

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

JOËL ROUSSEAU

MODULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROLACTINE PAR
L'ENDOSULFAN ET LE CHLORDANE DANS UNE LIGNÉE DE
CELLULES HYPOPHYSAIRES.

10 mai 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Le mémoire que j'ai le plaisir de vous présenter est rédigé sous la forme d'un article scientifique, qui sera publié sous peu. Par conséquent, il ne s'agit pas d'un mémoire traditionnel. En plus de l'article au chapitre 2, j'ai inclus une introduction, des résultats complémentaires ainsi qu'une conclusion. Ce mémoire regroupe les différentes étapes que j'ai franchies pour en arriver à la publication des résultats.

La contamination de l'environnement par de grandes quantités de composés chimiques potentiellement dangereux pour la santé est une réalité à laquelle nous sommes confrontés tous les jours. Dans ce projet de recherche, nous nous sommes spécifiquement intéressés à une classe de composés possédant certains pouvoirs estrogéniques, nommés xénoestrogènes. En particulier, nous avons choisi l'endosulfan et le chlordane, deux insecticides utilisés en agriculture, qui ont la particularité de persister longtemps dans l'environnement.

En résumé, l'objectif de cette maîtrise était d'étudier l'effet de certains xénoestrogènes sur la modulation de l'expression génique de cellules du système neuroendocrinien. En particulier, nous avons étudié l'effet de l'endosulfan et du chlordane sur l'expression du gène de la prolactine. Nous avons ciblé la prolactine puisque l'expression de cette hormone est grandement contrôlée par l'estradiol, autant *in vivo* que *in vitro*. Pour faire cette étude, nous avons utilisé la lignée de cellules GH₃, qui provient d'une tumeur d'hypophyse de rat. Le choix de ces

cellules se justifie par le fait qu'elles produisent la prolactine en grande quantité et que l'expression de cette dernière est grandement contrôlée par l'estradiol.

La détection de l'induction du gène de la prolactine s'est effectuée selon deux techniques de biologie moléculaire : le transfert Northern et le *reverse transcriptase – polymerase chain reaction* (RT-PCR) quantitatif. De plus, comme un de nos objectifs était de mettre au point le RT-PCR, nous l'avons développé en parallèle et nous l'avons comparé à la technique du transfert Northern. Nos résultats nous ont permis de déterminer que le RT-PCR s'avère être une excellente technique pour la détection quantitative de l'expression génique et qu'elle est beaucoup plus rapide et sécuritaire que le transfert Northern radioactif.

Le traitement des cellules GH₃ par les pesticides s'est effectué sur une période de 4 jours dans un milieu de culture dépourvu de stéroïde. Nous avons choisi cette période de temps, puisque que les cellules traitées avec les pesticides ne montrent pas d'induction du gène de la prolactine après 1 et 2 jours de traitement. En effet, les niveaux basaux de prolactine sont trop élevés pour qu'on puisse détecter l'effet induit par l'endosulfan et le chlordane avant 4 jours. Les résultats ont permis de conclure que l'endosulfan et le chlordane ont des pouvoirs estrogéniques semblables à ceux de l'estradiol. Les pesticides induisent spécifiquement l'expression de la prolactine, puisque la détection de l'expression d'un gène contrôle, en l'occurrence l'actine, ne montre pas de changements

significatifs entre les différents traitements.

Autre fait intéressant, l'estradiol et le diéthylstilbestrol induisent des changements au niveau de l'apparence et de l'organisation des cellules GH₃ après 4 jours de traitement. Par contre, l'endosulfan et le chlordane n'ont pas la capacité d'induire de tels changements. Ces observations nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les changements d'apparence et d'organisation des cellules seraient causés par un mécanisme cellulaire en lien avec l'activation classique du récepteur des estrogènes. Cette ligne de pensée nous suggère que l'endosulfan et le chlordane pourraient produire leur effet estrogénique via différentes voies secondaires.

La prolactine est une petite protéine qui possède plus de 300 fonctions différentes dans l'organisme. Elle est impliquée dans la croissance, le développement, la reproduction, le fonctionnement du cerveau, etc. Un dérèglement de son expression par un ou des xénoestrogènes pourrait facilement occasionner des problèmes, comme par exemple, de reproduction chez des animaux vivant dans des endroits contaminés par ce type de produits

En outre, j'ai inclus dans ce mémoire d'autres résultats que nous avons obtenus, mais qui n'entrent pas dans la publication au chapitre 2. Ils permettront de mieux apprécier le cheminement scientifique à la base de l'expérimentation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ma maîtrise. En particulier, je veux remercier ma directrice de maîtrise, le Dre Maria-Grazia Martinoli, pour son support et son positivisme. Elle a toujours su me faire voir le côté positif de la recherche, surtout dans les moments difficiles. Je veux aussi la remercier pour sa disponibilité et sa patience tout au long de mes travaux.

Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, le Dr Louis Cossette, pour tous ses précieux conseils et ...lui témoigner ma reconnaissance pour ne pas m'avoir abandonné à l'aéroport de Philadelphie pendant ce fameux congrès en Nouvelle Orléans! Je veux aussi remercier le Dre Éliane Shahum, pour m'avoir initié aux rudiments de la culture cellulaire et le Dr Gervais Bérubé pour avoir synthétisé l'endosulfan-diol.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes collègues de laboratoire, Sylvie, Nadine, Isabelle et Meghan parce que tous les échanges et les discussions scientifiques que j'ai pu avoir avec elles tout au long de mes études m'ont été d'une aide précieuse.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à mes parents, pour m'avoir toujours encouragé et supporté dans mes décisions. Sans eux, mes études

auraient été beaucoup plus ardues. Et finalement, je veux remercier ma copine Judith pour son support, son amour et sa compréhension au cours des deux dernières années.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
<u>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</u>.....	1
1.1 ACTIONS DE CERTAINS PESTICIDES À EFFET ESTROGÉNIQUE	1
1.2 OBJECTIFS	2
1.3 MÉTHODOLOGIE.....	3
1.4 PESTICIDES UTILISÉS	4
1.4.1 CHLORDANE.....	5
1.4.2 ENDOSULFAN	6
1.5 VOIES DE PÉNÉTRATION.....	7
1.6 PROLACTINE	8
1.6.1 DESCRIPTION.....	8
1.6.2 FONCTIONS	9

1.7 RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES.....	10
1.7.1 STRUCTURE DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES	12
1.7.2 SÉQUENCE PALINDROMIQUE.....	13
1.7.3 ACTIVATION DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES	14
1.7.4 RÔLE DE L'HOMODIMÈRE	15
1.8 MODE D'ACTION DES XÉNOESTROGÈNES	16
1.8.1 VOIE DIRECTE D' ACTION DES XÉNOESTROGÈNES	17
1.8.2 VOIES ESTROGÉNIQUES SECONDAIRES	18
1.8.2.1 Fixation secondaire sur le récepteur des estrogènes.....	18
1.8.2.2 Implication de l'élément de réponse estrogène sans le récepteur des estrogènes	19
1.8.2.3 Phosphorylation	20
1.8.2.4 Contrôles stéroïdiens.....	21
1.8.2.5 Récepteur des estrogènes membranaires	22
1.8.3 CONCLUSION.....	22
<u>CHAPITRE 2 : ARTICLE.....</u>	24
2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS	24
2.2 ARTICLE SOUMIS À <i>NEUROENDOCRINOLOGY</i>	26
<u>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....</u>	56
3.1 INTRODUCTION.....	56
3.2 CULTURE NEURALE	57
3.2.1 IMMUNOFLUORESCENCE	58
3.2.2 CONCLUSION	59

3.3 LIGNÉE CELLULAIRE PC-12	60
3.3.1 CONCLUSION	61
3.4 EXPÉRIENCES <i>IN VIVO</i>	62
3.4.1 TRAITEMENT DES MÂLES	63
3.4.1.1 <i>Traitement au chlordane</i>	64
3.4.1.2 <i>Traitement à l'endosulfan</i>	65
3.4.2 TRAITEMENT DES FEMELLES	66
3.4.3 CONCLUSION	67
3.5 EFFET DU DIÉTHYLSTILBESTROL.....	69
<u>CHAPITRE 4 : CONCLUSION</u>	71
BIBLIOGRAPHIE.....	80
ANNEXE 1(TABLEAU 1)	91
ANNEXE 2 (TABLEAU 2)	92
ANNEXE 3 (ACCUSÉ DE RÉCEPTION).....	94

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

FIGURE 1 : STRUCTURES MOLÉCULAIRES DE L'E ₂ , DE L'ENDOSULFAN ET DU CHLORDANE	5
FIGURE 2 : STRUCTURE DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES.....	13
FIGURE 3 : ACTIVATION DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES MENANT À L'EXPRESSION D'UN NOUVEL ARNm. ...	15
FIGURE 4 : EFFET DE L'HOMODIMÈRE SUR LE COMPLEXE DE PRÉ-INITIALISATION.....	16

Chapitre 2

FIGURE 1 : CULTURE CELLULAIRE:.....	59
FIGURE 2 : TRAITEMENT AU CHLORDANE :	64
FIGURE 3 : TRAITEMENT À L'ENDOSULFAN :	66

Chapitre 3

FIGURE 1 : SCHÉMA D'UNE AMPLIFICATION PCR.....	73
--	----

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : SITES D'ACTION DE LA PROLACTINE CHEZ LES VERTÉBRÉS	91
TABLEAU 2 : FONCTIONS DE LA PROLACTINE DANS LA REPRODUCTION	92

LISTE DES ABRÉVIATIONS

^3H : hydrogène tritié

a.a. : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AF : *activation functions*

Ara-c : cytosine arabinose

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BSA : *bovine serum albumin*

DA : dopamine

DES : Diéthylstilbestrol

DDT : 1,1,1-trichloro-2-(*p*-chlorophényl)-2-(*o*-chlorophényl)éthane

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

dNTP : désoxyribonucléique triphosphate

E₂ : estradiol

EGF : *epidermal growth factor*

ERE : élément de réponse estrogène

EPA : *environmental protection agency*

FBS : *fetal bovine serum*

GFAP : *glial fibrillary associated protein*

GH : hormone de croissance

HEPES : (*N*-[2-Hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2—ethane sulfonic acid])

HS : *horse serum*

HSP : *heat shock protein*

Log : logarithme

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

M-MULV : *Moloney Murine Leukemia Virus*

MOPS : *3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid*

NGF : *nerve growth factor*

O.D. : *Optical Density*

PCR : *polymerase chain reaction*

PM : poids moléculaire

POL : polymérase

PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor*

ppm : partie par million

PRL : prolactine

RE : récepteur des estrogènes

RPRL : récepteur de la prolactine

RT : *reverse transcriptase*

TATA : Thymine, Adénine, Thymine, Adénine

TF : *transcription factor*

TH : tyrosine hydroxylase

U.V. : ultra violet

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Actions de certains pesticides à effet estrogénique

Depuis les débuts du monde industriel, l'homme a souvent exploité la nature à son propre avantage et déversé des tonnes de produits chimiques dans l'environnement, sans se soucier de ce dernier. Depuis les 50 dernières années, plus de 100 000 composés synthétiques différents ont été répandus à travers le monde. Par exemple, le domaine de l'agriculture a utilisé et utilise encore beaucoup de pesticides pour protéger les cultures contre la dévastation faite par les insectes. Dans une société comme la nôtre, nous devons recourir à ce genre de procédé pour réussir à combler nos besoins alimentaires, mais nous pouvons aussi se poser la question suivante : a-t-on bien évalué les risques d'une telle utilisation de produits chimiques pour l'environnement et la vie en général ?

Dans ce projet de maîtrise, nous nous sommes intéressés à une classe de molécules possédant des pouvoirs estrogéniques. Des chercheurs ont démontré que certains animaux vivant dans les milieux contaminés par ces produits souffrent de différents problèmes liés à leur reproduction (Colborn, Van Saal et al. 1993; Gimeno, Gerritsen et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996). Par exemple, la population des alligators du lac Apopka en Floride est en déclin depuis les années 1980. Ce déclin est en relation avec l'utilisation de 1,1,1-trichloro-2-(*p*-chlorophényl)-2-(*o*-chlorophényl)éthane (DDT) dans cette région. Le DDT est un

pesticide qui possède des propriétés estrogéniques et son effet se fait sentir via le récepteur des estrogènes (RE) (Robinson, Schmidt et al. 1985; Shelby, Newbold et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996; Gaido, Leonard et al. 1997).

Les problèmes de reproduction dont souffrent ces animaux se situent à différents niveaux. Dans un premier temps, il y a une perte de viabilité des œufs. On observe aussi des problèmes au niveau du système reproducteur chez les alligators survivants. Par exemple, chez les jeunes mâles, on observe des organes génitaux plus petits que chez les sujets sains. Pour leur part, les femelles possèdent un nombre élevé de follicules ovariens. Par conséquent, ces dérèglements morphologiques induisent chez l'animal des niveaux hormonaux anormaux. (Vonier, Crain et al. 1996). Ce genre d'observations écologiques, a permis de faire des liens entre les produits chimiques déversés dans le milieu et les anomalies physiologiques observées.

1.2 Objectifs

Ce projet de maîtrise consistait à étudier l'effet de certains polluants environnementaux à effet estrogénique, sur l'expression génique de cellules du système neuroendocrinien.

Il est important de chercher à mieux comprendre les modes d'action de ce genre de produit afin de développer des antidotes efficaces en cas d'intoxication. De plus, il devient important de développer des techniques permettant de

détecter le pouvoir estrogénique de nouvelles molécules. Ces techniques permettraient d'éviter de mettre sur le marché des composés trop dangereux pour la santé. En effet, ces composés chimiques pourraient favoriser de l'apparition de maladies, comme par exemple, certains cancers hormonaux dépendants, tels que les cancers du sein, des ovaires et des testicules (Ahlborg et al 1995; Davis et Bradlow 1995; Safe 1995).

Les objectifs spécifiques de cette maîtrise peuvent être résumés par les quelques points suivants : 1) Établir un modèle expérimental efficace, pour tester l'effet estrogénique de diverses molécules. 2) Déterminer le potentiel estrogénique de l'endosulfan et du chlordane, sur un gène normalement contrôlé par les estrogènes, c'est à dire le gène de la prolactine (PRL). 3) Déterminer si l'endosulfan et le chlordane peuvent induire l'expression de la PRL à la dose d'induction maximale de l'estradiol (E_2).

1.3 Méthodologie

Cette étude s'est effectuée sur la lignée de cellules GH₃. Ce type de cellule provient d'une tumeur d'hypophyse de rat, qui produit et sécrète en quantité la PRL et l'hormone de croissance (GH). Nous avons choisi cette lignée, parce que l'expression de la PRL est normalement induite par l'estradiol (E_2) dans les cellules hypophysaires et que cette lignée n'est pas un modèle transfecté avec des plasmides contenant d'autres gènes inductibles par les estrogènes, comme c'est le

cas pour bien des modèles (Arnold, Klotz et al. 1996; Petit, Le Goff et al. 1997; Steinmetz, Brown et al. 1997; Massaad, Coumoul et al. 1998).

Par contre, il ne faut pas faire abstraction du fait qu'un organisme entier possède tout l'arsenal enzymatique nécessaire pour métaboliser diverses molécules, incluant certains xénoestrogènes. De cette façon, il est tout à fait probable que les effets observés en culture cellulaire soient différents des effets induits *in vivo*.

Nous avons principalement utilisé des techniques de biologie cellulaire et moléculaire afin de déterminer si l'expression de ce gène cible avait été affectée par les molécules testées. En particulier, nous avons déterminé les niveaux d'expression de l'ARNm de la PRL en utilisant les techniques du RT-PCR et du transfert Northern.

1.4 Pesticides utilisés

Compte tenu de la grande quantité de contaminants environnementaux, nous avons choisi deux pesticides reconnus pour leur effet estrogénique (Arnold, Klotz et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996; Petit, Le Goff et al. 1997; Ramamoorthy, Wang et al. 1997; Wade, Desaulniers et al. 1997; Gillesby et Zacharewski 1998; Massaad, Coumoul et al. 1998; Sonnenschein et Soto 1998). Il s'agit de l'endosulfan et du chlordane. Sur la figure 1, on peut voir leur structure moléculaire. Ce sont deux molécules polycycliques polychlorées. En effet,

l'endosulfan possède six atomes de chlore tandis que le chlordane en a huit. En observant bien leur structure, on peut remarquer qu'ils se ressemblent beaucoup. Ils ont un cycle identique et leur différence structurale se situe au niveau du deuxième cycle. Sur ce cycle, l'endosulfan possède trois atomes d'oxygène et un de soufre. Pour sa part, le chlordane ne possède ni oxygène, ni soufre. Sur cette même figure, on peut aussi remarquer que les structures des pesticides diffèrent de celle de l'E₂. Par contre, ce sont principalement des polycycloalcanes et par conséquent des molécules à caractère hydrophobe.

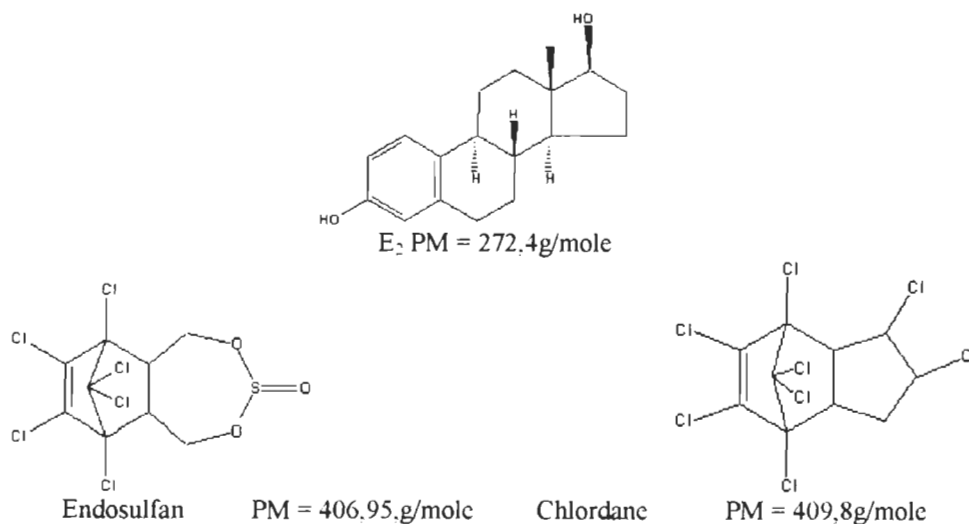


Figure 1 : Structures moléculaires de l'E₂, de l'endosulfan et du chlordane

1.4.1 Chlordane

Le chlordane a vu le jour après la seconde guerre mondiale en 1945, où il était utilisé pour protéger le bois contre les termites. On l'a aussi grandement utilisé en agriculture, où il servait principalement dans la culture des fruits et légumes (pomme de terre, champignons, etc.). Mais, à cause de sa persistance

dans l'environnement, des résistances se sont développées chez des insectes vivant dans les sols contaminés. Cette résistance a eu pour effet de produire une bio-amplification du produit en question dans la chaîne alimentaire. Le concept de bio-amplification implique que les insectes résistants à ce produit peuvent accumuler le chlordane dans leur organisme au lieu de mourir. Ces insectes sont en suite mangés par leurs prédateurs, qui à leur tour seront proie pour d'autres prédateurs. De cette façon, le chlordane peut se retrouver au sommet de la chaîne alimentaire en concentrations élevées. En raison des ces événements indésirables, *l'Environmental Protection Agency (EPA)* a décidé de bannir ce type de produit de l'agriculture dans les années 1975-80. Par contre, il a continué à être utilisé pendant près de 10 ans comme termiticide. Dans les pays occidentaux, il a été graduellement banni pendant les années 1984-88 (Tomlin 1994; Ware 1994; Johnson et Ware 1998). Toutefois, dans les pays du tiers monde, il est encore utilisé pour la culture de certains fruits, dont celle de la banane.

