

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE CONTAMINANTS AGRICOLES SUR LA DIFFÉRENCIATION
CELLULAIRE ET LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE DES CELLULES
EMBRYONNAIRES P19

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MATHIEU SOLARI

OCTOBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Mon projet de maîtrise s'inscrit à la suite des premiers résultats obtenus dans le cadre du « Projet Amphibien ». Ce projet mis en avant par un groupe de chercheurs du Toxen (UQÀM) vise à évaluer le potentiel toxique des contaminants d'origine agricole lessivés dans les rivières en utilisant le ouaouaron (*Rana catesbeiana*) de la rivière Yamaska comme espèce sentinelle. Plus spécifiquement, l'objectif de mon projet était de mettre sur pied un bioessai à base de culture cellulaire permettant d'identifier des substances potentiellement tératogènes et de juger de leurs mécanismes d'action possibles. Bien que les résultats n'aient pas permis d'identifier clairement des molécules tératogènes et que certaines limites expérimentales aient été rencontrées, cette étude a permis de montrer que les cellules P19 de carcinome embryonnaire de souris sont un modèle cellulaire intéressant pour travailler sur la différenciation cellulaire et le métabolisme de l'acide rétinoïque (RA). Cette étude a ainsi permis la mise sur pied d'un protocole de quantification de la différenciation cellulaire par cytométrie de flux (FACS) et d'une méthode de dosage des rétinoïdes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). À plus long terme et dans des études plus poussées, ce modèle cellulaire pourra être utilisé pour évaluer les effets des toxiques sur des cibles cellulaires précises dont les enzymes et les récepteurs nucléaires.

Le présent document est constitué de trois chapitres dont le premier est consacré à l'état des connaissances concernant l'utilisation des rétinoïdes comme biomarqueurs de la contamination environnementale et les deux autres présentant les résultats obtenus dans le cadre de mon projet de maîtrise. Le chapitre II est rédigé sous la forme d'un article scientifique qui sera bientôt soumis. Au moment d'écrire ces lignes, le choix de la revue pour cette publication n'est toutefois pas arrêté. Le troisième chapitre fait état d'expérimentations ne faisant pas partie de la publication, mais qui sont d'un intérêt certain en ce qui a trait à la culture des cellules P19 et aux expositions aux pesticides. Tous les résultats présentés dans l'article et dans le reste du mémoire sont issus des expérimentations que j'ai réalisées au cours des deux dernières années. J'ai également traité chacun des résultats présentés et rédigé l'article. Mon projet de maîtrise est, à venir jusqu'à maintenant et selon mes connaissances, la seule étude qui tient compte à la fois d'une exposition à des contaminants et du métabolisme

des rétinoïdes. Cette contribution pourra certainement aider à développer de nouvelles avenues de recherche.

Je tiens à remercier Monique Boily, ma directrice de recherche qui m'a fait confiance et qui m'a soutenu tout au long de la mise au point de ce projet. Je tiens aussi à remercier ma co-directrice Joanne Paquin pour ses conseils, ses idées et ses encouragements continuels. Également, un gros merci à Michel Marion et à Denis Flipo de m'avoir aidé lors des analyses par FACS. Je voudrais également remercier Frédéric Bouchard pour son aide apportée dans les méthodes de culture cellulaire, Philippe Ducharme pour l'analyse par buvardage et Janik Thibodeau pour son aide technique. Finalement, je tiens à remercier ma famille et tout mon entourage immédiat. Un merci spécial à ma copine Julie qui m'a soutenu et encouragé continuellement.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	5
1.1 Situation des amphibiens à travers le monde	5
1.1.1 Déclin des populations et malformations des membres	5
1.1.2 Facteurs potentiellement impliqués	5
1.1.2.1 Radiations UV	6
1.1.2.2 Parasites	6
1.1.2.3 Contaminants d'origine agricole	6
1.2 La vitamine A et les rétinoïdes	7
1.2.1 Importance de la vitamine A dans le développement embryonnaire	7
1.2.2 Structures et propriétés	8
1.2.3 Métabolisme du rétinol	8
1.2.4 Mode d'action cellulaire de l'acide rétinoïque	9
1.2.5 Métabolisme enzymatique de l'acide rétinoïque	11
1.2.6 Interactions moléculaires dans les voies des rétinoïdes	11
1.2.6.1 Le TTNPB, un analogue de l'acide rétinoïque	12
1.2.6.2 Pesticides organochlorés	12
1.2.6.3 Acide méthoprénoïque	13
1.2.6.4 Inhibiteurs du catabolisme de l'acide rétinoïque	13
1.2.7 Utilisation des rétinoïdes comme biomarqueurs	14
1.2.7.1 Les ouaouarons de la rivière Yamaska	14
1.2.7.2 La culture cellulaire et l'acide rétinoïque	14
1.3 Le modèle cellulaire P19 de carcinome embryonnaire de souris	15

1.3.1	Généralités	15
1.3.2	Différenciation des cellules P19	15
1.3.3	La différenciation neuronale comme modèle d'étude sur la tératogénèse	16
1.3.4	Métabolisme de l'acide rétinoïque	17
1.4	Contaminants d'origine agricole à l'étude	17
1.4.1	Nitrates et nitrites	17
	1.4.1.1 Métabolisme cellulaire du NO [•]	19
1.4.2	Atrazine	20
1.4.3	Carbaryl	20
1.4.4	Endosulfane	21
1.5	Hypothèses et objectifs	21
CHAPITRE II		
ATRAZINE AND NITROGENOUS FERTILIZERS ON NEURODIFFERENTIATION		
AND RETINOIC ACID METABOLISM IN THE P19 CELL MODEL		
		23
2.1	Abstract	24
2.2	Introduction	25
2.3	Materials and methods	28
2.3.1	Chemicals	28
2.3.2	Cell culture	28
2.3.3	Neuronal differentiation	28
2.3.4	Exposition of differentiating P19 cells to atrazine and nitrogenous fertilizers	29
2.3.5	Immunostaining and flow cytometry analysis	29
2.3.6	Western blotting analysis	30
2.3.7	Cell treatment for analysis of atRA metabolism	30
2.3.8	Retinoid analysis	31
2.3.9	Cell proliferation/viability assay	32
2.3.10	Statistical analysis	32
2.4	Results	33
2.4.1	SSEA1 expression in P19 cells	33
2.4.2	β III-tubulin expression in P19 cells	33

2.4.3	Dose-dependant effects of atRA on neuronal differentiation	34
2.4.4	HPLC analysis of atRA metabolism	35
2.4.5	Effect of clotrimazole on atRA metabolism	36
2.4.6	Effects of atrazine, nitrates and nitrites on cell differentiation and atRA metabolism	38
2.5	Discussion	47
2.6	Aknowledgements	52
2.7	References	53
CHAPITRE III		
LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE ET LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE : EFFETS DU CARBARYL ET DE L'ENDOSULFANE		
3.1	Mise en contexte	59
3.2	Matériel et méthodes	60
3.2.1	Différenciation neuronale et quantification de la différenciation	60
3.2.2	Traitement des cellules pour l'analyse du métabolisme d'atRA	60
3.2.3	Analyse statistique	60
3.3	Résultats et discussion	61
CONCLUSION		
APPENDICE		
RÉFÉRENCES		

LISTE DES FIGURES

2.1	SSEA1 expression in P19 cells	39
2.2	β III-tubulin expression in P19 cells	40
2.3	Effects of atRA concentration on marker expression and morphology	41
2.4	HPLC profiles of retinoids in medium and cells during incubation with atRA	42
2.5	Time course profile of atRA metabolism	43
2.6	Inhibition of atRA metabolism	44
2.7	Concentration–response curves of three common water pollutants in neuronal differentiation	45
3.1	Effets du carbaryl et de l'endosulfane sur le maintien de l'état indifférencié	66
3.2	Effets du carbaryl sur le développement des neurones	67
3.3	Effets d'atRA sur la différenciation neuronale des cellules P19 en monocouche en absence de sérum	68
3.4	Effets du carbaryl et de l'endosulfane sur la neurodifférenciation en monocouche	69
3.5	Effets du carbaryl et de l'endosulfane sur le métabolisme de atRA	70
3.6	Effets d'un prétraitement avec le carbaryl ou l'endosulfane sur le métabolisme de atRA	71
A-1	Caractérisation de la viabilité des cellules P19 indifférenciées et traitées avec atRA	78
A-2	Comparaison de la taille et de la granulosité des cellules viables NI et traitées avec atRA	79
A-3	atRA et TTNPB sont des agents antiprolifératifs	80
A-4	NO ₂ est toxique pour les cellules P19	81
A-5	Effets des nitrites et des nitrates sur le taux de rétinol	82

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Effects of various concentrations of atrazine, nitrates and nitrites on the atRA levels in P19 culture media	46
-----	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

9- <i>cis</i> -RA	Acide 9- <i>cis</i> -rétinoïque
13- <i>cis</i> -RA	Acide 13- <i>cis</i> -rétinoïque
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	Acide 13- <i>cis</i> -4-oxo-rétinoïque
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARAT	Acyl Coenzyme A : rétinol acyltransférase
atRA	Acide rétinoïque tout-trans
BHT	Hydroxytoluène butylé (Butylated hydroxytoluene)
CRABP	Protéine cellulaire de liaison de l'acide rétinoïque (Cellular retinoic acid binding protein)
CRBP	Protéine cellulaire de liaison du rétinol (Cellular retinol binding protein)
CYP450	Cytochrome P450
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC	Carcinome embryonnaire (Embryonal carcinoma)
ES	Souche embryonnaire (Embryonal stem)
FACS	Cytométrie de flux (Fluorescence-activated cell sorting)
HER	Hydrolase des esters de rétinol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (High performance liquid chromatography)
LRAT	Lécithine rétinol acyltransférase
NI	Non-induites
NO•	Oxyde nitrique (espèce radicalaire)
RA	Acide rétinoïque (Retinoic acid)
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque (Retinoic acid receptor)
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinoïque (Retinoic acid response element)
RBP	Protéine de liaison du rétinol (Retinol binding protein)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)
RXR	Récepteur des rétinoïdes X (Retinoid X receptor)
SD	Écart-type (Standard deviation)
SSEA1	Stage-specific embryonic antigen 1
TFA	Acide trifluoroacétique (Trifluoroacetic acid)
TTNPB	(E)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphthylényl)-1-propényl] benzoïque acid
TTR	Transthyrétine
UV	Ultraviolet

RÉSUMÉ

Depuis de nombreuses années, on observe un fort déclin des populations d'amphibiens à travers le monde et une augmentation marquée du taux de malformation des membres. Plusieurs causes sont suggérées pour expliquer l'émergence de ces effets sur le développement. Parmi celles-ci, la présence de fertilisants et de pesticides dans les cours d'eau semble être un facteur majeur impliqué dans ce phénomène étant donné que la peau des amphibiens est très perméable et parce que la plupart des malformations ont été répertoriées dans les marais avoisinant les zones d'agriculture intensive. Il est connu qu'un excès ou une carence en vitamine A (rétinol) durant le développement d'un organisme peut provoquer de graves effets sur le développement, voire même provoquer la mort au stade embryonnaire. Les rétinoïdes sont des molécules qui dérivent de la vitamine A, et l'acide rétinoïque (RA) est un des dérivés biologiquement actif. C'est un morphogène très puissant et ses effets sont assurés par la liaison et l'activation de récepteurs nucléaires spécifiques. Plusieurs pesticides sont connus pour affecter le développement et certains sont également connus pour interférer dans le métabolisme et les voies de signalisation de RA.

L'objectif du présent projet était d'évaluer le potentiel tératogène de quelques contaminants d'origine agricole en mesurant leur capacité à affecter la différenciation cellulaire médiée par RA et le catabolisme de RA. Les cellules P19 de carcinome embryonnaire de souris ont été sélectionnées comme modèle d'étude. Ces cellules sont indifférenciées et peuvent se différencier en présence de différents inducteurs, dont RA. Un protocole de neurodifférenciation en agrégats et un second en monocouche ont été utilisés et le taux de différenciation cellulaire a été évalué par cytométrie de flux (FACS) à l'aide du marqueur de non-différenciation SSEA1 et du marqueur neuronal β III-tubuline. La disparition de RA et sa métabolisation en dérivés polaires ont été mesurés par une méthode HPLC et un bioessai de métabolisation de courte durée permettant de tester de fortes concentrations de contaminants a été mis au point. L'atrazine, les nitrates et les nitrites ont été sélectionnés comme première série de contaminants étant donné que leur toxicité développementale n'est pas complètement documentée et parce qu'ils sont parmi les contaminants les plus abondants dans les cours d'eau avoisinant les zones agricoles. Le carbaryl et l'endosulfane ont été choisis pour une deuxième série d'analyses en considérant leurs effets déjà connus, le premier étant neurotoxique et le second étant tératogène et connu pour interférer dans le système des rétinoïdes. Les résultats ont montré qu'une augmentation de la concentration de RA diminuait SSEA1 et augmentait β III-tubuline de façon dose-dépendante. Il a également été démontré que les cellules P19 métabolisent le RA, que ce métabolisme pouvait être inhibé partiellement par le clotrimazole (inhibiteur du cytochrome P450) et qu'il pouvait être suractivé suite à un prétraitement des cellules avec RA ou son analogue, le TTNPB. Les 3 premiers contaminants testés sur la différenciation neuronale en agrégats ont été utilisés à des concentrations de 100 à 10000 fois plus élevées que les normes canadiennes pour la protection de la vie aquatique. Les résultats n'ont pas permis de mesurer d'effets à des concentrations qui n'affectent pas la prolifération et/ou la viabilité cellulaire. Des concentrations de nitrites variant de 0 à 670 mg/L préviennent fortement la diminution de l'expression de SSEA1 et diminuent le nombre de cellules positives pour β III-tubuline. Le carbaryl et l'endosulfane testés à 25 μ M n'induisent pas la différenciation cellulaire de cellules cultivées en agrégats. Avec des cellules cultivées en monocouches, ces deux

pesticides ont beaucoup affecté la prolifération et/ou la viabilité cellulaire et ont diminué le taux de cellules positives pour β III-tubuline. Aucun des contaminants n'a affecté le métabolisme. Les résultats suggèrent que la cytotoxicité est probablement un facteur impliqué dans certains effets développementaux et que le système enzymatique impliqué dans la métabolisation de RA ne semble pas être une cible pour ces pesticides aux concentrations utilisées. Les effets de ces contaminants sur la liaison de RA à ses récepteurs, sur le métabolisme microsomal et/ou sur l'expression de diverses cibles cellulaires pourraient éventuellement être étudiés pour préciser les effets de type « rétinoidiens ».

Mots clés : acide rétinoïque, cellules P19, contaminants agricoles, différenciation cellulaire, FACS, HPLC

INTRODUCTION

Au Québec tout comme ailleurs dans le monde, l'agriculture occupe une large part de l'économie de marché. Une partie importante des terres agricoles se situe, entre autres, dans le sud-ouest du Québec, plus particulièrement dans les Basses-Terres du Saint-Laurent où plus de la moitié des territoires possèdent un potentiel agricole. La culture du maïs a pris un essor fulgurant depuis 1976 et occupait plus de 21% des superficies d'agriculture en 1999. Bien qu'étant économiquement rentable, c'est une des cultures les plus exigeantes en herbicides et en fertilisants azotés. Statistiquement, plus de la moitié des pesticides utilisés en agriculture au Québec sont utilisés pour la culture du maïs. Les pratiques agricoles rendant les sols de plus en plus vulnérables à l'érosion, les pesticides et les engrais peuvent aisément ruisseler jusque dans les cours d'eau avoisinants et affecter la qualité de l'eau (Simard, 2000).

Depuis déjà plusieurs années, on observe des effets néfastes sur la faune avoisinant les cultures agricoles intensives. On a observé des effets toxiques notamment chez les poissons, mais plus particulièrement chez les amphibiens. D'ailleurs, depuis les années 60, on assiste à un fort déclin des populations d'amphibiens dans le monde entier (Crump, 2001). Ces constatations ont été documentées depuis la fin des années 80 et la contamination chimique de source agricole a été proposée comme étant une des causes pouvant expliquer l'émergence de ce phénomène (Bérubé *et al.*, 2005). Différents cas de malformations des membres ont également été répertoriés chez les amphibiens au cours des dernières années. Le dossier le plus frappant est sans doute celui du Minnesota en 1995 où des élèves d'une école élémentaire ont retrouvé des grenouilles malformées lors d'une sortie scolaire (Vandenlangenberg *et al.*, 2003). Ces grenouilles présentaient notamment des pattes supplémentaires ou manquantes, mais aussi des yeux manquants. Au Québec, des grenouilles malformées ont été retrouvées dans les eaux contaminées de la rivière St-Laurence (Ouellet *et al.*, 1997). Également, des cas de malformations crâno-faciales et de nageoires absentes ou dupliquées ont été rapportés chez des populations de poissons, notamment chez le meunier noir et l'esturgeon jaune dans des sites du fleuve Saint-Laurent contaminés par les BPC et les HAP (Branchaud *et al.*, 1995 ; Doyon *et al.*, 1999).

Les recherches concernant les causes des effets tératogènes en zones agricoles ont pris de l'ampleur au cours des dernières décennies. Plusieurs études ont ainsi permis de montrer que l'apparition d'effets tératogènes serait due, entre autres, à une perturbation du métabolisme de la vitamine A et des rétinoïdes. La vitamine A (rétinol) est un micronutriment essentiel impliqué dans le développement embryonnaire (Zile, 2001). Les rétinoïdes sont des dérivés métaboliques du rétinol et l'acide rétinoïque (RA) est le principal métabolite actif impliqué dans la transduction des signaux cellulaires. Au niveau cellulaire, RA peut être métabolisé, mais peut aussi se lier à des récepteurs nucléaires spécifiques. Ayant des propriétés morphogènes, RA peut également induire la différenciation de cellules souches en différents phénotypes cellulaires (McBurney, 1993). Il est connu qu'un débalancement des concentrations de rétinol ou de RA durant le développement d'un organisme peut conduire à des effets tératogènes. Certaines substances dont le TTNPB, l'acide méthoprénoïque et les pesticides organochlorés sont d'ailleurs reconnus pour interagir dans le métabolisme et les voies de signalisation des rétinoïdes, soit au niveau des récepteurs nucléaires ou au niveau des enzymes. Le système des rétinoïdes semble donc être un biomarqueur adéquat pour identifier des substances comme étant potentiellement toxiques et tératogènes et pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués.

Le projet Amphibien mis de l'avant par des chercheurs du TOXEN de l'UQÀM vise à étudier les effets des contaminants d'origine agricole sur les populations amphibiennes vivant dans le bassin versant de la rivière Yamaska. Cette rivière est la plus polluée du Québec (Provost, 2005) et donc l'étude d'un lien de cause à effet entre la pollution des eaux et la santé de la faune vivant dans la rivière est de mise. Le ouaouaron a été sélectionné comme espèce sentinelle car il fait partie des espèces sensibles à la présence de contaminants dans l'environnement et parce qu'il passe pratiquement toute sa vie dans l'eau ou sur les berges. En 2003, une équipe de recherche a rapporté pour la première fois des changements morphologiques et physiologiques sur les ouaouarons de la rivière Yamaska. On y a retrouvé des grenouilles mâles beaucoup plus petites dans les sites d'échantillonnage où l'on pratique l'agriculture intensive et on a également observé chez ces mêmes grenouilles, une altération des niveaux de rétinoïdes hépatiques et plasmatiques (Bérubé *et al.*, 2005).

Bien que des recherches *in vivo* sur la perturbation des rétinoïdes endogènes chez les ouaouarons de la rivière Yamaska aient été entreprises, on n'a en somme que très peu d'informations sur les mécanismes cellulaires impliqués dans les malformations des membres. Un des aspects du projet visait d'ailleurs à mettre au point un bioessai cellulaire permettant de juger du potentiel tératogène de différents contaminants d'origine agricole et de leurs mécanismes cellulaires potentiels. Dans cette optique, le présent travail se veut une étude exploratoire des effets de différents contaminants chimiques sur la différenciation cellulaire médiée par RA et sur le catabolisme de RA. Comme il n'existe pas de lignée cellulaire *in vitro* issue des amphibiens, la lignée cellulaire P19 de carcinome embryonnaire de souris a été sélectionnée comme matériel biologique pour cette étude. Ce modèle apparaît tout à fait adéquat étant donné que ces cellules répondent à RA et parce que le métabolisme des rétinoïdes est bien conservé au cours de l'évolution. Ces cellules sont indifférenciées et peuvent se différencier en différents phénotypes cellulaires en présence de RA. La différenciation neuronale a été sélectionnée. Le premier objectif de l'étude était de développer un protocole permettant de mesurer le taux de neurodifférenciation en présence de RA et de quantifier cette différenciation. Pour ce faire, des immunomarquages de marqueurs phénotypiques suivi d'une analyse quantitative par cytométrie de flux (FACS) ont dû être testés et mis au point. Le marqueur SSEA1 spécifique à l'état indifférencié et le marqueur β III-tubuline spécifique aux neurones ont été choisis. En second lieu, la description du profil métabolique de RA dans ces cellules devait être établie. Une méthode d'extraction des rétinoïdes et d'analyse par HPLC a donc été testée sur les extraits de milieux de culture et d'homogénats cellulaires recueillis à différents temps d'incubation. Une fois ces deux approches expérimentales établies, des contaminants d'origine agricole ont été sélectionnés pour tester leur potentiel à affecter la différenciation induite par RA et la dégradation enzymatique de RA.

Le présent document se divise en trois chapitres. Le premier chapitre porte sur l'état des connaissances nécessaires à la compréhension et à la justification de la recherche présentée. Le deuxième renferme les résultats de l'étude menée avec l'atrazine, les nitrates et les nitrites et se présente sous la forme d'un article scientifique. Enfin, le troisième, court, rapporte les résultats obtenus avec le carbaryl et l'endosulfane sur la différenciation et le métabolisme. On

retrouvera en Appendice, quelques résultats complémentaires à ceux de l'article présenté dans le chapitre II.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1- Situation des amphibiens à travers le monde

1.1.1- Déclin des populations et malformations des membres

Depuis les années 60, on observe un fort déclin des populations d'amphibiens à travers le monde (Crump, 2001). Également, au cours des 20 dernières années, un nombre important de grenouilles difformes a été rapporté au Japon et en Amérique du Nord (Gardiner *et al.*, 2003) et même au Québec (Ouellet *et al.*, 1997). Des malformations aussi flagrantes que des membres troncqués, supplémentaires ou manquants ont, entre autres, été répertoriées (Taylor *et al.*, 1995). Ceci n'est pas sans rappeler le cas de 1995 au Minnesota où des grenouilles avec des yeux et des pattes manquantes, voire même des pattes supplémentaires ont été retrouvées dans un marais avoisinant une zone d'agriculture intensive (Vandenlangenberg *et al.*, 2003). Ces malformations peuvent contraindre le déplacement des amphibiens et ainsi nuire à leur quête de nourriture ou à leur réflexe de fuite lors de situations de prédation. Leurs chances de survie en milieu naturel peuvent ainsi être grandement diminuées. Depuis, les malformations ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique et plusieurs recherches ont été mises de l'avant pour tenter d'expliquer leur émergence.

1.1.2.- Facteurs potentiellement impliqués

La cause des anomalies morphologiques observées n'est pas encore parfaitement comprise, mais plusieurs facteurs ont été catégorisés comme étant potentiellement impliqués. Il est difficile d'expliquer les effets observés par un seul de ces facteurs et il est fort possible que ces mécanismes agissent de façon concertée.

1.1.2.1.- Radiations UV

Les rayons UV, en particulier ceux de type B pourraient potentiellement expliquer l'apparition de grenouilles difformes dans certaines régions du globe. La pollution atmosphérique affecte la couche d'ozone depuis de nombreuses années et une plus grande quantité de ces rayons peut atteindre la surface terrestre et causer la photodégradation ou l'isomérisation de molécules endogènes ou exogènes. Certaines études (Blaustein *et al.*, 1997; Kiesecker *et al.*, 2001) ont montré une corrélation positive entre l'exposition aux rayons UV et le déclin des populations d'amphibiens, mais les résultats significatifs allant dans ce sens sont assez restreints. Également, une étude a montré qu'une exposition d'œufs de grenouilles à des rayons solaires artificiels produisait des malformations de façon dose dépendante chez les organismes en développement, mais qu'elles ne correspondaient pas à celles observées en milieu naturel (Ankley *et al.*, 2002).

1.1.2.2.- Parasites

La présence de parasites est une autre cause étudiée. Une hypothèse soutient que des bactéries ou des nématodes peuvent provoquer une perturbation mécanique durant le développement des membres. Selon cette hypothèse, une perturbation de la morphogénèse pourrait être causée par un parasite enkysté au niveau des bourgeons embryonnaires des membres ciblés (Sessions et Ruth, 1990). Cette hypothèse n'est toutefois pas supportée par plusieurs publications et l'infection par les parasites n'apparaît pas comme pouvant expliquer de façon satisfaisante la majorité des types de malformations des membres observées à travers le monde (Gardiner *et al.*, 2003).

1.1.2.3.- Contaminants d'origine agricole

L'utilisation de pesticides et d'engrais azotés en agriculture semble être la cause la plus probable pour expliquer l'émergence des effets néfastes sur les amphibiens. En fait, comme les grenouilles ont une peau perméable (Campbell, 1999), elles absorbent pratiquement tout par cette voie et sont donc extrêmement sensibles à la présence des contaminants et polluants

lessivés dans les cours d'eaux. Également, des études ont montré que des espèces aquatiques comme les grenouilles vertes (*Rana clamitans*) et les grenouilles du Nord (*Rana septentrionalis*) ont des taux de malformations des membres beaucoup plus élevés que les grenouilles des bois (*Rana sylvatica*), lesquelles sont des espèces plutôt terrestres (Gardiner *et al.*, 2003). Les pesticides et engrais sont encore beaucoup utilisés à travers le monde et on en retrouve une grande diversité dans les rivières avoisinant les zones agricoles. On suppose que les molécules en question puissent mimer des molécules endogènes impliquées dans le développement ou interférer dans le métabolisme et les mécanismes de signalisation cellulaire.

1.2.- La vitamine A et les rétinoïdes

1.2.1.- Importance de la vitamine A dans le développement embryonnaire

Le développement embryonnaire, et particulièrement l'organogenèse, est un processus physiologique très sensible et vulnérable du cycle de vie du règne animal. La vitamine A ou rétinol est un micronutriment essentiel impliqué dans le développement de l'embryon et plus particulièrement dans la prolifération et la différenciation cellulaire chez les vertébrés. Par ailleurs, il a été démontré que bien qu'elle soit nécessaire dès la vie embryonnaire, un excès ou une carence de vitamine A peut provoquer des effets passablement néfastes, allant de la tératogénicité à la mortalité (Zile, 2001). Les rétinoïdes sont des molécules qui dérivent du rétinol. Dans l'organisme, on les retrouve sous forme biologiquement active ou entreposés dans les tissus. Les réserves les plus importantes de rétinoïdes se retrouvent au niveau du foie sous forme estérifiée et ils sont principalement entreposés sous forme de palmitate de rétinol. S'il y a un trop haut niveau de vitamine A dans l'organisme, il y aura activation de certains processus pour rétablir le taux normal : réduction de son absorption ainsi qu'une augmentation de son oxydation et de son excrétion biliaire, fécale et urinaire. Ces mécanismes ont toutefois des limites et des carences ou excès importants peuvent survenir et produire des déséquilibres au niveau des formes de rétinoïdes endogènes (Zile, 1998). Une carence en rétinol s'observe habituellement chez les jeunes individus qui n'ont pas emmagasiné d'importantes concentrations en rétinoïdes. La plupart des organes et tissus

peuvent être affectés par une hypovitaminose au cours du développement embryonnaire : cerveau postérieur, système visuel, système auditif, organes et tissus dérivant de la crête neurale, structures crânio-faciales et pharyngiennes, glandes thyroïde et para-thyroïde. Une forte carence peut également provoquer la mort embryonnaire. À l'opposé, un excès en vitamine A engendre des symptômes aussi divers qu'une fragilité des os, des lésions cutanées, des malformations, une diminution du poids et l'inhibition de croissance (Boily *et al.*, 2004).

