

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PERTURBATION DU CATABOLISME DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE PAR DES
PESTICIDES DANS DEUX LIGNÉES CELLULAIRES HÉPATIQUES DE
POISSON : SCÉNARIO PLAUSIBLE POUR LA PERCHAUDE DU
LAC SAINT-PIERRE ?

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
CHARBEL HANNA

MAI 2021

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.04-2020). 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.»

REMERCIEMENTS

Je remercie du fond du cœur ma directrice de recherche, Mme Catherine Jumarie. Sa sagesse, sa générosité et son dévouement sont sans pareil. Elle a été pour moi non seulement un maître, mais également un modèle hors pair. Elle m'a guidé à travers toutes les étapes de mon projet et, dans sa patience infinie, a supporté mes innombrables petites questions. Elle m'a enseigné les fondements d'une méthode scientifique rigoureuse et a jeté les fondations du biologiste que je deviens. Pour cela, je lui en serai éternellement reconnaissant.

Je remercie tout aussi chaleureusement ma codirectrice de recherche, Mme Monique Boily. Son regard perçant, son souci de la qualité et sa rigueur m'ont poussé à donner sans cesse le meilleur de moi-même et à constamment me dépasser. Sa patience, sa gentillesse et sa passion m'ont accompagné tout au long du projet. Elle m'a inculqué le souci du détail, le sens du travail acharné et le dépassement de soi, et a forgé le scientifique que je deviens. Je lui en serai pour toujours reconnaissant.

Je remercie également tous mes collègues, dont l'aide généreuse et les conseils judicieux m'ont sans cesse permis de progresser. Je remercie Carla Mahé, qui m'a très patiemment formé à la chromatographie liquide à haute performance et qui a enrichi toujours davantage ma réflexion par son esprit affûté, ainsi que Myriam Mireault et Daphnée Gariépy pour leurs judicieux conseils en ce qui a trait à la culture cellulaire et à la panoplie d'analyses biochimiques que j'ai entreprises. Je remercie aussi Yannick Arnold Nombre, Alex Grenier et tous mes collègues du TOXEN pour les conversations enrichissantes et les encouragements incessants.

Je remercie infiniment mon épouse, mon pilier, ma confidente. Elle a été pour moi une source intarissable de support, d'encouragements et de réconfort, et m'a sans cesse poussé à aller au bout de mes rêves et de mes ambitions. Je remercie tout autant mes parents, qui m'ont soutenu à travers ces années, m'ont supporté dans mes projets et, par leurs sacrifices, ont rendu possible toute cette épopée. Je remercie également ma sœur, dont la curiosité insatiable a animé tant de discussions sur mon projet et qui, depuis toujours, a cru en moi. Je remercie aussi tous mes amis, qui m'ont encouragé toutes ces années.

Finalement, je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, le Fonds de recherche Nature et technologies Québec, la Fondation de l'UQÀM, la Faculté des sciences de l'UQÀM et le Chapitre Saint-Laurent pour leur soutien financier.

Du fond du cœur, je remercie toutes ces personnes, sans qui un tel projet aurait été impensable.

Interroge les bêtes, elles t'instruiront, les oiseaux du ciel, ils te l'apprendront;
Parle à la terre, elle t'instruira; et les poissons de la mer te le raconteront.

Job 12, 7-8

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Le déclin des perchaudes du lac Saint-Pierre	3
1.2 Toxicité des pesticides étudiés	5
1.3 Les rétinoïdes	7
1.4 Le stress oxydatif	12
1.5 L'état de santé des perchaudes du lac Saint-Pierre	14
1.6 Lignées cellulaires et modèles <i>in vitro</i>.....	16
1.7 Problématique, objectif et hypothèse.....	17
CHAPITRE II PESTICIDES INHIBIT RETINOIC ACID CATABOLISM IN TWO FISH HEPATIC CELL LINES	21
2.1 Abstract	22
2.2 Introduction	23
2.3 Materials and methods.....	27
2.3.1 Chemicals.....	27
2.3.2 Cell culture	28
2.3.3 MTT cell viability assay	29
2.3.4 Intracellular thiol content determination	29
2.3.5 Lipid peroxidation determination – TBARS.....	30

2.3.6 Co-exposure of cells to <i>at</i>-RA and CYP450 inhibitors	31
2.3.7 Co-exposure of cells to <i>at</i>-RA and pesticides with or without NAC.....	32
2.3.8 Retinoid extraction and high-performance liquid chromatography ...	33
2.3.9 Total protein content determination	34
2.3.10 Triglyceride content determination	34
2.3.11 Statistical analysis	35
2.4 Results.....	38
2.4.1 Contribution of CYP26A1 in the catabolism of RA in fish hepatic cell lines.....	38
2.4.2 Effect of pesticides on cell viability	42
2.4.3 Perturbation of RA catabolism by pesticides	44
2.4.4 Oxidative stress: intracellular thiols and lipid peroxidation	47
2.4.5 Implication of oxidative stress in the perturbation of RA catabolism by pesticides	49
2.4.6 Retinoic acid isomerization after pesticide exposure.....	54
2.5 Discussion	57
2.6 Conclusion	66
2.7 References	67
CHAPITRE III DISCUSSION	73
3.1 Contexte de l'étude	73
3.2 Retour sur certains résultats	74
3.3 Des lignées cellulaires aux perchaudes du lac Saint-Pierre	76
3.4 Perspectives de recherche	79
CONCLUSION.....	86
ANNEXE A FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	87
RÉFÉRENCES.....	100

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 – Métabolisme du rétinol, conversion en acide rétinoïque et dégradation..	10
Figure 1.2 – Réactions oxydatives dans le métabolisme du rétinol.....	12
Figure 1.3 – Stimulation suggérée du catabolisme de l'acide rétinoïque par des pesticides provoquant une sur-mobilisation des esters de rétinol.....	20
Figure 2.1 – Metabolic pathway of retinoids and the possible consequence of pesticides on retinoic acid catabolism by CYP26A1.....	26
Figure 2.2 – Chromatograms of 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA, 13- <i>cis</i> -RA, 9- <i>cis</i> -RA, and <i>at</i> -RA in fish hepatic cell lines.....	39
Figure 2.3 – Inhibition of RA catabolism in PLHC-1 cells by two CYP450 inhibitors.....	40
Figure 2.4 – Inhibition of RA catabolism in ZFL cells by two CYP450 inhibitors....	41
Figure 2.5 – Concentration-response curves of PLHC-1 and ZFL cell lines exposed to atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam.....	43
Figure 2.6 – Retinoic acid and 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA kinetics in PLHC-1 cells after pesticide exposure.....	45
Figure 2.7 – Retinoic acid and 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA kinetics in ZFL cells after pesticide exposure.....	46
Figure 2.8 – Thiol variations and lipid peroxidation in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure.....	48
Figure 2.9 – Rescue effect of the antioxidant NAC on RA catabolism after pesticide exposure in PLHC-1 cells.....	51
Figure 2.10 – Rescue effect of the antioxidant NAC on RA catabolism after pesticide exposure in ZFL cells (part 1).....	52
Figure 2.10 – Rescue effect of the antioxidant NAC on RA catabolism after pesticide exposure in ZFL cells (part 2).....	53
Figure 2.11 – Proportion of each isomer of RA in PLHC-1 and ZFL cells exposed to pesticides.....	56
Figure 2.12 – Suggested pathways for the formation and catabolism of 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA in fish hepatic cell lines.....	58

Figure 3.1 – Viabilité des cellules PLHC-1 et ZFL après 1 et 3 jours d'exposition à des combinaisons d'atrazine, glyphosate, clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame.....	84
Figure S1 – Retinoic acid contents in PLHC-1 cells after CYP450 inhibition.....	88
Figure S2 – Retinoic acid contents in ZFL cells after CYP450 inhibition.....	89
Figure S3 – Protein contents in PLHC-1 and ZFL cells after CYP450 inhibition.....	90
Figure S4 – Retinoic acid and 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA contents in PLHC-1 cells after pesticide exposure.....	91
Figure S5 – Retinoic acid and 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA contents in ZFL cells after pesticide exposure.....	92
Figure S6 – Protein contents in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure.....	93
Figure S7 – Thiol and MDA contents in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure.....	94
Figure S8 – Protein and triglyceride contents in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure.....	95
Figure S9 – Retinoic acid contents in PLHC-1 cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC.....	96
Figure S10 – Retinoic acid and 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA contents in ZFL cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC (part 1).....	97
Figure S10 – Retinoic acid and 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA contents in ZFL cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC (part 2).....	98
Figure S11 – Protein contents in PLHC-1 and ZFL cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC.....	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 – Caractéristiques des lignées cellulaires étudiées.....	16
Table 2.1 – Statistical parameters of the Dirichlet regressions for the proportions of each isomer of RA in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure over time.....	55
Tableau 3.1 – Inhibiteurs spécifiques d'enzymes du cytochrome P450.....	80

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

4-OH-AR	4-hydroxy-acide rétinoïque
4-OH-RA	4-hydroxy-retinoic acid
4-oxo-AR	4-oxo-acide rétinoïque
4-oxo-RA	4-oxo-retinoic acid
5,6-époxy-AR	5,6-époxy-acide rétinoïque
9- <i>cis</i> -AR	9- <i>cis</i> -acide rétinoïque
9- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -retinoic acid
13- <i>cis</i> -4-oxo-AR	13- <i>cis</i> -4-oxo-acide rétinoïque
13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	13- <i>cis</i> -4-oxo-retinoic acid
13- <i>cis</i> -AR	13- <i>cis</i> -acide rétinoïque
13- <i>cis</i> -RA	13- <i>cis</i> -retinoic acid
18-OH-AR	18-hydroxy-acide rétinoïque
at-4-oxo-RA	All- <i>trans</i> -4-oxo-retinoic acid
at-RA	All- <i>trans</i> -retinoic acid
tt-4-oxo-AR	Tout- <i>trans</i> -4-oxo-acide rétinoïque
tt-AR	Tout- <i>trans</i> -acide rétinoïque
AIC	Akaike information criterion
ARAT	Acyl-CoA : retinol acyltransferase
BHT	Butylated hydroxytoluene
CRABP I	Cellular retinoic acid-binding protein I
CRABP II	Cellular retinoic acid-binding protein II
CRBP I	Cellular retinol-binding protein I
CRBP II	Cellular retinol-binding protein II
CVAC	Critère de protection de la vie aquatique – effet chronique
CYP450	Cytochrome P450
DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
DCFH-DA	Diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle minimum essential medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPAL	Palmitate de 3,4-didéhydrorétinol; 3,4-didehydroretinol palmitate
DRAL	3,4-didehydroretinaldehyde
DROH	3,4-didéhydrorétinol; 3,4-didehydroretinol
DTNB	5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EMEM	Earle's salts minimum essential medium
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
F-12	F-12 nutrient mixture
FBS	Fetal bovine serum
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase

GSH	Glutathion réduit; reduced glutathione
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
HBP	High-density lipoprotein-binding protein
HER	Hydrolase des esters de rétinol
HPLC	High-performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
L-15	Leibovitz's L-15 medium
LRAT	Lecithin retinol acyltransferase
MDA	Malonaldéhyde; malonaldehyde
MDDEP	Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs
MFFP	Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs
NAC	N-acetylcysteine
PAL	Retinol palmitate
PBS	Phosphate-buffer saline
PLHC-1	<i>Poeciliopsis lucida</i> hepatocellular carcinoma-1
RA	Retinoic acid
RAL	Retinaldehyde
RALDH	Retinaldehyde dehydrogenase
RAR	Récepteurs à acide rétinoïque; retinoic acid receptors
RBP	Retinol-binding protein
REH	Retinol esters hydrolase
ROH	Rétinol; retinol
ROLDH	Retinol dehydrogenase
RXR	Récepteurs X des rétinoïdes; retinoid X receptors
SD	Standard deviation
SDR	Short-chain dehydrogenases/reductases
SOD	Superoxyde dismutase
TTR	Transthyréline
ZFL	Zebrafish liver

RÉSUMÉ

La population jadis prospère de perchaudes (*Perca flavescens*) du lac Saint-Pierre (QC, Canada) connaît un déclin dramatique depuis le milieu des années 1990. L'exploitation agricole de la plaine inondable et la piètre qualité de l'eau sont en partie responsables du déclin. En effet, 21 pesticides sont détectés dans le lac. Depuis l'instauration du premier moratoire sur la pêche commerciale et sportive en 2012, la population de perchaudes a connu un faible essor, ralenti toutefois par l'échec de recrutement : les jeunes perchaudes n'atteignent pas la taille nécessaire pour survivre à leur premier hiver. Les rétinoïdes (vitamine A et ses dérivés) sont essentiels au développement embryonnaire et à la croissance, et une perturbation de leur physiologie est embryotoxique, tératogène et hépatotoxique. Or, les niveaux hépatiques de rétinoïdes sont diminués chez les perchaudes du lac Saint-Pierre. Néanmoins, nous ignorons si ces diminutions sont dues à une altération du métabolisme des rétinoïdes par les pesticides. Mon objectif est donc d'évaluer l'effet d'herbicides et d'insecticides néonicotinoïdes sur le catabolisme de l'acide rétinoïque dans deux lignées cellulaires hépatiques de poisson. Mon hypothèse veut que l'exposition aux pesticides augmente le catabolisme de l'acide rétinoïque par le biais d'un stress oxydatif qui entraîne l'oxydation de l'acide rétinoïque.

En premier lieu, le catabolisme de l'acide rétinoïque a été caractérisé dans les lignées cellulaires hépatiques ichtyennes PLHC-1 et ZFL, et la contribution du CYP26A1 dans ce catabolisme a été évaluée à l'aide d'inhibiteurs du CYP450 : le talarozole, un inhibiteur spécifique du CYP26A1, et le kétoconazole, un inhibiteur généraliste du CYP450. Ensuite, l'effet des pesticides sur le catabolisme de l'acide rétinoïque a été étudié en exposant les cellules à deux herbicides et à trois insecticides néonicotinoïdes, en l'occurrence Aatrex® (atrazine), Credit Xtreme® (glyphosate), Titan® (clothianidine), Admire® (imidaclopride) et Actara® (thiaméthoxame). Puis, les thiols intracellulaires et la peroxydation des lipides, deux biomarqueurs de stress oxydatif, ont été mesurés dans les cellules exposées à ces pesticides. Subséquemment, le lien de causalité entre la perturbation du catabolisme de l'acide rétinoïque et le stress oxydatif a été examiné en tentant un effet de sauvetage sur le catabolisme perturbé, à l'aide de l'agent antioxydant N-acétylcystéine. Finalement, l'effet des pesticides sur l'isomérisation de l'acide rétinoïque à travers le temps a été étudié.

Les pesticides inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque. L'atrazine, l'imidaclorpride et le thiaméthoxame causent cette inhibition par le biais d'un stress oxydatif. Les pesticides affectent également l'isomérisation de l'acide rétinoïque à travers le temps,

particulièrement dans les cellules PLHC-1. Ces résultats suggèrent une possible perturbation du catabolisme de l'acide rétinoïque chez les poissons vivant dans des eaux contaminées par des pesticides. Cette perturbation du métabolisme des rétinoïdes est fort inquiétante, considérant leur implication dans de nombreuses voies physiologiques et leur rôle primordial dans le développement de l'organisme. Mon projet de recherche aura donc permis de proposer un mécanisme de toxicité des pesticides sur le métabolisme des rétinoïdes chez les perchaudes du lac Saint-Pierre.

Mots-clés : acide rétinoïque, 4-oxo-acide rétinoïque, pesticides, herbicides, insecticides néonicotinoïdes, CYP26A1, talarozole, kéroconazole, stress oxydatif, N-acétylcystéine, isomérisation, chromatographie liquide à haute performance

INTRODUCTION

La population de perchaudes (*Perca flavescens*) du lac Saint-Pierre connaît un déclin dramatique depuis le milieu des années 1990 (de la Chenelière *et al.*, 2014). Les mesures restreignant la pêche commerciale et sportive, adoptées entre 1997 et 2012, n'ayant pas porté fruit (de la Chenelière *et al.*, 2014), un moratoire de cinq ans sur la pêche de la perchaude dans le lac Saint-Pierre a été imposé en 2012, puis reconduit en 2017 pour cinq autres années (MFFP, 2012, 2017). Le moratoire a permis de freiner le déclin, mais la population ne se rétablit pas (de la Chenelière *et al.*, 2014). Le déclin enregistré chez d'autres espèces, soient le grand brochet (*Esox lucius*), le crapet de roche (*Ambloplites rupestris*), le crapet-soleil (*Lepomis gibbosus*) et le méné à tache noire (*Notropis hudsonius*), exclue l'hypothèse de la pêche intensive comme seule responsable de l'effondrement (Brodeur, 2013). L'exploitation agricole de la plaine inondable nécessaire à la fraie, la compétition avec des espèces exotiques, la prédatation des individus juvéniles et la contamination de l'eau constituent autant d'obstacles au rétablissement de la population (de la Chenelière *et al.*, 2014). De plus, la croissance des jeunes perchaudes est réduite, ce qui augmente la mortalité juvénile et diminue le recrutement (Magnan *et al.*, 2017).

Les tributaires du lac Saint-Pierre drainent la moitié des terres agricoles du Québec (MDDEP, 2012), entraînant dans le lac des contaminants d'origine agricole, notamment des herbicides et des insecticides néonicotinoïdes dont les niveaux mesurés dans le lac et dans ses tributaires dépassent le critère de qualité de l'eau pour la protection des espèces aquatiques – effet chronique (Giroux *et al.*, 2016). Or, des perturbations du métabolisme des rétinoïdes chez les animaux exposés à des pesticides ont été répertoriées (Novák *et al.*, 2008). De plus, des études menées dans des sites

contaminés de l'écosystème du fleuve Saint-Laurent ont mis en lumière des perturbations du profil des rétinoïdes chez différentes espèces animales (Branchaud *et al.*, 1995; Champoux *et al.*, 2002; Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005; Champoux *et al.*, 2006; Boily *et al.*, 2009; Bruneau *et al.*, 2016; Giraudo *et al.*, 2016; Landry *et al.*, 2017, 2020). Quant à elles, les perchaudes du lac Saint-Pierre ont une moins bonne condition physique et leurs tissus contiennent moins de lycopènes que les perchaudes en amont du lac. De plus, et elles mobilisent davantage leurs réserves de rétinoïdes (Giraudo *et al.*, 2016; Landry *et al.*, 2017).

Il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* d'étude du métabolisme des rétinoïdes chez le poisson. Or, des lignées cellulaires hépatiques de poisson sont disponibles, notamment PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma-1) et ZFL (Zebrafish liver). Caractériser le métabolisme de l'acide rétinoïque dans ces lignées cellulaires nous permettra de mettre au point un modèle *in vitro* pour l'étude du métabolisme des rétinoïdes chez le poisson. Ensuite, l'étude des perturbations de ce métabolisme par des herbicides et par des insecticides néonicotinoïdes nous permettra de mieux comprendre les causes des altérations du statut des rétinoïdes observées chez les perchaudes du lac Saint-Pierre.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le déclin des perchaudes du lac Saint-Pierre

Le lac Saint-Pierre est un haut lieu de pêche. Elle y était déjà pratiquée en 1871, mais la pêche à la perchaude ne s'est intensifiée que dans les années 1970 (Guénette *et al.*, 1994; Morneau, 2000). À partir de 1995, une chute importante de l'abondance de la population de perchaudes a été enregistrée (Mailhot, 1999). Pour freiner le déclin, plusieurs mesures limitant les quotas de pêche commerciale et sportive ont été adoptées entre 1997 et 2012, mais ces mesures se sont avérées insuffisantes (Mailhot, 1997; Thibault, 1999; Magnan *et al.*, 2017), ce qui poussa le Ministère de la Faune, des Forêts et des Parcs du Québec (MFFP) à décréter, le 4 mai 2012, un moratoire sur toutes formes de pêche à la perchaude dans le lac Saint-Pierre pour une durée de cinq ans, puis à reconduire ce moratoire, le 2 mai 2017, pour cinq années supplémentaires (MFFP, 2012, 2017).

Depuis l'instauration du premier moratoire en 2012, la population de perchaudes connaît un certain essor, mais qui demeure mitigé. D'une part, l'abondance globale des perchaudes est en hausse et le taux de mortalité a baissé de 8 % depuis 2012. D'autre part, l'abondance des perchaudes juvéniles, âgés d'un et de deux ans, stagne à des niveaux très bas et la distribution spatiale des individus juvéniles est nettement moins

étendue que par le passé (Magnan *et al.*, 2017). Ces données témoignent du succès du moratoire à protéger les individus matures et les tranches d’âge supérieures, mais indiquent un échec du recrutement mis en évidence par la faible abondance des individus juvéniles, dont la taille à la fin du premier été demeure faible depuis 2002. En somme, même si la population ne décline pas comme par le passé, elle peine toujours à se rétablir (Magnan *et al.*, 2017).

Différentes causes du déclin des perchaudes du lac Saint-Pierre ont été identifiées, notamment la pêche intensive, l’exploitation agricole de la plaine inondable et la piètre qualité de l’eau, qui est affectée par les activités agricoles (Fecteau et Poissant, 2001; Magnan, 2002; de la Chenelière *et al.*, 2014). En effet, les tributaires majeurs du lac Saint-Pierre, soit les rivières Yamaska, Saint-François et Nicolet au sud, et les rivières Maskinongé, du Loup et Yamachiche au nord, drainent les eaux en provenance de plus de la moitié des terres agricoles de la Belle Province (de la Chenelière *et al.*, 2014).

On détecte 21 pesticides dans le lac Saint-Pierre et 8 à 21 pesticides dans ses tributaires. Les tributaires de la rive sud présentent davantage de pesticides, et en plus grandes concentrations, que ceux de la rive nord. La rivière Yamaska est le tributaire le plus contaminé : 21 pesticides y ont été détectés entre 2012 et 2014 (Giroux *et al.*, 2016). Dans les tributaires du lac Saint-Pierre, les concentrations des insecticides néonicotinoïdes clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame dépassent de 13 à 71 fois le critère de protection de la vie aquatique – effet chronique (CVAC; 8,3 ng/L), et les concentrations de l’herbicide atrazine sont presque doubles au CVAC (1,8 µg/L). Dans le lac Saint-Pierre, les niveaux de clothianidine et de thiaméthoxame dépassent de 9 à 29 fois les CVAC, le niveau d’atrazine atteint le CVAC et l’imidaclopride n’y a pas été analysé. C’est encore la portion sud qui est la plus contaminée (Giroux *et al.*, 2016). Les pesticides atteignent leurs concentrations maximales au mois de juin

(Giroux *et al.*, 2016), peu après l'éclosion des œufs de perchaude (Bernatchez et Giroux, 2000). Finalement, l'usage de l'herbicide glyphosate est en hausse dans les terres agricoles du bassin versant du lac Saint-Pierre. Sa concentration augmente dans les rivières Chibouet et Saint-Zéphirin, tributaires des rivières Yamaska et Nicolet, depuis respectivement 2002 et 2005 (MDDEP, 2012). Cet herbicide remplace graduellement l'atrazine, dont les concentrations dans les mêmes rivières diminuent depuis 1992 (MDDEP, 2012).

1.2 Toxicité des pesticides étudiés

Le clothianidine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame sont des agonistes de l'acétylcholine, un neurotransmetteur endogène des récepteurs nicotiniques. Cependant, contrairement à l'acétylcholine, les néonicotinoïdes ne sont pas dégradés par l'acétylcholinestérase. Ils se lient donc irréversiblement aux récepteurs cholinergiques nicotiniques et provoquent une surstimulation de ces récepteurs, entraînant la paralysie et la mort (Wang *et al.*, 2018). Notons au passage que le clothianidine constitue un des produits de la métabolisation du thiaméthoxame par le CYP3A4 (Casida, 2011).

L'atrazine compte parmi les trois herbicides les plus utilisés sur la planète, les deux autres étant le glyphosate et le 2,4-D (Hayes et Hansen, 2017). Chez les poissons, les amphibiens et les reptiles, l'atrazine est un perturbateur endocrinien. Il augmente l'expression de l'aromatase, ou CYP19, entraînant une hausse de l'estriadiol et une baisse de la testostérone dans le plasma. Cette altération des ratios d'hormones sexuelles se traduit par une démasculinisation et une féminisation des mâles, ainsi qu'une baisse de la production spermatique (Hayes *et al.*, 2002a, 2002b, 2004, 2006,

2010; Hayes et Hansen, 2017). L’atrazine est aussi connu pour stimuler la peroxydation des lipides chez le poisson (Nwani *et al.*, 2010).

Le glyphosate compte parmi les trois herbicides les plus utilisés au niveau mondial (Hayes et Hansen, 2017). Il s’agit d’un dérivé de la glycine qui inhibe la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (Amrhein *et al.*, 1980), enzyme qui synthétise la chorismate (base conjuguée de l’acide chorismique), un intermédiaire de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane. Cette voie métabolique étant absente chez les vertébrés, le glyphosate était, il y a quelques années, perçu comme un herbicide sûr et sécuritaire (Williams *et al.*, 2012). Reclassifié comme produit de catégorie 2A, c’est-à-dire probablement cancérogène chez l’humain (IARC, 2015), ses formulations commerciales (dans lesquelles le glyphosate est couplé à des adjuvants facilitant son absorption dans le tissu végétal) sont aujourd’hui connues pour leur toxicité chez les animaux. Il est, comme l’atrazine, un perturbateur endocrinien. En effet, le Round Up® (une des formulations commerciales du glyphosate) inhibe l’expression et l’activité de l’aromatase dans le tissu testiculaire équin, dans les cellules embryonnaires hépatiques et dans les cellules et tissus placentaires, par inhibition compétitive, en interagissant directement avec le site actif de l’aromatase, et il diminue la production spermatique (Cassault-Meyer *et al.*, 2014; Richard *et al.*, 2005; Benachour *et al.*, 2007). Il cause également de la peroxydation des lipides (Nwani *et al.*, 2013). Finalement, quoiqu’il ne soit généralement pas considéré génotoxique, compte tenu des publications recensées par Williams *et al.* (2000) et par Kier et Kirkland (2013), le glyphosate augmenterait la fréquence de micronoyaux chez les poissons *Tilapia rendalii*, *Prochilodus lineatus* et *Carassius auratus* (Grisolia, 2002; Çavaş et Könen, 2007; Cavalcante *et al.*, 2008).

La contamination de l'eau du lac Saint-Pierre par ces cinq pesticides pourrait perturber le métabolisme des rétinoïdes chez les poissons, affectant ainsi la croissance et la survie des jeunes perchaudes.

1.3 Les rétinoïdes

Les rétinoïdes désignent la vitamine A, ou rétinol (ROH), ainsi que ses dérivés (Ross *et al.*, 2000; Patel, 2012). Ils jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques, notamment la reproduction, le développement, l'immunité et la vision (Ross *et al.*, 2000). Certains rétinoïdes et leurs précurseurs, les caroténoïdes, sont impliqués dans la défense antioxydante (Ross *et al.*, 2000; Slaninova *et al.*, 2009). Chez plusieurs espèces de poissons d'eau douce, dont la perchaude, la forme 3,4-didéhydrorétinol (DROH) prime sur la forme ROH. Le DROH diffère du ROH par la présence d'un double-lien C₃=C₄ à l'intérieur du cycle carboné. Il a été observé pour la première fois par Heilbron *et al.* (1931) par colorimétrie et sa structure chimique a été caractérisée par Farrar *et al.* (1952). Il constituerait une adaptation, facilitant notamment la vision en eau douce (Enright *et al.*, 2015; La Frano *et al.*, 2018).

Les principales étapes du métabolisme des rétinoïdes sont résumées dans la figure 1.1. Les animaux sont incapables de produire des rétinoïdes *de novo*. Ils doivent donc les assimiler par leur diète. Souvent, les rétinoïdes sont assimilés sous forme d'esters de rétinol d'origine animale ou sous forme de précurseurs caroténoïdes d'origine végétale, tels que la β-carotène. Durant la digestion, les esters de rétinol et les caroténoïdes sont transformés en ROH. Ce dernier est alors lié à la protéine liant le rétinol cellulaire II (*Cellular retinol-binding protein II*; CRBP II), puis est ensuite estérifié par la lécithine-rétinol acyltransférase (*Lecithin retinol acyltransferase*; LRAT). Lorsque la CRBP II est saturée, l'excès de ROH est estérifié par l'acyl-Coa-rétinol acyltransférase (*Acyl-*

CoA : retinol acyltransferase; ARAT). Dans les deux cas, ces esters de rétinol sont transportés dans des chylomicrons jusqu'au foie (Harrison et Hussain, 2001; Novák *et al.*, 2008).

Dans les cellules parenchymateuses du foie, l'hydrolase des esters de rétinol (HER) convertit les esters de rétinol en ROH et ce dernier se lie à la CRBP I. Si les niveaux plasmatiques de ROH sont suffisants, le ROH hépatique est de nouveau converti en esters de rétinol par la LRAT, puis est entreposé dans les cellules étoilées du foie (cellules de Ito). Inversement, lorsqu'il y a un manque de ROH plasmatique, les esters de rétinol sont convertis en ROH par la HER, puis le ROH est séparé de la CRBP I, lié à la protéine liant le rétinol (*Retinol-binding protein; RBP*) et libéré dans le plasma (Napoli, 1996, 1999; Novák *et al.*, 2008). Dans le foie, la LRAT et la HER agissent donc de façon antagoniste pour maintenir l'équilibre des niveaux plasmatiques de ROH.

La protéine RBP voyage dans le plasma sous forme de complexe avec la transthyréotide (TTR), une protéine qui transporte la thyroxine (T4) (Van Bennekum *et al.*, 2001), quoique certaines isoformes de la RBP de poisson ne se lient pas à la TTR (Folli *et al.*, 2003). Les cellules cibles accumulent le ROH, ou plutôt le complexe RBP-ROH, par un récepteur dont le fonctionnement n'est pas encore parfaitement élucidé : il n'est pas encore clair si l'entrée s'accomplit par le récepteur, ou plutôt par endocytose du complexe récepteur-RBP-ROH (Blomhoff *et al.*, 1990). Quoiqu'il en soit, une petite quantité de ROH libre est en équilibre avec le ROH lié à la RBP, et ce ROH libre entrerait sans l'aide d'un récepteur (Blomhoff *et al.*, 1990). Une petite quantité d'acide rétinoïque est aussi liée à l'albumine et serait transférée à la cellule (Blomhoff *et al.*, 1990). La RBP humaine a presque autant d'affinité pour l'acide rétinoïque que pour le ROH (Goodman et Raz, 1972; Smith *et al.*, 1973). Cela dit, dans une étude portant sur le transport de l'acide rétinoïque plasmatique chez le rat, c'est l'albumine sérique qui

ressortit comme principal responsable du transport de l'acide rétinoïque dans le plasma, tandis que la RBP ne semblait pas transporter d'acide rétinoïque (Smith *et al.*, 1973). La RBP aurait donc une affinité pour l'acide rétinoïque (Goodman et Raz, 1972), sans que cela n'ait d'implication physiologique *in vivo*, à moins d'une différence interspécifique (Smith *et al.*, 1973).

Dans les tissus, le ROH est lié à la CRBP I, puis est oxydé, de manière réversible, en rétinaldéhyde par diverses enzymes : des alcools déshydrogénases telles que la déshydrogénase du rétinol (*retinol dehydrogenase*; ROLDH), des déshydrogénases à courte chaîne (*short-chain dehydrogenases/reductases*; SDR) et des enzymes du cytochrome P450 (CYP450). Ensuite, le rétinaldéhyde est converti, cette fois de manière irréversible, en acide rétinoïque par la déshydrogénase du rétinaldéhyde (*retinaldehyde dehydrogenase*; RALDH) (Marill *et al.*, 2003; Novák *et al.*, 2008). L'acide rétinoïque est la forme active des rétinoïdes (Bastien et Rochette-Egly, 2004).

