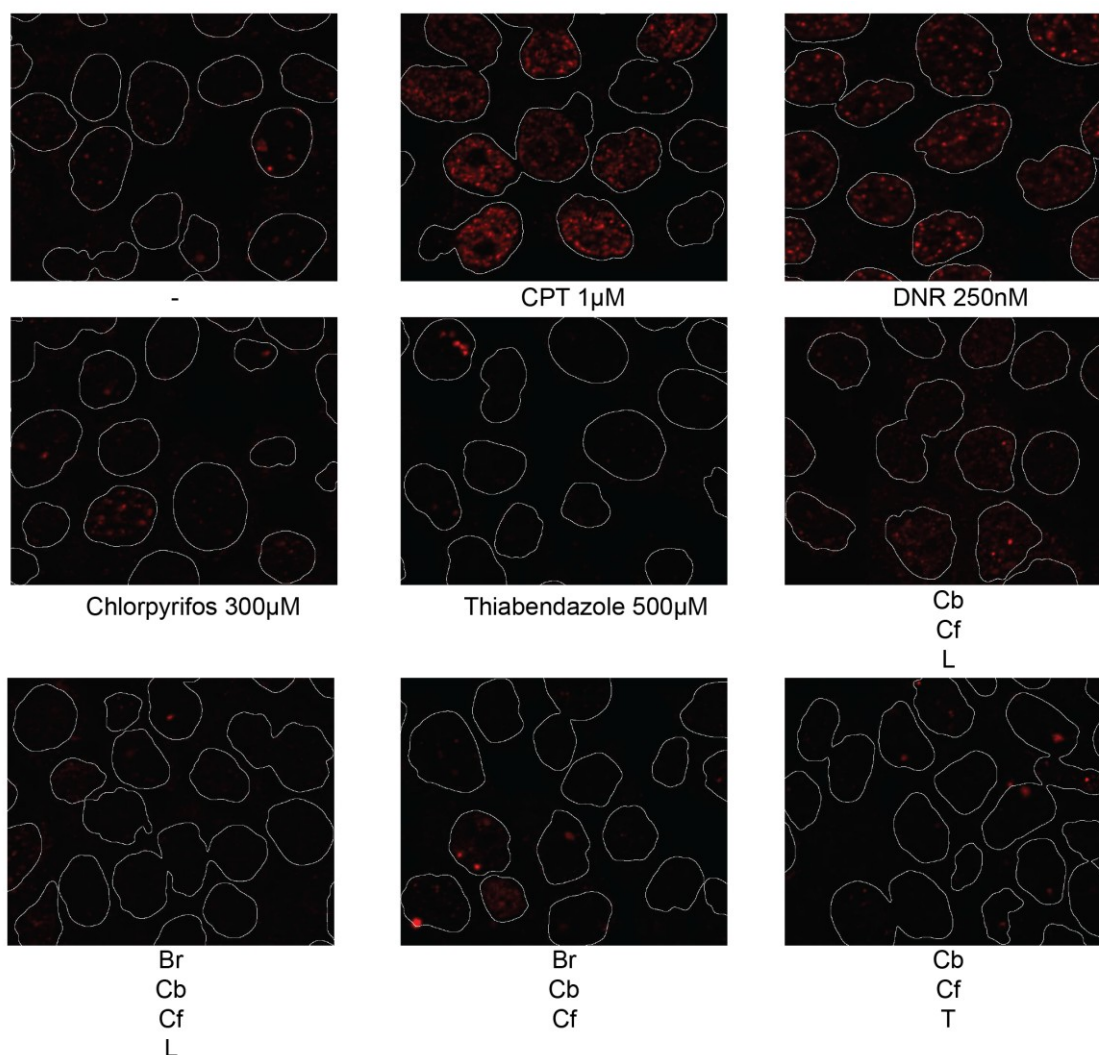
S2.6 Fig. Carbaryl, linuron and bromoxynil activate *p21* expression in MCF-7 cells.

p21 mRNA levels were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 24h and then treated with (A,B) bromoxynil, (C) carbaryl, (D,E) chlorpyrifos while "-" correspond to DMSO treated samples.



S2.8 Fig. Carbaryl, linuron and bromoxynil cause DNA damage.

γ -H2A.X foci were observed by immunofluorescence on MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 48h and treated with DMSO, camptothecin 1 μ M (CPT), daunorubicin 250nM (DNR), carbaryl 500 μ M, bromoxynil 500 μ M and linuron 500 μ M for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples.



S2.9 Fig. Chlorpyrifos, thiabendazole and pesticide active agents combinations do not cause DNA damage.

γ -H2A.X foci were observed by immunofluorescence on MCF-7 cells grown in DMEM media supplemented with FBS 10 % for 48h and treated with DMSO, camptothecin 1μM (CPT), daunorubicin 250nM (DNR), chlorpyrifos 300μM, thiabendazole 500μM and bromoxynil 500μM and four combinations containing 20μM carbaryl, 40μM chlorpyrifos and 25μM linuron (Cb,Cf,L), or 60μM bromoxynil, 10μM carbaryl, 20μM chlorpyrifos and 12.5μM linuron (Cb,Cf,L,B), or 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 60μM bromoxynil (Cb, Cf, B) and 1μM carbaryl, 2μM chlorpyrifos and 1μM thiabendazole (Cb, Cf,T) for 24h while "-" correspond to DMSO treated samples.

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

Le présent chapitre explique la méthodologie utilisée pour produire les résultats qui vous seront présentés dans le prochain chapitre.

3.1 SPE

Préparation des échantillons

Un échantillon de 500 ml d'eau a été prélevé dans la rivière Saint-François le 26 septembre 2016. Il a été filtré à 0,22 μm avec une chambre vide, puis 55 mg de Na_2EDTA ont été ajoutés. Le pH des échantillons a été ajusté entre 6,0 et 6,4.