1.2.2.- Structure et propriétés

La structure de base du rétinol et de ses dérivés (rétinoïdes) est formée d'un cycle cyclohexène triméthylé, d'une chaîne tétraène conjuguée et d'un groupement fonctionnel polaire composé d'oxygène. Ces molécules se distinguent notamment par leur couleur jaune et par leur caractère hautement lipophile. Les rétinoides peuvent facilement être isomérisés et dégradés par la lumière ambiante. Également, ils peuvent être oxydés par l'oxygène de l'air, les rendant ainsi inactifs (Barua et Furr, 1998). Le rétinol reste toutefois un des plus puissants anti-oxydants.

1.2.3.- Métabolisme du rétinol

Chez la plupart des vertébrés, le rétinol est principalement issu des caroténoïdes de l'alimentation (Burri et Clifford, 2004). Il dérive également des esters de rétinol emmagasinés au niveau du foie par le biais d'une hydrolyse par l'enzyme HER (hydrolase des esters du rétinol). Cette réaction d'hydrolyse est toutefois peu spécifique, car il a été démontré qu'en situation *in vitro*, des lipases et des carboxylases peuvent catalyser la même réaction. Autrement, l'estérification du rétinol se produit spécifiquement par deux enzymes, soit la LRAT (Lécithine Rétinyl Acyl Transférase) et la ARAT (Acyl-coA Rétinyl Transférase). L'ARAT catalyse principalement l'estérification du rétinol libre alors que la LRAT catalyse plutôt l'estérification du rétinol lié à sa protéine de transport (RBP). Lorsque le rétinol est libéré dans la circulation sanguine, il peut atteindre les cellules cibles après liaison à la RBP liée à la transthyréline (TTR). À destination, le rétinol est libéré des

protéines de transport, entre dans la cellule et se lie aux protéines intracellulaires CRBP (cellular retinol-binding protein) (Boily *et al.*, 2004, Ong, 1993). Le rétinol intracellulaire est ensuite métabolisé en rétinaldéhyde par l'enzyme rétinol déshydrogénase et ce dernier est converti en acide rétinoïque tout-*trans* (atRA) par l'enzyme rétinol déshydrogénase (RALDH) ou par les isoformes du cytochrome P450 CYP1A1 et CYP1A2 (Duester, 1996).

1.2.4.- Mode d'action cellulaire de l'acide rétinoïque

RA est un rétinoïde actif majeur impliqué dans les voies de transduction régulant le développement et dans l'orchestration de l'élongation des membres (Zile, 1998). Un débalancement de ses concentrations peut avoir des effets importants au niveau embryonnaire. En fait, il s'agit du rétinoïde à action morphologique le plus puissant et un manque ou un excès de cette substance dans l'organisme durant le développement peut provoquer de graves effets tératogènes (Zile, 2001). Il active la transcription des gènes Hox, lesquels sont responsables du patron axial et de la polarité antéro-postérieure des membres chez les vertébrés (Marshall *et al.*, 1996). Ces gènes sont positionnés de façon séquentielle dans l'ordre dans lequel ils sont exprimés de l'extrémité 3' jusqu'à l'extrémité 5'. Ainsi, les gènes en 3' sont exprimés en premier et sont impliqués dans le développement des structures antérieures et vice-versa. Également, la concentration de RA nécessaire pour leur activation augmente progressivement au fil des gènes Hox. Ce gradient assure entre autre le patron des doigts et un excès de RA provoque l'absence, la duplication ou une orientation anormale des phalanges (Eichele *et al.*, 1985; Sundin et Eichele, 1992). RA assure également le développement du patron morphologique du cerveau et un excès peut provoquer des malformations crâno-faciales. On distingue différents isomères de RA, notamment les formes tout-*trans* (atRA), 9-*cis* et 13-*cis*. Ces deux derniers isomères sont formés suite à l'isomérisation d'atRA (Lee *et al.*, 2004). Le 9-*cis*-RA est un facteur de transcription qui régule la croissance et la différenciation des cellules normales et malignes (Rubin *et al.*, 1994). Quant au 13-*cis*-RA, on lui connaît notamment des propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales (Datta et Lianos, 1999 ; Waliszewski *et al.*, 1999). Les effets du rétinol sont toutefois principalement médiés par la forme tout-*trans* de RA (atRA) par le biais de récepteurs nucléaires spécifiques. On distingue deux classes de récepteurs nucléaires au

niveau du métabolisme des rétinoïdes, soit les récepteurs à acide rétinoïque RAR (retinoic acid receptor) α , β et γ et les récepteurs à rétinoïdes RXR (retinoid X receptor) α , β et γ . Chacun des types de récepteurs (α , β et γ) comprend plusieurs isoformes et on dénombre ainsi plus de 14 récepteurs nucléaires différents (Chambon, 1996). Les récepteurs RAR lient les isomères tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* de RA alors que les récepteurs RXR lient seulement 9-*cis*-RA. D'autres rétinoïdes issus du métabolisme de RA peuvent lier ces récepteurs, notons le tout-*trans*-4-oxo-RA et le tout-*trans*-3,4-déshydro-RA. Ils se lient avec une haute affinité aux récepteurs et peuvent provoquer des effets typiques de la vitamine A tout comme l'atRA (Beckett et Petkovich, 1999). Ces rétinoïdes peuvent être de source exogène ou bien générés par la conversion de RA en dérivés polaires. Les récepteurs complexés RAR et RXR peuvent s'homodimériser ou former des hétérodimères RAR:RXR, pouvant se lier à l'ADN pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la morphogénèse. Ces dimères régulent aussi leur propre expression comme celle de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme de RA et des autres rétinoïdes. Ces dimères lient les éléments de réponse de RA (retinoic acid response elements ou RARE) des gènes cibles et en activent ou répriment la transcription. Par exemple, la fixation du complexe RA/RAR:RA/RXR en position 5' des RARE induit la transcription des gènes cibles alors que la fixation en position 3' la réprime. Considérant le grand nombre de combinaisons possibles entre les différents ligands et les diverses isoformes des RAR et RXR, on dénote une multiplicité d'effets biologiques reliés à la vitamine A (Boily *et al.*, 2004). RA peut se lier à des protéines cellulaires spécifiques liant RA (CRABP). Ces protéines agissent comme des navettes, transférant RA du cytoplasme vers le noyau et peuvent également compétitionner avec les récepteurs nucléaires RAR pour la fixation de RA libre (Maden *et al.*, 1992). Ces protéines contrôlent les quantités de RA disponibles pour la liaison aux récepteurs nucléaires. On distingue les isoformes I et II, la première conservant RA hors du noyau et la seconde étant larguée avec RA dans le noyau pour activer les récepteurs RAR (Sessler et Noy, 2005). De la même façon, certains rétinoïdes peuvent se lier aux protéines cellulaires liant le rétinol (CRBP). Ces protéines sont essentielles pour le métabolisme de RA et pour le maintien des gradients de RA, notamment dans les bourgeons des membres et dans le tube neural (Maden, 1999).

1.2.5.- Métabolisme enzymatique de l'acide rétinoïque

On distingue deux voies principales de métabolisation de RA en dérivés plus polaires. Il peut subir une réaction de phase II et être converti en rétinoyl- β -glucuronide par l'enzyme uridine diphospho-glucuronosyltransférase (Eckhoff *et al.*, 1991). Cette réaction apparaît toutefois comme une des voies métaboliques de RA les moins courantes et est surtout présente dans les cellules qui n'expriment pas la protéine CRABP, notamment les hépatocytes et certaines cellules de la muqueuse intestinale. Par le biais du métabolisme oxydatif, RA peut être converti en dérivés polaires par des isoformes spécifiques du cytochrome P450 (CYP450). Le cytochrome P26 (CYP26) est une enzyme qui catalyse l'hydroxylation de RA en 4-hydroxy-RA (4-OH-RA) et ce métabolite est ensuite oxydé en 4-oxo-RA (Sonneveld *et al.*, 1999). Il semble que la liaison de RA à la protéine CRABP soit essentielle à cette réaction. Les complexes CRABP-RA sont dirigés vers le réticulum endoplasmique où ils sont reconnus par le système enzymatique CYP26 (Nezzar *et al.*, 2007). L'oxydation de 4-OH-RA en 4-oxo-RA ne nécessite pas l'intervention du CYP450, mais se fait en présence de NAD ou NADPH (Roberts *et al.*, 1979). Ces deux métabolites sont les principaux produits issus de la métabolisation de RA et sont formés à partir d'atRA, mais aussi des isomères 9-*cis* et 13-*cis* (Lanvers *et al.*, 1996). D'autres métabolites peuvent être produits par cette réaction, notons entre autre le 13-*cis*-4-oxo-RA, le tout-*trans*-18-hydroxy-RA et le tout-*trans*-4-hydroxy-RA (Nezzar *et al.*, 2007). Cette conversion de RA est un mécanisme essentiel pour restreindre l'exposition de certains types de tissus et de cellules sensibles aux concentrations délétères de RA (Lemaire *et al.*, 2004).

1.2.6.- Interactions moléculaires dans les voies des rétinoïdes

Parce que les rétinoïdes sont impliqués dans le développement des membres, plusieurs chercheurs tentent de montrer que la présence d'anomalies développementales chez les amphibiens retrouvés dans l'environnement est due à une interférence de divers contaminants dans les voies des rétinoïdes.

1.2.6.1.- Le TTNPB, un analogue de l'acide rétinoïque

En laboratoire, il a été démontré que RA peut produire des membres supplémentaires chez des embryons d'oiseaux (Thaller et Eachele, 1996) et de souris. Une autre étude effectuée sur des embryons de *Xenopus laevis* a montré que des traitements avec le palmitate de rétinol, l'atRA et le (E)-4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetraméthyl-2-naphthylényle)-1-propényl] benzoic acid (TTNPB), qui est un analogue fonctionnel de RA et un activateur synthétique spécifique des RAR, peuvent provoquer la mort de l'embryon ainsi que des malformations des membres comme celles observées chez les amphibiens en milieu agricole (membres dupliqués ou tronqués, triangles osseux). Cette molécule très stable a le potentiel d'induire des malformations après de courtes expositions variant de 3 à 24 h (Gardiner *et al.*, 2003). Son utilisation sur des micromasses de bourgeons de membres de souris a montré qu'il se lie à la protéine CRABP, qu'il résiste à la métabolisation et qu'il prolonge l'activation des récepteurs RAR α (Pignatello *et al.*, 1997). C'est également un fort activateur de l'isoforme CYP450RAI1 responsable de la métabolisation de RA en dérivés polaires (Lemaire *et al.*, 2004).

1.2.6.2.- Pesticides organochlorés

Une expérience récente a montré que certains des pesticides organochlorés activent les récepteurs RAR humains (Lemaire *et al.*, 2004). Comme les pesticides organochlorés ont des effets tératogènes chez les animaux (Gupta *et al.*, 1978, Ottolenghi *et al.*, 1974), ces résultats supportent donc l'hypothèse que les malformations des membres observées en milieu agricole puissent être dues à des substances interférant au niveau des mécanismes moléculaires impliqués dans le métabolisme et la signalisation de la vitamine A. Plus spécifiquement, les résultats ont démontré que le chlordane, la dieldrine, l'aldrine, l'endrine et l'endosulfane activent les récepteurs RAR de type β et γ . Cette activation est spécifique des récepteurs RAR et non des récepteurs RXR. De plus, le taux d'activation des récepteurs RAR β et γ par ces pesticides est nettement plus faible que le potentiel agoniste du TTNPB pour ces mêmes récepteurs, ce qui démontre que ces pesticides n'ont qu'une faible affinité pour les récepteurs visés. Cette même étude a également démontré que ces pesticides activent

fortement le cytochrome P450RAI1, une isoforme responsable du métabolisme de RA. Cette surexpression enzymatique dans des cellules en culture rend ainsi les cellules hyposensibles à la présence de RA. Considérant la persistance des pesticides organochlorés dans l'environnement, ces derniers résultats tentent à appuyer l'hypothèse que l'augmentation du taux de malformations des membres observées dans plusieurs pays puisse être due à une exposition prolongée aux pesticides organochlorés (Lemaire *et al.*, 2004).

1.2.6.3.- Acide méthoprénoïque

Il a été démontré que le métabolite acide méthoprénoïque issu de la dégradation du pesticide méthoprène peut se lier et activer les récepteurs RXR de type α et γ . Toutefois, le taux d'activation des RXR obtenus avec le méthoprène et l'acide méthoprénoïque à des concentrations respectives de 10^{-4} M et 10^{-5} M est pratiquement deux fois plus faible que celui obtenu avec le 9-*cis*-RA à une concentration de 10^{-5} M. Ces résultats ont poussé plusieurs chercheurs à tenter de proposer un lien de cause à effet entre les malformations des membres observées en milieu agricole et la présence de méthoprène dans l'environnement. Toutefois, ni le méthoprène et ni l'acide méthoprénoïque utilisés à différentes concentrations n'ont provoqué d'anomalies morphologiques chez la grenouille léopard *Rana pipiens* (Harmon *et al.*, 1995).

1.2.6.4.- Inhibiteurs du catabolisme de l'acide rétinolique

Certaines molécules sont connues pour inhiber le CYP450 responsable de la 4-hydroxylation de RA. Le ketoconazole et le clotrimazole sont des fongicides imidazoles capables d'inhiber cette réaction. Toutefois, ces inhibiteurs sont non spécifiques et inhibent la plupart des CYP450 (Williams et Napoli, 1987, Omiecinski *et al.*, 1999). Le liarozole, une molécule synthétique, est un autre inhibiteur à forte activité (Pignatello *et al.*, 2001). Une étude récente pose également l'hypothèse que les fongicides de type triazole pourraient inhiber le CYP26, une isoforme CYP450 spécifique de cette réaction (Menegola *et al.*, 2006). Plus récemment, il a également été montré que le p,p'-DDE, un des plus persistants métabolites du DDT diminue de façon dose dépendante l'expression protéique et génique du CYP26 chez la

grenouille mâle européenne *Rana temporaria* (Leiva-Presa *et al.*, 2006). Le CYP26 apparaît comme une cible cellulaire passablement vulnérable à la présence de différents xénobiotiques.

1.2.7.- Utilisation des rétinoïdes comme biomarqueurs

Beaucoup d'études avancent la possibilité d'utiliser les rétinoïdes comme biomarqueurs. Deux cas sont présentés ici, l'un rapportant une approche *in vivo* et l'autre *in vitro*.

1.2.7.1- Les ouaouarons de la rivière Yamaska

Une étude qui s'échelonne depuis 2003 dans le bassin versant de la rivière Yamaska (rivière la plus polluée du Québec) porte sur la santé des grenouilles *Rana catesbeiana* (ouaouarons) en relation avec la contamination agricole. En 2003, des ouaouarons ont été capturés et les profils hépatique et plasmatique des rétinoïdes ont été analysés (Bérubé *et al.*, 2005 ; Boily *et al.*, 2005). Les captures ont été faites dans des sites correspondant à différentes intensités d'activité agricole. Les extraits d'eau de surface, analysés pour plus de 53 pesticides, révèlent principalement de l'atrazine et du métolachlore à des concentrations de l'ordre du µg/L. Des concentrations significatives de rétinol et de 13-*cis*-4-oxo-RA ont été retrouvées dans le plasma des ouaouarons et les taux de 13-*cis*-4-oxo-RA ont été significativement différents entre les différents sites. Au niveau du foie, les concentrations de rétinol étaient significativement plus basses chez les grenouilles mâles d'un site contaminé comparativement à un site de référence. Le ratio rétinyl palmitate/rétinol tendait également à être plus élevé chez les grenouilles capturées dans les sites les plus contaminés. Ces derniers résultats suggèrent que les niveaux des rétinoïdes entreposés et circulants peuvent être indirectement affectés par les pratiques agricoles.

1.2.7.2.- La culture cellulaire et l'acide rétinoïque

Une étude récente menée par Novak *et al.* (2007) a montré que des extraits de sédiments contaminés peuvent interférer dans les voies de signalisation des rétinoïdes. Cette étude a été

réalisée sur une culture de cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 transfectées avec un plasmide codant pour une luciférase RAR dépendante. Des extraits de sédiments de la rivière Kymi en Finlande contenant des dioxines et des furannes polychlorés ainsi que des HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) augmentent de façon significative le potentiel de RA à activer les récepteurs RAR, alors qu'aucun effet n'est observé avec des extraits non contaminés. L'étude montre également que le TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) et quelques phtalates diminuent la capacité de RA à activer les récepteurs RAR.

1.3.- Le modèle cellulaire P19 de carcinome embryonnaire de souris

1.3.1.- Généralités

Les cellules de carcinome embryonnaire (EC) représentent un système très similaire à celui des cellules souches embryonnaires (ES). En fait, ce sont des cellules souches issues de tumeurs malignes particulières, les tératocarcinomes (Loubet, 1998). Plus spécifiquement, les cellules P19 isolées par McBurney et son équipe en 1982 (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982) dérivent d'un tératocarcinome produit en greffant un embryon de souris de 3 jours dans des testicules de rat adulte. Ces cellules sont indifférenciées et développementalement pluripotentes. En présence de sérum, ces cellules sont capables de croître continuellement et de conserver leur caractère indifférencié. De la même façon que les cellules de type ES, elles peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules appartenant aux trois feuillettes embryonnaires primitifs (Martin, 1975). Elles constituent un outil intéressant pour la mise au point de bioessais cellulaires et pour travailler sur le développement embryonnaire. Ces cellules peuvent être cultivées sous forme de monocouches adhérentes au support de culture ou sous forme d'agrégats en suspension.

1.3.2.- Différenciation des cellules P19

Des tests de différenciation en agrégats ou à forte densité dans un milieu de culture complet ont montré que ces cellules ne se différencient pas efficacement dans ces conditions

(McBurney, 1993). Toutefois, en présence de différents inducteurs et selon la concentration, les cellules P19 peuvent se différencier en différents types cellulaires. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et RA sont connus comme deux inducteurs de la différenciation cellulaire (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983). Une concentration de 0,5% DMSO induit la différenciation cardiaque (Paquin *et al.*, 2002) alors que RA à des concentrations de 10^{-8} M et 10^{-6} M induit respectivement la différenciation cardiaque et la différenciation neuronale (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). La différenciation neuronale est un modèle de différenciation cellulaire bien établi. Six jours après une exposition initiale à 0,3 μ M RA, plus de 85% des cellules expriment des marqueurs neuronaux. Ce pourcentage décline par la suite étant donné le caractère post-mitotique des neurones et la présence de fibroblastes plus prolifératifs que les neurones (McBurney, 1993). Les cellules P19 représentent un bon modèle pour étudier la différenciation cellulaire.

1.3.3.- La différenciation neuronale comme modèle d'étude sur la tératogénèse

Bien que l'objet de la recherche soit les amphibiens, il est tout de même justifié d'utiliser un modèle cellulaire de souris pour tester les effets *in vitro* d'un contaminant, car il n'existe pas de lignées cellulaires de type EC issues des amphibiens et le métabolisme des rétinoïdes chez les amphibiens devraient s'apparenter à celui de la souris étant donné qu'il est très bien conservé au cours de l'évolution. Également, les contaminants agricoles retrouvés dans les eaux de rivières peuvent contaminer la chaîne alimentaire et affecter des espèces autres que les amphibiens. Il a d'ailleurs récemment été suggéré que l'utilisation de cellules souches de mammifères représente un système *in vitro* adéquat pour étudier les mécanismes de toxicité développementale (Seeley et Faustman, 1998). L'étude a montré que 4 agents alkylants tératogènes (méthyl méthanesulfonate, méthylnitrosourée, éthyl méthanesulfonate, éthylnitrosourée) affectent la différenciation neuronale médiée par RA et que ces effets sont comparables à ceux obtenus sur des cellules isolées du système nerveux central d'embryons de souris. Ces effets sont toutefois corrélés avec une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire.

1.3.4.- Métabolisme de l'acide rétinoïque

Le métabolisme de RA par les cellules P19 et par les microsomes de ces cellules a été partiellement établi par Sonneveld *et al.* (1999). En moins de 4 à 6 heures, le métabolisme de RA est déjà bien entamé et ce taux de métabolisation peut être fortement suractivé suite à un prétraitement avec le substrat RA. Cette suractivation est due à une surexpression du CYP26. Cinq métabolites sont formés, notamment le 4-hydroxy-RA qui est le métabolite majeur formé ainsi que le 18-hydroxy-RA et le 4-oxo-RA. Les cellules F9 de type EC représentent un autre modèle cellulaire capable de métaboliser aisément RA et ce métabolisme a déjà été bien établi par Williams et Napoli (1985). Le métabolisme de RA par ces cellules s'apparente assez bien à celui décrit précédemment et le profil des métabolites dans le milieu de culture est qualitativement similaire à ce qui est mesuré dans les extraits cellulaires. Le métabolisme oxydatif de RA par les cellules de type EC semble être bien conservé.

1.4.- Contaminants d'origine agricole à l'étude

Les fertilisants azotés et l'atrazine sont parmi les contaminants agricoles les plus abondants dans les cours d'eaux avoisinant les zones de culture intensive. On n'a encore que peu d'informations quant à leur toxicité développementale potentielle et leurs mécanismes de toxicité. Le carbaryl et l'endosulfane sont deux pesticides ayant des effets toxiques connus sur le développement.

1.4.1.- Nitrates et nitrites

Les engrais sont des mélanges de minéraux utilisés en agriculture pour apporter aux plantes des compléments d'éléments nutritifs. Au Canada seulement, l'utilisation d'engrais est passée de 1 million de tonnes en 1960 à 4 millions de tonnes en 1985. Les engrais azotés sont encore très utilisés aujourd'hui, et sont la cause des fortes augmentations de nitrates (NO_3) dans les cours d'eaux. Les nitrites (NO_2) sont également présents en grandes quantités et sont le produit de la réduction des nitrates par des microorganismes. Les nitrites sont particulièrement néfastes pour les poissons et sont environ 100 fois plus toxiques et beaucoup

plus oxydants que les nitrates (Environnement Canada). Les nitrites peuvent également réagir avec les amines secondaires et former des nitrosamines en milieu acide (Kunisaki et Hayashi, 1979). Plusieurs études suggèrent que les fertilisants azotés tels que le nitrate d'ammonium NH_4NO_3 , le nitrate de potassium KNO_3 et le nitrate de sodium NaNO_3 peuvent contribuer, de pair avec les pesticides, au déclin des populations d'amphibiens dans les zones agricoles. La majeure partie des études a montré que la toxicité des composés nitrés chez les amphibiens augmente avec la concentration en nitrates et le temps d'exposition. Une étude effectuée sur les têtards du crapaud *Bufo bufo* a montré qu'une exposition de 13 jours à une concentration en nitrates de 9,1 mg/L provoquait une réduction de l'alimentation, une perte de poids et une diminution de la survie (Baker et Waights, 1993). Une autre étude effectuée avec du NH_4NO_3 sur les têtards de diverses espèces de grenouilles et de crapauds a révélé des effets anormaux au cours d'expériences de toxicité aiguë et chronique, soit des têtards nageant et se nourrissant moins vigoureusement, des enflures et des corps transparents, des déformations au niveau de la tête et du système digestif ainsi qu'un état de paralysie (Camargo *et al.*, 2005). Des concentrations aussi faibles que 2 à 5 ppm de nitrates peuvent provoquer des effets chroniques chez les amphibiens tels que des malformations des membres au cours du développement embryonnaire (Environnement Canada). Quant aux nitrites, il a été rapporté que le nitrite de sodium (NaNO_2) à des concentrations aussi élevées que 1000 mg/L ne provoque pas d'effets mutagènes ou tératogènes chez des fœtus de souris (Shimada, 1989). D'autres études ont toutefois rapporté qu'à des concentrations de l'ordre du mg/L, ils affectent le développement de plusieurs espèces de grenouilles (Griffis-Kyle, 2007; Marco and Blaustein, 1999). L'effet des nitrites et des nitrates sur la signalisation ou le métabolisme de RA est peu connu. Une étude réalisée *in vitro* avec des molécules pures a montré qu'en conditions acides, les nitrites pouvaient nitroser des rétinoïdes (Panzella *et al.*, 2003). On ne sait pas si une telle réaction se produit *in vivo*, mais si c'est le cas, elle pourrait affecter les voies rétinoïdiennes.

1.4.1.1.- Métabolisme cellulaire du NO[•]

Bien qu'ils puissent être des composés potentiellement toxiques, les nitrates et les nitrites peuvent être synthétisés *in vivo* par le métabolisme cellulaire. L'oxyde nitrique synthase (NOS) catalyse la dégradation de la L-arginine en citrulline et en oxyde nitrique (NO[•]). On distingue trois formes majeures de l'enzyme NOS, soit les formes constitutives présentes dans les cellules endothéliales (eNOS) et neuronales (nNOS) et la forme inducible (iNOS) impliquée dans des processus pathophysiologiques (Misko *et al.*, 1993). Le NO[•] est une molécule essentielle dans plusieurs processus de signalisation chez les vertébrés, notamment dans la transmission neuronale dans le système nerveux central. En fait, il est impliqué dans les voies de transduction des signaux inter- et intracellulaire et peut conduire à une perte fonctionnelle ou à une activation de certaines protéines cellulaires. Il est également connu comme un important régulateur du développement embryonnaire (Gouge *et al.*, 1998). Une fois relâché dans le milieu extracellulaire, le NO[•] peut réagir avec l'oxygène et l'eau pour former des nitrates et des nitrites, des produits stables issus de l'oxydation du NO[•]. Toutefois, au niveau intracellulaire, le NO[•] peut être potentiellement toxique en interagissant avec les anions superoxyde ([•]O₂) pour former du peroxynitrite ([•]ONOO⁻), un radical libre oxydant pouvant causer la fragmentation de l'ADN et l'oxydation des lipides (Brown, 1999). Le nitrate et le nitrite inorganiques sont donc des substances endogènes produites par l'oxydation du NO[•] (Lauer *et al.*, 2001). Ces deux molécules sont des agents oxydants. Ils peuvent donc engendrer un stress oxydatif en produisant des espèces oxygénées activées, ceci pouvant provoquer des dégâts cellulaires irréversibles. Plusieurs études récentes suggèrent que le NO[•] est impliqué dans la différenciation cellulaire *in vitro* médiée par atRA (Séguin-Devaux *et al.*, 2002, Danalache *et al.*, 2007, Ogura *et al.*, 1996, Teixeira *et al.*, 2005). Toutefois, l'implication des nitrates et des nitrites produits après oxydation du NO[•] reste inconnue jusqu'à maintenant, de même que l'impact de ces ions sur l'action et le métabolisme du NO[•].

1.4.2.- Atrazine

L'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamine-s-triazine) est un pesticide de la famille des triazines et un des herbicides les plus utilisés en Amérique du Nord. Il a provoqué des cas d'hermaphrodisme et des retards de croissance au niveau des organes sexuels chez les grenouilles mâles (Hayes *et al.*, 2002). Il est également connu comme un activateur de l'aromatase, l'enzyme qui convertit la testostérone en oestrogène (Holloway *et al.*, 2007). Une étude en Iowa a également rapporté qu'à des concentrations élevées, il augmente de près de 3 fois le taux de malformations cardiaques et de presque 7 fois le taux de malformations des membres (Munger *et al.*, 1997). De plus, d'autres études ont révélé qu'exposés durant le stade larvaire à des concentrations sous-létales d'atrazine variant de 20 à 2000 µg/L, certains organismes tels que les têtards de la rainette versicolore (*Hyla versicolor*) prennent plus de temps à se métamorphoser et possèdent un plus petit poids et une plus petite taille que des organismes non exposés (Sullivan et Spence, 2003).

1.4.3.- Carbaryl

Le carbaryl (1-naphthyl-N-méthylcarbamate) est un insecticide faisant partie de la famille des esters de carbamate. Dans cette famille, on retrouve des molécules connues comme étant neurotoxiques. Une exposition prolongée à ces insecticides chez les mammifères a provoqué des effets aussi divers qu'une perte de mémoire, une polyneuropathie dégénérative et d'autres types de désordres neurologiques (Chang *et al.*, 2006). Bien que les carbamates inhibent l'enzyme acétylcholinestérase (Ecobichon, 2001), les mécanismes impliqués dans les désordres et changements neurologiques observés ne sont pas très bien connus. Parmi ceux-ci, le carbaryl a provoqué des changements dans la morphologie de neurones cultivés *in vitro* à partir de cellules SK-N-SH différenciées en présence de RA. Ces changements se caractérisent notamment par une diminution de croissance des neurites observés dans les cultures (Chang *et al.*, 2006).