L'acide rétinoïque peut adopter trois conformations : tout-*trans* (*tt*-AR), 9-*cis* (9-*cis*-AR) et 13-*cis* (13-*cis*-AR). Chaque isomère peut changer de conformation spontanément ou avec l'aide d'une isomérase (Marill *et al.*, 2003; Novák *et al.*, 2008). Il est aussi possible que le 9-*cis*-AR soit produit directement, sans isomérisation du *tt*-AR. En effet, il existe une déshydrogénase du 9-*cis*-rétinol et les adultes, du moins chez le rat, possèdent du 9-*cis*-rétinol (Ross *et al.*, 2000). Dans les cellules, l'acide rétinoïque est lié à la protéine 1 de liaison à l'acide rétinoïque cellulaire (*Cellular retinoic acid-binding protein I*; CRABP I) ou à la CRABP II. Le complexe est ensuite soit transféré au noyau, soit oxydé et inactivé par le CYP450 (Noy, 2000). Les enzymes qui se chargent de la dégradation de l'acide rétinoïque appartiennent aux familles CYP1, 2, 3, 4 et, particulièrement, CYP26 (Novák *et al.*, 2008). D'ailleurs, l'enzyme CYP26A1, principalement responsable du catabolisme de l'acide rétinoïque, est inducible par le *tt*-AR (Novák *et al.*, 2008). Les produits de l'oxydation par les CYP,

principalement le 4-oxo-acide rétinoïque (4-oxo-AR) et le 4-hydroxy-acide rétinoïque (4-OH-AR), sont plus polaires et donc plus facilement excrétés que l'acide rétinoïque (Reijntjes *et al.*, 2005). Toutefois, ces métabolites sont actifs et peuvent induire la transcription de gènes cibles de l'acide rétinoïque (Idres *et al.*, 2002). Leur excrétion est par la suite facilitée par la glucuronidation (Marill *et al.*, 2003).

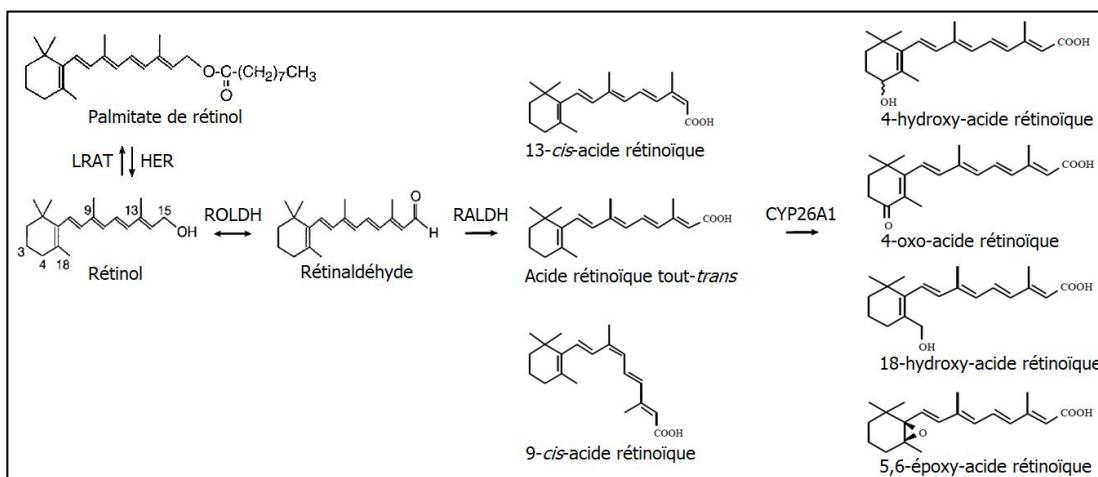


Figure 1.1 – Métabolisme du rétinol, conversion en acide rétinoïque et dégradation

Cette figure a été adaptée principalement de Marill *et al.* (2003), ainsi que de Napoli (1999) et Ross *et al.* (2000).

L'acide rétinoïque active la transcription de gènes en se fixant à des récepteurs nucléaires. Ses mécanismes d'action ont surtout été étudiés chez les vertébrés, particulièrement chez les mammifères. Chez les vertébrés, on lui connaît deux familles de récepteurs : les récepteurs à acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR). Chaque famille comprend trois isoformes : α , β et γ . Les RAR sont activés par le *tt*-AR et le 9-*cis*-AR, tandis que les RXR ne sont activés que par le 9-*cis*-AR (Bastien et Rochette-Egly, 2004; Novák *et al.*, 2008). Le rôle du 13-*cis*-AR n'est pas encore bien élucidé : il limiterait la forme *tt*-AR et activerait faiblement les RAR, mais on

ignore si ce dernier effet n'est pas simplement la conséquence de son isomérisation en *tt*-AR ou en *9-cis*-AR (Veal *et al.*, 2002).

À l'état basal, les récepteurs rétinoïdes sont liés à des corépresseurs (Marill *et al.*, 2003; Novák *et al.*, 2008). La liaison à leur ligand modifie leur conformation, entraînant le relâchement du corépresseur et le recrutement de coactivateurs, à la suite de quoi ils se lient à des éléments de réponse et induisent l'expression de gènes cibles (Love et Gudas, 1994; Vivat *et al.*, 1997; Bastien et Rochette-Egly, 2004; Lemaire *et al.*, 2005; Novák *et al.*, 2008). L'acide rétinoïque induit l'expression de centaines de gènes, incluant des gènes impliqués dans son propre métabolisme, tels que *rar β* , *cyp26*, *crbp* et *crabp*, et des gènes de différenciation et de morphogénèse, tels que les gènes des familles *jun* et *hox* (Balmer et Blomhoff, 2002; Bastien et Rochette-Egly, 2004; Eifert *et al.*, 2006; Novák *et al.*, 2008).

Tant le manque que l'excès de rétinoïdes peuvent avoir de graves répercussions sur le développement embryonnaire et la croissance (Ross *et al.*, 2000). C'est pourquoi les concentrations de ROH et d'acide rétinoïque doivent être finement régulées par l'organisme pendant le développement. Or, les jeunes perchaudes du lac Saint-Pierre souffrent d'un déficit de croissance : elles n'atteignent pas la taille minimale requise pour survivre à leur premier hiver (Magnan *et al.*, 2008), ce qui suggère une possible altération du métabolisme de l'acide rétinoïque. Cette altération pourrait être causée par des contaminants agricoles présents dans le lac Saint-Pierre, notamment par des pesticides. De plus, la conversion du ROH en acide rétinoïque et la dégradation de l'acide rétinoïque constituent des réactions d'oxydation, et ces molécules sont très sensibles à l'oxydation par des agents physico-chimiques (Figure 1.2). Un stress oxydatif, causé par des pesticides, pourrait donc entraîner l'oxydation de ces rétinoïdes et affecter le développement et la croissance des jeunes perchaudes.

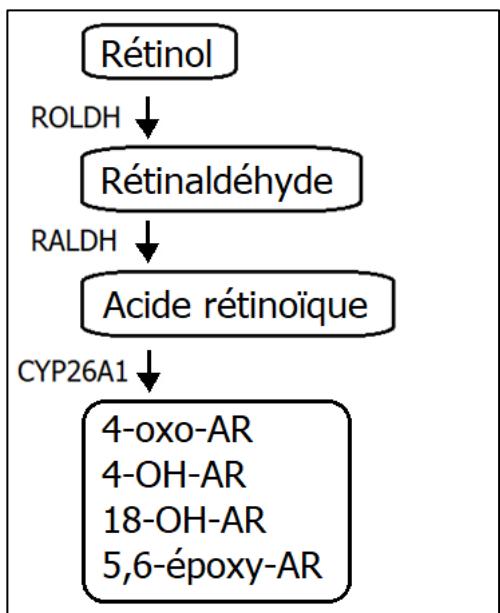


Figure 1.2 – Réactions oxydatives dans le métabolisme du rétinol

1.4 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est inhérent à tout système physiologique usant de l'oxygène pour sa respiration cellulaire. Les réactions d'oxydation génèrent naturellement des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les cellules disposent de mécanismes de défense contre ces ERO (Slaninova *et al.*, 2009). Toutefois, il arrive que la production de ERO dépasse la capacité de ces mécanismes à les neutraliser, phénomène désigné stress oxydatif (Davies, 1995). Les mécanismes de défense antioxydante se classent en deux groupes : les défenses enzymatiques et les molécules antioxydantes.

Les principales enzymes antioxydantes sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase, et les glutathion peroxydases (GPX), réductases (GR) et S-transférases (GST). La SOD convertit l'anion superoxyde (O_2^{2-}), un des principaux ERO, en oxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est aussi un ERO, mais il est moins

toxique que le $O^{2\bullet-}$. D'ailleurs, il est à son tour neutralisé par la catalase et les GPX qui le convertissent en eau (H_2O) et en O_2 (Slaninova *et al.*, 2009).

Les GPX et les GR sont impliquées dans la défense antioxydante par le biais du glutathion réduit (GSH) (Matés *et al.*, 1999). Le GSH est la principale molécule antioxydante : il réduit les ERO, se laissant oxyder par eux, spontanément ou par le biais des GPX. Le GSH réduit un ERO, puis deux GSH oxydés sont jumelés en une molécule de glutathion oxydé (GSSG) qui, par la suite, est à son tour réduite en deux molécules de GSH par la GR (Slaninova *et al.*, 2009). L'acide ascorbique (vitamine C), les tocophérols (composants de la vitamine E), les métallothionéines et les caroténoïdes comptent parmi les molécules antioxydantes (Slaninova *et al.*, 2009). Les caroténoïdes ayant la plus forte activité antioxydante sont le lycopène, le β -carotène, l' α -carotène, la zéaxanthine et la cryptoxanthine (Di Mascio *et al.*, 1989, 1991; Stahl et Sies, 2003). Ces composés neutralisent surtout l'oxygène singulet (1O_2) et les radicaux perhydroxyles (HO_2), des initiateurs de la peroxydation des lipides. La neutralisation du 1O_2 s'accomplit par un mécanisme physique dans 99,95 % des cas : le caroténoïde absorbe l'énergie du 1O_2 et la dissipe dans le solvant environnant (Stahl et Sies, 2003). La neutralisation du HO_2 requiert l'oxydation du caroténoïde (Sies et Stahl, 1995; Stahl et Sies, 2003). Le caractère lipophile des caroténoïdes et leur présence dans les membranes lipidiques leur confèrent un rôle de première importance dans la défense des membranes et des lipoprotéines contre la peroxydation des lipides (Sies et Stahl, 1995).

Un stress oxydatif pourrait affecter le métabolisme des rétinoïdes. D'une part, les caroténoïdes pourraient être détournés de la voie de synthèse du ROH et être exploités pour leurs capacités antioxydantes (sauf le lycopène, qui n'est pas un précurseur du ROH). D'autre part, et c'est plutôt ce mécanisme qui m'intéressera, la conversion du

ROH en acide rétinoïque et la dégradation de ce dernier dépendent de réactions d'oxydation (Novák *et al.*, 2008), qui pourraient être affectées par un stress oxydatif.

1.5 L'état de santé des perchaudes du lac Saint-Pierre

Les perchaudes adultes capturées récemment au lac Saint-Pierre ont une moins bonne condition physique que celles capturées dans les lacs en amont et à l'île Beauregard, située tout juste en aval de la station d'épuration des eaux usées de Montréal (Giraudo *et al.*, 2016; Landry *et al.*, 2017). La faible condition physique des perchaudes du lac Saint-Pierre s'expliquerait peut-être par la présence de contaminants retrouvés au lac Saint-Pierre, mais pas dans l'effluent de la station d'épuration, tels que des contaminants agricoles (Giraudo *et al.*, 2016). Hudon *et al.* (2012) ont indiqué que la perte du couvert macrophytique, la prolifération de cyanobactéries benthiques et la baisse de disponibilité des invertébrés dans le lac seraient les causes de la faible taille et de la mauvaise condition physique des perchaudes juvéniles. À cela s'ajoutent des perturbations dans la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, dont le gène de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et les gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras et dans le transport du cholestérol (Houde *et al.*, 2014; Bruneau *et al.*, 2016; Defo *et al.*, 2018). Ces altérations de transcription de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique pourraient contribuer à la mauvaise condition physique des perchaudes du lac Saint-Pierre, due, du moins en partie, à la contamination du lac ou aux modifications de l'environnement responsables d'un changement de diète (Bruneau *et al.*, 2016).

Outre des gènes du métabolisme énergétique, des gènes de facteurs de transcription et de réponse aux stress sont sur-exprimés, tandis que des gènes impliqués dans l'immunité, la reproduction, l'homéostasie du fer, l'apoptose, la réparation des

dommages à l'ADN, l'oxydation de l'hème et la communication cellulaire sont sous-exprimés (Defo *et al.*, 2018). L'expression de deux gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes, et d'importance capitale pour ma recherche, est également altérée : le gène du CYP26A1 est sur-exprimé et le gène de la ROLDH est sous-exprimé (Defo *et al.*, 2018). La surexpression du gène de CYP26A1 pourrait provoquer une hausse du catabolisme de l'acide rétinoïque.

Les niveaux de l'antioxydant α -tocophérol sont plus bas chez les larves de perchaude du lac Saint-Pierre comparativement aux larves des populations en amont (Landry *et al.*, 2017). Il en va de même pour le lycopène, un autre antioxydant très puissant, chez les perchaudes juvéniles et adultes (Landry *et al.*, 2017, 2020). De plus, le gène de l'aldéhyde déshydrogénase *aldh2*, impliqué entre autres dans la détoxicification des xénobiotiques, est sous-exprimé, ce qui peut réduire les capacités de défense du poisson (Bruneau *et al.*, 2016).

Les niveaux hépatiques de palmitate de DROH (DPAL), une forme d'esters de rétinol, et de β -carotène sont plus bas chez les perchaudes du lac Saint-Pierre (Bruneau *et al.*, 2016; Landry *et al.*, 2017). Cela pourrait être dû à la présence de contaminants, qui augmenteraient possiblement la mobilisation du palmitate de rétinol hépatique et altèreraient la conversion du ROH en esters de rétinol (Zile, 1992; Branchaud *et al.*, 1995; Rolland, 2000), ou à une diète faible en vitamine A (Giraudo *et al.*, 2016). Cependant, aucune différence dans les niveaux de DROH hépatique ou plasmatique n'a été observée (Bruneau *et al.*, 2016; Landry *et al.*, 2017). Il semblerait donc que les perchaudes du lac Saint-Pierre sur-mobilisent leurs réserves de DPAL pour garder les teneurs hépatique et plasmatique de DROH constantes (Landry *et al.*, 2017). Si c'est le cas, un catabolisme excessif de l'acide rétinoïque stimulé par les pesticides pourrait entraîner une pression constante sur les réserves de DPAL.

1.6 Lignées cellulaires et modèles *in vitro*

Les résultats présentés jusqu'à maintenant proviennent toutes de recherches *in vivo*. Il n'existe pour l'heure, à ma connaissance, aucune étude *in vitro* du métabolisme des rétinoïdes dans des lignées cellulaires hépatiques de poisson, ni de modèle cellulaire pour étudier les rétinoïdes chez le poisson. Or, les lignées cellulaires constituent un modèle idéal pour étudier d'une part le métabolisme de l'acide rétinoïque et, d'autre part, les mécanismes d'action des pesticides sur ce métabolisme. Quelques lignées cellulaires hépatiques de poisson sont disponibles, notamment PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma-1) et ZFL (Zebrafish liver). Ces deux lignées sont décrites dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 – Caractéristiques des lignées cellulaires étudiées

Lignée	PLHC-1	ZFL
Organisme	<i>Poeciliopsis lucida</i>	<i>Danio rario</i>
Tissu	Foie	Foie
Morphologie	Épithérial	Épithérial
Âge	Adulte	Adulte
Pathologie	Carcinome hépatocellulaire	Normal

1.7 Problématique, objectif et hypothèse

En somme, les perchaudes vivant dans des zones contaminées du fleuve Saint-Laurent présentent des teneurs altérées de rétinoïdes. Néanmoins, les études d'exposition *in vivo* décrites précédemment ne permettent pas de conclure avec certitude sur la cause exacte de ces altérations. En effet, différents contaminants se retrouvent simultanément dans un cours d'eau contaminé et les données recueillies jusqu'à ce jour ne permettent pas encore d'identifier des contaminants responsables des perturbations des rétinoïdes observées chez les perchaudes du lac Saint-Pierre. Plusieurs études ont déjà mis en lumière des perturbations du système des rétinoïdes à la suite d'une exposition à des pesticides, notamment à des insecticides organochlorés (Novák *et al.*, 2008). Toutefois, peu d'études rapportent des effets des pesticides sur le métabolisme des rétinoïdes chez les poissons. Mon objectif est donc d'étudier l'effet d'herbicides et d'insecticides néonicotinoïdes sur le catabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson.

Le premier sous-objectif de cette recherche est de caractériser le catabolisme de l'acide rétinoïque dans les lignées cellulaires hépatiques ichtyennes PLHC-1 et ZFL, puis d'évaluer la contribution du CYP26A1 dans ce catabolisme. Le deuxième sous-objectif est de caractériser les modifications du catabolisme de l'acide rétinoïque dans ces deux lignées cellulaires à la suite d'une exposition aux formulations commerciales de deux herbicides, Aatrex® (atrazine) et Credit Xtreme® (glyphosate), et de trois insecticides néonicotinoïdes, Titan® (clothianidine), Admire® (imidaclopride) et Actara® (thiaméthoxame). Le troisième sous-objectif est d'évaluer le potentiel oxydatif de ces cinq pesticides dans ces lignées cellulaires. Le quatrième sous-objectif est dépendant des deux précédents : si les pesticides perturbent le catabolisme de l'acide rétinoïque et provoquent un stress oxydatif dans les lignées cellulaires, j'étudierai le lien de causalité entre ces deux phénomènes, afin de déterminer si la perturbation du catabolisme de l'acide rétinoïque est causée par le biais d'un stress oxydatif. Ceci

permettra de mieux comprendre comment les pesticides perturbent le catabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson.

Mon hypothèse veut que les pesticides perturbent le catabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson. Lemaire *et al.* (2005) ont démontré que l'expression du CYP26A1 est inducible par l'endrine, le dieldrine, le chlordane, l'endosulfan et l'aldrine, cinq insecticides organochlorés, qui agissent comme agonistes des récepteurs nucléaires RAR α et RAR β dans les cellules hépatiques humaines HepG2 à la suite d'une exposition de 24 h à 10 μ M, ce qui pourrait se traduire par un catabolisme accru de l'acide rétinoïque. De plus, Chen *et al.* (2009) ont observé un catabolisme accru de l'acide rétinoïque dans des microsomes hépatiques de souris exposées *in vivo* pendant 4 jours à des fongicides conazoles. Par ailleurs, dans le foie de crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*) exposés pendant 4 jours à des concentrations croissantes d'atrazine allant jusqu'à 9 mg/L, le GSH a doublé, le GSSG a quadruplé, le ratio GSH/GSSG a diminué de moitié et le malonaldéhyde (MDA) a augmenté de moitié (Elia *et al.*, 2002). La hausse de GSH et de GSSG et la baisse du ratio GSH/GSSG suggèrent un stress oxydatif et la hausse de MDA indique une peroxydation des lipides (Elia *et al.*, 2002). Aussi, Lushchak *et al.* (2009) ont observé une baisse de l'activité des enzymes antioxydantes SOD et GR dans le foie, le cerveau et le rein, et de GST dans le foie de cyprins doré (*Carassius auratus*) exposés pendant 4 jours à des concentrations croissantes de glyphosate allant jusqu'à 20 mg/L, ce qui suggère aussi un stress oxydatif. De plus, Ge *et al.* (2015) ont observé une hausse de la production d'ERO et de la peroxydation des lipides chez des poissons-zèbres (*Danio rerio*) exposés à 5 mg/L d'imidaclopride pendant 7 à 28 jours. Je prédis donc que les insecticides néonicotinoïdes et les herbicides étudiés provoqueront une hausse du catabolisme de l'acide rétinoïque par le biais d'un stress oxydatif qui entraînera l'oxydation de l'acide rétinoïque.

Bruneau *et al.* (2016) et Landry *et al.* (2017) n'ont observé aucune différence dans les teneurs en DROH hépatique chez les perchaudes du lac Saint-Pierre comparativement à des perchaudes provenant des lacs situés en amont, considérées plus saines. Néanmoins, ces mêmes auteurs ont observé une baisse des teneurs en DPAL dans le foie, ce qui suggère une sur-mobilisation de ces réserves hépatiques, possiblement pour maintenir constantes les teneurs en DROH. Il est possible que la sur-mobilisation du DPAL soit le résultat d'un catabolisme excessif de l'acide rétinoïque, stimulé par les contaminants agricoles (figure 1.3). D'ailleurs, l'oxydation du 13-*cis*-AR en 13-*cis*-4-oxo-AR et en *tt*-4-oxo-AR tend à augmenter dans les microsomes hépatiques de ouaouarons femelles provenant de six sites du bassin versant de la rivière Yamaska, suivant un gradient croissant de contamination agricole (Thibodeau *et al.*, 2012). Aussi, les teneurs plasmatiques en 13-*cis*-4-oxo-AR augmentent avec le gradient de contamination agricole (Thibodeau *et al.*, 2012). Ces perturbations du métabolisme des rétinoïdes pourraient non seulement contribuer au défaut de croissance des perchaudes du lac Saint-Pierre, mais aussi affecter divers processus développementaux et physiologiques, allant d'un système immunitaire affaibli à un risque accru de tératogenèse, en passant par des anomalies oculaires et des troubles reproducteurs (Ross *et al.*, 2000). En somme, une hausse du catabolisme de l'acide rétinoïque dans les lignées cellulaires hépatiques de poissons exposés à des pesticides *in vitro* offrirait une piste d'explication de la problématique du statut des rétinoïdes chez les perchaudes du lac Saint-Pierre.

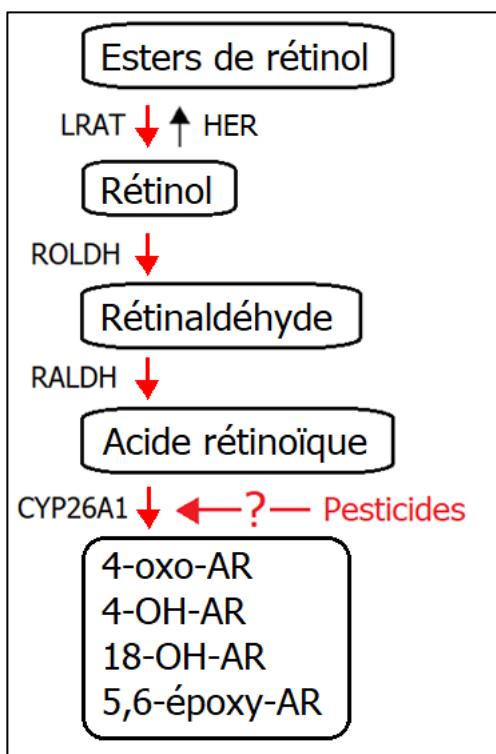


Figure 1.3 – Stimulation suggérée du catabolisme de l'acide rétinoïque par des pesticides provoquant une sur-mobilisation des esters de rétinol

CHAPITRE II

PESTICIDES INHIBIT RETINOIC ACID CATABOLISM IN TWO FISH HEPATIC CELL LINES

Charbel Hanna, Monique Boily et Catherine Jumarie

*Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888,
Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3P8*

2.1 Abstract

The once flourishing population of yellow perch (*Perca flavescens*) in lake Saint-Pierre (QC, Canada) has been dramatically declining since 1995 without any sign of recovery. Retinoid (vitamin A) metabolic pathways are disrupted in yellow perches from lake Saint-Pierre, which is also severely contaminated by pesticides, but we do not know yet if pesticides are themselves disrupting retinoid metabolism in fish. Our study aims at evaluating the impact of herbicides and neonicotinoid insecticides on retinoic acid catabolism in fish hepatic cell lines. We hypothesized that pesticides accelerate the catabolism of retinoic acid through an oxidative stress that exacerbates the oxidation of retinoic acid. First, the relative importance of CYP26A1 in the catabolism of retinoic acid was evaluated in fish hepatic cell lines PLHC-1 and ZFL through a co-exposition to all-*trans*-retinoic acid and either talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, or ketoconazole, a generalist inhibitor of cytochrome P450 enzymes. Then, the impacts of pesticides on retinoic acid catabolism were evaluated by treating cells with all-*trans*-retinoic acid and with two herbicides and three neonicotinoid insecticides, namely Aatrex® (atrazine), Credit Xtreme® (glyphosate), Titan® (clothianidin), Admire® (imidacloprid), and Actara® (thiamethoxam). Afterwards, intracellular thiols and lipid peroxidation, two biomarkers of oxidative stress, were measured following pesticide exposure. Subsequently, the causal relation between oxidative stress and the perturbation of retinoic acid catabolism was investigated by attempting to rescue the disrupted catabolism with N-acetylcysteine, an antioxidant. Lastly, the impacts of pesticides on the isomerization of all-*trans*-retinoic acid over time were studied. Pesticides inhibit retinoic acid catabolism, and atrazine, imidacloprid, and thiamethoxam do so through an oxidative stress. Pesticides also affect the isomerization of all-*trans*-retinoic acid over time, especially in PLHC-1 cells. All in all, these results hint at a possible perturbation of retinoic acid catabolism in fish living in pesticides-contaminated waters, as suggested by several *in vivo* studies. Such a disruption of retinoid metabolism is quite worrying, given the numerous physiological pathways driven by retinoids.

Keywords: retinoic acid, 4-oxo-retinoic acid, pesticides, herbicides, neonicotinoid insecticides, CYP26A1, talarozole, ketoconazole, oxidative stress, N-acetylcysteine, isomerization, HPLC

2.2 Introduction

Yellow perch (*Perca flavescens*) is an emblematic fish of lake Saint-Pierre (QC, Canada), quite popular among commercial and sport fishers. However, in 1995, the population's abundance drastically dropped, until it reached an alarmingly low abundance in the early 2000s, and the population has not recovered since (de la Chenelière et al., 2014; Magnan et al., 2017). To halt the decline, several measures were adopted between 1997 and 2012, aiming at restricting fisheries, notably through an overgrowing severity of quotas, but to no avail (Mailhot, 1997; Magnan et al., 2017). To protect what remains of the population, a five years moratory on all forms of yellow perch fishing was adopted on May 4th, 2012 by the Ministry of Fauna, Forests, and Parcs of Quebec (MFFP, 2012), and was reconducted for five additional years on May 2nd, 2017 (MFFP, 2017).

Many causes for the abrupt decline were identified, notably intensive fishing, agricultural exploitation of the lake's floodplain, which is essential to perch's spawning, and poor water quality (de la Chenelière et al., 2014). Indeed, up to 21 pesticides were detected in the lake and in its tributaries, especially the southern ones, which go through Quebec's largest agricultural area (Giroux et al., 2016). Concentrations of clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam exceeded their criteria for the protection of aquatic life – chronic effect (CVAC; 8.3 ng/L), and the concentration of atrazine equaled the CVAC (1.8 µg/L) established for this herbicide (Giroux et al., 2016). Additionally, the concentrations of glyphosate have been increasing in the lake's watershed (MDDEP, 2012). Moreover, when measured in lake Saint-Pierre in 2014, the concentrations of pesticides peaked in June (Giroux et al., 2016), a few weeks after the hatching of the eggs (Bernatchez and Giroux, 2000), which may well impact the development and growth of larvae and first-year yellow perch.

As a matter of fact, first-year yellow perch are indeed experiencing a growth deficit that prevents them from attaining the minimal size required for survival through their first winter (Magnan et al., 2017). Consequently, the population fails at recruiting juveniles into the higher age layers, a failure which prevents its growth and maintains it in a state of critically low abundance (Magnan et al., 2017). Given the primordial role of retinoids in growth, we suspect pesticides may impact their metabolism.

The term *retinoids* designates vitamin A and its derivatives (Ross et al., 2000). Animals, being unable to synthesize them *de novo*, take them up from their alimentation, either as vegetal carotenoids or as animal retinol esters (Novák et al., 2008). During digestion, carotenoids are oxidized into retinaldehyde (RAL) or 3,4-didehydroretinaldehyde (DRAL) by a carotenoid oxygenase. These products bind to cellular retinol-binding protein II (CRBP II), to be reduced into retinol (ROH) or 3,4-didehydroretinol (DROH) by a microsomal retinaldehyde reductase. Retinol and DROH are then esterified by lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) or acyl-CoA:retinol acyltransferase (ARAT) into retinol esters or dehydroretinol esters, such as retinol palmitate (PAL) or 3,4-didehydroretinol palmitate (DPAL). These retinol esters are then transported into chylomicrons to the liver, where they are stocked alongside other carotenoids, vitamin E, and dietary lipids (Napoli, 1996; Novák et al., 2008). When the plasmatic level of ROH is low, retinol esters are hydrolyzed into ROH by the retinol esters hydrolase (REH) and sent into the bloodstream, toward the tissues. Inversely, when the plasmatic level of ROH is high, ROH is esterified by LRAT in the liver and stocked there (Napoli, 1996, 1999; Novák et al., 2008).

Retinol is transported in the plasma by the retinol-binding protein (RBP), which then delivers it to cells through an RBP-receptor (Blomhoff et al., 1990), and human RBP affinity for retinoic acid (RA) is almost as much as for ROH *in vitro* (Goodman and Raz, 1972). However, the major *in vivo* transporter of RA appears to be albumin, not

RBP (Smith et al., 1973), and RA bound to albumin might be transferred to the cells (Blomhoff et al., 1990). After entering the cell, ROH is oxidized into RAL by the retinol dehydrogenase (ROLDH), and RAL is again oxidized, this time irreversibly, into RA by retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) (Marill et al., 2003; Novák et al., 2008). Retinoic acid is the active form of retinoids; it penetrates the cell's nucleus and activates the transcription of target genes (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Being cytotoxic, its concentration is finely regulated, and any excess is metabolized. The major catabolic pathway of RA involves an initial hydroxylation into 4-hydroxy-retinoic acid (4-OH-RA) and a subsequent dehydrogenation into 4-oxo-retinoic acid (4-oxo-RA) by the oxidative enzymes of the cytochrome P450 (CYP450), especially CYP26A1 (Reijntjes et al., 2005; Novák et al., 2008). The metabolites, being more polar, are more easily excreted, although they still possess some biological activity, especially all-*trans*-4-oxo-RA (*at*-4-oxo-RA) (Idres et al., 2002; Reijntjes et al., 2005; Topletz et al., 2015).

In 2017, our team demonstrated that, compared to yellow perch populations from upstream lakes Saint-Louis and Saint-Francois, yellow perch from lake Saint-Pierre had lower concentrations of DPAL (Landry et al., 2017). Since the plasmatic DROH levels were similar to other groups, the authors then suggested that yellow perch from lake Saint-Pierre over-mobilized their hepatic stocks of DPAL to maintain constant their level of plasmatic DROH (Landry et al., 2017; Bruneau et al., 2016).

We do not know yet if pesticides really are causing this supposed perturbation of retinoid metabolism in yellow perch. Therefore, our study aims at evaluating the impact of herbicides and neonicotinoid insecticides on RA catabolism in fish hepatic cell lines. We hypothesized that pesticides stimulate the catabolism of RA through an oxidative stress that exacerbates the oxidation of RA. This increased catabolism of RA would explain the over-mobilization of hepatic 3,4-didehydroretinol esters by yellow perch in

lake Saint-Pierre (Fig. 2.1). These cellular mechanisms and their relation to pesticide exposure will be investigated in the fish liver cell lines PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma-1) and ZFL (Zebrafish liver) treated separately with atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam.