Le meilleur exemple de la persistance du chlordane est sans aucun doute le bois traité contre les termites, qui se trouve toujours protégé contre ces insectes nuisibles 50 ans après l'application.

1.4.2 Endosulfan

L'endosulfan a été commercialisé en 1956. Tout comme le chlordane, il a été utilisé comme insecticide. Son éventail d'utilisation touche aux fruits et légumes,

au colza, au coton, au tabac, etc. Contrairement au chlordane, l'endosulfan est toujours permis aux États-Unis, tout en étant restreint. Il est principalement utilisé dans la culture du tabac et des fruits. On l'utilise aussi pour la préservation du bois. Son utilisation étant toujours permise, l'EPA recommande que les taux d'endosulfan soient inférieurs à 74 ppm dans les lacs, les rivières et les ruisseaux. Pour ce qui est de la concentration retrouvée dans la nourriture que nous consommons, les limites se situent entre 0.1 et 2 ppm, selon le produit consommé (ATRS DR 1993).

1.5 Voies de pénétration

Lorsque l'on parle de contaminants produisant des effets néfastes sur un être vivant, il devient important de connaître les voies d'entrée de ces produits dans l'organisme. Il existe plusieurs voies d'entrée. Comme ce sont principalement des aliments qui sont traités avec ces pesticides, un organisme vivant peut être contaminé lorsqu'il mange de la nourriture contaminée ou lorsqu'il qu'il boit de l'eau contaminée. Il y a aussi l'air respiré à proximité des champs où l'épandage a été fait, le contact direct avec des sols contaminés et, bien sûr, les industries et les laboratoires où l'on utilise ce genre de produits. Il y a même des possibilités de contamination des fumeurs qui fument le tabac traité aux pesticides (ATRS DR 1993). Leur utilisation, même restreinte, rend ces produits potentiellement dangereux, en raison de la facilité avec laquelle ils peuvent entrer dans un

organisme vivant.

D'un point de vue cellulaire, ces pesticides pénètrent facilement dans une cellule, au même titre que l'E₂. Ces trois molécules possèdent toutes des structures moléculaires polycycloalcanes. De par ce fait, elles ont la caractéristique de pouvoir passer librement à travers les membranes phospholipidiques et de se retrouver dans le cytoplasme et le noyau de la cellule. Les différents modes d'action sont présentés à la section 1.8.

1.6 Prolactine

1.6.1 Description

La PRL est une hormone que l'on retrouve chez tous les vertébrés. C'est une protéine, dont la séquence peut varier de 197 à 199 acides aminés (a.a.), selon l'espèce. Sa structure secondaire est constituée en majeure partie d'hélices α , qui représentent plus de 50 % de la protéine. Le reste est constitué de boucles désorganisées servant de liens entre les différentes hélices. La PRL contient, entre autres, 6 cystéines formant 3 ponts disulfures, stabilisant ainsi la structure tertiaire de cette protéine (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).

1.6.2 Fonctions

L'effet de cette hormone se fait sentir sur presque tous les systèmes d'un organisme. Dans le tableau 1 en annexe 1, on peut apercevoir la majorité des sites où la PRL peut avoir un effet. On y retrouve donc des récepteurs de la PRL (RPRL). On a même retrouvé des RPRL dans des fœtus en développement (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998). À ce jour, on reconnaît plus de 300 fonctions différentes de la PRL. On peut subdiviser ces fonctions dans les grandes catégories suivantes : 1) balance électrolytique et équilibre hydrique 2) croissance et développement, 3) endocrinologie et métabolisme, 4) cerveau et comportement et 5) reproduction. Le tableau 2 en annexe 2, présente les principales fonctions de cette hormone dans la reproduction. En définitive, un dérèglement dans la production de PRL pourrait induire des effets néfastes, à différents degrés, sur différents systèmes biologiques d'un organisme. En se référant au tableau 2 de l'annexe 2, on peut apercevoir les nombreux effets causés par un dérèglement de la PRL. Par exemple, lorsque la concentration sanguine de PRL augmente, on observe une augmentation de la synthèse protéique du lait (caséine) (Guyette, Matusik et al. 1979). L'augmentation de la sécrétion de la PRL peut aussi causer une diminution de l'ovulation, qui pourrait entraîner une diminution de la fertilité chez les femelles (Yoshimura, Tada et al. 1989).

Chez les mammifères, la PRL est sécrétée par l'adénohypophyse, située à la base du cerveau. L'hypophyse est en contact direct avec l'hypothalamus par la

tige hypophysaire. Entre autres, l'hypothalamus sécrète la dopamine (DA), qui est le seul inhibiteur naturel de la PRL connu jusqu'à aujourd'hui (Wilson, Foster et al. 1998). La DA est produite par l'hypothalamus de tous les vertébrés et elle agit sur les cellules de l'adénohypophyse en diminuant la sécrétion de la PRL. Bien que l'hypophyse soit la principale source de PRL, il existe certaines régions du cerveau qui peuvent produire de la PRL, tel qu'indiqué par le tableau 1 (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998). Considérant la complexité et la grande quantité de fonctions de la PRL, nous ne traiterons ici que de son rôle endocrinien.

La voie d'action classique de la PRL peut se définir comme suit. La PRL est sécrétée par l'adénohypophyse, dans la circulation sanguine. L'hormone est alors transportée dans tout l'organisme vers les cellules cibles et agit sur ces dernières via le RPRL. La PRL se fixe sur le RPRL et peut alors activer différentes voies de signalisation intracellulaire très complexes. Nous n'entrerons pas plus dans les détails en ce qui à trait au mode d'action de la PRL, puisque mon projet ne porte pas sur ce volet de recherche.

1.7 Récepteur des estrogènes

D'un point de vue biochimique, un récepteur est une protéine servant à recevoir un ligand spécifique. Une fois la réception faite, dans un domaine spécifique de la protéine, le récepteur peut engendrer une cascade d'événements cellulaires. Par exemple, un récepteur peut contrôler la phosphorylation de

protéines, l'activation d'autres, des sécrétions, bref, la majorité des activités métaboliques d'une cellule sont initialement contrôlées par des interactions de type récepteur-ligand.

Comme cette étude porte sur l'induction de l'expression de la PRL par les pesticides, il faut apprendre comment ce gène est induit en conditions physiologiques. En particulier, nous allons examiner un des éléments clés du contrôle de l'expression de la PRL, le récepteur des estrogènes (RE). Le RE fait partie de la super famille des récepteurs nucléaires, au même titre que le récepteur de l'hormone thyroïdienne, de la vitamine D et de l'acide rétinoïque (Korach, Davis et al. 1997). Cette famille de récepteurs a la particularité de lier une séquence spécifique de l'ADN, située en 5' du gène contrôlé.

Une certaine incertitude plane toujours sur la question de la localisation du RE en absence d'hormone. Les techniques récentes d'immunohistochimie ont permis d'en arriver à la conclusion que le RE se retrouve presque exclusivement dans le noyau (Dauvois, White et al. 1993; Wilson, Foster et al. 1998). Toutefois, Dauvois en 1993, en étudiant le mécanisme d'action de l'anti-estrogène pur ICI 182780, a mis en évidence que cette molécule produit son effet anti-estrogénique en interférant sur le transport du RE entre le noyau et le cytoplasme (Dauvois, White et al. 1993). Cette dernière évidence expérimentale vient contredire, en quelque sorte, les autres études affirmant que le RE est exclusivement nucléaire. Par contre, même en tenant compte de ces contradictions, il est clair que tous les

récepteurs des stéroïdes sont présents dans le noyau lorsqu'ils ont lié leurs ligands (Wilson, Foster et al. 1998).

De plus, tout récemment, des chercheurs ont mis en évidence un type de RE membranaire (Pappas, Gametchu et al. 1995). Cette découverte est tout à fait révolutionnaire et nous y reviendrons plus loin dans la section des voies secondaires d'action.

1.7.1 Structure du récepteur des estrogènes

Le RE est une protéine d'environ 595 a.a.. Comme le démontre la figure 3, le RE se subdivise en 6 domaines fonctionnels, identifiés par les lettres de A à F. De tous ces domaines, certains semblent être plus importants que d'autres. Dans la séquence du RE, les domaines C et E sont les plus importants. La région C est la partie responsable de la reconnaissance de l'élément de réponse estrogène (ERE) sur l'ADN. Cette région a la particularité de posséder une hélice α . Lors de l'activation du récepteur, cette hélice se positionne de façon précise afin de reconnaître et de fixer l'ERE. Elle vient donc s'intercaler dans le grand sillon de l'ADN. Pour sa part, la région E est responsable de la liaison de l'E₂ et de la dimérisation du récepteur (Korach, Davis et al. 1997).

De plus, on peut aussi diviser la séquence du RE en deux parties. La première, nommée AF-1, regroupe les domaines A et une partie du domaine B. Cette région est considérée indépendante du ligand puisque ce dernier ne

s'y fixe pas. Le ligand se fixe plutôt dans la partie AF-2, qui se retrouve dans le domaine E. Les parties *activation functions* (AF) du RE représentent deux régions importantes ayant comme rôle de moduler la transcription du gène. Donc, l'habileté du RE d'activer un gène cible résulte de l'interaction entre les régions AF et d'autres facteurs de transcription présents dans la cellule (Korach, Davis et al 1997).

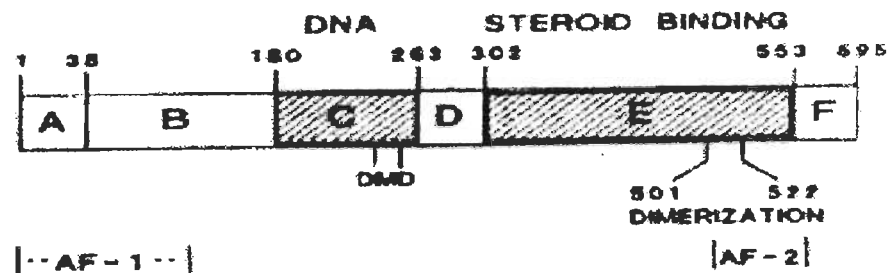


Figure 2 : Structure du récepteur des estrogènes.

Le RE est divisé en 6 domaines fonctionnels. L'activation de la transcription d'un gène s'effectue par la section AF-1, dans les domaines A/B, et/ou par le domaine AF-2, dépendant de l'hormone, dans la le domaine E. La dimérisation s'effectue par les domaines C et E. Le domaine E contient le site de fixation de l'hormone.

1.7.2 Séquence palindromique

L'ERE du RE est défini par la séquence 5'-GGTCAnnnTGACC-3'. Il s'agit d'un palindrome inversé, puisque chaque extrémité du palindrome est complémentaire à l'extrémité opposée. De plus, on peut remarquer que les deux bouts de séquences complémentaires sont séparés par 3 nucléotides arbitraires. Ce palindrome se situe en 5' du gène. Il peut se retrouver en plusieurs exemplaires et être présent à des distances pouvant atteindre quelques centaines de bases du site d'initiation. Ces grandes distances entre l'ERE et le site d'initiation ne

représente pas un réel problème pour l'activation des gènes, puisque l'ADN possède la capacité de former des boucles, permettant ainsi de contrer les distances linéaires, tel que démontré par des expériences de biologie moléculaire et de microscopie électronique (Alberts, Bray et al. 1996).

1.7.3 Activation du récepteur des estrogènes

Dans un premier temps, le RE se trouve dans une conformation dite inactive. Il est alors en association avec différentes protéines de choc thermique (HSP), telles que les HSP 90,70 et 59. Ces protéines permettent de garder le RE dans une conformation inactive (Gillesby et Zacharewski 1998). Il ne peut donc pas reconnaître et lier l'ERE correctement.

La figure 4 représente très bien les différentes étapes qui mènent à l'expression d'un nouvel ARNm. Le processus d'activation du RE débute lorsque des molécules de stéroïdes viennent s'insérer dans la poche hydrophobe du récepteur, c'est-à-dire dans la région E. Cette liaison engendre la libération des HSP, la phosphorylation et un changement conformationnel du récepteur. Ce changement conformationnel permet la dimérisation et le bon positionnement des hélices α . En effet, le RE doit se retrouver sous forme d'homodimère pour reconnaître l'ERE, où chaque récepteur se fixe à un demi-palindrome (Gillesby et Zacharewski 1998; Wilson, Foster et al. 1998). Tous ces événements engendrent l'expression d'une nouvelle protéine.

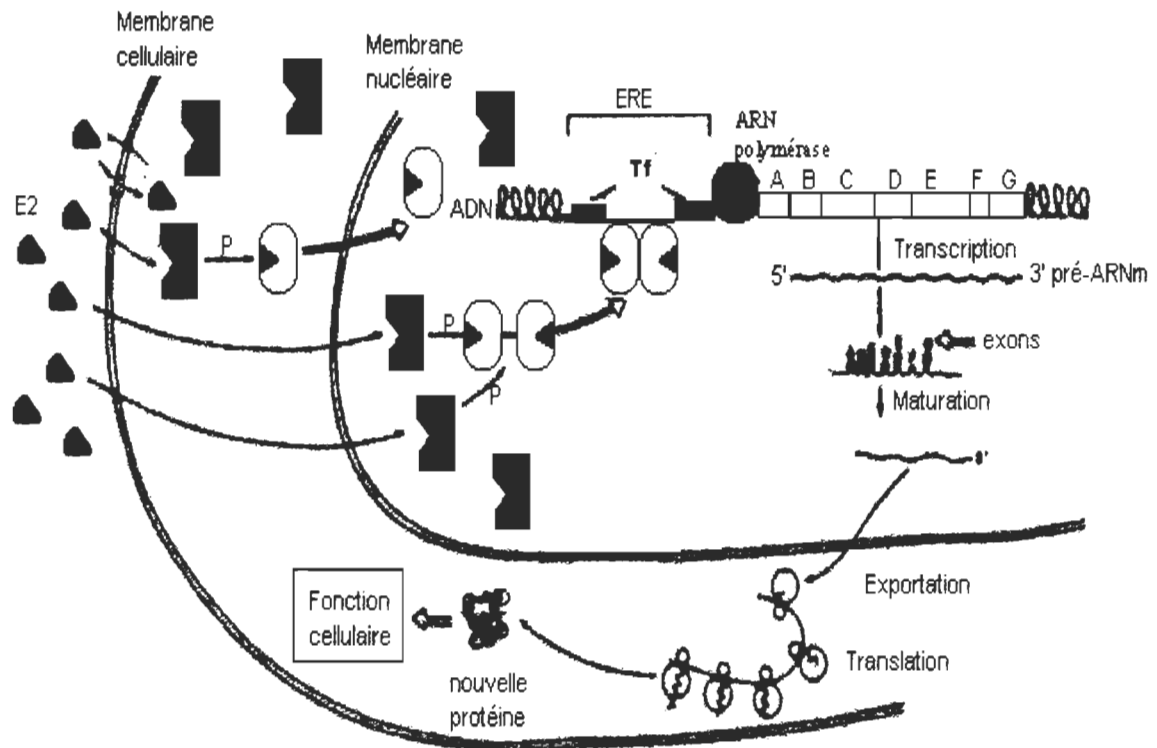


Figure 3 : Activation du récepteur des estrogènes menant à l'expression d'un nouvel ARNm.

L'E₂ pénètre librement à travers les membranes phospholipidiques pour se fixer dans le site actif du RE. Cette liaison provoque l'activation du récepteur par des changements conformationnels dus entre autres à des phosphorylations. Une fois activé correctement, le RE peut dimériser et reconnaître l'ERE situé en 5' du gène cible. Cette liaison sur l'ADN provoque une cascade d'événements moléculaires menant à l'expression d'une nouvelle protéine. ABCDEFG représentent différents domaines d'un gène.

1.7.4 Rôle de l'homodimère

La figure 5 représente l'effet produit par la liaison de l'homodimère. Le RE agirait au niveau de la formation du complexe de pré-initiation. Plus spécifiquement, il aiderait à recruter différents facteurs de transcription au promoteur TATA (séquence d'ADN reconnue par l'ARN polymérase (POL II)), incluant TF-11D, TF-11A, TF-11B, TF-11F et il agirait comme stabilisateur de cet arrangement de facteurs (Korach, Davis et al. 1997; Wilson, Foster et al. 1998).

En définitive, on peut dire que le RE agit au niveau de l'activation de POL II.

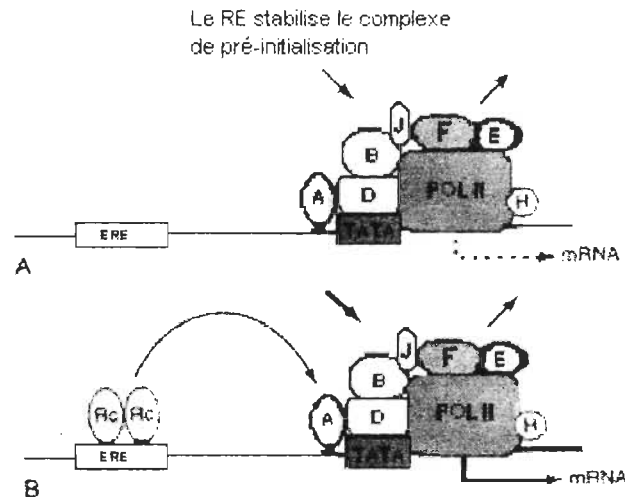


Figure 4 : Effet de l'homodimère sur le complexe de pré-initialisation.