1.4.4.- Endosulfane

L'endosulfane (1,2,3,4,7,7 - hexachlorobicyclo - (2,2,1) - 2-heptène - 5,6 - bisoxyméthylène sulfite) est un insecticide organochloré encore utilisé pour contrôler les populations d'insectes dans les cultures de légumes, de coton et de fruits. Il est neurotoxique et on lui connaît des propriétés oestrogéniques. On a également montré récemment qu'il inhibe la différenciation et la prolifération cellulaires durant le développement et qu'il inhibe les jonctions gap (Kang *et al.*, 2001). C'est également un pesticide tératogène capable d'activer les RAR β et γ et le CYP26 (Lemaire *et al.*, 2004). C'est également un pesticide neurotoxique qui a la capacité d'inhiber la croissance des neurites *in vitro* dans des conditions d'inhibition de la prolifération cellulaire (Kang *et al.*, 2001).

1.5.- Hypothèses et objectifs

Beaucoup d'études suspectent ou rapportent des effets délétères de contaminants d'origine agricole sur le développement et la morphogénèse des amphibiens. Cependant, on n'a encore que peu d'informations sur le degré de toxicité de ces contaminants et sur les mécanismes cellulaires de leur action. Beaucoup de tests de toxicité sont effectués *in vivo* et ne permettent pas de déterminer précisément les mécanismes de toxicité cellulaire impliqués. Tel que décrit précédemment, des études ont récemment été réalisées au Québec sur des ouaouarons à différents sites de la rivière Yamaska et les résultats ont permis de poser l'hypothèse que les variations observées sur les niveaux de rétinoïdes endogènes peuvent s'expliquer par la contamination agrochimique des cours d'eaux (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005) et qu'elles pourraient avoir un impact sur le développement de ces animaux. Des échantillons d'eaux ont été prélevés aux différents sites et analysés chimiquement et les résultats ont révélé une présence importante d'atrazine, de nitrates et de nitrites (non publié). L'objectif principal de mon travail était de déterminer l'effet potentiel de ces trois contaminants sur le métabolisme de RA et sur la différenciation médiée par RA. Les cellules P19 de carcinome embryonnaire de souris ont été choisies comme modèle d'étude parce qu'elles métabolisent RA et parce qu'elles se différencient efficacement en neurones en présence de RA. L'introduction de fertilisants azotés ou d'atrazine dans les cultures de cellules P19 en cours

de différenciation en présence de RA pourrait affecter le métabolisme de RA et le taux de neurodifférenciation. Possiblement aussi, ces composés pourraient induire une différenciation cellulaire en absence de RA. D'autre part, les approches développées avec le modèle P19 avaient le potentiel de conduire à la mise au point de bioessais permettant de juger le potentiel tératogène de toxiques environnementaux. Un autre objectif général était d'évaluer, de façon préliminaire et avec le modèle P19, des pesticides reconnus pour être neurotoxiques (le carbaryl et l'endosulfane). Pour toutes ces raisons, les objectifs spécifiques de ce travail étaient :

- La mise au point d'un bioessai permettant d'évaluer le taux de différenciation générale et neuronale des cellules P19
- La description du profil métabolique de RA dans les cellules P19
- L'étude de l'effet de l'atrazine, des nitrites et des nitrates sur la différenciation cellulaire et le métabolisme de RA dans le modèle P19
- L'étude préliminaire de l'effet du carbaryl et de l'endosulfane sur la différenciation cellulaire et le métabolisme de RA dans le modèle P19

CHAPITRE II

ATRAZINE AND NITROGENOUS FERTILIZERS ON NEURODIFFERENTIATION AND RETINOIC ACID METABOLISM IN THE P19 CELL MODEL

Mathieu Solari¹, Monique H. Boily¹, Joanne Paquin²

¹Département des Sciences Biologiques

²Département de Chimie

Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec,
H3C 3P8, Canada

Article à être soumis

2.1.- Abstract

Atrazine and nitrogenous fertilizers are among the most commonly found pollutants in agricultural rivers in North America. Little is known about their potential teratogenic effects but several *in vivo* experiments suggest their ability to promote adverse developmental effects in mammals and amphibians. Retinoids, including retinoic acid (RA) are endogenous molecules known to play an essential role in embryonic development and disturbance of their homeostasis has been shown to be linked with severe developmental defects. A possible action of atrazine and nitrogen species on RA metabolism and RA-mediated processes was however not investigated. Using the mouse P19 embryonal carcinoma cell line as a model of RA-inducible neurodifferentiation, we sought to determine whether atrazine, nitrates and nitrites inhibit neurodifferentiation and affect RA metabolism. P19 cells were cultured for four days as aggregates without (non-induced cells) or with all-*trans*-RA (atRA) (induced cells), in the absence or presence of contaminants and assayed by flow cytometry for expression of SSEA1 (marker of the undifferentiated state) and β III-tubulin (neuronal marker). Extracts from cells and culture media were also analysed for atRA metabolism by HPLC. Downregulation of SSEA1 mirrored β III-tubulin upregulation in an atRA concentration-dependent manner. Atrazine, nitrates and nitrites did not affect differentiation when used at concentrations encountered in the Yamaska river drainage basin, Québec. However, at high concentrations, nitrites and to a lesser extent nitrates prevented RA-induced SSEA1 downregulation and nitrites affected appearance of β III-tubulin. These last results were correlated with a decrease in cell proliferation/viability. Atrazine remained innocuous. P19 cells rapidly metabolized RA and produced polar retinoids such as the all-*trans*-4-oxo-RA. Contaminants had no effect on atRA metabolism even at contaminant concentrations exhibiting phenotypic effects. These results suggest that potential teratogenicity of these contaminants can be explained by general cytotoxicity. These two bioassays appear to be complementary valuable tools for studying mechanisms implicated in teratogenic effects.

Keywords : atrazine, nitrite, nitrate, P19 cells, retinoic acid, cell differentiation, flow cytometry, HPLC

2.2.- Introduction

Amphibian populations are decreasing worldwide and high incidences of deformed anurans have been reported in North America. In addition to parasites and UV radiations, chemical contamination of waterways is viewed as an important cause of deformities given the high skin permeability of frogs (Gardiner *et al.*, 2003). In southern Québec, hindlimb malformations of several species of frogs were observed in agricultural areas, where the pesticides and nutrients are largely used (Ouellet *et al.*, 1997). According to a few studies, frog deformities could be linked to an altered retinoid effect. More specifically, environmental contaminants could interfere with retinoid pathways and lead to malformations (Dégitz *et al.*, 2003).

Retinoic acid (RA) is the active metabolite of retinol (vitamin A), a micronutrient that plays an essential role in growth and embryonic development in vertebrates (Zile, 1998). RA acts principally in binding specific nuclear receptors that are members of the steroid superfamily of ligand-activated transcription factors. Two classes of receptors have been identified so far: the retinoic acid receptors (RAR) and the retinoid X receptors (RXR). The dimers formed are the functional units that transduce and activate target genes involved in diverse biological processes such as cell growth and differentiation (Zile, 2001). Enzymatic pathways by which RA is synthesized and metabolized are well known and may contribute to the profound effects of retinoids (Napoli *et al.*, 1995). 4-hydroxy-RA is the major metabolite of RA and is produced by a CYP450-mediated reaction involving RA hydroxylation (CYP26) (Ray *et al.*, 1997). Subsequent oxidation of 4-hydroxy-RA leads to 4-oxo-RA, which is also known for teratogenic effects (Pijnappel *et al.*, 1993). Retinoids have been extensively studied as biomarkers of teratogenicity, but the studies were majoritarily *in vivo* and took in account persistent organochlorine contaminants (Zile, 1992; Boily *et al.*, 2003). The potential effects of non-persistent contaminants (e.g. herbicides, insecticides and nutrients) on retinoids have not been investigated despite the fact that pesticides are widely used and that exposure is not limited to spray drifts. Recent studies with frogs captured from the Yamaska river, the most polluted river in Québec revealed that body weight as well as retinoid homeostasis were affected by agricultural practices (Bérubé *et al.*, 2005, Boily *et al.*, 2005).

Atrazine, which helps controlling the growth of emergent broad leaf weeds and grasses, is one of the most widely used pesticides in North America in corn cultures. Its concentration in the aquatic environment can reach concentrations up to 15-23 $\mu\text{g/L}$ (Solomon *and al.*, 1996; David *et al.*, 2003; Zablotowicz *et al.*, 2006). Atrazine is not considered as an acute toxic component at environmentally relevant concentrations, but several studies demonstrated its ability to affect development. This pesticide was shown to affect endocrine status, gonadal differentiation, metamorphosis and growth in amphibians, adults and tadpoles (Hayes *et al.*, 2002; Diana *and al.*, 2000; Tavera-Mendoza, 2002 a, b; Allran and Karasov, 2001). Nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) ions are naturally present in the environment as products of nitrogen oxidation by microorganisms, but their concentration in waterways is increased by intensive uses of nitrogenous fertilizers. They can affect larva survival or development in sensitive amphibian species (Ortiz *et al.*, 2004, Edwards *et al.* 2006) or amplify some adverse effects of other stressors such as atrazine and U.V. radiations (Orton *et al.*, 2006; Sullivan and Spence, 2003; Smith *et al.*, 2004; Macias *et al.*, 2007). Nitrates have been shown to reduce growth rate of tree frog (*Litoria caerulea*) tadpoles at concentrations varying from 40 mg/L to 100 mg/L (Baker and Waights, 1994). It was also shown that nitrites at concentrations up to 3.5 mg/L can have adverse effects on the metamorphosis of Cascades frogs (*Rana cascadae*) (Marco and Blaustein, 1999). In the Yamaska River study, the chemical analysis indicated a high level of atrazine (Bérubé *et al.* , 2005), nitrates and nitrites (in preparation).

The goal of this study was to explore if atrazine, nitrates and nitrites may alter RA metabolism or RA-mediated processes. All-*trans*-RA (atRA) isomer was selected because it is the principal *in vivo* form of vitamin A acid. In the absence of an established amphibian embryonic cell line, mouse P19 embryonal carcinoma (EC) cell line, a well established RA-sensitive model of cell differentiation, was selected to verify this possible relationship. These undifferentiated and pluripotent cells give rise to the formation of cell derivatives of all three germ layers (McBurney, 1993). When aggregated *in vitro* in normal culture medium, most P19 cells retain the EC phenotype. However, if aggregates are treated with an inducer as RA, the subsequently plated cells can develop into neurons, glia and fibroblasts (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). For the purpose of this study, neurodifferentiation was then selected as a RA-

dependent differentiation model and SSEA1 (marker of the undifferentiated state) and β III-tubulin (neuronal marker) were chosen as cell markers for assessment of differentiation. Cell cultures were exposed to agricultural contaminants. Cell differentiation and atRA metabolism were respectively assessed by flow cytometry and HPLC. Relevant markers were tested and validated for an efficient monitoring of these two processes. Results showed that mg/L concentrations of nitrites have important effects on neuronal differentiation, but that these effects were correlated with cytotoxicity. None of the contaminants had effects on atRA metabolism. This research could result in a rapid bioassay testing the teratogenic potential of chemical substances, found alone or in mixtures.

2.3.- Materials and methods

2.3.1.- *Chemicals.* Atrazine, sodium nitrate (NaNO_3) and sodium nitrite (NaNO_2), butylated hydroxytoluene (BHT) and the retinoid standards atRA, 13-*cis*-RA and at-retinol were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). All-*trans*-4-oxo-RA and 13-*cis*-4-oxo-RA were synthesized by irradiation of atRA in a heptane-iodine solution as described by McKenzie *et al.* (1979). All solvents and trifluoroacetic acid (TFA) were HPLC grade or better and were obtained from Fisher Scientific (Montréal, Qué., Canada).

2.3.2.- *Cell culture.* P19 cells were routinely grown in complete culture medium consisting of α -minimum essential medium (α -MEM, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories Inc., Toronto, Ontario, Canada), 50 IU/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Invitrogen). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Confluent cultures were dissociated by incubation in phosphate buffer solution (PBS) containing 0.025% w/v trypsin (Sigma-Aldrich Co.) and 1 mM EDTA. Cells were resuspended by pipetting and seeded as 1×10^6 cells/10 ml in complete culture medium. Cell passages were done every two days.

2.3.3.- *Neuronal differentiation.* P19 cell neurodifferentiation procedure was modified from that of Cadet and Paquin (2000). Briefly, cells were cultivated as aggregates from day 0 to day 4 (D0 to D4) in bacteriological grade culture dishes in complete differentiation medium consisting of α -MEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 5% donor bovine serum (PAA Laboratories), antibiotics and 0.5 μM atRA. Differentiation medium was replenished at D2. At D4, cell aggregates were dissociated by trypsinization and cultured as monolayers for 24 h (D5) or more, onto gelatin- or poly-D-lysine-coated tissue culture dishes, in neuronal maturation medium (Neurobasal™ containing 0,5 mM L-glutamine and 0,5% B27™ supplement, all three from Invitrogen). This defined medium sustains growth of P19 neurons (Yao *et al.*, 1995) and inhibits the proliferation of fibroblasts. Flow cytometry analysis was performed on dissociated D4- and D5-cells. Western blotting was done on D7 cells. Non-

induced (NI) cells were subjected to the neurodifferentiation protocol but in absence of atRA. In some studies, atRA concentration varied from 0 to 5 μM .

2.3.4.- Exposition of differentiating P19 cells to atrazine and nitrogenous fertilizers. Atrazine was dissolved in DMSO and sodium nitrogenous salts (NaNO_3 and NaNO_2) were prepared in water. All stock solutions were kept at 4°C until use. Contaminants were added to the cell differentiation medium during the 4 days of aggregation, in the absence or presence of 0.5 μM atRA. Atrazine was tested up to 2000 $\mu\text{g/L}$ and nitrogenous fertilizers were respectively tested at concentrations varying from 0 to 2000 mg/L NaNO_3 (1460 mg/L NO_3) and 0 to 1000 mg/L NaNO_2 (670 mg/L NO_2). The goal of this approach was to identify adverse effects of these agrochemicals on the rate of atRA-induced cell differentiation.

2.3.5.- Immunostaining and flow cytometry analysis. The following antibodies were used : mouse IgM anti-SSEA1 [MC480] (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, USA), mouse IgG anti- β III-tubulin (Sigma Aldrich), FITC-conjugated sheep anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch), FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch). At D4 or D5 of the differentiation protocol, cells were dissociated, fixed by incubation in PBS containing 1% p-formaldehyde, carefully washed and suspended in PBS. These cell suspensions were kept at 4°C until analysis. All subsequent steps were done at room temperature. Cells ($0,5 \times 10^6$) were incubated during 15 min with 100 μl of primary antibody, rinsed three times with 1 ml of PBS, incubated 15 min with 200 μl of secondary antibody, carefully rinsed again and kept at 4°C in the dark until flow cytometry analysis. For SSEA1 staining, the primary (mouse IgM;) and secondary (sheep anti-mouse IgM conjugated to fluorescein) antibodies were respectively used at 1/50 and 1/500 dilution in PBS containing 3% BSA (PBS-BSA). For β III-tubulin staining, cells were permeabilized during 5 min with PBS containing 0.005% saponin before incubation with the primary (mouse IgG) and secondary (sheep anti-mouse IgG conjugated to fluorescein) antibodies, both diluted 1/500 in PBS-BSA containing 0.005% saponin. Reference cells were not treated with antibodies and non-specific staining was determined by treating cells with the secondary antibody only. Reference and stained cells were resuspended in PBS (1×10^6 cells/ml). Flow cytometry was done by using a FACScan apparatus (Becton Dickinson) at a flow rate of 2000

cells/second. Results were analysed with WinMDI 2.8 and/or CellQuest™Pro ver 5.1.1 software (BD Biosciences). Cellular debris were excluded from the analysis by forward scatter (FSC, cell size) and side scatter (SSC, cell complexity). Dead cells were identified by their lower forward scatter (FSC, cell size) values in an unfixed cell population. Percentages of dead cells determined with SSC and FSC values were validated by flow cytometry analysis of unfixed cells stained with propidium iodide (50 µg/ml) (Koso *et al.*, 2006).

2.3.6.- *Western blotting analysis.* Cells were rinsed and collected by scraping, homogenized in PBS, then centrifuged at 1 000 x g for 1 min at 4°C. The supernatants were discarded and the pellets resuspended in RIPA solution (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.6, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS) in the presence of 20 mg/ml of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride. After an incubation of 30 min on ice, the suspensions were centrifuged at 12 000 x g for 10 min at 4°C, and the supernatants were analysed for protein content by a modified Bradford assay. Aliquots (20 µg of protein) were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) under reducing conditions followed by electrotransfer onto polyvinylidene fluoride membrane (PVDF; Amersham Pharmacia-Pharmacia). Molecular size was calibrated with Broad Standard Solution (Bio-Rad; Mississauga, ON, Canada). The PVDF blots were blocked overnight at 4°C with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS 20 mM, Tris-HCl pH 8.0 140 mM, NaCl 1%, BSA 0.1%, Tween-20), and successively probed with sheep anti-βIII-tubulin (1/800 in TBS) for 2 h at room temperature. Detection was done by enhanced chemiluminescence with an Amersham Pharmacia- ECL kit. Autoluminograms were developed in an AFP Imaging Minimed 190 X-Ray Film Processor (AFP, Elmsford, NY). Actin immunoblotting was done to verify protein loads on gels, using an antibody purchased from Sigma-Aldrich.

2.3.7.- *Cell treatment for analysis of atRA metabolism.* Individualized cells (1×10^6 suspended in 10 ml of complete α-MEM culture medium) were seeded in 100 mm-diameter tissue culture dishes (cell monolayer metabolism) or bacteriological grade dishes (cell aggregate metabolism) and incubated with 0.5 µM RA for 48 h or more. Culture media (500 µl-aliquots) and cells (entire populations suspended in 1 ml PBS) were collected at different

times during this period and were kept in 1.5 ml polypropylene tube (Eppendorf type) at -80°C until analysis for retinoids. The capacity of contaminants to inhibit atRA metabolism was evaluated as per Williams and Napoli, 1987. Briefly, cells (8×10^5 cells in 2 ml complete culture medium) were seeded in 35 mm-diameter tissue culture dishes during 16 hours. Cells were then preincubated for 30 min with 10 μ M clotrimazole or various concentrations of atrazine, nitrates or nitrites. Following this time, 50 nM atRA was added and the incubation resumed for 4 h. Culture medium (2 ml) and cell samples (entire populations suspended in 1 ml PBS) were collected as previously described. Cell protein concentration was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951).

2.3.8.- Retinoid analysis. All retinoid analyses were conducted under yellow incandescent lights to prevent isomerisation. The extraction procedure was that of Bérubé *et al.* (2005) with slight modifications. Briefly, frozen media (1 ml) and cell homogenates (1 ml) were allowed to thaw at room temperature for 30 min. Methanol (200 μ l) containing 1 mg/ml BHT and 1 ml of a solvent mixture composed of 50% ethyl acetate and 50% acidified hexane (containing 0,068% v/v glacial acetic acid) were added to 200 μ l (100 mm-diameter dishes) or 500 μ l (35 mm) of cell culture medium and to 500 μ l (100 mm) or 800 μ l (35 mm) of cell homogenate. The mixture was vortexed for 1 min, centrifuged at 2 000 x g for 5 min and 800 μ l of the organic phase was transferred to a clean test tube. The extraction was repeated and 1000 μ l of the organic phase was collected. The combined organic phases (1.8 ml) were evaporated to dryness at 45°C under a gentle stream of nitrogen gas and the residue was dissolved in 100 μ l of acetonitrile. A volume of 80 μ l was injected into a reverse-phase HPLC system (Water Corporation, Milford, MA, USA) consisting in a Millennium program loaded onto a Pentium II computer, a model 510 pump, a model 486 absorbance detector set at 350 nm and a model 7725i (Rheodyne) injector. The mobile phase was methanol : acetonitrile : tetrahydrofuran : 0.35 mM trifluoroacetic acid (25.8%:55.7%:2.5%:16%) and flowed at 1 ml/min isocratically. Retinoids were separated on an Inertsil C18 analytical column (Chromatographic Sciences Company, Brockville, Ont., Canada; 150A-ODS2; 250 mm \times 4.6 mm; 5 μ m). The peaks for retinol and RA were identified by comparing with authentic commercial standards (Sigma-Aldrich). Identification of at-4-oxo-RA and 13-*cis*-4-

oxo-RA were performed using standards synthesized in our laboratory based on the method of McKenzie *et al.* (1979) (see Chemicals).

2.3.9.- *Cell proliferation/viability assay.* Cells were seeded in 24-well tissue culture plates (10^4 cells/well) in complete α -MEM culture medium with increasing concentrations of contaminants. After a 48. h-incubation, cells were rinsed with PBS, fixed for 20 min with 1% p-formaldehyde in PBS, stained with PBS containing 0.1% crystal violet, rinsed with PBS and extracted with 10% acetic acid diluted in PBS. Extracts were read spectrophotometrically at 595 nm.

2.3.10.- *Statistical analysis.* For some analysis, results are reported as the mean values \pm SD (standard deviation) and treatments were compared by unpaired Student's t test using Microsoft® Excel 2002 software.

2.4.- Results

2.4.1.- SSEA1 expression in P19 cells. SSEA1 is a glycoconjugate antigen found at the surface of embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells. Immunocytofluorescence studies revealed that efficient neuronal differentiation of P19 cells, which requires their aggregation in the presence of 0.5 μ M atRA, is correlated with an important downregulation of SSEA1 expression shortly after a 48 h exposure (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983). In the present work, we sought to characterize expression of this embryonic marker by flow cytometry. Figure 2.1 A-C show representative histograms comparing abundance of SSEA1-positive cells under various conditions. Almost all cells were positive in undifferentiated cultures. A similar situation was observed in non-induced (NI) cultures aggregated for 4 days in absence of atRA. Surprisingly, neurodifferentiation treatment only slightly decreased the number of positive cells. However, important changes became apparent when comparing fluorescence levels between cells. Mean fluorescence per cell in neuroinduced cultures was reduced by 86% relatively to NI cultures (Fig. 2.1 D). Mean fluorescence rather than cell count was therefore used throughout this work to follow cell differentiation.

2.4.2.- β III-tubulin expression in P19 cells. Neurons specifically express the β III-isoform of tubulin. Before using anti- β III-tubulin antibody in flow cytometry studies, we verified its specificity by Western blotting (Fig. 2.2 A). Two immunoreactive bands can be detected in atRA neuroinduced cultures. The strongly stained band likely corresponds to β III-tubulin on the basis of the following criteria : it has the right molecular weight (55 kDa) and it is not expressed in undifferentiated and NI cells. An immunoreactive band of slightly lower molecular weight and unknown identity was found to be present at similar levels in all cultures. In considering the faintness of the latter band compared to the intensity of the 55 kDa-band, we judge the anti- β III-tubulin antibody as being usable in flow cytometry studies. Undifferentiated cells (Fig. 2.2 B) and NI cultures (not shown) exhibited similar β III-tubulin histograms characterized by a single, weakly fluorescent peak, in agreement with Western blotting data. In contrast, a second, intensively fluorescing peak was seen in atRA-induced cultures (Fig. 2.2 B). Intensively stained cells (β III-tubulin positive cells) accounted for $22 \pm$

4% and $56 \pm 10\%$ of all cells in D4- and D5-neuroinduced cultures respectively (Fig. 2.2 C), indicating generation of neurons.

2.4.3.- Dose-dependent effects of atRA on neuronal differentiation. Considering that contaminants can potentially affect atRA metabolism and thus influence this morphogen availability and action in cells and organisms, we examined P19 cell neurodifferentiation efficiency as a function of atRA concentration. Differentiation was assessed by flow cytometry and by morphology. The number of β III-tubulin positive cells was negligible in cultures where cell aggregates were not exposed to atRA (Fig. 2.3 A). On the other hand, positive cell counts increased with increasing atRA concentrations. A plateau was reached at $0.05 \mu\text{M}$ RA and remained stable until $5 \mu\text{M}$ concentration, the highest tested concentration. Decrease in SSEA1 staining (mean fluorescence per cell) mirrored β III-tubulin upregulation. atRA concentration can thus influence phenotypic marker expression. Flow cytometry FSC/SSC dot plots were also collected and likewise revealed profiles affected by atRA concentration (Fig. 2.3 B). Cultures of NI-aggregates and aggregates induced with a very low atRA concentration ($0.005 \mu\text{M}$) contained the largest number of cellular debris as illustrated by the number of points found in areas of low FSC/SSC values on dot plots. Increased cell complexity/granulosity (high SSC values), corresponding probably to less healthy cells was found at lower atRA concentrations. However, the majority of these high-SSC cells were not stained by the fluorescent dye propidium iodide indicating some degree of viability (not shown). Although FSC/SSC dot plots were not used to determine neurodifferentiation efficiency, it is worth noting that their profiles started to stabilize at $0.5 \mu\text{M}$ atRA since there was no important difference between the 0.5 and $5 \mu\text{M}$ profiles. This finding agrees with phenotypic marker expression curves. Finally, photomicrographs were taken at D4 and D5 of the neurodifferentiation protocol (Fig. 2.3 C) to determine whether atRA effect on SSEA1 and β III-tubulin marker expression correlated with cell morphology. D4-aggregates appear to be darker and less-well rounded with decreasing atRA concentrations. This was not unexpected since in absence of atRA, a known inhibitor of cell proliferation (Pachernik *et al.*, 2005b), cells proliferate and necrotic areas form in the heart of aggregates due to reduced availability of nutrients and oxygen (Smith *et al.* 1987). Reduced necrotic areas in atRA-treated cultures could well reflect the capacity of atRA to reduce cell proliferation as well as

to promote cell-cell adhesion and communication (Clairmont *et al.*, 1996; Byers *et al.*, 1996). Transfer of D4 cells to tissue culture dishes permits to follow neuritogenesis in neurally-induced cultures. In absence of atRA, there was no neuritogenesis 24 h post-transfer and cells kept their undifferentiated morphology easily distinguished by the presence of two prominent nucleoli. In contrast, neuritic processes were visible in cultures induced with 0.05 μM and 0.5 μM atRA. Neurites were rare at the highest atRA concentration tested (5 μM), probably because the weak cell density in these cultures could delay neuronal maturation. However, despite poor neuritogenesis, cells had a neuronal phenotype as evidenced by characteristic small rounded bodies. Neuritogenesis was absent in cultures treated with 0.005 μM and these cultures presented a mixed morphology : a number of cells resembled undifferentiated cells whereas some others had a tendency to grow as islets resembling those observed in cultures clearly containing neurons. Altogether, results indicate that SSEA1 and $\beta\text{III-tubulin}$ flow cytometry assays can be used to measure loss of undifferentiated phenotype and apparition of neuronal phenotype in a manner sensitive to atRA concentration.