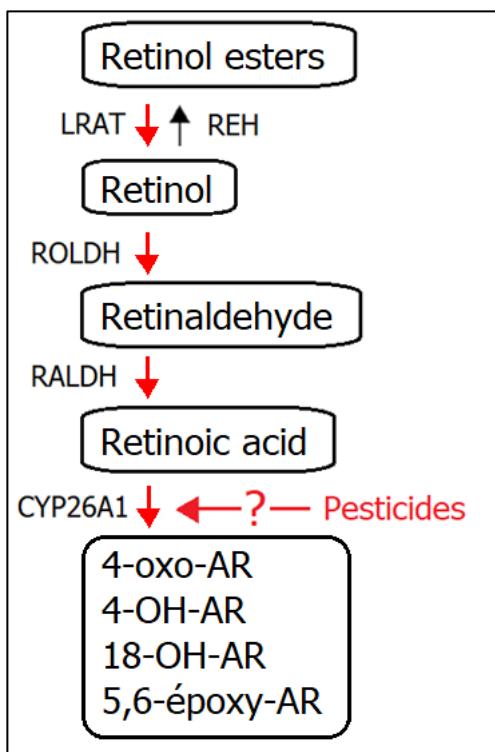


Figure 2.1 – Metabolic pathway of retinoids and the possible consequence of pesticides on retinoic acid catabolism by CYP26A1

Our study involves four research questions. 1) What is the relative contribution of CYP26A1 in the catabolism of RA in PLHC-1 and ZFL cells? 2) Do pesticides perturb RA catabolism? 3) Do pesticides induce oxidative stress in PLHC-1 and ZFL cells? 4) If pesticides perturb the catabolism of RA and induce oxidative stress, is the perturbation of RA catabolism caused by oxidative stress? These are our predictions. 1) CYP26A1 is responsible for most of the catabolism of RA. 2) Pesticides will decrease the intracellular concentrations of RA and increase the extracellular

concentrations of the metabolite 4-oxo-RA. 3) Pesticides will increase intracellular thiols and lipid peroxidation, two biomarkers of oxidative stress. 4) Intracellular and extracellular concentrations of RA and 4-oxo-RA in cells exposed to pesticides and rescued by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) will be similar to those of control cells not exposed to pesticides.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Chemicals

Commercial formulations of pesticides were used. Aatrex® (atrazine: 480 g active matter/L) and Credit Xtreme® (glyphosate: 540 g active matter/L) were purchased from Les Moulins Mondou (Mirabel, QC, Canada). Titan® (clothianidin: 600 g active matter/L) and Admire® (imidacloprid: 240 g active matter/L) were purchased from Bayer CropScience (Calgary, AB, Canada). Actara® (thiamethoxam: 240 g active matter/L) was purchased from Syngenta (Guelph, ON, Canada). Retinoids standards (all-*trans*-retinoic acid (*at*-RA), 9-*cis*-retinoic acid (9-*cis*-RA), 13-*cis*-retinoic acid (13-*cis*-RA), and 13-*cis*-4-oxo-retinoic acid (13-*cis*-4-oxo-RA)), L-proline, L-serine, epidermal growth factor, Tetrazolium salt MTT, reduced glutathione (GSH), 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, also known as Ellman's Reagent), 1,1,3,3-tetramethoxypropane, thiobarbituric acid, talarozole, ketoconazole, N-acetylcysteine, methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran, HPLC-grade water, ethyl acetate, acetic acid, butylated hydroxytoluene (BHT), and bovine serum albumin were purchased from Merck KGaA Millipore Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U. S. A.). Dulbecco's Modified Eagle minimum essential medium (DMEM) with high glucose (25 mM), Earle's salts minimum essential medium (EMEM), F-12 nutrient mixture (F-12), Leibovitz's L-15 medium (L-15), L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid,

L-glutamic acid, Penicillin-streptomycin, and trypsin-EDTA were purchased from Gibco Life Technologies Co. (Grand Island, NY, U. S. A.). Fetal bovine serum (FBS), glycine, and human insulin were purchased from Wisent Inc. (St-Bruno, QC, Canada). Rainbow trout serum was purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Caledon Laboratories (Georgetown, ON, Canada). Sodium hydroxide (NaOH), hexane, and trifluoroacetic acid were purchased from Thermo Fisher Scientific (St-Laurent, QC, Canada). Trichloroacetic acid was purchased from Anachemia (Montreal, QC, Canada). Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (Bradford reagent) was purchased from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada). The EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit (Catalog No: ETGA-200) was purchased from BioAssay Systems (Hayward, CA, U. S. A.). HPLC-grade solvents were used.

2.3.2 Cell culture

Cell lines PLHC-1 (ATCC® CRL-2406™) and ZFL (ATCC® CRL-2643™) were maintained in 75 cm² flasks at 28 °C and 5% CO₂. PLHC-1's medium was made of EMEM, with 0.1 mM non-essential amino acids (L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycine, L-proline, L-serine), 2 g/L NaHCO₃, and penicillin-streptomycin (50 000 U/L-50 mg/L), pH 7.2, complemented with 5% FBS. ZFL's medium was made of a mixture of L-15, DMEM, and F-12 (50%-35%-15%), with 1 g/L NaHCO₃, and penicillin-streptomycin (50 000 U/L-50 mg/L), pH 7.2, complemented with 5% FBS, 0.5% rainbow trout serum, 0.01 mg/mL human insulin, and 50 ng/mL epidermal growth factor. Medium was changed every two days and cells were passed once a week by trypsinization (0.05% trypsin-0.53 mM EDTA). ZFL and PLHC-1 cells were plated at a density of 1.33 x 10⁴ cells/cm² and 2.00 x 10⁴ cells/cm²,

respectively. PLHC-1 and ZFL cells were maintained for 10 and 6 days, respectively, to ensure confluence.

2.3.3 MTT cell viability assay

PLHC-1 and ZFL cells plated in 96-wells plates were exposed to pesticides (5 to 250 mg/L) diluted in the culture medium by adding 100 µL of medium per well, in triplicates, for 1, 2, or 3 days. At the end of the incubation, 10 µL of 5 g/L tetrazolium salt MTT were added to the wells, and the plates were incubated for 2 to 4 h to ensure the formation of purple crystals. Subsequently, the medium was removed, the crystals were dissolved in 200 µL DMSO, the plates were incubated 15 min, shaken, and optical density was measured at 575 nm in a Tecan SpectraFluor Plus microplate spectrophotometer (Esbe Scientific Industries Inc. St-Laurent, QC, Canada). MTT data are expressed relative to control measures in unexposed cells (% of viability).

2.3.4 Intracellular thiol content determination

Confluent PLHC-1 and ZFL cells monolayers plated in 60 mm petri dishes were exposed to 250 mg/L of pesticides. PLHC-1 cells were exposed for 3 days while ZFL cells were exposed for 1 day only, due to their greater sensibility, especially to mixtures – three days of exposure caused too high cell mortality. The next procedures were done on ice, in partial darkness, to prevent oxidation of the thiols and due to the reagent's photo sensibility. At the end of the exposure, culture medium was removed, and cells were washed twice with ice-cold tris-phosphate EDTA buffer. PLHC-1 and ZFL cells were harvested in 800 µL and 500 µL buffer, respectively. Cells were then stored at -20 °C until further analysis. On the day of the assay, cells were thawed on ice and

homogenized with a Kinematica Polytron PT 1600 E Homogenizer (Kinematica AG, Bohemia, NY, U. S. A.) using a 5 mm PT-DA 05/2EC-E85 disperser for 45 s to break cell membranes and to free intracellular thiol groups. Intracellular thiols were measured following reaction with DTNB, in a 96-wells plate; 200 µL DTNB were added to 50 µL of cell homogenate, in triplicates. The remaining homogenate was stored back at -20 °C until protein determination. For the standard curve, 200 µL DTNB were added to 50 µL GSH at concentrations ranging from 0 to 1000 µM, diluted in tris-phosphate EDTA buffer. Five minutes later, optical density was measured at 410 nm in a Tecan SpectraFluor Plus microplate spectrophotometer. Cellular thiol contents are expressed relative to cellular protein contents (µmol/mg proteins).

2.3.5 Lipid peroxidation determination – TBARS

Measurement of malonaldehyde (MDA) as a biomarker of lipid peroxidation was adapted from Paquet-Walsh et al. (2019), Landry et al. (2017), and Ohkawa et al. (1979). Confluent PLHC-1 and ZFL cells monolayers plated in 100 mm petri dishes were exposed to 250 mg/L of pesticides diluted in culture medium. PLHC-1 cells were exposed for 1 to 3 days and ZFL cells were exposed for 1 day. The next procedures were done on ice. At the end of the exposure, culture medium was removed, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffer saline (PBS), and harvested in 400 µL PBS. Cells were then stored at -70 °C until further analysis. On the day of the assay, cells were thawed on ice and homogenized with a Kinematica Polytron PT 1600 E Homogenizer using a 5 mm PT-DA 05/2EC-E85 disperser for 30 s to break cell membranes. The homogenates were centrifuged at 4000 g, for 10 min, at 4 °C. Then, 200 µL of the supernatant were collected, 100 µL of sodium deoxycholate 0.15% were added, the samples were vortexed and allowed to rest on ice for 10 min. The remaining homogenates were stored back at -70 °C for protein and triglyceride determination.

Then, 100 µL of trichloroacetic acid 50% were added to the samples, and the latter were centrifuged at 9000 g, for 15 min, at 4 °C. Subsequently, 75 µL of the supernatant were transferred on a 96-wells plate, in triplicates, to which 50 µL trichloroacetic acid 50% and 75 µL thiobarbituric acid 1.3% (dissolved in NaOH 0.3%) were added. The plate was wrapped in an aluminium sheet and heated on a dry heat block incubator at 80-90 °C for 1 h. This incubation allows the products of lipid peroxidation to react with thiobarbituric acid, generating MDA, which will be subsequently measured. Following this incubation, the plate was freed from its aluminium sheet and allowed to rest on ice for 15 min, to stop the reaction. For the standard curve, 200 µL of 1,1,3,3-tetramethoxypropane diluted in PBS at concentrations ranging from 0 to 7.284 µM were treated as were the samples after the first centrifugation onwards, when 200 µL of supernatant were collected. Optical density was then measured, first at 530 nm to measure MDA, then at 650 nm to correct for turbidity, in a Varioskan Lux microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). The optical density at 650 nm was subtracted from that at 530 nm. Levels of MDA are expressed relative to levels of cellular proteins or triglycerides (µmol/g proteins or µmol/g triglycerides).

2.3.6 Co-exposure of cells to *at*-RA and CYP450 inhibitors

All the following procedures, except cell culture and maintenance, were done under yellow light to prevent the oxidation of retinoids. Confluent PLHC-1 and ZFL cells monolayers plated in 100 mm petri dishes were exposed to 1 µM talarozole or 10 µM ketoconazole, concomitantly with 50 nM *at*-RA dissolved in ethanol 95%, for 24 h (the final concentration of ethanol was less than 0.1%). The harvest was accomplished on ice to prevent oxidation. One mL of the medium was collected, the remaining medium was removed, cells were washed twice with ice-cold PBS and harvested in 800 µL

PBS. The remaining cells in the petri dish were collected aside for protein determination. Cells and culture medium were then stored at -70 °C until retinoids extraction and protein measurement.

2.3.7 Co-exposure of cells to *at*-RA and pesticides with or without NAC

The same protocol as the one above was applied, with the following modifications. Cells were exposed to 250 mg/L of pesticides for 24 h. Concomitantly, cells were co-exposed to 50 nM *at*-RA dissolved in 95 % ethanol, for 6, 18, or 24 h. Cells and medium culture were harvested as described previously. To complete the kinetic analysis, cells were also exposed to 50 nM *at*-RA for 0 h, without pesticides. In this case, all 10 mL of culture medium were harvested from the petri dish, and *at*-RA was added to the medium culture, from which 1 mL was collected. Cells were then harvested per usual.

In some experiments, the effect of the antioxidant NAC on pesticides-induced modifications in *at*-RA contents was tested with co-incubation of the cells with pesticides, *at*-RA, and 1 mM NAC. Time of co-exposure with *at*-RA and pesticides were selected according to results obtained in kinetic studies with *at*-RA: for the PLHC-1 cells, 24 h of exposure in all cases; for the ZFL cells, 24 h of exposure to *at*-RA with atrazine and glyphosate, and 6 h of exposure to *at*-RA with clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam.

2.3.8 Retinoid extraction and high-performance liquid chromatography

Retinoid extraction was adapted from the procedure of Solari et al. (2010). On the day of analysis, cell samples were thawed on ice and mixed with 200 µL of 1 mg/mL BHT diluted in methanol to prevent oxidation. One mL of an extraction solvent mixture composed of 50% ethyl acetate and 50% acidified hexane containing 0.068% acetic acid was added to the sample, which was then vortexed for 1 min and centrifuged at 1625 g for 8 min. Afterwards, 800 µL of the organic phase was transferred into a glass tube and evaporated in a Vacufuge Plus evaporator (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada) for 15 min at 45 °C. The same procedures were accomplished with the medium samples, with the following modifications: 400 µL of BHT were added to the sample, the first centrifugation lasted 15 min, and only 700 µL of the organic phase could be collected after the first centrifugation. The precedent procedures, from adding the extraction solvent onwards, were repeated twice, but 1000 µL of organic phase were collected and evaporated, always in the same glass tube, to pool the retinoids extracted. After the third evaporation, 100 µL of acetonitrile were added to the glass tube, which was then vortexed 20 s, and 90 µL were injected for chromatography. To ensure optimal preservation of the retinoids, the glass tubes were stored at -20 °C and processed one by one. All samples from a set of experiment were injected the same day.

All-*trans*-retinoic acid, 9-*cis*-RA, 13-*cis*-RA, and 13-*cis*-4-oxo-RA were measured by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), through a system composed of a Model 510 pump, a Model 7725i rheodyne injector, a Model 486 absorbance detector, and a Millenium software (Waters Corporation, Milford, MA, U. S. A.). They were separated through an ACE C18 analytical column (ACE-121-2546, 250 x 4.6 mm, 5 µm; Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada) under isocratic condition, in a mobile phase composed of methanol:

acetonitrile: tetrahydrofuran: 0.35 mM trifluoroacetic acid (25.8%: 55.7%: 2.5%: 16%), flowing at a rate of 1.0 mL/min for 25 min. Absorbance was measured at a wavelength of 350 nm. Peaks were identified by comparing retention times of standards of each retinoid and by spiking samples with standards after retinoids extraction. Intracellular and extracellular RA (sum of *at*-RA, 9-*cis*-RA, and 13-*cis*-RA) and 13-*cis*-4-oxo-RA contents are expressed relative to cellular protein contents (ng/mg proteins).

2.3.9 Total protein content determination

Total protein contents were estimated according to Bradford (1976) on cell samples previously homogenized with the Kinematica Polytron PT 1600 E Homogenizer using the Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (Bradford reagent), in 96-wells plates; 200 µL diluted Bradford reagent were added to 50 µL diluted homogenates. Bovine serum albumin at concentrations ranging from 0 to 100 µg/mL was used as the calibration standard. Optical density was then measured at 595 nm in a Tecan SpectraFluor Plus microplate spectrophotometer. In some cases where the volumes of the samples were too low for mechanical homogenization, cell digestion was performed with a 1h-incubation in NaOH 1 N and protein determination was conducted with appropriate standard curve performed in the presence of 0.040 M NaOH final concentration.

2.3.10 Triglyceride content determination

Cellular triglyceride contents were estimated using the EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit, on ice, as described by the manufacturer. Briefly, the working reagent was prepared by mixing, for each well, 100 µL assay buffer, 2 µL enzyme mix, 5 µL lipase,

1 μL ATP, and 1 μL dye reagent. A standard curve was prepared ranging 0 to 1 mM and kept on ice. The samples and the standard dilutions were vortexed, 10 μL were transferred on a 96-wells plate, in triplicates, and 100 μL of the working reagent were added. The plate was incubated at room temperature for 30 min and optical density was measured at 575 nm in a Tecan SpectraFluor Plus microplate spectrophotometer.

2.3.11 Statistical analysis

The concentration-response viability curves were built using the non-linear four parameters log-logistic function $f(x) = c + \frac{d-c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$. The parameters b, c, d, and e stand for the Hill coefficient, the lower asymptote, the higher asymptote, and the inflection point, or EC50, respectively. Since the concentrations used did not yield high levels of mortality, we assumed that a 100% mortality could have been reached and we fixed the lower asymptote to 0. The models were built with the *drc* package in R, using the LL.4 function within the *drm* function (Ritz et al., 2015), and the curves were drawn with the *ggplot2* package (Wickham, 2016) and combined with the *grid*, *gridExtra*, and *lemon* packages (R Core Team, 2018; Auguie, 2017; Edwards, 2019).

All results related to oxidative stress (thiols, proteins, MDA, triglycerides, and appropriate ratios) and retinoids measurements were analyzed using linear models, by setting the control group as intercept and comparing each exposed group to the control group by planned contrasts. Planned contrasts, unlike *post hoc* comparisons, test predetermined statistical hypotheses, and have therefore more statistical power to avoid type II errors (Chatham, 1999). For the measurements of MDA in PLHC-1 cells, time of exposure and pesticides were not treated as separate factors, but were combined, and the control group was considered as a 0-days exposure. The linear models for retinoid

contents after exposure to pesticides treated time of exposure as a second factor, which was set as a discrete measure, without interaction with the pesticide factor. The levels of all three isoforms of RA (*9-cis*-RA, *13-cis*-RA, and *at*-RA) were summed to yield RA levels.

The data of the following models were log-transformed to correct for heteroscedasticity: extracellular *13-cis*-4-oxo-RA levels in PLHC-1 cells and intracellular *13-cis*-4-oxo-RA levels in ZFL cells after co-exposure to *at*-RA and CYP450 inhibitors; intracellular RA levels in PLHC-1 and ZFL cells after co-exposure to *at*-RA, NAC, and clothianidin or thiamethoxam, as well as after co-exposure to *at*-RA, NAC, and glyphosate in ZFL cells; extracellular RA levels in ZFL cells after co-exposure to *at*-RA, NAC, and clothianidin or thiamethoxam; and extracellular *13-cis*-4-oxo-RA levels in ZFL cells after co-exposure to *at*-RA, NAC, and atrazine. The data of the following models were square-rooted, rather than log-transformed, to correct for heteroscedasticity, because of the presence of zeros: intracellular RA levels and extracellular *13-cis*-4-oxo-RA levels in PLHC-1 cells after co-exposure to *at*-RA and pesticides; and intracellular and extracellular RA levels, as well as extracellular *13-cis*-4-oxo-RA levels, in ZFL cells after co-exposure to *at*-RA and pesticides. The heteroscedasticity of the thiol contents in PLHC-1 cells could not be corrected by transforming the data, so it was accounted for with a weighted linear model, each value being weighted by the inverse of its intra-group variance.

After noticing interesting trends in our data, we evaluated the impacts of pesticide exposure on RA isomerization over time. Proportions of each isomer of RA were compared by a Dirichlet regression (Maier, 2014; Douma and Weedon, 2019), under the common parametrization, by setting as factors pesticides, time of exposure to *at*-RA, and their interaction. The alternative parametrization was attempted for each cell line, using pesticide treatment to build the precision model, but in both cell lines

the Akaike information criterion (AIC) was lower under the common parametrization, which was therefore kept. The models were built using the *DirichletReg* package (Maier, 2015) in R.

All measurements were done on three independent cell cultures ($n = 3$). The significance level was set to 5% ($\alpha = 0.05$). Statistical analyses were performed on R (R Core Team, 2018).

2.4 Results

2.4.1 Contribution of CYP26A1 in the catabolism of RA in fish hepatic cell lines

To characterize RA catabolism in fish hepatic cell lines and to estimate how much CYP26A1 is responsible for that catabolism, PLHC-1 and ZFL cells were exposed for 24 h to 50 nM *at*-RA in the presence or the absence of two CYP450 inhibitors: 1 μ M talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, and 10 μ M ketoconazole, a generalist CYP450 inhibitor. The metabolite 13-*cis*-4-oxo-RA and the RA isomers 13-*cis*-RA, 9-*cis*-RA, and *at*-RA were detected in both cell lines (Fig. 2.2). In PLHC-1 cells, talarozole did not significantly affect intracellular and extracellular RA contents. However, ketoconazole led to 3-fold higher intracellular RA levels ($t = 5.26; p < 0.01$), with a significant inhibition of RA catabolism (Fig. 2.3). Inversely, in ZFL cells, both talarozole ($t = 3.74; p < 0.01$) and ketoconazole ($t = 5.06; p < 0.01$) led to 2.5-fold higher intracellular RA levels, pointing to a significant inhibition of RA catabolism by both the specific and generalist inhibitors (Fig. 2.4). Surprisingly, talarozole also caused a significant intracellular accumulation of 13-*cis*-4-oxo-RA in both cell lines (PLHC-1: $t = 3.00; p < 0.05$; ZFL: $t = 8.80; p < 0.001$), and a significant extracellular accumulation of 13-*cis*-4-oxo-RA ($t = 4.71; p < 0.01$) in the medium culture of ZFL cells (Fig. 2.3 and 2.4). Ketoconazole significantly decreased 13-*cis*-4-oxo-RA contents ($t = -4.87; p < 0.001$) only in ZFL cells (Fig. 2.4). These results suggest that CYP26A1 is responsible for most of RA catabolism in ZFL cells, but not in PLHC-1 cells, and it is not responsible for the formation of the metabolite 13-*cis*-4-oxo-RA. Raw data of RA, 13-*cis*-4-oxo-RA, and protein contents after co-exposure to *at*-RA and to CYP450 inhibitors can be found in the supplementary material (Fig. S1, S2 and S3).

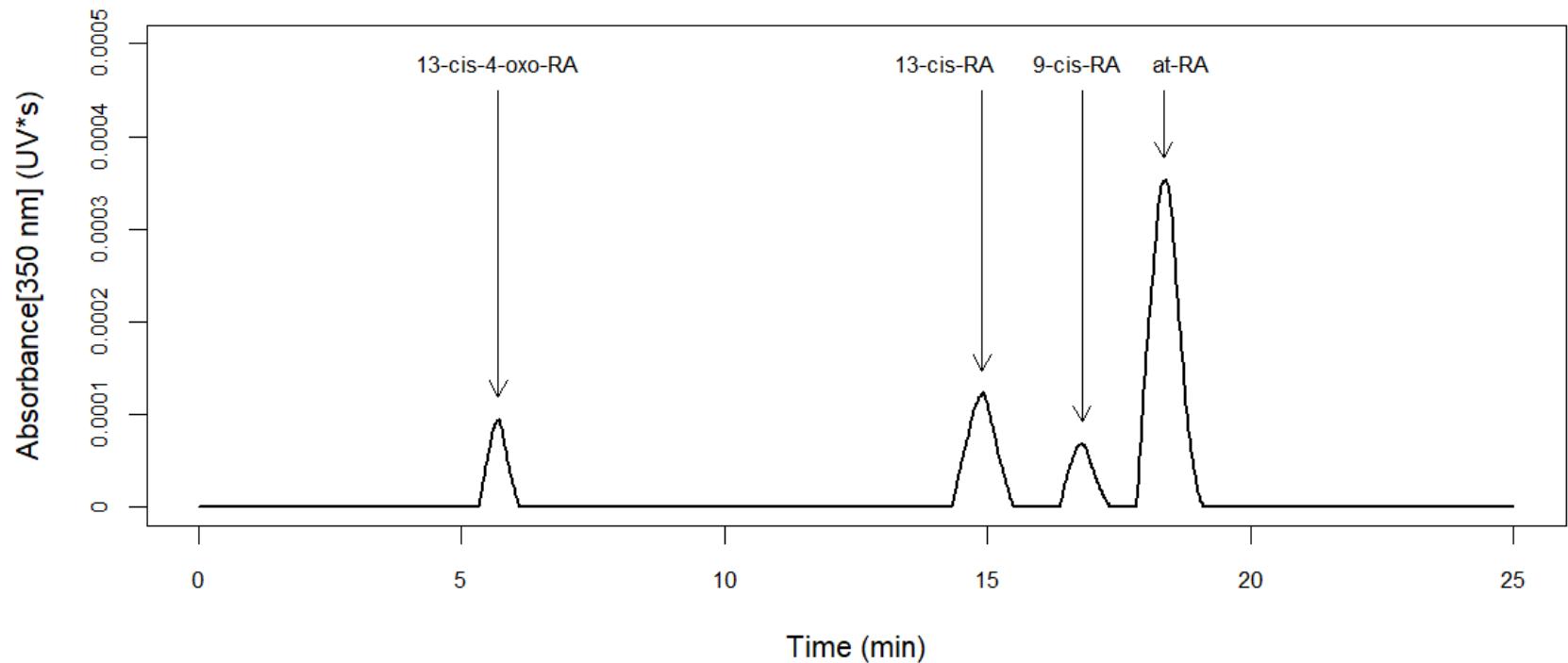


Figure 2.2 – Chromatograms of 13-cis-4-oxo-RA, 13-cis-RA, 9-cis-RA, and at-RA in fish hepatic cell lines
Chromatograms of retinoids from fish hepatic cell lines PLHC-1 and ZFL exposed to 50 nM at-RA for 6 to 24 h.

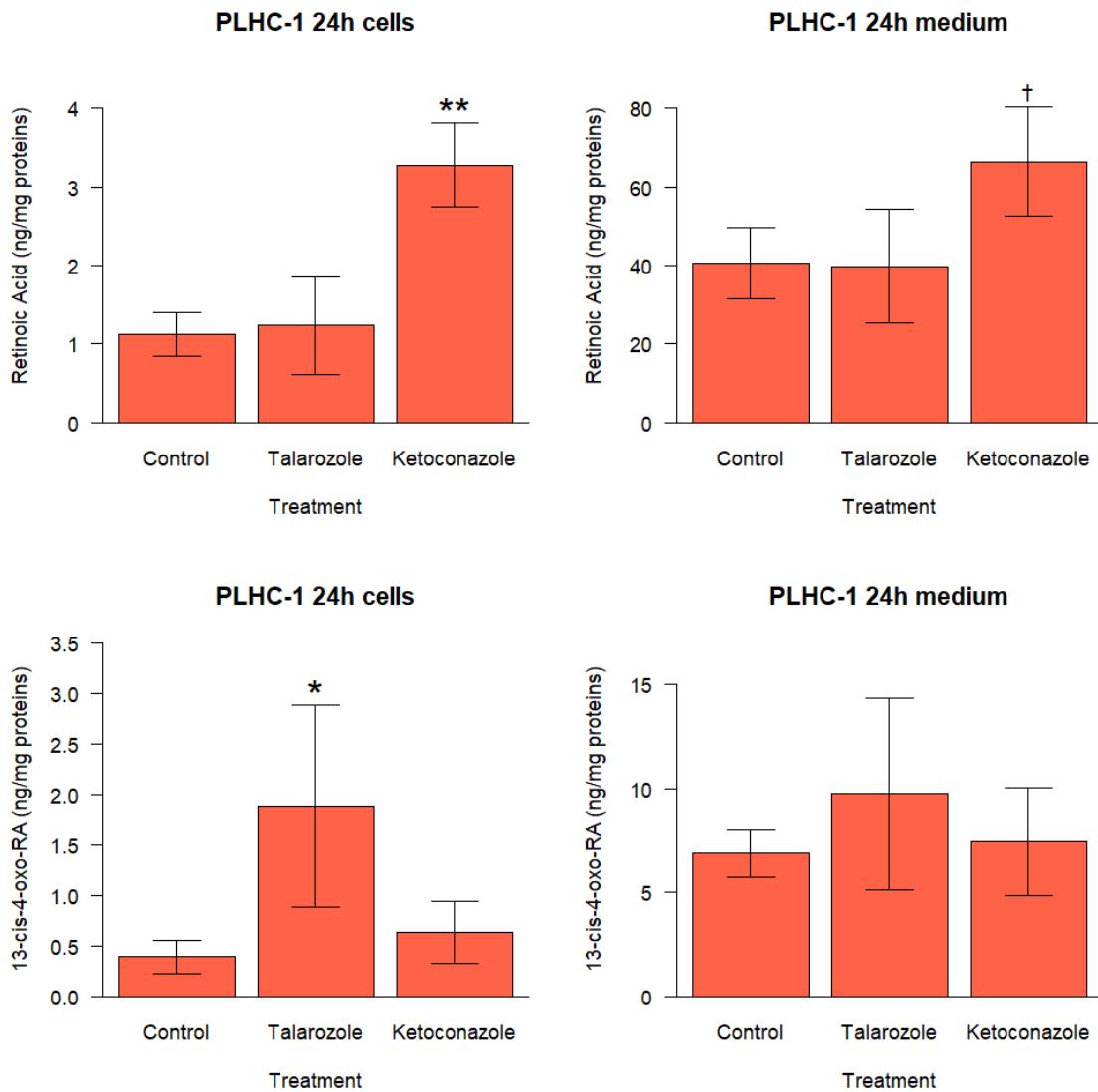


Figure 2.3 – Inhibition of RA catabolism in PLHC-1 cells by two CYP450 inhibitors

PLHC-1 cells were treated with 1 μ M talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, or 10 μ M ketoconazole, a generalist CYP450 inhibitor, and with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA and 13-*cis*-4-oxo-RA (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. † $p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

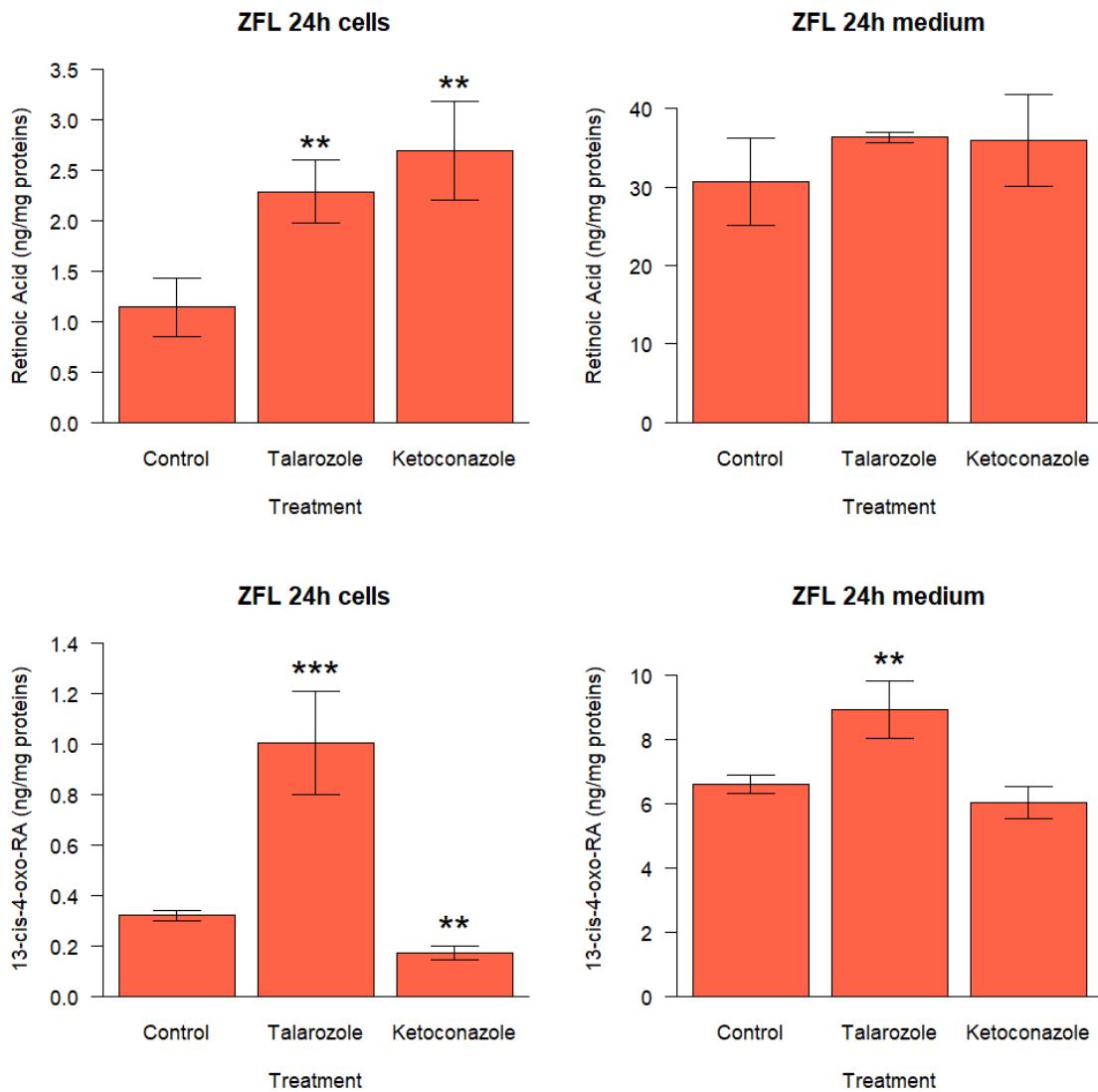


Figure 2.4 – Inhibition of RA catabolism in ZFL cells by two CYP450 inhibitors
ZFL cells were treated with 1 μ M talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, or 10 μ M ketoconazole, a generalist CYP450 inhibitor, and with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA and 13-*cis*-4-oxo-RA (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.4.2 Effect of pesticides on cell viability

MTT assays were conducted to characterize concentration-response curves and to determine concentrations and durations of exposure to pesticides that would ensure approximately 80% of cell survival. In PLHC-1 cells (Fig. 2.5), atrazine was the most toxic pesticide, albeit no pesticide produced a dramatic mortality level, even at the highest combination of concentration and duration of exposure. Accordingly, PLHC-1 cells were exposed to 250 mg/L of pesticide for 1 to 3 days in the subsequent experiments. In ZFL cells (Fig. 2.5), thiamethoxam was the most toxic pesticide, closely followed by atrazine. At 250 mg/L, 2 and 3 days of exposure led to up to 50% and 75% cell mortality. High concentration was prioritized on long duration of exposure to manifest acute mechanisms of toxicity rather than chronic ones. Therefore, ZFL cells were exposed to 250 mg/L of pesticide for 1 day in the following experiments.

