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

LE DIETHYLHEXYLPHTALATE (DEHP) ET SON MÉTABOLITE (mEHP): LEURS IMPACTS SUR L'ÉPITHÉLIUM DE LA GLANDE MAMMAIRE

Emanuelle Ferraris

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc)
Octobre 2016

Jury d'évaluation

Directrice de recherche:	Dre Isabelle Plante INRS - Institut Armand-Frappier
Examinatrice interne et présidente de jury:	Dre Cathy Vaillancourt INRS - Institut Armand-Frappier
Examinatrice externe:	Dre Céline Van Themsche Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR)

© 2016 Emanuelle Ferraris

RÉSUMÉ

Le diéthylhexylphtalate (DEHP) est un plastifiant largement utilisé dans les produits de consommation. Il ne forme pas de liens covalents avec sa matrice, faisant en sorte qu'il est graduellement relâché des produits et que nous y sommes exposés de façon chronique. Le DEHP est déjà reconnu comme un perturbateur endocrinien, mais les mécanismes impliqués dans sa toxicité sont peu compris à ce jour. L'objectif de cette étude était de déterminer les effets d'une exposition au DEHP et au monoéthylhexylphtalate (mEHP), son métabolite, sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires et sur les marqueurs impliqués dans la cancérogenèse mammaire. Pour se faire, deux lignées cellulaires ont été utilisées: les cellules T-47D et hTERT-HME1, une lignée tumorigénique et non-tumorigénique. Ces cellules ont été exposées à des doses de DEHP et de mEHP entre 0,01 et 10 000nM pour 5-7 jours. Les résultats démontrent que des expositions à 10 000nM de DEHP et à 0,1nM de mEHP augmentent significativement la prolifération des cellules T-47D, sans affecter les cellules hTERT-HME1. Les protéines jonctionnelles n'ont pas été affectées par les phtalates tandis qu'une augmentation significative de l'expression protéique du récepteur à la progestérone (PR) a été mesurée, en plus de sa translocation nucléaire chez les cellules T-47D exposées à 10 000nM de DEHP. De plus, une exposition au mEHP cause une augmentation de l'expression de la vimentine chez les cellules hTERT-HME1. Bref, ces résultats suggèrent qu'une exposition au DEHP et au mEHP pourraient augmenter les risques de développer un cancer du sein, autant par l'augmentation de la prolifération cellulaire que par l'activation de PR. Le lien entre la translocation nucléaire de PR et l'augmentation de la prolifération cellulaire reste à être élucider.

Mots clés: diéthylhexylphtalate (DEHP); monoéthylhexylphtalate (mEHP); perturbateurs endocriniens; glande mammaire; prolifération; jonctions; progestérone

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, Isabelle Plante, qui a su m'accueillir dans son laboratoire en tant qu'étudiante à la maîtrise avec confiance et de façon très chaleureuse. Tout au long de mes études, tu m'as encadré de manière exemplaire et tu a toujours su orienter mes recherches et éclairer mes doutes. Merci de ta patience, de ton écoute, de ta générosité et de tes conseils. Il est évident que tu as énormément contribué au perfectionnement de mes compétences scientifiques. Merci de toujours être disponible pour tes étudiantes et de nous encourager. C'est en bonne partie grâce à toi si j'ai toujours la passion des sciences et de la recherche. Merci pour ton aide apportée à l'élaboration des études scientifiques, à l'analyse des résultats, aux choix des techniques statistiques, mais aussi pour l'achèvement de ce mémoire. Ta disponibilité, ton excellence et ton irréprochable encadrement ont fait de toi une mentor hors pair.

Un merci spécial à Elise Kolasa, stagiaire post-doctorale dans le laboratoire. Merci de m'avoir pris sous ton aile dès le début et de m'avoir autant appris au plan théorique et technique. Tes judicieux conseils ont su me rendre autonome rapidement, mais m'ont aussi appris à toujours me requestionner au cours de mes expérimentations. Je te remercie pour l'aide apportée à l'élaboration de plans d'études et aussi à l'analyse des résultats.

Je ne pourrais passer sous silence l'aide remarquable que m'a apportée Martine Caplette, technicienne en laboratoire. J'ai pu bénéficié de son enseignement pour plusieurs techniques de laboratoire et son aide a été utile à de multiples reprises. Merci aussi pour toute la gestion du laboratoire, je me compte très chanceuse d'avoir pu compter sur ton organisation exemplaire. Merci aussi pour tous tes précieux conseils et ton sens de l'humour, c'est toujours un plaisir de travailler à tes côtés. Un grand merci à tous mes autres collègues de laboratoire, soit Elham Dianati, Melanie Busby, Melanie Lavoie, Anne Weber-Ouellette, Bruno Johnson, Marie-Noëlle Séquin-Grignon et Guillaume Ricaud. Vous avez tous, à un moment ou a un autre, aidé à parfaire ma réflexion scientifique. J'ai aussi très apprécié partager mes journées avec vous, nos rencontres me laissent un souvenir très enrichissant au plan professionnel, mais aussi personnel. Je remercie également Géraldine Delbès et Jacques Bernier, professeurs du programme, pour leurs généreux conseils autant au niveau de mon projet de maîtrise qu'au niveau de mes cours universitaires. Un merci spécial va aussi à l'ensemble des étudiants, chercheurs et membres du personnel de l'Institut Armand-Frappier, avec qui j'ai eu des relations de travail très sympathiques.

Enfin, je rend une grande reconnaissance à mes amis et aux membres de ma famille, spécialement à mon conjoint David Coolidge, à mes soeurs Mélanie, Maude et Émilie ainsi qu'à mes parents Denis Ferraris et Sidnée Sylvestre. Leurs encouragements et leurs conseils m'ont soutenu tout au long de mon cheminement scolaire. Merci d'avoir toujours été présents pour m'aider à me surpasser, à atteindre mes objectifs et à réaliser mes rêves.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....vii