2.4.4.- HPLC analysis of atRA metabolism. Retinoid profile in neurally-differentiating P19 cultures was examined by HPLC at the end of the first 24 h of the neurodifferentiation protocol. Substance identity under peaks was confirmed by comparing chromatographic behaviour with those of standard retinoids. Fig. 2.4 firstly shows a comparative retinoid chromatogram resulting from extracts of the native complete culture medium and from the culture medium of cells incubated with 0.5 μM atRA (panel A). Retinoid profile in cells after incubation with atRA is presented in panel B. Retinoid profile in the control medium is qualitatively similar to that of control cells, so only one of them is shown. BHT used as an anti-oxydant in the extraction procedure eluted at about 12 min (peak 5) and an unknown molecule eluted at about 21 min (peak 8). Retinol (peak 7) appears as the only retinoid found in the fetal bovine serum. Chromatograms of medium and cells after incubation with atRA appear to be qualitatively similar. atRA (peak 9) was still present after a 24 h incubation. Polar RA metabolites which elute between 4.5 and 7 min were generated by the cellular metabolism. Four metabolites of atRA (peaks 1-4) are produced during the incubation and one was clearly identified as being all-*trans*-4-oxo-RA (peak 2). Traces of 13-*cis*-RA (peak 6) were also identified. Figure 5 shows time course profiles of atRA metabolism. In absence

of cells, atRA was not degraded in the culture medium. In fact, atRA levels remained stable until at least 80 h (Fig. 2.5 A). In contrast, levels decreased with time in culture media in the presence of cells, and disappearance profiles were similar whether cells were seeded in tissue culture plates (monolayer cultures) or bacteriological culture plates (aggregate cultures). Half-times of disappearance were approximately 30 h and atRA was almost undetectable in culture media after 48 h of incubation with cells. This is an interesting finding since a second provision of atRA is normally given to cells at 48 h of the neurodifferentiation protocol, thus corresponding to a real replenishment of the morphogen. atRA disappearance was slightly more rapid when cells were incubated as monolayers instead of aggregates (Fig. 2.5 A). Figure 2.5 B compares atRA and polar metabolite profiles in culture media and cell extracts during the first 48 h of the neuronal differentiation protocol. Analysis was not performed beyond this time because replenishment of cultures with atRA would have complicated interpretation of kinetics. Disappearance of atRA in the culture medium was accompanied by increased production of polar metabolites. In cells, atRA was accumulated until 24 h, followed by an important decrease due to cellular consumption. Metabolites were also shown to accumulate over the 48 h period. Retinol was detectable at each time but did not seem to be metabolised even if we found some levels in cells (not shown).

2.4.5.- Effect of clotrimazole on atRA metabolism. Clotrimazole is a known inhibitor of cytochrome P450-like activities (Omiecinski *et al.*, 1999). We tested its effect on atRA metabolism in P19 cells in order to determine conditions to be used to evidence potential inhibitory action of contaminants on this metabolism. Increasing concentrations of clotrimazole up to 10 μM were tested during a 24 hour incubation period in the presence of 0.5 μM atRA or 0.05 μM . Apparent inhibitory effects observed at highest clotrimazole concentrations were correlated with deleterious effects on cell viability and proliferation (not shown). So, we decided to use a method modified from that established by Williams and Napoli (1987) by using a 0.05 μM atRA concentration and a 4 h incubation period. Under these modified conditions, 10 μM clotrimazole inhibited atRA disappearance by 55% in culture medium without affecting cell viability or proliferation (Fig. 2.6 A). Parallely, an 8-fold increase in intracellular atRA levels was observed in clotrimazole-treated cultures compared to control cultures (Fig. 2.6 B). No apparent differences were noted by comparing

metabolite profiles of clotrimazole-treated versus control cells (not shown). A 10-fold higher clotrimazole concentration appeared to be highly toxic to cells even after a 4 h incubation period in the presence of low (0.05 μ M) atRA concentration.

2.4.6.- Effects of atrazine, nitrates and nitrites on cell differentiation and atRA metabolism.

Selected concentrations of atrazine, nitrates and nitrites were tested for their potency to interfere in neuronal differentiation induced by 0.5 μ M atRA by measuring their ability to prevent SSEA1 downregulation and β III-tubulin upregulation (Fig. 2.7). Preliminary studies using maximal contaminant concentrations encountered in the Yamaska river drainage basin in Québec (Canada) during summer 2004 (4 μ g/L for atrazine, 3100 μ g/L for nitrates and 460 μ g/L for nitrites, unpublished data) had no effect on differentiation as assessed by SSEA1 and β III-tubulin flow cytometry analysis (not shown). This finding applies whether contaminants were used separately or combined. However, various deleterious effects of these contaminants were reported to occur at much higher concentrations. We therefore tested some of these higher concentrations. Atrazine used at concentrations up to 2000 μ g/L had no effect on cell marker expression (Fig. 2.7 A). With nitrate concentrations varying from 0 to 1460 mg/L, we observed a slight concentration-dependent increase in SSEA1 expression (up to 20%) (Fig. 2.7 B). However, nitrites used at half nitrate concentrations had a more prominent effect : SSEA1 expression reached levels found in undifferentiated cells and there was more than 40% decrease in the number of β III-tubulin-expressing cells (Fig. 2.7 C). Because loss of cell proliferation/viability could be a confounding element in interpreting cell differentiation behaviour, we measured effects of contaminants on cell culture density as an indicator of potential changes in proliferation or viability. Measurements were done in tissue culture plates after an incubation of 48 h in absence of atRA because of its known antiproliferative action. Atrazine had no effect on culture density, nitrates a light decreasing effect (10% loss at most) and nitrites a pronounced effect (in this case, up to 40% decrease). At nitrite concentration of 320 mg/L, which corresponded to a 10% loss in cell viability/proliferation, there was a 30% loss in β III-tubulin expressing cells (from 100% to 70%) and about 30% increase in SSEA1 mean level (from 35% to 65%) indicating some effects on cell differentiation. Contaminants were also tested for their effect on atRA metabolism. Analysis was done under the conditions used with clotrimazole because of

increased sensitivity (lower atRA concentration may not saturate the metabolic machinery) as well as absence of deleterious effects on cell proliferation/viability (culture densities were maintained during the 4 h exposure, not shown). Table 2.1 indicates no effect of atrazine, nitrates and nitrites on atRA catabolism.

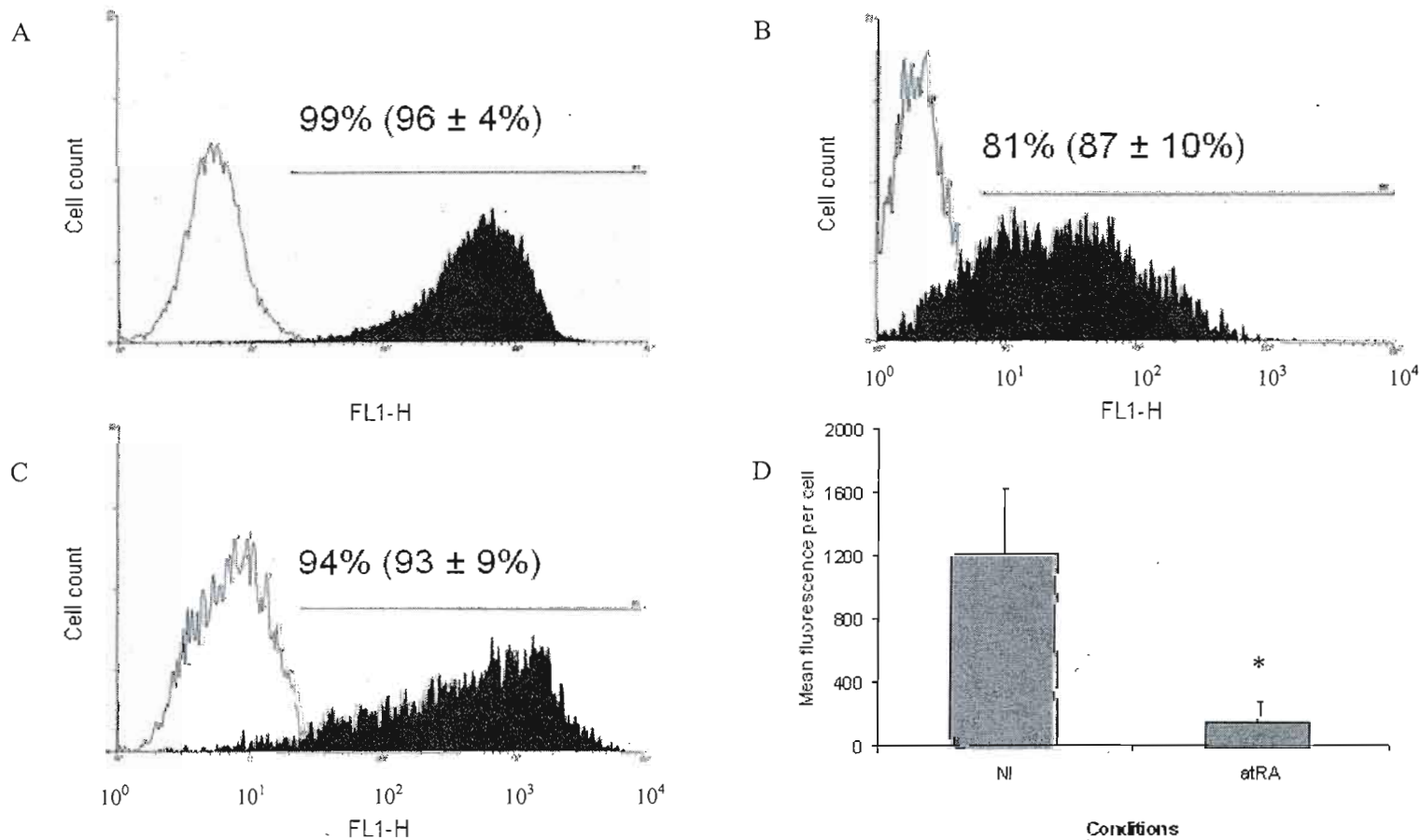


Figure 2.1. SSEA1 expression in P19 cells. Cells were cultured as aggregates for 4 days in the absence or presence of 0.5 μ M atRA and dissociated cells were analysed for SSEA1 expression by FACS. Representative histograms of P19 cells (A), atRA-induced cells (B) and NI cells (C) are shown (white peak = basal fluorescence, black peak = staining fluorescence). Numbers between parentheses represent the percentage of positive cells (mean value \pm SD) for 15 independent determinations. Mean fluorescence per cell is shown (D) and bars represent the means \pm SD of 9 independent studies. * indicates a significant difference with NI cells ($p < 0,05$).

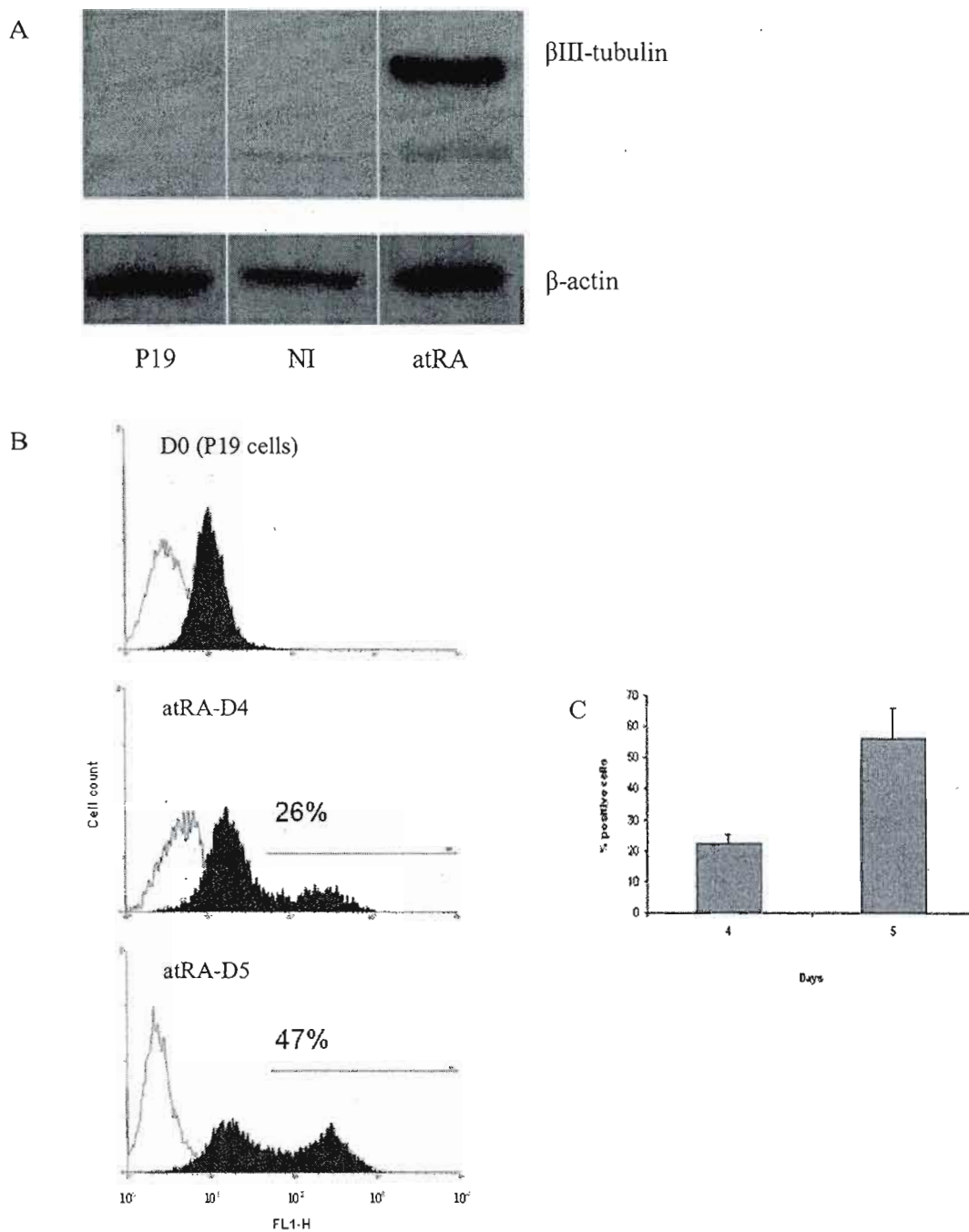


Figure 2.2. β III-tubulin expression in P19 cells. Cells were subjected to the neuronal differentiation protocol in the absence (NI) or the presence of atRA and analyzed at the indicated differentiation day. (A) Western blot of undifferentiated P19 cells and of D7 NI and atRA-induced cells. (B) FACS histograms of atRA-induced cells at days 0, 4 and 5 of differentiation. (C) Percentages of positive cells at D4 and D5 are presented as mean \pm SD for at least 4 independent experiments.

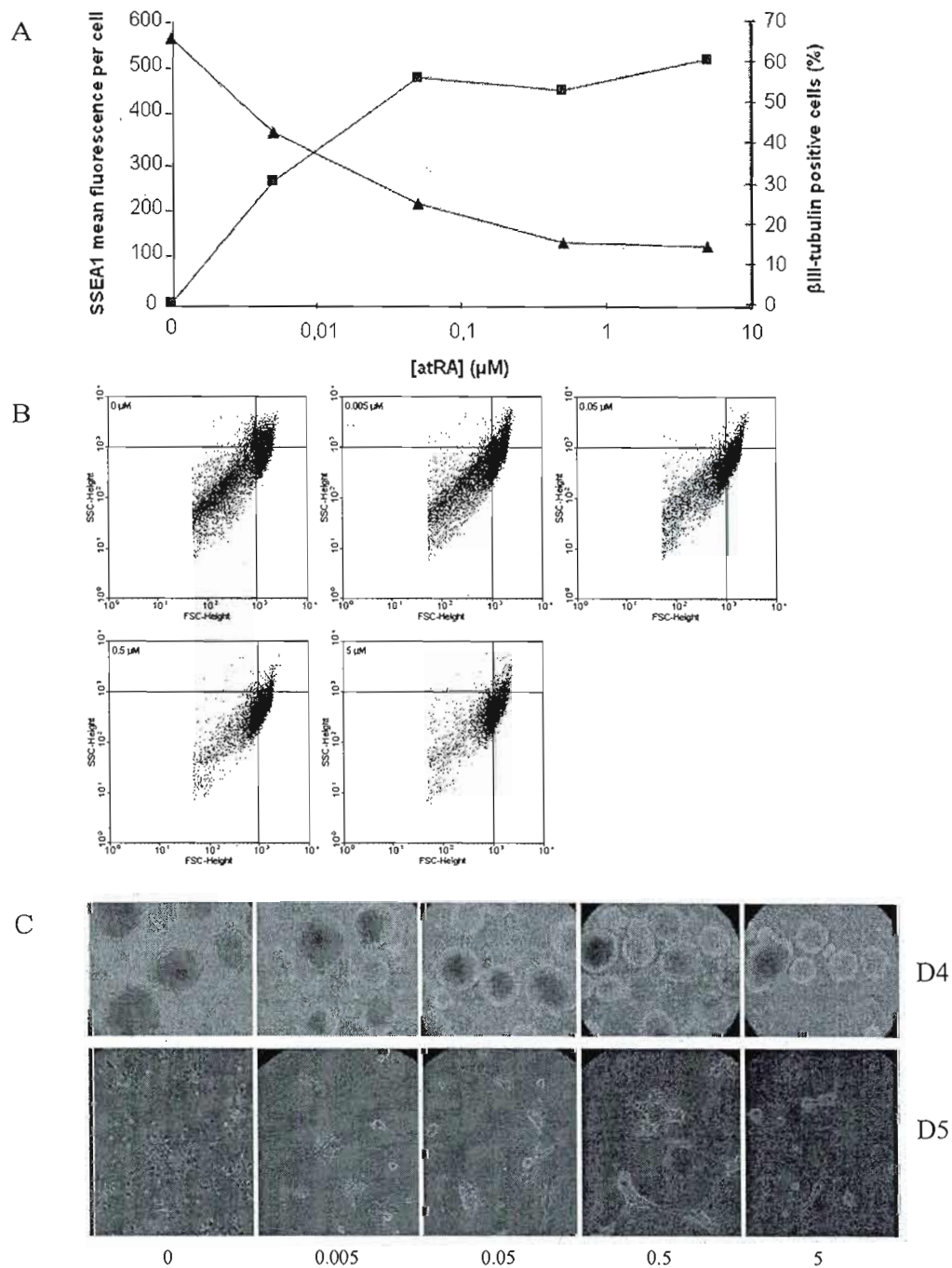


Figure 2.3. Effects of atRA concentration on marker expression and cell morphology. P19 cell aggregates were cultured for 4 days in the presence of different concentrations of atRA, dissociated and scored for SSEA1 mean expression (\blacktriangle) or plated onto tissue culture dishes to enumerate β III-tubulin positive-cells (\blacksquare) at D5 (A). Representative day 4 FSC/SSC dot plots (B), D4 aggregates and D5 cells were photographed (C, 100X-magnification).

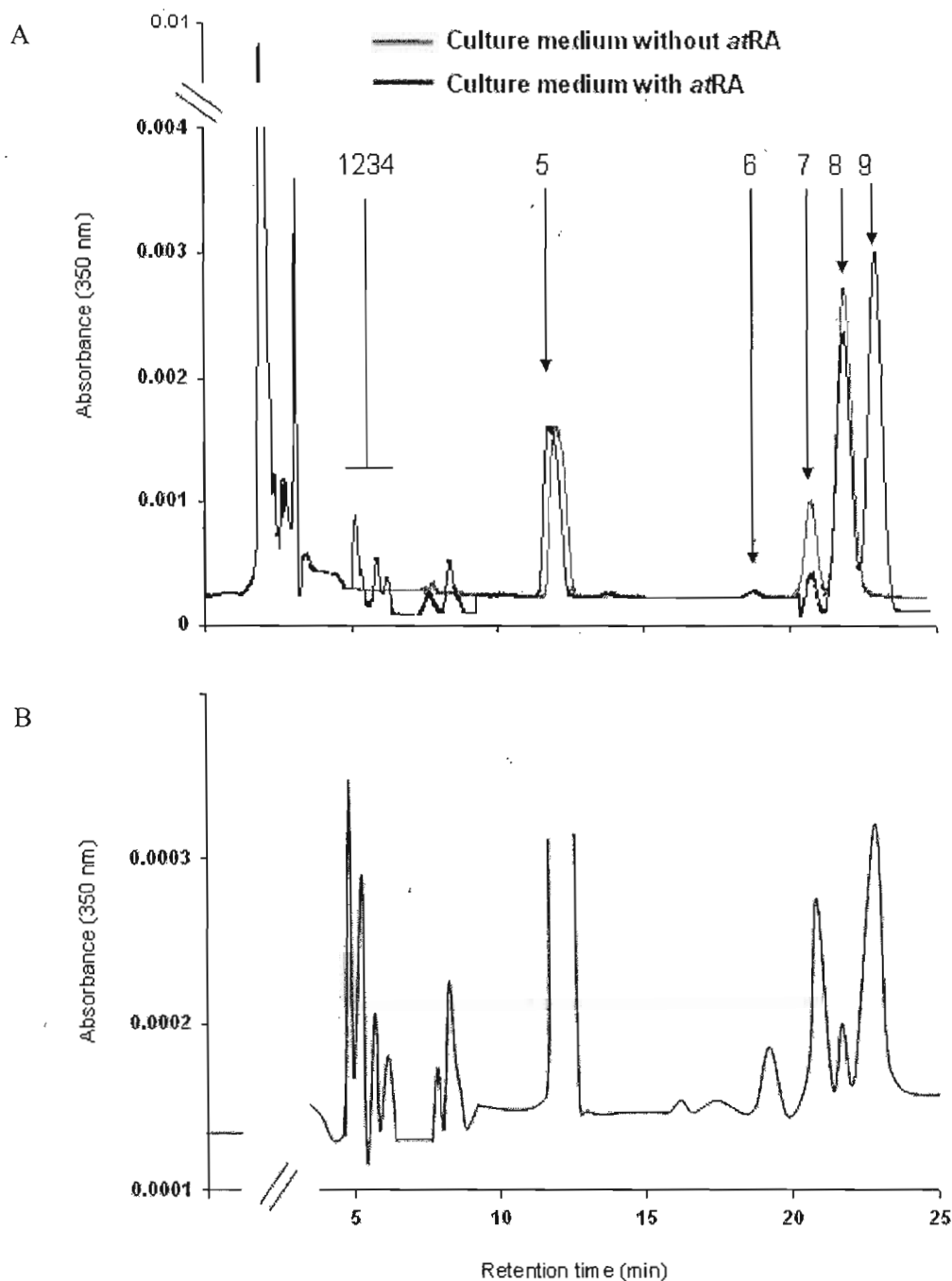


Figure 2.4. HPLC profiles of retinoids in culture medium and cells during incubation with *atRA*. P19 cells were incubated for about 24 h in the presence or absence of 0.5 μM *atRA* and retinoids were extracted from culture medium and cells for HPLC analysis. Chromatograms (A) and (B) are for culture medium and cells respectively. Numbers above peaks identify the elution position of polar metabolites (1-4; 2: *all-trans*-4-oxo-RA), BHT(5), 13-*cis*-RA (6), retinol (7), unknown (8) and *atRA* (9).

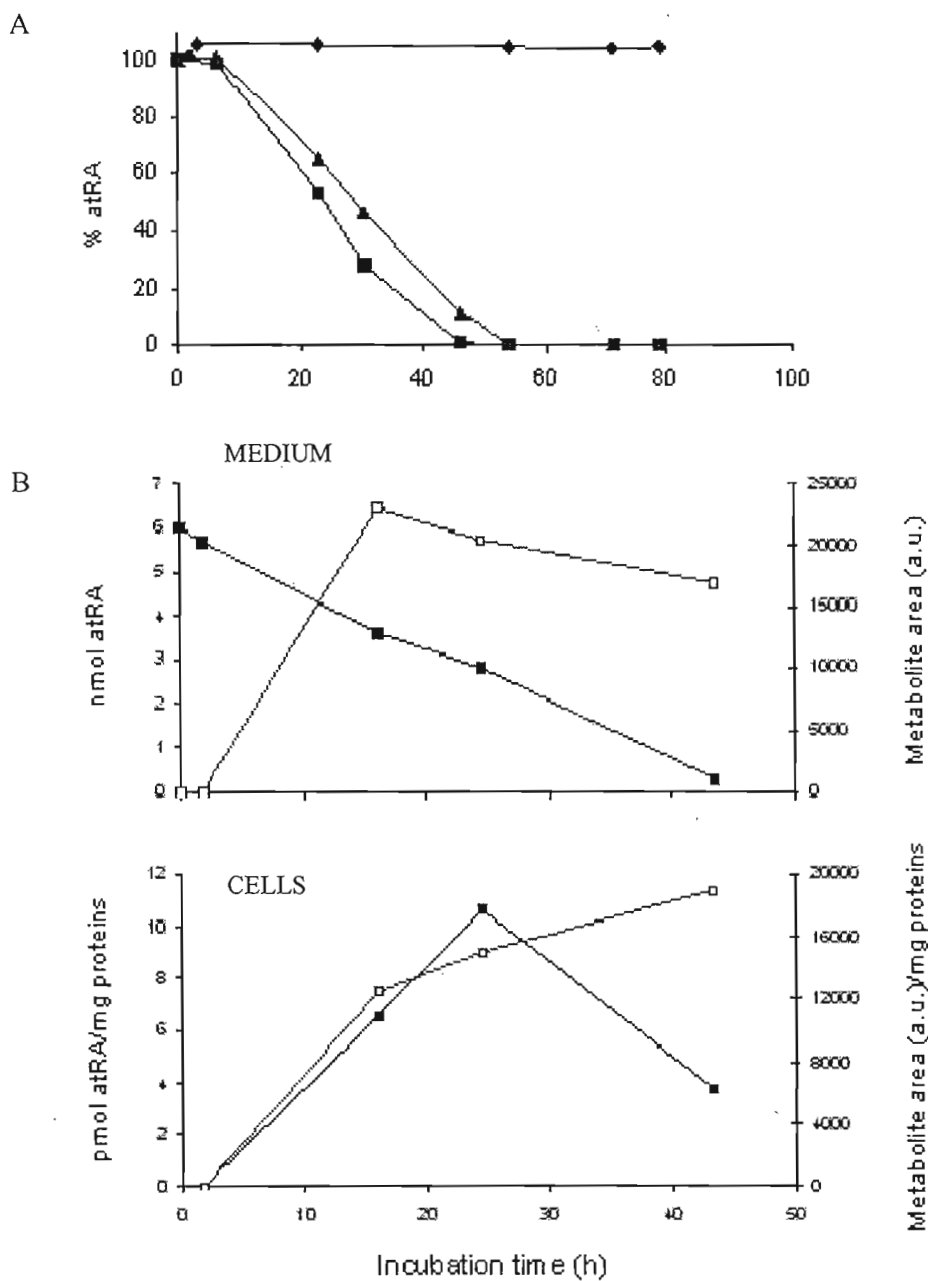


Figure 2.5. Time course profile of atRA metabolism. P19 cells were incubated in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ atRA for the indicated times and analysed for retinoids by HPLC. (A) Relative levels of atRA (%) remaining in culture medium were compared for cells grown as monolayers versus aggregates; the figure also shows the stability of atRA levels in culture medium not exposed to cells. (B) and (C) compare variations in levels of atRA and polar metabolites in culture medium and cells. atRA levels in B are reported as the total quantity in 10 ml of culture medium. ♦, atRA without cells; ▲, atRA with P19 aggregates; ■, atRA with P19 monolayers; □, polar atRA metabolites.