Extraction

Les échantillons ont été extraits avec des cartouches d'extraction sur phase solide en phase inverse Strata-X de Phenomenex. Des volumes de 5 ml de MeOH et 5 ml d' H_2O ont été introduits dans les cartouches chacun leur tour à pression ambiante. Par la suite, l'échantillon a été introduit dans les cartouches avec un débit situé entre 2 et 4ml/minute. Les ballons ont été rincés avec de l' H_2O et l'eau de rinçage a été passée sur la colonne. Les cartouches ont été rincées deux fois avec de l' H_2O . La phase solide a été asséchée puis l'élution s'est fait avec un mélange 1 : 1 d'acétonitrile et de méthanol.

Reconstitution

Les extraits ont été évaporés avec un flux d'azote gazeux. Ensuite, 300 µl d'un mélange 1 : 1 MeOH et H₂O a été ajouté. Une centrifugation à 2500 rpm pendant 3 minutes a été faite puis le surnageant a été transféré dans des fioles. L'échantillon a été conservé à -20°C jusqu'à ce que l'analyse HPLC-MSMS soit faite.

3.2 Culture cellulaire

Les MCF7 proviennent du département de biologie de l'Université de Sherbrooke. Les MCF7 sont des cellules adhérentes provenant d'un adénocarcinome de cellules épithéliales de la glande mammaire. Les MCF7 ont été maintenues en culture dans du DMEM complet (Wisent), à 37 °C dans un environnement humidifié contenant 5 % de CO₂. Le milieu complet a été supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen) et 10% de FBS (Wisent). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations des contaminants extraits et concentrés de la rivière Saint-François ainsi qu'avec un mélange de 100 µM d'acétaminophène, 100 µM de roxithromycine et 100 µM de caféine (Sigma) tous dilués dans un mélange 1 : 1 MeOH et H₂O. Suite aux traitements, les cellules ont été incubées pendant 24h à 37 °C dans un environnement humidifié contenant 5% de CO₂. Les cellules ont par la suite été lysées puis conservées à -20 °C afin d'être analysées ultérieurement. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.

3.3 Extraction d'ARN

Le kit d'extraction EZ10 DNAaway RNA miniprep (Biobasic) a été utilisé. Les instructions fournies par le manufacturier ont été suivies, mais les modifications suivantes ont été

appliquées. Le volume de lysis buffer utilisé est de 300µl. La vitesse de centrifugation a été modifiée pour 13000 rpm pour chacune des centrifugations effectuées. L'élution de l'ARN a été effectuée dans 30 µl d'eau commerciale (Wisent). Le dosage des ARN a été effectué avec le nanodrop 1000. La concentration des ARN a été ajustée à 100 ng/µl.

3.4 Transcription inverse et PCR quantitative

La transcription inverse a été effectuée sur 500 ng d'ARN avec l'enzyme MMuLV Reverse Transcriptase (Enzymatics). 500 ng d'ARN, 0,5 µg de *random hexamer* et 2 ul d'eau stérile (Wisent) ont été mélangés dans un tube à PCR. Un préchauffage a été effectué à 72 °C pendant 15 minutes puis la température est redescendue à 4°C. À ce moment, il faut ajouter 2,5 ul de buffer 10X fourni avec l'enzyme (Enzymatics), 1,25 ul de dNTP 10 nM (Biobasic) et compléter avec de l'eau pour un volume final de 25 ul par tube. Le programme a été poursuivi à 42 °C pendant 60 min puis à 80 °C pendant 15 minutes. Lorsque le programme est terminé, une dilution 1:5 des ADNc a été faite.

Pour la qPCR, ajouter 5 ul d'ADNc, 10 ul de buffer 2X maison, 0,4 ul de dNTP 10 mM (Biobasic), 0,5 ul amorce 5 mM, 0,5 ul de Taq maison et compléter le volume à 20 ul pour chaque puits avec de l'eau. Le programme utilisé commence à 95°C pendant 2 minutes. Par la suite, 30 secondes à 90°C, 45 secondes à 62°C et 30 secondes à 72°C. Ce cycle est répété 35 fois. Par la suite, 30 secondes à 95°C et une augmentation de 5°C par 5 secondes en commençant à 65°C et en terminant à 95°C.

CHAPITRE 4

ACTIVATION DES GENES CYP PAR LES PESTICIDES PRESENTS DANS L'EAU DE LA RIVIERE SAINT-FRANÇOIS

Dans la deuxième partie de mon projet de maîtrise, j'ai travaillé en partenariat avec le laboratoire de mon co-directeur Pedro A. Segura afin de détecter les contaminants environnementaux, dont les pesticides, présents dans l'eau de rivière ainsi que de quantifier l'effet de ses contaminants sur les gènes *CYP*. Tout d'abord, Mathieu Racine, un étudiant à la maîtrise en chimie analytique dans le laboratoire de mon co-directeur, a développé une méthode pour concentrer et quantifier une cinquantaine de contaminants environnementaux présents dans les eaux de surfaces. Ainsi, dans l'échantillon de contaminants concentrés provenant de la rivière Saint-François, il a été montré qu'il y avait de l'acétaminophène, de la roxithromycine et de la caféine. L'acétaminophène est l'ingrédient actif présent dans les Tylenol et c'est un agent analgésique. Pour sa part, la roxithromycin est un antibiotique de la famille des macrolides qui sont surtout utilisés dans le traitement des bactéries gram positives (Ohtani et al., 2000). La caféine est le ingrédient actif du café et il est retrouvé dans la plupart des boissons gazeuses sur le marché ainsi que dans le thé et les boissons énergisantes, ce qui fait de lui une des "drogues" les plus consommées (Shi et al., 2016). La méthode de détection est toujours en optimisation au moment d'écrire ces lignes, donc il se peut que d'autres composés pharmaceutiques ou pesticides soient présents dans l'échantillon.