Lorsque le RE a été activé correctement et qu'il a reconnu l'ERE, il contribue à recruter les différents facteurs de transcription (A,B,D,E,F,J,H) nécessaires la production d'un nouvel ARNm. Le dimère de RE contribue aussi à stabiliser le complexe de pré-initialisation et ainsi facilité l'activation de POL II.

1.8 Mode d'action des xénoestrogènes

Dans l'environnement, il existe toute une panoplie de molécules que l'on peut classer dans la catégorie des xénoestrogènes, telles que les deux molécules utilisées pendant mon projet de maîtrise, l'endosulfan et le chlordane. Les xénoestrogènes peuvent se définir comme des molécules de natures étrangères, pouvant produire des effets similaires aux estrogènes. Parmi les xénoestrogènes, il y a les molécules qui agissent directement sur le RE, en se liant au domaine de liaison de l'E₂ et les molécules agissant ailleurs que sur le RE. Le mécanisme d'action le mieux connu est sans aucun doute celui qui passe directement par le RE, mais depuis quelques années, d'autres hypothèses concernant d'autres voies

métaboliques secondaires ont surgi (Gillesby et Zacharewski 1998).

1.8.1 Voie directe d'action des xénoestrogènes

Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer si l'effet estrogénique des xénoestrogènes s'exerce par la liaison et l'activation directe du RE (Cummings et Metcalf 1995; Arnold, Klotz et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996; Petit, Le Goff et al. 1997; Ramamoorthy, Wang et al. 1997; Steinmetz, Brown et al. 1997; Wade, Desaulniers et al. 1997; Gillesby et Zacharewski 1998; Massaad, Coumoul et al. 1998). L'expérience la plus courante pour déterminer si une molécule a le pouvoir de lier de façon spécifique un récepteur, en l'occurrence le RE, est celle de l'E₂ tritié (³H). Brièvement, l'expérience consiste à incuber de l'E₂-³H avec le RE pour un temps prédéterminé. Cette étape permet de saturer tous les sites de liaison de l'hormone du RE avec le ligand radioactif. Par la suite, l'E₂-³H libre (non-lié) est enlevé du reste de la réaction. Subséquemment, on peut incuber les molécules estrogéniques que l'on veut tester, à différentes concentrations, avec la solution contenant l'E₂-³H lié au RE. Après un certain temps, on mesure le pourcentage d'E₂-³H libre, qui a donc été déplacé par les molécules testées. L'endosulfan, pour sa part, est un pesticide réputé pour produire son effet estrogénique via le RE. En effet, ce dernier a le pouvoir de déplacer l'E₂-³H du récepteur (Arnold, Klotz et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996; Petit, Le Goff et al. 1997; Wade, Desaulniers et al. 1997). Selon les résultats de Arnold, le pouvoir de liaison de l'endosulfan au RE

serait 10 000 fois moins fort que l'E₂ elle-même.

Lors d'expériences avec ligands radioactifs, le chlordane n'a pas le pouvoir de déplacer l'E₂-³H (Arnold, Klotz et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996). Cet insecticide est tout de même considéré comme un xénoestrogène puisqu'il a le pouvoir d'induire des événements estrogéniques (Cassidy, Vorhees et al. 1994; Arnold, Klotz et al. 1996; Massaad, Coumoul et al. 1998). Donc, si le chlordane ne se fixe pas au domaine de liaison de l'hormone, il agit forcément via une voie secondaire.

1.8.2 Voies estrogéniques secondaires

1.8.2.1 Fixation secondaire sur le récepteur des estrogènes

En 1996, les expérimentations de Arnold et al ont démontré que le chlordane n'est estrogénique qu'en combinaison avec d'autres pesticides, dont l'endosulfan (Arnold, Klotz et al. 1996). Ces observations suggèrent qu'il existerait d'autres sites de fixation, que le domaine de liaison de l'hormone, sur le RE (Arnold, Klotz et al. 1996). Ici, il faut faire très attention aux résultats publiés dans cet article de *Science*, car l'article a été retiré. La principale conclusion qui ressort de ces travaux est que le mélange de deux pesticides (effet synergique) peut être de 150 à 1600 fois plus estrogénique que les deux pesticides utilisés individuellement. Ce qui permet aux auteurs d'émettre l'hypothèse que le chlordane pourrait se lier sur un autre site que le domaine de liaison de l'hormone du RE, c'est le fait

que le chlordane n'est pas estrogénique lorsqu'il est utilisé seul dans leur modèle expérimental. Sauf que lorsqu'il est mis en présence d'un autre xénoestrogène, comme l'endosulfan, la réponse estrogénique est beaucoup plus forte que la réponse induite par l'endosulfan seul. Par contre, ces résultats ne démontrent en aucun temps qu'il a effectivement un autre site de fixation sur le RE.

Ces résultats ont été grandement critiqués car d'autres chercheurs ont tenté de répéter les expériences, sans grand succès. (Ramamoorthy, Wang et al. 1997; Ramamoorthy, Wang et al. 1997). Les résultats de synergisme sont à un tel point critiqués et non reproductibles, que McLachlan en 1997, a décidé de retirer ses résultats temporairement, afin de résoudre le problème (McLachlan 1997).

1.8.2.2 Implication de l'élément de réponse estrogène sans le récepteur des estrogènes.

Il y a aussi un mécanisme qui est indépendant du RE, mais qui implique l'ERE (Gillesby et Zacharewski 1998). L'ERE est une seule et même séquence située en 5' de tous les gènes dont l'expression est contrôlée par le RE (Darnell, Lodish et al. 1993). En effet, certaines études ont démontré que d'autres récepteurs de la famille des récepteurs nucléaires peuvent se fixer sur l'ERE. En particulier, il y a l'hétérodimérisation du récepteur rétinien avec le récepteur thyroïdien, bien connu pour se lier à l'ERE. (Gillesby et Zacharewski 1998; Klinger, Bodenner et al.) Il y a aussi l'hétérodimérisation du récepteur rétinien avec le *peroxisome*

proliferator activated receptor (PPAR) Cet hétérodimère a aussi le pouvoir de se fixer à l'ERE de pS2 et de la vitellogenin A2 et ainsi induire la transcription de l'ARNm correspondant (Keller, Givel et al. 1995; Nusez, Medin et al. 1995).

1.8.2.3 Phosphorylation

Les mécanismes de phosphorylation peuvent aussi faire partie des voies par lesquelles les xénoestrogènes produisent leur effet. L'activation du RE est causée par la présence et l'agencement de plusieurs facteurs, dont la liaison de l'E₂ et la phosphorylation du RE. Dans certaines conditions, le RE peut être activé par phosphorylation, même en absence de ligand (Ignar-Trowbridge, Pimentel et al. 1995; O'Malley, Schrader et al. 1995; Pietras 1995; Bunone, Briand et al. 1996; Wilson, Foster et al. 1998). Des études ont démontré que l'implication de la voie *Ras* peut être responsable de certains effets estrogéniques n'impliquant pas directement une fixation dans le domaine de liaison de l'hormone du RE (Gillesby et Zacharewski 1998).

Ras, est une protéine G monomérique qui contrôle l'activation de certaines *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Ces kinases sont impliquées dans une multitude de phosphorylation de protéines, incluant les récepteurs nucléaires. Des chercheurs ont démontré que la phosphorylation par les MAPK peut activer le RE, même en absence de ligands (Bunone, Briand et al. 1996; Patrone, Ma et al. 1996). Par exemple, on sait que le facteur de croissance *epidermal growth factor*

(EGF) a le pouvoir d'induire l'activation du RE (Korach, Davis et al. 1997; Gillesby et Zacharewski 1998; Wilson, Foster et al. 1998).

L'EGF, en se liant sur son propre récepteur, induit une série d'événements complexes menant à l'activation de *Ras*. À son tour, *Ras* induit une autre cascade d'événements menant à l'activation des MAPK. C'est justement ces dernières qui ont le pouvoir de phosphoryler le RE. De plus, il semble que seulement la partie AF-1 du RE est phosphorylée, lorsque le RE est activé par l'EGF (Bunone, Briand et al. 1996). L'insuline, pour sa part, peut aussi activer le RE indépendamment du ligand, mais la phosphorylation se situe sur la partie AF-2 (Gillesby et Zacharewski 1998).

1.8.2.4 Contrôles stéroïdiens

Les mécanismes régissant le bon fonctionnement d'une cellule sont tous étroitement liés. Un des gènes impliqués dans les premières étapes de synthèse des stéroïdes est le CYP11A1. Il est responsable du clivage de la chaîne latérale du cholestérol (Gillesby et Zacharewski 1998; Wilson, Foster et al. 1998). Donc, un xénobiotique qui aurait le pouvoir d'induire la synthèse de cette enzyme, augmenterait la production d'E₂ et par conséquent activerait le RE. L'effet estrogénique ressenti ne serait pas causé par une interaction directe entre le xénobiotique et le RE mais par l'augmentation du ligand spécifique du RE.

1.8.2.5 Récepteur des estrogènes membranaires

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe un type de RE membranaire peu connu (Pietras et Szego 1977, 1980; Pappas, Gametchu et al. 1995; Watson, Papas et al. 1995; Karthikeyan et Thamphan 1996). Pappas et al. ont découvert que la sécrétion de PRL, induite par l'E₂ dans les cellules GH3/B6, est augmentée dans un temps aussi court que 5 minutes. Nous savons que le mécanisme estrogénique classique ne permet pas une réponse cellulaire aussi rapide, par le fait qu'il implique une série de synthèses et de localisations macromoléculaires (Clark et Peck 1980). Pappas et al émettent l'hypothèse que l'action rapide de l'E₂ n'impliquerait pas la voie *classique* que l'on connaît, mais une voie non-génomique, qui agirait de façon beaucoup plus rapide. Cette découverte nous oblige à considérer un nouveau mécanisme d'action des xénoestrogènes, jusqu'à ce jour inconnu.

1.8.3 Conclusion

On a longtemps pensé que l'activation classique du RE était le seul mécanisme valable pour expliquer le contrôle de l'expression d'un gène cible. L'étude de molécules, comme les xénoestrogènes, a permis de mettre en évidence qu'il existe d'autres voies dite *estrogénique* indirectes. La recherche sur le mode d'action de ce genre de molécules, nous permet de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes estrogéniques et de l'importance relative de chacun dans le

contrôle homéostatique d'une cellule. L'ensemble des actions estrogéniques est probablement contrôlé par l'interaction mutuelle de toutes ces voies.

CHAPITRE 2

ARTICLE

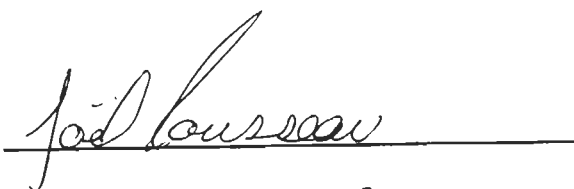
2.1 Résumé de l'article en français

De nos jours, il existe certains contaminants environnementaux que l'on nomme xénoestrogènes. Ces molécules sont de plus en plus étudiées pour leur capacité à moduler le système endocrinien. Parmi ces molécules qui produisent des effets similaires aux estrogènes dans un organisme vivant, il y a l'endosulfan et le chlordane. Ces deux insecticides possèdent la caractéristique de persister longtemps dans l'environnement. La prolactine est une hormone dont l'expression est grandement contrôlée par les estrogènes. Elle possède une multitude de fonctions dans l'organisme, comme par exemple, la croissance fœtale, le développement et la reproduction. À l'aide du transfert Northern et du RT-PCR quantitatif, nous avons détecté les niveaux d'ARNm de la PRL induit par l'estradiol, l'endosulfan ou le chlordane, dans la lignée de cellules GH₃. Après 1 et 2 jours de traitement, nous avons remarqué une augmentation significative de l'ARNm de la prolactine induit par 10⁻⁹ M d'estradiol. Par contre, pour la même période de temps et pour la même dose, l'endosulfan et le chlordane n'induisent pas l'ARNm de la PRL. D'un autre côté, les deux insecticides ont la capacité d'induire l'ARNm de la PRL après 4 jours de traitement, avec une dose de 10⁻⁹ M. De plus, pour la même dose et la même période de temps l'E₂ et le DES, contrairement à l'endosulfan et au chlordane, ont le pouvoir de provoquer des changements d'organisation

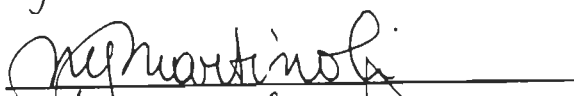
cellulaire. Nos résultats suggèrent que l'endosulfan et le chlordane peuvent mimer l'effet de l'estradiol sur un gène inductible par les estrogènes. En considérant les changements d'organisation cellulaire ainsi que les temps d'induction génique, nous pouvons émettre l'hypothèse que le ou les modes d'action de ces insecticides pourraient passer via une ou des voies secondaires, autre que l'activation directe du récepteur des estrogènes. De plus, au niveau physiologique, il est clair que les xénoestrogènes endosulfan et chlordane peuvent, dans une certaine mesure, dérégler le système endocrinien.

Signatures

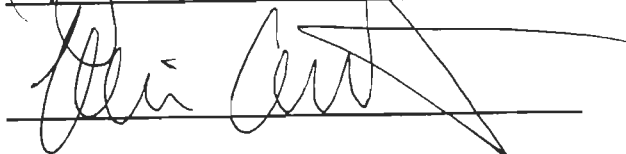
M. Joël Rousseau, B.Sc.

Handwritten signature of Joël Rousseau in black ink, written over a horizontal line.

Mme Maria-Grazia Martinoli, Ph.D.

Handwritten signature of Maria-Grazia Martinoli in black ink, written over a horizontal line.

M. Louis Cossette, Ph.D.

Handwritten signature of Louis Cossette in black ink, written over a horizontal line.

2.2 Article soumis à *neuroendocrinology*

**Modulation of Prolactin mRNA levels by endosulfan and chlordane in
GH₃ cells.**

Joël Rousseau¹, Louis Cossette¹, and Maria-Grazia Martinoli^{1,2}

¹ Department of Chemistry and Biology, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada.

² School of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada

Corresponding author:

Maria-Grazia Martinoli, Ph.D.
Dept. of Chemistry and Biology
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.
Tel. 819-376-5053; Fax 819-376-5084
e-mail: Martinol@uqtr.quebec.ca

Short title: Xenoestrogens and PRL expression.

Key words: Prolactin, xenoestrogens, estrogens, chlordane, endosulfan,
RT-PCR, gene expression.

Abstract

Xenoestrogens are widely used environmental chemicals recently under scrutiny because of their possible role as endocrine disruptors. Among them are chlordane and endosulfan, persistent insecticides suspected to act as estrogens in living organisms. Prolactin (PRL) is a well-known estrogen inducible-gene with many physiological functions, especially in foetal growth, development, and reproduction. By means of Northern blots and quantitative RT-PCR, we investigated the effects of estradiol (E_2), chlordane, and endosulfan on PRL mRNA levels in GH₃ lactotroph cells. We detected a substantial increase of PRL mRNA levels after 1, 2 and 4 days of treatment with E_2 at 10^{-9} M, while chlordane and endosulfan were not able to induce detectable levels of PRL gene expression at the same dose after 1 and 2 days of treatment. On the other hand, these two insecticides could induce a significant increase of PRL mRNA levels after 4 days of treatment at 10^{-9} M. Our results suggest that chlordane and endosulfan could mimic the action of E_2 on estrogen-inducible genes. However, their mode of action suggests that they might act via second messenger-mediated cellular mechanisms instead of solely competing with estrogens for the nuclear estrogen receptor sites.

Introduction

Environmental contaminants that exhibit hormone-like activity are being implicated in developmental and reproductive dysfunctions in wildlife and humans [1, 2]. This association is supported by recent observations demonstrating physiological and morphological changes in wildlife, laboratory animals, and humans exposed to agricultural and industrial compounds [3-6]. Effects include increased abnormalities of reproductive organs and of embryonic development [7, 8], delayed sexual maturation and reduced steroidogenic capacity [5]. Moreover, reduction in sperm count and quality in humans might be also affected [1]. Interference with hormonal signaling pathways by these hormone modulators has been the proposed cause for these disturbances [3, 9, 10].

Some of these chemicals, termed endocrine disruptors or modulators, may evoke cellular responses that are typically induced by sex steroids [10-12]. The best characterized of these contaminants are xenoestrogens. Xenoestrogens produce effects resembling those of endogenous estrogens, although their mode of action is still under debate. Among them, two chlorinated bicyclo(2.2.1)-2-heptenes - endosulfan and chlordane - were widely used insecticides in North America where they still persist in the environment [13]. Both endosulfan and chlordane are blockers of insect neuronal GABA (A) receptor/chloride channels [14] and strongly inhibit the human acrosome reaction initiated by progesterone or glycine [15].

Petit et al. [12] have demonstrated using an *in vitro* yeast reporter system as well as trout hepatocytes cell cultures that endosulfan can weakly bind to the estrogen receptor by competing with $^3\text{H-E}_2$ for the hormone binding site. Chlordane has been reported to masculinize sexually dimorphic functions and behaviors possibly by disrupting the pattern of synthesis and metabolism of natural hormone and/or modifying hormone receptor levels [16].

Prolactin (PRL) expression is known to be under estrogenic control [17, 18]. PRL is a pituitary hormone implicated in a variety of physiological function such as foetal development, reproduction and immune response. As such disturbance in PRL production could affect the whole organism [19]. Despite this potential, there are relatively few published studies that have investigated the effects of xenoestrogens on PRL production. Steinmetz et al. [20] recently reported that bisphenol A, a monomer found in polycarbonate plastics, can modulate the PRL gene via the estrogen receptor.

The aim of our study was to determine the effects of two polychlorinated insecticides, endosulfan and chlordane, on PRL mRNA levels in the GH₃ cells, a well established pituitary lactotroph estrogen-responsive cell line [17, 18]. Specifically, we compared the potency of E₂, endosulfan and chlordane in modulating PRL mRNA levels by using both Northern blots and quantitative RT-PCR. Our results suggest that endosulfan and chlordane may modulate and disrupt PRL production and also demonstrate that quantitative RT-PCR is a

powerful technique for rapidly screening of possible modulators of gene expression.

Materials and Methods

GH₃ cell culture and treatment: 50 000 cells/cm² were plated in six-well tissue culture plates with Ham's F-10 medium (Sigma Chemicals) supplemented with 15% defined horse serum (HS), 2.5% defined fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and with 25 U/ml penicillin and 25 mg/ml streptomycin. After two days, cells were rinsed with F-10 without serum and then cultured in phenol red-free medium containing 17.5% charcoal-stripped serum as previously described [17, 18]. Experimental media were supplemented with endosulfan (hexachloro-norbornene-dimethanol cyclic sulfite), chlordane (octachloro-hexahydro-methano-1H-indene) (Chem Service, USA), or 17 β-estradiol (E₂) (Sigma Chemicals).