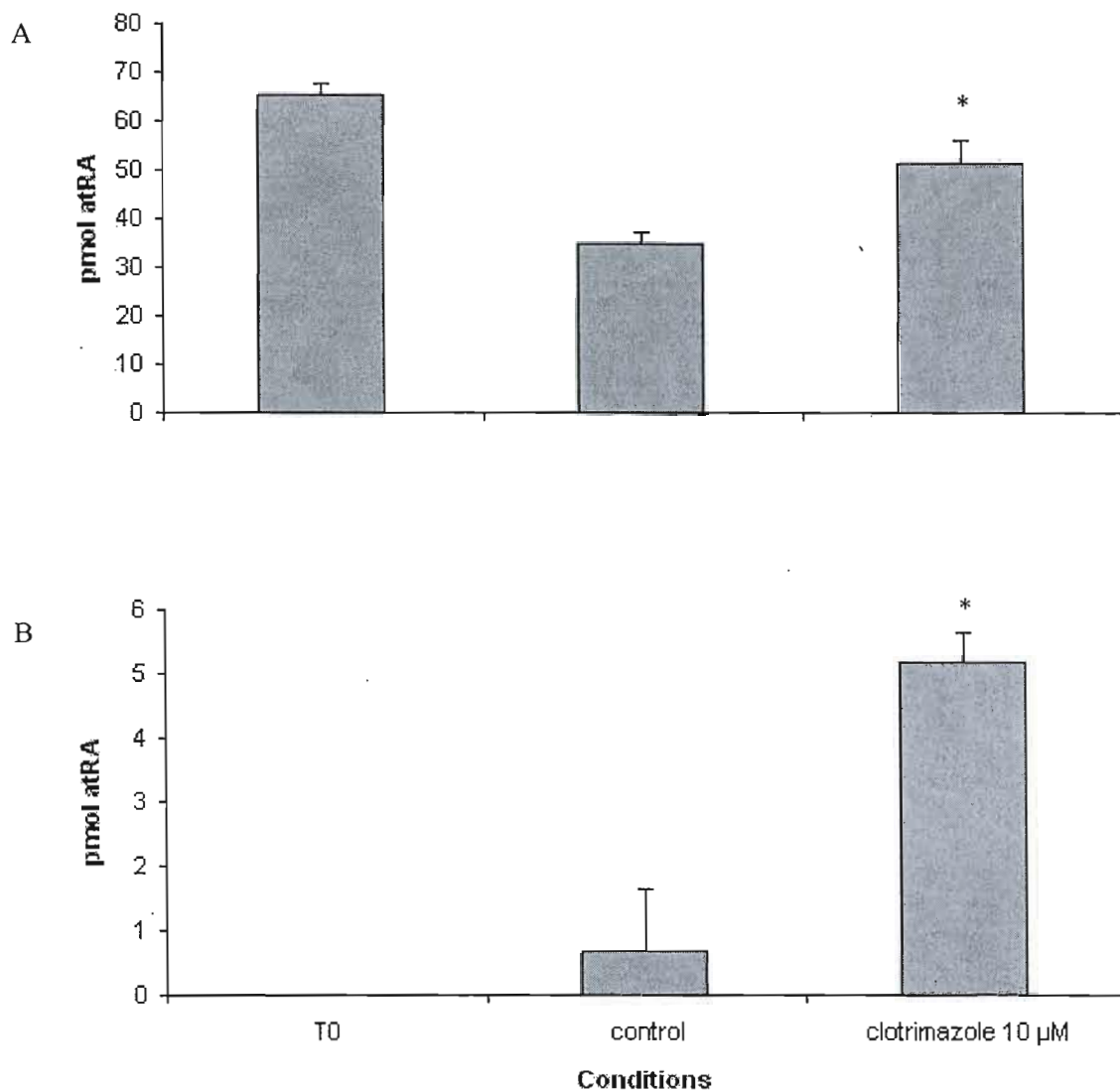


Figure 2.6. Inhibition of atRA metabolism. P19 cells were incubated as monolayers during 4 h in the presence of 0.05 μM atRA with or without 10 μM clotrimazole, and analyzed for retinoids by HPLC. Values of atRA levels found in the total quantity of medium (4 ml, panel A) and cells (B) are expressed as the mean \pm SD for three independent experiments. * indicates a significant difference with control cells ($p < 0.05$).

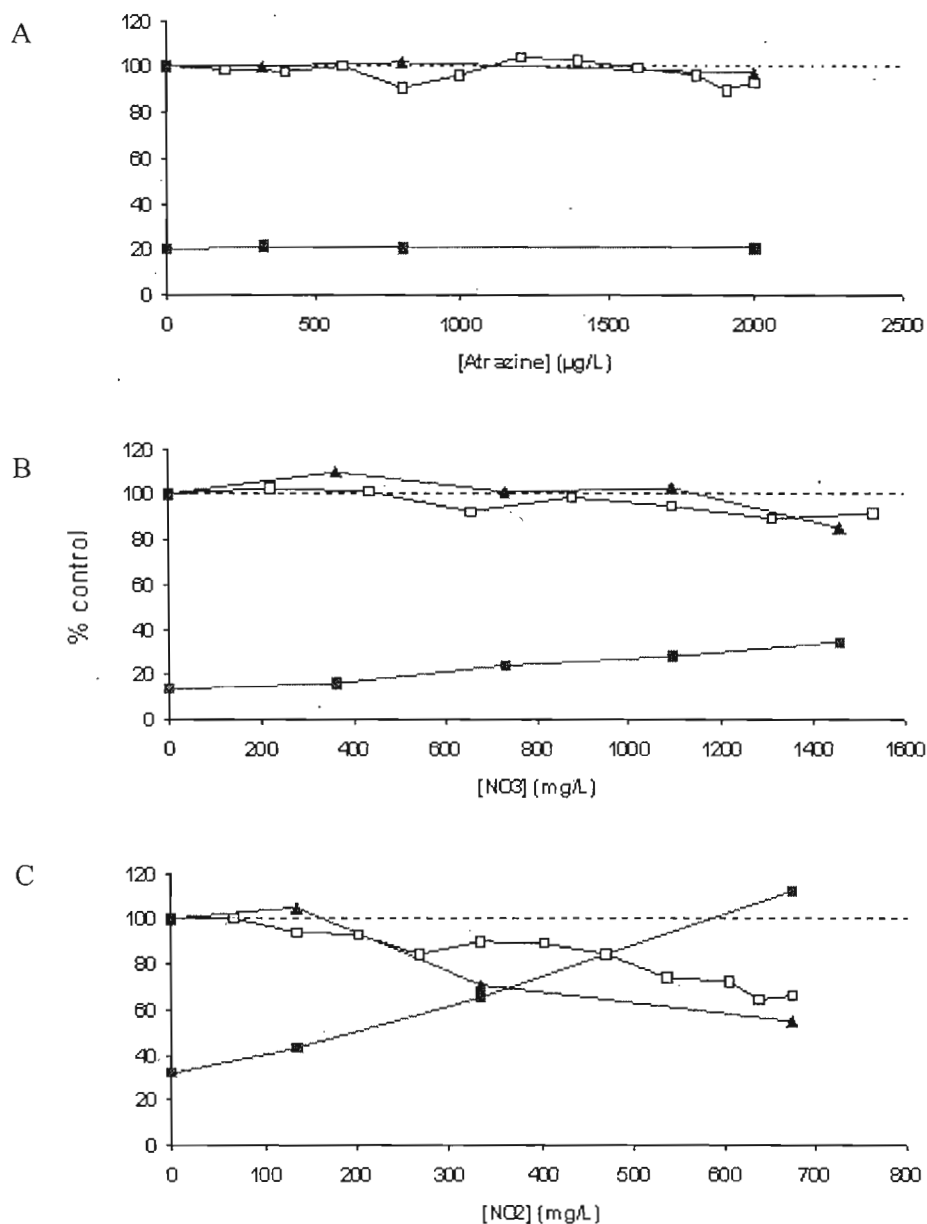


Figure 2.7. Concentration–response curves of three common water pollutants in neuronal differentiation. Effects of atrazine (A), nitrates (B) and nitrites (C) on P19 cell proliferation/viability (□) and on SSEA1 (■) and β III-tubulin expression (▲). Proliferation/viability was determined by crystal violet staining of cell monolayers incubated with contaminant over 48 h in absence of atRA. SSEA1 and β III-tubulin expression were determined by flow cytometry on day 4 of the neurodifferentiation protocol (aggregates + atRA). Expression levels are shown as percentages with the 100% value determined with NI cells for SSEA1, and atRA-induced cells for β III-tubulin.

Table 2.1. Effect of various concentrations of atrazine, nitrates and nitrites on atRA levels in P19 culture media.

Treatment		Residual atRA level (pmol)
T0		96.1 ± 3.7
None		59.0 ± 5.7
Atrazine (µg/L)	500	61.9, 61.1
	1000	59.3, 54.4
	2000	62.9, 64.5
NO ₃ (mg/L)	328	65.4, 63.9
	657	58.1, 56.7
	1314	54.2, 69.6
NO ₂ (mg/L)	167	63.2, 62.8
	335	56.5, 63.3
	670	63.0, 55.8

Cells were grown as monolayers during 4 h in the presence of 0.05 µM atRA and increasing concentrations of atrazine, nitrates and nitrites. Culture media were analysed for retinoids by HPLC. Results before incubation (T0) as well as in absence of contaminants (None) are expressed as the mean ± SD of 4 experiments. Each contaminant concentration was assayed twice and individual values are reported.

2.5.- Discussion

P19 embryonal carcinoma cells can differentiate in the presence of inducers such as RA. They can develop into derivatives of all three germ layers, indicating as neurons or cardiomyocytes (Rudnicki and McBurney, 1987). During this process, RA binds and activates specific nuclear receptors but is also metabolized by CYP450 enzymatic systems, particularly CYP26. While enzymatic degradation is known as a mechanism to decrease action of RA (Williams and Napoli, 1985), it was recently shown that CYP26 activity was essential to the formation of the neuronal cell type (Sonneveld and *al.*, 1999). By considering these findings, effectiveness of cell differentiation and RA catabolism appear as two parameters that can be used to evaluate the adverse effects of common agricultural pollutants on the vitamin A mediated processes.

One goal of our study was to develop a cell differentiation method to screen common agrochemicals as potential teratogenic compounds. We selected neuronal differentiation as a RA-dependent differentiation model because it is already well documented. This differentiation is commonly used to assess the effects of chemicals on embryonic development. In fact, the inhibition of the formation of neuritic extensions by cultured neuroblastoma and neuronal stem cells is a common indicator to identify pollutants as neurotoxicants (Chang *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2001). It was recently shown that P19 cells represent a valuable model for studying developmental toxicity by measuring GABA uptake in neurons (Seeley et Faustman, 1998). This approach is a good method to assess differentiation, but requires a prolonged outgrowth of neurons after the RA treatment in aggregates. Specific cell markers appear as valuable stable tools to quickly assess the cell phenotype. SSEA1 (stage-specific embryonic antigen-1) is a glycolipidic antigen present on the cell surface of murine ES and EC cells that disappears rapidly after a 48 hour RA treatment of P19 cells (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983; Solter and Knowles, 1978). β III-tubulin is a specific tubulin isoform from the cytoskeleton of neurons found in the brain and dorsal root ganglia and localized to neurons of the central and peripheral nervous system. Its expression increases during P19 neuronal outgrowth (Pachernik *et al.*, 2005a) but can also be upregulated in embryoïd bodies (Verani *et al.*, 2007). By considering the specificity of each

antigen, we characterized their expression by flow cytometry after treatment of P19 cells with atRA.

The atRA concentration 0.5 μM was selected as a worthwhile concentration to produce an important level of neuronal differentiation (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983). After the 4 day aggregation period, SSEA1 mean expression was drastically downregulated in atRA-induced cells compared with NI cells (Fig. 2.1), thus indicating a high specificity of this marker for the undifferentiated state. In comparison with P19 cells (Fig. 2.1 A), D4 non-induced cells present an important heterogeneity in the SSEA1 expression profile (Fig. 2.1 C). It has been reported that when P19 cells are aggregated in the absence of inducer, most of them maintain the EC form, but that a small portion can differentiate into extra-embryonic endodermal cells (Jones-Villeneuve *and al.*, 1982). Presence of a large expression profile and cells that express low SSEA1 levels can thus be explained by a spontaneous differentiation in aggregation (McBurney, 1993). Measurement of $\beta\text{III-tubulin}$ in D4 and D5 cells permitted to observe the emergence of a highly fluorescent specific peak in the atRA-treated cell population, thus indicating the usefulness of this marker for the neuronal phenotype (Fig. 2). Detection of this protein by Western blotting permitted to confirm that the population represented by the first peak of fluorescence was not enriched in neurons. Our results presented in Figure 2.3 show that yield of neuronal differentiation of P19 cells can be finely tuned to the atRA concentration used. It appears clear by comparing parallelism between SSEA1 downregulation and $\beta\text{III-tubulin}$ upregulation as the dose-dependent effects observed on FSC/SSC dot plots and morphology. By considering these findings, it seems appropriate to measure anti-RA effects with this method. This *in vitro* bioassay presents many advantages over the conventional *in vivo* method, particularly by providing more information on the cellular mechanisms involved in teratogenicity (Seeley and Faustman, 1998).

Metabolism of atRA appears as a target for some chemicals such as the unspecific CYP450 inhibitors imidazole antimycotics (Williams et Napoli, 1987) and the teratogenic organochlorine pesticides (Lemaire *et al.*, 2004). So it seems to be sensitive pathways to the presence of exogeneous substances. For the purpose of our study, first we describe the metabolism of atRA in P19 cells. Some retinoids were identified after incubation of cells in

the presence of atRA (Fig. 2.4). Retinol is present in the medium of untreated cells and seems to be the only retinoid present in the fetal bovine serum (FBS) used for the maintenance of continuous culture of P19 cells. After incubation of cells with atRA, polar metabolites can easily be identified and no gross differences were noted between culture medium and cellular profiles. The major metabolite produced (peak 1, Fig. 2.4) during incubation was not identified, but it could be a hydroxylated form of atRA, more polar than the 4-oxo form and synthesized sooner in the metabolic sequence (Sonneveld *et al.*, 1999). Previous studies showed that 4-oxo-RA like RA itself can bind and activate RAR and RXR nuclear receptors. It also appears as being a highly active metabolite which can modulate positional specification in early amphibian embryos (Pijnappel *et al.*, 1993). Moreover 4-hydroxy-, 4-oxo- and 5,6-epoxy-RA metabolites can mimic RA effects by inducing cell differentiation and inhibition of proliferation (Ramp *et al.*, 1994). In contrast, 4-hydroxylation of RA is known as an inactivation pathway for growth and differentiation (Williams *et al.*, 1987). So the link between RA metabolism and differentiation rate remains to be clarified. atRA metabolism by P19 cells was also characterized (Fig. 2.5). Neuronal differentiation requires aggregation of cells in suspension and for this reason, metabolism of these cells was compared to a simple treatment on monolayer. Visually, metabolic rates are practically similar, even if aggregated cells seem to metabolise atRA at a slight slowly rate. Metabolism measured after treatment on monolayer seems to be representative of that measured with cells in aggregation. While atRA is constantly consumed in the culture medium, it appears to be gradually accumulating in cells and stocks are rapidly metabolised. Polar metabolites accumulate in cells, but are rapidly excreted out of the cell. To test the sensitivity of atRA metabolism to the presence of exogenous substances, an atRA metabolism assay based on an established method (Williams and Napoli, 1987) was used. To validate our assay, we tested clotrimazole, an imidazole antimycotic known to inhibit cytochrome P450-system and the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel (Wallerstedt and Bodésson, 1997). Its ability to block RA metabolism in carcinoma cell lines is already known (Williams and Napoli, 1987, Garrabrant and End, 1995) but it is known to be a weak inhibitor in comparison to strong inhibitors such as liarozole or ketoconazole. Addition of 10 μM clotrimazole during the atRA incubation partially inhibited atRA metabolism in our P19 cell cultures. Clotrimazole is not known as a teratogenic compound (Czeizel *et al.*, 1999), probably

because it is a weak inhibitor. However, ketoconazole was shown to promote dysmorphogenic effects on rat embryos cultured *in vitro* (Menegola *et al.*, 2006).

Since 2002, studies are conducted on frogs from the Yamaska River basin (Québec, Canada) in subwatersheds related to a gradient of agricultural activity intensity. It was suggested that agricultural practices can affect retinoid homeostasis and body weight in male bullfrogs *Rana catesbeiana* (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005). In this regard and according to the discovery of numerous deformed frogs in the last years over the world near of the agricultural fields, we wanted to test the potency of common water pollutants to disrupt P19 cell differentiation and maintenance of atRA levels. So, we selected atrazine, nitrates and nitrites as the three most common pollutants found in the Yamaska River. During summer 2004, the maximal concentrations measured for these pollutants were 4 µg/L, 3.1 mg/L and 0.46 mg/L respectively (unpublished data). Preliminary tests were done with these realistic contaminant concentrations but no effects were observed. In this regard, we decided to test higher concentrations based on studies showing adverse effects on growth and development in many *in vivo* experiments (see introduction) and by considering the fact that atrazine and NOx concentrations are usually found at µg/L and mg/L levels respectively in the environment. Day 4 was selected as the culture time to score the cell phenotype because it is the sooner time where we can observe a considerable effect on the selected cell markers. Tested concentrations of atrazine up to 2000 µg/L had no effects on markers and on cell proliferation. In the presence of nitrate concentrations up to 1460 mg/L, we observed a slight increase in the SSEA1 expression and only a very slight decrease in cell proliferation. However, in the presence of increasing concentrations of nitrites up to 670 mg/L, we measured an important decrease in the number of βIII-tubulin positive cells, a really important SSEA1 expression increase and a drastic decrease in cell proliferation. These last results suggest that concentrations of nitrites affect cell differentiation. Poor is known about the teratogenicity of nitrites. Previous *in vivo* studies conducted with the highest concentration tested did not permit to promote teratogenic or mutagenic effects on mouse fetuses (Shimada, 1989). However, recent studies showed that sublethal mg/L concentrations can affect metamorphosis and development of amphibians and crustaceans (Griffis-Kyle, 2007; Marco and Blaustein, 1999; Mallasen and Cotroni Valenti, 2006). It was previously

shown that many pollutants such as alkylating agents (Seeley and Faustman, 1998) and endosulfan (Kang *et al.*, 2001) can affect *in vitro* differentiation by affecting growth rate. So the effects observed with nitrites are probably unspecific and can be simply caused by their strong oxidizing activity. Poor is known about the developmental toxicity of the contaminants we tested. So, we also tested their potency to affect the rate of atRA metabolism, but no effects were observed (Table I). The enzymatic system involved in the metabolism of atRA does not seem to be a target for these contaminants at these selected concentrations.

In this study we showed that SSEA1 and β III-tubulin are two easily quantifiable cell markers and that they are valuable tools to assess the neuronal differentiation of P19 cells. Differentiation and metabolism of atRA are two mediated processes, so it suggests their utility for the identity of potential teratogenic molecules. We failed to observe any effects on differentiation in the absence of cytotoxicity and on the metabolism of atRA, but these two approaches appear to be complementary methods for the evaluation of compounds as developmental toxicants.

2.6.- Acknowledgements

This work was supported by grants from NSERC. MSc scholarships were awarded to M. Solari by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), the Centre de recherche en toxicologie de l'environnement de l'UQAM (TOXEN) and the Université du Québec à Montréal. We would like to thank Denis Flipo for his assistance during FACS analysis and for his generous advices. We also want to thank Philippe Ducharme for his technical help during Western blotting analysis. We acknowledge the contribution of Marie-Claude Locas, Steve Poirier and Frédéric Bouchard who, as undergraduate students, performed some preliminary experiments related to this project.

2.7.- References

- Allran, J.W., Karasov, W.H. 2001. Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(4):769-775.
- Baker, J.M.R., Waights, V. 1994. The effects of nitrate on tadpoles of the tree frog (*Litoria caerulea*). *Herpetological Journal* 4:106-108.
- Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A. 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic Toxicology* 71(2):109-20.
- Boily, M.H., Ndayibagira, A., Spear, P.A. 2003. Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the yolk-sac membrane of Japanese quail eggs and effects of mono-ortho-PCBs. *Comparative biochemistry and physiology, Toxicology and pharmacology* 134(1):11-23.
- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N. 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5):1099-106.
- Byers, S., Pishvaian, M., Crockett, C., Peer, C., Tozeren, A., Sporn, M., Anzano, M., Lechleider, R. 1996. Retinoids increase cell-cell adhesion strength, beta-catenin protein stability, and localization to the cell membrane in a breast cancer cell line: a role for serine kinase activity. *Endocrinology* 137:3265-3273.
- Cadet, N., Paquin, J. 2000. Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons. *Developmental Brain Research* 120:211-221.
- Chang, P.-A., Wu, Y.-J., Li, W., Leng, X.-F. 2006. Effect of carbamate esters on neurite outgrowth in differentiating human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Chemico-Biological Interactions* 159:65-72.
- Clairmont, A., Tessmann, D., Sies, H. 1996. Analysis of connexin43 gene expression induced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *FEBS Letters* 397(1):22-24(3).
- Crump, D. 2001. The effects of UV-B radiation and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) on the biology of amphibians. *Environ Rev./Dossiers Environ.* 9(2):61-80.
- Czeizel, A.E., Toth, M., Rockenbauer, M. 1999. No teratogenic effect after clotrimazole therapy during pregnancy. *Epidemiology* 10(4):437-40.
- David, M.B., Gentry, L.E., Starks, K.M., Cooke, R.A. 2003. Stream transport of herbicides and metabolites in a tile-drained, agricultural watershed. *Journal of Environmental Quality* 32(5):1790-801.

- Degitz, S.J., Durhan, E.J., Tietge, J.E., Kosian, P.A., Holcombe, G.W., Ankley, G.T. 2003. Developmental toxicity of methoprene and several degradation products in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 64(1):97-105.
- Diana, S.G., Resetarits, W.J., Schaeffer, D.J., Kimberlee, B.B., Beasley, V.R. 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2961-2967.
- Edwards, T.M., McCoy, K.A., Barbeau, T., McCoy, M.W., Thro, J.M., Guillette, L.J. Jr. 2006. Environmental context determines nitrate toxicity in Southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles. *Aquatic Toxicology* 78(1):50-8.
- Gardiner, D., Ndayibagira, A., Grün, F., Blumberg, B. 2003. Deformed frogs and environmental retinoids. *Pure and Applied Chemistry* 75(11-12):2263-2273.
- Garrabrant, TA, End, DW. 1995. A Rapid Assay for Measuring the Metabolism of [³H]-Retinoic Acid in Cell Cultures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 34:219-223.
- Griffis-Kyle, K. 2007. Sublethal Effects of Nitrite on Eastern Tiger Salamander (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) and Wood Frog (*Rana sylvatica*) Embryos and Larvae: Implications for Field Populations. *Aquatic Ecology* 41(1):119-127(9).
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:5476-5480.
- Jones-Villeneuve, E.M., McBurney M.W., Rogers K.A., Kalnins, V.I. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of Cell Biology* 94:253-262.
- Jones-Villeneuve, E.M.V., Rudnicki, M.A., Harris, J.F., McBurney, M.W. 1983. Retinoic Acid-Induced Neural Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biology* 3(12):2271-2279.
- Kang, K.-S., Park, J.-E., Ryu, D.-Y., Lee, Y.-S. 2001. Effects and Neuro-toxic Mechanisms of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-Hexachlorobiphenyl and Endosulfan in Neuronal Stem Cells. *Journal of Veterinary Medical Science* 63(11):1183-1190.
- Koso, H., Ouchi, Y., Tabata, Y., Aoki, Y., Satoh, S., Arai, K., Watanabe, S. 2006. SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signalling pathway. *Developmental Biology* 292:265-276.

- Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., Rahmani, R. 2004. Activation of retinoic acid receptor-dependant transcription by organochlorine pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202:38-49.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Macias, G., Marco, A. Blaustein, A.R. 2007. Combined exposure to ambient UVB radiation and nitrite negatively affects survival of amphibian early life stages. *Science of the Total Environment* 385(1-3):55-65.
- Mallasen, M., Cotroni Valenti, W. 2006. Effect of nitrite on larval development of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 261(4):1292-1298.
- Marco, A., Blaustein, A.R. 1999. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in Cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(5):946-949.
- McBurney, M.W. 1993. P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Biology* 37:135-140.
- McKenzie, R.M., Hellwege, D.M., McGregor, M.L., Nelson, E.C. 1979. Oxidation and isomerisation of retinoic acid by iodine and light: a novel preparation of all-trans- and 13-cis-4-oxoretinoic acid. *Lipid* 14:714-717.
- Menegola, E., Broccia, M.L., Di Renzo, F., Giavini, E. 2006. Dymophogenic effects of some fungicides derived from the imidazole on rat embryos cultured *in vitro*. *Reproductive Toxicology* 21(1):74-82.
- Napoli, J. L., Boerman, M. H. E. M., Chai, X., Zhai, Y., and Fiorella, P. D. (1995). Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53:497-502.
- Omicinski, C.J., Rimmel, R.P., Hosagrahara, V.P. 1999. Concise Review of the Cytochrome P450s and their Roles in Toxicology. *Toxicological Sciences* 48:151-156.
- Ortiz, M.E., Marco, A., Saiz, N., Lizana, M. 2004. Impact of ammonium nitrate on growth and survival of six European amphibians. *Archives of environmental contamination and toxicology* 47(2):234-9.
- Orton, F., Carr, J.A., Handy, R.D. 2006. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1):65-71.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Lair, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33(1):95-104.

- Pachernik, J., Bryja, V., Esner, M., Kubala, L., Dvorak, P., Hampl, A. 2005a. Neural differentiation of Pluripotent Mouse Embryonal Carcinoma Cells By Retinoic Acid : Inhibitory Effect of Serum. *Physiological Research* 54:115-122.
- Pachernik, J., Bryja, V., Esner, M., Hampl, A., Dvorak, P. 2005b. Retinoic Acid-Induced Neural Differentiation of P19 Embryonal Carcinoma Cells is Potentiated by Leukemia Inhibitory Factor. *Physiological Research* 54:257-262.
- Pijnappel, W.W.M., Hendriks, H.F., J., Folkers, G.E., van den Brink, C.E., Dekker, E.J., Edelenbosch, C., van der Saag, P.T., Durston, A.J. 1993. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* 366:340-344.
- Ramp, U., Gerharz, C.D., Eifler, E., Bielsalski, H.K., Gabbert, H.E. 1994. Effects of retinoic acid metabolites on proliferation and differentiation of the clonal rhabdomyosarcoma cell line BA-HAN-1C. *Biology of the cell* 81, 31-37.
- Ray, W. J., Bain, G., Yao, M., and Gottlieb, D.I. 1997. CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *Journal of Biological Chemistry* 272:18702-18708.
- Rudnicki, M.A., McBurney, M.W. 1987. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: Roberston, E.J. (Ed.), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 19-49.
- Seeley, M.R., Faustman, E.M. 1998. Evaluation of P19 cells for studying mechanisms of developmental toxicity: applications to four direct-acting alkylating agents. *Toxicology* 127:49-58.
- Shimada, T. 1989. Lack of teratogenic and mutagenic effects of nitrite on mouse fetuses. *Archives of Environmental Health* 44(1):59-63.
- Smith, S.C., Reuhl, K.R., Craig, J., McBurney, M.W. 1987. The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 131(1):74-84.
- Smith, G.R., Vaala, D.A., Dingfelder, H.A., Temple, K.G. 2004. Effects of nitrite on bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles from central Ohio, USA. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 72(5):1012-6.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, D.R., Klaine, S.J., LaPoint, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, R.J., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W., Williams, W.M. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:31-74.

- Solter, D., Knowles, B.B. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75(11):5565-5569.
- Sonneveld, E., van den Brink, C.E., Tertoolen, L.G.J., van der Burg, B., van der Saag, P.T. 1999. Retinoic Acid Hydroxylase (CYP26) Is a Key Enzyme in Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Developmental Biology* 213:390-404.
- Sullivan, K.B., Spence, K.M. 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(3):627-635.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. 2002a. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:527-531.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. 2002a. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:1264-1267.
- Verani, R., Cappuccio, I., Spinsanti, P., Gradini, R., Caruso, A., Magnotti, M.C., Motolese, M., Nicoletti, F., Melchiorri, D. 2007. Expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid. *Journal of Neurochemistry* 100:242-250.
- Wallerstedt, S.M., Bodelsson, M. 1997. Endothelium-dependant relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *British Journal of Pharmacology* 120: 25-30.
- Williams, JB, Napoli, JL. 1985. Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:4658-4662.
- Williams, JB, Napoli, JL. 1987. Inhibition of retinoic acid metabolism by imidazole antimycotics in F9 embryonal carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 36(8):1386-1388.
- Yao, M., Bain, G., Gottlieb, D.I. 1995. Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in defined media. *Journal of Neuroscience Research* 41:792-804.
- Zablotowicz, RM, Locke, MA, Krutz, LJ, Lerch, RN, Lizotte, RE, Knight, SS, Gordon, RE, Steinriede, RW. 2006. Influence of watershed system management on herbicide concentrations in Mississippi Delta oxbow lakes. *Science of the Total Environment* 370(2-3):552-60.
- Zile, M.H. 1992. Vitamin A homeostasis endangered by environmental pollutants. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 201(2):141-153.

Zile, M.H. 1998. Symposium: Functional Metabolism of Vitamin A in Embryonic Development. *Journal of Nutrition* 128:455S-458S.

Zile, M.H. 2001. Function of Vitamin A in Vertebrate Embryonic Development. *Journal of Nutrition* 131:705-708.