LISTE DES ABRÉVIATIONS ix

SOMMAIRE xi

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE.....3

1.1 Le cancer..... 3
1.1.1 Les trois grandes étapes de la cancérogenèse..... 4
1.1.1.1 Initiation.....4
1.1.1.2 Promotion.....5
1.1.1.3 Progression.....5
1.1.2 Caractéristiques du cancer..... 6
1.1.2.1 La prolifération comme caractéristique clé de la cancérogenèse.....6
1.1.3 Anomalies géniques..... 7
1.1.3.1 Cancérigènes mutagéniques.....7
1.1.3.2 Cancérigènes épigénétiques.....8
1.1.4 Évidences épidémiologiques de l'impact de l'environnement sur la cancérogenèse..... 8
1.2 Le cancer du sein..... 9
1.2.1 Anatomie et physiologie de la glande mammaire..... 9
1.2.2 Développement de la glande mammaire..... 10
1.2.2.1 Développement durant la puberté.....11
1.2.2.2 Développement durant la grossesse.....11
1.2.2.3 Le rôle des différentes hormones.....12
1.2.3 Statistiques sur le cancer du sein..... 14
1.2.4 Les stades de cancer du sein..... 15
1.2.5 Les grades de développement du cancer..... 16
1.2.6 Les sous-types de cancer du sein..... 17
1.2.6.1 Cancers de sous-type luminal.....17
1.2.6.2 Cancers de sous-type HER2.....18
1.2.6.3 Cancer de type triple négatif.....19
1.3 Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude..... 19
1.3.1 Les cellules T-47D..... 19
1.3.2 Les cellules hTERT-HME1..... 20
1.4 Des récepteurs importants dans la pathologie du cancer du sein..... 20
1.4.1 Les récepteurs nucléaires ERα et ERβ..... 20
1.4.1.1 Les isoformes.....20
1.4.1.2 Les cascades de signalisation induites.....21
1.4.1.3 Les ERs dans le cancer du sein.....22
1.4.1.4 Influence de l'estradiol (E_2) sur la glandemammaire.....22
1.4.1.5 Expression d'ER α et ER β dans le cancer du sein.....23
1.4.2 Le récepteur à la progestérone (PR)..... 23
1.4.2.1 Les isoformes.....24
1.4.2.2 Les signalisations des PRs.....24
1.4.2.3 Les PRs dans le cancer du sein.....26

1.4.3 Le récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) 27
1.4.3.1 La signalisation de HER2 27
1.4.3.2 L'enrichissement de HER2 dans le cancer du sein 27
1.4.4 Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) 28
1.4.4.1 La signalisation d'AhR 28
1.4.4.2 AhR et le cancer 29
1.5 Des structures régulées par les récepteurs nucléaires aux hormones: les jonctions intercellulaires 29
1.5.1 Les jonctions lacunaires 29
1.5.2 Les jonctions adhérentes 31
1.5.3 Les jonctions serrées 33
1.6 Un modulateur potentiel des jonctions intercellulaires, de la prolifération cellulaire et de l'équilibre hormonal: le diéthyhexylphtalate (DEHP) 34
1.6.1 Le métabolisme du DEHP 35
1.6.2 Études épidémiologiques 37
1.6.3 Le DEHP lie de nombreux récepteurs influençant la biologie des cellules de la glande mammaire 37
1.6.4 Le DEHP peut perturber les jonctions intercellulaires 38
1.6.5 Le DEHP et le mEHP et l'augmentation de la prolifération cellulaire 38
1.7 Problématique 39

RATIONNELLE ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL 40
OBJECTIFS 40

CHAPITRE 2: AN EXPOSURE TO DIETHYLHEXYLPHTHALATE (DEHP) INCREASES PROLIFERATION AND TRIGGERS THE NUCLEAR TRANSLOCATION OF THE PROGESTERONE RECEPTOR IN EPITHELIAL BREAST CELLS 41

2.1 Présentation des auteurs 41
2.1.1 Auteurs 41
2.1.2 Contributions des auteurs 41
2.2 Résumé de l'article 41
2.3 Article 42
2.3.1 Abstract 43
2.3.2 Introduction 43
2.3.3 Materials and methods 45
2.3.3.1 Compounds 45
2.3.3.2 Cell culture 45
2.3.3.3 DEHP/mEHP exposures 45
2.3.3.4 Assessment of cell proliferation and viability in real-time using xCELLigence technology 46
2.3.3.5 Apoptosis analysis of T47-D cells by annexin V/PI in flow cytometry 46
2.3.3.6 Western blot analysis 46
2.3.3.7 Immunofluorescence 47
2.3.3.8 Statistical analysis and n-values 47
2.3.4 Results 48
2.3.4.1 A 5 days exposure to DEHP and mEHP increases cell proliferation of T-47D but does not affect hTERT-HME1 cells 48
2.3.4.2 An exposure to DEHP and mEHP does not influence apoptosis in T47D and hTERT-HME1 cells 49

2.3.4.3 Junctional proteins and markers of EMT are not affected in DEHP- and mEHP- treated T-47D, while vimentin expression is increased in hTERT-HME1 cells....51
2.3.4.4 Progesterone receptor (PR-A) protein expression is increased by DEHP exposure in T-47D cells. 53
2.3.4.5 Progesterone receptor is translocated to the nucleus in T-47D cells exposed to DEHP....55
2.3.5 Discussion 56
2.3.5.1 DEHP and mEHP exposure results in increased breast cancer cells proliferation without having an effect on normal cells....57
2.3.5.2 DEHP exposure increases and triggers nuclear localisation of the progesterone receptor A (PR-A) in T-47D cells....58
2.3.5.3 mEHP affects T-47D cells proliferation at lower environmental doses compared to DEHP....59
2.3.6 Conclusion....60
2.3.7 Acknowledgements 60
2.3.8 Supplementary figures 61

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE 67

3.1 Limitations de la culture *in vitro* 68
3.2 Profil protéique des cellules 69
3.3 Cible du DEHP 70
3.4 Microenvironnement tumoral....70
3.5 CONCLUSION 72

CHAPITRE 4: RÉFÉRENCES....73

ANNEXE I: Résultats supplémentaires....95

ANNEXE II: Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast....99

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1: Revue de littérature

Figure 1 Schéma démontrant les six stratégies que la plupart des cellules cancéreuses acquièrent durant leur développement

Figure 2 Schéma illustrant que la cancérogenèse est un processus comportant trois grandes étapes s'étalant sur une bonne période de temps: l'initiation, la promotion et la progression

Figure 3 Schéma démontrant le développement d'une tumeur maligne depuis l'initiation d'une seule cellule saine

Figure 4 Schéma de la structure anatomique de la glande mammaire

Figure 5 Alvéologenèse de la glande mammaire

Figure 6 Contrôle hormonal du développement des glandes mammaires

Figure 7 Incidence et taux de mortalité des différents types de cancer au Canada

Figure 8 Schéma représentant les différents stades de cancer du sein

Figure 9 Schéma résumé des différentes caractéristiques des sous-types moléculaires de cancer du sein

Figure 10 Modèle de la régulation de la prolifération cellulaire par la progestérone médiée par la voie de signalisation paracrine RANK-RANKL

Figure 11 Diagramme schématique illustrant les propriétés trans-jonctionnelles sélectives des jonctions lacunaire dans la communication intercellulaire

Figure 12 Schéma représentant la jonction permettant l'adhésion des cellules épithéliales: la jonctions adhérente

Figure 13 Illustration des principales protéines impliquées dans les jonctions serrées

Figure 14 Schéma du métabolisme du diéthylhexylphtalate

Chapitre 2: An Exposure to Diethyhexylphthalate (DEHP) Increases Proliferation and Triggers the Nuclear Translocation of the Progesterone Receptor in Epithelial Breast Cells

Figure 1 A five-day exposure to DEHP and mEHP increases cell proliferation of T-47D but does not affect hTERT-HME1 cells

Figure 2 Environmental exposure to DEHP and mEHP does not trigger apoptosis in T-47D and hTERT-HME1 cells