Lorsque l'analyse de la composition de l'échantillon a été faite, nous avons pu effectuer des tests afin de voir si les contaminants pouvaient activer la transcription des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. Ainsi, des cellules MCF-7 ont été traitées avec 4 concentrations différentes des contaminants provenant de l'eau de la rivière Saint-François; soit 1X, 5X, 10X ou 20X la concentration réelle retrouvée dans la rivière au moment de l'échantillonnage. Un mélange contenant les trois contaminants détectés dans l'analyse effectuée par Mathieu Racine, soit

100µM d'acétaminophène, 100µM de roxithromycine et 100µM de caféine, appelé MIX, ont aussi été utilisés dans l'expérience (Figure 4.1A et B). Ainsi, on peut observer que plus la concentration augmente, plus l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* augmentent. En effet, à partir de 10X la concentration réelle des contaminants de l'eau de surface, on voit une augmentation significative de l'expression du gène *CYP1A1*. Pour ce qui est du gène *CYP1B1*, on voit aussi une petite augmentation de l'expression. Les cellules traitées avec le MIX ne semblent pas avoir un changement d'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*.

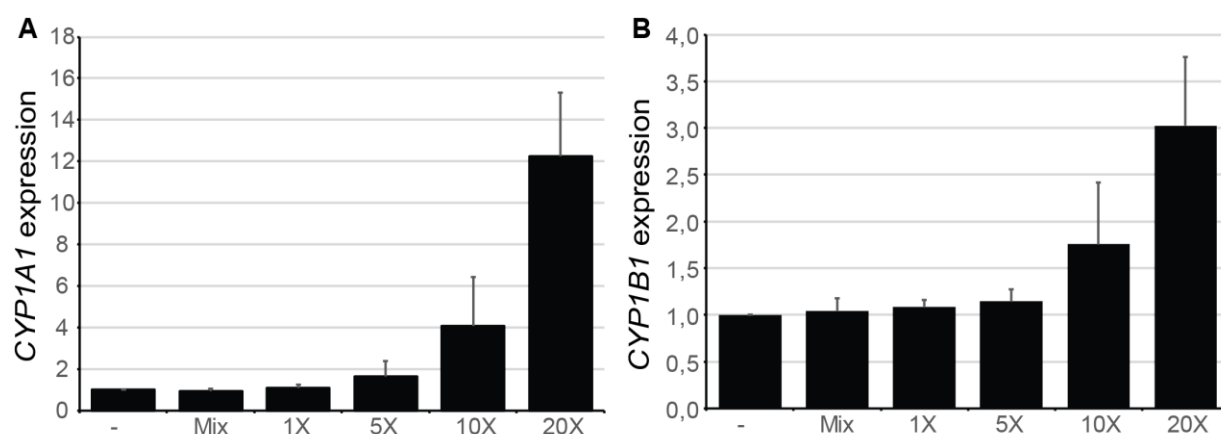


Figure 4.1 Les contaminants environnementaux activent l'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1* dans les cellules MCF-7. La quantité de ARNm des gènes *CYP1A1* (A) et *CYP1B1* (B) ont été quantifiés par qRT-PCR dans les cellules MCF-7 qui ont poussé dans du DMEM pendant 24 h, puis traité pendant 24h avec un MIX (100µM d'acétaminophène, 100µM de roxithromycine et 100µM de caféine) et les quatre concentrations des contaminants environnementaux.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Le début de l'étude des contaminants environnementaux date des années 1960. Cependant, il y a peu de méthodes efficaces pour le moment pour étudier les effets des pesticides sur les êtres vivants. La plupart des études sur les pesticides étudient leurs effets lorsqu'ils sont seuls. Cependant, il est peu commun qu'ils soient utilisés ainsi dans l'agriculture. La plupart du temps, les pesticides sont utilisés en combinaison afin que leurs effets soient combinés. Il y a très peu d'études de ce type dans la littérature en ce moment. Même le gouvernement étudie les effets des pesticides lorsqu'ils sont seuls lors de leur homologation (Santé Canada, 2004).

Les pesticides peuvent avoir plusieurs effets sur les cellules humaines. Il est connu que certains pesticides ont un effet sur les gènes *CYP* via AhR (Long et al., 2003; Takeuchi et al., 2008). Malgré qu'il y ait beaucoup d'ingrédients actifs composant les différents pesticides et que de nouveaux pesticides sont homologués chaque année (Santé Canada, 2004), ce n'est pas tous les pesticides qui ont déjà été étudiés. J'ai porté la première partie de ma maîtrise sur l'étude de cinq d'entre eux, soit le bromoxynil, le carbaryl, le chlorpyrifos, le linuron et le thiabendazole dans les MCF-7. Avec ces cinq pesticides, nous avons pu démontrer qu'ils permettaient tous l'activation d'AhR à différents niveaux lorsque leurs concentrations étaient élevées. En étudiant différentes combinaisons de ces pesticides à plus faibles concentrations, nous avons déterminé que celles-ci permettaient une activation qui pouvait être soit additive ou synergique selon les combinaisons. Il semble que plus les concentrations des différents pesticides qui composent les combinaisons sont faibles plus l'effet observé sur AhR est synergique. Cependant, nous avons remarqué que lorsque le linuron était présent dans les combinaisons étudiées, il semblait induire une activation moins grande que lorsqu'il n'était pas présent. Par exemple, nous pouvons observer dans la figure 3.2B que la combinaison

composée de chlorpyrifos 40µM et de carbaryl 20µM induit une plus grande activation que cette même combinaison à laquelle nous avons ajouté du linuron 25µM. Comme nous n'avons pas poussé plus loin l'étude de ce phénomène, je ne peux pas affirmer ce qui cause cet effet. Cependant, ce composé semble avoir un effet de "squelching", ce qui veut dire que le linuron inhibe son propre effet de facteur de transcription, il en résulte ainsi en une baisse de l'activation de AhR. Ce phénomène peut se produire lorsqu'un composé se retrouve en grande concentration dans la cellule (Schmidt et al., 2016).