CHAPITRE III

LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE ET LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE : EFFETS DU CARBARYL ET DE L'ENDOSULFANE

3.1.- Mise en contexte

Ce chapitre fait état des résultats obtenus avec deux pesticides moins répandus dans l'environnement, mais ayant des effets connus sur le métabolisme d'atRA ou la différenciation cellulaire. Le carbaryl est un ester de carbamate reconnu pour ses effets neurotoxiques. Toutefois, les mécanismes cellulaires impliqués dans les désordres et changements neurologiques qu'il produit ne sont pas tous connus. Il a provoqué des changements dans la morphologie cellulaire de neurones cultivés *in vitro* à partir de cellules SK-N-SH différenciées en présence de RA. Ces changements se caractérisent notamment par une sous-croissance des neurites observés dans les cultures (Chang *et al.*, 2006). L'endosulfane est un insecticide organochloré encore utilisé pour contrôler les populations d'insectes dans les cultures de légumes, de coton et de fruits. Il est neurotoxique et il affecte la différenciation cellulaire (Kang *et al.*, 2001). C'est également un pesticide tératogène capable d'activer les récepteurs RAR β et γ et le catabolisme de RA (Lemaire *et al.*, 2004).

L'objectif de cette étude préliminaire était de vérifier le potentiel de ces deux pesticides à induire la différenciation ou leur capacité à affecter la neurodifférenciation et le catabolisme de RA. L'utilisation de molécules toxiques pour le développement est essentielle pour évaluer la capacité du bioessai à mesurer l'effet de xénobiotiques sur les mécanismes modulés par RA. La présence d'effets sur la différenciation et le métabolisme pourrait renseigner sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité développementale de ces deux pesticides. Aucun des deux contaminants n'a induit la différenciation, mais à une concentration cytotoxique, ils affectent la différenciation neuronale. Toutefois, ils n'affectent pas le catabolisme d'atRA.

3.2.- Matériel et méthodes

3.2.1.- *Différenciation neuronale et quantification de la différenciation.* La culture des cellules P19 et la différenciation neuronale en agrégats en présence d'atRA est similaire à ce qui est décrit dans le chapitre II. La différenciation neuronale des cellules P19 en monocouche est effectuée selon de légères modifications de la procédure établie par Pachernik *et al.*, (2005). Les cellules sont d'abordensemencées à une densité de 5×10^3 cellules/cm² sur pétri tissulaire traité à la poly-L-lysine durant 24 h dans un milieu de culture α -MEM complet. Au jour 1, le milieu est retiré et remplacé par un milieu DMEM:F12 1:1 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham's [1X] + 2,50 mM L-glutamine + 15 mM HEPES Buffer, HyClone) + ITS ($6,25 \times 10^{-3}$ mg/ml insuline, $6,25 \times 10^{-3}$ mg/ml transferrine, $6,25 \times 10^{-6}$ mg/ml sodium selenite) en présence de 0,5 μ M atRA. Au jour 3, le milieu est renouvelé, mais sans ajout de atRA. Le milieu est ensuite renouvelé chaque 2 jours. Les mesures de SSEA1 et β III-tubuline ont été effectuées par FACS ou par buvardage Western tel que décrit dans le chapitre II.

3.2.2.- *Traitement des cellules pour l'analyse du métabolisme d'atRA.* Les effets des contaminants sur la métabolisation d'atRA ont été mesurés de la même façon que celle décrite dans la chapitre II. Pour mesurer la capacité des pesticides à suractiver le métabolisme d'atRA, les cellules ont été préincubées durant 16 h en présence de l'inducteur ou du pesticide, puis incubées durant 4 h en présence de 0,05 μ M atRA. Les rétinoïdes ont été extraits et analysés par HPLC.

3.2.3.- *Analyse statistique.* Certains résultats sont rapportés sous la forme moyenne \pm écart-type (SD). Les traitements ont été comparés avec le test de Student non pairé à l'aide du logiciel Microsoft® Excel 2002.

3.3.- Résultats et discussion

Le carbaryl et l'endosulfane ont chacun des effets adverses connus sur le développement, le premier étant neurotoxique (Dickoff *et al.*, 1987) et le second étant neurotoxique, mais également tératogène (Gupta *et al.*, 1978). Comme l'embryogénèse est un processus médié par la vitamine A et les rétinoïdes, il était donc jugé possible que ces deux pesticides puissent affecter les effets médiés par RA, voire même mimer ses effets. L'objectif de la présente série d'expérimentations était ainsi d'évaluer dans quelle mesure ces molécules, pouvant causer une toxicité embryonnaire, peuvent interférer dans la neurodifférenciation et le métabolisme d'atRA en utilisant les cellules P19 de carcinome embryonnaire de souris comme modèle d'étude.

Les deux pesticides ont d'abord été testés avec le protocole de neurodifférenciation conventionnel en agrégats (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983) en absence d'atRA pour tester leur potentiel à induire une différenciation cellulaire (Fig. 3.1). SSEA1 a été sélectionné comme marqueur, car il disparaît au cours de la différenciation et parce qu'il n'est pas spécifique à l'apparition d'un phénotype cellulaire particulier. atRA et TTNPB ont été utilisés comme contrôles dans cette expérience pour mesurer la diminution de l'expression de SSEA1 lors de la neurodifférenciation (Fig. 3.1 A). Le carbaryl et l'endosulfane (Fig. 3.1 B et 3.1 C) ont été testés à une concentration de 25 μM , soit à un taux 50 fois plus élevé que la concentration de atRA couramment utilisée pour la neurodifférenciation. Le TTNPB a montré une diminution de SSEA1 pratiquement similaire à celle d'atRA pour une même concentration de 0,5 μM . Ce résultat n'est pas surprenant considérant qu'il lie et active les récepteurs RAR α , β et γ à un taux pratiquement similaire à celui de RA (Pignatello *et al.*, 1997, Pignatello *et al.*, 1999). Il est d'ailleurs couramment utilisé comme contrôle positif en tant qu'activateur des RAR et du système enzymatique CYP450 responsable de la métabolisation de RA (Lemaire *et al.*, 2004). L'ajout de TTNPB en même temps que celui d'atRA a induit une diminution de SSEA1 similaire à celle obtenue avec chacun des deux inducteurs testés séparément et des neurones ont été obtenus avec chacun des 3 traitements (non montré). Les pesticides ont été testés à des concentrations initiales de 0,5 à 1 μM , mais aucun effet n'a été observé. Supposant une faible activité rétinoïdienne potentielle, les concentrations ont donc été

fortement augmentées en se basant sur les valeurs maximales de l'ordre de 30 – 50 μM suggérées dans la littérature (Chang *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2004). Une concentration de 25 μM a été sélectionnée malgré l'obtention d'un nombre réduit de cellules par rapport au contrôle. En testant une concentration induisant un début de cytotoxicité, on s'assure de tester la substance aux limites maximales de son intervalle de concentrations utilisables. Toutefois, dans chacun des cas, aucune diminution de l'expression du marqueur SSEA1 n'a été observée. Il a récemment été montré que l'endosulfane était un agoniste des récepteurs RAR β et γ . Toutefois, il s'agissait d'une faible activation, atteignant des maximas approximatifs de 35% pour RAR β et 45% pour RAR γ à une concentration de 30 μM , comparativement à une réponse de 100% en présence de 10 nM TTNPB. Cette concentration de 30 μM était également considérée comme un seuil acceptable de cytotoxicité avec un taux de viabilité cellulaire d'environ 70% (Lemaire *et al.*, 2004). Il est possible dans ce cas que l'activation des récepteurs ne soit pas suffisante pour induire la différenciation. Une autre possibilité est que l'incapacité du pesticide à lier et activer RAR α soit un obstacle à la formation des dimères adéquats lors de la transduction des signaux cellulaires.

Il a été montré par Chang *et al.* (2006) que le carbaryl à une concentration de 50 μM diminue *in vitro* la longueur des neurites des cellules de neuroblastome humain SK-N-SH différenciées en présence de 20 μM RA. À partir de ces observations, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure le carbaryl pouvait affecter la morphologie des neurones P19 déjà formés. Les cellules en cours de différenciation avec 0,5 μM atRA avec le protocole de différenciation neuronale conventionnel ont été traitées avec des concentrations de 25 ou 50 μM de carbaryl durant la période d'agrégation de 4 jours. Les cellules ont ensuite été dissociées et transférées sur pétri tissulaire en absence de atRA et du carbaryl (Fig. 3.2). Au jour 5, on observe déjà des neurones typiques en absence de carbaryl. Avec 25 et 50 μM de carbaryl, on observe toutefois une forte diminution de la densité cellulaire, ce qui confirme la présence d'effets cytotoxiques. À ces concentrations, on observe tout de même la présence de petits neurites et ceux-ci continuent de se développer graduellement aux jours 6 et 8. Bien qu'on semble observer un possible ralentissement du développement neuronal, la neuritogénèse ne semble pas être contrée. La présence d'effets cytotoxiques apparaît comme un facteur déterminant dans les effets observés. Ce résultat suggère qu'un fort effet

antiprolifératif ou anti-viabilité provoqué par un contaminant n'empêche pas les cellules de se différencier en présence de atRA.

Comme il n'a pas été possible de mesurer des effets pro- ou anti-RA avec la méthode conventionnelle de différenciation avec ces deux contaminants, nous avons voulu tester leurs effets avec une seconde procédure de différenciation neuronale (Fig. 3.3). L'objectif était la mise au point d'une méthode permettant une exposition plus courte et plus homogène aux contaminants, que la différenciation classique en agrégats. Ce protocole se déroule entièrement sur monocouche et en absence de sérum. Les cellules au jour 7 ont été analysées pour β III-tubuline par buvardage Western (Fig. 3.3 A). Contrairement à ce qui était observé avec la neurodifférenciation classique en agrégats, on observe que la β III-tubuline se retrouve dans les cellules traitées avec atRA, mais aussi dans les cellules NI. En fait, il a précédemment été montré que la présence de sérum est essentielle au maintien des cellules de type EC dans l'état indifférencié (Darmon *et al.*, 1981). Il y a donc une neurodifférenciation spontanée des cellules et l'ajout d'atRA ajoute à cet effet (Pachernik *et al.*, 2005). On remarque la quasi-absence d'actine dans les cellules NI en jour 7. Il est à noter que dans le cas de ces cellules, l'homogénat cellulaire préparé contenait des cellules mortes décollées du tapis cellulaire dû à une trop forte confluence. Il est possible dans ce cas que la mort des cellules ait provoqué un clivage de l'actine du cytosquelette (White *et al.*, 2001). Les histogrammes de FACS pour SSEA1 et β III-tubuline sont représentatifs des cellules non-induites et traitées avec 0,5 μ M RA récoltées au jour 6 du protocole de neurodifférenciation (Fig. 3.3 B). Si l'on compare à l'histogramme SSEA1 des cellules P19 indifférenciées en jour 0 tel que montré dans le chapitre II, on remarque bien que l'absence de sérum induit une diminution marquée de l'expression de SSEA1, bien que cette diminution soit plus importante en présence de atRA. Tel que montré sur le buvardage Western, on observe également l'émergence d'un second pic de fluorescence pour l'analyse de la β III-tubuline par FACS avec les cellules traitées avec atRA, mais aussi avec les cellules NI. Ce protocole permet de générer plus de 40% de neurones comparativement à environ 8% en absence d'inducteur (Fig. 3.3 C).

Ayant préalablement montré leur incapacité à induire la différenciation, le carbaryl et l'endosulfane ont individuellement été testés pour leur capacité à affecter la différenciation induite par atRA (Fig. 3.4). Chacun des pesticides a été testé à une concentration de 25 μM . Au jour 6 du protocole de neurodifférenciation, les cellules ont été récoltées et le nombre de cellules positives pour βIII -tubuline a été mesuré. Visuellement, chacun des deux pesticides a provoqué une forte diminution de la quantité de cellules (non montré). Pour chacun des pesticides, on observe une diminution du tiers du nombre de neurones par rapport au contrôle. La présence de cytotoxicité apparaît encore ici comme le facteur impliqué dans les effets adverses sur la différenciation.

De la même façon que dans le chapitre II, l'effet du carbaryl et de l'endosulfane a été testé sur la capacité des cellules P19 à métaboliser atRA (Fig. 3.5). Les cellules ont été incubées avec 0,05 μM atRA durant 4 heures en présence de 10 μM (Fig. 3.5 A), 25 μM (Fig. 3.5 B) ou 50 μM (Fig. 3.5 C) de carbaryl ou d'endosulfane. Aucune des concentrations testées n'a affecté la capacité des cellules P19 à métaboliser atRA. Dans un deuxième temps, la capacité des pesticides à suractiver le métabolisme de atRA a été investiguée (Fig. 3.6). Les cellules ont été prétraitées durant 16 heures en présence de la molécule à tester et elles ont ensuite été incubées durant 4 heures en présence d'atRA. Un prétraitement des cellules avec 0,5 μM atRA ou TTNPB a réduit de près de 4 fois la quantité de atRA résiduelle après la période d'incubation de 4 heures (Fig. 3.6 A). Les cellules ont également été prétraitées avec 10 μM de chacun des deux pesticides avant l'ajout d'atRA, mais aucun des deux contaminants n'a suractivé la métabolisation. (Fig. 3.6 B). Des prétraitements de 25 μM et 50 μM avaient également été testés, mais des signes évidents de cytotoxicité ont été observés. Il a toutefois été montré par Lemaire *et al.* (2005) que l'endosulfane à une concentration de 10 μM peut surexprimer le système enzymatique impliqué dans le catabolisme d'atRA. Toutefois, cette surexpression n'a atteint qu'un taux maximal de 14,6% par rapport au TTNPB. Il est possible, comme dans le cas de l'activation des récepteurs, que la surexpression ne soit pas assez importante pour être en mesure de mesurer un effet avec notre méthode. L'analyse des métabolites produits après suractivation du métabolisme montre une plus grande abondance du métabolite 1 par rapport à des cellules non traitées (Fig. 3.6 C). Bien qu'il n'ait pas été identifié, le résultat suggère qu'il est probablement un des premiers métabolites produits

après l'oxydation d'atRA. Connaissant les propriétés tératogènes d'atRA (Gardiner *et al.*, 2003), un déséquilibre des métabolites produits pourrait être lié à certains effets tératogènes, d'autant plus que certains des métabolites peuvent induire la différenciation cellulaire (Pijnappel *et al.*, 1993; Ramp *et al.*, 1994).

Les résultats obtenus avec chacun de ces deux pesticides sur la différenciation et sur le métabolisme n'ont pas permis de supposer un lien entre la présence de xénobiotiques et une interférence métabolique dans les mécanismes cellulaires impliquant la vitamine A et ses dérivés. Les résultats suggèrent toutefois que les effets antiprolifératifs des contaminants pourraient expliquer la présence de malformations, notamment en retardant le développement durant l'organogénèse.

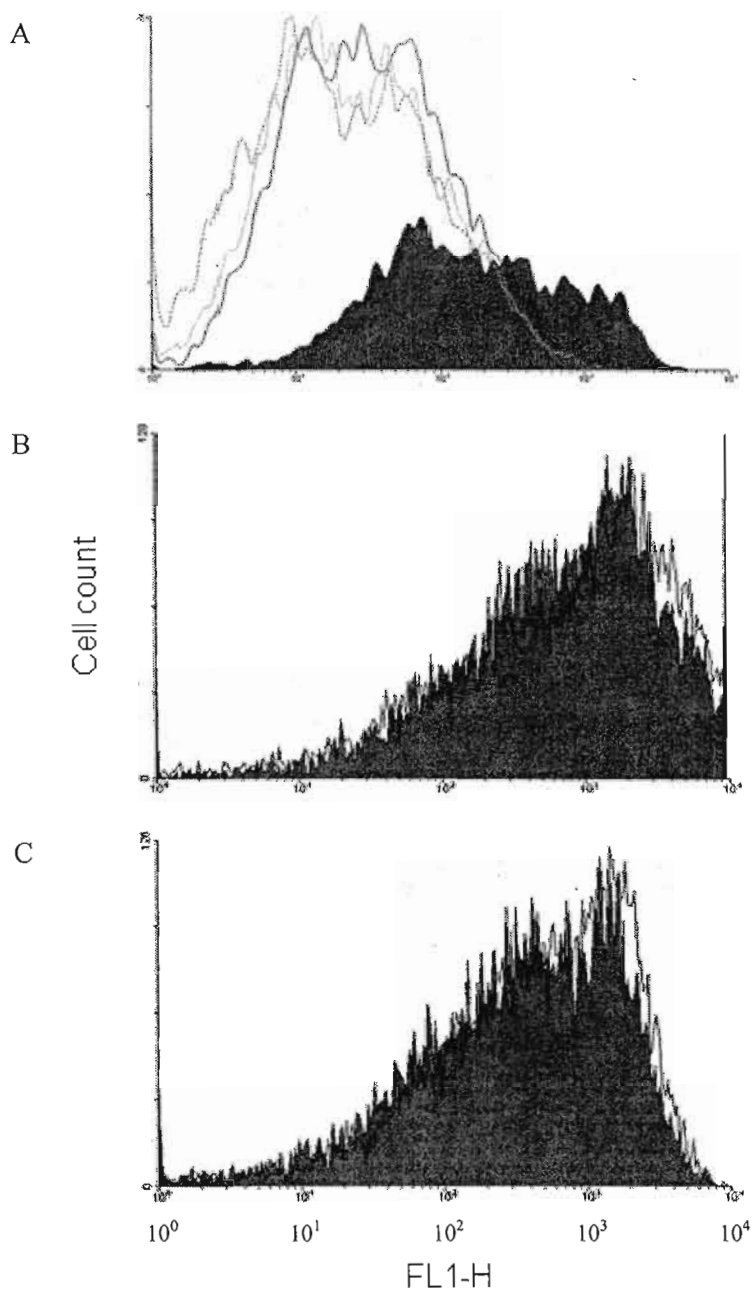


Figure 3.1. Effets du carbaryl et de l'endosulfane sur le maintien de l'état indifférencié. $0,5 \mu\text{M}$ atRA(---), TTNPB (—) ou atRA + TTNPB (· · ·) (A), $25 \mu\text{M}$ carbaryl (B) ou $25 \mu\text{M}$ endosulfane (C) ont été testés sur les cellules P19 en cours d'agrégation et les cellules des agrégats dissociés en jour 4 ont été analysées pour SSEA1 par FACS tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les courbes à surface foncée représentent les cellules NI et les courbes à surface claire représentent les cellules traitées. (n = 1)

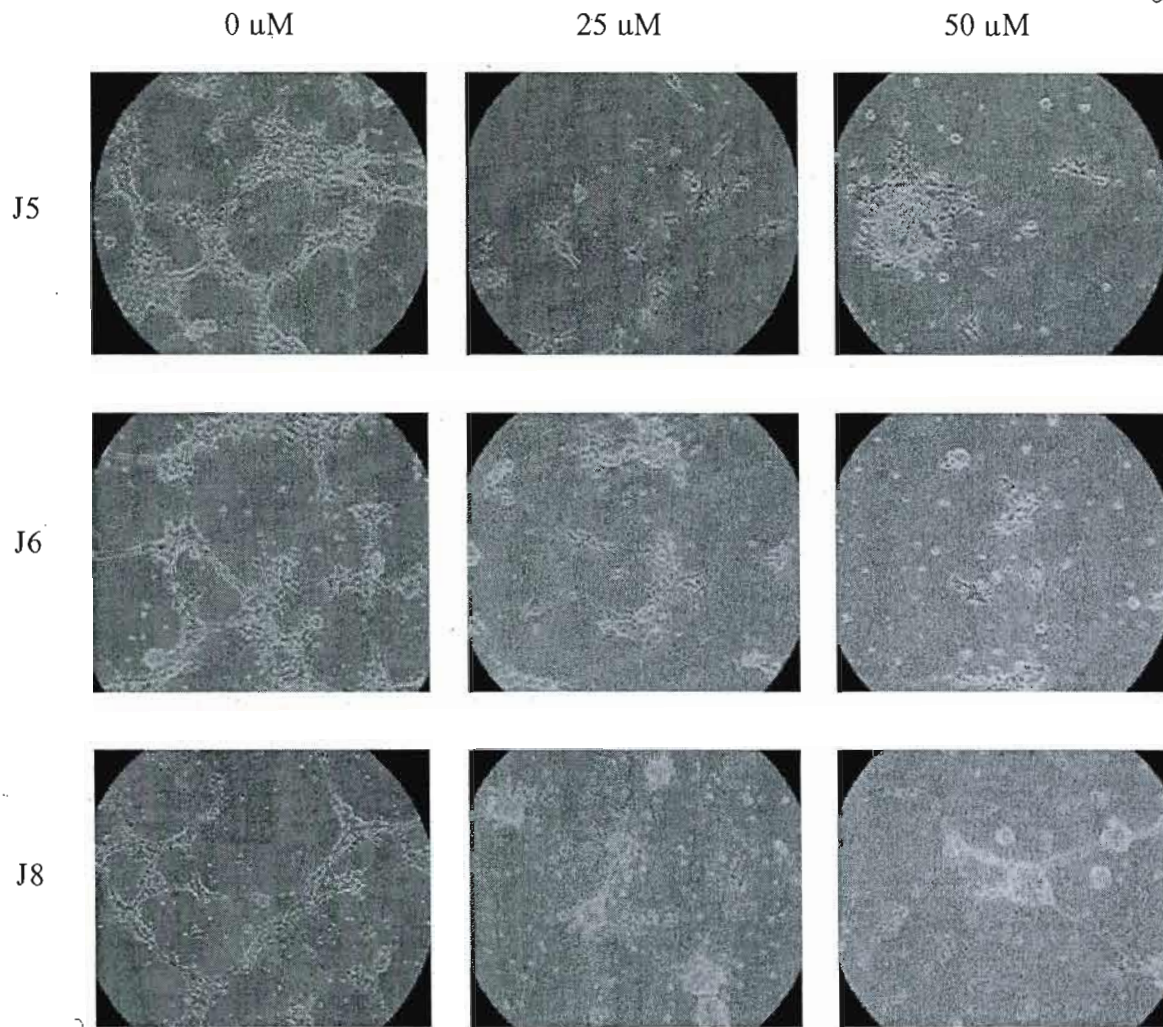


Figure 3.2. Effets du carbaryl sur le développement des neurones. Les cellules ont été traitées pendant 4 jours en agrégats en présence de 0,5 μM RA avec ou sans carbaryl (0, 25, 50 μM) tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Une foisensemencées sur pétri tissulaire, les cellules ont été prises en photo aux jours 5, 6 et 8 du protocole de neurodifférenciation (grossissement 100X). (n = 1)

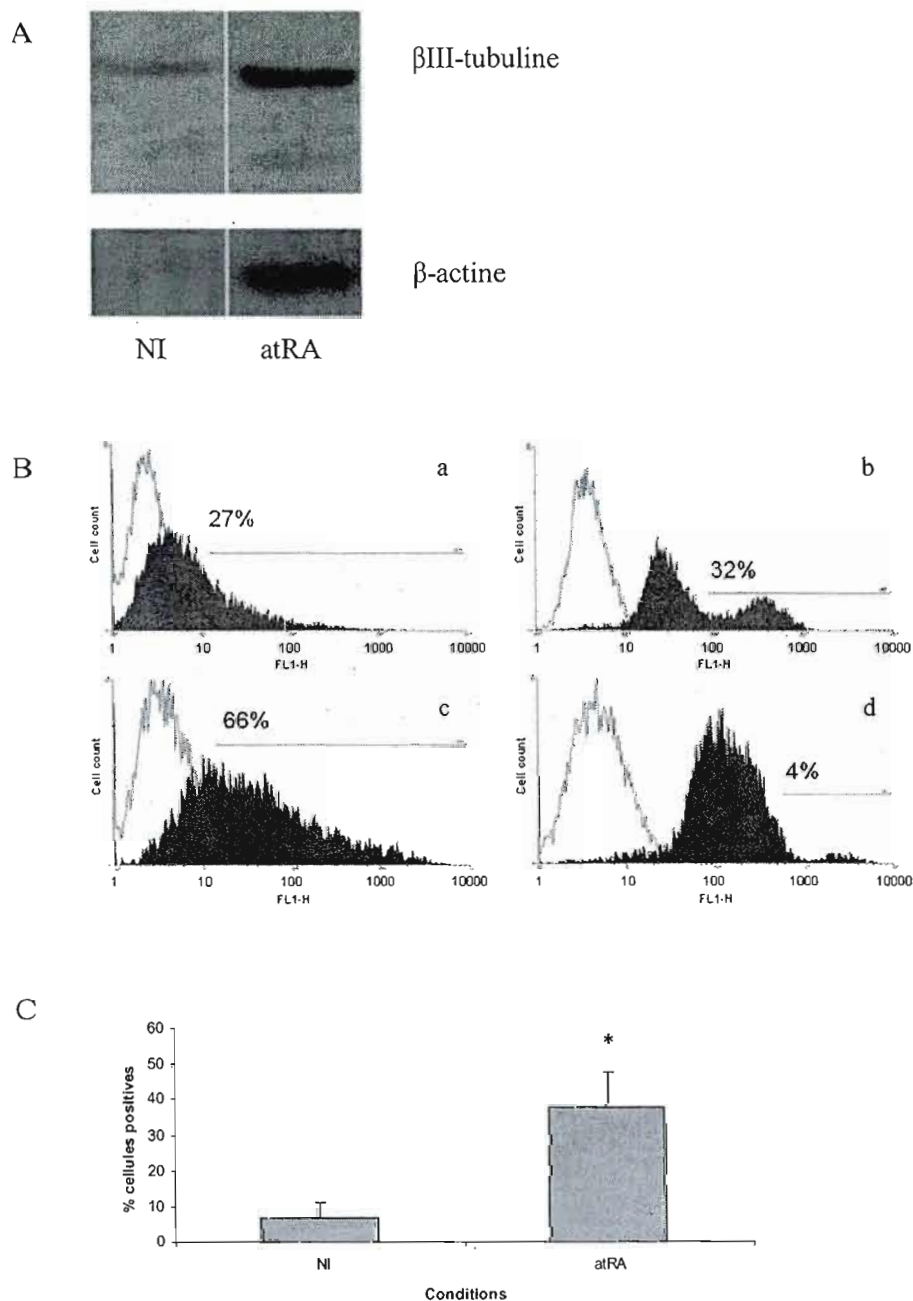


Figure 3.3. Effets d'atRA sur la différenciation neuronale des cellules P19 en monocouche en absence de sérum. Les résultats montrent l'analyse au jour 7 de la β III-tubuline par buvardage Western (A) sur les cellules NI et traitées avec atRA, l'analyse par FACS (B) des cellules NI (c, d) et traitées avec atRA (a, b) en jour 6 pour SSEA1 (a, c) et β III-tubuline (b, d) et la quantification du nombre de cellules β III-tubuline positives moyen (C). Ces derniers résultats se présentent sous la forme moyenne \pm écart-type pour au moins trois expériences. * indique une différence significative par rapport aux cellules NI ($p < 0,05$).