Figure 3 Junctional protein and EMT are not affected by exposure to DEHP and mEHP in T-47D and hTERT-HME1 cells

Figure 4 Vimentin expression is up-regulated by DEHP and mEHP exposure in hTERT-HME1 cells

Figure 5 PR-A protein expression is increased by DEHP exposure while AhR, HER2, p-HER2 and ERα are not affected in T-47D cells

Figure 6 Progesterone receptor is translocated to the nucleus when T-47D cells are exposed to DEHP

Supplementary figure 1 Staurosporine exposure induces apoptosis in T-47D

Supplementary figure 2 Cx43 protein expression is not affected in hTERT-HME1 cells

Annexe I: Résultats supplémentaires

Figure 1 L'exposition au DEHP et au mEHP augmente l'expression protéique de PPARβδ chez les cellules T47D et les cellules hTERT-HME1

Figure 2 Une exposition au DEHP et au mEHP déclenche la translocation nucléaire de PPARβδ chez les cellules T-47D

Figure 3 Une exposition au DEHP et au mEHP tend à déclencher la translocation nucléaire de PPARβδ chez les cellules hTERT-HME1

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Récepteur aux hydrocarbures aromatiques (Aryl hydrocarbon Receptor)
AhRR	Répresseur du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (Aryl hydrocarbon Receptor Repressor)
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNT	Translocateur nucléaire d'AhR (AhR Nuclear Translocator)
bHLH/PAS	Protéines basique-hélice-boucle-hélice/PAS (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM)
BRCA1/2	Cancer du sein 1 et 2 (Breast cancer 1 and 2)
DEHP	Diéthylhexylphtalate
EGF	Facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor)
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor)
ER	Récepteur aux estrogènes (Estrogen Receptor)
EREs	Éléments de réponse à l'estrogène (Estrogen Response Elements)
FGF	Facteur de croissance de fibroblaste (Fibroblast Growth Factor)
GHR	Récepteur à l'hormone de croissance (Growth Hormon Receptor)
GJIC	Communication intercellulaire jonctionnelle par canal (Gap Junctional Intercellular Communication)
HAHs	Hydrocarbures aromatiques halogénés
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques non-halogénés
HER2	Récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HSP	Protéine de chocs thermiques (Heat Shock Protein)
Id4	Inhibiteur de la liaison à l'ADN 4 (Inhibitor of DNA binding 4)
IGF	Facteur de croissance ressemblant à l'insuline (Insuline-like Growth Factor)
IGF-1R	Récepteur du facteur de croissance de l'insuline (Insuline-like 1 Growth Factor Receptor)
Ki-67	Marqueur de prolifération
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes (Mitogen-Activated Protein Kinase)
mEHP	Monoéthylhexylphtalate
NFκB	Facteur de transcription nucléaire kappa B (Nuclear Factor kappa B)

P4	Progestérone
p21	Protéine inhibitrice 1 dépendante de cyclines
p53	Facteur de transcription suppresseur de tumeur
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (Peroxysome Proliferator-Activated Receptor)
PR	Récepteur à la progestérone (Progesterone Receptor)
PREs	Éléments de réponse à la progestérone (Progesterone Response Elements)
PTP1B	Protéine tyrosine phosphatase 1B
RANK	Récepteur activateur du facteur nucléaire κB (Receptor Activator of Nuclear Factor κB)
RANKL	Récepteur activateur du facteur nucléaire ligand κB (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand)
SERM	Modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (Selective estrogenic receptor modulator)
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF	Facteur de croissance de transformation (Transforming Growth Factor)
TNFα	Facteur de nécrose tumorale α (Tumor Necrosis Factor α)
UVB	Ultraviolet B
XREs	Éléments de réponse aux xénobiotiques (Xenobiotic Response Elements)

SOMMAIRE

De nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques démontrent que l'exposition environnementale à certains perturbateurs endocriniens est liée avec une augmentation du risque de développement du cancer et avec l'augmentation de la prolifération et de la survie des cellules cancéreuses. Toutefois, peu d'études épidémiologiques sont disponibles concernant l'effet des plastifiants sur le cancer du sein spécifiquement. Cependant, malgré le fait que la ou les cibles exactes des phtalates ne soient pas connues, il est assez clair que ces molécules ont un effet déséquilibrant sur le métabolisme des cellules.

La classification des types de cancer du sein est basée en partie sur l'expression de certains récepteurs, dont l'expression du récepteur à l'estrogène (ER), à la progestérone (PR) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). Une surexpression d'une ou plusieurs de ces protéines peut augmenter la probabilité de développer un cancer du sein via, en partie, la hausse de prolifération et la perturbation du contrôle de la progression du cycle cellulaire.

Les jonctions cellulaires sont d'une importance vitale pour les cellules épithéliales. Les jonctions lacunaires permettent une communication directe entre les cellules. Les jonctions adhérentes et les jonctions serrées sont pour leur part utiles à l'attachement et à l'accolement des cellules les unes avec les autres. D'ailleurs, dans le cancer du sein, il est clairement démontré que les jonctions cellulaires sont perturbées.

Notre objectif était donc de déterminer les effets d'une exposition au diéthylhexylphtalate (DEHP) et au monoéthylhexylphtalate (mEHP) sur la prolifération cellulaire et sur l'expression de différents marqueurs dans des lignées de cellules humaines mammaires saines et cancéreuses. Les phtalates étant déjà reconnu comme des perturbateurs endocriniens, leur impacts sur la biologie des cellules mammaires saines et cancéreuses sont peu décrits. Pour répondre à cet objectif, différentes doses de DEHP (0,01 à 10 000nM) et de mEHP (0,1 à 10 000nM) ont été ajoutées au milieu de culture de cellules cancéreuses de type luminal B (T-47D) ainsi que des cellules saines (hTERT-HME1).

L'ensemble de nos résultats a démontré que des expositions chroniques de 5 jours à 10 000 nM de DEHP et à 0,1 nM de mEHP augmentent significativement la prolifération des cellules mammaires cancéreuses humaines T-47D, sans affecter les cellules hTERT-HME1 provenant de glandes mammaires saines humaines. L'intégrité des jonctions cellulaires est pour sa part

préservée autant chez les cellules saines que les cellules cancéreuses. Chez les cellules cancéreuses, les traitements ont eu peu d'effets sur l'expression des récepteurs ER, AhR ou HER2. Toutefois, une augmentation significative de l'expression de PR est mesurée chez les T-47D ayant été exposées à 10 et à 10 000 nM de DEHP. De plus, une translocation nucléaire de PR a pu être mesurée chez les cellules T-47D exposées à 10 000 nM de DEHP. Enfin, nous avons observé que les cellules hTERT-HME1 exposées au DEHP et au mEHP possédaient des niveaux plus élevés de vimentine.

Cette étude démontre qu'une exposition au DEHP et au mEHP pourrait augmenter les risques de développer le cancer du sein ou d'aggraver une cancer du sein latent, tant au niveau de l'augmentation de la prolifération cellulaire que par l'activation de PR.

INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les Canadiennes. Il est d'ailleurs la deuxième cause de décès par cancer chez ces femmes, malgré le fait que le taux de survie à cinq ans était de 88% en 2014. Toutefois, il est important de ne pas traiter du cancer comme une maladie, mais plutôt comme un ensemble de maladies très différentes au plan moléculaire.

Les tumeurs du sein sont classées selon leur expression génique et leur phénotype. Les quatre principaux sous-types moléculaires sont : Luminal A, Luminal B, HER2 et triple-négatif. La classification est possible grâce aux différences d'expression par les tumeurs de différents marqueurs, tels que le récepteur à l'estrogène (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur au facteur de croissance épidermique 2 (HER2). Ces récepteurs permettent entre autres d'activer des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, le contrôle de la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Un débalancement dans l'expression d'un ou de plusieurs de ces récepteurs peut d'ailleurs être le déclencheur du développement d'une tumeur de la glande mammaire.

De plus en plus d'études démontrent qu'il pourrait y avoir un lien entre un changement dans l'exposition à des perturbateurs endocriniens, des composés perturbant la signalisation hormonale, et le développement du cancer du sein. En effet, des études cliniques démontrent que par leur action proliférative dans la glande mammaire, une dérégulation dans leur signalisation hormonale est un facteur de risque pour le cancer du sein. Il est donc devenu important dans notre société actuelle d'étudier notre exposition à des perturbateurs endocriniens sur le développement de certains cancers.

Parmi les contaminants environnementaux pouvant perturber notre système endocrinien se retrouvent les phtalates, qui sont des plastifiants largement utilisés de nos jours. Le DEHP est le phtalate qui se retrouve le plus dans notre environnement, étant celui produit en plus grande quantité par l'industrie manufacturière mondiale. Le DEHP est déjà associé à plusieurs problèmes de santé dont l'infertilité, la puberté précoce et l'obésité. Toutefois, les mécanismes d'action des phtalates dans les cellules mammaires entre autres, restent toujours à être élucidés.

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le cancer

Plusieurs théories existent quant à l'origine du cancer. Toutefois, deux concepts sont communs à toutes ces théories: le cancer comporte plusieurs stades et il implique plusieurs mécanismes distincts (Weinstein 1988). Six altérations essentielles à la physiologie cellulaire sont caractéristiques des cellules cancéreuses: 1) l'auto-suffisance vis-à-vis les signaux de croissance cellulaire, 2) l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, 3) l'évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), 4) un potentiel de réplication illimité, 5) une capacité d'induction d'angiogenèse et 6) la capacité d'invasion et de métastase (Figure 1) (Hanahan et Weinberg 2000).

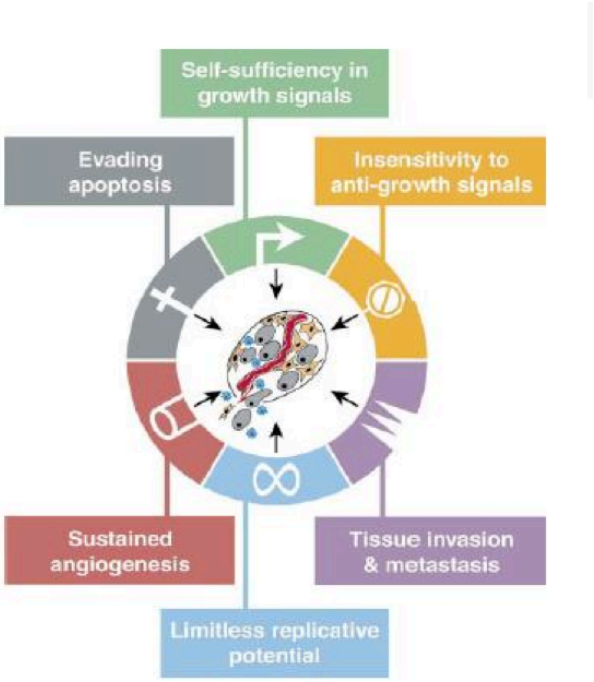


Figure 1: Schéma démontrant les six propriétés que la plupart des cellules cancéreuses acquièrent durant leur développement (Hanahan et Weinberg 2000)

1.1.1 Les trois grandes étapes de la cancérogenèse

De façon générale, le cancer peut être décrit comme une suite de trois grandes étapes successives: l'initiation, la promotion et la progression (Figure 2) (Pitot et Dragan 1991 ; Kang et al. 2011).

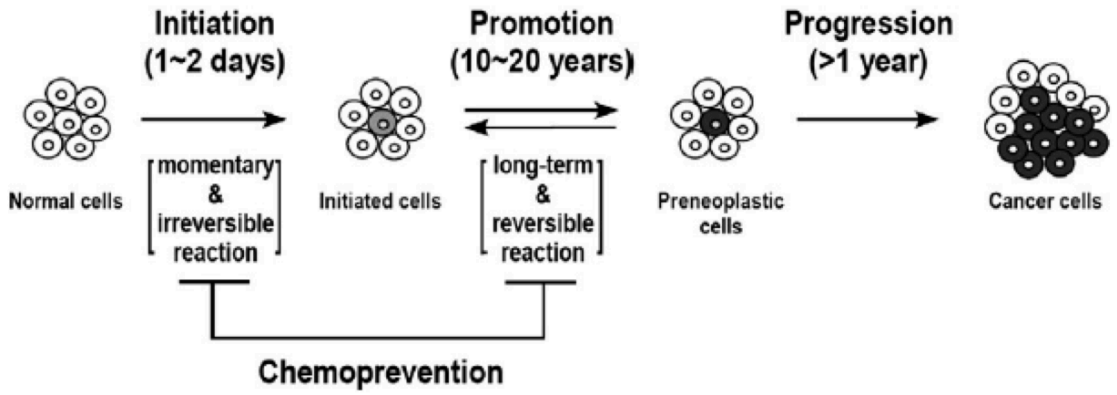


Figure 2: Schéma illustrant que la cancérogenèse est un processus comportant trois grandes étapes pouvant s'étendre sur plusieurs années: l'initiation, la promotion et la progression (Kang et al. 2011)

1.1.1.1 Initiation

L'étape d'initiation débute par le premier événement reflétant une modification génétique ou épigénétique permanente et irréversible. Cette transformation s'étalant sur une à deux journées peut être la conséquence d'un agent cancérigène, d'une mutation ou tout simplement de l'hérédité (Polyak 2007). Lorsqu'il y a altération d'un gène dans une cellule, cette cellule devient « initiée ». Dépendamment du gène ou du groupe de gènes altéré, elle peut aussi devenir immortelle (Trosko et Ruch 1998). La cellule initiée n'est pas encore une cellule cancéreuse, mais elle a franchi le premier pas pour le devenir (Buick et Pollak 1984).