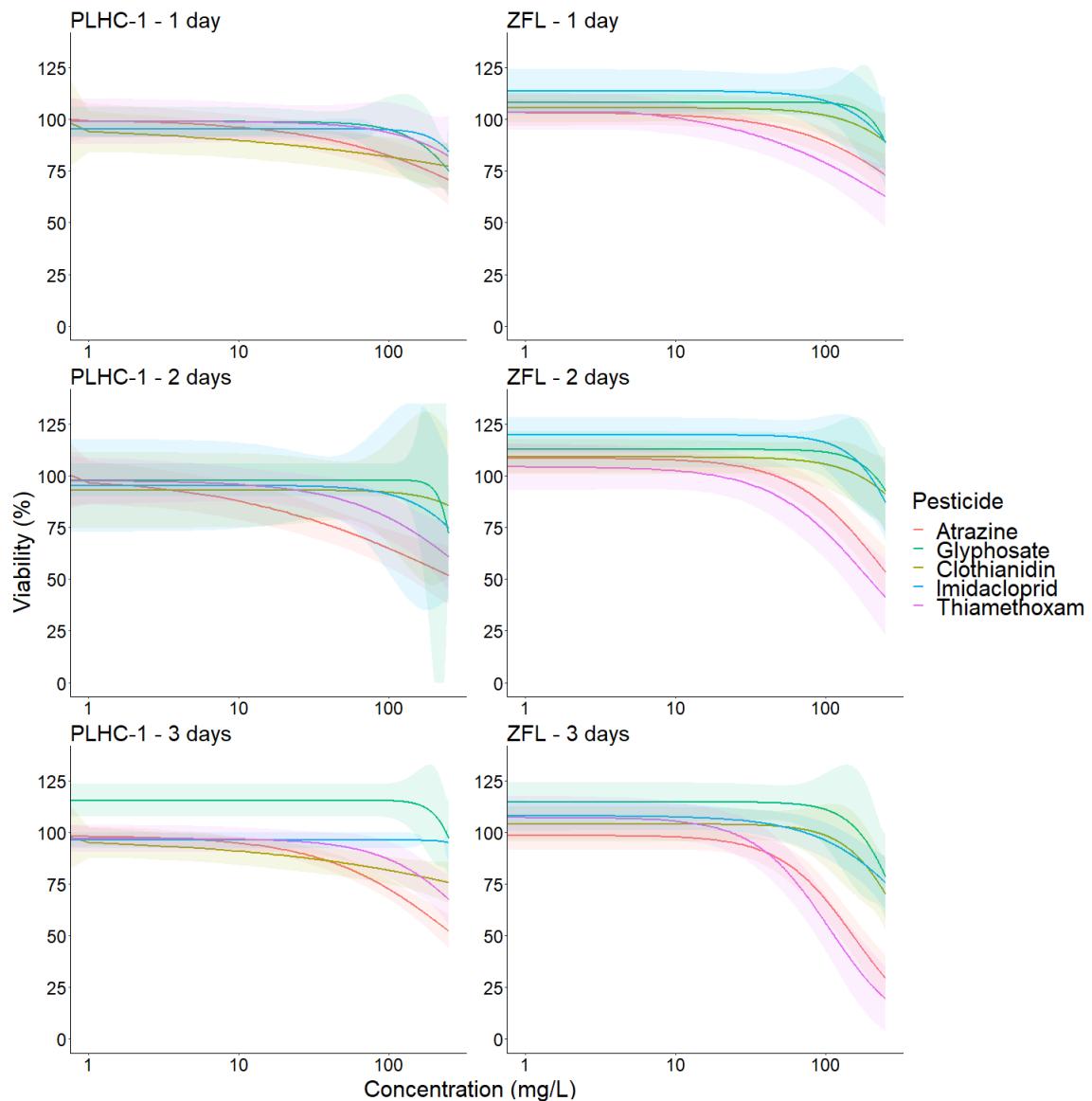


Figure 2.5 – Concentration-response curves of PLHC-1 and ZFL cell lines exposed to atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam

Concentrations range from 0 to 250 mg/L, and durations of exposure range from 1 to 3 days. The curves were estimated by a four-parameters log-logistic function, and the lower asymptote was fixed to zero.

2.4.3 Perturbation of RA catabolism by pesticides

To test whether pesticides may affect RA catabolism in the two fish hepatic cell lines, RA and the metabolite 13-*cis*-4-oxo-RA were measured in cells and in the corresponding medium culture after a 24-h exposure to pesticides and a concomitant 6-, 18-, and 24-h exposure to *at*-RA. PLHC-1 cells significantly accumulated RA after exposure to atrazine ($t = 3.16$; $p < 0.01$), clothianidin ($t = 3.27$; $p < 0.01$), and thiamethoxam ($t = 5.49$; $p < 0.001$). Following the exposure to imidacloprid, the accumulation of RA tended to increase, but this result was not significant ($t = 1.89$; $p < 0.1$). Extracellular RA contents were also significantly elevated after thiamethoxam exposure ($t = 2.13$; $p < 0.05$). None of the pesticides affected intracellular or extracellular 13-*cis*-4-oxo-RA contents (Fig. 2.6). ZFL cells significantly accumulated RA after exposure to all pesticides (atrazine: $t = 2.51$; $p < 0.05$; glyphosate: $t = 2.60$; $p < 0.05$; clothianidin: $t = 2.56$; $p < 0.05$; imidacloprid: $t = 2.35$; $p < 0.05$; thiamethoxam: $t = 3.87$; $p < 0.001$). Extracellular RA contents were significantly elevated after atrazine ($t = 3.31$; $p < 0.01$), clothianidin ($t = 2.18$; $p < 0.05$), or thiamethoxam ($t = 2.66$; $p < 0.01$) exposure. Surprisingly, the levels of extracellular 13-*cis*-4-oxo-RA were also significantly higher after atrazine exposure ($t = 3.55$; $p < 0.001$). None of the pesticides affected intracellular 13-*cis*-4-oxo-RA contents (Fig. 2.7). In summary, these results suggest that all pesticides may inhibit RA catabolism in fish hepatic cell lines and underline some differences between the two cell lines. Finally, contrary to what was estimated in PLHC cells, it is worth noting that the basal levels of intracellular RA in ZFL cells was not null, only very small (Fig. 2.7). Raw data of RA, 13-*cis*-4-oxo-RA, and protein contents after *at*-RA and pesticide co-exposure can be found in the supplementary material (Fig. S4, S5 and S6).

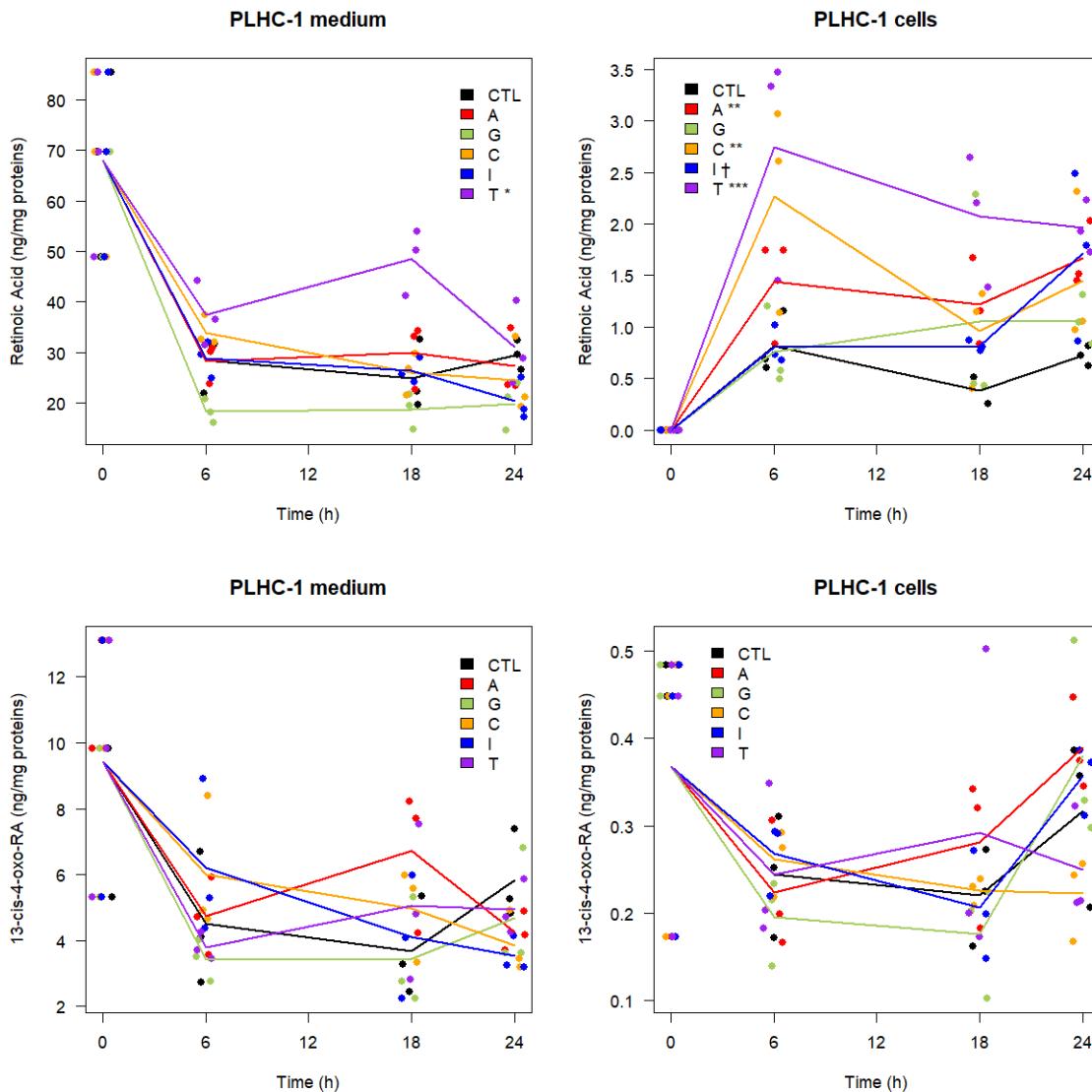


Figure 2.6 – Retinoic acid and 13-cis-4-oxo-RA kinetics in PLHC-1 cells after pesticide exposure

PLHC-1 cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, and 24 h. Control cells were also treated with 50 nM *at*-RA for 0 h, meaning that *at*-RA was added in the medium culture at harvest, to complete the kinetics. The points correspond to RA and 13-cis-4-oxo-RA levels, whereas the curves go through the means of RA and 13-cis-4-oxo-RA levels (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in two-factors linear models. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; $* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$.

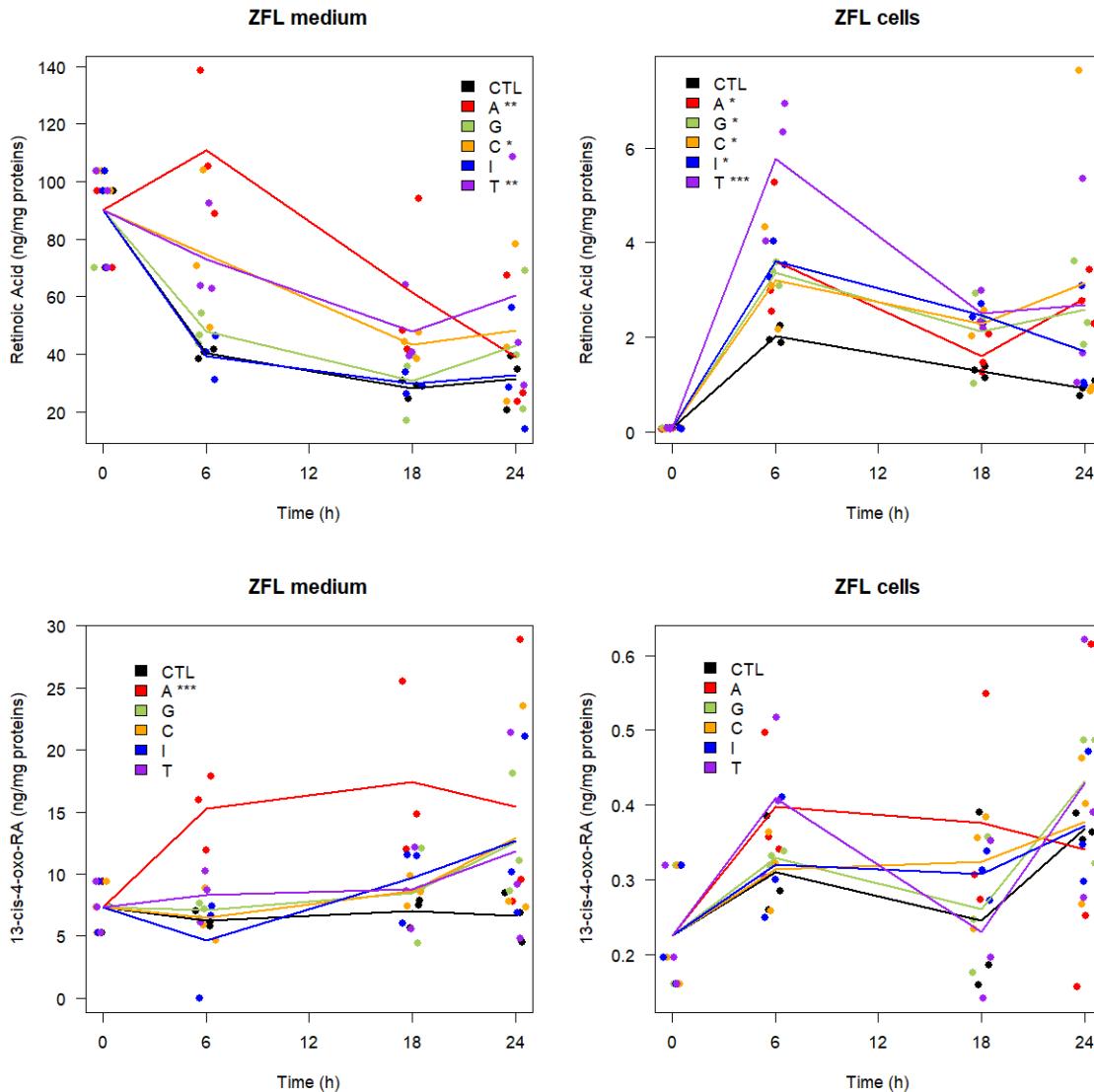


Figure 2.7 – Retinoic acid and 13-cis-4-oxo-RA kinetics in ZFL cells after pesticide exposure

ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, and 24 h. Control cells were also treated with 50 nM *at*-RA for 0 h, meaning that *at*-RA was added in the medium culture at harvest, to complete the kinetics. The points correspond to RA and 13-cis-4-oxo-RA levels, whereas the curves go through the means of RA and 13-cis-4-oxo-RA levels (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in two-factors linear models. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.4.4 Oxidative stress: intracellular thiols and lipid peroxidation

To test whether pesticides induce oxidative stress in the two fish hepatic cell lines, two biomarkers of oxidative stress were analyzed following exposure to pesticides: intracellular thiols, a biomarker of antioxidative defense mechanisms, and MDA, a biomarker of lipid peroxidation (Fig. 2.8). In PLHC-1 cells, atrazine, alone ($t = 30.3$; $p < 0.001$) or in mixtures with other pesticides (with glyphosate: $t = 7.01$; $p < 0.001$; with clothianidin: $t = 5.40$; $p < 0.001$; with imidacloprid: $t = 5.32$; $p < 0.001$; with thiamethoxam: $t = 31.0$; $p < 0.001$), induced a 1.6-fold significant increase in intracellular thiols. Clothianidin ($t = 3.60$; $p < 0.01$), thiamethoxam ($t = 2.37$; $p < 0.05$), and a mixture of glyphosate and imidacloprid ($t = 2.11$; $p < 0.05$) also significantly raised intracellular thiol contents, albeit less impressively. Atrazine (3-days: $t = 2.45$; $p < 0.05$), glyphosate (2-days: $t = 2.77$; $p < 0.01$; 3-days: $t = 3.02$; $p < 0.01$), and imidacloprid (1-day: $t = 2.08$; $p < 0.05$) induced a significant 1.5- to 2-fold increase in MDA contents at either one of the three exposure times. Data normalization to levels of triglycerides or proteins yielded different conclusions regarding which pesticides induce oxidative stress, but in both cases, glyphosate significantly elevated MDA contents and clothianidin had no effect. In ZFL cells, through both biomarkers, let alone a non-significant tendency toward lipid peroxidation by imidacloprid ($t = 1.92$; $p < 0.1$), no sign of oxidative stress was detected. In summary, these results suggest that all five pesticides may induce oxidative stress in PLHC-1 cells. Inversely, all pesticides failed to induce the investigated biomarkers of oxidative stress in ZFL cells under our experimental conditions. Raw data of thiols, MDA, protein, and triglyceride contents after pesticide exposure can be found in the supplementary material (Fig. S7 and S8).

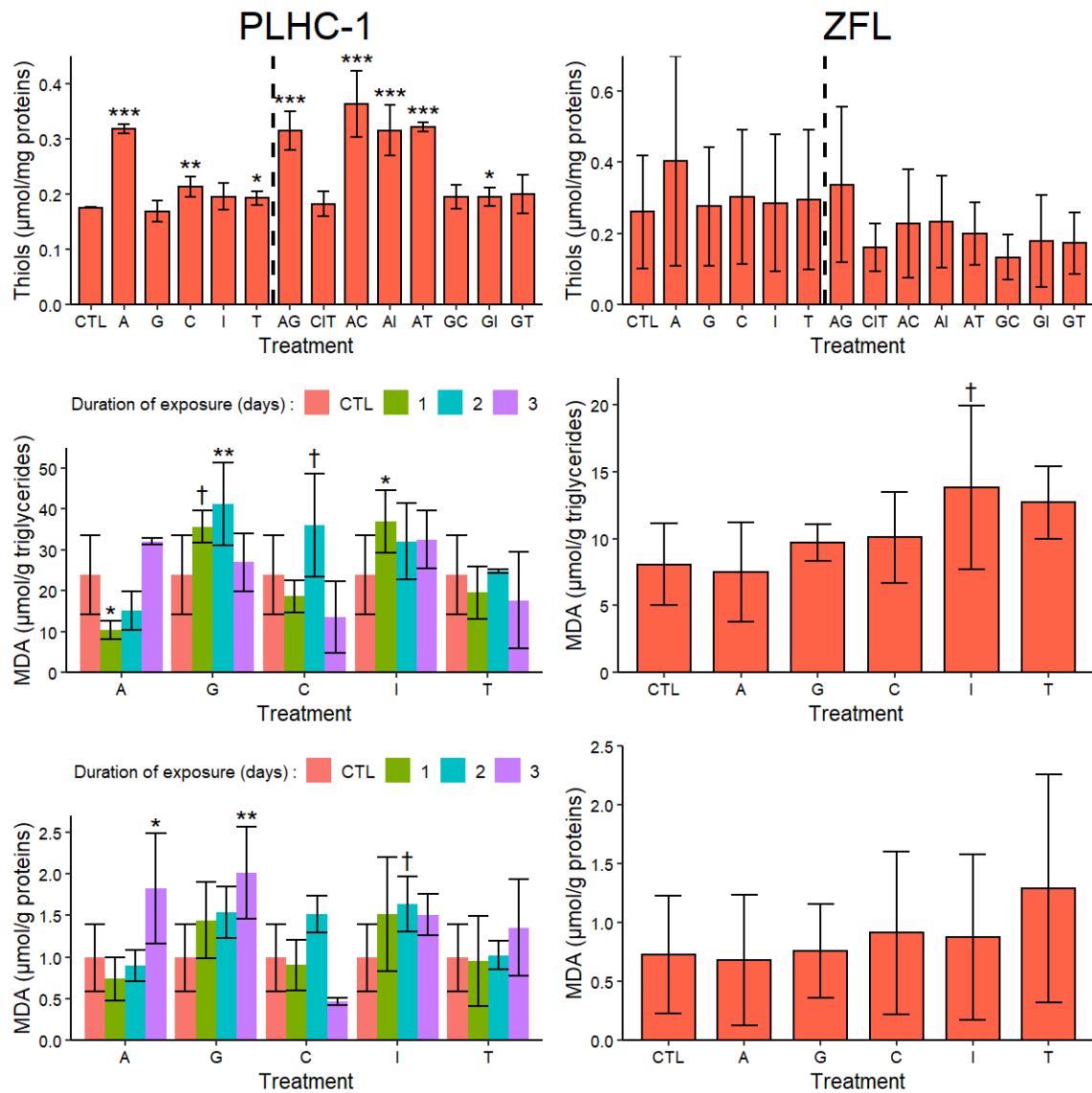


Figure 2.8 – Thiol variations and lipid peroxidation in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure

PLHC-1 and ZFL cells were exposed to 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam, alone or in mixtures, and cellular thiols and MDA were measured. For cellular thiols measurements, the exposure times in PLHC-1 and ZFL cells were 3 and 1 days, respectively. For MDA, the exposure times in PLHC-1 and ZFL cells were 1 to 3 days and 1 day, respectively. Results are expressed as mean \pm SD of thiols ($\mu\text{mol}/\text{mg proteins}$) and MDA ($\mu\text{mol}/\text{g triglycerides or proteins}$). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.4.5 Implication of oxidative stress in the perturbation of RA catabolism by pesticides

To test if pesticides affect RA catabolism through an oxidative stress, PLHC-1 and ZFL cells were exposed to pesticides and RA in the presence of NAC, an antioxidant, to investigate for a rescue effect. In PLHC-1 cells, NAC nullified the effect of atrazine ($t = 1.69; p > 0.05$) and imidacloprid ($t = 0.27; p > 0.05$) on RA catabolism but did not improve the situation in cells exposed to thiamethoxam ($t = 2.86; p < 0.05$). In cells exposed to clothianidin, no significant difference was found between RA contents with or without NAC ($t = 1.66; p > 0.05$), but the data does not show a rescue effect (Fig. 2.9).

In ZFL cells, NAC nullified the effect of atrazine ($t = 1.73; p > 0.05$) but did not improve the situation in cells exposed to glyphosate ($t = 4.75; p < 0.01$) or clothianidin ($t = 3.80; p < 0.01$) (Fig. 2.10). The cases of imidacloprid and thiamethoxam in ZFL cells are particular; the intracellular RA contents were higher in the presence of NAC alone than in the control cells. Therefore, we also compared the intracellular RA contents following exposure to imidacloprid and thiamethoxam using NAC alone as control. With these new linear models, intracellular RA contents remained higher in cells exposed to imidacloprid even after NAC exposure ($t = 2.59; p < 0.05$), but NAC lowered the RA contents in cells exposed to thiamethoxam ($t = 1.78; p > 0.05$). Additionally, the extracellular RA contents were not brought back to control levels by NAC following thiamethoxam exposure ($t = 2.48; p < 0.05$) but were brought back to control levels in cells exposed to clothianidin ($t = 1.46; p > 0.05$). Finally, NAC did not lower the extracellular 13-*cis*-4-oxo-RA contents after atrazine exposure ($t = 2.61; p < 0.05$) (Fig. 2.10).

Therefore, we may infer from these results that atrazine probably affects RA catabolism through oxidative stress in both cell lines, and that is also be the case for imidacloprid in PLHC-1 cells and for thiamethoxam in ZFL cells, whereas glyphosate- and clothianidin-induced modifications in RA catabolism do not involve oxidative stress. Raw data of RA, 13-*cis*-4-oxo-RA, and protein contents after *at*-RA, pesticide, and NAC co-exposure can be found in the supplementary material (Fig. S9, S10, S11 and S12).

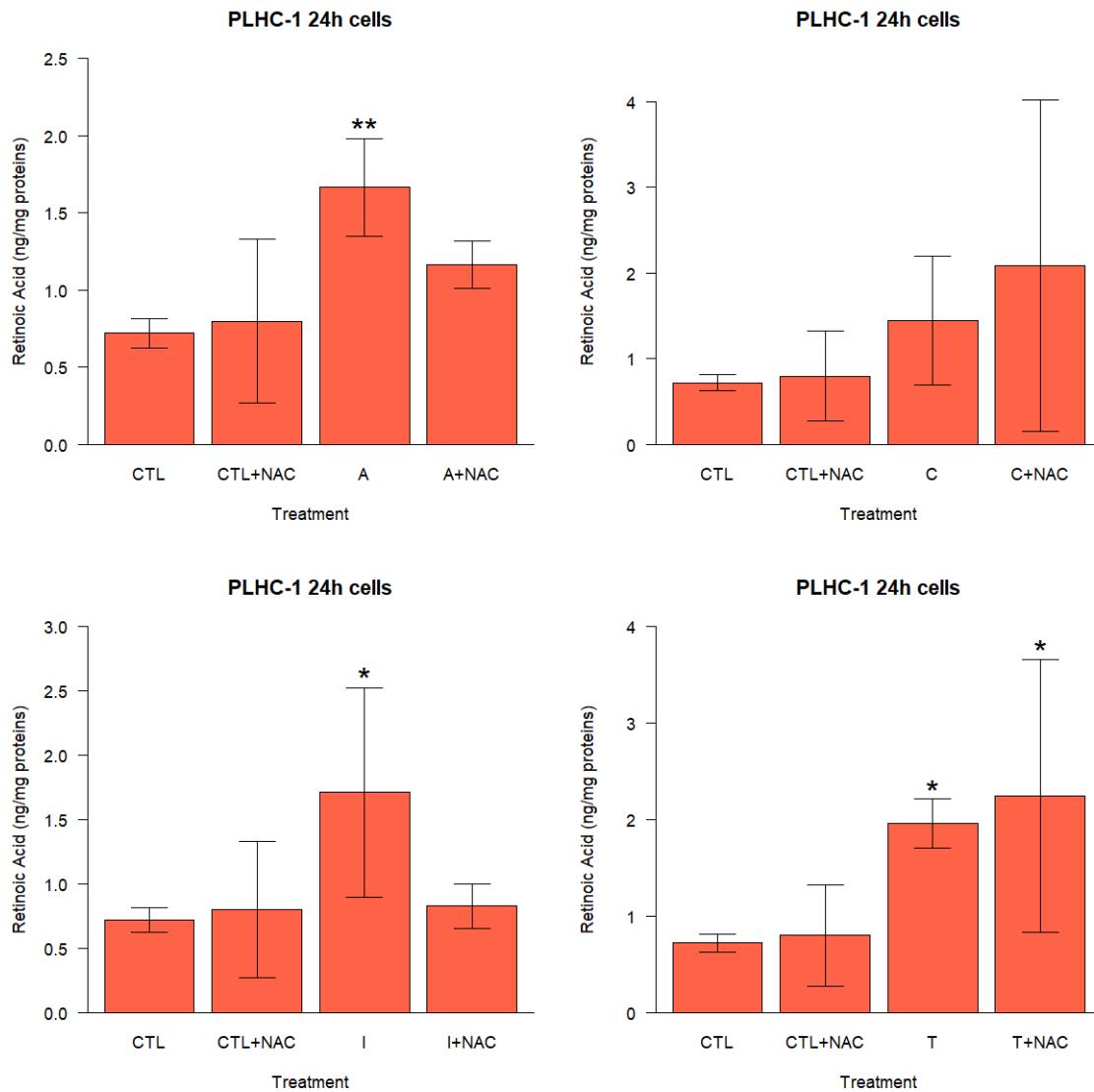


Figure 2.9 – Rescue effect of the antioxidant NAC on RA catabolism after pesticide exposure in PLHC-1 cells

PLHC-1 cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, concomitantly with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

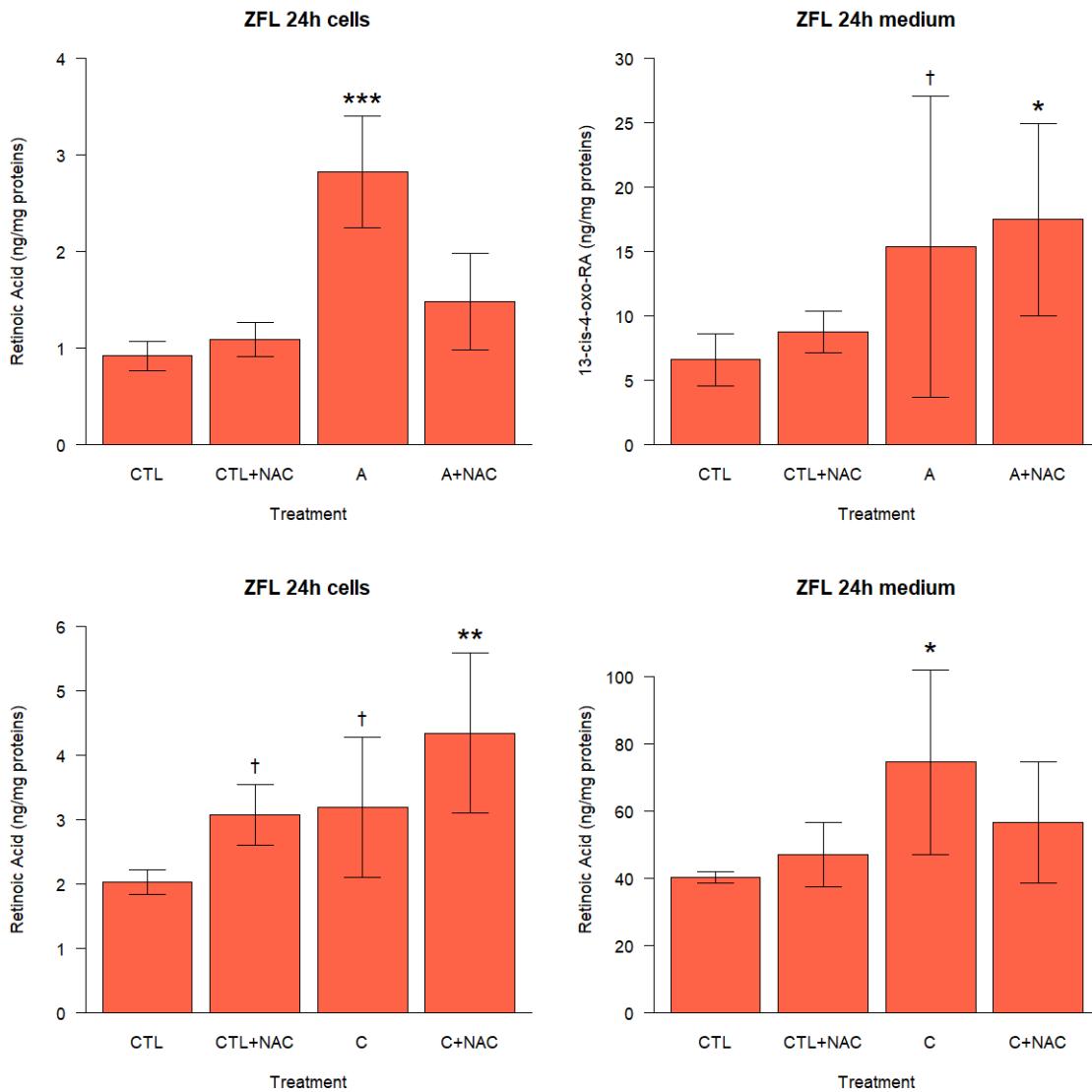


Figure 2.10 – Rescue effect of the antioxidant NAC on RA catabolism after pesticide exposure in ZFL cells (part 1)

ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, and with 1 mM NAC, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 24 h in presence of atrazine or glyphosate, or for 6 h in presence of clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam. Results are expressed as mean \pm SD of RA and 13-cis-4-oxo-RA (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; $* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$.