Par la suite, nous avons voulu voir si on pouvait observer l'interaction croisée entre AhR et ERα avec une combinaison de pesticides. Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé que l'interaction croisée était observable avec les trois ingrédients actifs seuls, soit le carbaryl, le chlorpyrifos et le thiabendazole. Nous avons déterminé par la suite que l'interaction croisée était aussi détectable avec la combinaison des trois pesticides. Avec cette interaction croisée, il y a une diminution de l'expression du gène *CYP1A1*, alors que le gène *CYP1B1* reste inchangé. Cela amène le point qu'il est possible que le ratio entre les métabolites des enzymes CYP1A1 et CYP1B1, le 2-OHE2 et le 4-OHE2, soit changé. S'il est modifié, le ratio pourrait favoriser le 4-OHE2, qui est le métabolite cancérigène. Ainsi, les pesticides pourraient causer des dommages à l'ADN. Afin de confirmer cela, il faudrait quantifier les métabolites de l'estradiol. La méthode est présentement en optimisation, alors ce ne sont que des hypothèses pour le moment.

Cependant, il y a d'autres méthodes afin de vérifier si les pesticides peuvent causer des dommages à l'ADN. L'activation de la voie de signalisation de p53 permet de voir si l'ADN de la cellule a été endommagé. Dans cette voie de signalisation, il y a la protéine p21, dont l'expression est activée par la présence de grande quantité de p53. Nous avons démontré que seulement le bromoxynil, le carbaryl et le linuron permettent l'activation de l'expression de p21 par qRT-PCR dans les MCF-7. Afin de confirmer ce résultat, un immunobuvardage a été

effectué où les protéines p53 et ATM, non phosphorylés et phosphorylés en S15 et S1981 respectivement, ont été observés. Les protéines phosphorylées de p53 et ATM, ont été détectées pour le bromoxynil, le carbaryl et le linuron dans les MCF-7. Cela confirme donc que ces trois pesticides semblent activer le point de contrôle des dommages à l'ADN qui est contrôlé par p53. Ainsi, ils semblent que les pesticides peuvent engendrer des bris à l'ADN.

Afin de déterminer si les pesticides et les combinaisons causent des dommages à l'ADN, nous avons décidé d'effectuer une immunofluorescence ciblant la protéine γ -H2A.X. Avec cette expérience, nous avons pu déterminer que le carbaryl et le linuron sont les seuls pesticides qui, après un traitement de 24h, sont associés à la présence de la protéine γ -H2A.X. Ainsi, ce sont les deux seuls pesticides qui semblent causer des bris double brin dans les cellules. Cependant, le mécanisme expliquant comment ils causent ces dommages n'est pas connu. Par le fait même, nous ne savons pas non plus exactement quel type de dommages causent les pesticides. Seuls les bris doubles brins ont été étudiés au cours de ma maîtrise, mais il se pourrait que les pesticides puissent causer d'autres types de bris comme des bris simples brins. La réponse aux dommages à l'ADN est différente si ce sont des bris simple brin plutôt que des bris double brin. ATM ainsi que γ -H2A.X sont deux protéines qui sont impliquées dans la réponse au bris double brin. Alors, si les pesticides causent d'autre type de bris que ceux-ci, ces dommages ne seront pas nécessairement détectés par ces deux protéines. De plus, puisque les combinaisons de pesticides contiennent des pesticides à faibles concentrations, il est possible que la quantité de dommages à l'ADN causés par les combinaisons soit trop faible et que nous ne puissions pas détecter de dommages à l'ADN avec les méthodes que nous avons utilisées. Donc, l'option que les pesticides ainsi que les combinaisons causent des dommages à l'ADN n'est pas mise de côté. Afin de poursuivre l'étude des dommages à l'ADN, il faudrait en connaître davantage sur le mécanisme d'action causant ceux-ci en présence d'un seul ingrédient actif à la fois.

Pour la deuxième partie de ma maîtrise, en collaboration avec mon co-directeur Pedro Segura et Mathieu Racine, un de ses étudiants à la maîtrise, nous avons détecté des contaminants environnementaux dans l'eau de surface de la rivière Saint-François et nous avons pu déterminer leur effet sur AhR. La méthode de détection des contaminants permet de détecter les pesticides, mais aussi par exemple des composés pharmaceutiques et des molécules provenant de l'alimentation. Ainsi, grâce à cette méthode, nous élargissons notre étude des contaminants environnementaux en incluant d'autres composés que les pesticides. Ainsi, malgré que l'optimisation de la méthode ne soit pas tout à fait terminée, nous avons pu déterminer pour le moment que l'échantillon d'eau de la rivière Saint-François contenait de la caféine, de l'acétaminophène ainsi que la roxithromycine. Avec l'analyse sur les MCF-7, nous avons pu déterminer que les contaminants environnementaux permettent d'activer les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, ce qui signifie qu'AhR est activé. Cependant, dans cette expérience, un contrôle a été effectué en utilisant 100µM d'acétaminophène, 100µM de roxithromycine et 100µM de caféine provenant du commerce et nous avons montré que ce mélange ne permettait pas l'activation d'AhR. Ainsi, nous pouvons affirmer que l'échantillon de la rivière Saint-François contient d'autres contaminants environnementaux que ceux détectés précédemment.