Si les cellules environnantes saines arrivent à inhiber la prolifération de la cellule initiée, il n'y aura pas de formation de tumeur. Toutefois, si les cellules environnantes ne peuvent pas inhiber sa prolifération, processus qui dépend de différents facteurs, alors cette cellule initiée, pourra proliférer en une masse de cellules non différenciées (Trosko 1996).

1.1.1.2 Promotion

Le stade de promotion se définie par une expansion clonale sélective de cellules initiées vers le stade de foci, c'est-à-dire de masse de cellules altérées. Dépendamment de l'organe dans lesquels ces masses de cellules partiellement différenciées se développent, elles sont nommées de différentes façons: les papillomes du col de l'utérus, les polypes du colon, les nodules du sein, etc. (Pitot et Dragan 1991). Ce processus se déroulant à long terme est possible surtout grâce à l'intervention d'agents promoteurs de tumeurs. Ces agents modulent l'expression des gènes impliqués surtout dans l'homéostasie cellulaire. Ce phénomène est réversible seulement s'il y a arrêt d'exposition à ce promoteur. À ce moment, une diminution de la grosseur du foci est fréquemment observée. Normalement, l'exposition au promoteur doit se faire de manière continue afin qu'une transformation cellulaire soit enclenchée. Une seule exposition induit peu souvent une réponse (Pitot et Dragan 1991).

1.1.1.3 Progression

Enfin, le stade de progression est le dernier stade vers le développement d'un cancer. C'est un processus impliquant différentes transformations cellulaires menant au stade de néoplasme, et pendant lequel les cellules acquièrent une autonomie quant à leur croissance (Figure 3). C'est à ce moment qu'on définit cette masse de cellules comme étant un cancer (Pitot et Dragan 1991). Ce phénomène est irréversible et implique au même moment d'autres changements génétiques menant à l'activation d'oncogènes et/ou à l'inactivation de suppresseurs de tumeurs (Pitot et Dragan 1991). Le temps joue un rôle important dans la pathophysiologie du cancer, plusieurs années peuvent être nécessaires afin que la cellule accumule les multiples mutations dont elle a besoin pour former une tumeur. C'est la raison pour laquelle la majorité des cancer surviennent tardivement au cours d'une vie (Lodish et al. 2000).

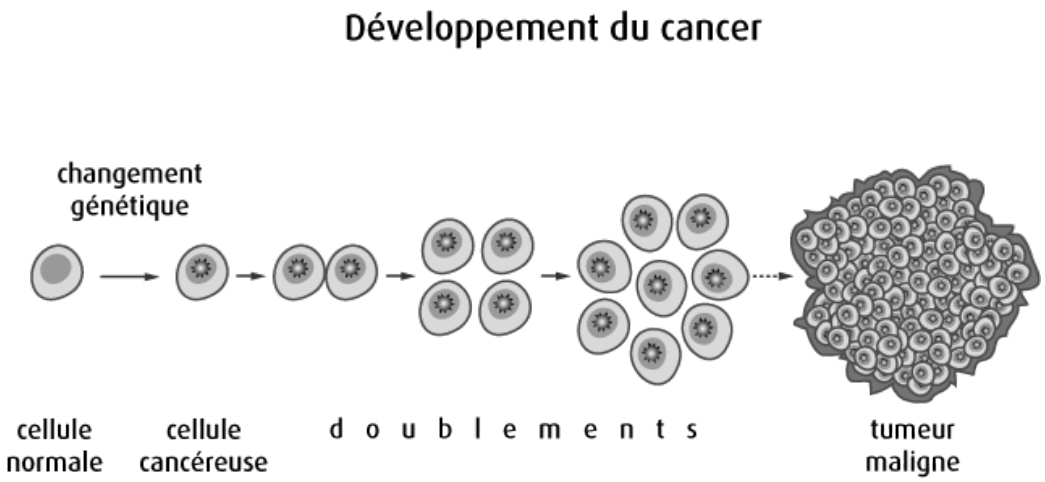


Figure 3: Schéma démontrant le développement d'une tumeur maligne depuis l'initiation d'une seule cellule saine (la cellule initiée se retrouverait entre la cellule saine et la cellule cancéreuse). La tumeur maligne implique des cellules ayant subi les trois étapes de la cancérogenèse et qui sont autonomes face à leur croissance (Société canadienne du cancer)

Normalement, lorsque des altérations surviennent dans l'ADN d'une cellule, celle-ci possède un système de réparation assez efficace. Lors d'une situation de cancer, ces systèmes de surveillance et de réparation sont dysfonctionnels, menant à l'accumulation de dommages dans l'ADN (Moolgavkar et Knudson 1981). De plus, les cellules peuvent acquérir des changements génétiques ou épigénétiques additionnels leur permettant d'envahir des tissus secondaires et d'engendrer des métastases (Pitot et Dragan 1991).

1.1.2 Caractéristiques du cancer

Tel que mentionné précédemment (Figure 1), les cellules cancéreuses peuvent acquérir six caractéristiques leur permettant de progresser (Hanahan et Weinberg 2000). Ces six propriétés ne sont pas présentes dans toutes les tumeurs et peuvent survenir dans un ordre aléatoire. Certaines de ces caractéristiques, telle que la capacité d'invasion, peuvent influencer le microenvironnement direct des cellules (Hanahan et Weinberg 2000).

1.1.2.1 La prolifération comme caractéristique clé de la cancérogenèse

Les cellules cancéreuses accumulent des caractéristiques leur permettant de survivre au-delà de leur durée de vie habituelle et de proliférer anormalement (Feitelson et al. 2015). La cancérogenèse est une suite d'événements apportant des changements dans la programmation

cellulaire avant même l'apparition du cancer. Ces altérations sont associées avec des changements dans le phénotype cellulaire. L'un de ces événements est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce phénomène résulte de la perte du phénotype épithélial et de l'acquisition du phénotype mésenchymal. Les cellules ayant acquis les caractéristiques mésenchymales auront la capacité d'envahir les tissus environnants et de métastaser (Kondaveeti, Guttilla Reed et White 2015). Lorsque bien établie, la TEM peut occasionner des petites régions locales d'hypoxie, favorisant la survie cellulaire et la croissance des cellules souches, en plus de promouvoir l'angiogenèse (Brahimi-Horn, Chiche et Pouyssegur 2007).

De plus, parce que la croissance et la prolifération des cellules saines sont sous le contrôle partiel des facteurs de croissance et des hormones, une altération dans les voies de signalisations activées par ces derniers peut rendre les cellules plus résistantes et plus indépendantes à leurs signaux (Hanahan et Weinberg 2000). La progestérone et l'estrogène sont les hormones ayant le plus d'influence sur la prolifération des cellules de la glande mammaire. Effectivement, l'index prolifératif de l'épithélium mammaire est à son plus haut niveau lors de la phase lutéale du cycle menstruel et lors de la grossesse, phase à laquelle les niveaux de progestérone et d'estrogène sont élevés (Anderson 2002).