For dose response assays, GH₃ cells were incubated for 4 days with chlordane, endosulfan or E₂ at concentrations of 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ M. For time course assays, cells were incubated with the same molecules for 1, 2, and 4 days at 10⁻⁹ M. Each solution was freshly prepared in 100% ethanol. Final ethanol concentration in wells was 0.1% (vol/vol). Diethylstilbestrol (DES) (Sigma Chemicals) was used at concentration of 10⁻⁹ M in stripped serum exclusively to induce aggregation of cell clusters in comparison to E₂ (see Results).

RNA isolation: Total RNA was extracted using 1 ml of lysis mixture (Tri-Reagent™, Molecular Research Center) per well. RNA was either frozen at -70 °C for later analysis or used immediately for RT-PCR or Northern blots.

Northern blots: 5 µg of total RNA were separated on a 1.2% agarose gel in 1X MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid) running buffer. The RNA was transferred onto nylon membranes (Boehringer Manheims, Canada) by capillarity using 20X SSC overnight. Membranes were then rinsed in sterile water, air dried and prehybridized at 42 °C for at least 5 hours in the following buffer: 50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 25mM KH₂PO₄ and 200 µg/ml salmon sperm DNA. Hybridization was performed overnight at 42 °C using fresh hybridization buffer supplemented with 10% dextran sulfate and 25 µCi of each specific probe. cDNA probes for mouse β-actin (Ambion, USA) and rat prolactin (supplied by Dr. R.A. Maurer) consisting of 1076 and 780 base pair respectively, were random-priming labeled with ³²P-dCTP and 5 U of Kleenow (New England Biolabs) as already described [21]. Membranes were washed twice for 15 min in 1X SSC + 0.1% SDS and twice for 15 min. in 0.25X SSC + 0.1% SDS, then exposed on X-ray film (Kodak-Biomax). The autoradiograms were scanned with a UMAX S-6E scanner and analyzed using the NIH-image program.

Quantitative RT-PCR: 1 µg of total RNA was reverse transcribed using 25 U of M-MULV reverse transcriptase (N.E.B.), 1.5 µM dNTP and 0.0075 µg/µl oligo dT₁₂₋₁₈

(Gibco). Differential PCR amplification of both β -actin (control) and PRL single-copy gene was performed in the same vial, using 1 μ l of the cDNA reaction mixture with 2.5 U Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Canada), 1X polymerase buffer containing 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, and 0.2 μ M of each forward and reverse primers in a total volume of 50 μ l [22, 23]. The PCR conditions were optimized for the two sets of primers in the same tube:

Actin 1: 5'-GCGGTGCACGATGGAGGGGCCG-3'

Actin 2: 5'-GTAACCAACTGGGACGATATGG-3';

PRL 1: 5'-AATCCCTGCGCAGGCACCGAAT-3'

PRL 2: 5'-ACCTCTCCCGGAGCTGTTTGAC-3'.

The reactions were heated to 94 °C and then cycled 22 times through 1 min at 94 °C ; 1 min at 55 °C; and 2 min at 72 °C. 10 μ l of the PCR products were analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1X TAE running buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0). Gels were dipped in ethidium bromide solution and photos were taken on U.V. lamps with a Kodak digital camera DC-120, transferred on a personal computer and analyzed with the NIH-image program.

Comparative RT-PCR was carried out as previously described [24], using total RNA extracted from untreated cells (control) and cells treated with 10^{-9} M E_2 ,

endosulfan or chlordane. Briefly, 1, 2, and 4 μl cDNA were amplified using PRL primers, resulting in a linear relationship between cDNA quantity and band density of the amplified product. As shown in Fig. 1, the cDNA quantities are directly proportional to the PRL mRNA expressed in optical density units (O.D. units) for untreated samples as well as for samples treated with 10^{-9} M E_2 (Fig. 1), endosulfan and chlordane (data not shown).

Results

E₂ response in GH₃ cell line

Using both Northern blots (Fig. 2A) and RT-PCR (Fig. 2B), our results demonstrate that PRL mRNA levels dramatically increased in GH₃ cells cultured in stripped serum supplemented with 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ M E₂ for 4 days. The presence of E₂ in stripped serum resulted in an increase of PRL mRNA levels. The maximal dose response was observed by treating GH₃ with 10⁻⁹ M of E₂.

Endosulfan and Chlordane response in GH₃ cells at 10⁻⁹ M.

We tested the ability of the two insecticides endosulfan and chlordane to induce PRL mRNA transcription at 10⁻⁹ M since this concentration of E₂ produced the maximal induction of PRL mRNA (Fig. 2A and 2B). As shown in Fig. 3, an increase of PRL mRNA levels was observed by treating GH₃ cells for 4 days in stripped serum supplemented with E₂, endosulfan or chlordane at 10⁻⁹ M. In particular, PRL mRNA levels increased 6-, 2- and 3.5- fold in response to E₂, endosulfan, or chlordane respectively, compared to the control. However, higher doses of endosulfan or chlordane (10⁻⁸ M and 10⁻⁷ M) did not significantly increase PRL gene expression but rather caused a reduction in cell viability and lower doses (10⁻¹⁰ M and 10⁻¹¹ M) did not produce detectable changes in mRNA expression.

Time dependent stimulation of PRL mRNA levels.

The efficacy and time dependency of E₂, endosulfan and chlordane in stimulating PRL gene expression were compared. GH₃ cells were treated with stripped serum supplemented with vehicle (control), E₂, endosulfan or chlordane at 10⁻⁹ M for 1, 2, and 4 days (Fig. 4). Our results demonstrate that PRL mRNA levels gradually decrease following 1, 2, and 4 days of culture in medium containing stripped serum with vehicle (Fig. 4, control). The addition of E₂ to GH₃ cells induced an increase of PRL mRNA levels above the control after 1, 2 and 4 days of treatment. Although endosulfan and chlordane stimulated an increment of PRL mRNA levels above the control after 4 days of treatment, they did not induce any increase of PRL mRNA levels after 1 and 2 days of treatment (Fig. 4).

Organization of GH₃ cell clusters after treatment with E₂, DES, endosulfan or chlordane.

Notable changes in the aggregation of GH₃ cells were observed after 4 days of culture in medium containing either 10⁻⁹ M E₂ (Fig. 5A) or 10⁻⁹ M DES (Fig. 5B). This tendency to form clusters was not observed in GH₃ cells treated with 10⁻⁹ M endosulfan or chlordane (Fig. 5C and 5D, respectively) or with vehicle in stripped serum (Fig. 5E).

Discussion

Several reports have recently suggested that some of the chemicals released in the environment over the years may have effects on the endocrine system of many organisms [2-4]. These studies mainly used estrogen-responsive reporter systems, cells transfected with exogenous receptors, as well as transformed cells to evaluate the estrogenic potential of these chemicals. However, all these systems lack the normal cellular environment necessary to reflect all the possible interactions with other signal pathways known to interact with the estrogen receptor [25], and could therefore over- or under-evaluate their actual effect in those cells.

In order to establish a reliable and efficient system to screen for estrogenic activity in non-transfected cell cultures, we first compared the PRL mRNA levels of pituitary GH₃ cells with or without estradiol treatment. Our results showed that in Northern blot and comparative RT-PCR experiments, PRL mRNA levels were significantly elevated after estradiol treatments of GH₃ cells. Both techniques consistently gave comparable results and were therefore deemed equally suitable for assessing the estrogenic potential of estrogenic chemicals in this cell line.

Our study shows that both endosulfan and chlordane had the ability to increase PRL mRNA levels as with cells treated with estradiol. At the same concentration that allowed the maximal PRL mRNA expression after estradiol treatment (i. e. 10⁻⁹

M) endosulfan and chlordane were able to increase prolactin mRNA expression 21% and 50% respectively, of the increase seen with estradiol.

Endosulfan was previously shown to have estrogenic activity in estrogen-responsive reporter systems [12, 26-28], on the growth of cell cultures [12, 29] and *in vivo* [28]. Chlordane also appears to have estrogen-like activity *in vivo* [16], but it does not seem to stimulate estrogen-responsive reporter systems nor bind to the estrogen receptor (ER) [7, 26, 30]. Although it is not classified as a potential estrogen for these reasons and because it does not promote MCF-7 cell growth [10], chlordane did have an effect on the PRL mRNA levels of GH₃ cells in our experiments.

Our findings reveal that endosulfan and chlordane can increase prolactin mRNA levels in GH₃ cells and supports the hypothesis that molecules not structurally related to estrogens may in effect trigger estrogen-like responses in cell cultures. However, it should be noted that if these effects may still be described as estrogenic because of their ultimate outcome on PRL messenger levels, they are unlikely to act in the same way estradiol does. In fact, the relative stimulation of PRL mRNA was significantly different after 1, 2 or 4 days of treatment with either estradiol, endosulfan or chlordane.

Whereas estradiol promoted an increase in PRL mRNA after only 1 day, it took endosulfan and chlordane 4 days to have a significant effect on PRL mRNA levels,

perhaps because of a delayed mechanism of action. Furthermore, the stimulation of GH₃ cells with estradiol, endosulfan, or chlordane produced noticeable differences in the way the cells appeared in culture after treatment. The aggregation pattern of GH₃ cells was very different for estradiol-treated cells as compared to cells treated with either endosulfan or chlordane. In order to further test this change of aggregation in response to estrogens, we also tested DES, a potent analog of estradiol, which induced the same distinctive pattern of aggregation seen in cells treated with estradiol.

Other teams have reported maximal estrogenic activity for endosulfan at other concentrations than ours. For example, the maximal effect of endosulfan on a yeast reporter system was attained at a concentration of 10⁻⁴ M [26]. In our experiments, these higher concentrations rather had a cytotoxic effect which greatly reduce the viability of the culture. Our attempts to measure a reliable dose-response curve with GH₃ cells have repeatedly been hampered by the fact that lower or higher concentrations would either have no effect or kill the cells.

Although estradiol, endosulfan and chlordane triggered similar end-results with regards to PRL mRNA levels after 4 days, different mechanisms of action would be needed to explain the differences observed between the molecules used in our experiments as well as between our results and other reports. In addition to our findings, other observations support a wide diversity in estrogenic responses. For example, the affinity of several xenoestrogens for the ER seems very weak in

comparison with estradiol [7, 25, 26, 31]. Also, the existence of a rapid estrogen response is not compatible with the genomic response of the ER [32-35].

The question of whether xenoestrogens act via the same cellular pathways as estradiol remains unanswered to this day. However, recent evidence suggests that different mechanisms may be involved. Instead of using the classical cascade (i.e. binding to the ER, dimerization of ER, translocation to the nucleus and binding to the estrogen response element (ERE)), there appears to exist other indirect, non-genomic pathways leading to the same effects as the classical one. For example, the phosphorylation of the ER is now well established and it was shown to modulate the ER ability to promote the transcription of ERE-controlled sequences as well as via the MAP-kinase pathway [35-37]. In addition, several studies provide evidence for the existence of signal cross-talks between the ER and other second messengers in the cell [38-40].

Altogether our results indicate that endosulfan and chlordane have an estrogenic effect since they can significantly increase PRL mRNA levels, but that they may not use the classical estrogen receptor pathway. Regardless of which specific cellular pathway may be involved in the increase of PRL gene expression, our results could also have interesting implications for understanding the effect of xenoestrogens on the neuroendocrine system. PRL has more type of actions than any other pituitary hormone and may act as a hormone, a growth factor, a neurotransmitter and an immunoregulator [19]. Also, extra-pituitary sites of PRL

production have been found in the brain [41]. Therefore, a disruption of PRL expression by endosulfan or chlordane could play a pivotal role in the delicate balance of neuroendocrine functions like reproduction and development. The various abnormalities found in wildlife exposed to endocrine disruptors might in part be related to the diverse physiological effects of PRL.

The use of cell lines responding to estrogens within their normal capacity are more likely to reflect the complex interrelationship between the ER and other signalling events in the cells. Since xenoestrogens are likely to interact with these mechanisms, the use of such a system in parallel with comparative RT-PCR may be a valuable tool in the assessment of the estrogenicity of different environmentally-significant chemicals.

Acknowledgments

This work was funded by a NSERC (Canada) grant to MGM. We wish to thank Dr. P. Falardeau, University Laval Research Center (Québec, Canada), for kindly providing the GH₃ cell line, and Ms. Meghan Graham for revising the manuscript.

References

1. Sharpe RM, Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993. 341(8857): p. 1392-5.
2. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993. 101(5): p. 378-84.
3. Korach KS, Davis VL, Curtis SW, Bocchinfuso WP, Xenoestrogens and estrogen receptor action, in *Endocrine Toxicology, 2nd ed.*, Thomas JA, Colby HD, Editors. 1997, Taylor and Francis: Washington, D.C. p. 181-212.
4. Ankley G, Mihaich E, Stahl R, Tillitt D, Colborn T, authors ao: Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ Toxicol Chem* 1998. 17(1): p. 68-87.
5. Gray EL, Ostby J, Wolf C, Lambright C, Kelce W: The value of mechanistic studies in laboratory animals for the prediction of reproductive effects in wildlife: endocrine effects on mammalian sexual differentiation. *Environ Toxicol Chem* 1998. 17(1): p. 109-118.

6. Harrison PT, Holmes P, Humfrey CD: Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Sci Total Environ* 1997. 205(2-3): p. 97-106.

7. Vonier PM, Crain DA, McLachlan JA, Guillette LJ, Jr., Arnold SF: Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect* 1996. 104(12): p. 1318-22.

8. Birnbaum LS: Developmental effects of dioxins. *Environ Health Perspect* 1995. 103 Suppl 7: p. 89-94.

9. Massaad C, Coumoul X, Sabbah M, Garlatti M, Redeuilh G, Barouki R: Properties of overlapping EREs: synergistic activation of transcription and cooperative binding of ER. *Biochemistry* 1998. 37(17): p. 6023-32.

10. Sonnenschein C, Soto A: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998. 65(1-6): p. 143-150.

11. Nesaretnam K, Corcoran D, Dils RR, Darbre P: 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 1996. 10(8): p. 923-36.

12. Petit F, Le Goff P, Cravedi JP, Valotaire Y, Pakdel F: Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J Mol Endocrinol*. 1997 Dec; 19(3): p. 321-35.

13. Simonich SL, Hites RA: Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 1995. 269: p. 1851-1854.

14. Bloomquist JR: Ion channels as target for insecticides. *Ann Rev Entomol* 1996. 41: p. 163-190.

15. Turner KO, Syvanen M, Meizel S: The human acrosome reaction is highly sensitive to inhibition by cyclodiene insecticides. *J Androl* 1997. 18(6): p. 571-5.

16. Cassidy RA, Vorhees CV, Minnema DJ, Hastings L: The effects of chlordane exposure during pre- and postnatal periods at environmentally relevant levels on sex steroid-mediated behaviors and functions in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994. 126(2): p. 326-37.

17. Rhode PR, Gorski J: Inhibitory effects of serum and stimulatory effects of estrogen on prolactin mRNA levels in GH3 rat pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991. 82(1): p. 1-9.

18. Rhode PR, Gorski J: Growth and cell cycle regulation of mRNA levels in

GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991. 82(1): p. 11-22.

19. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA: Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998. 19(3): p. 225-68.

20. Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N: The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo [see comments]. *Endocrinology* 1997. 138(5): p. 1780-6.

21. Martinoli MG, Pelletier G: Ontogenesis and sexual dimorphism of rat growth hormone messenger ribonucleic acid as studied by in situ hybridization. *J Neuroendocrinol* 1990. 2(5): p. 613-619.

22. Frye RA, Benz CC, Liu E: Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 1989. 4(9): p. 1153-7.

23. Zeillinger R, Schneeberger C, Speiser P, Kury F: Rapid quantitative analysis of differential PCR products by high-performance liquid chromatography. *Biotechniques* 1993. 15(1): p. 89-95.

24. Ribot EM, Quinn FD, Bai X, Murtagh JJ, Jr.: Rapid amplification of transposon ends for the isolation, cloning and sequencing of transposon-disrupted chromosomal genes. *Biotechniques* 1998. 24(1): p. 16-17, 20, 22.

25. Wade MG, Desaulniers D, Leingartner K, Foster WG: Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo. *Reprod Toxicol* 1997.11(6): p. 791-8.
26. Ramamoorthy K, Wang F, Chen IC, Norris JD, McDonnell DP, Leonard LS, Gaido KW, Bocchinfuso WP, Korach KS, Safe S: Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 1997. 138(4): p. 1520-7.
27. Jin L, Tran DQ, Ide CF, McLachlan JA, Arnold SF: Several synthetic chemicals inhibit progesterone receptor-mediated transactivation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 233(1): p. 139-46.
28. Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL: Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect* 1996. 104(12): p. 1296-300.
29. Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C: The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 1994. 102(4): p. 380-3.
30. Arnold SF, Vonier PM, Collins BM, Klotz DM, Guillette LJ, Jr., McLachlan JA: In vitro synergistic interaction of alligator and human estrogen receptors with

combinations of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 1997. 105 Suppl 3: p. 615-8.

31. vom Saal FS, Nagel SC, Palanza P, Boechler M, Parmigiani S, Welshons WV: Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicol Lett* 1995. 77(1-3): p. 343-50.

32. Wehling M: Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Ann Rev Physiol* 1997. 59: p. 365-93.

33. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS: Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 1995. 9(5): p. 404-10.

34. Watson CS, Pappas TC, Gametchu B: The other estrogen receptor in the plasma membrane: implications for the actions of environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 1995. 103 Suppl 7: p. 41-50.

35. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F: Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* 1996. 15(6): p. 1292-300.

36. Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Rotondi

A: Protein tyrosine phosphorylation and estradiol action. *Ann N Y Acad Sci* 1996. 784: p. 149-72.

37. Weigel NL: Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 1996. 319(Pt 3): p. 657-67.

38. Ignar Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS: Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 1996. 137(5): p. 1735-44.

39. Ram P, Kiefer T, Silverman M, Song Y, Brown G, Hill S: Estrogen-receptor transactivation in MCF-7 breast-cancer cells by melatonin and growth-factors. *Mol Cell Endocrinol* 1998. 141(1-2): p. 53-64.

40. Smith CL: Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 1998. 58(3): p. 627-32.

41. Ben-jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW: Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev.* 1996. 17: p. 639-669.