Finalement, lors de la première partie de mon projet de maîtrise, les expériences avec les combinaisons ont seulement été effectuées avec des pesticides. De plus, notre étude portait sur des combinaisons qui comprenaient une quantité limitée de pesticides; soit entre 3 et 4 pesticides par combinaison. Cependant, dans cette deuxième partie, nous ne savons pas quel type de composé est présent dans notre échantillon d'eau de rivière. De plus, nous ne connaissons ni le nombre de contaminants environnementaux ni leur concentration. Ainsi, lorsque l'optimisation de la méthode de détection des contaminants environnementaux sera terminée, nous pourrons sûrement détecter plus de composés présents dans notre échantillon. Il ne faut cependant pas oublier qu'il est possible qu'un composé soit présent dans notre échantillon, mais qu'il soit en trop faible quantité pour pouvoir être détecté par la méthode. Comme nous avons démontré dans la première partie du projet, même en faible quantité, une

combinaison de ces contaminants peut avoir un effet sur AhR. Donc, il est possible que nous ne soyons pas capables de détecter et caractériser tous les contaminants qui ont permis d'obtenir l'activation d'AhR dans cet échantillon. Cependant, ce qui est important de prendre en considération, c'est que l'eau de la rivière Saint-François contient un ou plusieurs composés permettant l'activation d'AhR. Ainsi, il est possible que ce ou ces composés puissent causer des dommages à l'ADN, comme l'ont fait le carbaryl, le linuron et le bromoxynil dans la première partie de mon projet. Si ces composés sont en plus grande concentration ou si l'échantillon contient plus de composés que les combinaisons que nous avons testées, il est possible que nous soyons en mesure de détecter des dommages à l'ADN causés par l'échantillon d'eau de la rivière Saint-François.

Ainsi, au cours de ma maîtrise, j'ai pu déterminer que les pesticides étudiés permettent l'activation d'AhR, en étant seuls ou en combinaison. De plus, le bromoxynil, le carbaryl et le linuron permettent l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN, mais seulement le carbaryl et le linuron font des dommages à l'ADN.

CHAPITRE 6

PERSPECTIVES

Les perspectives de mon projet sont d'effectuer un RNA-seq afin de savoir exactement quels gènes sont affectés par les traitements avec les pesticides. Ainsi, nous pourrions savoir si tous les pesticides affectent les mêmes gènes ou si les gènes affectés changent selon les pesticides utilisés. De plus, avec les combinaisons, nous pourrions essayer de mieux comprendre leurs effets sur l'organisme.

De plus, il faudrait effectuer un dosage des métabolites de l'estradiol, le 2-OHE2 et le 4-OHE2. Il serait donc possible d'analyser l'impact que le changement du ratio entre les gènes *CYP1A1/CYP1B1* a sur le ratio entre ces deux métabolites. Si le ratio des métabolites change, cela pourra expliquer en partie comment les pesticides peuvent augmenter les chances de développer un cancer.

Pour la partie sur les dommages à l'ADN, je crois qu'il serait intéressant de trouver deux ou trois autres pesticides qui, à haute concentration, permettent une forte activation d'Ahr et qui cause des dommages à l'ADN. Avec ces pesticides, ainsi que le carbaryl que nous avons déjà trouvé, il serait intéressant de tester une nouvelle combinaison des pesticides à faible concentration afin de voir si cette nouvelle combinaison pourrait causer des dommages à l'ADN.

De plus, il serait intéressant d'explorer plus en détail les effets des contaminants environnementaux aux concentrations retrouvées dans l'environnement sur les êtres vivants puisque ceux-ci sont de plus en plus présents dans l'environnement. Par exemple, nous

pourrions voir si la combinaison de contaminants environnementaux provenant de la rivière Saint-François cause des dommages à l'ADN.

Finalement, il serait intéressant d'étudier le mécanisme derrière les dommages à l'ADN causés par les pesticides. On pourrait ainsi savoir si ce sont les pesticides qui causent des dommages à l'ADN directement ou si les pesticides vont activer une autre voie métabolique qui elle cause des dommages à l'ADN.

BIBLIOGRAPHIE

Abass, K., Lamsa, V., Reponen, P., Kublbeck, J., Honkakoski, P., Mattila, S., Pelkonen, O., and Hakkola, J. (2012). Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology* 294, 17-26.

Akahoshi, E., Yoshimura, S., and Ishihara-Sugano, M. (2006). Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environmental health : a global access science source* 5, 24.

Appella, E., and Anderson, C.W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 2764-2772.

Ashcroft, M., Taya, Y., and Vousden, K.H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Molecular and cellular biology* 20, 3224-3233.

Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D., Bernal, J.A., and Venkitaraman, A.R. (2008). HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453, 682-686.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., *et al.* (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674-1677.

Barette, É. (2006). Pesticides et eau souterraine: Prévenir la contamination en milieu agricole, M.r.d.D.v.d. Direction des politiques en milieu terrestre, de l'Environnement et des Parcs, ed. (Québec).

Belous, A.R., Hachey, D.L., Dawling, S., Roodi, N., and Parl, F.F. (2007). Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer research* 67, 812-817.

Bennett, P., Ramsden, D.B., and Williams, A.C. (1996). Complete structural characterisation of the human aryl hydrocarbon receptor gene. *Clinical molecular pathology* 49, M12-16.

Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.

Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J.G., Rogan, E., and Roy, D. (2000). Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 75-93.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chapman, J.R., and Jackson, S.P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO reports* 9, 795-801.

Christmann, M., Boisseau, C., Kitzinger, R., Berac, C., Allmann, S., Sommer, T., Aasland, D., Kaina, B., and Tomicic, M.T. (2016). Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res.*

Come, M.G., Skladanowski, A., Larsen, A.K., and Laurent, G. (1999). Dual mechanism of daunorubicin-induced cell death in both sensitive and MDR-resistant HL-60 cells. *British journal of cancer* 79, 1090-1097.

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

Dasika, G.K., Lin, S.C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., and Lee, E.Y. (1999). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18, 7883-7899.

Davie-Martin, C.L., Hageman, K.J., and Chin, Y.P. (2013). An improved screening tool for predicting volatilization of pesticides applied to soils. *Environmental science & technology* 47, 868-876.

Dawling, S., Hachey, D.L., Roodi, N., and Parl, F.F. (2004). In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chemical research in toxicology* 17, 1258-1264.