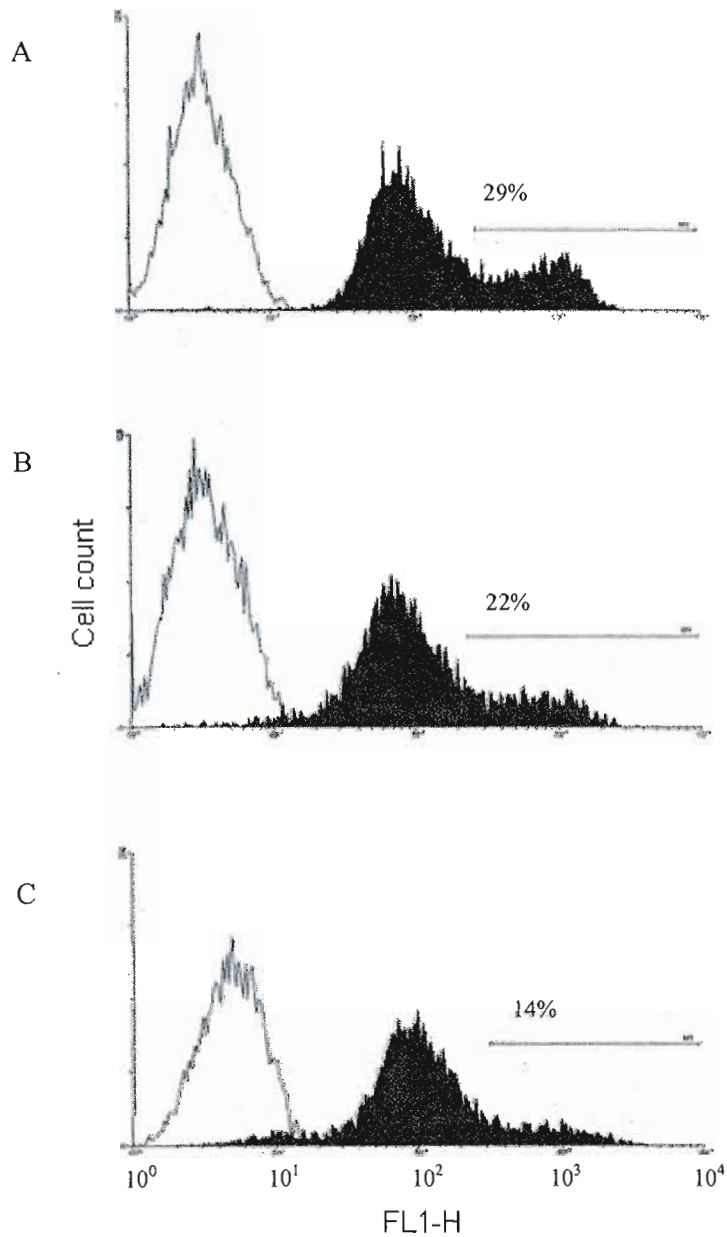


Figure 3.4. Effets du carbaryl et de l'endosulfane sur la neurodifférenciation en monocouche. Les cellules traitées avec 0,5 μ M atRA du jour 1 au jour 3 ont été simultanément différenciées en absence (A) ou en présence de 25 μ M carbaryl (B) ou endosulfane (C) et ont été analysées pour β III-tubuline par FACS au jour 6 de neurodifférenciation. A : contrôle, B : 25 μ M carbaryl, C : 25 μ M endosulfane. (n = 1)

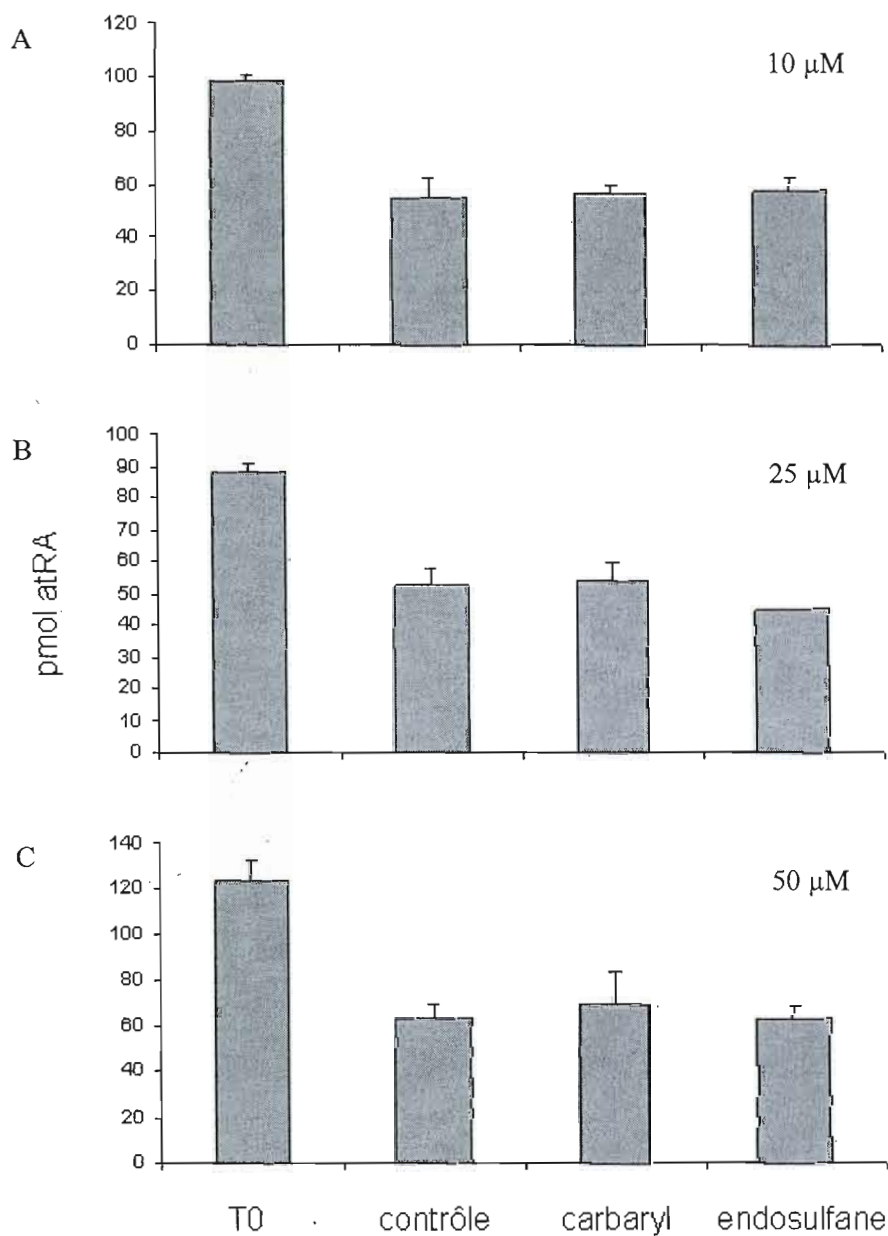


Figure 3.5. Effets du carbaryl et de l'endosulfane sur le métabolisme de atRA. Le carbaryl et l'endosulfane ont été testés à des concentrations respectives de 10 μM (A), 25 μM (B) et 50 μM (C) en même temps qu'atRA. Les rétinoïdes ont été extraits et analysés tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les diagrammes à bandes se présentent sous la forme moyenne \pm écart-type pour deux expériences indépendantes.

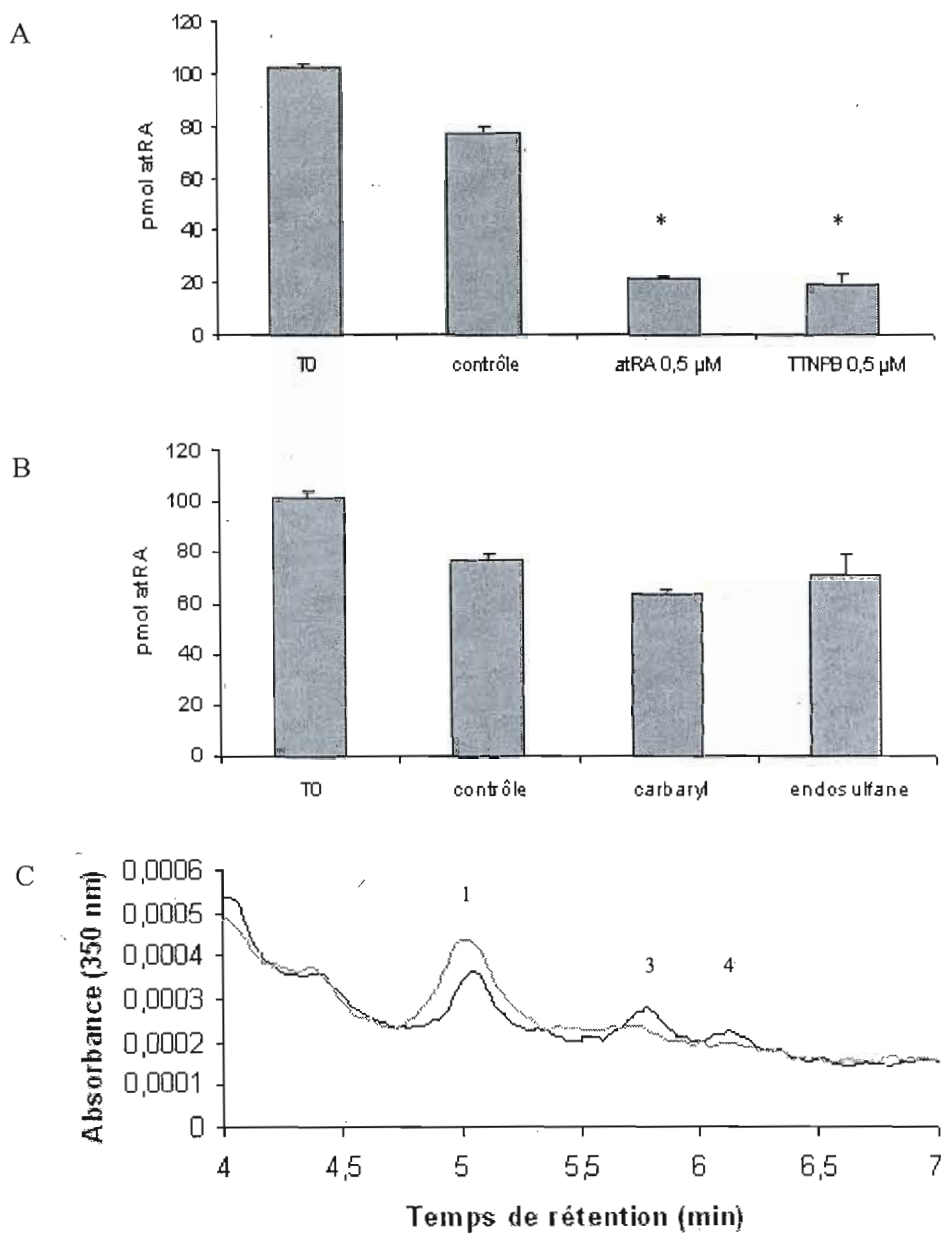


Figure 3.6. Effets d'un prétraitement avec le carbaryl ou l'endosulfane sur le métabolisme d'atRA. Les cellules ont été prétraitées avec 0,5 μ M d'inducteur (A) ($n = 3$) ou avec 10 μ M de chacun des pesticides (B) ($n = 2$) durant 16 heures et la quantité d'atRA résiduelle présente dans le milieu de culture a été mesurée par HPLC tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Le chromatogramme comparatif des métabolites polaires produits par les cellules natives (-) et suractivées (-) avec atRA est présenté (C).

CONCLUSION

Bien que plusieurs facteurs soient suggérés pour expliquer l'émergence des malformations des membres observées chez les amphibiens depuis les dernières décennies, la présence de polluants dans les cours d'eaux semble contribuer de façon importante à l'apparition de ces phénomènes. Plusieurs voies de recherche sont suivies pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués et beaucoup pointent le système des rétinoïdes comme cible potentielle de plusieurs contaminants. Cette hypothèse est plausible, sachant qu'un déséquilibre des concentrations de vitamine A et de ses dérivés peut causer des effets tératogènes durant le développement d'un organisme. Toutefois, la plupart des études démontrant une action de type rétinoïdienne sont le résultat d'expérimentations *in vivo*, et leur interprétation est rendue plus compliquée à cause d'une multitude de conditions physiologiques et environnementales. Les études récentes effectuées sur les ouaouarons de la rivière Yamaska ont permis de mesurer une altération des rétinoïdes hépatiques et plasmatiques chez les individus des sites les plus contaminés, ce qui suggère un lien possible entre la forte activité agricole et une interférence métabolique (Bérubé *et al.* 2005, Boily *et al.* 2005). L'utilisation d'un modèle d'étude du développement *in vitro* à base de culture cellulaire est un outil intéressant pour cibler avec plus de finesse les mécanismes cellulaires impliqués et les effets directs des molécules toxiques. Également, la mise au point d'un bioessai cellulaire apparaît comme un outil intéressant pour statuer rapidement du potentiel tératogène de différents contaminants d'origine agricole.

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer si des contaminants d'origine agricole présélectionnés pouvaient affecter la différenciation de cellules P19 et leur capacité à métaboliser atRA. Ces cellules sont indifférenciées et peuvent se différencier en plusieurs phénotypes cellulaires en présence d'atRA. L'atrazine, les nitrates et les nitrites ont d'abord été sélectionnés étant donné qu'ils sont parmi les contaminants agricoles les plus abondants dans le bassin hydraulique de la rivière Yamaska et parce qu'on n'a encore que peu d'informations sur leur toxicité développementale potentielle. Aucun de ces trois contaminants n'a affecté la métabolisation d'atRA, mais les nitrites aux concentrations testées, ont affecté la différenciation des cellules P19 en neurones. Ces effets ont toutefois été

mesurés à des concentrations qui affectent la croissance des cellules P19. Il n'a donc pas été possible de suggérer un lien entre un contaminant et un effet de type rétinoidien. Le carbaryl et l'endosulfane ont par la suite été testés étant donné qu'ils sont respectivement connus pour affecter la neuromaturation et pour interférer dans le système des rétinoïdes. Aucun de ces pesticides n'a eu d'effets sur le catabolisme d'atRA et aucun n'a induit la différenciation cellulaire. À des concentrations cytotoxiques, ils ont toutefois affecté le taux de neurodifférenciation avec une procédure de différenciation neuronale en monocouche. De la même façon que l'atrazine et les fertilisants azotés, il n'a pas été possible de suggérer un effet de ces pesticides sur le système des rétinoïdes, bien que ce type d'effet soit connu pour l'endosulfane. Les résultats obtenus suggèrent toutefois qu'un effet sur la croissance ou la viabilité cellulaire peut affecter le développement durant l'organogénèse.

Malgré l'avantage certain que représente la mise sur pied d'un bioessai cellulaire tel que présenté dans ce document, la méthode décrite ici présente quelques limites. Les effets antiprolifératifs voire létaux des contaminants testés sont un obstacle majeur pour tester des substances n'ayant qu'une faible activité de type rétinoidienne. Ceci limite donc la gamme de concentrations utilisables pour un contaminant donné. Également, la différenciation cellulaire étant un processus modulé par diverses voies de signalisation cellulaire, une inhibition de la différenciation ne permet pas de cibler avec précision les mécanismes cellulaires impliqués. Aussi, la différenciation neuronale étant une différenciation nécessitant de fortes concentrations de RA, on ne sait pas dans quelle mesure les fortes concentrations utilisées peuvent masquer l'effet adverse potentiel d'un xénobiotique.

Bien qu'étant exploratoire, cette étude trouve sa valeur dans l'élaboration et la mise au point d'une méthode visant à évaluer le potentiel tératogène de contaminants agricoles. Peu d'études utilisent les cellules de carcinome embryonnaire de souris pour mieux comprendre la toxicité développementale, et nous avons voulu montrer les applications et les limites de l'approche expérimentale que nous avons voulu développer avec les cellules P19 de carcinome embryonnaires de souris. Cette étude a permis la mise sur pied d'un test rapide permettant de quantifier le taux de différenciation cellulaire par cytométrie de flux et de décrire le métabolisme d'atRA avec ce modèle cellulaire.

Avec les résultats obtenus, on ne peut donc pas écarter complètement l'idée que les contaminants testés puissent affecter le système des rétinoïdes endogènes, ni qu'ils puissent affecter le développement des organismes exposés. Des expériences plus poussées permettront probablement de mieux contrôler les limites expérimentales rencontrées et d'obtenir des réponses plus complètes. L'utilisation de microsomes de cellules P19 apparaît comme une alternative intéressante pour tester les enzymes de type CYP450 en utilisant des concentrations de contaminants plus élevées qu'avec des cellules vivantes. Également, une méthode permettant de mesurer le taux d'activation des récepteurs nucléaires à l'aide d'un gène rapporteur et la mesure du taux d'expression de différentes protéines cellulaires (enzymes des voies rétinoïdiennes) apparaissent comme deux autres approches expérimentales complémentaires à envisager.

APPENDICE

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Cette section rapporte quelques résultats de FACS relatifs à la viabilité cellulaire et à l'analyse de la taille et de la granulosité des cellules P19 en cours de différenciation avec atRA. Les dernières figures rapportent quelques résultats complémentaires obtenus avec les nitrites.

Résultats et discussion.

Parallèlement aux études de toxicité des pesticides sur la différenciation cellulaire et le métabolisme rétinoidien, des effets ont été observés sur la taille et la granulosité des cellules. Les résultats sont résumés dans les présentes figures et apportent de l'information complémentaire aux résultats du chapitre II.

La Figure A-1 présente la viabilité des cellules P19 indifférenciées, non induites (NI) et traitées avec atRA durant 4 jours en agrégats. Le panneau A présente les dot plots SSC (granulosité) versus FSC (taille) à gauche et FL2 versus FSC à droite. FL2 a été mesuré suite à un marquage des cellules non fixées à l'iodure de propidium. Les populations encadrées représentent les cellules mortes. Ces cellules ont pu être identifiées dans les dot plot FSC/SSC et dans chacun des cas, elles ont toutes une plus petite taille que les cellules vivantes. Un fort taux de viabilité a été mesuré avec les cellules P19 indifférenciées et traitées avec atRA durant 4 jours. Toutefois les cellules NI en jour 4 présentent une forte diminution de la viabilité cellulaire. Ceci est probablement dû à une trop forte prolifération des cellules agrégées et à une nécrose cellulaire à l'intérieur de l'agrégat (Smith *et al.*, 1987). La Figure 2 présente une comparaison de la granulosité (SSC) et de la taille (FSC) des cellules agrégées en jour 4. Cette figure ne présente que les cellules vivantes obtenues après exclusion des cellules mortes à l'iodure de propidium. Des différences visuelles sont facilement distinguables entre les nuages de points de chacune des populations. Les cellules vivantes de la population NI présentent un plus grand SSC et un plus grand FSC que les cellules traitées avec atRA. Il est documenté par Jones-Villeneuve *et al.*, 1983 que les cellules traitées avec atRA et récoltées au jour 4 ont un plus petit volume que les cellules NI et ceci semble être le cas. Il est possible que l'augmentation du SSC soit due à une plus grande mortalité dans la population cellulaire NI. Ces cellules peuvent correspondre à des cellules en moins bonne santé que celles traitées avec atRA (Craig *et al.*, 1993). L'absence de marquage à l'iodure de propidium de ces cellules suggère également la présence d'apoptose (Bertho *et al.*, 2000). Autrement, il est également possible que les cellules indifférenciées soient simplement plus granuleuses que des neurones. Des expériences plus avancées pourraient permettre de mieux

comprendre ces observations. L'effet antiprolifératif de atRA montré à la Figure 3 a sûrement une influence dans les différences observées entre les cellules NI et traitées avec atRA.

Pour compléter les résultats obtenus avec les nitrites dans le chapitre II, les concentrations utilisées ont été testées sur les cellules P19 en monocouche durant 48 heures et les cellules récoltées ont été analysées pour leur taille et leur granulosité (Fig. 4). À mesure que la concentration augmente, on remarque que les cellules ont un SSC de plus en plus élevé et qu'il y a une accumulation de cellules dans la portion en bas à gauche. Ceci suggère fortement une cytotoxicité des nitrites sur les cellules P19. Bien que les nitrites n'aient eu aucun effet sur la capacité des cellules à métaboliser atRA, la Figure 5 montre qu'à mesure que leur concentration augmente, il y a de moins en moins de rétinol. Bien qu'aucune analyse supplémentaire n'ait été faite, il est possible que cette disparition soit due à une réaction entre le rétinol et les nitrites. En fait il a précédemment été démontré que les nitrites ont la capacité de réduire les stocks de vitamine A chez les poulets et les rats. Les nitrites peuvent réagir avec le rétinol dans des conditions acides (Roberts et Sell, 1963). Il est possible que cette réaction ait lieu dans le milieu d'extraction des rétinoïdes, étant donné qu'il contient une importante concentration d'acide acétique.

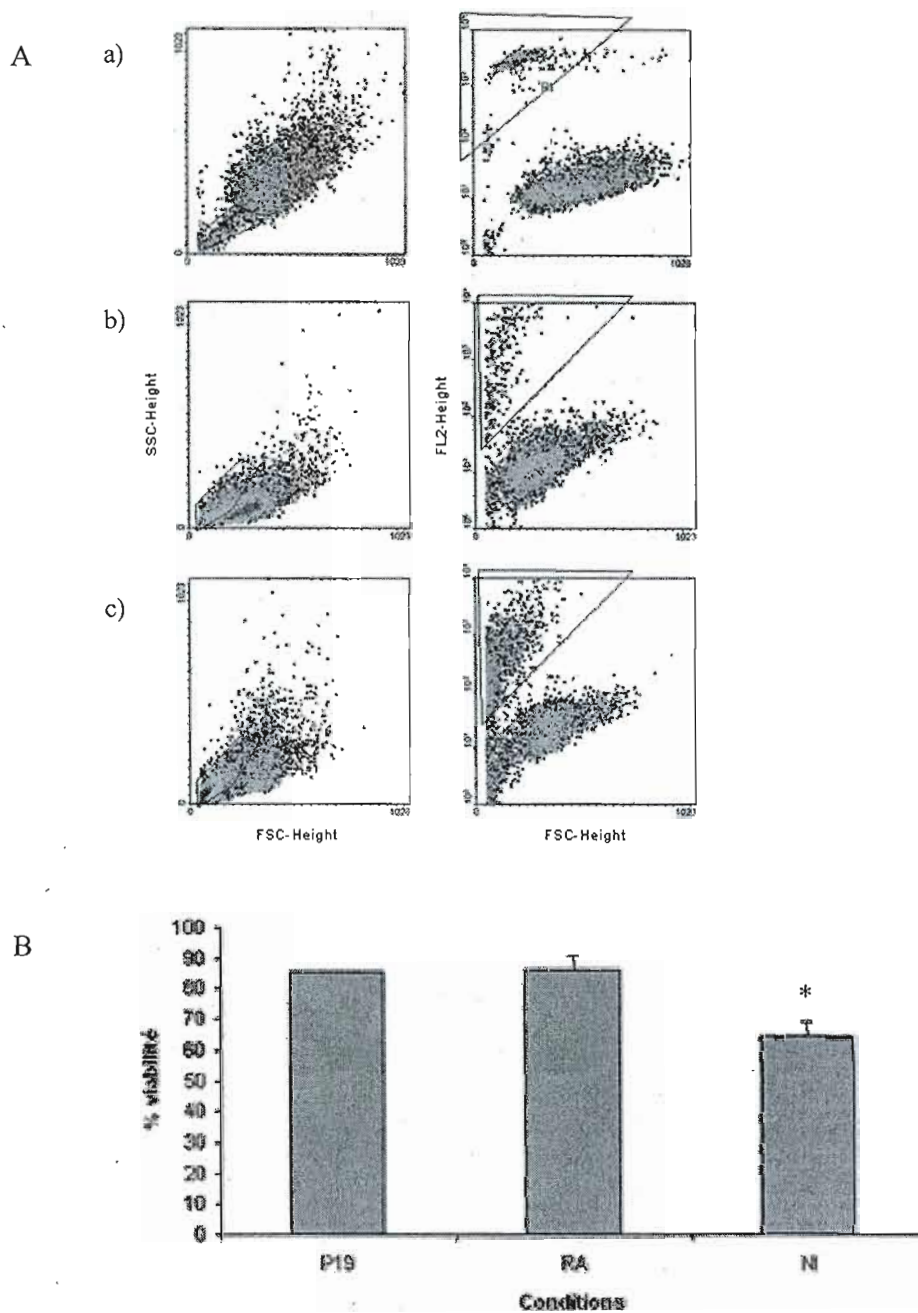


Figure A-1. Caractérisation de la viabilité des cellules P19 traitées ou non avec atRA. Les dot plots de FACS SSC/FSC et FL2/FSC après marquage des cellules à l'iodure de propidium sont présentés (A) pour les cellules P19 indifférenciés (a), les cellules traitées avec RA en jour 4 (b) et les cellules NI en jour 4 (c). La viabilité moyenne pour chacune des trois populations est présentée sous la forme moyenne \pm écart-type. * indique une différence significative par rapport aux cellules P19 ($p < 0,05$).

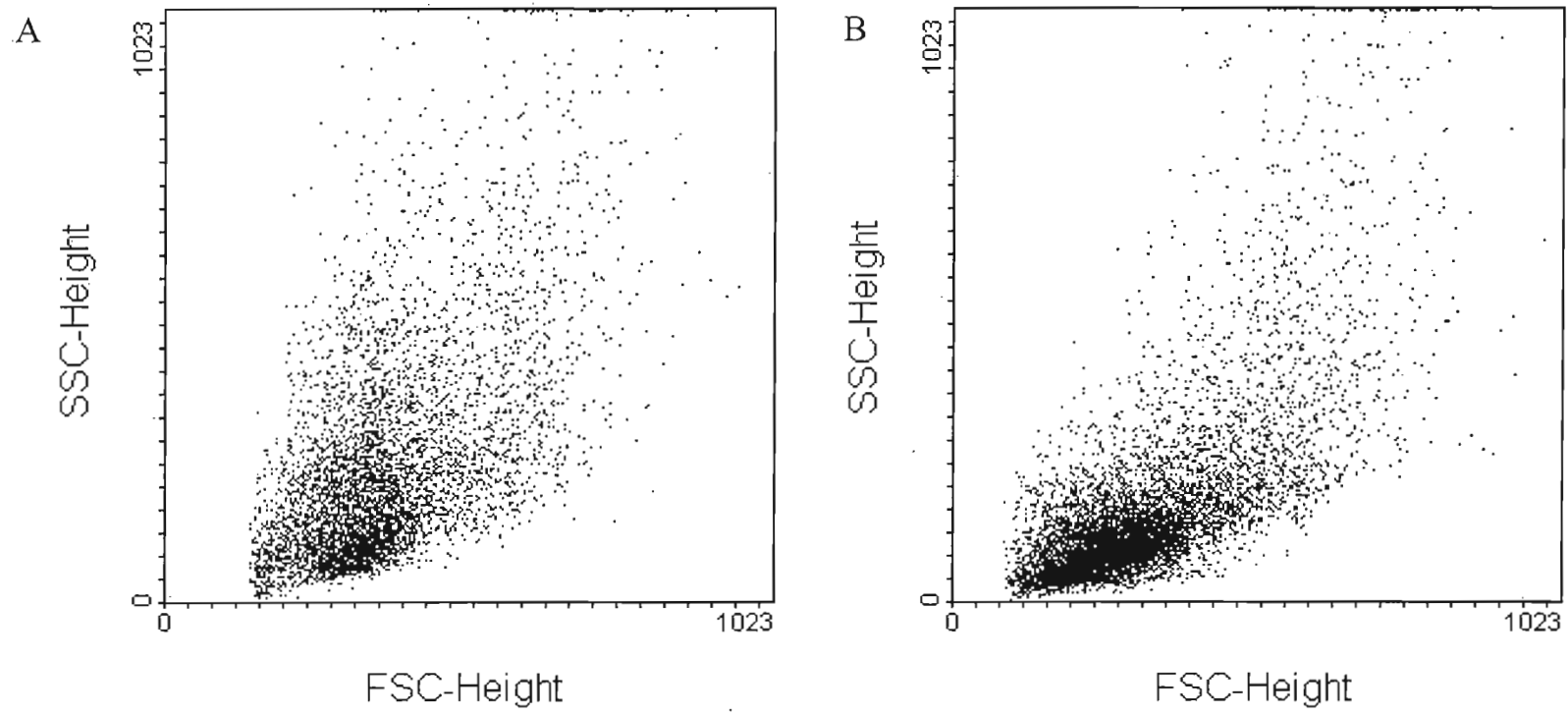


Figure A-2. Comparaison de la taille et de la granulosité des cellules viables NI et traitées avec atRA. Les dot plots de FACS SSC/FSC pour les cellules NI (A) et atRA (B) en jour 4 sont présentés ci-dessus.