Legends to the Figures

Fig 1. Comparative RT-PCR. Total RNA was reverse transcribed using 25 U of M-MULV reverse transcriptase. 1, 2 and 4 μ l of cDNA from untreated cells (control) and cells treated with 10^{-9} M of E_2 were used for comparative PCR. PCR products were separated on a 1.5 % agarose gel, visualized with ethidium bromide and photographed with a digital camera, as described in Materials and Methods. A linear relationship resulted between the cDNA quantity and the band density of the amplified product. Images were analyzed and relative PRL mRNA levels were expressed in optical density (O.D.) units. These data are representative of at least 3 experiments.

Fig. 2. Detection by Northern blot (Fig. 2A) and RT-PCR (Fig. 2B) of PRL mRNA levels induced by E_2 in GH₃ cells. Cells were incubated with 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} and 10^{-7} M E_2 in medium containing stripped serum for 4 days, as described in Materials and Methods. Control cells were incubated with vehicle alone. 5 μ g of total RNA were used for Northern blot (Fig. 2A) and 1 μ g of total RNA was reverse transcribed. 1 μ l of cDNA was PCR cycled and run on agarose gel (Fig. 2B). Autoradiograms (Fig. 2A) were scanned while agarose gels were visualized with ethidium bromide and photographed with a digital

camera (Fig. 2B), as described in Materials and Methods. Images were analyzed and relative PRL mRNA levels were expressed in O.D. units. These data are representative of at least 3 experiments.

Fig. 3. Induction of PRL mRNA levels after 4 days of treatments with 10^{-9} M of E_2 , endosulfan or chlordane in medium containing stripped serum, as described in Materials and Methods. $1\mu\text{g}$ of total RNA was reverse transcribed and $1\mu\text{l}$ of cDNA was used for the PCR reaction. Photos of agarose gels were taken with a digital camera and then analyzed. Relative PRL mRNA levels were expressed in O.D. units. These data are representative of at least 3 experiments.

Fig 4. Time-dependent stimulation of PRL mRNA levels by E_2 , endosulfan or chlordane at 10^{-9} M. Cells were incubated with E_2 , endosulfan or chlordane at 10^{-9}M for 1, 2 and 4 days in medium containing stripped serum. $1\mu\text{g}$ of total RNA was reverse transcribed and $1\mu\text{l}$ of cDNA was used for the PCR reaction. Photos of agarose gels were taken with a digital camera and then analyzed. Relative PRL mRNA levels were expressed in O.D. units. These data are representative of at least 3 experiments.

Fig 5. Appearance of GH₃ cell clusters after treatment with E₂, DES, endosulfan or chlordane. GH₃ cells were observed after 4 days of culture in a stripped medium containing 10⁻⁹ M of E₂ (Fig. 5A), DES (Fig. 5B), endosulfan (Fig. 5C) or chlordane (Fig. 5D), respectively. Cell clusters were observed in GH₃ cells treated with E₂ or DES but not in GH₃ cells treated with endosulfan or chlordane. Fig. 5E shows the appearance of GH₃ cells treated with the vehicle alone (control). GH₃ cells were photographed using a phase contrast objective at 200X.

Figure 1

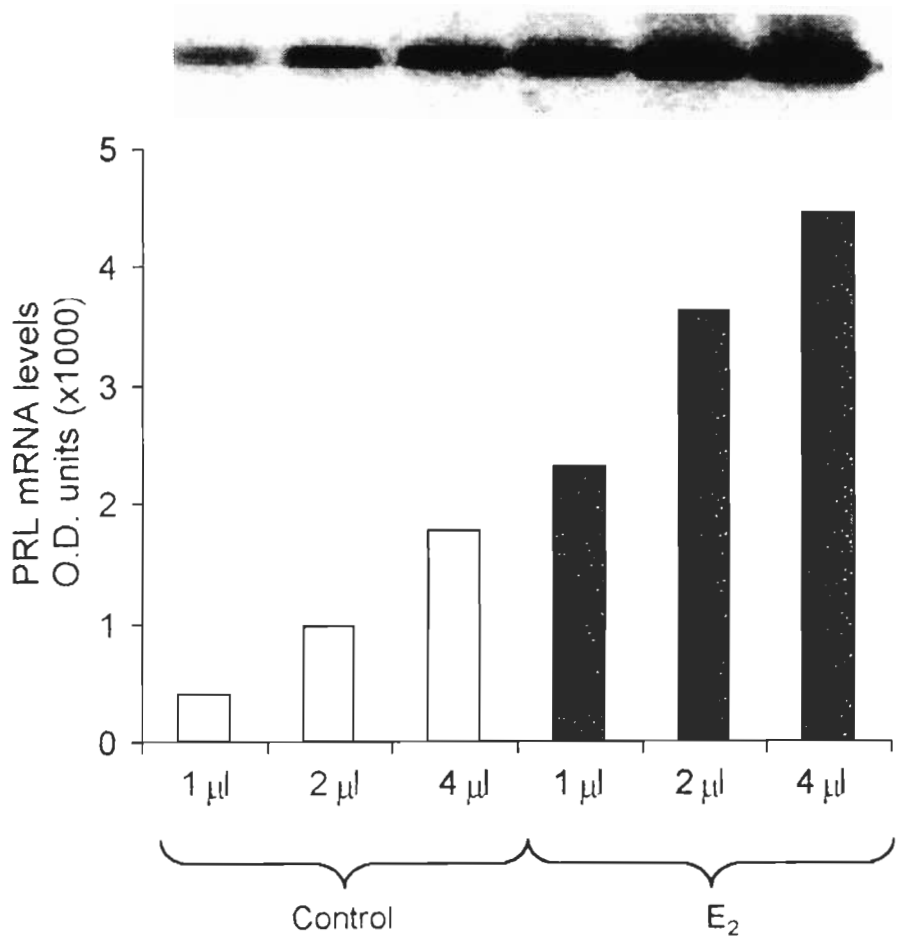


Figure 2

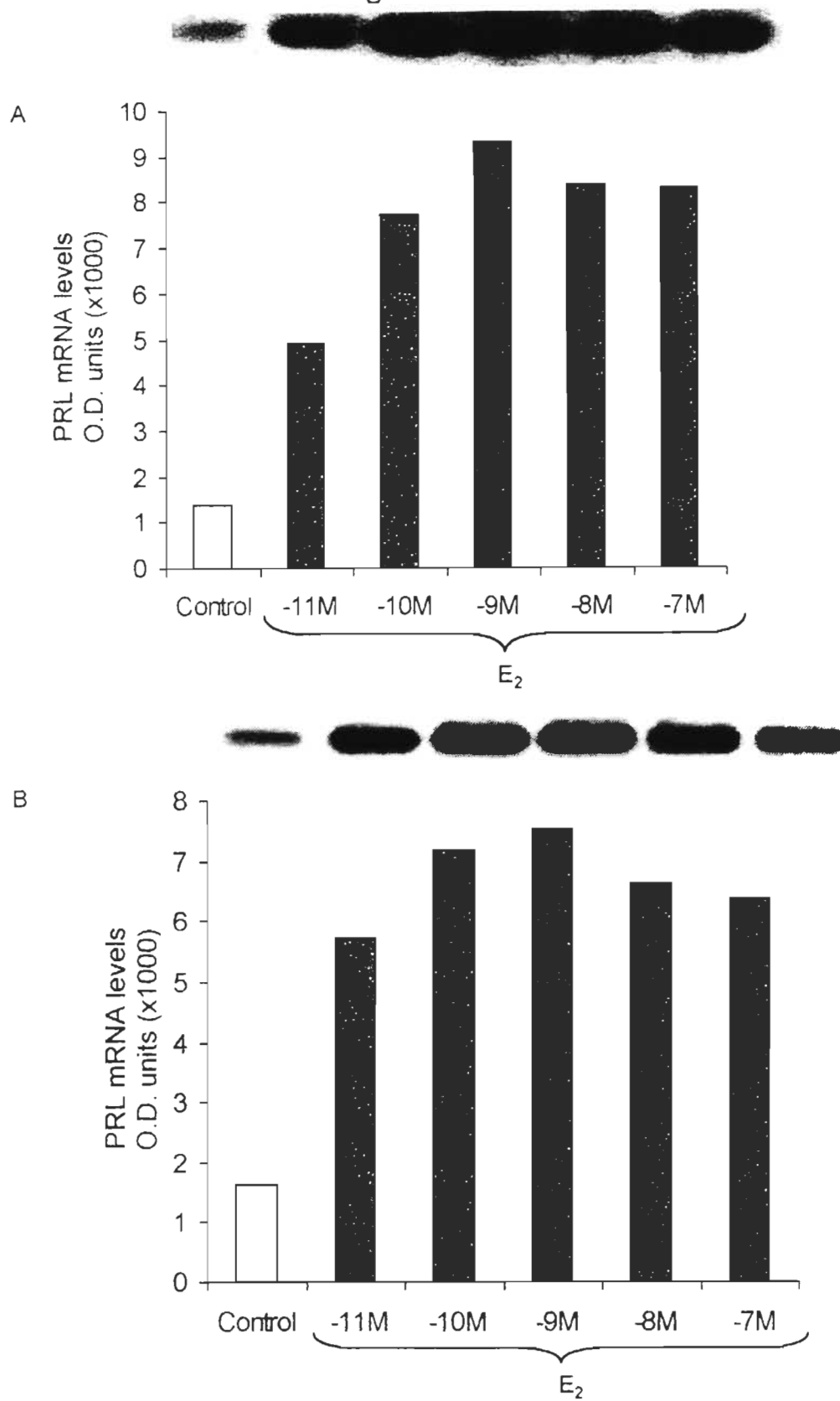


Figure 3

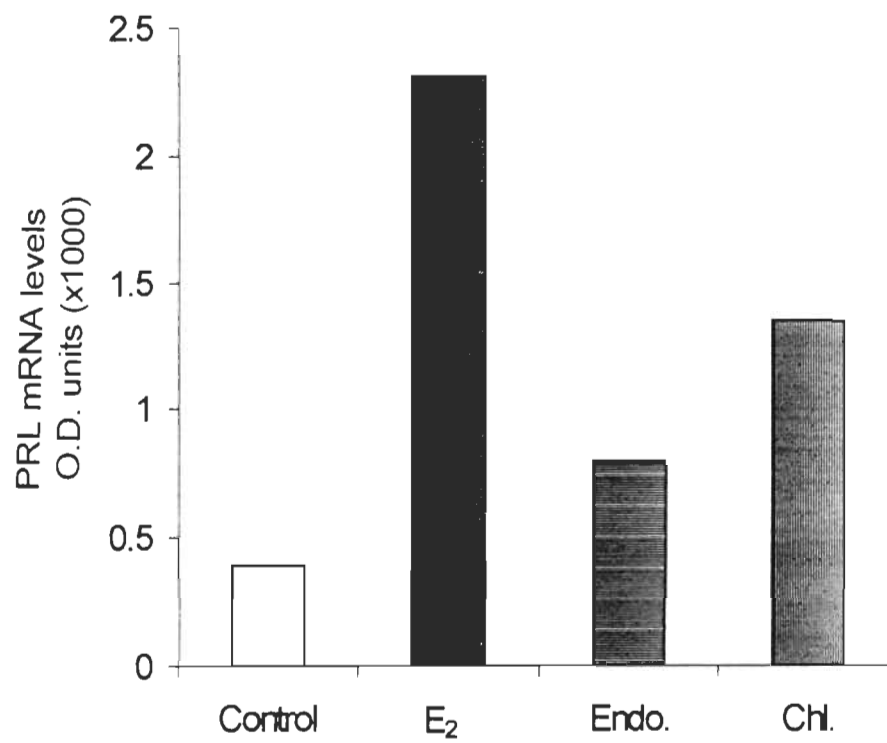


Figure 4

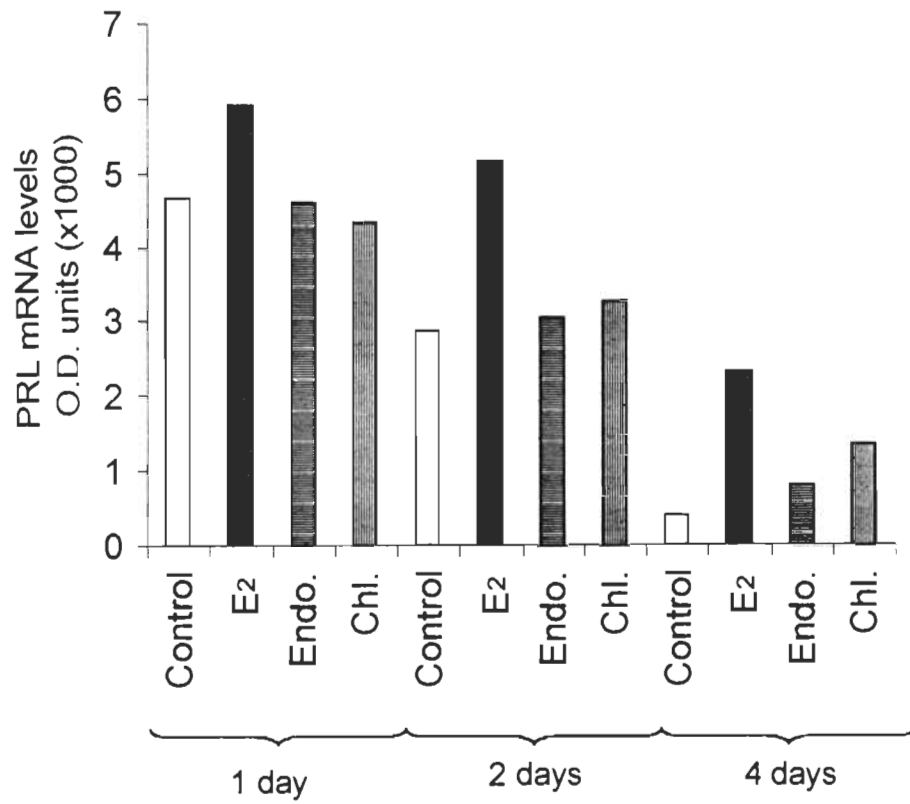
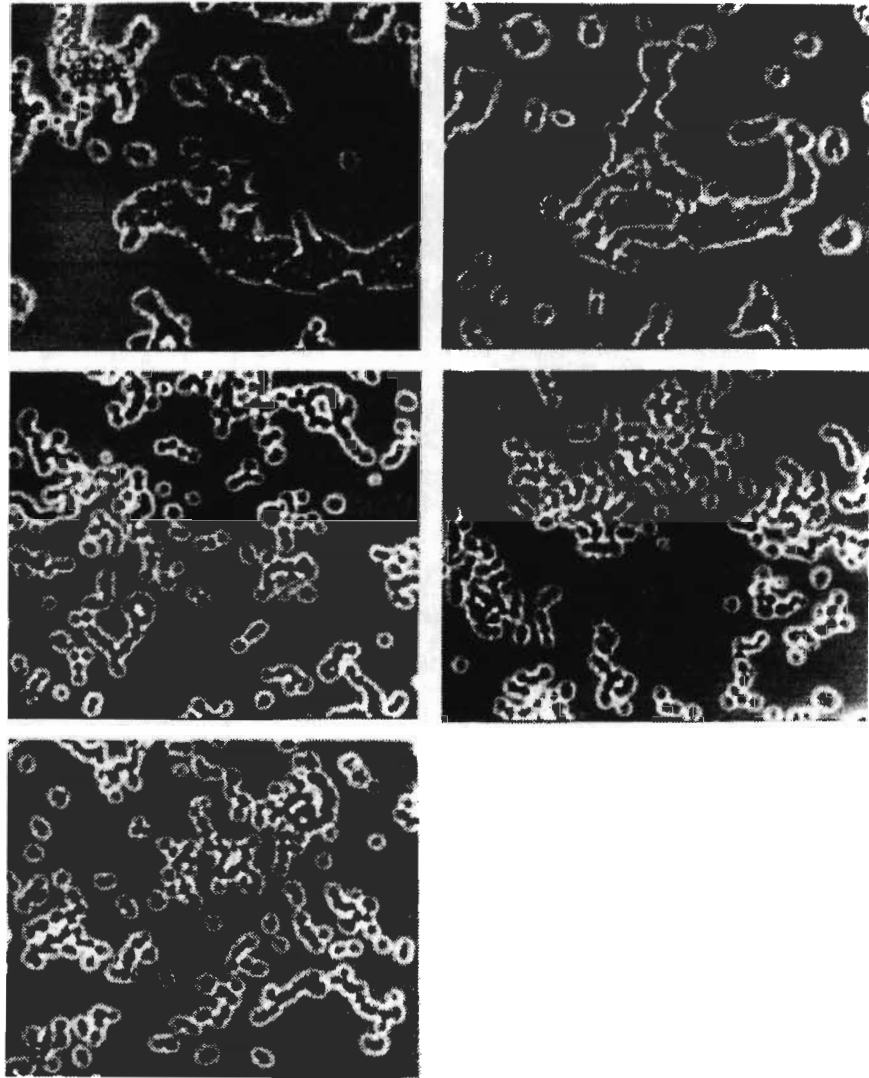


Figure 5



CHAPITRE 3

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

3.1 Introduction

Ce chapitre regroupe différents résultats ne faisant pas partie de l'article au chapitre 2. Cette section permettra de mieux démontrer la démarche scientifique qui repose sous les résultats de l'article au chapitre 2.

Le projet de maîtrise s'est amorcé avec un tout nouveau projet et avec de nouvelles techniques qui n'avaient été mises au point par aucun autre étudiant avant mon arrivé. Dans le domaine de la recherche, il peut arriver que nous soyons dans l'obligation de faire plusieurs tests et expériences avant de trouver un volet à exploiter convenablement. Avant d'en arriver aux conclusions que l'on retrouve dans l'article, le cheminement scientifique de ce projet a pris différentes tournures.

L'objectif ce projet de recherche consistait à étudier les effets estrogéniques de polluants environnementaux, en relation avec le système neuroendocrinien. Pour débiter, nous devions trouver un système expérimental fiable où nous pourrions tester nos molécules. Nous avons voulu étudier l'effet des xénoestrogènes sur l'expression de l'ARNm de la tyrosine hydroxylase (TH) dans des cultures primaires de neurones. La TH a la responsabilité de transformer l'a.a. tyrosine en L-Dopa. Par la suite, cette dernière est transformée en DA. Nous voulions cibler

ce gène, puisque l'expression de cette enzyme est reconnue pour être en partie sous le contrôle des estrogènes (Hermann, Bever et al. 1998). Notre premier objectif était donc de mettre au point la technique de culture primaire de neurones de cerveau de rat.

3.2 Culture neurale

Les neurones sont des cellules qui perdent leur capacité à se diviser après la naissance ou, tout au plus, quelques jours après. Les cultures de neurones sont par conséquent très fragiles et difficiles à cultiver.