1.1.3 Anomalies géniques

Les produits cancérogènes peuvent exercer leurs dommages soit en occasionnant des mutations et/ou en modifiant des événements épigénétiques de l'ADN. On appelle ces produits cancérigènes mutagéniques ou épigénétiques.

1.1.3.1 Cancérigènes mutagéniques

Les cancérigènes mutagéniques occasionnent directement des mutations à l'ADN, altérant l'information génétique des cellules cibles. Les mutations peuvent impliquer différents processus tels des substitutions, des additions ou des délétions de bases, lorsqu'il s'agit d'un gène unique. Des mutations peuvent aussi survenir sur un ensemble de gènes ou sur un ou plusieurs chromosomes entiers. Les mutations somatiques sont transmissibles à la descendance de la cellule mutée tandis qu'une mutation germinale est transmissible à la descendance même de l'individu. Les cancérigènes mutagéniques sont généralement des initiateurs de tumeurs (Lodish et al. 2000).

1.1.3.2 Cancérigènes épigénétiques

Les cancérigènes ayant un impact sur les marques épigénétiques, contribuent à mettre en place des conditions favorables au développement des tumeurs, c'est-à-dire qu'ils altèrent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'organisation cellulaire, les interactions cellulaires, la réparation de l'ADN, l'apoptose, etc. Les cancérigènes épigénétiques sont plutôt considérés comme des promoteurs de tumeurs. D'ailleurs, dans plusieurs types de cancer incluant ceux du sein, des changements épigénétiques surviennent avant les mutations géniques et pourraient faciliter leur accumulation (Elsheikh et al. 2009). Certains de ces cancérigènes peuvent par exemple causer des changements dans la position des nucléosomes ou dans la méthylation de l'ADN, faisant en sorte que certains gènes soient accessibles ou non pour les protéines contrôlant la transcription (Khan et al. 2012). Les changement épigénétiques n'affectent donc pas les nucléotides directement, mais bien tout ce qui entoure ces derniers (Lodish et al. 2000).

1.1.4 Évidences épidémiologiques de l'impact de l'environnement sur la cancérogenèse

Le contexte environnemental est depuis longtemps associé avec le développement de cancers chez l'humain. Environ 10% des cancers seraient d'origine génétique tandis que la plupart des cancers seraient attribuables à des facteurs environnementaux et pourraient donc être évités (Doll et Peto 1981). Par exemple, il a été mis en évidence depuis un certain temps que des cancers comme le cancer du poumon et les mélanomes pouvaient être attribuables en grande partie à la cigarette et à l'exposition aux rayons UVB respectivement (Pleasance et al. 2010 ; Hecht 2012).

De plus, les habitants de quelques pays sont plus vulnérables à certains types de cancers que d'autres. L'influence de l'environnement sur la cancérogenèse s'est confirmée avec l'augmentation de la migration au cours des dernières années. En effet, les personnes qui migrent d'un pays ayant des taux de cancers élevés adoptaient l'incidence plus faible de leur pays d'accueil en une ou deux générations, et vice-versa (Maskarinec et Noh 2004). Ces évidences et ces nouvelles visions quant à l'origine du cancer confirment que l'environnement, l'alimentation et les habitudes de vie jouent un rôle crucial dans la cancérogenèse (Pfeifer 2015). De plus, dépendamment des agents cancérigènes se trouvant dans notre environnement, ces derniers ont le pouvoir de cibler différents mécanismes cellulaires et ainsi, de favoriser certains cancers plus que d'autres (Pfeifer 2015).

1.2 Le cancer du sein

1.2.1 Anatomie et physiologie de la glande mammaire

Le sein est formé de deux compartiments: l'épithélium et le stroma (Figure 4). La glande mammaire est un organe unique à la classe des mammifères et qui a pour fonctions spécifiques de synthétiser, de sécréter et de délivrer, sur demande, le lait au nouveau-né (Medina 1996). Ce processus est essentiel pour le développement du nouveau-né, mais aussi pour sa protection immunitaire, par le transfert d'anticorps de la mère à l'enfant (Medina 1996). La glande mammaire est donc constituée d'un épithélium glandulaire sécrétoire qui est doté d'un système de canaux qui stockent et qui transportent le lait jusqu'au mamelon lors de la lactation (Cooper 1840).

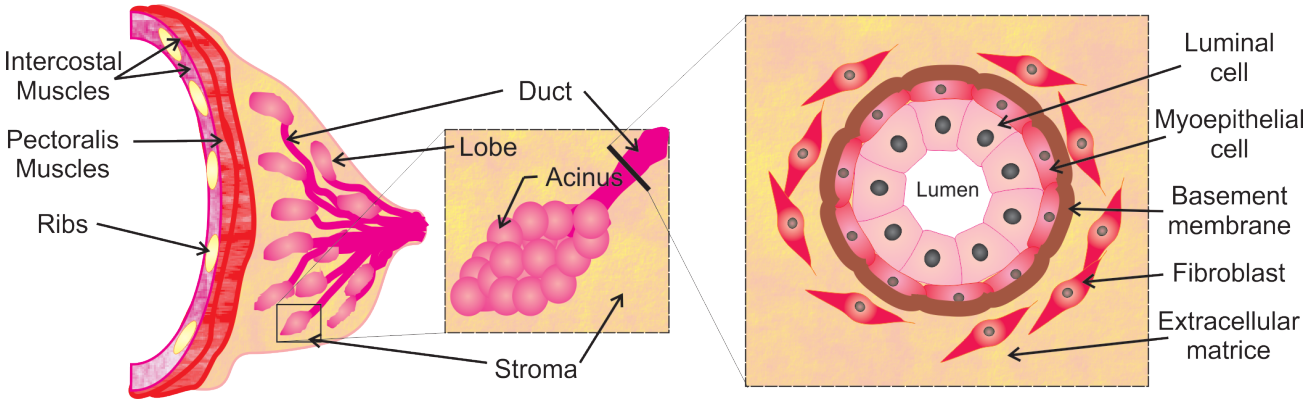


Figure 4: Schéma de la structure anatomique de la glande mammaire. L'illustration de gauche représente une coupe sagittale de la glande mammaire nous permettant de voir la structure des canaux et des lobes. L'image de droite représente un acinus, unité de base de la glande mammaire, avec la couche interne, composée de cellules luminales, entourée d'une couche de cellules myoépithéliales et de la membrane basale. Le stroma entoure la structure et est composé majoritairement de fibroblastes, de cellules adipeuses, de collagène et de cellules immunitaires (Daniel G. Cyr, Patrick J. Devine et Plante 2016)

Chez la femme, le tissu glandulaire est composé d'en moyenne 16 lobes se divisant en lobules qui comprennent entre 10-100 acini, les unités sécrétrices de lait (Ohtake et al. 2001). Le lait est acheminé par les canaux jusqu'au mamelon, où il est expulsé. L'aréole du mamelon joue un rôle de lubrification dans ce processus (*Société canadienne du cancer* 2016).