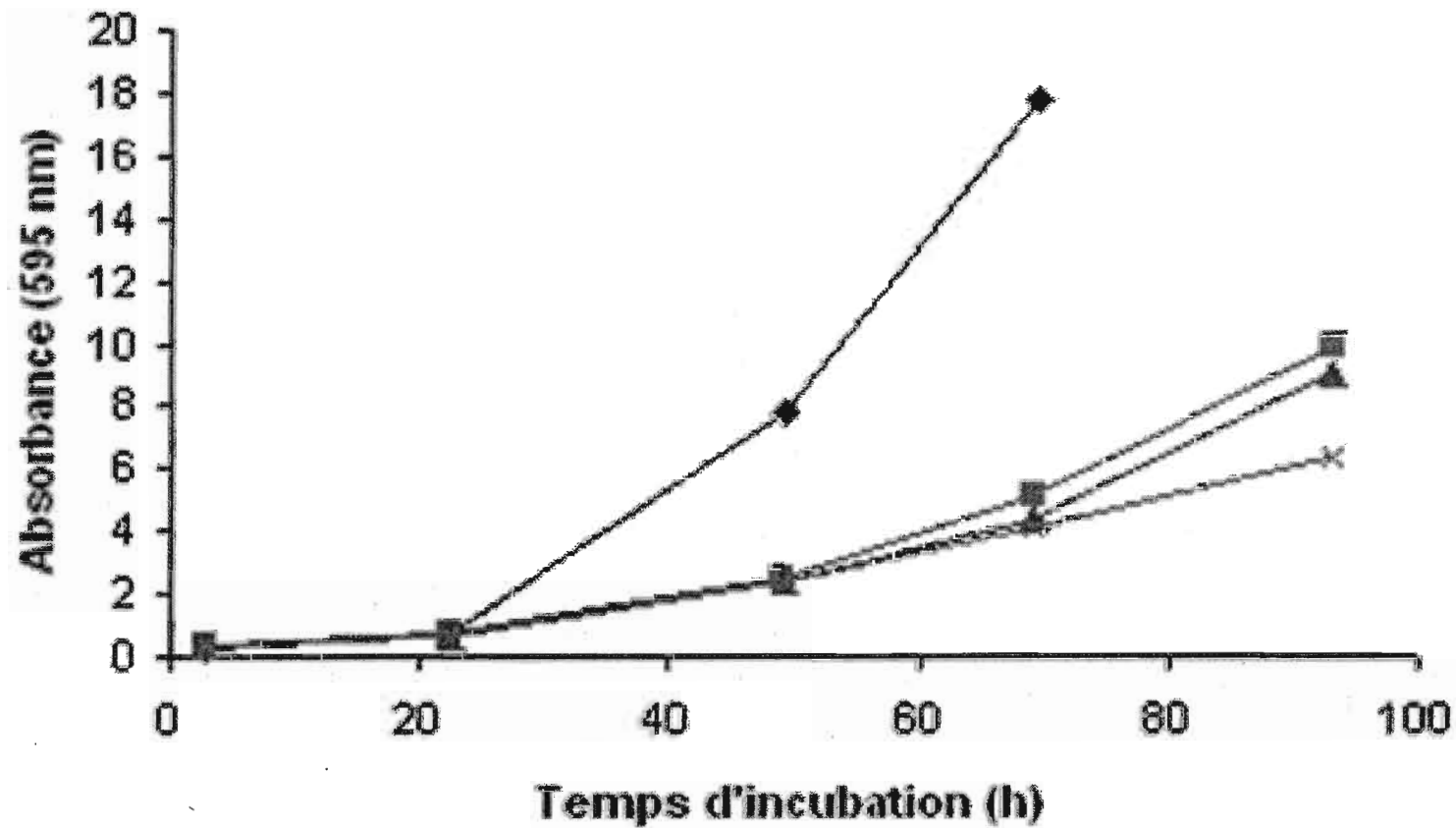


Figure A-3. atRA et TTNPB sont des agents antiprolifératifs. Les cellules ont été traitées sur monocouche en absence (◆) ou en présence de 0,5 μ M atRA (■), 0,5 μ M TTNPB (▲) ou 0,5 μ M RA + 0,5 μ M TTNPB (x). Les cellules ont ensuite été fixées et la densité cellulaire a été évaluée à l'aide d'une coloration au cristal violet suivi d'une lecture à 595 nm.

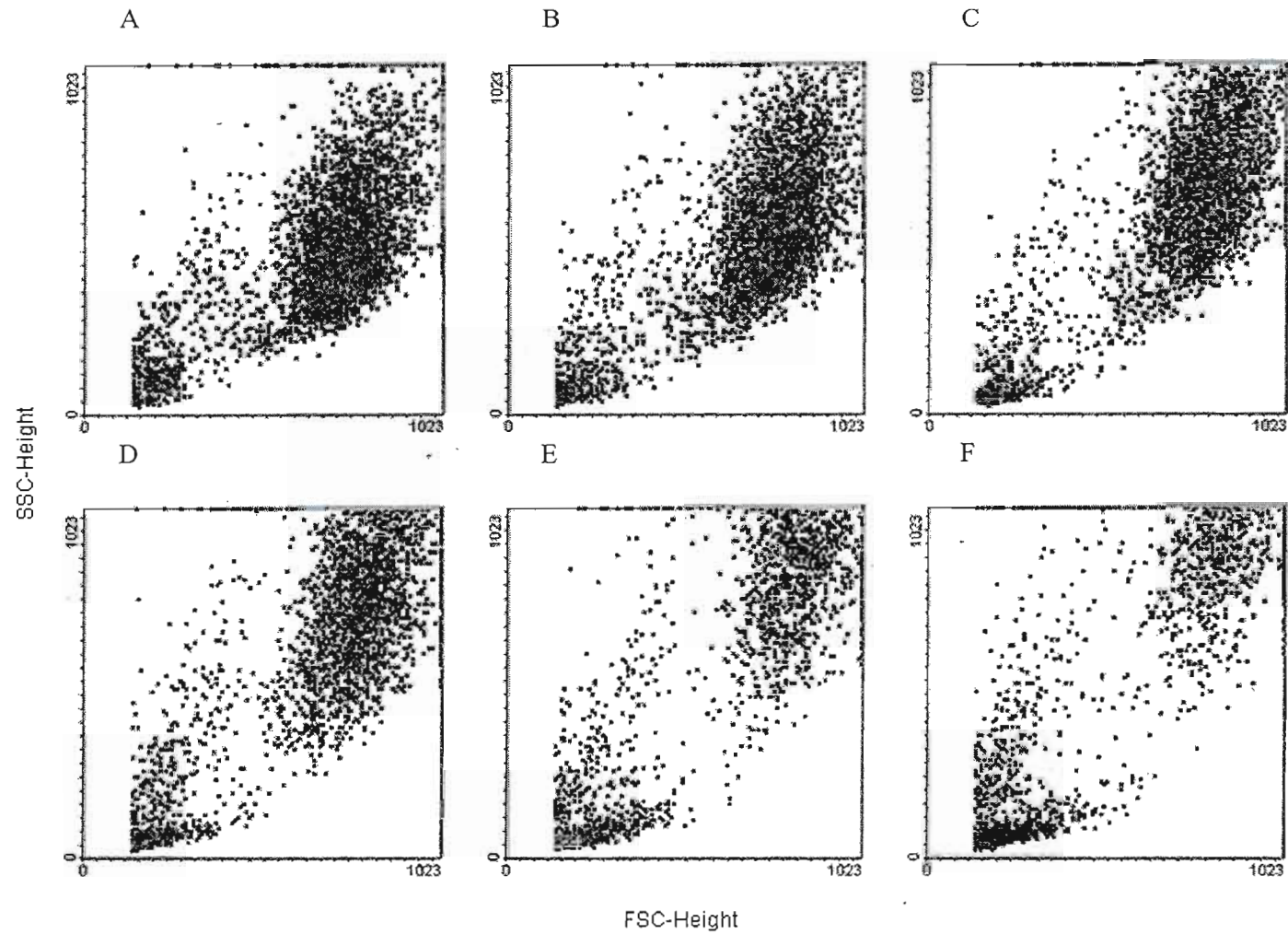


Figure A-4. NO_2 est toxique pour les cellules P19. Les cellules ont été traitées durant 48 heures en présence de 0 mg/L (A), 134 mg/L (B), 234,5 mg/L (C), 335 mg/L (D), 502,5 mg/L (E) ou 670 mg/L (F) de NO_2 . Les cellules ont ensuite été analysées par FACS.

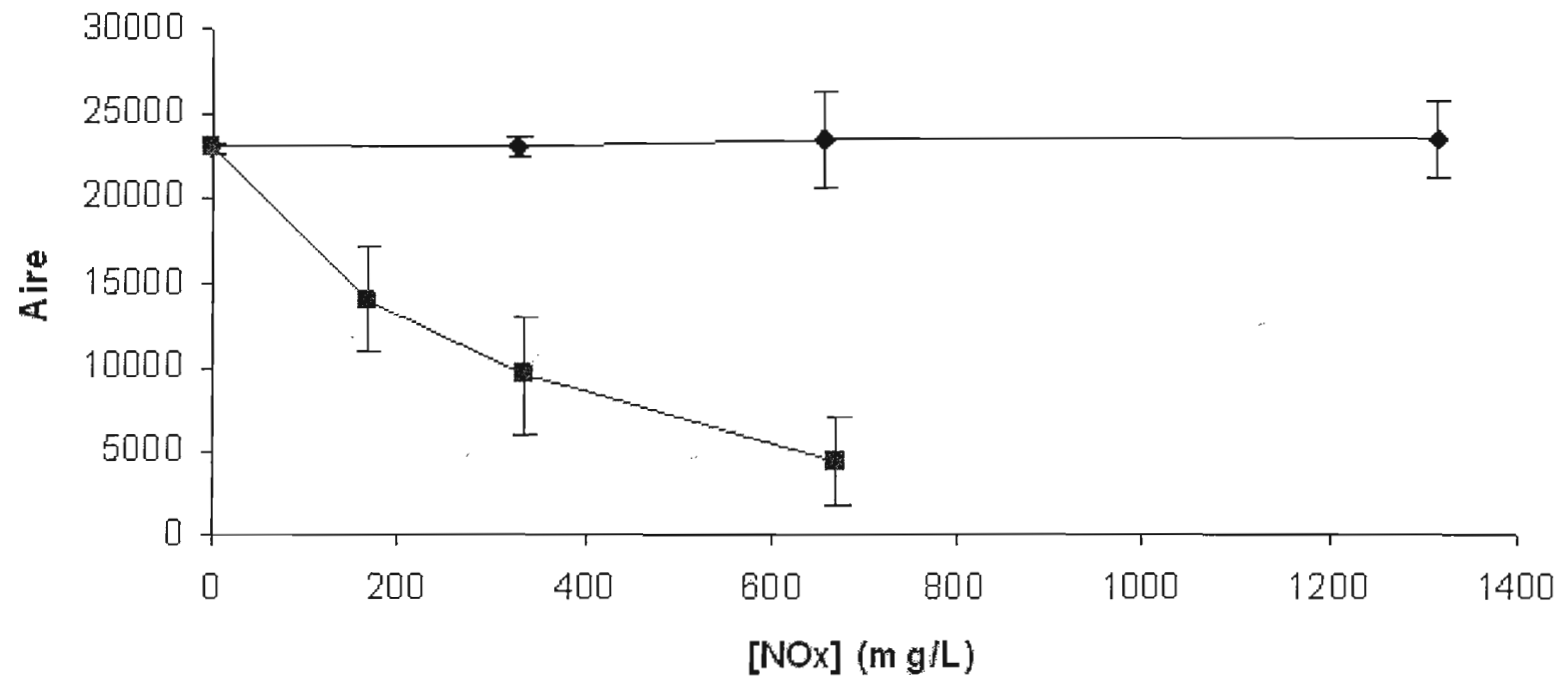


Figure A-5. Effets des nitrites et des nitrates sur le taux de rétinol. Les courbes représentent la quantité de rétinol mesurée après incubation des cellules durant 4 heures en présence de $0,05 \mu\text{M}$ atRA et avec des concentrations croissantes de nitrates (♦) ou de nitrites (■). (n = 2)

RÉFÉRENCES

- Ankley, G.T., Diamond, S.A., Tietge, J.E., Holcombe, G.W., Jensen, K.M., DeFoe, D.L., Peterson, R. 2002. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependant induction of hindlimb malformations in the northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Environmental Science and Technology* 36:2853-2858.
- Baker, J., Waights, V. 1993. The effect of sodium nitrate on the growth and survival of toad tadpoles (*Bufo bufo*) in the laboratory. *Herpetological Journal* 3:147-148.
- Barua, A.B., Furr, H.C. 1998. Review : Properties of retinoids : Structure, handling and preparation. *Molecular Biotechnology* 10:167-182.
- Beckett, B.R., Petkovich, M. 1999. Evolutionary conservation in retinoid signalling and metabolism. *American Zoology* 39:783-795.
- Bertho, A.L., Santiago, M.A., Coutinho, S.G. 2000. Flow Cytometry in the Study of Cell Death. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(3):429-433.
- Bérubé, V.E., Boily, M.H., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P.A. 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic Toxicology* 71(2):109-20.
- Boily, M.H., Bisson, M., Spear, P.A. 2004. Rétinoïdes: biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques. In: Campbell, G.C., Denizeau, F., Pelletier, E. (Eds), *Écotoxicologie moléculaire, principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec à Montréal. Sainte-Foy, Qué., Canada, pp. 197-256.
- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C., Dassylva, N. 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5):1099-106.
- Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., Chivers, D.P., Anthony, R.G. 1997. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25):13735-7.
- Branchaud, A., Gendron, A., Fortin, R., Anderson, P.D., Spear, P.A. 1995. Vitamin A stores, teratogenesis and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Rivière des Prairies near Montréal and a reference site. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52:1703-1713.
- Brown, G.C. 1999. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica and Biophysica Acta* 1411:351-369.

- Burri, B.J., Clifford, A.J. 2004. Carotenoid and retinoid metabolism: insights from isotope studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430:110-119.
- Campbell, A. 1999. Declines and Disappearances of Australian Frogs. *Environment Australia* 185-201.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals : a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58:1255-1267.
- Chambon, P. 1966. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Journal of the Federation of the American Societies of Experimental Biology* 10:940-954.
- Chang, P.-A., Wu, Y.-J., Li, W., Leng, X.-F. 2006. Effect of carbamate esters on neurite outgrowth in differentiating human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Chemico-Biological Interactions* 159:65-72.
- Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., Lansdorp, P.M. 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine* 177:1331-1342.
- Crump, D. 2001. The effects of UV-B radiation and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) on the biology of amphibians. *Environ Rev./Dossiers Environ.* 9(2):61-80.
- Danalache, B.A., Paquin, J., Donghao, W., Grygorczyk, R., Moore, J.C., Mummery, C.L., Gutkowska, J., Jankowski, M. 2007. Nitric oxide signaling in ocytocin-mediated cardiomyogenesis. *Stem Cells* 25(3):679-688.
- Darmon, M., Bottenstein, J., Sato G. 1981. Neural differentiation following culture of embryonal carcinoma cells in a serum-free defined medium. *Developmental Biology* 85:463-473.
- Datta, P.K., Lianos, E.A. 1999. Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells. *Kidney International* 56:486-493.
- Dickoff, D.J., Gerber, O., Turovsky, Z. 1987. Delayed neurotoxicity after ingestion of carbamate pesticide. *Neurotoxicity* 37:1229-1231.
- Doyon, C., Fortin, R., Spear, P.A. 1999. Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and Abitibi region, Quebec. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56:1428-1436.
- Duester, G. 1996. Involvement of alcohol deshydrogenase, short-chain deshydrogenase/reductase, aldehyde deshydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35:12221-12227.

- Eckhoff, C., Bailey, J.R., Collins, M.D., Slikker Jr, W., Nau, H. 1991. Influence of dose and pharmaceutical formulation of vitamin A on plasma levels of retinyl esters and retinol and metabolic generation of retinoic acid compounds and β -glucuronides in the cynomolgus monkey. *Toxicology and Applied Pharmacology* 111:116-127.
- Ecobichon, D.J. 2001. Carbamate insecticides, in: R. Krieger (Ed.), *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 2, Academic Press, San Diego, 2001, pp. 1087-1106.
- Eichele, G., Tickle, C., Alberts, B.M. 1985. Studies on the mechanism of retinoid-induced pattern duplications in the early chick limb bud: temporal and spatial aspects. *Journal of Cell Biology* 101:1913-1920.
- Gardiner, D., Ndayibagira, A., Grün, F., Blumberg, B. 2003. Deformed frogs and environmental retinoids. *Pure Applied Chemistry* 75(11-12):2263-2273.
- Gouge, R.C., Marshburn, P., Gordon, B.E., Nunley, W., Huet-Hudson, Y.M. 1998. Nitric Oxide as a Regulator of Embryonic Development. *Biology of reproduction*. 58:875-879.
- Griffis-Kyle, K.L., Ritchie, M.E. 2007. Amphibian survival, growth and development in response to mineral nitrogen exposure and predator cues in the field: an experimental approach. *Oecologia* 152(4):633-642.
- Gupta, P.K., Chandra, S.V., Saxena, D.K. 1978. Teratogenic and embryotoxic effects of endosulfan in rats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 42(2):150-2.
- Harmon, M.A., Boehm, M.F., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J. 1995. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:6157-6160.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:5476-5480.
- Holloway, A.C., Angers, D.A., Crankshaw, D.J., Wu, M., Foster, W.G. 2007. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. *Journal of Applied Toxicology* 28(3):260-270.
- Jones-Villeneuve, E.M., McBurney M.W., Rogers K.A., Kalnins, V.I. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *Journal of Cell Biology* 94:253-262.
- Jones-Villeneuve, E.M.V., Rudnicki, M.A., Harris, J.F., McBurney, M.W. 1983. Retinoic Acid-Induced Neural Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biology* 3(12):2271-2279.

Kang, K.-S., Park, J.-E., Ryu, D.-Y., Lee, Y.-S. 2001. Effects and Neuro-toxic Mechanisms of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-Hexachlorobiphenyl and Endosulfan in Neuronal Stem Cells. *Journal of Veterinary Medical Science* 63(11):1183-1190.

Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Belden, L.K. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681-684.

Kunisaki, N., Hayashi, M. 1979. Formation of N-Nitrosamines from Secondary Amines and Nitrite by Resting Cells of *Escherichia coli* B. *Applied and Environmental Microbiology* 37(2):279-282.

Lanvers, C., Hempel, G., Blaschke, G., Boos, J. 1996. Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis and 9-cis-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biochemical Sciences and Applications* 685(2):233-248.

Lauer, T., Preik, M., Rassaf, T., Strauer, B.E., Deussen, A., Feelisch, M., Kelm, M. 2001. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(22):12814-9.

Lee, G.S., Kochhar, D.M., Collins, M.D. 2004. Retinoid-induced limb malformations. *Current Pharmaceutical Design* 10:2657-2699.

Leiva-Presa, A., Mortensen, A.S., Arukwe, A., Jensen, B.M. 2006. Altered hepatic retinol and CYP26 levels in adult European common frogs (*Rana temporaria*) exposed to p,p'-DDE. *Marine Environmental Research* 62:S10-S15.

Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., Rahmani, R. 2004. Activation of retinoic acid receptor-dependant transcription by organochlorine pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202:38-49.

Loubet, F. 1998. Les cellules souches embryonnaires : un modèle cellulaire pour l'étude de la différenciation cardiaque normale et pathologique. *Médecine/Sciences* 14:1072-6.

Maden, M., Horton, C., Graham, A., Leonard, L., Pizzey, J., Siegenthaler, G., Lumsden, A., Eriksson, U. 1992. Domains of cellular retinoic acid-binding protein I (CRABP I) expression in the hindbrain and neural crest of the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 37(1-2) : 13-23.

Maden, M. 1999. Retinoids in neural development. dans H. Nau et W.S. Blaner (dir.), *Handbook of Experimental Pharmacology : Retinoids, the Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*. Heidelberg, Springer-Verlag. 139:399-442.

Marco, A., Blaustein, AR. 1999. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(5):946-949.

Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Pöpperl, H., Krumlauf, R. 1996. Retinoids and HOX genes. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10:969-978.

Martin, G.R. 1975. Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* 5:229-243.

McBurney, M.W. 1993. P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Biology* 37:135-140.

Menegola, E., Broccia, M.L., Di Renzo, F., Giavini, E. 2006. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reproductive Toxicology* 22(2):185-195.

Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M., Currie, M.G. 1993. A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrite in Biological Samples. *Analytical Biochemistry* 214:11-16.

Munger, R., Isacson, P., Hu, S., Burns, T., Hanson, J., Lynch, C.F., Cherryholmes, K., Van Dorpe, P., Hausler, W.J.Jr. 1997. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environmental Health Perspectives* 105(3):308-14.

Nezzar, H., Chiambaretta, F., Marceau, G., Blanchon, L., Faye, B., Dechelotte, P., Rigal, D., Sapin, V. 2007. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Molecular Vision* 13:1641-50.

Novak, J., Benisek, M., Pachernik, J., Janosek, J., Sidlova, T., Kiviranta, H., Verta, M., Giesy, JP, Blaha, L., Hilscherova, K. 2007. Interference of contaminated sediment extracts and environmental pollutants with retinoid signalling. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(8):1591-1599.

Ogura, T., Nakayama, K., Fujisawa, H., Esumi, H. 1996. Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. *Neuroscience Letters* 204:89-92.

Omicinski, C.J., Rimmel, R.P., Hosagrahara, V.P. 1999. Concise Review of the Cytochrome P450s and their Roles in Toxicology. *Toxicological Sciences* 48:151-156.

Ong, D.E. 1993. Retinoid Metabolism During Intestinal Absorption. *Journal of Nutrition* 123:351-355.

- Ottolenghi, A.D., Haseman, J.K., Suggs, F. 1974. Teratogenic effects of aldrin, dieldrin, and endrin in hamsters and mice. *Teratology* 9:11-16.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Lair, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrofactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33(1):95-104.
- Pachernik, J., Bryja, V., Esner, M., Kubala, L., Dvorak, P., Hampl, A. 2005. Neural differentiation of Pluripotent Mouse Embryonal Carcinoma Cells By Retinoic Acid : Inhibitory Effect of Serum. *Physiological Research* 54:115-122.
- Paquin, J., Danalache, B.A., Jankowski, M., McCann, S.M., Gutkowska, J. 2002. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(14):9550-9555.
- Panzella, L., Manini, P., Crescenzi, O., Napolitano, A., d'Ischia, M. 2003. Nitrite-induced nitration pathways of retinoic acid, 5,6-epoxyretinoic acid, and their esters under mildly acidic conditions: toward a reappraisal of retinoids as scavengers of reactive nitrogen species. *Chemical Research in Toxicology* 16(4):502-11.
- Pijnappel, W.W., Hendriks, H.F., Folkers, G.E., van den Brink, C.E., Dekker, E.J., Edelenbosch, C., van der Saag, P.T., Durston, A.J. 1993. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature*.366(6453):340-344.
- Pignatello, M.A., Kauffman, F.C., Levin, A.A. 1997. Multiple Factors Contribute to the Toxicity of the Aromatic Retinoid TTNPB (Ro 13-7410) : Binding Affinities and Disposition. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142:319-327.
- Pignatello, M.A., Kauffman, F.C., Levin, A.A. 1999. Multiple Factors Contribute to the Toxicity of the Aromatic Retinoid TTNPB (To 13-7410): Interactions with the Retinoic Acid Receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 159:109-116.
- Pignatello, M.A., Kauffman, F.C., Levin, A.A. 2001. Liarozole Markedly Increases all trans-Retinoic Acid Toxicity in Mouse Limb Bud Cell Cultures : A Model to Explain the Potency of the Aromatic Retinoid (E)-4-[2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl] Benzoic Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142 : 319-327.
- Provost, G. 2005. Les ouaouarons de la rivière Yamaska. Découverte (Radio-Canada). [document audio-visuel].
- Ramp, U., Gerharz, CD, Eifler, E., Biesalski, HK, Gabbert, HE. 1994. Effects of retinoic acid metabolites on proliferation and differentiation of the clonal rhabdomyosarcoma cell line BA-HAN-1C. *Biology of the Cell* 81(1):31-37.

- Roberts, A.B., Nichols, MD, Newton, DL, Sporn, MB. 1979. *In vitro* metabolism of retinoic acid in hamster intestine and liver. *Journal of Biological Chemistry* 254:6296-6302.
- Roberts, W.K., Sell, J.L. 1963. Vitamin A Destruction by Nitrite *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of Animal Science* 22:1081-1085.
- Rubin, M., Fenig, E., Rosenauer, A., Menendez-Botet, C., Achkar, C., Bentel, JM, Yahalom, J., Mendelsohn, J., Miller Jr, WH. 1994. 9-cis Retinoic Acid Inhibits Growth of Breast Cancer Cells and Down-Regulates Estrogen Receptor RNA and Protein. *Cancer Research* 54:6549-6556.
- Seeley, M.R., Faustman, E.M. 1998. Evaluation of P19 cells for studying mechanisms of developmental toxicity: applications to four direct-acting alkylating agents. *Toxicology* 127:49-58.
- Séguin-Devaux, C., Devaux, Y., Latger-Cannard, V., Grosjean, S., Rochette-Egly, C., Zannad, F., Meistelman, C., Mertes, P.-M., Longrois, D. 2002. Enhancement of the inducible NO synthase activation by retinoic acid is mimicked by RAR α agonist in vivo. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 283: E525-E535.
- Sessions, S.K., Ruth, S.B. 1990. Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *The Journal of Experimental Zoology* 254(1):38-47.
- Sessler, R.J., Noy, N. 2005. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Molecular Cell* 18:343-353.
- Shimada, T. 1989. Lack of teratogenic and mutagenic effects of nitrite on mouse fetuses. *Archives of Environmental Health* 41(1):59-63.
- Simard, A. 2000. Portrait global de la qualité des eaux au Québec. Ministère de l'Environnement (Québec).
- Smith, S.C., Reuhl, K.R., Craig, J., McBurney, M.W. 1987. The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology*. 131:74-84.
- Sonneveld, E., van den Brink, C.E., Tertoolen, L.G.J., van der Burg, B., van der Saag, P.T. 1999. Retinoic Acid Hydroxylase (CYP26) Is a Key Enzyme in Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Developmental Biology* 213:390-404.
- Sullivan, K.B., Spence, K.M. 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(3):627-635.

- Sundin, O., Eichele, G. 1992. An early marker of axial pattern in the chick embryo and its respecification by retinoic acid. *Development* 114:841-852.
- Teixeira, C.C., Ischiropoulos, H., Leboy, P.S., Adams, S.L., Shapiro, I.M. 2005. Nitric oxide-nitric oxide synthase regulates key maturational events during chondrocyte terminal differentiation. *Bone* 37:37-45.
- Taylor, B., Skelly, D., Demarchis, L.K. 1995. Proximity to Pollution Sources and Risk of Amphibian Limb Malformation. *Environmental Health Perspectives* 113(11):1497-1501.
- Thaller, C., Eichele, G. 1996. Retinoid signaling in vertebrate limb development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 785:1-11.
- Vandenlangenberg, S.M., Canfield, J.T., Magner, J.A. 2003. A Regional Survey of Malformed Frogs in Minnesota (USA) (Minnesota Malformed Frogs). *Environmental Monitoring and Assessment* 82(1):45-61.
- Waliszewski, P., Waliszewska, M., Gordon, N., Hurst, R.E., Benbrook, D.M., Dhar, A., Hemstreet, G.P. 3rd. 1999. Retinoid signaling in immortalized and carcinoma-derived human uroepithelial cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 148:55-65.
- White, S.R., Williams, P., Wojcik, K.R., Sun, S., Hiemstra, P.S., Rabe, K.F., Dorscheid, D.R. 2001. Initiation of Apoptosis by Actin Cytoskeletal Derangement in Human Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24(3):282-294.
- Williams, J.B., Napoli, J.L. 1985. Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:4658-4662.
- Williams, J.B., Napoli, J.L. 1987. Inhibition of retinoic acid metabolism by imidazole antimycotics in F9 embryonal carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 36(8):1386-1388.
- Zile, M.H. 1998. Symposium: Functional Metabolism of Vitamin A in Embryonic Development. *Journal of Nutrition* 128:455S-458S.
- Zile, M.H. 2001. Function of Vitamin A in Vertebrate Embryonic Development. *Journal of Nutrition* 131:705-708.