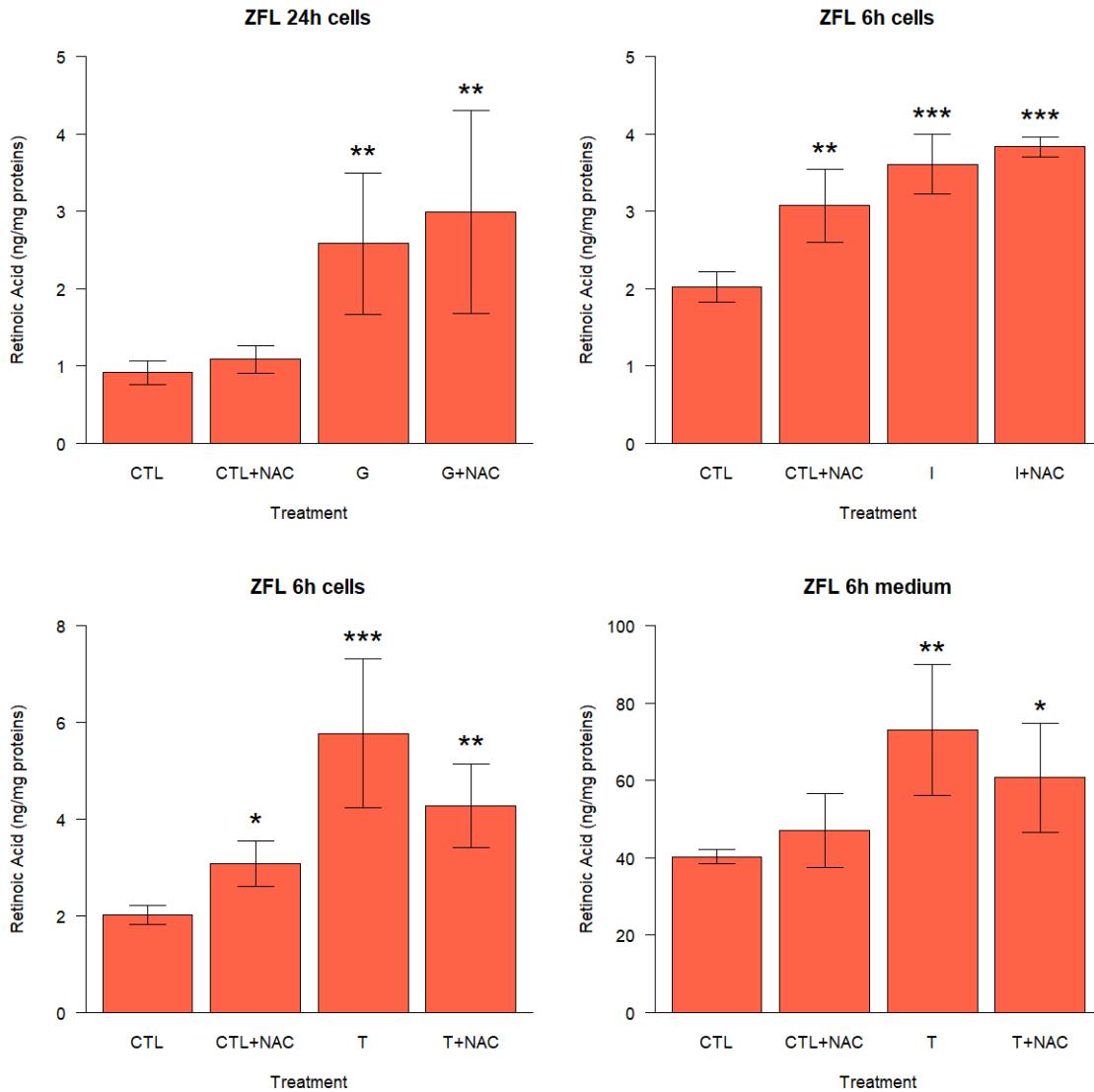


Figure 2.10 – Rescue effect of the antioxidant NAC on RA catabolism after pesticide exposure in ZFL cells (part 2)

ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, and with 1 mM NAC, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 24 h in presence of atrazine or glyphosate, or for 6 h in presence of clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam. Results are expressed as mean \pm SD of RA and 13-cis-4-oxo-RA (ng/mg proteins). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.4.6 Retinoic acid isomerization after pesticide exposure

Figure 2.11 illustrates the proportion of each isomer of RA within the sum of RA isomers in PLHC-1 and ZFL cells. In both cell lines, *at*-RA is consistently the major isomer of RA, which is not surprising since we exposed cells to *at*-RA. More interestingly, in PLHC-1 cells, 9-*cis*-RA only appears in cells exposed to pesticides, and its frequency of appearance increases over time of exposure. This was not due to variation in total quantity of RA over time, as figure 2.6 shows that the peak of accumulation was attained before 6 h of exposure. Comparatively, in ZFL cells, 9-*cis*-RA always was present, even in control cells not exposed to pesticides, which points to an interesting difference between the two cell lines.

Table 2.1 details the statistical outcomes of the Dirichlet regression for PLHC-1 and ZFL cell lines. In PLHC-1 cells, the proportion of *at*-RA changes over time. Surprisingly, and in contrary to what can be inferred from figure 2.11, the proportion of 9-*cis*-RA does not statistically change over time, although that might simply be a statistical bias due to the high number of zeros in the 9-*cis*-RA data; zeros affect the parameters of Dirichlet regressions. Additionally, glyphosate, clothianidin, and thiamethoxam modified the proportions of the various isomers, and the effect of clothianidin and thiamethoxam varies with exposure time. In ZFL cells, the proportions of each isomer change over exposure time, and they also change after exposure to atrazine. The effect of clothianidin was not statistically significant, but its interaction with exposure time was significant. Also, the effect of the interaction between atrazine and exposure time was significant on the proportions of 9-*cis*-RA. In summary, the isomerization of RA in PLHC-1 and ZFL cells varied over time and was affected by some pesticides, notwithstanding important differences between cell lines.

Table 2.1 – Statistical parameters of the Dirichlet regressions for the proportions of each isomer of RA in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure over time

PLHC-1 and ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, or 24 h. The effect of pesticide and time exposure on the proportion of each isomer of RA was assessed with a Dirichlet regression under the common parametrization. † p < 0.1; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

PLHC-1				ZFL			
Isomer	Condition	z value	p-value	Isomer	Condition	z value	p-value
13- <i>cis</i> -RA	Glyphosate	-2.06	*	13- <i>cis</i> -RA	Atrazine	-2.82	**
13- <i>cis</i> -RA	Clothianidin	-4.18	***	13- <i>cis</i> -RA	Clothianidin	1.70	†
13- <i>cis</i> -RA	Thiamethoxam	-2.34	*	13- <i>cis</i> -RA	Thiamethoxam	-1.65	†
13- <i>cis</i> -RA	Clothianidin:Time	2.14	*	13- <i>cis</i> -RA	Time	-2.16	*
13- <i>cis</i> -RA	Thiamethoxam:Time	2.44	*	13- <i>cis</i> -RA	Clothianidin:Time	-2.42	*
9- <i>cis</i> -RA	Glyphosate	-1.71	†	9- <i>cis</i> -RA	Atrazine	-4.33	***
9- <i>cis</i> -RA	Clothianidin	-1.86	†	9- <i>cis</i> -RA	Clothianidin	1.69	†
9- <i>cis</i> -RA	Thiamethoxam	-3.29	**	9- <i>cis</i> -RA	Thiamethoxam	-1.91	†
9- <i>cis</i> -RA	Time	-1.65	†	9- <i>cis</i> -RA	Time	-2.83	**
9- <i>cis</i> -RA	Thiamethoxam:Time	3.84	***	9- <i>cis</i> -RA	Atrazine:Time	2.03	*
<i>at</i> -RA	Glyphosate	-2.12	*	9- <i>cis</i> -RA	Clothianidin:Time	-2.34	*
<i>at</i> -RA	Clothianidin	-3.76	***	<i>at</i> -RA	Atrazine	-2.54	*
<i>at</i> -RA	Thiamethoxam	-1.79	†	<i>at</i> -RA	Clothianidin	1.88	†
<i>at</i> -RA	Time	-2.21	*	<i>at</i> -RA	Time	-3.37	***
<i>at</i> -RA	Clothianidin:Time	1.96	*	<i>at</i> -RA	Atrazine:Time	1.70	†
<i>at</i> -RA	Thiamethoxam:Time	2.61	**	<i>at</i> -RA	Clothianidin:Time	-2.16	*

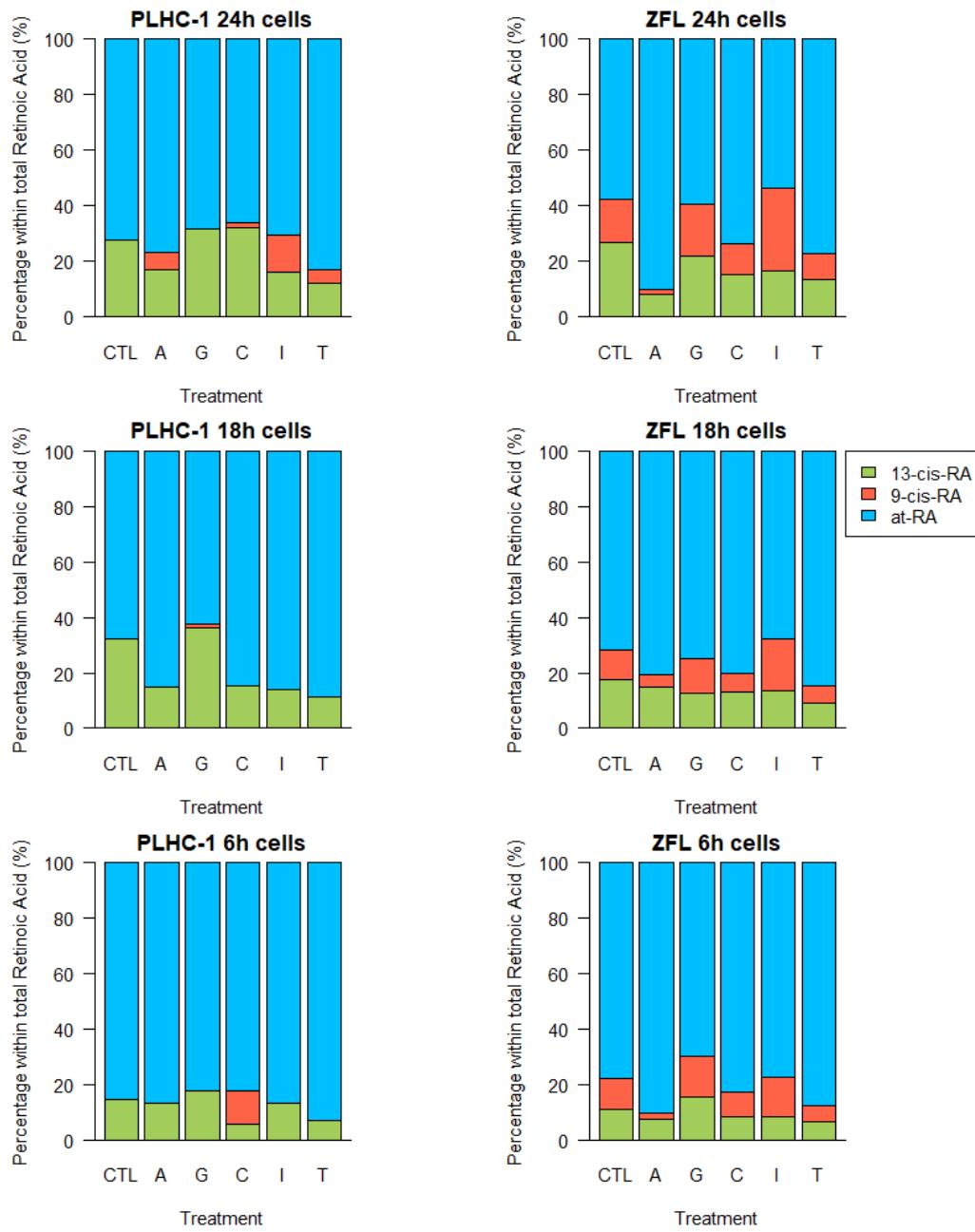


Figure 2.11 – Proportion of each isomer of RA in PLHC-1 and ZFL cells exposed to pesticides

PLHC-1 and ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, or 24 h. The proportions of each isomer are presented as means of percentages (%). Standard deviations of percentages are not shown to alleviate the figure. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam.

2.5 Discussion

We began our study by briefly characterizing RA catabolism in fish hepatic cell lines PLHC-1 and ZFL and by evaluating the contribution of CYP26A1 in this catabolism. In both cell lines, the metabolite *13-cis*-4-oxo-RA was detected, and the three RA isomers eluted in the same order as observed by Lampen et al. (2000) and by Chen et al. (2009) (Fig. 2.2). We had predicted that CYP26A1 would be responsible for most of RA catabolism (Novák et al., 2008). Our results suggest that RA catabolism is mediated mostly by CYP26A1 in ZFL cells, but not in PLHC-1 cells, and the formation of *13-cis*-4-oxo-RA is not mediated by CYP26A1 in both cell lines (Fig. 2.3 and 2.4). These observations agree with those of Topletz et al. (2015), who investigated the induction of CYP26A1 by RA and its metabolites in HepG2 cells and in human hepatic microsomes. In this study, *at*-4-oxo-RA, a substrate for CYP26A1, induced CYP26A1, but the formation of *at*-4-oxo-RA from 4-OH-RA was not inhibited by ketoconazole (10 µM). However, the formation of *at*-4-oxo-RA from *at*-RA was inhibited by talarozole (1 µM), which led the authors to conclude that CYP26A1 was responsible for the initial hydroxylation of RA into 4-OH-RA, but not for the subsequent dehydrogenation of 4-OH-RA into *at*-4-oxo-RA (Topletz et al., 2015).

Whereas Topletz et al. (2015) found decreased contents of *at*-4-oxo-RA in HepG2 cells treated with talarozole due to the inhibition of 4-OH-RA formation, we found an increased formation and decreased catabolism of *13-cis*-4-oxo-RA in PLHC-1 and ZFL cells treated with talarozole (Fig. 2.3 and 2.4). Two possible explanations may account for this difference. 1) CYP26A1 might not be responsible for the initial formation of 4-OH-RA and its dehydrogenation into *13-cis*-4-oxo-RA in fish hepatic cell lines, but only for the catabolism of *13-cis*-4-oxo-RA. However, intracellular 4-OH-RA contents were not measured in the present study, so we may only speculate at this point. 2) *13-cis*-4-oxo-RA was directly produced from RA, independently from 4-OH-RA,

and therefore an inhibition of CYP26A1 would not have affected its formation, but only its catabolism. These two suggestions are illustrated in figure 2.12.

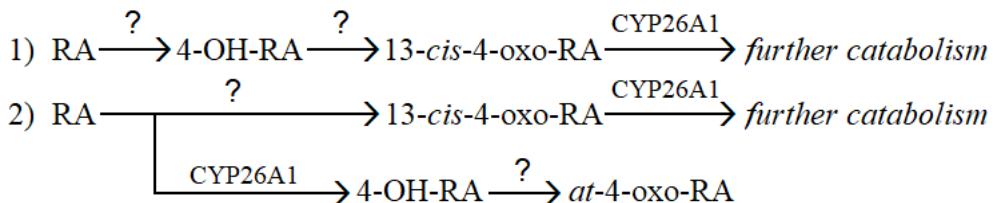


Figure 2.12 – Suggested pathways for the formation and catabolism of 13-cis-4-oxo-RA in fish hepatic cell lines

In any case, CYP26A1 is responsible for most of RA catabolism in ZFL cells, but not in PLHC-1 cells, and CYP26A1 is responsible for the catabolism of 13-cis-4-oxo-RA but not for its formation in both cell lines.

The aim of our study was to investigate the consequences of pesticide exposure on RA catabolism in fish hepatic cell lines. We had predicted that pesticides would stimulate RA catabolism. On the contrary, our results suggest that pesticides inhibit RA catabolism, as evidenced by the intracellular and extracellular accumulations of RA following pesticide exposure (Fig. 2.6 and 2.7). The accumulation of RA and the inhibition of its catabolism could be critical for the cell and for the fish organism; either a deficiency or an excess may affect the immune system, the ocular development, the formation of the cardiac system, the reproductive system, and limb formation during embryonic development (Ross et al., 2000). The extracellular accumulation of RA suggests that cells limit RA uptake when the intracellular contents increase too much, perhaps by regulating the uptake of RA mediated by RBP (Goodman and Raz, 1972; Blomhoff et al., 1990). This would explain why the pesticides which induced the highest intracellular RA contents also limited RA uptake (Fig. 2.6 and 2.7).

In both cell lines, pesticides do not affect the intracellular contents of 13-*cis*-4-oxo-RA, and the extracellular contents are elevated only after atrazine exposure in ZFL cells (Fig. 2.6 and 2.7). As a consequence of an inhibited RA catabolism, one could have expected either lower intracellular contents, or higher extracellular contents, of 13-*cis*-4-oxo-RA. However, 13-*cis*-4-oxo-RA is but one of many metabolites of RA (Napoli, 1999; Ross et al., 2000; Marill et al., 2003), and it might itself be further catabolized (Topletz et al., 2015). Why extracellular levels of 13-*cis*-4-oxo-RA after atrazine exposure in ZFL cells were exceptionally high remains to be explained (Fig. 2.7). We may speculate that atrazine-induced perturbation of RA catabolism in ZFL cells could lead to variation in metabolites ratios, with a higher proportion of 13-*cis*-4-oxo-RA. It is noteworthy that atrazine is also the only pesticide to affect the proportions of each isomer of RA in ZFL cells (Table 2.1).

To summarize our findings, in both cell lines, pesticides seem to inhibit RA catabolism. Leiva-Presa *et al.* (2006) reported an accumulation of ROH in livers of European common frogs (*Rana temporaria*) exposed to *p,p'*-DDE, a toxic metabolite of the organochlorine insecticide DDT. This increase in ROH (one may assume also an increase in RA) was concomitant to a decrease in CYP26 expression. The authors concluded to a disruption of ROH metabolism after exposure to *p,p'*-DDE. Yet, many other studies of retinoid metabolism after pesticide exposure hinted at the inverse pattern.

In the honeybee *Apis mellifera*, atrazine and glyphosate decreased ROH content (Hedrei Helmer et al., 2015). However, β-carotene contents decreased accordingly. Thus, the ROH decrease may be due to either a deficiency in β-carotene in exposed bees, or, as the authors suggested, a stimulation of both β-carotene 15-15'-oxygenase and ROLDH activity, leading to an increased conversion of both β-carotene and ROH to RAL, which would be converted to RA. The latter was unfortunately not measured,

so it is hard to conclude to either an accumulation or depletion of RA in honeybees exposed to atrazine or glyphosate, but the possibility of a depletion remains.

Furthermore, Lemaire et al. (2005) detected an increase in CYP26 expression in human hepatic HepG2 cells after exposure to several organochlorine insecticides, which acted as agonists of RAR α and RAR β , two nuclear receptors of RA which induce the expression of numerous genes, including the *cyp26* gene (for a review of literature on gene transcription by RA, cf. Novák et al., 2008). Unless the HepG2 exposed cells also accumulated excessive RA, which would account for the increased CYP26 expression, we may presume that the increased CYP26 expression would lead to an excessive catabolism of RA, thus decreasing the latter's concentrations in the cells. Although we may again not conclude to a decrease or increase of RA contents in the exposed HepG2 cells because the authors did not measure them, the conflicting results of Lemaire et al. (2005) and Leiva-Presa et al. (2006) regarding CYP26 expression is striking, even though both studies involved pesticides belonging to the same family, that of organochlorine insecticides.

The study of Chen et al. (2009) provides additional evidence for an increased catabolism of RA after pesticide exposure. The authors reported decreased hepatic levels of *at*-RA and increased hepatic levels of the metabolites *at*-4-oxo-RA and *at*-4-OH-RA in mice exposed to three conazole fungicides. They also observed a strong induction of CYP2B and CYP3A expression, but not of CYP26A1 expression. Thus, they concluded to an increased catabolism of RA in mice exposed to conazole fungicides through CYP450 induction.

Closer to our own study model, Landry et al. (2017) reported lower DPAL hepatic contents in yellow perch from lake Saint-Pierre, compared to other populations upstream, less exposed to pesticides. However, liver DROH contents were unchanged,

and the authors did not find any variation in hepatic contents of retinoid precursors such as α -carotene and β -carotene. Therefore, they suggested that the depletion of DPAL might indicate an over-mobilization of hepatic stocks to maintain basal concentrations of DROH. This is precisely the study which prompted our hypothesis of an increased RA catabolism in fish exposed to pesticides.

The study of Landry et al. (2017) suggested an increased catabolism of RA after pesticide exposure, a conclusion that was corroborated by the studies of Lemaire et al. (2005), Hedrei Helmer et al. (2015), and Chen et al. (2009), but not by the study of Leiva-Presa et al. (2006). In the present study, we had predicted an increased catabolism of RA that would be manifested by decreased levels of RA and increased levels of 13-*cis*-4-oxo-RA, but our results infirm this prediction. Given the wide array of genes induced by RA (Bastien and Rochette-Egly, 2004), a decrease of its catabolism is worrying, as it may disrupt numerous physiological pathways following genes overexpression.

Pesticide exposure induced the apparition of 9-*cis*-RA in PLHC-1 cells, especially after 24 h of *at*-RA exposure (Fig. 2.11), though we cannot confirm whether it is *at*-RA or 13-*cis*-RA which isomerized into 9-*cis*-RA. Additionally, atrazine, clothianidin, and thiamethoxam affected the proportions of various RA isomers in PLHC-1 cells, and atrazine had the same effect in ZFL cells (Table 2.1). Similarly, Chen et al. (2009) observed an induction of *at*-RA isomerization by three conazole fungicides in mouse hepatic microsomes.

The cause of this isomerization is still unclear. Had the product of isomerization been the inactive 13-*cis*-RA (Novák et al., 2008), we would have suggested that this isomerization constitutes a defence mechanism against excessive levels of *at*-RA and 9-*cis*-RA. However, in the study of Chen et al. (2009), while the major product of

isomerization is indeed 13-*cis*-RA, levels of *at*-RA are depleted by pesticide exposure, not increased. Whereas in our own study, the major product of isomerization is the active 9-*cis*-RA, not the inactive 13-*cis*-RA. Shih et al. (1986, 1997) reported that the non-enzymatic isomerization of RA isomers is catalyzed by molecules containing sulphydryl groups, i.e. thiols. While we have not measured intracellular thiol levels after 24 h of pesticide exposure in PLHC-1 cells, we found increased levels after 72 h of exposure (Fig. 2.8). Thus, it is not unlikely that pesticide exposure induced oxidative stress, which was met by an increase in intracellular thiols, catalyzing the non-enzymatic isomerization of either *at*-RA or 13-*cis*-RA into 9-*cis*-RA in PLHC-1 cells. In both cases, such an observation is worrisome, for the following reason.

If it be *at*-RA which isomerizes into 9-*cis*-RA, this would mean the induction of genes mediated by the nuclear receptors RXR, which only link to 9-*cis*-RA (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Novák et al., 2008) and which, at least, would not have been induced by the already excessive levels of *at*-RA shown in figure 2.6. If it be 13-*cis*-RA which isomerizes into 9-*cis*-RA, this would mean not only the induction of RXR-mediated genes, but also a passage from an inactive form of RA to an active form, increasing even more the levels of active RA within the cells.

As was noted earlier, *at*-RA isomerization was observed in ZFL cells without pesticide exposure, and atrazine affects this process (Table 2.1), especially after 24 h of exposure (Fig. 2.11). However, in ZFL cells the proportion of 9-*cis*-RA is decreased rather than increased by atrazine, whereas the proportion of *at*-RA is increased (Fig. 2.11). This particular case therefore contradicts our findings in PLHC-1 as well as the findings of Chen et al. (2009). The reason why the isomerization profile in control and atrazine-exposed ZFL cells is different than in the corresponding PLHC-1 cells remains unclear, but these differences between fish cell lines and, perhaps, between fish species, are nonetheless important to consider for future studies of RA metabolism in fish.

The effects of some pesticides on the isomerization process were affected by time of exposure to *at*-RA (Table 2.1 and Fig. 2.11). This translates, in both cell lines, in a seemingly decrease of the proportion of *at*-RA over time in control and pesticide-exposed cells (Fig. 2.11). Thus, we suggest that the isomerization of *at*-RA accentuates over time. Interestingly, in ZFL cells, the proportion of the inactive isomer 13-*cis*-RA increases over time (Table 2.1). This phenomenon might be a defense mechanism against an overaccumulation of the active *at*-RA. If it is the case, then ZFL cells would seem better equipped than PLHC-1 cells to effectively deal with excessive intracellular RA contents by isomerizing these excesses over time. This remains, of course, highly speculative at this point.

We had predicted that pesticides would induce oxidative stress, which would be responsible for the perturbation of RA catabolism. Under our experimental conditions, only PLHC-1 cells exhibited any sign of oxidative stress. Lipid peroxidation increased after exposure to atrazine, glyphosate, and imidacloprid, and intracellular thiols increased after exposure to atrazine, clothianidin, and thiamethoxam (Fig. 2.8). However, the increase of intracellular thiols after clothianidin or thiamethoxam exposure might be an artifact of the linear model, which was weighted by the intra-group variances to account for heteroscedasticity. This weighting, while necessary to fit the linear model to heteroscedastic results and avoid type II errors (false negatives), increases the sensibility of the model and the risk of committing type I errors (false positives). This information nuances the conclusion that clothianidin and thiamethoxam increase intracellular contents, without invalidating it. Atrazine has been shown to induce lipid peroxidation in the liver of the fish *Channa Punctatus* (Nwani et al., 2010). Imidacloprid also induced lipid peroxidation in mice livers (El-Gendy et al., 2010). Likewise, lipid peroxidation was observed in the gills and in blood cells of the fish *C. punctatus* after exposure to glyphosate (Nwani et al., 2013).

The ZFL cells were found more sensible to pesticides than PLHC-1 cells, most notably to thiamethoxam and atrazine (Fig. 2.5). According to our study, thiols and the peroxidation of lipids did not influence the mortality of ZFL cells exposed to pesticides (Fig. 2.8). However, before discarding the influence of oxidative stress on mortality, it would be of interest to measure other biomarkers such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase (Slaninova et al., 2009). Out of the three neonicotinoids, thiamethoxam was the most cytotoxic, most notably for the ZFL cells (Fig. 2.5). Interestingly, in a study investigating the effects of neonicotinoids and ultraviolet radiation on perch's larvae, thiamethoxam was also more lethal than imidacloprid (Paquet-Walsh et al., 2019). The herbicide atrazine was strikingly more toxic than glyphosate in both cell lines (Fig. 2.5), perhaps through a more important oxidative stress, as evidenced by the drastic rise of intracellular thiols in PLHC-1 cells exposed to atrazine (Fig. 2.8).

The relation between oxidative stress and the perturbation of RA catabolism was studied by investigating the effect of an antioxidant agent on the pesticides-induced effects. We had predicted that the antioxidant agent would yield a rescue effect. This was the case after atrazine exposure in both cell lines, after imidacloprid exposure in PLHC-1 cells and after thiamethoxam exposure in ZFL cells (Fig. 2.9 and 2.10). Therefore, oxidative stress is involved in the disruption of RA catabolism induced by atrazine, imidacloprid, and thiamethoxam, with a possible altered expression or activity of the CYP450 enzymes responsible for the catabolism of RA.

In SVGA astrocytes, ethanol increased the transcription and expression of CYP2E1, but this effect disappeared with a co-treatment with the antioxidant vitamin A, leading the authors to conclude that the increased CYP2E1 expression is mediated through oxidative stress (Jin et al., 2013). In human HepG2 and rat H4 hepatoma cells exposed to TCDD, a pre-treatment with the oxidative agent H₂O₂ greatly reduced CYP1A1

expression, thus affecting the cellular defense mechanisms against TCDD toxicity (Morel and Barouki, 1998). In the same cells, a dose-dependent downregulation of the CYP1A1 promoter gene activity was observed with increasing concentrations of H₂O₂, and a depletion of GSH also downregulated the promoter (Morel and Barouki, 1998). In rat livers and HepG2 cells, CCl₄ caused lipid peroxidation and reduced the expression and activity of CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP2E1, and CYP3A2, whereas a pre-treatment with antioxidant lignans rescued the livers against lipid peroxidation and moderated the inhibition of the expression and activity of the above mentioned CYP450 enzymes (Xie et al., 2014).

Unlike atrazine, imidacloprid, and thiamethoxam, the impacts of glyphosate and clothianidin on RA catabolism were not nullified by NAC (Fig. 2.9 and 2.10). Clothianidin is metabolized by CYP450 (Casida, 2011), and we know that RA is not catabolized solely by CYP26A1, but also by other CYP450 of the CYP1, 2, 3, and 4 families (Novák et al., 2008), especially in PLHC-1 cells (Fig. 2.3). Therefore, clothianidin might compete with RA for the CYP450. Glyphosate, however, is not metabolized by CYP450 and seems to be mostly excreted without being metabolized at all (Hietanen et al., 1983; Brewster et al., 1991). Nonetheless, it also inhibits some CYP450 enzymes (Abass and Pelkonen, 2013) and decreases their concentrations (Hietanen et al., 1983), and it might therefore inhibit the CYP450 enzymes responsible for RA catabolism.