Chaque canal est composé d'un épithélium à double couche (Figure 4). La couche interne encapsulant le lumen du canal est composée de cellules luminales cuboïdales. Certaines d'entre elles, se trouvant au niveau des acini, se différencieront en lactocytes, les cellules

sécrétrices de lait, durant la grossesse. Une deuxième couche de cellules entoure les cellules luminales; ce sont des cellules basales comprenant les cellules progénitrices et les myoépithéliales contractiles ayant les propriétés des muscles lisses. Ces cellules reposent sur la lame basale les séparant du stroma. Le stroma est composé d'une matrice extracellulaire qui est formée de cellules adipeuses, de fibroblaste, de collagène, de cellules immunitaires, etc. Le stroma est principalement important afin de soutenir et de nourrir les cellules épithéliales (Visvader 2009 ; Brisken et O'Malley 2010).

1.2.2 Développement de la glande mammaire

La glande mammaire est un organe qui diffère des autres puisque son développement survient majoritairement après la naissance. Sa croissance s'effectue en grande partie durant la puberté et son développement culmine durant la grossesse et l'allaitement, où l'organe rempli sa pleine fonction (Key, Verkasalo et Banks 2001)

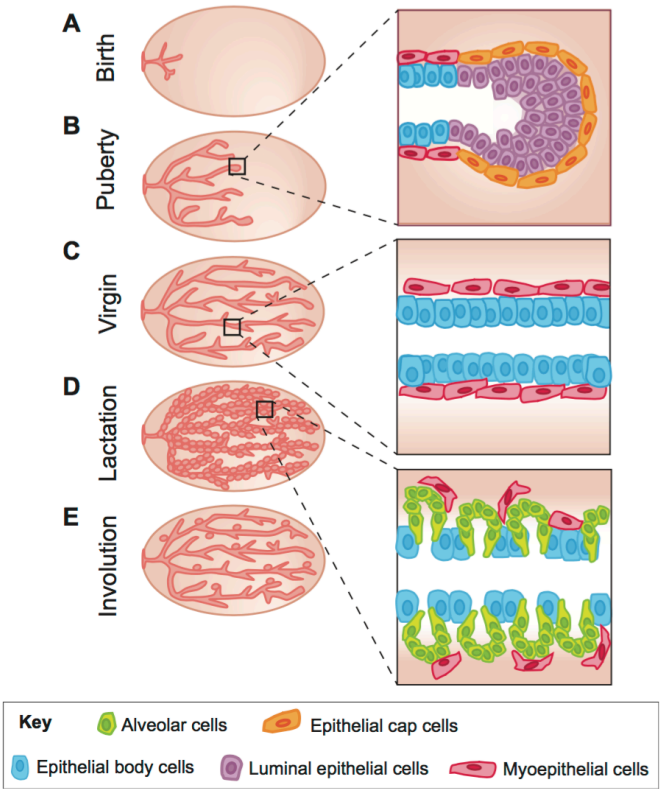


Figure 5: Alvéologenèse de la glande mammaire. Modèle schématique démontrant le développement de l'épithélium de la glande mammaire. Structure de l'épithélium à la naissance (a); élongation des canaux durant la puberté (b); canaux matures chez l'adulte (c); alvéoles durant la lactation (d); involution suite à l'allaitement (e) (Chuong et al. 2014 ; Hennighausen et Robinson 2005).

1.2.2.1 Développement durant la puberté

Le début de sécrétion d'estrogènes par les ovaires signifie, entre autres, le début de la puberté chez la fille (Ciarloni, Mallepell et Brisken 2007). C'est en partie la signalisation de l'estrogène qui permet la production de la progestérone, qui aura aussi son rôle à jouer dans le développement des glandes mammaires (Brisken et O'Malley 2010). La production d'hormones induit une rapide croissance du tissu mammaire, principalement occasionnée par la déposition de tissu adipeux (Russo et al. 1987), mais aussi par l'élongation des canaux existants puis leurs embranchements en canaux secondaires et tertiaires (Figure 5b, 5c). Il y a également apparition des lobules qui restent à l'état de bourgeons jusqu'au stade de la grossesse. À chaque cycle menstruel, la glande mammaire subit un léger remodelage en préparation à une éventuelle grossesse, qui se résorbera le cas échéant (Russo, Rivera et Russo 1992).

1.2.2.2 Développement durant la grossesse

Ce n'est que lors d'une grossesse que la glande mammaire atteint son plein développement et que nous pouvons la considérer comme un organe fonctionnel mature (Pang et Hartmann 2007). En effet, en réponse aux hormones induites par l'implantation et la croissance de l'embryon (estrogènes, progestérone, prolactine, facteurs de croissance, corticostéroïdes), la glande mammaire subit une deuxième phase de prolifération et de différenciation marquée (Lange et Yee 2008).

Une augmentation graduelle de la prolactine au cours du second trimestre de grossesse stimule la prolifération et la différenciation des cellules des acini, unités fonctionnelles de la glande mammaire. À ce stade, les cellules luminales se différencient en lactocytes, les cellules productrices et sécrétrices du lait maternel (Cox et al. 1999).

Enfin, lorsque l'allaitement est terminé, la glande mammaire subit le processus d'involution. Ce processus fait intervenir des protéinases impliquées dans le processus de remodelage des lobules et des canaux afin de retourner à un phénotype pré-grossesse (Hughes et al. 2012).