La réussite d'une culture primaire de cellules nerveuses repose sur le fait que nous avons besoin de rats très jeunes, âgés de quelques heures seulement. Au-delà de ce délai, l'obtention d'une suspension de cellules viables est très difficile. Avant de découvrir ce détail primordial, nous avons tenté de mettre au point cette technique sur des rats plus âgés. Avec de tels rats, nous n'avons jamais réussi à obtenir la moindre cellule parce que les cellules de leur cerveau étaient déjà trop différenciées pour être mises en culture. En utilisant des rats nouveau-nés, nous obtenions une suspension cellulaire qui contenait un mélange de toutes les sortes de cellules nerveuses : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de la microglie et les neurones. Après cette étape, il faut sélectionner les neurones et se débarrasser des autres types cellulaires. Pour plus de détails, se référer à la légende de la figure 1.

3.2.1 Immunofluorescence

Afin de vérifier la pureté en neurones de mes cultures, nous avons effectué de l'immunofluorescence sur des cellules que nous avons préalablement fait coller sur des lamelles. La figure 1 représente le type de culture que nous avons obtenu. Pour l'immunofluorescence, nous avons utilisé un anticorps primaire anti-GFAP et un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine. GFAP est une protéine du cytosquelette exprimée en majeure partie par les astrocytes. Comme illustrée par la figure 1, la culture cellulaire contient beaucoup trop d'astrocytes pour faire une étude sur les neurones. Les astrocytes, contrairement aux neurones, ont toujours la capacité de se diviser en culture. Pour freiner la prolifération des astrocytes on ajoute à un moment stratégique du protocole (voir détails à la figure 1) l'antimitotique cytosine arabinose (Ara-c). Comme on ne réussit jamais à éliminer tous les astrocytes, ces dernières prennent le dessus sur les quelques neurones et finissent par les envahir. À défaut de voir des neurones, on peut apprécier la qualité et la spécificité de l'anticorps pour les protéines GFAP. On voit très bien le réseau de filaments délimitant le noyau et le contour des cellules.

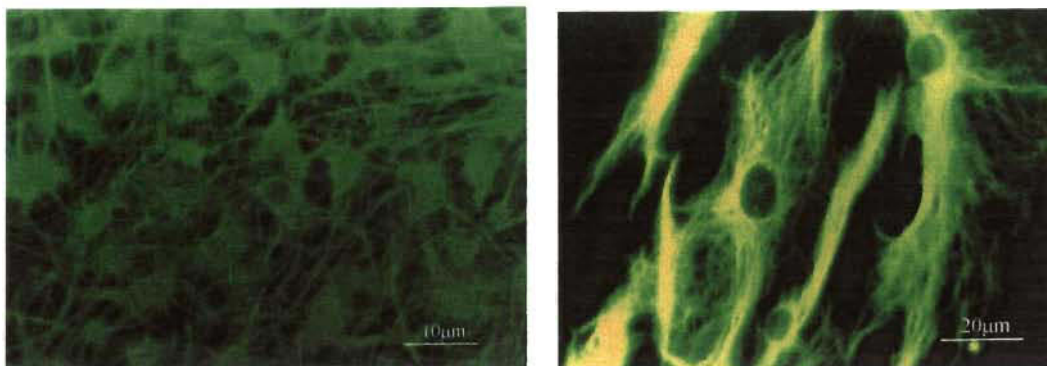


fig. 1a

fig. 1b

Figure 1 : Culture cellulaire:

Les rats nouveau-nés sont anesthésiés avec du méthoxyflurane et guillotins immédiatement. On prélève des morceaux de cortex pour les couper en plus petits morceaux. On les rince dans du DMEM et on récupère la suspension tissulaire par centrifugation. Le culot ainsi obtenu est homogénéisé et incubé pendant 2 h à 37°C dans une solution d'enzymes contenant 510U/ml d'hyaluronidase et 550U/ml de collagénase dans un tampon HEPES 3% BSA. Par la suite, les cellules sont rincées dans du DMEM et récupérées par centrifugation. Ce culot est homogénéisé et incubé dans une deuxième solution enzymatique contenant 0.25 % de pancréatine dans du PBS 1X. Par la suite, on récupère les cellules par centrifugation et on resuspend le culot dans un volume approprié de DMEM + 10% de FBS. *Culture neurale* : La suspension estensemencée à 1.25×10^5 cellules /cm² dans du DMEM +10% de FBS + 5µM d'Ara-c. Trois jours plus tard, on change le milieu sans ajouter d'Ara-c. On laisse les cellules se développer pendant quelques jours. *Immunofluorescence* : Les cellules sont fixées au méthanol (-20°C) sur des lamelles pendant 15 min. Les cellules sont rincées 2 x 1 min avec du PBS 1X et sont perméabilisées 5 min avec du triton 0.2%. Les cellules sont incubées 2h 30 min, à température de la pièce avec l'anticorps primaire(dilution 1/50) anti-GFAP, rincées 3 x 5 min avec du PBS 1X et incubées 1 h avec l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (dilution 1/50). Finalement les cellules sont rincées 3 x 5 min avec du PBS 1X. Photo 1a prise à un grossissement de 200X et la photo 1b est prise à un grossissement de 400X.

3.2.2 Conclusion

Pour ce projet de maîtrise, il était fondamental d'obtenir un grand nombre de cellules. Dans les conditions dans lesquelles nous travaillions, 8-15 ratons ne me donnaient pas suffisamment de cellules pour effectuer des doses réponses sur les cellules et ainsi tester plusieurs molécules à différentes doses. De plus, il fallait

attendre la naissance des ratons pour réussir à démarrer une expérience. Autre problème technique, nous devons mettre au point la technique pour sélectionner les neurones, étant donné la trop grande prolifération des astrocytes. Ces deux dernières contraintes prenaient énormément de temps et comme la durée d'une maîtrise n'est que de deux ans, nous avons décidé d'opter pour l'utilisation d'une lignée cellulaire.

L'effet des xénoestrogènes sur l'expression de la TH dans une culture primaire de neurones aurait été très intéressant à étudier, étant donné que ces cellules proviennent directement d'un organisme vivant. Il ne s'agit pas de cellules tumorales modifiées génétiquement. L'effet qu'on aurait pu observer nous aurait donner de meilleurs indices sur les dérèglements engendrés par les polluants *in vivo*.

3.3 Lignée cellulaire PC-12

Pour faire suite à ces cultures primaires de neurones, nous avons utilisé la lignée de cellules pheochromocytoma (PC12), qui origine d'une tumeur de glandes surrénales de rats. Cette lignée a la particularité de sécréter la DA et de se différencier en neurones. En effet, lorsque ces cellules d'apparence ronde, sont mises en présence de *nerve growth factor* (NGF), elles commencent à émettre des prolongements dans tous les sens. Elles expriment un phénotype neuronal.

Avec cette lignée, nous voulions voir l'effet des xénoestrogènes sur les niveaux de production de DA et sur les niveaux d'expression de la TH. Comme l'expression de la TH est en partie contrôlée par les estrogènes (Hermann, Bever et al. 1998), la DA sera aussi sous le contrôle des différents niveaux de ces stéroïdes. Malheureusement, les PC12 sont des cellules fragiles aux mutations (Banker et Goslin 1996) et mes nombreuses tentatives pour les différencier (Wrighton et Busslinger 1993; Andus et Contreras 1994; Sohrabji, Greene et al. 1994; Andus et Contreras 1996; Banker et Goslin 1996; Zerby et Ewing 1996) se sont soldées par des échecs.

3.3.1 Conclusion

Ce qui était intéressant dans ce type d'étude, c'est que la DA est le seul inhibiteur naturel connu de la PRL. L'étude de ces deux systèmes, c'est-à-dire les GH₃ et les PC12, pourrait permettre de faire un lien entre les dérèglements de la PRL et la DA. Les insuccès de différenciation pourraient s'expliquer par les quelques points suivants. Dans un premier temps, j'ai déjà mentionné que les PC12 sont des cellules sensibles aux mutations (Banker et Goslin 1996). Au début de cette maîtrise, nous avons eu quelques problèmes avec les incubateurs où les cellules étaient cultivées. En effet, les régulateurs du pourcentage de CO₂ étaient défectueux, et les cellules ont été cultivées plusieurs mois dans un environnement non favorable à leur bon développement. De cette façon, nous avons peut-être sélectionné une sous-population de cellules ne pouvant plus se différencier. Un

autre point à ne pas négliger, c'est la solution dans laquelle le NGF a été solubilisé. Bien que nous ayons utilisé le bon type de NGF (7-S), suggéré par plusieurs références (Andus et Contreras 1994; Andus et Contreras 1996), nous avons solubilisé le NGF dans une solution d'acétate de sodium 3M pH 5. Même si cette façon de faire est recommandée dans la référence de Banker et Goslin 1996, il est possible qu'une erreur se soit produite dans la préparation de notre solution. En effet, un pH trop acide pourrait dégrader la molécule de NGF, la rendant inactive pour induire une différenciation.

3.4 Expériences *in vivo*

De plus, pendant cette maîtrise, nous avons effectué quelques expériences *in vivo*, au cours desquelles nous avons traité de jeunes rats avec l'endosulfan et le chlordane. Avec ces expériences, nous voulions vérifier l'effet de ces xénoestrogènes sur les niveaux d'expression de la PRL dans les hypophyses de rats en développement. De plus, nous voulions observer si l'E₂, l'endosulfan ou le chlordane pouvaient induire des changements permanents dans le développement du système neuroendocrinien. Pour ce faire, nous avons traité des jeunes rats de 10 jours quotidiennement, avant que le système neuroendocrinien ne soit totalement formé. Comme il s'agissait pour nous d'une première expérience avec un protocole *in vivo*, ces premiers traitements doivent encore être mis au point, afin de déterminer les meilleures conditions de traitements futurs.

Pour ces expériences *in vivo*, nous avons besoin d'un nombre relativement important d'animaux. Nous nous sommes donc trouvé dans l'obligation de faire accoupler plusieurs femelles pour subvenir à nos besoins. En outre, pour ne pas avoir une trop grande quantité d'animaux à traiter en même temps, nous avons dû planifier les accouplements de manière à ce que les différentes portées soient décalées. De plus, nous avons été dans l'obligation d'attendre la naissance des ratons pour planifier mes traitements, ne pouvant connaître à l'avance les proportions de ratons mâles et femelles. Comme nous avons obtenu une plus grande proportion de mâles, nous avons effectué la majorité des traitements sur ces derniers. Devant toutes ces limitations techniques et temporelles, il nous a été impossible de répéter cette expérience en duplicata. Par conséquent, les résultats suivants, démontrant les niveaux d'expression de l'ARNm de la PRL chez les mâles et les femelles, ont été effectués qu'une seule fois.

3.4.1 Traitement des mâles

Nous avons commencé à traiter les rats à l'âge de dix jours, pour une période de quatorze jours consécutifs. Par la suite, les rats ont été euthanasiés à l'âge de trente-cinq jours afin d'en prélever les hypophyses et d'en extraire l'ARN pour l'analyse des niveaux d'expression de l'ARNm de la PRL par la technique du transfert Northern.

3.4.1.1 Traitement au chlordane

La figure 2 représente les résultats obtenus pour ce type de traitement et la légende de la figure décrit les détails expérimentaux. Nous avons utilisé deux rats pour les contrôles négatifs, traités avec le véhicule seulement, deux rats pour les traitements à l'E₂ et trois autres rats pour chacune des deux doses de chlordane.

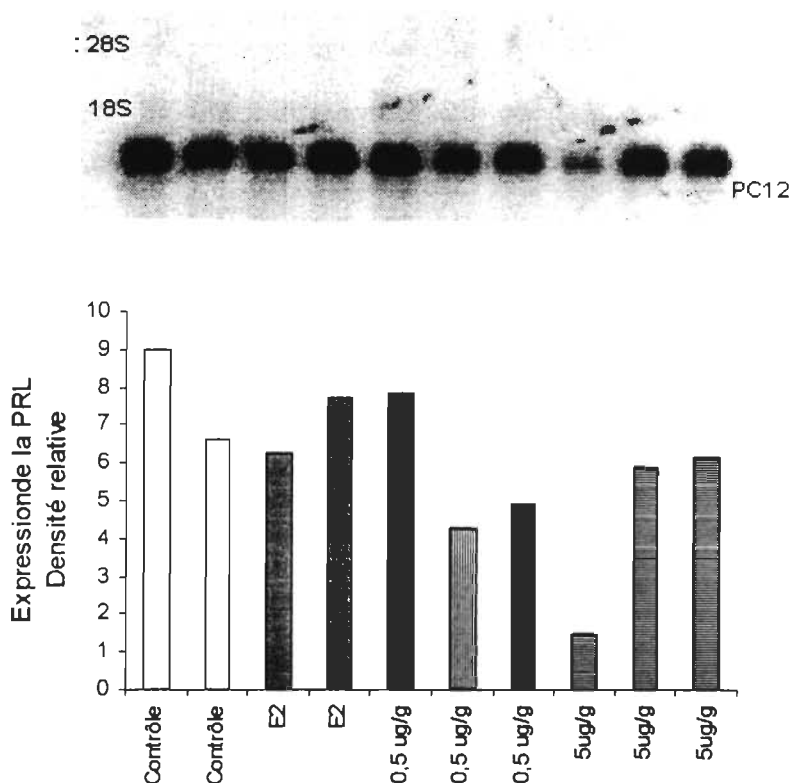


Figure 2 : Traitement au chlordane :

Les rats ont été traités 14 jours consécutifs par injection avec le chlordane dissous dans d'une solution saline de PBS 1X + 0.3% de gélatine. Chaque rat a été pesé régulièrement (2-3 jours) afin de garder le même rapport dose /g de rats. Les contrôles ont seulement reçu le véhicule, la dose d'E₂ est de 0.07µg/g et les deux doses de chlordane sont de 0.5µg/g et 5 µg/g. 5µg d'ARN total ont été utilisés pour effectuer le transfert Northern. L'uniformité de la quantité d'ARN dans chaque puits a été contrôlé en comparant les intensités des ARN ribosomals (28S et 18S) dans le gel. Pour obtenir plus de détails sur la technique du transfert Northern, se référer au matériel et méthode de l'article du chapitre 2.

En observant le graphique de la figure 2, on peut voir que les différents traitements n'ont pas induit de changements significatifs dans les niveaux d'expression de la PRL, par rapport aux contrôles. De plus, on observe même des variations dans une même catégorie de traitement. Par exemple, les deux rats traités à l'E₂ montrent des niveaux de PRL différents. Une lacune que l'on peut dégager de ces traitements, c'est le nombre d'animaux par catégorie de traitement. Comme il n'y a pas un animal qui va réagir exactement de la même façon qu'un autre, j'aurais eu besoin d'au moins cinq animaux par catégorie de traitements, afin de voir la tendance générale de l'effet des différents produits testés. Par contre, sur cette même figure, on peut observer la spécificité de la sonde de PRL. Il n'y a aucune bande de PRL dans le puits où on retrouve l'ARN de PC12. Cette lignée cellulaire n'exprime pas le gène de la PRL.

3.4.1.2 Traitement à l'endosulfan

La figure 3 représente les résultats obtenus pour ces traitements. Se référer à la légende de la figure 3 pour les détails expérimentaux. Nous avons utilisé deux rats, pour les contrôles négatifs, traités avec le véhicule seulement, quatre rats pour les traitements à l'E₂ (0.07µg/g), trois rats pour la dose de 3µg/g d'endosulfan et 2 rats pour la dose de 6µg/g d'endosulfan.

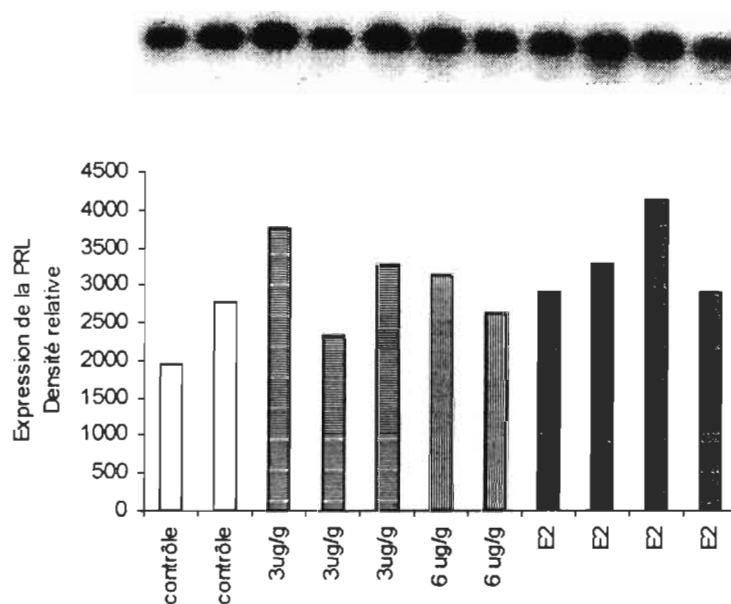


Figure 3 : Traitement à l'endosulfan :

Les rats ont été traités pendant 14 jours consécutifs par gavage. Les doses d'endosulfan ont été dissoutes dans de l'huile de sésame. Chaque rat a été pesé régulièrement (2-3 jours) afin de garder le même rapport dose /g de rats. Les contrôles ont seulement reçu le véhicule, les doses d'E₂ sont de 0.07µg/g et les doses d'endosulfan sont de 3µg/g et 6 µg/g. 5µg d'ARN total ont été utilisés pour effectuer le transfert Northern. L'uniformité de la quantité d'ARN dans chaque puits a été contrôlé en comparant les intensités des ARN ribosomals (28S et 18S) dans le gel. Pour obtenir plus de détails sur la technique du transfert Northern, se référer au matériel et méthode de l'article du chapitre 2.

Les résultats de la figure 3 démontrent aussi qu'il ne semble pas y avoir de rapport entre les doses d'E₂ et de xénoestrogènes sur les niveaux d'ARNm de PRL.

3.4.2 Traitement des femelles

Afin de profiter au maximum des animaux que nous avons à notre disposition, nous avons décidé d'utiliser les quelques femelles qui restaient. Comme le but de ces expériences était d'observer un effet sur les niveaux d'expression de la PRL

dans l'hypophyse, nous avons voulu comparer l'effet de l'E₂ chez les femelles. Un premier groupe de quatre femelles a subi l'ablation des ovaires. Ces organes sont la principale source d'estrogène chez les femelles. Il faut donc enlever la source d'E₂ endogène, si l'on veut que les rates réagissent aux doses d'E₂ que nous leur donnons. Les femelles représentaient un grand intérêt pour ce genre d'expérience, par le fait que la PRL joue un rôle qu'on ne retrouve pas chez les mâles. En effet, la PRL est une hormone qui est grandement impliquée dans les phénomènes de grossesse, où elle déclenche la production de lait maternel par les glandes mammaires qui y sont adéquatement préparées par les estrogènes.