2.6 Conclusion

The aim of our study was to evaluate the impacts of herbicides and neonicotinoid insecticides on RA catabolism in fish by using fish hepatic cell lines as *in vitro* models. We hypothesized that pesticides would stimulate RA catabolism through oxidative stress. On the contrary, our results show that pesticides inhibit RA catabolism in fish hepatic cell lines. Atrazine, imidacloprid, and thiamethoxam perturb RA catabolism through oxidative stress, whereas glyphosate and clothianidin perturb it through other mechanisms. Additionally, pesticides affect the isomerization of *at*-RA over time. Interestingly, CYP26A1 is responsible for RA catabolism in ZFL cells but not in PLHC-1 cells. For future research, the CYP450 enzyme responsible for RA catabolism in PLHC-1 cells could be investigated by testing other specific inhibitors of CYP450 enzymes, and this investigation could be repeated in other fish cell lines, such as Hepa-E1 (*Anguilla japonica*) et RTL-W1 (*Oncorhynchus mykiss*), to determine whether the case of PLHC-1 is the exception or the norm in fish. Additionally, the effect of oxidative stress on RA catabolism could be studied directly, by measuring RA catabolism after exposure to H₂O₂. Furthermore, to understand how glyphosate and clothianidin inhibit RA catabolism, the expression of CYP26A1 could be measured in ZFL cells by Western Blot, to determine if it is decreased by these pesticides. In conclusion, these results allow for a better understanding of how pesticides perturb RA catabolism in fish. Moreover, they make the case for using fish hepatic cell lines as *in vitro* models for the study of retinoid metabolism in a toxicological context. Finally, it is risky to conclude that RA catabolism is inhibited in yellow perch from lake Saint-Pierre solely on the basis of our *in vitro* findings. However, if this be the case, this disruption of RA catabolism and the associated increase in RA contents could partly explain why yellow perch in lake Saint-Pierre experience growth deficit, given the role of retinoids in development.

2.7 References

- Abass, K., Pelkonen, O. (2013). The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1584-1588.
- Auguie, B. (2017). gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics. R package version 2.3. <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, 328, 1-16.
- Blomhoff, R., Green, M. H., Berg, T., Norum, K. R. (1990). Transport and storage of vitamin A. *Science*, 250(4979), 399-404.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bernatchez, L., Giroux, M. (2000). *Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'Est du Canada*. Ottawa : Broquet, 350 p.
- Brewster, D. W., Warren, J., Hopkins II, W. E. (1991). Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundamental and applied toxicology*, 17(1), 43-51.
- Bruneau, A., Landry, C., Giraudo, M., Douville, M., Brodeur, P., Boily, M., Gagnon, P., Houde, M. (2016). Integrated spatial health assessment of yellow perch (*Perca flavescens*) populations from the St. Lawrence River (QC, Canada), part B: cellular and transcriptomic effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18211-18221.
- Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2923-2931.
- Chatham, K. (1999). Planned Contrasts: An Overview of Comparison Methods. Paper presented at the Annual Meeting of the Southwest Educational Research Association (San Antonio, TX, January 21-23, 1999).

- Chen, P. J., Padgett, W. T., Moore, T., Winnik, W., Lambert, G. R., Thai, S. F., Hester, S. D., Nesnow, S. (2009). Three conazoles increase hepatic microsomal retinoic acid metabolism and decrease mouse hepatic retinoic acid levels in vivo. *Toxicology and applied pharmacology*, 234(2), 143-155.
- De La Chenelière, V., Brodeur, P., Mingelbier, M. (2014). Restauration des habitats du lac Saint-Pierre: un prérequis au rétablissement de la perchaude. *Le naturaliste canadien*, 138, 50-61.
- Douma, J. C., Weedon, J. T. (2019). Analysing continuous proportions in ecology and evolution: A practical introduction to beta and Dirichlet regression. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(9), 1412-1430.
- El-Gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Kenawy, A., El-Sebae, A. K. H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and chemical Toxicology*, 48(1), 215-221.
- Edwards, S. M. (2019). lemon: Freshing Up your 'ggplot2' Plots. R package version 0.4.3. <https://CRAN.R-project.org/package=lemon>.
- Giroux, I., Hébert, S., Berryman, D. (2016). Qualité de l'eau du Saint-Laurent de 2000 à 2014: paramètres classiques, pesticides et contaminants émergents. *Le Naturaliste Canadien*, 140, 26-34.
- Goodman, D. S., Raz, A. (1972). Extraction and recombination studies of the interaction of retinol with human plasma retinol-binding protein. *Journal of lipid research*, 13(3), 338-347.
- Hedrei Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8010-8021.
- Hietanen, E., Linnainmaa, K., Vainio, H. (1983). Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 53(2), 103-112.
- Idres, N., Marill, J., Flexor, M. A., Chabot, G. C. (2002). Activation of retinoic acid receptor dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 31491–31498.
- Jin, M., Ande, A., Kumar, A., Kumar, S. (2013). Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell death & disease*, 4(3), e554-e554.

- Lampen, A., Meyer, S., Arnhold, T., Nau, H. (2000). Metabolism of vitamin A and its active metabolite *all-trans*-retinoic acid in small intestinal enterocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(3), 979-985.
- Landry, C., Houde, M., Brodeur, P., Spear, P., Boily, M. (2017). Lipophilic antioxidants and lipid peroxidation in yellow perch subjected to various anthropogenic influences along the St. Lawrence River (QC, Canada). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 316-325.
- Leiva-Presa, A., Mortensen, A. S., Arukwe, A., Jenssen, 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. (2005). Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 38-49.
- Magnan, P., P. Brodeur, É. Paquin, N. Vachon, Y. Paradis, P. Dumont et Y. Mailhot. 2017. *État du stock de perchaudes du lac Saint-Pierre en 2016. Comité scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre*. Chaire de recherche du Canada en écologie des eaux douces, Université du Québec à Trois-Rivières et ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs. vii + 34 pages + annexes.
- Maier, M. J. (2014). DirichletReg: Dirichlet Regression for Compositional Data in R. Research Report Series / Department of Statistics and Mathematics, 125. WU Vienna University of Economics and Business, Vienna. <http://epub.wu.ac.at/4077/>.
- Maier, M. J. (2015). DirichletReg: Dirichlet Regression in R. R package version 0.6-3.1. <http://dirichletreg.r-forge.r-project.org/>.
- Mailhot, Y. (1997). Plan de gestion de la pêche à la perchaude et suivi scientifique de la population de la perchaude. Dans M. Bernard et C. Groleau, *Compte rendu du deuxième atelier sur les pêches commerciales*. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, p. 141-146.
- Marill, J., Idres, N., Capron, C. C., Nguyen, E., Chabot, G. G. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current Drug Metabolism*, 4, 1-10.

- Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, (MDDEP), 2012. *Portrait de la qualité des eaux de surface au Québec 1999 – 2008*, Québec, Direction du suivi de l'état de l'environnement. ISBN 978-2-550-63649-6 (PDF), 97 p.
- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) du Québec. (28 mars 2012). *Pêche à la perchaude au lac Saint-Pierre - Le ministère des Ressources naturelles et de la Faune intensifie les mesures de protection et de restauration* [Communiqué]. Récupéré de <https://mffp.gouv.qc.ca/presse/communiques-detail.jsp?id=9539>.
- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) du Québec. (2 mai 2017). *Pêche à la perchaude au lac Saint-Pierre – Reconduction du moratoire jusqu'en 2022* [Communiqué]. Récupéré de <https://mffp.gouv.qc.ca/peche-perchaude-lac-saint-pierre-moratoire-2022/>.
- Morel, Y., Barouki, R. (1998). Down-regulation of Cytochrome P450 1A1 Gene Promoter by Oxidative Stress, Critical Contribution of Nuclear Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26969-26976.
- Napoli, J. L. (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80, S52-S62.
- Napoli, J. L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440, 139-162.
- Novák, J., Beníšek, M., Hilscherová, K. (2008). Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International*, 34, 898-913.
- Nwani, C. D., Lakra, W. S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S. K. (2010). Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *International journal of environmental research and public health*, 7, 3298-3312.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W. S. (2013). DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, 539-547.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

- Paquet-Walsh, A., Bertolo, A., Landry, C., Deschamps, L., Boily, M. (2019). Interactive effects of neonicotinoids and natural ultraviolet radiation on yellow perch (*Perca flavescens*) larvae. *Science of The Total Environment*, 685, 690-701.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E., Maden, M. (2005). The control of morphogen signaling: Regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Developmental Biology*, 285, 224-237.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015) Dose-Response Analysis Using R *PLOS ONE*, 10(12), e0146021.
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., De Luca, L. M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiological reviews*, 80, 1021-1054.
- Shih, T. W., Lin, T. H., Shealy, Y. F., Hill, D. L. (1997). Nonenzymatic isomerization of 9-cis-retinoic acid catalyzed by sulphydryl compounds. *Drug metabolism and disposition*, 25(1), 27-32.
- Shih, T. W., Shealy, Y. F., Strother, D. L., Hill, D. L. (1986). Nonenzymatic isomerization of all-trans-and 13-cis-retinoids catalyzed by sulphydryl groups. *Drug metabolism and disposition*, 14(6), 698-702.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z. (2009). A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*, 30, 2-12.
- Smith, J. E., Milch, P. O., Muto, Y., Goodman, D. S. (1973). The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat. *Biochemical Journal*, 132(4), 821-827.
- Solari, M., Paquin, J., Ducharme, P., Boily, M. (2010). P19 neuronal differentiation and retinoic acid metabolism as criteria to investigate atrazine, nitrite, and nitrate developmental toxicity. *Toxicological Sciences*, 113, 116-126.
- Topletz, A. R., Tripathy, S., Foti, R. S., Shimshoni, J. A., Nelson, W. L., Isoherranen, N. (2015). Induction of CYP26A1 by metabolites of retinoic acid: evidence that CYP26A1 is an important enzyme in the elimination of active retinoids. *Molecular pharmacology*, 87(3), 430-441.
- Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

Xie, Y., Hao, H., Wang, H., Guo, C., Kang, A., Wang, G. (2014). Reversing effects of lignans on CCl₄-induced hepatic CYP450 down regulation by attenuating oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 213-221.

CHAPITRE III

DISCUSSION

3.1 Contexte de l'étude

La population de perchaudes du lac Saint-Pierre, jadis prospère, est aujourd’hui dans un triste état (Mailhot, 1997; Thibault, 1999; Magnan *et al.*, 2017). Son abundance, après un déclin effroyable, s'est finalement stabilisée, mais demeure très basse. Les jeunes perchaudes n'atteignent pas la taille minimale requise pour survivre à leur premier hiver et souffrent donc d'une surmortalité qui empêche un recrutement adéquat et maintient la population dans un état précaire (Magnan *et al.*, 2017). Le lac Saint-Pierre étant fortement contaminé en pesticides (Giroux *et al.*, 2016), ces derniers sont pointés du doigt comme une des causes du déclin des perchaudes (de la Chenelière *et al.*, 2014) et sont soupçonnés de perturber le métabolisme des rétinoïdes, des composés essentiels à la croissance (Ross *et al.*, 2000). Des recherches menées dans notre laboratoire ont montré une sur-mobilisation des réserves hépatiques de DPAL chez les perchaudes du lac Saint-Pierre, probablement provoquée par un catabolisme excessif de l'acide rétinoïque (Landry *et al.*, 2017). Néanmoins, le lien de cause à effet entre les pesticides et la perturbation du métabolisme des rétinoïdes restait à démontrer.

Mon projet de recherche visait à mieux comprendre le catabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson. Mon hypothèse voulait que certains pesticides stimuleraient le

catabolisme de l'acide rétinoïque par le biais d'un stress oxydatif. Pour évaluer cette hypothèse, j'ai étudié l'effet de deux herbicides et de trois insecticides néonicotinoïdes, en l'occurrence Aatrex® (atrazine), Credit Xtreme® (glyphosate), Titan® (clothianidine), Admire® (imidaclopride) et Actara® (thiaméthoxame), sur le catabolisme de l'acide rétinoïque dans deux lignées cellulaires hépatiques de poisson, PLHC-1 et ZFL. En transposant la problématique vers des lignées cellulaires, j'ai pu mettre au point un modèle *in vitro* pour étudier le métabolisme des rétinoïdes chez le poisson. Mes résultats confirment et infirment à la fois mon hypothèse. J'ai bel et bien observé une perturbation du catabolisme de l'acide rétinoïque par des pesticides, mais cette perturbation va dans le sens opposé à celui prévu, c'est-à-dire que les pesticides inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque. L'atrazine, l'imidaclorpride et le thiaméthoxame inhibent ce catabolisme par le biais d'un stress oxydatif, et cette inhibition disparaît lorsque le stress oxydatif est contré par un agent antioxydant. Cependant, le glyphosate et le clothianidine inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque par un autre mécanisme que le stress oxydatif. Les pages qui suivent font état de certains résultats avec les modèles cellulaires et de l'implication de mes conclusions sur la population de perchaudes du lac Saint-Pierre. Finalement, j'aborderai quelques perspectives de recherche que soulèvent mes résultats.

3.2 Retour sur certains résultats

Dans les deux lignées cellulaires étudiées, les niveaux basals (c'est-à-dire les niveaux mesurés sans exposition à de l'acide rétinoïque) de 13-*cis*-4-oxo-AR ne sont pas nuls. Or, seules les cellules ZFL possèdent des niveaux basals d'acide rétinoïque non-nuls, sous la forme de 9-*cis*-AR. L'on s'attendrait à ce que, en absence d'exposition à de l'acide rétinoïque, les cellules n'aient simplement pas d'acide rétinoïque à cataboliser. Ces données impliquent donc que les cellules aient accès à une source de rétinoïdes

dans le milieu de culture, probablement sous la forme de ROH plasmatique issu du sérum fœtal bovin ajouté au milieu de culture. D'ailleurs, cela n'est pas surprenant, considérant que l'acide rétinoïque joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires, notamment la survie, la différenciation et la prolifération (Noy, 2010; Bar-El Dadon et Reifen, 2017). Puisque les formulations de milieux de culture ne contiennent aucune forme de rétinoïdes, l'apport essentiel serait assuré par le sérum fœtal bovin. Ainsi, il y aurait donc un métabolisme basal et continu de l'acide rétinoïque dans les cellules en culture, ce qui expliquerait la présence de 13-*cis*-4-oxo-AR intracellulaire et extracellulaire dans les deux lignées, ainsi que la présence de 9-*cis*-AR dans les cellules ZFL.

L'atrazine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque par le biais d'un stress oxydatif. Pourquoi le stress oxydatif inhiberait-il l'activité du CYP450 et en quoi cela est-il pertinent pour ma recherche ? Une réponse à la première question est proposée par Morel et Barouki (1998) qui nous rappellent que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un sous-produit de l'activité de plusieurs enzymes du CYP450. Le stress oxydatif causé par le H_2O_2 inhiberait le CYP450 par une boucle de rétro-inhibition. D'ailleurs, cette boucle échouerait dans le cas des dommages hépatiques induits par l'alcool (Jin *et al.*, 2013), ce qui souligne encore plus l'importance biologique d'un tel mécanisme. La réponse à la seconde question est liée à trois constats. 1) Tous les pesticides utilisés, sauf le glyphosate, sont métabolisés par des enzymes du CYP450 (Lang *et al.*, 1997; Schulz-Jander et Casida, 2002; Joo *et al.*, 2010; Casida, 2011). Le catabolisme de ces pesticides pourrait donc constituer en soi une source de stress oxydatif. 2) Au moins dans les cellules PLHC-1, l'atrazine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame causent un stress oxydatif. 3) Le catabolisme de l'acide rétinoïque est assuré par des enzymes du CYP450 (Novák *et al.*, 2008). Donc, l'atrazine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame inhiberaient, par le biais d'un stress

oxydatif, les enzymes du CYP450 responsables du catabolisme de l'acide rétinoïque, en faisant intervenir la boucle de rétro-inhibition.

3.3 Des lignées cellulaires aux perchaudes du lac Saint-Pierre

Il est difficile d'extrapoler des résultats obtenus *in vitro* à des organismes *in vivo* et, de surcroît, d'appliquer ces résultats à des perchaudes vivant dans un environnement complexe. Je ne m'aventurerai donc pas dans une telle entreprise, mais je désire tout de même revenir sur la suggestion de Landry *et al.* (2017), qui a motivé mon projet de recherche. D'une part, il est clair que les pesticides ne stimulent pas le catabolisme de l'acide rétinoïque dans des lignées cellulaires hépatiques de poisson, mais l'inhibent. D'autre part, il est clair que les perchaudes du lac Saint-Pierre sur-mobilisent leurs réserves hépatiques de rétinoïdes (Landry *et al.*, 2017). Comment concilier ces deux affirmations ?

Il n'est pas exclu que les pesticides causent une sur-mobilisation des réserves hépatiques de rétinoïdes en stimulant la conversion du DPAL en DROH, autrement dit, en stimulant l'expression ou l'activité de HER ou des autres enzymes pouvant hydrolyser les esters de 3,4-didéhydrorétinol, plutôt qu'en stimulant le catabolisme de l'acide rétinoïque. Landry *et al.* (2020) ont d'ailleurs observé une baisse du ratio de DPAL/DROH chez les perchaudes de la partie sud du lac Saint-Pierre, ce qui suggère un déséquilibre des enzymes LRAT-ARAT/HER.

Le lac Saint-Pierre et ses tributaires sont contaminés par un grand nombre de pesticides, mais aussi par bien d'autres contaminants agricoles et non agricoles : phosphore, produits azotés, éléments-traces métalliques, polybromodiphényléthers, composés perfluorés, produits pharmaceutiques et de soins personnels, etc. (MDDEP, 2012;

Giroux *et al.*, 2016). La sur-mobilisation des réserves hépatiques de rétinoïdes pourrait bien être causée par l'un de ces nombreux autres contaminants. Les PBDE, par exemple, altèrent l'entreposage, le transport et le métabolisme des rétinoïdes chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*). Une exposition *in vivo* à des concentrations environnementales et supra-environnementales provoque une baisse des réserves hépatiques d'esters de rétinol, couplée à une hausse de ROH (Chen *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montré qu'une exposition à des éléments-traces métalliques entraîne une baisse des niveaux hépatiques d'esters de rétinol chez le poisson, quoique certaines études ont à l'inverse souligné une hausse des réserves d'esters de rétinol (Defo *et al.*, 2014). Ces quelques exemples indiquent que d'autres contaminants que des pesticides pourraient causer la sur-mobilisation des réserves hépatiques de rétinoïdes observée chez les perchaudes du lac Saint-Pierre.

Finalement, la cause du déficit des réserves hépatiques de rétinoïdes chez les perchaudes du lac Saint-Pierre pourrait être d'ordre écologique plutôt que métabolique. Le couvert macrophytique des zones peu profondes du lac a subi des transformations majeures depuis au moins 2005 : les grands herbiers, autrefois dominés par la vallisnérie, cèdent leur place à un tapis filamentueux de cyanobactéries benthiques (de la Chenelière *et al.*, 2014). Cette transformation s'explique par l'apport excessif en nutriments apporté par les tributaires du lac, au sud (MDDEP, 2012). À l'embouchure de ces rivières, les macrophytes abondent, puisque leur croissance est stimulée par les excès de phosphore et d'azote (zone enrichie). L'eau contient alors davantage de particules en suspension. Il s'en suit une épuration des nutriments de l'eau qui, en aval, devient oligotrophe, donc déficitaire en azote et en phosphore, ce qui y limite la croissance des macrophytes (zone épurée). En conséquence, les macrophytes déclinent et les cyanobactéries *Lyngbia wollei* et *Gloeoetrichia pisum*, qui fixent elles-mêmes l'azote atmosphérique, abondent (Hudon et Carignan, 2008; Vis *et al.*, 2008). De cette transformation du couvert végétal du lac s'en suit une réduction marquée de la

disponibilité des invertébrés, notamment des gastropodes, éléments essentiels de la diète des perchaudes juvéniles (Hudon *et al.*, 2012).

À la naissance, les perchaudes larvaires se nourrissent principalement de zooplanctons, puis leur diète passe aux invertébrés benthiques après quelques semaines (Fortin et Magnin, 1972). La biomasse d'invertébrés étant plus élevée dans la zone enrichie, le taux de croissance des perchaudes dans cette zone est 26 % supérieur au taux de croissance des perchaudes dans la zone épurée (Hudon *et al.*, 2012). En août, les jeunes perchaudes de la zone enrichie présentent donc une meilleure condition. Or, selon le modèle de Post et Evans (1989), les perchaudes doivent atteindre à la fin de leur premier été une taille de 70 à 95 mm pour espérer survivre à l'hiver. Suivant ce modèle, le taux de mortalité des perchaudes de première année est estimé à 39 % dans la zone épurée, contre seulement 8 % dans la zone enrichie (Hudon *et al.*, 2012). Ce haut taux de mortalité juvénile estimé concorde avec le faible recrutement dénoté par Magnan *et al.* (2017). Bref, la perte du couvert macrophytique, la prolifération de cyanobactéries benthiques et la baisse de disponibilité des invertébrés dans le lac causeraient possiblement des déficits nutritionnels qui expliqueraient le défaut de croissance des perchaudes de première année du lac Saint-Pierre (Hudon *et al.*, 2012).

Landry *et al.* (2020) suggèrent justement que la baisse du ratio de DPAL/DROH pourrait être due à des déficits nutritionnels. Cela dit, les contenus tissulaires en caroténoïdes provitamine A ne sont pas systématiquement plus faibles chez les perchaudes du lac Saint-Pierre, lorsque celles-ci sont comparées aux perchaudes des lacs Saint-François et Saint-Louis, situés en amont (Landry *et al.*, 2017). Néanmoins, une perturbation de la conversion des caroténoïdes en rétinoïdes par l'oxygénase des caroténoïdes pourrait limiter la capacité des perchaudes du lac Saint-Pierre à exploiter leurs caroténoïdes provitamine A, ce qui résulterait en une baisse du ratio DPAL/DROH (Landry *et al.*, 2020).

3.4 Perspectives de recherche

La recherche scientifique est un processus qui se nourrit de lui-même : chaque réponse entraîne de nouvelles questions, et les réponses à ces questions génèrent elles-mêmes de nouvelles questions. Mon projet de recherche ne fait pas exception à cette règle. Dans les lignes qui suivent, je proposerai quelques perspectives de recherche, pour approfondir encore davantage nos connaissances dans ce domaine.

J'ai montré que l'atrazine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque par le biais d'un stress oxydatif. Pour ajouter un élément de preuve à ce constat, il serait intéressant d'évaluer directement l'effet du stress oxydatif sur le catabolisme de l'acide rétinoïque dans les lignées cellulaires PLHC-1 et ZFL. J'ai tenté une telle expérience, en exposant les cellules PLHC-1 et ZFL à 100 µM de H₂O₂ pendant 3 h pour stimuler un stress oxydatif, mais les résultats n'étaient pas concluants. Cette méthode pourrait être reprise en ajustant la concentration et la durée d'exposition et en vérifiant que le traitement choisi génère bel et bien des ERO, en mesurant la fluorescence de la sonde DCFH-DA une fois en DCF. Une autre approche à considérer pour vérifier le lien entre le stress oxydatif et l'inhibition du catabolisme de l'acide rétinoïque serait d'affaiblir les défenses antioxydantes des cellules en inhibant la synthèse de GSH par une exposition à 10 µM de buthionine sulfoximine (Griffith et Meister, 1979). Ces deux expériences permettraient de mieux comprendre l'effet des ERO sur les enzymes du CYP450 responsables du catabolisme de l'acide rétinoïque, notamment CYP26A1 dans les cellules ZFL.

Ma brève caractérisation du catabolisme de l'acide rétinoïque a montré, contre toute attente, la faible contribution du CYP26A1 dans ce catabolisme dans les cellules PLHC-1. Il serait intéressant d'exposer ces cellules à d'autres inhibiteurs spécifiques

de certaines isoformes de CYP450 (Tableau 3.1) afin d'identifier celles principalement responsables du catabolisme de l'acide rétinoïque. Une fois ces enzymes identifiées, il serait de mise de vérifier l'effet des inhibiteurs sur le catabolisme de l'acide rétinoïque dans d'autres lignées cellulaires hépatiques de poisson, telles que Hepa-E1 (*Anguilla japonica*) et RTL-W1 (*Oncorhynchus mykiss*), pour déterminer si le cas des cellules PLHC-1 constitue ou non une exception et ainsi mieux comprendre les particularités du métabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson.

Tableau 3.1 – Inhibiteurs spécifiques d'enzymes du cytochrome P450

Adapté de Parmentier *et al.* (2007)

Cytochrome	Inhibiteurs spécifiques
CYP1A1	Alpha-naphthoflavone
CYP1A2	Furafylline
CYP2A6	Tranylcypromine, méthoxsalène, pilocarpine
CYP2B6	8-méthoxypsoralène, triéthylène thio phosphoramide
CYP2C8	Quercétine
CYP2C9	Diclofénac, sulfaphénazole
CYP2C19	N3-benzyl nirvanole
CYP2D6	Quinidine
CYP2E1	Diéthyldithiocarbamate, disulfirame
CYP3A4	Itraconazole

Lemaire *et al.* (2005) ont observé une hausse de l'expression du CYP26A1 dans les cellules hépatiques humaines HepG2 après 24 h d'exposition à 10 µM d'insecticides organochlorés. J'avais moi-même prévu mesurer l'expression du CYP26A1 par immunobuvardage de type Western dans les cellules PLHC-1 et ZFL après exposition aux deux herbicides et trois insecticides néonicotinoïdes étudiés. Une première tentative à cet égard n'avait pas été concluante et les contraintes temporelles ne m'ont pas permis de compléter cet aspect de mon projet de recherche.

Mes résultats ont montré que le glyphosate et le clothianidine inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque par le biais d'un mécanisme autre que le stress oxydatif. De plus, nous savons que ce catabolisme est principalement pris en charge par l'enzyme CYP26A1 dans les cellules ZFL, mais nous ignorons quelle isoforme spécifique du CYP450 catabolise l'acide rétinoïque dans les cellules PLHC-1. Après l'avoir identifiée à l'aide d'inhibiteurs spécifiques, il serait intéressant d'étudier l'effet des pesticides sur les niveaux d'expression des isoformes responsables du catabolisme de l'acide rétinoïque dans les deux lignées. Si ces pesticides inhibent l'expression de enzymes chargées du catabolisme de l'acide rétinoïque, alors le mécanisme d'action par lequel ces pesticides inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque serait identifié. Inversement, si ce mécanisme n'est pas à l'origine de l'inhibition du catabolisme, une accumulation anormale d'acide rétinoïque pourrait alors mener à une surexpression des isoformes de CYP450, puisque l'acide rétinoïque induit l'expression des enzymes qui le catabolisent (Novák *et al.*, 2008).

Chez la perchaude, comme chez plusieurs autres poissons d'eau douce, la forme DROH prime sur la forme ROH. Cette forme alternative constituerait une adaptation facilitant la vision en eau douce (Enright *et al.*, 2015; La Frano *et al.*, 2018). Pour mieux refléter la situation de la perchaude, une caractérisation du métabolisme de l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque pourrait être envisagée dans les lignées cellulaires hépatiques de poisson. De plus, la caractérisation du métabolisme pourrait être approfondie en mesurant la formation et la dégradation des autres métabolites de l'acide rétinoïque, notamment le 4-OH-AR (le précurseur du 4-oxo-AR), le 18-hydroxy-acide rétinoïque (18-OH-AR), le 5,6-époxy-acide rétinoïque (5,6-époxy-AR), ainsi que les métabolites conjugués par glucuronidation (Marill *et al.*, 2003; Topletz *et al.*, 2015).

Durant le développement embryonnaire, du moins chez les mammifères, le métabolisme des rétinoïdes doit être très finement régulé, puisque tant l'excès que le déficit en ROH ou en acide rétinoïque peut avoir des conséquences désastreuses sur le développement, notamment au niveau des systèmes cardiaque, musculosquelettique, nerveux et oculaire (Ross *et al.*, 2000). Puisque les perchaudes du lac Saint-Pierre souffrent de problèmes de croissance et que nous soupçonnons que les perturbations du métabolisme des rétinoïdes en constituent une des causes, il serait intéressant de caractériser le métabolisme de l'acide rétinoïque dans les cellules embryonnaires de poisson ZEM2S (*Danio rerio*) et d'étudier l'effet des pesticides sur ce modèle cellulaire.

Mon projet de recherche évaluait l'effet d'une exposition individuelle à divers pesticides. Or, dans l'environnement, les organismes sont exposés à une panoplie de contaminants, dont les effets combinés peuvent être synergistes, additifs, potentialisateurs ou antagonistes. Dans le lac Saint-Pierre et dans ses tributaires, Giroux *et al.* (2016) ont détecté jusqu'à 21 pesticides. Il serait possible d'évaluer le catabolisme de l'acide rétinoïque dans des cellules exposées à des combinaisons de pesticides, pour mieux refléter une exposition réelle. Lorsque j'ai caractérisé la sensibilité des cellules PLHC-1 et ZFL aux pesticides sélectionnés pour mon étude, j'ai brièvement évalué la sensibilité de ces cellules à des combinaisons de pesticides (Figure 3.1). Aucun effet additif n'a été observé entre les pesticides dans les cellules PLHC-1 après 1 jour d'exposition. En revanche, un effet possiblement additif a été observé après 3 jours d'exposition dans les cellules PLHC-1 et après 1 jour d'exposition dans les cellules ZFL lorsque la concentration des pesticides est de 250 mg/L. Dans la lignée PLHC-1, la viabilité oscille toujours autour de 75 % après une journée d'exposition à 250 mg/L de pesticides combinés. En revanche, la lignée ZFL semble plus sensible à certains mélanges lorsque la concentration des pesticides est de 250 mg/L, particulièrement en présence de thiaméthoxame. Je suggère, pour des études futures menées sur les mélanges de pesticides et le catabolisme de l'acide rétinoïque, de préserver pour la

lignée PLHC-1 les paramètres d'exposition utilisés dans mon projet de recherche, c'est-à-dire d'exposer les cellules à 250 mg/L de pesticides pendant 24 h, mais d'exposer la lignée ZFL à une concentration inférieure à 250 mg/L, mais supérieure à 50 mg/L, qui serait préalablement déterminée.

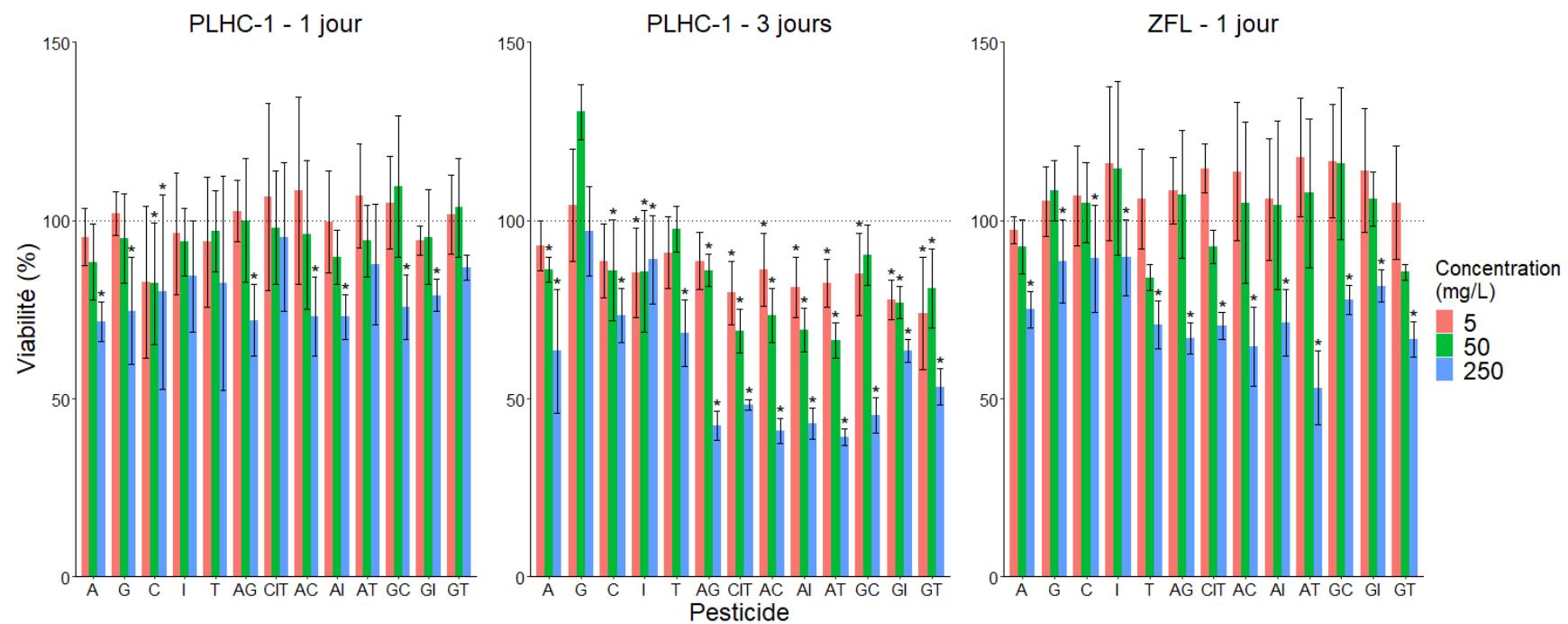


Figure 3.1 – Viabilité des cellules PLHC-1 et ZFL après 1 et 3 jours d'exposition à des combinaisons d'atrazine, glyphosate, clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame

La viabilité cellulaire a été mesurée par le test MTT. Les celles PLHC-1 et ZFL ont été exposées à 5, 50 et 250 mg/L de pesticides seuls et combinés. Les cellules PLHC-1 ont été exposées pendant un et trois jours, mais les cellules ZFL n'ont été exposées que pendant un jour, en raison de leur plus grande sensibilité aux pesticides à 250 mg/L. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$) de pourcentage de viabilité par rapport au témoin. Les mesures de viabilités ont été analysées dans un modèle linéaire à un facteur, en fixant l'ordonnée à l'origine à 100 et en comparant les mesures de viabilité à l'ordonnée à l'origine par des contrastes planifiés. A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidine; I: imidaclopride; T: thiaméthoxame. Pour alléger la figure, les intervalles de p -value ne sont pas distinguées selon la convention, mais toutes les p -value $< 0,05$ sont indiquées par *.