De Angelis, S., Tassinari, R., Maranghi, F., Eusepi, A., Di Virgilio, A., Chiarotti, F., Ricceri, L., Venerosi Pesciolini, A., Gilardi, E., Moracci, G., *et al.* (2009). Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 108, 311-319.

De Schamphelleire, M., Nuyttens, D., De Keyser, D., and Spanoghe, P. (2008). Evaporation drift of pesticides active ingredients. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 73, 739-742.

Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43, 309-334.

Dolwick, K.M., Schmidt, J.V., Carver, L.A., Swanson, H.I., and Bradfield, C.A. (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Molecular pharmacology* 44, 911-917.

Dong, J., Zhang, Q., Cui, Q., Huang, G., Pan, X., and Li, S. (2016). Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes. *ChemMedChem* 11, 2102-2118.

Duan, R., Porter, W., Samudio, I., Vyhldal, C., Kladde, M., and Safe, S. (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 13, 1511-1521.

Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., Stivala, L.A., and Prosperi, E. (2015). Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of toxicology* 89, 155-178.

Englert, N.A., Turesky, R.J., Han, W., Bessette, E.E., Spivack, S.D., Caggana, M., Spink, D.C., and Spink, B.C. (2012). Genetic and epigenetic regulation of AHR gene expression in MCF-7 breast cancer cells: role of the proximal promoter GC-rich region. *Biochemical pharmacology* 84, 722-735.

Eyheraguibel, B., Ter Halle, A., and Richard, C. (2009). Photodegradation of bentazon, clopyralid, and triclopyr on model leaves: importance of a systematic evaluation of pesticide photostability on crops. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 1960-1966.

Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611.

Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722-726.

Fox, G.A., Malone, R., Sabbagh, G.J., and Rojas, K. (2004). Interrelationship of macropores and subsurface drainage for conservative tracer and pesticide transport. *Journal of environmental quality* 33, 2281-2289.

Gasiewicz, T.A., Henry, E.C., and Collins, L.L. (2008). Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 18, 279-321.

Geric, M., Gajski, G., and Garaj-Vrhovac, V. (2014). gamma-H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. *Ecotoxicology and environmental safety* 105, 13-21.

Gillesby, B.E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z.F., and Zacharewski, T.R. (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 36, 6080-6089.

Giroux, I. (2015). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014 (ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement).

Go, R.E., Hwang, K.A., and Choi, K.C. (2015). Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 147, 24-30.

Gong, Q.F., Liu, E.H., Xin, R., Huang, X., and Gao, N. (2011). 2ME and 2OHE2 exhibit growth inhibitory effects and cell cycle arrest at G2/M in RL95-2 human endometrial cancer cells through activation of p53 and Chk1. *Molecular and cellular biochemistry* 352, 221-230.

Gorse, I. (2015). Bilan des ventes de pesticides au Québec 2015 (Québec: Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs), pp. <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/bilan/2015/milieu-agricole.pdf>.

Gorse, I., Laverdière, C., Grégoire, F., Québec (Province). Ministère de l'environnement (1998-), and Institut national de santé publique du Québec. Direction de la toxicologie humaine (2002). Répertoire des principaux pesticides utilisés au Québec (Sainte-Foy: Publications du Québec).

Gouvernement du Québec (1978). Loi sur la qualité de l'environnement (Québec), pp. <http://legisquebec.gouv.qc.ca/fr/ShowDoc/cs/Q-2/>.

Gouvernement du Québec (1987). Loi sur les pesticides. In Chapitre P-93, G.d. Québec, ed. (Québec), pp. <http://legisquebec.gouv.qc.ca/fr/ShowDoc/cs/P-9.3>.

Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D., and Yuan, Z.M. (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Molecular and cellular biology* 21, 8533-8546.

Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual review of pharmacology and toxicology* 35, 307-340.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.

Harris, M., Zacharewski, T., and Safe, S. (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds on the occupied nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer research* 50, 3579-3584.

Hu, W., Feng, Z., and Levine, A.J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer* 3, 199-208.

Jiang, H., Gelhaus, S.L., Mangal, D., Harvey, R.G., Blair, I.A., and Penning, T.M. (2007). Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical research in toxicology* 20, 1331-1341.

Kahl, V.F., da Silva, J., and da Silva, F.R. (2016). Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. *Mutation research* 791-792, 19-26.

Kamentsky, L., Jones, T.R., Fraser, A., Bray, M.A., Logan, D.J., Madden, K.L., Ljosa, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W., and Carpenter, A.E. (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27, 1179-1180.

Kharat, I., and Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry* 271, 10533-10537.

Kietz, S., Feng, S., AgoulNIK, A., and Hombach-Klonisch, S. (2009). Estrogen and TCDD influence RLN2 gene activity in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1160, 367-373.

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., and Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36, 5678-5694.

Kohle, C., and Bock, K.W. (2007). Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochemical pharmacology* 73, 1853-1862.

Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., and Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental health perspectives* 112, 524-531.

Kulkoyluoglu, E., and Madak-Erdogan, Z. (2016). Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer. *Steroids* 114, 41-47.

L'Heritier, F., Marques, M., Fauteux, M., and Gaudreau, L. (2014). Defining molecular sensors to assess long-term effects of pesticides on carcinogenesis. *International journal of molecular sciences* 15, 17148-17161.

Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell cycle* 6, 931-942.

Lee, A.J., Cai, M.X., Thomas, P.E., Conney, A.H., and Zhu, B.T. (2003). Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 144, 3382-3398.

Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *The Journal of biological chemistry* 277, 50607-50611.

Liehr, J.G. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine reviews* 21, 40-54.

Liehr, J.G., and Ricci, M.J. (1996). 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3294-3296.

Lima, M.P., Cardoso, D.N., Soares, A.M., and Loureiro, S. (2014). Carbaryl toxicity prediction to soil organisms under high and low temperature regimes. *Ecotoxicology and environmental safety*.