Afin de diminuer les risques de perdre des sujets à cause de l'opération, nous avons opéré les rates à l'âge de vingt-quatre jours. Dès le lendemain, ces animaux ont commencé à recevoir leur dose d'E₂ par gavage avec l'huile de sésame, pour une période de quatorze jours. Elles ont été sacrifiées quatre jours après leur dernier traitement. Les résultats démontrent (non-présentés) qu'il n'y a pas de différences significatives entre les niveaux de PRL des femelles contrôles et celles ayant reçu de l'E₂. Selon ces résultats, il semblerait que l'E₂ n'ait pas produit d'effets sur l'expression de la PRL.

3.4.3 Conclusion

Les expériences faites avec les mâles et les femelles ne permettent pas de conclure à un quelconque effet de l'endosulfan ou du chlordane sur l'expression de

l'ARNm de la PRL. On n'observe même pas de changement sur les niveaux de PRL lorsque les animaux sont traités à l'E₂.

Le fait que nous n'observons pas de changement sur la PRL, peut s'expliquer par un bon nombre d'hypothèses. Il se peut que la dose d'E₂ n'ait pas été assez grande ou, tout simplement qu'elle n'ait pas été administrée dans la bonne période de temps. Peut-être que le système neuroendocrinien était trop développé pour ressentir les effets des différents produits testés.

Même si les expériences faites sur les mâles et les femelles ne donnent pas des résultats concluants, ils vont sûrement servir de point de départ aux futurs étudiants du laboratoire qui voudront effectuer ce genre d'étude. Les modifications à faire pour obtenir de meilleurs résultats sur l'effet des pesticides sur l'expression de la PRL *in vivo* seraient les suivantes : 1) Traiter les rats dans leur plus prime jeunesse, avant qu'ils aient dix jours. 2) Sacrifier les animaux le lendemain du dernier traitement. 3) Le meilleur mode d'administration des pesticides est le gavage avec de l'huile de sésame, pour la simple raison que les molécules testées ne sont pas solubles dans l'eau. 4) Afin de comparer l'effet que les xénoestrogènes produisent sur le gène de la PRL, on aurait avantage à traiter au moins cinq animaux avec la même dose et à utiliser les mêmes doses pour l'E₂ et les autres molécules testées. Finalement, il y aurait sûrement avantage à réduire au maximum les stéroïdes endogènes. Pour les femelles et les mâles, on devrait

enlever les ovaires et les testicules le plutôt possible.

3.5 Effet du Diéthylstilbestrol

La figure 5 au chapitre 2 démontre que l'E₂ induit des changements au niveau de l'apparence et de l'organisation cellulaire des cellules GH₃. Par contre, l'endosulfan et le chlordane n'induisent pas ces changements. L'apparence et l'organisation cellulaire des cellules ressemblent beaucoup plus à celle du contrôle. Par rapport aux changements d'apparence et d'organisation cellulaire, nous avons voulu tester si un autre composé hautement estrogénique se liant au RE, différent de l'E₂, pouvait causer les mêmes changements.

Le diéthylstilbestrol (DES) est un composé hautement estrogénique, reconnu pour causer différents problèmes, en particulier sur le système reproducteur des humains et des animaux de laboratoire (Bern et Herbst 1981; Creco, Duello et al. 1993). Plus spécifiquement, le DES peut augmenter les risques de cancers vaginaux chez les jeunes femelles ayant été exposées à ce produit (McLachlan et Arnold 1996). On a aussi observé des changements structuraux de l'utérus, du vagin et des trompes de Fallope (McLachlan, Newbold et al. 1980).

Les cellules GH₃ ont été traitées avec une dose de 10⁻⁹ M de DES dans les mêmes conditions expérimentales que celles traitées avec l'E₂. Sur la figure 5 de l'article au chapitre 2, on peut observer que le DES induit les mêmes changements

d'apparence et d'organisation cellulaire que l'E₂. De plus, les résultats de RT-PCR démontrent la puissance estrogénique du DES pour induire spécifiquement les gènes de la PRL. Il faut noter toutefois qu'à dose égale, le DES induit moins l'expression de la PRL que l'E₂.

Ces derniers résultats, en comparaison à ceux obtenus avec l'endosulfan et le chlordane, permettent de nous orienter sur le ou les modes d'action que l'endosulfan et le chlordane peuvent prendre pour induire l'ARNm de la PRL. Dans mes conditions expérimentales, un composé fortement estrogénique comme l'E₂ ou le DES, utilisant le RE pour induire le gène de la PRL, a le pouvoir de provoquer des changements d'organisation cellulaire. Par contre, l'endosulfan et le chlordane ne provoquent pas de tels changements, mais induisent le gène de la PRL. Ces inductions sont plus faibles que celles provoquées par l'E₂ et le DES.

On pourrait émettre l'hypothèse que c'est l'activation du RE qui entraîne les changements d'organisation cellulaire. Comme les deux pesticides utilisés ne produisent pas les mêmes effets organisationnels, on pourrait penser que ces xénoestrogènes induisent la PRL via d'autres voies que la fixation directe sur le RE.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Les principaux objectifs de cette maîtrise étaient de déterminer si l'endosulfan et le chlordane pouvaient induire spécifiquement un gène normalement contrôlé par l'E₂, en l'occurrence la PRL, et d'établir un modèle expérimental efficace pour la détection de molécules potentiellement estrogéniques.

La figure 2 de l'article au chapitre 2 nous montre très bien que le gène de la PRL, exprimé dans la lignées de cellules hypophysaires GH₃, est induit par l'E₂ selon la dose utilisée. Cette induction se détecte aussi bien par la technique du transfert Northern que celle du RT-PCR. Les figures 2a et 2b nous démontrent que la dose d'induction maximale de la PRL par l'E₂ est 10⁻⁹ M. Pour les doses de 10⁻⁸ et 10⁻⁷ M, les niveaux de PRL diminuent. Nous avons donc décidé d'utiliser la dose de 10⁻⁹ M pour tester l'endosulfan et le chlordane, afin de voir si ces produits pouvaient débalancer l'expression de la PRL. De plus, il est tout à fait justifié d'utiliser cette concentration puisque 10⁻⁹ M représente 4.07 x 10⁻⁴ et 4.09 x 10⁻⁴ ppm pour l'endosulfan et le chlordane respectivement. Les concentrations acceptées par l'EPA dans la nourriture se situent entre 0.1 et 2 ppm. Ce qui veut dire que nous consommons de la nourriture qui peut contenir des doses 10 000 fois plus grandes que les doses actives, d'un point de vue cellulaire.

La technique du RT-PCR est relativement jeune en comparaison à celle du transfert Northern, nous avons donc entrepris de déterminer que cette technique est un bon outil quantitatif pour étudier l'expression génique. Les différentes dilutions d'un même ADNc permettent de voir que le RT-PCR est quantitatif (figure 1 de l'article au chapitre 2). Il faut noter ici que l'obtention d'un bon PCR quantitatif repose sur la rigueur et la précision des manipulations expérimentales. Par exemple, la mise au point du nombre de cycles PCR est particulièrement importante. Il faut s'assurer que nous sommes toujours dans la phase exponentielle du PCR. La phase exponentielle est représentée par la partie linéaire d'un graphique du logarithme (log) du nombre de copies par le nombre de cycles. La phase linéaire du graphique de la figure 1 assure que la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle et que la quantité relative de deux types d'ADN, dans des échantillons différents, sera proportionnelle.

Comme le démontre la figure 1, cette phase se retrouve dans les premiers cycles du PCR. Au-delà d'une certaine limite de cycles, l'amplification a tendance à plafonner, en raison de l'épuisement des composantes de la solution. Par exemple, au bout d'un certain nombre de cycles, la polymérase perd de son efficacité.

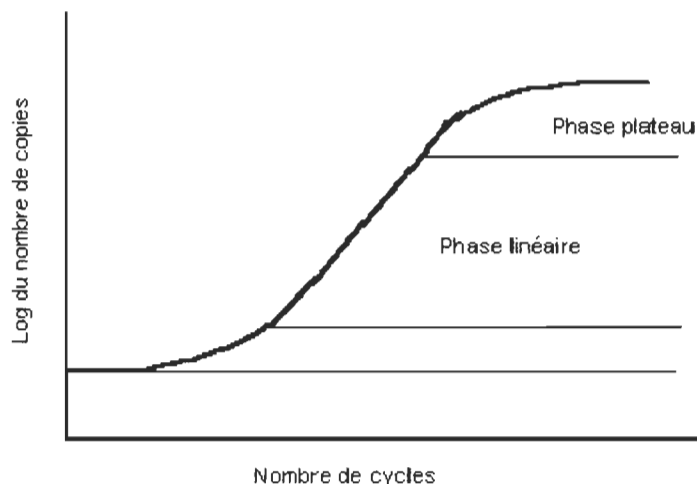


Figure 1 : Schéma d'une amplification PCR

La raison pour laquelle nous avons choisi de traiter les cellules pendant 4 jours avec l'E₂, l'endosulfan et le chlordane est représentée par la figure 4 de l'article au chapitre 2. On peut voir qu'après un et deux jours, les pesticides ne sont pas en mesure d'induire l'expression de la PRL et les niveaux correspondent à ceux des contrôles. Par contre, on peut observer que les niveaux de PRL diminuent dans le temps et que l'induction produite par l'E₂ est plus forte à mesure que les niveaux diminuent.

L'endosulfan et le chlordane ont des effets spécifiques sur l'expression de l'ARNm de la PRL après 4 jours de traitement. Ces résultats peuvent être visualisés sur la figure 4 de l'article au chapitre 2. On peut expliquer ce phénomène par le fait que les deux pesticides utilisés sont, en réalité, de faibles inducteurs de la PRL. Donc, pour réussir à voir un effet, il faut attendre que les

niveaux de PRL aient diminué suffisamment pour qu'on soit en mesure de détecter l'effet produit par les pesticides.

Cela s'explique par le fait que les cellules n'ont pas encore tout à fait épuisé leurs réserves d'E₂ qu'elles ont accumulées pendant les deux jours d'incubation dans un milieu contenant le sérum normal (avec stéroïdes) et le rouge de phénol. Afin de déterminer si l'effet estrogénique expérimentale se fait réellement sentir seulement après 4 jours traitement, il serait nécessaire d'incuber les cellules GH₃ pendant 2 jours dans un milieu contenant le sérum sans stéroïdes et sans rouge de phénol avant d'ajouter les différentes doses d'E₂ ou de pesticides. Cette incubation permettrait aux niveaux de PRL de descendre suffisamment bas pour voir l'effet estrogénique, de l'endosulfan et du chlordane, après 1 et 2 jours de traitement, si effet il y a.

Donc, pour les 4 jours de traitement, l'effet du chlordane sur l'expression de la PRL est un peu plus marqué que l'effet produit par l'endosulfan. On remarque aussi que l'induction produite par les deux pesticides reste toujours plus faible que l'induction produite par l'E₂. Il est clair ici que nous sommes en présence de molécules ayant des pouvoirs estrogéniques. En réalité, on devrait plutôt dire des effets similaires à l'E₂. Le terme *similaire* est employé pour désigner le fait que nous observons un phénomène normalement induit par l'E₂, sans pouvoir conclure sur le mode d'action.

Les résultats de la figure 5 de l'article permettent de nous orienter sur le mode d'action des xénoestrogènes. En effet, un traitement de 4 jours avec 10^{-9} M d'E₂ induit un fort changement organisationnel chez les cellules GH₃. Par contre, même si l'endosulfan et le chlordane induisent le gène de la PRL, ils sont incapables de provoquer de tels changements. L'organisation cellulaire s'apparentent beaucoup plus à celles des cellules contrôles. De plus, sur la figure 5, le DES, un xénoestrogène très puissant (Bern et Herbst 1981; Creco, Duello et al. 1993), induit les mêmes changements organisationnels que l'E₂. Comment pouvons-nous expliquer le fait que les pesticides induisent l'expression de la PRL, sans engendrer de changements organisationnels visibles ?

À la lumière de ces résultats, on pourrait penser que les changements organisationnels sont engendrés par l'activation directe du RE, comme le fait l'E₂ et le DES. Donc, l'effet observé pour l'endosulfan et le chlordane serait en majeure partie causé par l'activation de voies secondaires. Ce type de résultats ne nous permet pas de conclure sur le ou les modes d'action exacts qu'empruntent ces xénoestrogènes, mais nous permet d'émettre certaines hypothèses.

L'endosulfan est un xénoestrogène reconnu pour avoir la capacité de se lier au RE (Arnold, Klotz et al. 1996; Vonier, Crain et al. 1996; Petit, Le Goff et al. 1997; Wade, Desaulniers et al. 1997), puisqu'il entre en compétition avec l'E₂-H³ pour le domaine de liaison de l'hormone du RE. Selon Arnold et al. en 1996, l'endosulfan a une affinité pour le RE 10 000 fois moins grande que l'E₂ lui-même (Arnold, Klotz

et al. 1996). Par conséquent, il serait peu probable que l'effet observé sur la PRL soit principalement causé par la fixation de l'endosulfan sur le RE. C'est le faible degré de liaison de l'endosulfan pour le RE et les fortes inductions observées sur la PRL, qui nous permet d'émettre l'hypothèse que ce pesticide agit via une voie secondaire, autre que la fixation directe sur le RE.

Malgré certaines évidences estrogéniques du chlordane (Cassidy, Vorhees et al. 1994; Arnold, Klotz et al. 1996; Massaad, Coumoul et al. 1998), ce dernier n'aurait pas la faculté de se fixer au domaine de liaison de l'hormone. De par le fait qu'il n'induit pas les changements organisationnels, on pourrait conclure que sa voie d'action est différente du RE.

À défaut de conclure définitivement sur le ou les voies d'action de l'endosulfan et du chlordane, on peut suggérer les voies énumérées dans la section 1.8. Nous pouvons éliminer la voie qui implique les contrôles stéroïdiens en raison du fait que mon étude est faite sur une lignée de cellules ne possédant pas l'arsenal enzymatique nécessaire à la synthèse de nouveaux stéroïdes. Les stéroïdes dont les cellules ont besoin proviennent d'une source extérieure (sérum, milieu, etc.).

On pourrait être en présence d'un site secondaire de fixation sur le RE, comme le suggère Arnold et al. pour le chlordane (Arnold, Klotz et al. 1996). De par la similitude dans les structures moléculaires de l'endosulfan et du chlordane, il ne serait pas impossible que l'endosulfan emprunte aussi cette voie. Par contre cette

avenue reste à vérifier.

Les voies impliquant d'autres types de récepteurs, agissant de façon indirecte sur les réponses estrogéniques, représentent à mon avis un domaine qui mériterait d'être exploré plus en profondeur. Par exemple, nous savons que certains mécanismes de phosphorylation du RE peuvent engendrer son activation en absence de ligands (Ignar-Trowbridge, Pimentel et al. 1995; O'Malley, Schrader et al. 1995; Pietras 1995; Bunone, Briand et al. 1996; Wilson, Foster et al. 1998).

L'EGF, dans certaines conditions, induit la phosphorylation de la partie AF-1 du RE et pourrait impliquer l'activation de la voie « Ras » (Korach, Davis et al. 1997; Gillesby et Zacharewski 1998; Wilson, Foster et al. 1998). Il serait très intéressant de voir comment agissent l'endosulfan et le chlordane sur l'activation des différents éléments de la voie « Ras » et sur les événements induits par l'EGF.

Il existe certaines évidences dans la littérature supportant le fait que le gène de la PRL peut être induit par d'autres modes d'action que la voie estrogénique classique. En effet, l'EGF a la capacité d'induire l'expression du gène de la PRL dans les cellules GH₃ (Hapgood, Libermann et al 1983; White et Bancroft 1983; White 1985; Jackson, Bandyopadhyay et al 1990; Berwaer, Peers et al 1993; Zhang, Kulig et al 1993). On ne connaît pas entièrement le mode d'action qu'emprunte l'EGF pour induire le gène de la PRL, mais on sait que l'implication de différentes kinases joueraient un rôle important. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur

de tyrosine kinase, l'herbimycin A, diminue la capacité du EGF à augmenter l'expression du gène de la PRL (Billis et White 1997). Ces faits viennent renforcer l'hypothèse des mécanismes secondaires pour expliquer le mode d'action des xénoestrogènes n'agissant pas directement sur le RE. Nous savons que le EGF a un effet sur le gène de la PRL, en utilisant différentes phosphorylations, et qu'il a la capacité d'activer le RE indépendamment de son ligand. Donc, il est fort possible qu'un xénoestrogène emprunte une tel voie pour augmenter l'expression du gène de la PRL.

Précédemment, nous avons amplement parlé de la mise au point du RT-PCR sur l'expression de la PRL dans les cellules GH₃ et des différents modes d'action des xénoestrogènes. Il ne faut pas oublier que notre modèle expérimental n'est pas un modèle transfecté dans le but d'insérer un gène contrôlé par l'E₂. Donc, les événements qui s'y passent peuvent très bien se reproduire chez les mammifères. La PRL est un gène naturellement contrôlé par l'E₂, autant en culture cellulaire que chez les mammifères. Donc, les dérèglements de l'expression de la PRL pourraient éventuellement mener à l'apparition de problèmes reliés à la surexpression de cette protéine.

Par exemple, l'annexe 1 donne la liste des principales fonctions de la PRL. Devant ces deux pages complètes de fonctions, il est facile de penser que les xénoestrogènes peuvent dérégler quelques fonctions et mener à des problèmes de reproduction, comme par exemple ceux retrouvés chez les alligators du lac

Apopka en Floride (Vonier, Crain et al. 1996).

Avec toutes ces questions sans réponses, il reste énormément de recherches à faire afin d'expliquer les modes d'actions des xénoestrogènes, l'implication qu'ils peuvent avoir sur les dérèglements de la PRL et leur rôle encore hypothétique sur l'apparition de maladies comme certains cancers hormonaux dépendants.

BIBLIOGRAPHIE

Ahlborg, U. G. (1995). "Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: An assessment of the biological and epidemiological evidence." *Crit. Rev. Toxicol.* **25**: 463-531.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, k., Watson J.D.. (1996). "Molecular biology of the cell " garland publishing, New york.

Andus, W. G. R. and M. L. Contreras (1994). "The effects of aroclor 1254 on undifferentiated and NGF-stimulated PC12 cells." *Neurotoxicology* **15**(4): 809-818.

Andus, W. G. R. and M. L. Contreras (1996). "Effects of polychlorinated biphenyls on dopamine release from PC12 cells." *Toxicology Letters* **89**: 191-199.