Mon projet de recherche a montré les effets d'une exposition aux pesticides sur le catabolisme de l'acide rétinoïque dans des lignées cellulaires hépatiques de poisson. Nous supposons que ces effets seraient observables dans les perchaudes du lac Saint-Pierre, si les pesticides sont réellement la cause de la perturbation du profil des rétinoïdes chez ces perchaudes. Il serait donc pertinent d'évaluer l'impact des pesticides sur le catabolisme de l'acide rétinoïque dans des cultures primaires d'hépatocytes de perchaudes. Il serait également intéressant de mesurer le catabolisme de l'acide rétinoïque dans des microsomes hépatiques de perchaudes provenant du lac Saint-Pierre et de les comparer à des perchaudes provenant de lacs situés en amont (lac Saint-François ou lac Saint-Louis). Cette comparaison permettrait de vérifier si le catabolisme de l'acide rétinoïque est vraiment affecté chez les perchaudes du lac Saint-Pierre et, le cas échéant, de mieux comprendre le rôle des contaminants agricoles dans ce phénomène.

CONCLUSION

L'objectif de mon projet de recherche était d'évaluer l'effet de pesticides sur le catabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson. Pour ce faire, j'ai caractérisé le catabolisme de l'acide rétinoïque dans les lignées cellulaires hépatiques ichtyennes PLHC-1 et ZFL. Puis, j'ai étudié l'effet de deux herbicides et de trois insecticides néonicotinoïdes, en l'occurrence Aatrex® (atrazine), Credit Xtreme® (glyphosate), Titan® (clothianidine), Admire® (imidaclopride) et Actara® (thiaméthoxame), sur le catabolisme de l'acide rétinoïque.

J'avais prévu une stimulation de ce catabolisme par les pesticides, par le biais d'un stress oxydatif, mais l'inverse a été observé. En effet, les pesticides inhibent le catabolisme de l'acide rétinoïque. De plus, seuls l'atrazine, l'imidaclorpid et le thiaméthoxame causent cette inhibition par le biais d'un stress oxydatif. Le mécanisme d'action par lequel le glyphosate et le clothianidine provoquent cette inhibition reste à identifier. Par ailleurs, l'isomérisation de l'acide rétinoïque à travers le temps est également affectée par les pesticides.

Mon projet de recherche aura permis de mettre au point un modèle d'étude *in vitro* du métabolisme des rétinoïdes chez le poisson dans un contexte toxicologique. De plus, il contribuera à mieux comprendre l'impact des pesticides sur le catabolisme de l'acide rétinoïque chez le poisson. Finalement, quoiqu'il soit ardu de conclure à une inhibition du catabolisme de l'acide rétinoïque *in vivo* chez les perchaudes du lac Saint-Pierre, considérant le rôle des rétinoïdes dans le développement, une telle inhibition, si avérée, expliquerait en partie la perturbation de la croissance des perchaudes du lac Saint-Pierre.

ANNEXE A

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

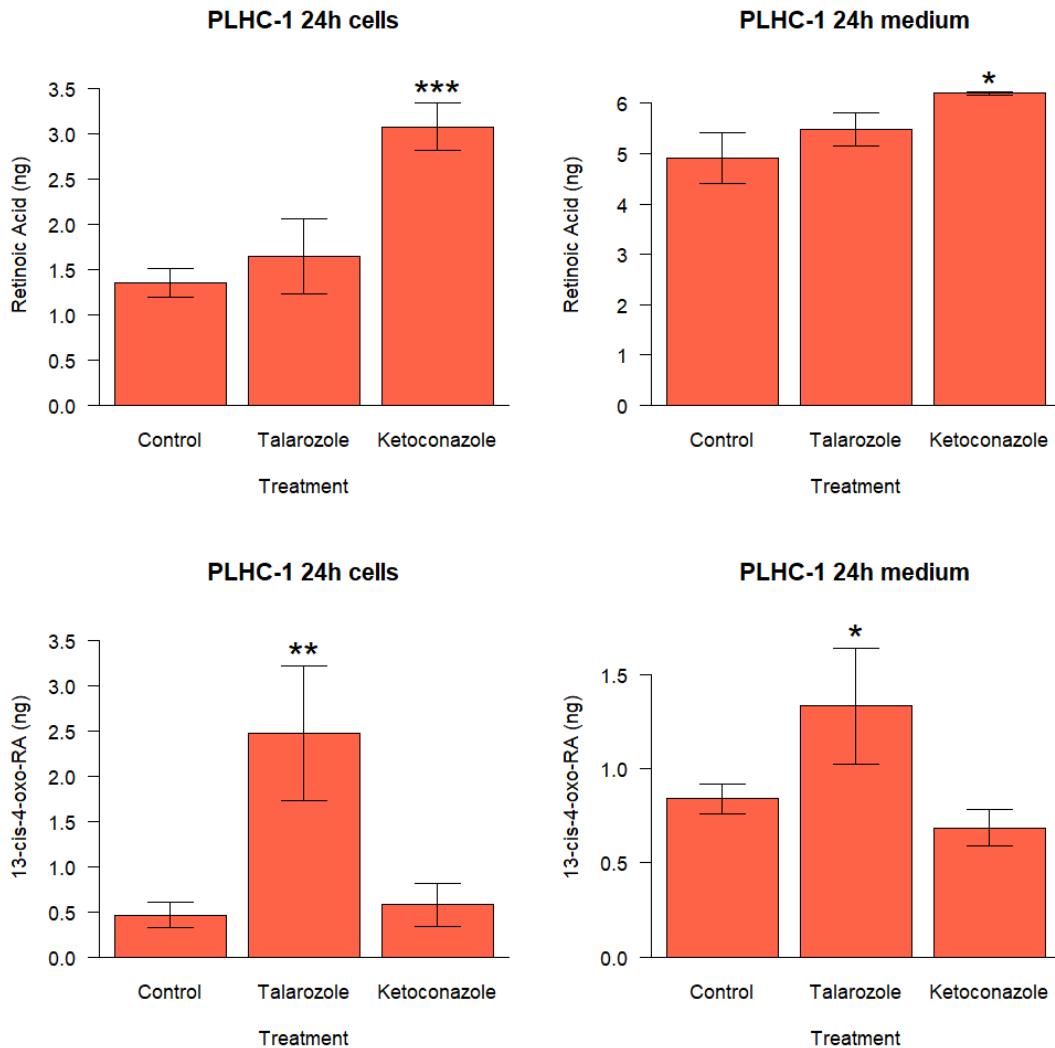


Figure S1 – Retinoic acid contents in PLHC-1 cells after CYP450 inhibition

PLHC-1 cells were treated with 1 μ M talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, or 10 μ M ketoconazole, a generalist CYP450 inhibitor, and with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA and 13-cis-4-oxo-RA (ng). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

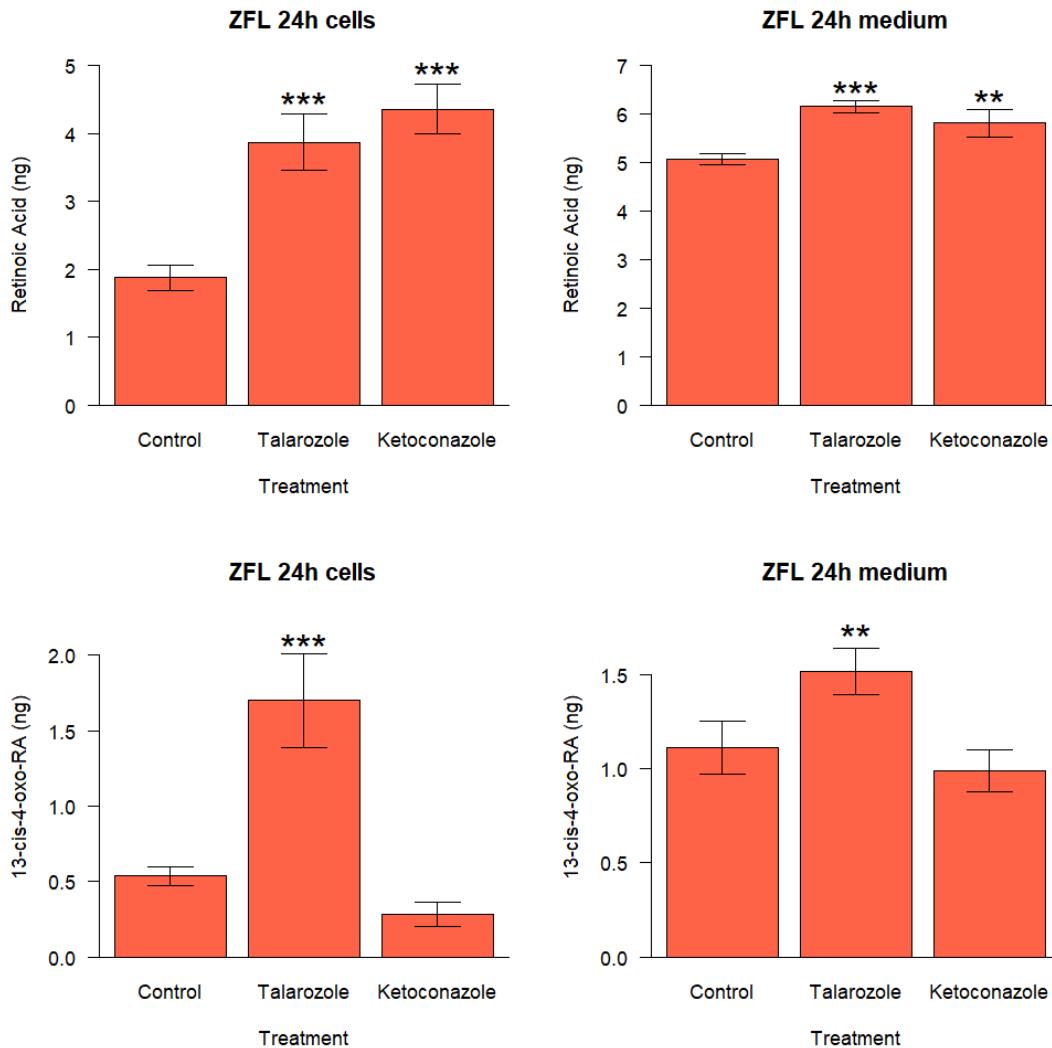


Figure S2 – Retinoic acid contents in ZFL cells after CYP450 inhibition

ZFL cells were treated with 1 μ M talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, or 10 μ M ketoconazole, a generalist CYP450 inhibitor, and with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA and 13-cis-4-oxo-RA (ng). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. ** p < 0.01; *** p < 0.001.

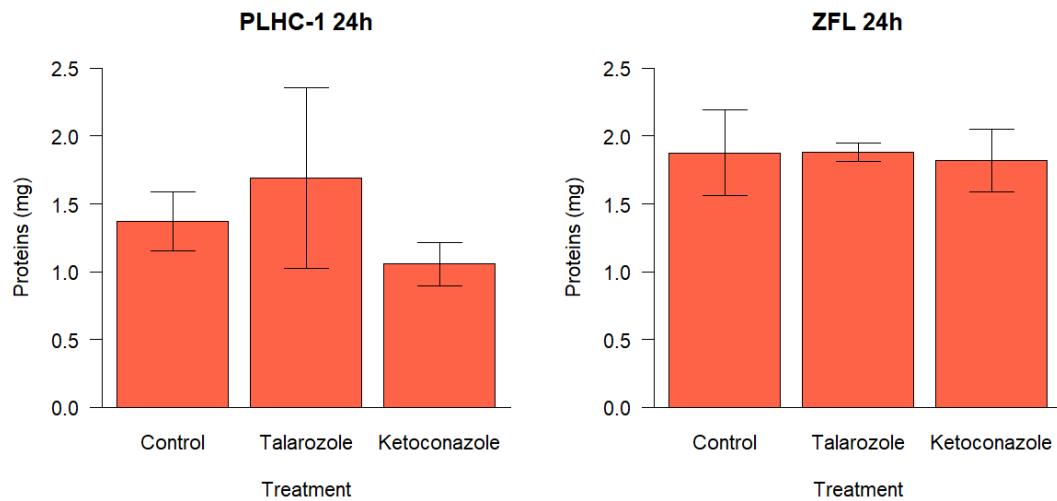


Figure S3 – Protein contents in PLHC-1 and ZFL cells after CYP450 inhibition

PLHC-1 and ZFL cells were treated with 1 μ M talarozole, a specific CYP26A1 inhibitor, or 10 μ M ketoconazole, a generalist CYP450 inhibitor, and with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of proteins (mg). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models.

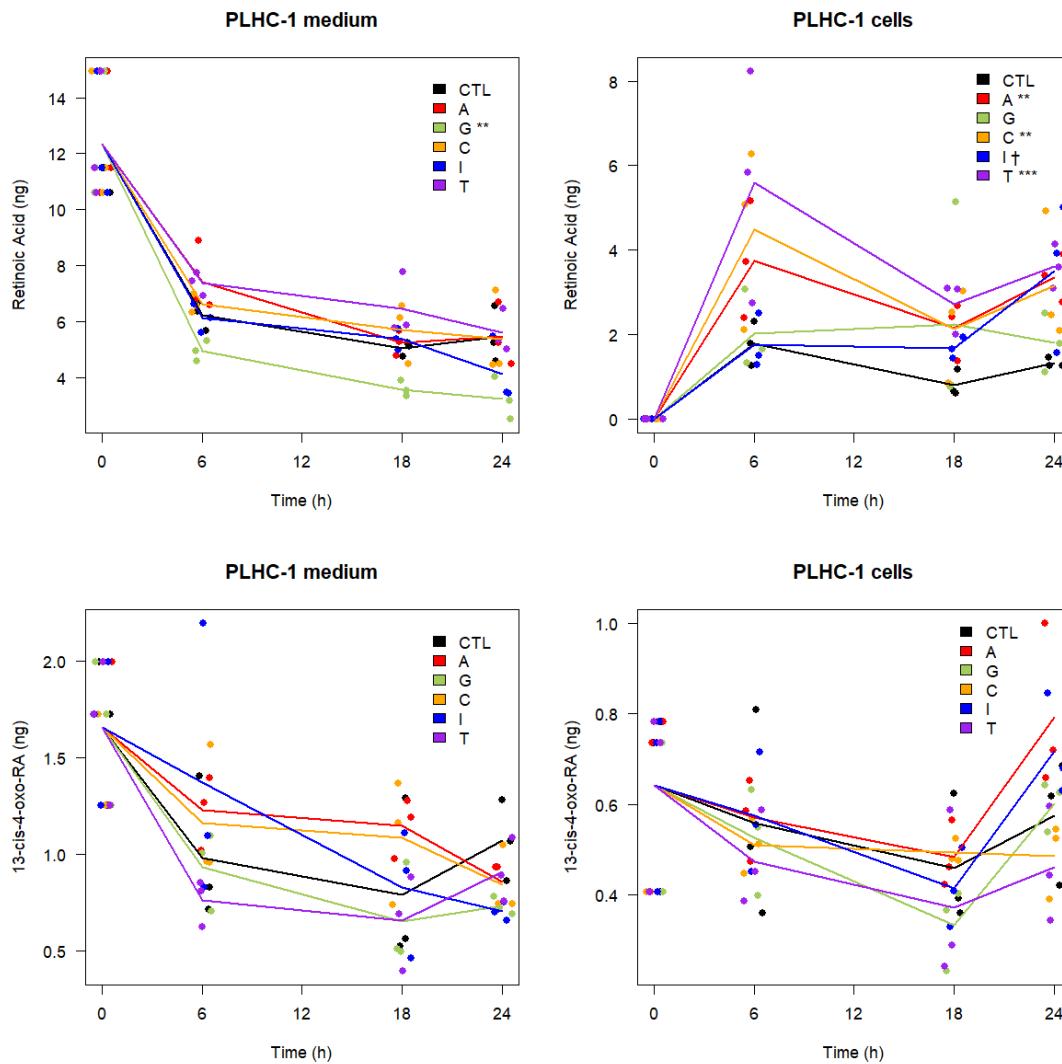


Figure S4 – Retinoic acid and 13-cis-4-oxo-RA contents in PLHC-1 cells after pesticide exposure

PLHC-1 cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, and 24 h. Control cells were also treated with 50 nM *at*-RA for 0 h, meaning that *at*-RA was added in the medium culture at harvest, to complete the kinetics. The points correspond to RA and 13-cis-4-oxo-RA levels (ng). Data were analyzed by planned contrasts in two-factors linear models. Intracellular and extracellular RA contents, as well as extracellular 13-cis-4-oxo-RA contents, were square-rooted to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. † $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

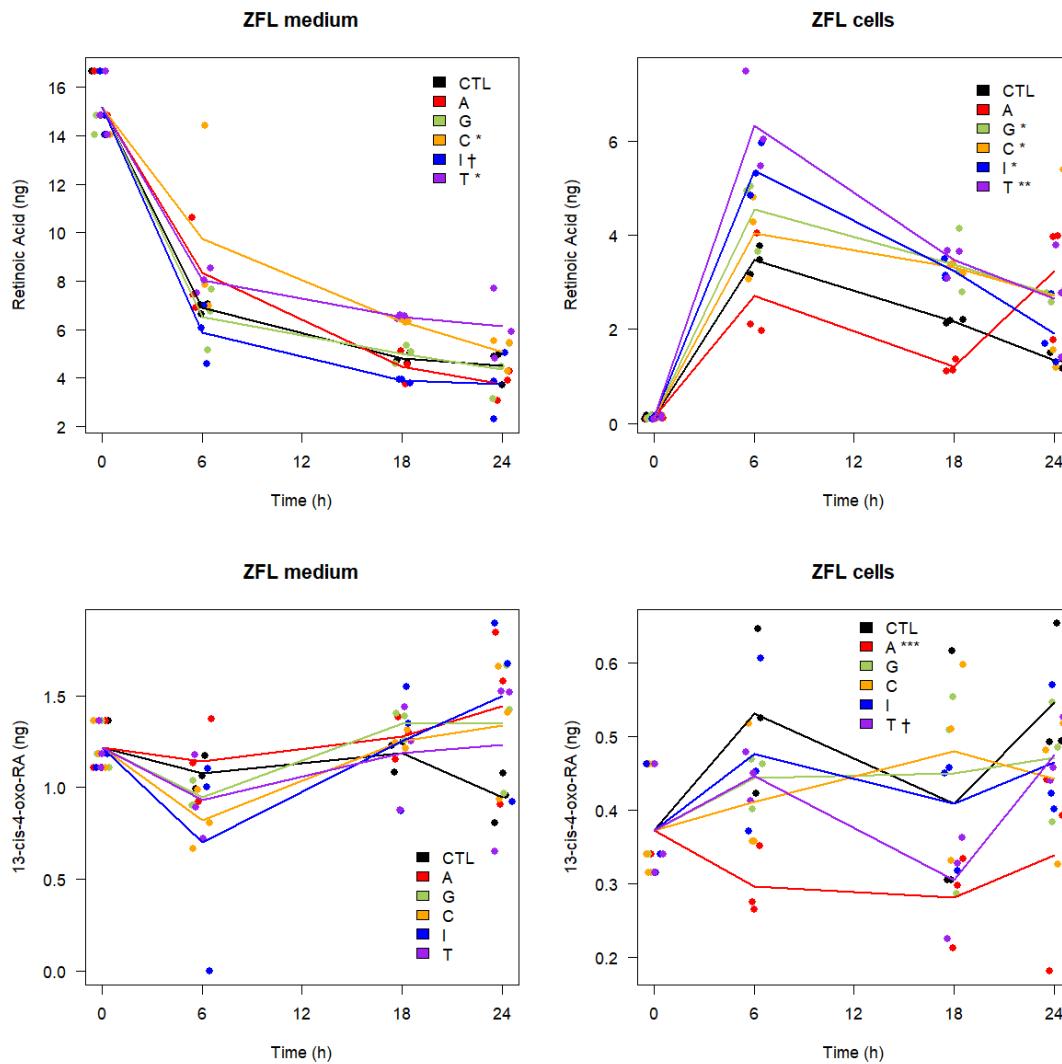


Figure S5 – Retinoic acid and 13-cis-4-oxo-RA contents in ZFL cells after pesticide exposure

ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, and 24 h. Control cells were also treated with 50 nM *at*-RA for 0 h, meaning that *at*-RA was added in the medium culture at harvest, to complete the kinetics. The points correspond to RA and 13-cis-4-oxo-RA levels (ng). Data were analyzed by planned contrasts in two-factors linear models. Intracellular and extracellular RA contents were square-rooted to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; $* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$.

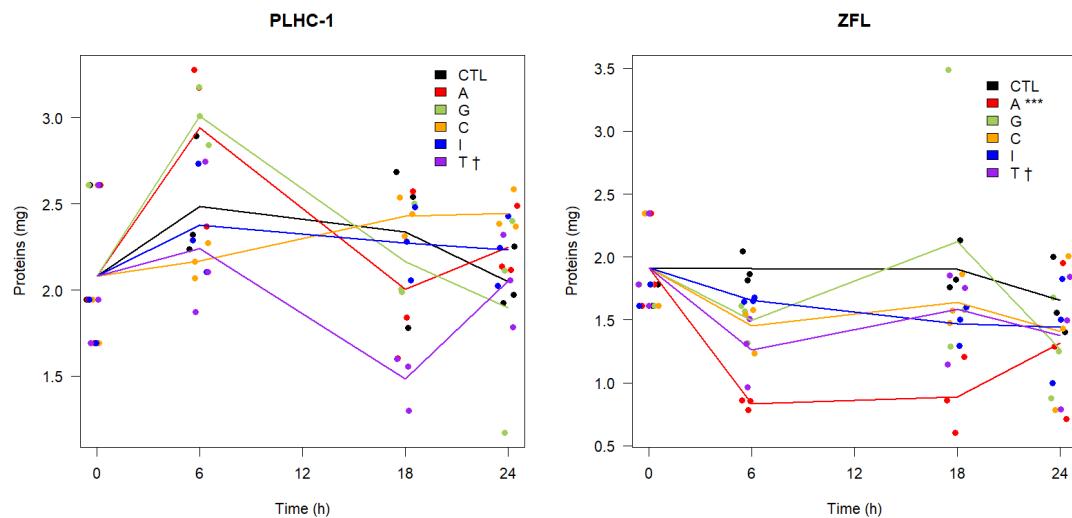


Figure S6 – Protein contents in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure

PLHC-1 and ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, for 24 h, concomitantly with 50 nM *at*-RA for 6, 18, and 24 h. Control cells were also treated with 50 nM *at*-RA for 0 h, meaning that *at*-RA was added in the medium culture at harvest, to complete the kinetics. The points correspond to proteins levels, whereas the curves go through the means of protein levels (mg). Data were analyzed by planned contrasts in two-factors linear models. Protein contents in ZFL cells were log-transformed to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. † $p < 0.1$; *** $p < 0.001$.

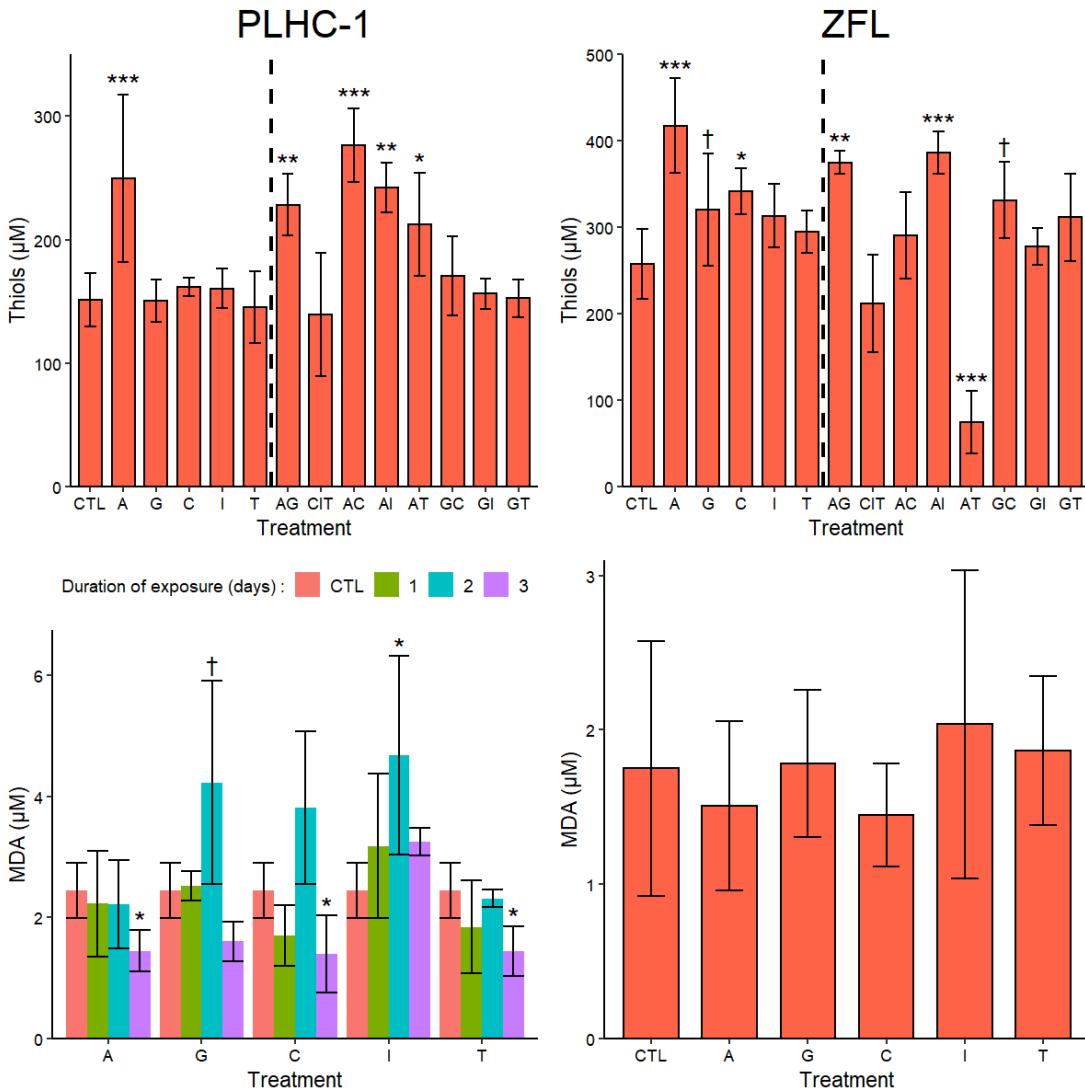


Figure S7 – Thiol and MDA contents in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure

PLHC-1 and ZFL cells were exposed to 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam, alone or in mixtures, and cellular thiols and MDA were measured. For cellular thiols measurements, the exposure times in PLHC-1 and ZFL cells were 3 and 1 days, respectively. For MDA, the exposure times in PLHC-1 and ZFL cells were 1 to 3 days and 1 day, respectively. Results are expressed as mean \pm SD of thiols (μM) and MDA (μM). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. The MDA contents in PLHC-1 cells were log-transformed to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

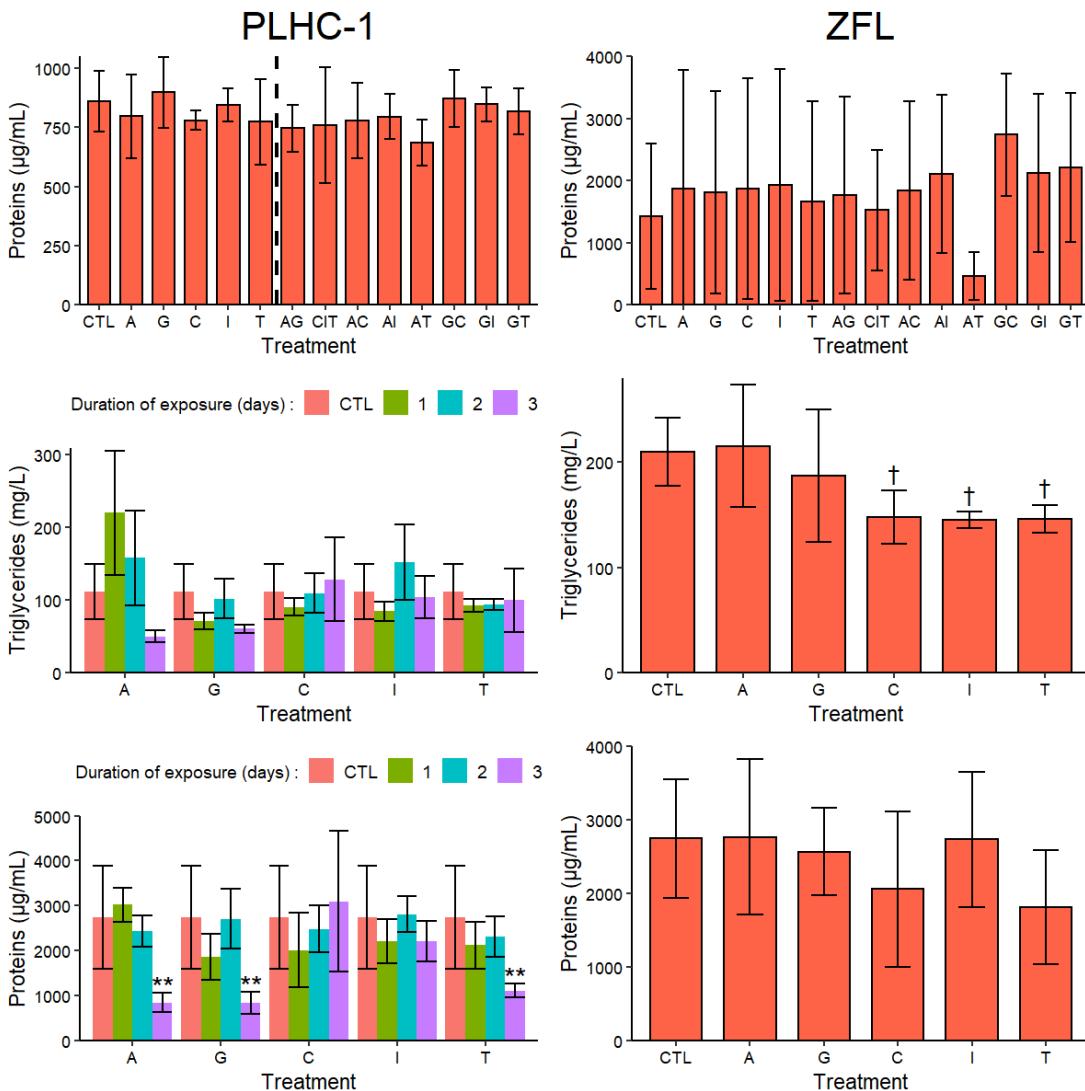


Figure S8 – Protein and triglyceride contents in PLHC-1 and ZFL cells after pesticide exposure

PLHC-1 and ZFL cells were exposed to 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam, alone or in mixtures, and cellular thiols and MDA were measured. For cellular thiols measurements, the exposure times in PLHC-1 and ZFL cells were 3 and 1 days, respectively. For MDA, the exposure times in PLHC-1 and ZFL cells were 1 to 3 days and 1 day, respectively. Results are expressed as mean \pm SD of proteins ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and triglycerides (mg/L). Protein contents related to MDA measurements in both cell lines and to thiols measurements in PLHC-1 cells, as well as triglyceride contents in ZFL cells, were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. Protein contents related to thiols measurements in ZFL cells and triglyceride contents related to MDA measurements in PLHC-1 cells were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; $** p < 0.01$.