Lo, R., and Matthews, J. (2012). High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130, 349-361.

Long, M., Laier, P., Vinggaard, A.M., Andersen, H.R., Lynggaard, J., and Bonefeld-Jorgensen, E.C. (2003). Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology* 194, 77-93.

Loughery, J., Cox, M., Smith, L.M., and Meek, D.W. (2014). Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res* 42, 7666-7680.

Ma, Q., Wauchope, R.D., Rojas, K.W., Ahuja, L.R., Ma, L., and Malone, R.W. (2004). The pesticide module of the Root Zone Water Quality Model (RZWQM): testing and sensitivity analysis of selected algorithms for pesticide fate and surface runoff. *Pest management science* 60, 240-252.

Macpherson, L., and Matthews, J. (2010). Inhibition of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription by resveratrol or kaempferol is independent of estrogen receptor alpha expression in human breast cancer cells. *Cancer letters* 299, 119-129.

Mah, L.J., El-Osta, A., and Karagiannis, T.C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679-686.

Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 175, 221-230.

Mansilha, C., Melo, A., Ferreira, I.M., Pinho, O., Domingues, V., Pinho, C., and Gameiro, P. (2011). Groundwater from infiltration galleries used for small public water supply systems: contamination with pesticides and endocrine disruptors. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 87, 312-318.

Marlowe, J.L., and Puga, A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of cellular biochemistry* 96, 1174-1184.

Marques, M., Laflamme, L., and Gaudreau, L. (2013). Estrogen receptor alpha can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 41, 8094-8106.

Meek, D.W. (2004). The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3, 1049-1056.

Meek, D.W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews Cancer* 9, 714-723.

Meek, D.W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *The Biochemical journal* 469, 325-346.

Michael, D., and Oren, M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13, 49-58.

Micka, J., Milatovich, A., Menon, A., Grabowski, G.A., Puga, A., and Nebert, D.W. (1997). Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics* 7, 95-101.

Mikstacka, R., Baer-Dubowska, W., Wieczorek, M., and Sobiak, S. (2008). Thiomethylstilbenes as inhibitors of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 activities. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1, S77-83.

Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques (2003). Distance d'éloignement à respecter lors de l'entreposage, de la préparation et de l'application des pesticides à des fins agricoles (Québec).

Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques (2013). Méthodologie - Bilan des pesticides vendus au Québec Année 2011, G.d. Québec, ed. (Québec).

Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques (2014a). À propos des pesticides.

Ministère du développement durable de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques (2014b). Bilan des ventes de pesticides au Québec Année 2011, D.d.p.a.e.d. pesticides, ed. (Québec).

Ministre de la Justice (2006). Loi sur les produits antiparasitaires, G.d. Canada, ed. (Ottawa).

Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., and Murray, D. (2012). New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2012, 170325.

Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

Monteiro, S.C., and Boxall, A.B. (2010). Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 202, 53-154.

Mullins, R.J., Xu, S., Pereira, E.F., Mamczarz, J., Albuquerque, E.X., and Gullapalli, R.P. (2013). Delayed hippocampal effects from a single exposure of prepubertal guinea pigs to sub-lethal dose of chlorpyrifos: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Neurotoxicology* 36, 42-48.

Munro, A.W., Girvan, H.M., Mason, A.E., Dunford, A.J., and McLean, K.J. (2013). What makes a P450 tick? *Trends Biochem Sci* 38, 140-150.

Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D., and Melvin, W.T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer research* 57, 3026-3031.

Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature reviews Cancer* 14, 801-814.

Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., and Gonzalez, F.J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of biological chemistry* 279, 23847-23850.

Newbold, R.R., and Liehr, J.G. (2000). Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer research* 60, 235-237.

Nguyen, L.P., and Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemical research in toxicology* 21, 102-116.

Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., *et al.* (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.

Ohtani, H., Taninaka, C., Hanada, E., Kotaki, H., Sato, H., Sawada, Y., and Iga, T. (2000). Comparative pharmacodynamic analysis of Q-T interval prolongation induced by the

macrolides clarithromycin, roxithromycin, and azithromycin in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 2630-2637.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., *et al.* (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197-203.

Otto, S., Loddo, D., Baldoin, C., and Zanin, G. (2015). Spray drift reduction techniques for vineyards in fragmented landscapes. *Journal of environmental management* 162, 290-298.

Parl, F.F., Dawling, S., Roodi, N., and Crooke, P.S. (2009). Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1155, 68-75.

Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.

Peter Guengerich, F., Chun, Y.J., Kim, D., Gillam, E.M., and Shimada, T. (2003). Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutation research* 523-524, 173-182.

Pflaum, J., Schlosser, S., and Muller, M. (2014). p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Frontiers in oncology* 4, 285.

Pisani, C., Voisin, S., Arafah, K., Durand, P., Perrard, M.H., Guichaoua, M.R., Bulet, P., and Prat, O. (2016). Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. *ALTEX* 33, 393-413.

Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews Cancer* 6, 789-802.

Porter, W., Wang, F., Duan, R., Qin, C., Castro-Rivera, E., Kim, K., and Safe, S. (2001). Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists. *J Mol Endocrinol* 26, 31-42.

Price, R.J., Scott, M.P., Walters, D.G., Stierum, R.H., Groten, J.P., Meredith, C., and Lake, B.G. (2004). Effect of thiabendazole on some rat hepatic xenobiotic metabolising enzymes. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 42, 899-908.

Prives, C., and Hall, P.A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-126.

Quivet, E., Faure, R., Georges, J., Paise, J.O., and Lanteri, P. (2006). Influence of metal salts on the photodegradation of imazapyr, an imidazolinone pesticide. *Pest management science* 62, 407-413.

Raccor, B.S., and Kaspera, R. (2013). Extra-hepatic isozymes from the CYP1 and CYP2 families as potential chemotherapeutic targets. *Curr Top Med Chem* 13, 1441-1453.