Arnold, S. F., Klotz, D. M., B. M. Collins, P. M. Vonier, L. J. Guillette, J. A. McLachlan (1996). "Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals [retracted by McLachlan JA. In: *Science* 1997 Jul 25;277(5325):462-3]." *Science*. 1996 Jun 7; **272**(5267): 1489-1492

ATRS DR, (1993). "Toxicological profile for endosulfan." Departement of health and human services., U.S.A.

Banker, G. and K. Goslin, Eds. (1996). *Culturing nerve cells*, Massachusetts

Institute of Technology Press.

Bern, H. A. and A. L. Herbst (1981). "Developmental effects of diethylstilbestrol (DES) in pregnancy." New-York:Thieme-Stratton.

Berwaer, M., Peers, B., Nalda, A. M., Monget, P., Davis, J. R., Belayew, A. and Martial, J. A. (1993). "Thyrotropin-releasing hormone and epidermal growth factor induce human prolactin expression via identical multiple cis elements." *Mol. Cell. Endocrinol.* 92(1): 1-7. Billis, W. M. and White, B. A. (1997). "Effects of the protein tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A, on prolactin gene expression in GH3 and 235-1 pituitary tumor cells." *Biochim. Biophys. Acta.* 1358(1):31-8.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Binart, N. and Kelly, P.A. (1998). "Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice." *Endocr. Rev.* **19**(3): 225-268.

Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J. and Picard, D. (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the map kinase pathway and direct phosphorylation." *EMBO J.* **15**: 2174-2183.

Cassidy, R. A., Vorhees, C. V., Minnema, D. J. and Hastings, L. (1994). "The effects of chlordane exposure during pre- and postnatal periods at environmentally relevant levels on sex steroid-mediated behaviors and functions in the rat." *Toxicol.*

Appl. Pharmacol. 1994 Jun; **126**(2): 326-337

Clark, J. H. and Peck, E. J. Jr. (1980). "Nuclear binding and biologic response-interrelationships between early and late uterotopic responses." In: Female sex steroids- Monographs og Endocrinology. New-York: Springer-Verlag. 88-91.

Colborn, T., Van Saal, F. S. and Soto, A. M. (1993). "Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans." Environ. Health Perspect. **101**: 378-384.

Creco, T. L., Duello, T. M. and Gorski, J. (1993). "Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of estrogen receptor and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tract." Endocr. Rev. **14**: 59-71.

Cummings, A. M. and Metcalf, J. L. (1995). "Methoxychlor regulate uterine estrogen-induced protein." Toxicol. Appl. Pharmacol. **130**: 154-160.

Darnell, Lodish and Baltimore. (1993). Biologie moléculaire de la cellule 2^e Ed, De Boeck-Wesmael s.a.

Dauvois, S., White, W. and Parker, M. G. (1993). "The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling." J. Cell. Sci. **106**: 1377-1388.

Davis, D. L. and Bradlow, H. L. (1995). "Can environmental estrogens cause breast cancer?" *Sci. Am.* **273**: 167-172.

Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J. and McDonnell, D. P. (1997). "Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* : **143**(1): 205-212

Gillesby, B. and Zacharewski, T. R. (1998). "Exoestrogens - mechanisms of action and strategies for identification and assessment." *Environ. Toxicol. Chem.* **17**(1): 3-14.

Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T. and Komen, H. (1996). "Feminization of male carp" *Nature.* **384**(6606): 221-222

Guyette, W. A., Matusik, R. J. and Rosen, J. M. (1979). "Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. " *Cell.* **17**: 1013-1023

Hapgood, J., Libermann, T. A., Lax, I., Yarden, Y., Schreiber, A.B., Naor, Z. and Schlessinger, J. "Monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor induce prolactin synthesis in cultured rat pituitary cells (GH₃)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* **80**(21):6451-6545.

Hermann, B., Bever, C., Winkler, A., Holsboer, F. and Rupprecht, R. (1998). "Regulation of the tyrosine hydroxylase by steroid hormones." Abstracts :Society for Neurosci. **part 2**: 2484.

Ignar-Trowbridge, D. M., Pimentel, M., Teng, C. T., Korach, K. S. and McLachlan, J. A. (1995). "Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems." Environ. Health Perspec. **103**: 35-38.

Jackson, A. E., Bandyopadhyay, S. K. and Bancroft, C. (1990) ." Epidermal growth factor and phorbol ester regulate prolactin gene expression via distinct pathways." Mol. Cell. Endocrinol. 69(1):7-11

Johnson, J. M. and Ware G. W. (1998). Pesticide litigation manual. New York, Clark Boardman Callaghan, Eds.

Karthikeyan, N. and Thamphan, R. V. (1996) "Plasma membrane is the primary site of localization of the nonactivated estrogen receptor in the goat uterus: hormone binding causes receptor internalization. "Arch. Biochem. Biophys. 325: 47-57.

Keller, H., Givel, F., Perroud, M. and Wahli, W. (1995). "Signaling crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response element." Mol. Endocr. **9**: 794-804.

Klinge, C.M., Bodenner, D. L., Desai, D., Niles, R.M. and Traish, (1997). "Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro." *Nucleic Acid Res.* 25: 1903-1912

Korach, K. S., Davis, V. L., Curtis, S. W. and Bocchinfuso, W. P. (1997). "Xenoestrogens and Estrogen Receptor Action." *Endocr. Toxicol.*: 181-212.

Massaad, C., Coumoul, X., Sabbah, M., Garlatti, M., Redeuilh, G. and Barouki, R. (1998). "Properties of overlapping EREs: synergistic activation of transcription and cooperative binding of ER." *Biochemistry*; **37**(17): 6023-6032.

McLachlan, A. J. (1997). "Synergistic effect of environmental estrogens: Report Withdrawn." *Science*; 277(5325):462-423

McLachlan, J. A. and S. F. Arnold (1996). "Environmental estrogens found internally, certain compounds are important signals found in the environment, they can become just so much noise." *Sci. Am.* **84**: 452-461.

McLachlan, J. A. and K. S. Korach (1995). "Symposium on estrogens in the environment, III." *Environ. Health Perspect.* **7**: 3-4.

McLachlan, J. A., Newbold, R. R. and Bullock, B. C. (1980). "Long-term effects on female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol." *Cancer Res.* **40**: 3988-3999.

Nunez, S.B., Medlin, J.A., Keller, H., Wang, K., Ozato, K., Wahli, W. and Segars, J. (1995). "Retinoid X receptor beta and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen response element." *Recent. Prog. Horm. Res.* 50: 409-416

O'Malley, B. W., Schrader, W. T., Mani, S., Smith, C., Weigel, N. L., Conneely, O. M. and Clark, J. H. (1995). "An alternative ligand-independent pathway for activation of steroid receptors." *Recent Progress in hormone Res.* 50: 333-347.

Pappas, T. C., Gametchu, B. and Watson, C. S. (1995). "Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding." *FASEB J.*; 9(5): 404-410

Patrone, C., Ma, Z. Q., Pollio, G., Agrati, P., Parker, M. G. and Maggi, A. (1996). "Cross-coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells." *Mol. Endocr.* 10: 499-507.

Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J. P., Valotaire, Y. and Pakdel, F. (1997). "Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures." *J. Mol. Endocrinol.*; 19(3): 321-335

Pietras, R. J. (1995). "HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells."

Oncogene **10**: 2435-2446.

Pietras, R. J. and Szego, C. M. (1977). "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells." *Nature* 265: 69-72.

Pietras, R. J. and Szego, C. M. (1980). "Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes." *Biochem. J.* 191: 743-760

Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I. C., Norris, J. D., McDonnell, D. P., Leonard, L. S., Gaido, K. W., Bocchinfuso, W. P., Korach, K. S. and Safe, S. (1997). "Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism." *Endocrinology*; **138**(4): 1520-1527

Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I. C., Safe, S., Norris, J. D., McDonnell, D. P., Gaido, K. W., Bocchinfuso, W. P. and Korach, K. S. (1997). "Potency of combined estrogenic pesticides. *Science*; **275**(5298): 405-406

Robinson, A. K., Schmidt, W. A. and Stancel, G. M. (1985). "Estrogenic activity of DDT:estrogen receptor profiles and the responses of individual uterine cell types following *o,p'*-DDT administration." *J. Toxicol. Environ. Health* **16**: 493-508.

Safe, S. H. (1995). "Modulation of gene expression and endocrine response

pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds." *Pharmacol. Ther.* **67**: 247-281.

Shelby, M. D., Newbold, R. R., Tully, D. B., Chae, K. and Davis, V. L. (1996). "Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays." *Environ. Health Perspect.* 1996 Dec; **104**(12): 1296-1300

Sohrabji, F., Greene, L. A., Miranda, R. C. and Toran-Allerans, D. (1994). "Reciprocal regulation of estrogen and NGF receptors by their ligands in PC12 cells." *J. Neurobiol.* **25**(8): 974-988.

Sonnenschein, C. and A. M. Soto (1998). " An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonist." *J. Steroid Biochem. Mol Biol.* **65**(1-6): 143-150.

Steinmetz, R., Brown, N. G., Allen, D. L., Bigsby, R. M. and Ben Jonathan, N. (1997). "The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo." *Endocrinology.*; **138**(5): 1780-1786

Tomlin, C. (1994). *The pesticide manual*, British Crop Protection Council, Eds

Vonier, P. M., Crain, D. A., McLachlan, J. A., Guillette, L. J. and Arnold, S. F. (1996). "Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator." *Environ. Health*

Perspect. 1996: 1318-1322

Wade, M. G., Desaulniers, D., Leingartner, K. and Foster, W. G. (1997). "Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo." *Reprod. Toxicol.* **11**(6): 791-798.

Ware, G. W. (1994). *The pesticide book*. Fresno ,California, Eds

Watson, C. S., Pappas, T. C., and Gametchu, B. (1995). "The other estrogen receptor in the plasma membrane: Implication for the actions of environmental estrogens. " *Environ. Health Perspect.* 103: 41-50.

White, B. A. (1985). "Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression." *J. Biol. Chem.* 260(2):1213-7.

White, B. A., Bancroft, F. C. (1983). "Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone interact synergistically with calcium to regulate prolactin mRNA levels. " *J. Biol. Chem.* 258(7): 4618-22.

Wilson, J. D., Foster, D. W., Kronenberg, H. M. and Larsen, P. R. (1998). *Williams textbook of Endocrinology*, W.B. Saunders Company,Eds

Wrighton, C. and M. Busslinger (1993). "Direct transcriptional stimulation of ornithine decarboxylase gene by Fos in PC12 cells but not in fibroblast." *Mol. Cell.*

Biol. **13**(8): 4657-4669.

Yoshimura, Y., Tada, S., Ada, T., Nakamura, Y., Maruyama, K., Ichikawa, F., Ebihara, T., Hirota, Y., Sawada, T. and Kawakami, T. (1989). "Direct inhibitory ovarian effects of prolactin in the process of ovulation. " *Nippon Sanka Fujinka Gakkaishi*. 41: 83-89.

Zhang, K., Kulig, E., Jin, L. and Lloyd, R. V. (1993) "Effects of estrogen and epidermal growth factor on prolactin and Pit-1 mRNA in GH3 cells. " *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202(2):193-200.

Zerby, S. E. and A. G. Ewing (1996). "Electrochemical monitoring of individual exocytotic events from the varicosities of differentiated PC12 cells." *Brain Res.* **712**: 1-10.

Annexe 1

Cell or tissue	Cell or tissue
Central nervous system	Kidney
Brain	Cortex
Cortex	Bladder (fish, reptiles, amphibians)
Hippocampus	Lymphoid tissue
Choroid plexus	Spleen
Striatum	Thymus
Cochlear duct	Nurse cells
Corpus callosum	Epithelial cells
Hypothalamus	Lymphocytes
Astrocytes	T
Glial cells	B
Retina	Macrophages
Olfactory system	Ganglia
Ganglia	Intestinal cells
Pituitary	Reproductive system
Anterior lobe	Female
Intermediate lobe	Ovary
Adrenal cortex	Ova
Skin	Granulosa cells
Epidermis	Thecal cells
Hair follicle	Corpus luteum (luteal cells)
Sweat gland	Oviduct
Bone tissue	Mammary gland
Chondrocytes	Epithelial cells
Cartilage	Milk ^a
Osteoblasts	Tumors
Gills (fish and larval amphibians)	Crop sac (birds)
Lung	Uterus (endometrium)
Heart	Placenta
Cardiac muscle	Amnion
Atria	Male
Skeletal muscle	Testis
Adipocytes (birds)	Germ cells
Brown adipose tissue	Spermatozoa
Liver	Leydig cells
Hepatocytes	Sertoli cells
Kupffer cells	Epididymis
Submandibular gland	Seminal vesicle
Submaxillary gland	Prostate
Pancreas	
Islet of Langerhans	
Gastrointestinal tract	
Esophagus	
Stomach	
Intestine	
Duodenum	
Jejunum	
Ileum	
Colon	

^a Membrane and soluble forms.

Tableau 1: Sites d'action de la prolactine chez les vertébrés.
(Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).

Annexe 2

Organ or target	Effect	Animal class
Uterus	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Progesterone receptors and progesterone effects ↑ PGE₂, phospholipase A₂, prostaglandin G/H synthase ↑ Fluid loss ↓ Progesterone metabolism ↑ Estrogen receptors ↓ Myometrial contraction ↑ General secretory activity of endometrium (with estrogen) ↑ Leucine aminopeptidase activity (with estrogen) ↑ Uteroglobin production Promote blastocyst implantation ↑ Glucose amine synthetase activity 	Mammals
Testis	In general, ↑ activities	Mammals
Leydig cells	Involved in maintenance of cell morphology	Mammals
	<ul style="list-style-type: none"> ↑ LH receptors ↓ Aromatase activity (with LH) ↑ Steroidogenesis and androgen production (cooperation with LH) 	
Sertoli cells	↑ FSH receptors	Mammals
Germ cells	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Total lipids ↑ Spermatocyte-spermatid conversion 	Mammals
Spermatozoa	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Ca²⁺ binding and/or transport of ejaculated and epididymal spermatozoa Energy metabolism: <ul style="list-style-type: none"> ↑ ATPase activity ↑ Fructose rate ↑ Glucose oxidation ↓ Zn²⁺ content Maintenance of mobility and attachment to oocyte Shortening optimal preincubation period to acquire capacitation 	Mammals
Epididymis	<ul style="list-style-type: none"> Energy metabolism: <ul style="list-style-type: none"> ↑ Glycogenolysis and hexophosphate enzymes ↑ Sialic acid ↑ β-galactosidase and α-mannosidase activities ↑ Lipids ↓ Glycoprotein metabolism 	Mammals
Seminal vesicle	<ul style="list-style-type: none"> Hyperprolactinemia: ↓ sperm fertilizing and mobility capacity Hypoprolactinemia: azoospermia <ul style="list-style-type: none"> ↑ Fluid lipids ↑ Lipogenesis ↑ Phosphomonoesterase and acid phosphatase ↓ Glycosylation 	Mammals
Prostate	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Weight ↑ Nuclear uptake of DHT ↑ Androgen receptor Involvement in estrogen-induced inflammation ↑ Epithelial secretory function ↑ Energy metabolism: <ul style="list-style-type: none"> Monosaccharide formation Amino acid oxidation and transamination ↑ Ornithine decarboxylase ↑ Citric acid secretion: <ul style="list-style-type: none"> ↑ Mitochondrial aspartate Aminotransferase (via PKC) 	Mammals

Tableau 2 : Fonctions de la prolactine dans la reproduction.
(Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).

Annexe 2 (suite)

Organ or target	Effect	Animal class
Mammary gland	Lobuloalveolar growth ↑ Milk protein synthesis α -Casein β -Casein Whey acidic protein β -Lactoglobulin Late lactation protein of marsupials ↑ Lactose synthesis Lactose synthetase Galactosyl transferase α -Lactalbumin ↑ Lipid metabolism Acetyl-CoA carboxylase Fatty acid synthase Malic enzyme Lipoprotein lipase ↑ IGF-I binding protein ↑ EGF ↑ 120-kDa protein ↑ Muc 1 (glycosylated mucin) ↑ PRL-inducible protein ↑ Parathyroid-like peptide	Mammals
Crop sac	Growth ↑ Mitosis of germinal layer Thickening of epithelium ↑ Annexin Icp 35 ↑ Crop milk polypeptide 58 and 50.5 ↑ Lipoprotein lipase ↑ Ornithine decarboxylase ↑ 25-kDa protein	Birds
Ovary	Luteotropic and luteolytic actions (dependent on stage of estrous cycle) Ovum maturation ↓ Folliculogenesis ↓ 3β -HSD ↓ Aromatase Potentiate effects of LH on 3β -HSD ↓ Ovulation ↓ Estradiol and induce ovarian regression ↓ Plasmin generation in preovulatory follicles	Mammals Birds Mammals
Granulosa cells	↓ Estrogen production ↓ P450 aromatase ↑ Use of extracellular lipoproteins ↑ Progesterone production ↑ LH receptors ↑ 20α -OH progesterone (humans) ↓ Progestins (humans) ↓ Luteinization ↓ cAMP and steroidogenesis (rats) Counteract morphological effects of LH ↑ Progesterone in cocultures of splenic macrophages removed at proestrus ↑ DAG ↑ 101_2 -Macroglobulin	Mammals
Oocytes	↑ Developmental competence and maturation (rabbits)	Mammals
Luteal cells	Luteotropic action Luteolysis in pregnancy (marsupials) Luteolysis during estrous cycle ↓ 20α -HSD ↑ Progesterone Control of delayed implantation and steroidogenesis (bats) ↓ 37-kDa protein	Mammals

Editor-in-Chief Dr. Claude KORDON
Neuroendocrine Research Unit
INSERM U. 159
2ter, rue d'Alésia
F-75014 Paris (France)
Tel.: (33) 1 45 81 65 87
Fax: (33) 1 45 81 65 88
(33) 1 45 80 72 93
Email: neuroend@broca.inserm.fr

International Journal for Basic and Clinical Studies on
Neuroendocrine Relationships

Dr. Maria-Grazia MARTINOLI
Dept of Chemistry and Biology
Univ du Québec à Trois-Rivières
CP500
Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7
CANADA

Fax: 1 8193765084

Ref. NE/99030 submission 1

March 3, 1999

Dear Dr. MARTINOLI,

We acknowledge receipt of your manuscript entitled "Modulation of prolactin mRNA levels by endosulfan and ..." that we received on 03/03/99. It has been registered under the reference NE/99030.

We have already engaged the procedure of reviewing and thank you for having chosen our Journal.

Yours sincerely,

The Editorial Office