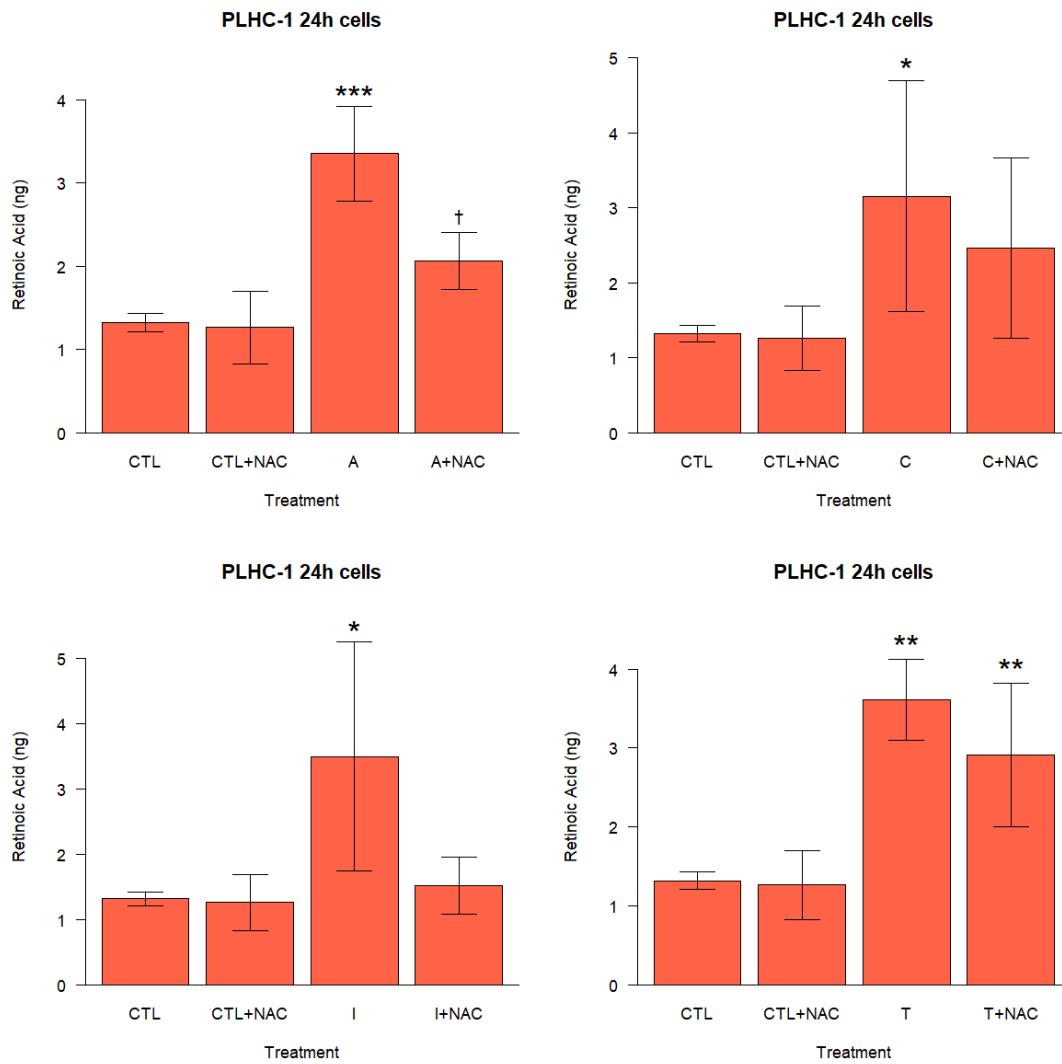


Figure S9 – Retinoic acid contents in PLHC-1 cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC

PLHC-1 cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, concomitantly with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA (ng). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. Retinoic acid contents after clothianidin or imidacloprid exposure were log-transformed to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. † $p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

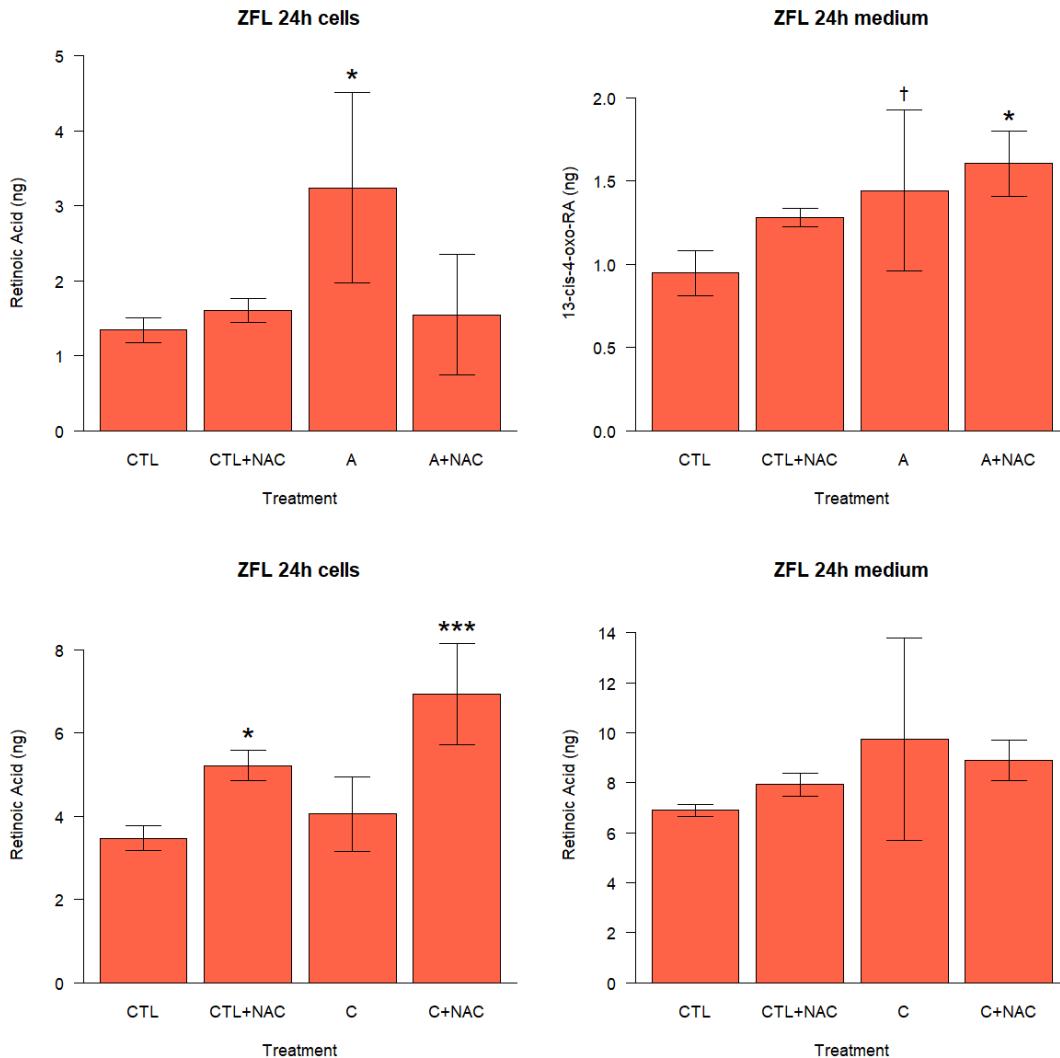


Figure S10 – Retinoic acid and 13-cis-4-oxo-RA contents in ZFL cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC (part 1)

ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, concomitantly with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA (ng). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. Intracellular RA contents after atrazine or glyphosate exposure, as well as extracellular RA contents after clothianidin exposure, were log-transformed to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. † $p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

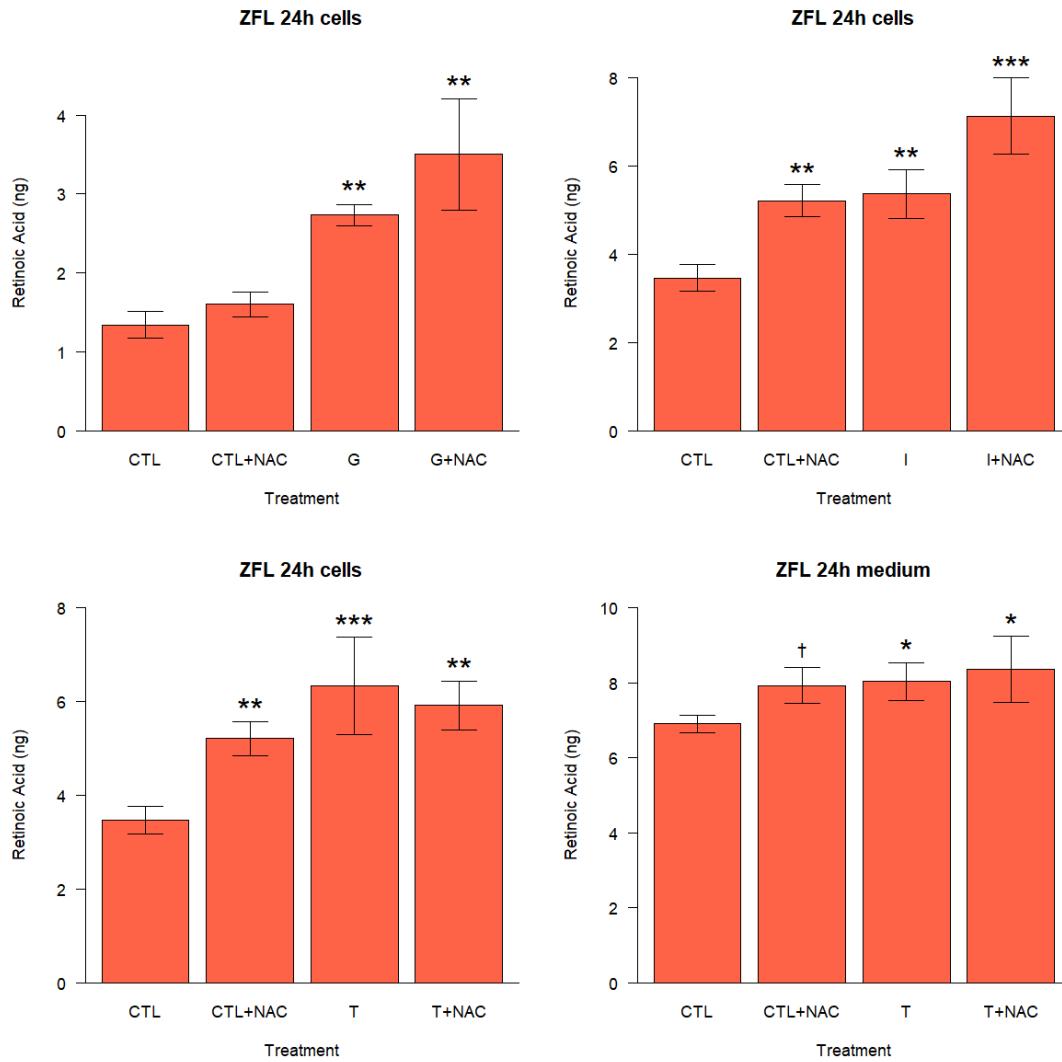


Figure S10 – Retinoic acid and 13-cis-4-oxo-RA contents in ZFL cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC (part 2)

ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, concomitantly with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of RA (ng). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. Intracellular RA contents after atrazine or glyphosate exposure, as well as extracellular RA contents after clothianidin exposure, were log-transformed to correct for heteroscedasticity. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. $\dagger p < 0.1$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

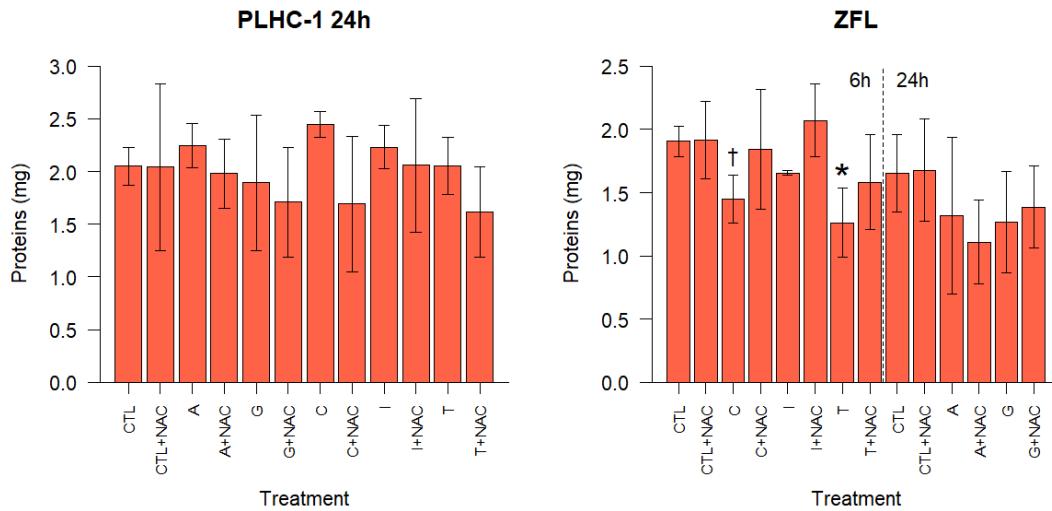


Figure S11 – Protein contents in PLHC-1 and ZFL cells after attempting a rescue effect with the antioxidant NAC

PLHC-1 and ZFL cells were treated with 250 mg/L atrazine, glyphosate, clothianidin, imidacloprid, or thiamethoxam, concomitantly with 50 nM *at*-RA, for 24 h. Results are expressed as mean \pm SD of proteins (mg). Data were analyzed by planned contrasts in one-factor linear models. Protein contents in ZFL cells after 6-h and 24-h exposure to *at*-RA were analyzed separately. CTL: control; A: atrazine; G: glyphosate; C: clothianidin; I: imidacloprid; T: thiamethoxam. † $p < 0.1$; * $p < 0.05$.

RÉFÉRENCES

- Amrhein, N., Schab, J., Steinrücken, H. C. (1980). The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften*, 67, 356-357.
- Balmer, J. E., Blomhoff, R. (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *Journal of Lipid Research*, 43, 1773-1808.
- Bar-El Dadon, S., Reifen, R. (2017). Vitamin A and the epigenome. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(11), 2404-2411.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, 328, 1-16.
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., Séralini, G. E. (2007). Time-and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(1), 126-133.
- Bernatchez, L., Giroux, M. (2000). *Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'Est du Canada*. Ottawa : Broquet, 350 p.
- 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, Quebec, Canada. *Aquatic Toxicology*, 71(2), 109-120.
- 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), 1099-1106.
- Boily, M., Thibodeau, J., Bisson, M. (2009). Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 118-125.
- Blomhoff, R., Green, M. H., Berg, T., Norum, K. R. (1990). Transport and storage of vitamin A. *Science*, 250(4979), 399-404.

- Branchaud, A., Gendron, A., Fortin, R., Spear, P. A., Anderson, P. D. (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.
- Brodeur, P. (2013). *État des stocks et gestion de la perchaude au lac Saint-Pierre et dans le tronçon Bécancour-Batiscan*. Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs du Québec, Québec, 2 p.
- Bruneau, A., Landry, C., Giraudo, M., Douville, M., Brodeur, P., Boily, M., Gagnon, P. Houde, M. (2016). Integrated spatial health assessment of yellow perch (*Perca flavescens*) populations from the St. Lawrence River (QC, Canada), part B: cellular and transcriptomic effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18211-18221.
- Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2923-2931.
- Cassault-Meyer, E., Gress, S., Seralini, G.-E., Galeraud-Denis, I. (2014). An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38: 131–140.
- Cavalcante, D. G., Martinez, C. B., Sofia, S. H. (2008). Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655, 41–46.
- Çavaş, T., Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268.
- Champoux, L., Rodrigue, J., DesGranges, J. L., Trudeau, S., Hontela, A., Boily, M., Spear, P. (2002). Assessment of contamination and biomarker responses in two species of herons on the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment*, 79(2), 193-215.
- Champoux, L., Rodrigue, J., Trudeau, S., Boily, M. H., Spear, P. A., Hontela, A. (2006). Contamination and biomarkers in the great blue heron, an indicator of the state of the St. Lawrence River. *Ecotoxicology*, 15(1), 83-96.

- Chen, L., Hu, C., Huang, C., Wang, Q., Wang, X., Yang, L., Zhou, B. (2012). Alterations in retinoid status after long-term exposure to PBDEs in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 120, 11-18.
- Chen, P. J., Padgett, W. T., Moore, T., Winnik, W., Lambert, G. R., Thai, S. F., Hester, S. D., Nesnow, S. (2009). Three conazoles increase hepatic microsomal retinoic acid metabolism and decrease mouse hepatic retinoic acid levels in vivo. *Toxicology and applied pharmacology*, 234(2), 143-155.
- Davies, K. J. A. (1995). Oxidative stress, the paradox of aerobic life. Dans C. Rice-Evans, B. Halliwell et G. G. Land, *Free radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*. Londres : Portland Press.
- Defo, M. A., Douville, M., Giraudo, M., Brodeur, P., Boily, M., Houde, M. (2018). RNA-sequencing to assess the health of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations from the St. Lawrence River, Canada. *Environmental Pollution*, 243, 1657-1668.
- Defo, M. A., Spear, P. A., Couture, P. (2014). Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: a review. *Toxicology letters*, 225(1), 1-11.
- De La Chenelière, V., Brodeur, P., Mingelbier, M. (2014). Restauration des habitats du lac Saint-Pierre: un prérequis au rétablissement de la perchaude. *Le naturaliste canadien*, 138, 50-61.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*, 274, 532-538.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194S-200S.
- Eifert, C., Sangster-Guity, N., Yu, L. M., Chittur, S. V., Perez, A. V., Tine, J. A., McCormick, P. J. (2006). Global gene expression profiles associated with retinoic acid-induced differentiation of embryonal carcinoma cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 73, 796–824.
- Elia, A. C., Waller, W. T., Norton, S. J. (2002). Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68, 809-816.

- Enright, J. M., Toomey, M. B., Sato, S. Y., Temple, S. E., Allen, J. R., Fujiwara, R., Kramlinger, V. M., Nagy, L. D., Johnson, K. M., Xiao, Y., How, M. J., Johnson, S. L., Roberts, N. W., Kefalov, V. J., Guengerich, F. P., Corbo, J. C., How, M. J. (2015). Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting vitamin A1 into A2. *Current Biology*, 25(23), 3048-3057.
- Farrar, K. R., Hamlet, J. C., Henbest, H. B., Jones, E. R. H. (1952). 503. Studies in the polyene series. Part XLIII. The structure and synthesis of vitamin A 2 and related compounds. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2657-2668.
- Fecteau, M., Poissant, L. (2001). *Survol des impacts environnementaux potentiels liés à la production de maïs à des fins énergétiques au Québec*. Environnement Canada, Saint-Laurent Vision 2000, Montréal, 78 p.
- Folli, C., Pasquato, N., Ramazzina, I., Battistutta, R., Zanotti, G., Berni, R. (2003). Distinctive binding and structural properties of piscine transthyretin. *FEBS Letters*, 555, 279–284.
- Fortin, R., Magnin, E. (1972). Quelques aspects qualitatifs et quantitatifs de la nourriture des perchaudes, *Perca flavescens* (Mitchill), de la Grande Anse de l'Ile Perrot, au lac Saint-Louis. *Annales d'hydrobiologie*, 3:79–91.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63, 1856-1862.
- Goodman, D. S., Raz, A. (1972). Extraction and recombination studies of the interaction of retinol with human plasma retinol-binding protein. *Journal of lipid research*, 13(3), 338-347.
- Giraudo, M., Bruneau, A., Gendron, A. D., Brodeur, P., Pilote, M., Marcogliese, D. J., Gagnon, C., Houde, M. (2016). Integrated spatial health assessment of yellow perch (*Perca flavescens*) populations from the St. Lawrence River, Quebec, Canada) part A: physiological parameters and pathogen assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 18073-18084.
- Giroux, I., Hébert, S., Berryman, D. (2016). Qualité de l'eau du Saint-Laurent de 2000 à 2014: paramètres classiques, pesticides et contaminants émergents. *Le Naturaliste Canadien*, 140, 26-34.
- Griffith, O. W., Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (Sn-butyl homocysteine sulfoximine). *Journal of Biological Chemistry*, 254, 7558-7560.

- Grisolia, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 145-150.
- Guénette, S., Mailhot, Y., McQuinn, I., Lamoureux, P., Fortin, R. (1994). *Paramètres biologiques, exploitation commerciale et modélisation de la population de perchaudes (Perca flavescens) du lac Saint-Pierre*. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec et Université du Québec à Montréal, Québec, 110 p. + annexes.
- Harrison, E. H., Hussain, M. M. (2001). Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *The Journal of Nutrition*, 131, 1405–1408.
- Hayes, T. B. (2004). There is no denying this: defusing the confusion about atrazine. *Bioscience*, 54(12), 1138-1149.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., Vonk, A. (2002a). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5476-5480.
- Hayes, T. B., Hansen, M. (2017). From silent spring to silent night: agrochemicals and the anthropocene. *Elementa Science of the Anthropocene*, 5, 57.
- Hayes, T. B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haefele, C., Vonk, A. (2002b). Feminization of male frogs in the wild. *Nature*, 419(6910), 895-896.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4612-4617.
- Hayes, T. B., Stuart, A. A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R., Kpodzo, D. (2006). Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl. 1), 134-141.

- Heilbron, I. M., Gillam, A. E., Morton, R. A. (1931). Specificity in tests for vitamin A. A new conception of the chromogenic constituents of fresh and aged liver oils. *Biochemical Journal*, 25(4), 1352-1366.
- Houde, M., Giraudo, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A. O., Spencer, C., Lair, S., Verreault, J., Bernatchez, L., Gagnon, C. (2014). A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). *Science of the Total Environment*, 497, 307-318.
- Hudon, C., Carignan, R. (2008). Cumulative impacts of hydrology and human activities on water quality in the St. Lawrence River (Lake Saint-Pierre, Quebec, Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(6), 1165-1180.
- Hudon, C., Cattaneo, A., Tourville Poirier, A.-M., Brodeur, P., Dumont, P., Mailhot, Y., Amyot, J.-P., Despatie, S.-P., de Lafontaine, Y. (2012). Oligotrophication from wetland epuration alters the riverine trophic network and carrying capacity for fish. *Aquatic Sciences*, 74, 495-511.
- Idres, N., Marill, J., Flexor, M. A., Chabot, G. C. (2002). Activation of retinoic acid receptor dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 31491-31498.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2015). IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. *World Health Organization, Lyon*.
- Jin, M., Ande, A., Kumar, A., Kumar, S. (2013). Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell death & disease*, 4(3), e554-e554.
- Joo, H., Choi, K., Hodgson, E. (2010). Human metabolism of atrazine. *Pesticide biochemistry and physiology*, 98(1), 73-79.
- Kier, L. D., Kirkland, D. J. (2013). Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Critical reviews in toxicology*, 43, 283-315.
- La Frano, M. R., Cai, Y., Burri, B. J., Thilsted, S. H. (2018). Discovery and biological relevance of 3, 4-didehydroretinol (vitamin A2) in small indigenous fish species and its potential as a dietary source for addressing vitamin A deficiency. *International journal of food sciences and nutrition*, 69(3), 253-261.

- Landry, C., Houde, M., Brodeur, P., Boily, M. (2020). Biological markers to establish a relationship between the health status of the St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*) with a gradient of anthropogenic disturbances. *Science of The Total Environment*, 138515.
- Landry, C., Houde, M., Brodeur, P., Spear, P., Boily, M. (2017). Lipophilic antioxidants and lipid peroxidation in yellow perch subjected to various anthropogenic influences along the St. Lawrence River (QC, Canada). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 316-325.
- Lang, D. H., Rettie, A. E., Böcker, R. H. (1997). Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbutylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. *Chemical research in toxicology*, 10(9), 1037-1044.
- Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., Rahmani, R. (2005). Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 38-49.
- Love, J. M., Gudas, L. J. (1994). Vitamin A, differentiation and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 6, 825-831.
- Lushchak, V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76, 932-937.
- Magnan, P. (2002). *Avis scientifique sur l'état des stocks de perchaudes au lac Saint-Pierre, les indicateurs biologiques utilisés pour effectuer son suivi et la pertinence de protéger la période de fraye de façon partielle ou totale*. Chaire de recherche en écologie des eaux douces, Université du Québec à Trois-Rivières. 52 p.
- Magnan, P., Y. Mailhot, P. Dumont. (2008). *État du stock de perchaude du lac Saint-Pierre en 2007 et efficacité du plan de gestion de 2005*. Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivières et Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec. iv + 28 pages + annexes.
- Magnan, P., P. Brodeur, É. Paquin, N. Vachon, Y. Paradis, P. Dumont, Y. Mailhot. (2017). *État du stock de perchaudes du lac Saint-Pierre en 2016*. Comité scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre. Chaire de recherche du Canada en écologie des eaux douces, Université du Québec à Trois-Rivières et Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec. vii + 34 pages + annexes.

- Mailhot, Y. (1997). Plan de gestion de la pêche à la perchaude et suivi scientifique de la population de la perchaude. Dans M. Bernard et C. Groleau, *Compte rendu du deuxième atelier sur les pêches commerciales*. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, p. 141-146.
- Mailhot, Y. (1999). *Document de réflexion sur la perchaude et la gestion de la pêche sportive et commerciale au lac Saint-Pierre*. Faune et Parcs Québec, Direction régionale du Centre-du-Québec, 14 p.
- Marill, J., Idres, N., Capron, C. C., Nguyen, E., Chabot, G. G. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current Drug Metabolism*, 4, 1-10.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603.
- Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, (MDDEP), 2012. Portrait de la qualité des eaux de surface au Québec 1999 – 2008, Québec, Direction du suivi de l'état de l'environnement. ISBN 978-2-550-63649-6 (PDF), 97 p.
- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) du Québec. (28 mars 2012). *Pêche à la perchaude au lac Saint-Pierre - Le ministère des Ressources naturelles et de la Faune intensifie les mesures de protection et de restauration* [Communiqué]. Récupéré de <https://mffp.gouv.qc.ca/presse/communiques-detail.jsp?id=9539>.
- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) du Québec. (2 mai 2017). *Pêche à la perchaude au lac Saint-Pierre – Reconduction du moratoire jusqu'en 2022* [Communiqué]. Récupéré de <https://mffp.gouv.qc.ca/peche-perchaude-lac-saint-pierre-moratoire-2022/>.
- Morel, Y., Barouki, R. (1998). Down-regulation of Cytochrome P450 1A1 Gene Promoter by Oxidative Stress CRITICAL CONTRIBUTION OF NUCLEAR FACTOR 1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26969-26976.
- Morneau, J. (2000). *Petits pays et grands ensembles. Les articulations du monde rural au XIXe siècle; l'exemple du lac Saint-Pierre*. Québec : Presses de l'Université Laval, 416 p.
- Napoli, J. L. (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80, S52-S62.

- Napoli, J. L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440, 139-162.
- Novák, J., Beníšek, M., Hilscherová, K. (2008). Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International*, 34, 898-913.
- Noy, N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochemical Journal*, 348, 481-495.
- Noy, N. (2010). Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annual review of nutrition*, 30, 201-217.
- Nwani, C. D., Lakra, W. S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S. K. (2010). Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *International journal of environmental research and public health*, 7, 3298-3312.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W. S. (2013). DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36, 539-547.
- Parmentier, Y., Bossant, M. J., Bertrand, M., Walther, B. (2007). *In vitro* studies of drug metabolism. Dans J. B. Taylor et D. J. Triggle, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, vol. 8 : Elsevier.
- Patel, N. A. (2012). Nomenclature of Vitamin A and Related Metabolites. Dans V. R. Preedy, *Vitamin A and carotenoids: Chemistry, analysis, function and effects* (No. 1) : Royal Society of Chemistry.
- Post, J. R., Evans, D. O. (1989). Size-dependent overwinter mortality of young-of-the-year yellow perch (*Perca flavescens*): laboratory, in situ enclosure, and field experiments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(11), 1958-1968.
- Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E., Maden, M. (2005). The control of morphogen signaling: Regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Developmental Biology*, 285, 224-237.

- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental health perspectives*, 113(6), 716-720.
- Rolland, R. M. (2000). A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *Journal of wildlife diseases*, 36, 615-635.
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., De Luca, L. M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiological reviews*, 80, 1021-1054.
- Schulz-Jander, D. A., Casida, J. E. (2002). Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology letters*, 132(1), 65-70.
- Sies, H., Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxydants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1315S-1321S.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z. (2009). A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*, 30, 2-12.
- Smith, J. E., Milch, P. O., Muto, Y., Goodman, D. S. (1973). The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat. *Biochemical Journal*, 132(4), 821-827.
- Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxydant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- Thibault, A. (1999). *Rapport et recommandations du Groupe de travail sur la gestion de la pêche à la perchaude au lac Saint-Pierre*. 9 p.
- Thibodeau, J., Filion, S., Spear, P., Paquin, J., Boily, M. (2012). Oxidation of retinoic acids in hepatic microsomes of wild bullfrogs *Lithobates catesbeianus* environmentally-exposed to a gradient of agricultural contamination. *Ecotoxicology*, 21, 1358-1370.
- Topletz, A. R., Tripathy, S., Foti, R. S., Shimshoni, J. A., Nelson, W. L., Isoherranen, N. (2015). Induction of CYP26A1 by metabolites of retinoic acid: evidence that CYP26A1 is an important enzyme in the elimination of active retinoids. *Molecular pharmacology*, 87(3), 430-441.
- Van Bennekum, A.M., Wei, S. H., Gamble, M. V., Vogel, S., Piantedosi, R., Gottesman, M., Episkopuu, V., Blanner, W. S. (2001). Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1107-1113.

- Veal, G. J., Errington, J., Redfern, C. R., Pearson, A. D. J., Boddy, A. V. (2002). Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 63, 207-215.
- Vis, C., Cattaneo, A., Hudon, C. (2008). Shift from chlorophytes to cyanobacteria in benthic macroalgae along a gradient of nitrate depletion. *Journal of Phycology*, 44(1), 38-44.
- Vivat, V., Zechel, C., Wurtz, J. M., Bourguet, W., Kagechika, H., Umemiya, H., Shudo, K., Moras, D., Gronemeyer, H., Chambon, P. (1997). A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *The EMBO Journal*, 16, 5697-5709.
- Williams, G. M., Kroes, R., Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 31(2), 117-165.
- Williams, A. L., Watson, R. E., Desesso, J. M. (2012). Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15, 39-96.
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Yuan, Z., Martínez, M. A. (2018). Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annual review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 471-507.
- Zile, M. H. (1992). Vitamin A homeostasis endangered by environmental pollutants. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 201(2), 141-153.