Ray, S., and Swanson, H.I. (2009). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: a tumor promoting event? *Biochemical pharmacology* 77, 681-688.

Ricci, M.S., Toscano, D.G., Mattingly, C.J., and Toscano, W.A., Jr. (1999). Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 3430-3438.

Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology* 20, 8458-8467.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 5858-5868.

Rose, R.L., Tang, J., Choi, J., Cao, Y., Usmani, A., Cherrington, N., and Hodgson, E. (2005). Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. *Scandinavian journal of work, environment & health* 31 Suppl 1, 156-163; discussion 119-122.

Safe, S., and Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chemical research in toxicology* 16, 807-816.

Sakai, R., Kondo, C., Oka, H., Miyajima, H., Kubo, K., and Uehara, T. (2014). Utilization of CDKN1A/p21 gene for class discrimination of DNA damage-induced clastogenicity. *Toxicology* 315, 8-16.

Santé Canada (2004). Procédure d'homologation de pesticide, pp. <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pest/part/protect-protéger/regist-homolog/index-fra.php>.

Santovito, A., Cervella, P., and Delpero, M. (2011). In vitro aneugenic effects of the fungicide thiabendazole evaluated in human lymphocytes by the micronucleus assay. *Archives of toxicology* 85, 689-693.

- Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., and Bradfield, C.A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6731-6736.
- Schmidt, S.F., Larsen, B.D., Loft, A., and Mandrup, S. (2016). Cofactor squelching: Artifact or fact? *Bioessays* 38, 618-626.
- Seong, H.A., and Ha, H. (2012). Murine protein serine-threonine kinase 38 activates p53 function through Ser15 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 287, 20797-20810.
- Shi, X., Xue, W., Liang, S., Zhao, J., and Zhang, X. (2016). Acute caffeine ingestion reduces insulin sensitivity in healthy subjects: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition journal* 15, 103.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C., and Fornace, A.J., Jr. (2000). p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Molecular and cellular biology* 20, 3705-3714.
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., and Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism* 12, 198-212.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annual review of immunology* 32, 403-432.
- Stojak, M., Lukawska, M., Oszczapowicz, I., Opydo-Chanek, M., and Mazur, L. (2014). Cell-cycle disturbance and induction of programmed death by new formamidine analogs of daunorubicin. *Anticancer research* 34, 7151-7158.
- Sun, S., Zhang, K., Lu, Y., Wang, A., and Zhang, H. (2014). Theoretical study on the reaction mechanism of carbaryl with OH radicals. *Journal of molecular modeling* 20, 2288.

Sun, T., and Cui, J. (2015). Dynamics of P53 in response to DNA damage: Mathematical modeling and perspective. *Progress in biophysics and molecular biology* 119, 175-182.

Swanson, H.I. (2002). DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chemico-biological interactions* 141, 63-76.

Swanson, H.I., Chan, W.K., and Bradfield, C.A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *The Journal of biological chemistry* 270, 26292-26302.

Takeuchi, S., Iida, M., Yabushita, H., Matsuda, T., and Kojima, H. (2008). In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere* 74, 155-165.

Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Brimfield, A.A., Dai, D., Goldstein, J.A., and Hodgson, E. (2001). Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29, 1201-1204.

Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., and Hodgson, E. (2002). In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chemico-biological interactions* 141, 229-241.

Tecalco-Cruz, A.C., and Ramirez-Jarquín, J.O. (2016). Mechanisms that Increase Stability of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer. *Clinical breast cancer*.

Tomlin, C., and British Crop Protection Council. (1997). *The pesticide manual : a world compendium*, 11th edn (Farnham, Surrey, UK: British Crop Protection Council).

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Kyo, S., Kanaya, T., Inoue, M., and Yokoi, T. (2004). Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer research* 64, 3119-3125.

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

Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., and Koshland, D. (2004). DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Molecular cell* 16, 991-1002.

Ventura, C., Nieto, M.R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., Randi, A., Cocca, C., and Nunez, M. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 156, 1-9.

Ventura, C., Nunez, M., Miret, N., Martinel Lamas, D., Randi, A., Venturino, A., Rivera, E., and Cocca, C. (2012). Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicology letters* 213, 184-193.

Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews Cancer* 2, 594-604.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.

Wang, F., Samudio, I., and Safe, S. (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Molecular and cellular endocrinology* 172, 91-103.

Warmerdam, D.O., and Kanaar, R. (2010). Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutation research* 704, 2-11.

Whitlock, J.P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 103-125.

Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O., and Jones, K.C. (2005). Real-time visualization and quantification of PAH photodegradation on and within plant leaves. *Environmental science & technology* 39, 268-273.

Wohak, L.E., Krais, A.M., Kucab, J.E., Stertmann, J., Ovrebo, S., Seidel, A., Phillips, D.H., and Arlt, V.M. (2016). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53-dependent mechanism. *Archives of toxicology* 90, 291-304.

Wong, T.Y., Lin, S.M., Poon, C.H., and Leung, L.K. (2014). The licorice flavonoid isoliquiritigenin reduces DNA-binding activity of AhR in MCF-7 cells. *Chemico-biological interactions* 221, 70-76.

Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., and Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Molecular and cellular biology* 23, 1843-1855.

Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development* 7, 1126-1132.

Xie, H.Q., Xu, T., Chen, Y., Li, Y., Xia, Y., Xu, S.L., Wang, L., Tsim, K.W., and Zhao, B. (2016). New perspectives for multi-level regulations of neuronal acetylcholinesterase by dioxins. *Chemico-biological interactions*.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

Yager, J.D. (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 67-73.

Yoshinari, K., Ueda, R., Kusano, K., Yoshimura, T., Nagata, K., and Yamazoe, Y. (2008). Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochemical pharmacology* 76, 139-145.

You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Molecular and cellular biology* 25, 5363-5379.

Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910-1915.