1.2.2.3 Le rôle des différentes hormones

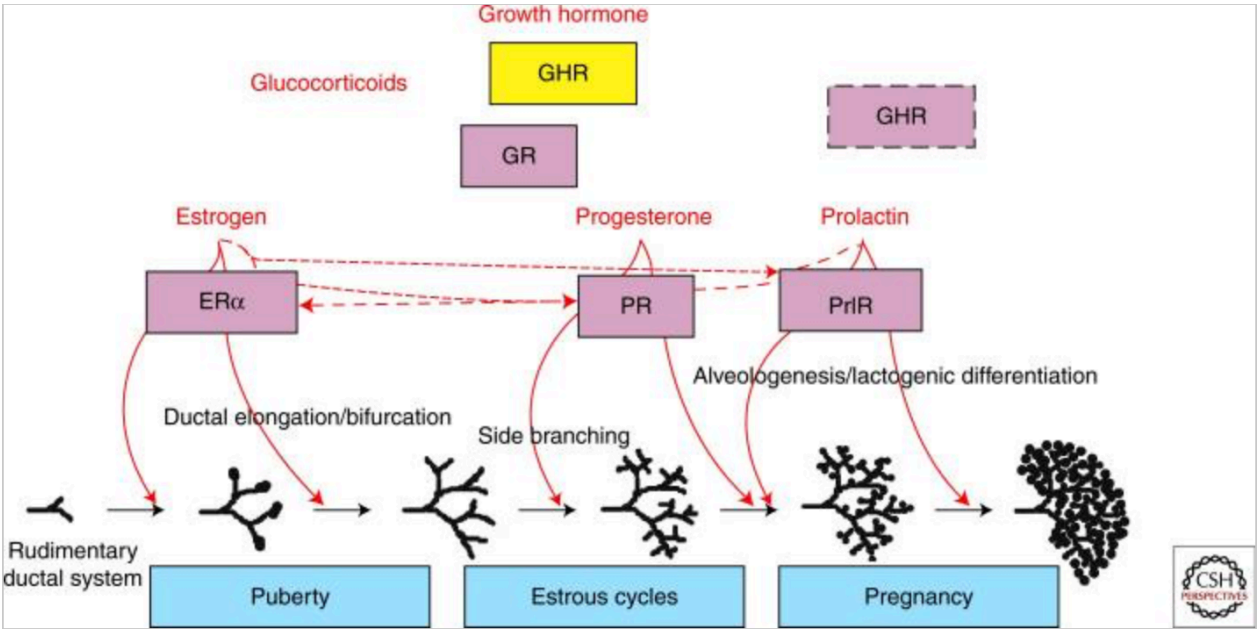


Figure 6: Contrôle hormonal du développement des glandes mammaires. Les différents stades du développement des glandes mammaires sont illustrés par les boîtes bleues. Certains récepteurs hormonaux sont présents dans l'épithélium mammaire (boîtes roses) tandis que GHR (récepteur à l'hormone de croissance) se retrouve dans le stroma (boîte jaune), mais engendre son effet dans l'épithélium (boîte rose hachurée). Les flèches rouges indiquent à quels stades l'implication des différentes hormones survient. L'implication des glucocorticoïdes et de l'hormone de croissance est constante durant le développement des glandes mammaires. Les flèches rouges hachurées illustrent la régulation hormonale de l'expression des récepteurs (Brisken et O'Malley 2010).

Le développement de la glande mammaire est considéré comme hormono-dépendant à partir de la puberté (Figure 6). Effectivement, à ce stade de développement, les estrogènes sont essentiels à l'élongation des canaux (Brisken et O'Malley 2010). Il existe deux isoformes du récepteur à l'estrogène (ER): ERα et ERβ. Ces derniers sont présents autant dans l'épithélium que dans le stroma. Afin de mieux comprendre le rôle des différents isoformes, des souris sauvages ont subit la transplantation d'un épithélium provenant de souris ERα -/- faisant en sorte que seules leurs glandes mammaires n'expriment pas ERα. Ces souris ne subissent pas de conséquences quant au développement de cet organe jusqu'à la puberté (Mallepell et al. 2006). Par contre, par la suite, aucun développement ne se poursuit dans les glandes mammaires de ces souris, démontrant que ERα est essentiel à l'élongation des canaux et qu'il est indirectement essentiel à l'alvéologenèse (Brisken et O'Malley 2010 ; Mallepell et al. 2006).

Lors de ces études, les chercheurs ont aussi greffé un épithélium mammaire d'une souris de type sauvage dans le stroma d'une souris ERα -/-. Dans ce cas-ci, l'épithélium a réussi à se développer normalement. Par contre, un épithélium ERα -/- ne se développe pas dans un stroma de type sauvage (Mallepell et al. 2006). Les études de transplantation d'épithélium ont donc démontré que l'expression de ERα est essentielle seulement dans l'épithélium afin que le développement de la glande mammaire soit complet.

Dans une autre étude, des chercheurs ont démontré que les souris ERβ -/- démontrent un délai dans l'embranchement des canaux de la glande mammaire, ce qui pourrait être attribuable à une fonction ovarienne perturbée résultant d'une diminution de sécrétion de progestérone (Antal et al. 2008). De façon similaire, il a été démontré que la progestérone est essentielle au développement tertiaire et à l'alvéologenèse. Ainsi, chez les souris PR -/-, l'épithélium des glandes mammaires ne comporte pas d'embranchement tertiaire des canaux et l'alvéologenèse est inhibée, démontrant l'importance de la signalisation de la progestérone (Brisken et al. 1998).

Plusieurs autres hormones sont impliquées dans le développement de la glande mammaire. Les plus importantes sont: la prolactine, indispensable à l'alvéologenèse et à la différenciation des cellules luminales en lactocytes durant la grossesse (Brisken et al. 1999), les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (« insuline-like growth factor », IGF), les facteurs de croissance épidermiques (« epidermal growth factor », EGF), les facteurs de croissance des fibroblastes (« fibroblast growth factors », FGF) et les facteurs de croissance de transformation (« transforming growth factor », TGF) (Brisken et O'Malley 2010).

Enfin, la glande mammaire est un organe très dynamique puisqu'elle s'adapte aux niveaux d'hormones sexuelles, telles l'estrogène et la progestérone, qui fluctuent au gré des différents stades de la vie féminine (puberté, cycles menstruels, grossesse, allaitement et ménopause) (Brisken et O'Malley 2010). La glande mammaire étant un organe hautement régulée par des hormones, une dérégulation dans leur signalisation peut avoir des conséquences importantes dans le développement de cette glande. Entre autres, un débalancement hormonal peut amener une prolifération excessive des cellules, ce qui pourrait favoriser le cancer du sein (Fenton et Birnbaum 2015).

1.2.3 Statistiques sur le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme au Canada (Figure 7). En 2015, 25 000 femmes recevaient un diagnostic de cancer du sein (26% de tous les nouveaux cas de cancer chez la femme) et 5000 Canadiennes mourraient des suites d'un cancer du sein, faisant de ce cancer la 2^{e} cause de décès par cancer chez les Canadiennes (*Société canadienne du cancer* 2016). Il est estimé qu'une femme sur neuf au Canada développera un cancer du sein au cours de sa vie (avant l'âge de 90 ans) et qu'une femme sur 30 en mourra (*Société canadienne du cancer* 2016).

Chez l'homme, en 2015, environ 220 Canadiens ont reçu un diagnostic de cancer du sein et il est estimé que 60 en mourront. La plupart sont âgés de plus de 60 ans lors du diagnostic (*Fondation canadienne du cancer du sein* 2016). Le cancer du sein chez l'homme est traité un peu de la même manière que chez les femmes ménopausées, c'est-à-dire par hormonothérapie. Les hommes, tout comme les femmes, porteurs de la mutation du gène « Breast Cancer 2 » (*BRCA2*) risquent davantage de développer un cancer du sein. Les hommes atteints du syndrome de Klinefelter sont aussi plus à risque de développer un cancer puisque leur taux d'androgènes est bas et que leur taux d'estrogènes est élevé; le même phénomène se produit lors d'une cirrhose du foie (*Société canadienne du cancer* 2016).

Cependant, d'un point de vue plus positif, le nombre de décès attribués au cancer du sein a beaucoup diminué au fil des années. Depuis 1986, le nombre de décès a baissé de 44% grâce, entre autres, aux diagnostics plus précoces, aux programmes de mammographies régulières, aux avancées technologiques dans le domaine du dépistage et à de meilleurs traitements (*Fondation canadienne du cancer du sein* 2016). En date de 2014, le taux de survie à cinq ans au cancer du sein au Canada était de 88% (*Fondation canadienne du cancer du sein* 2016).

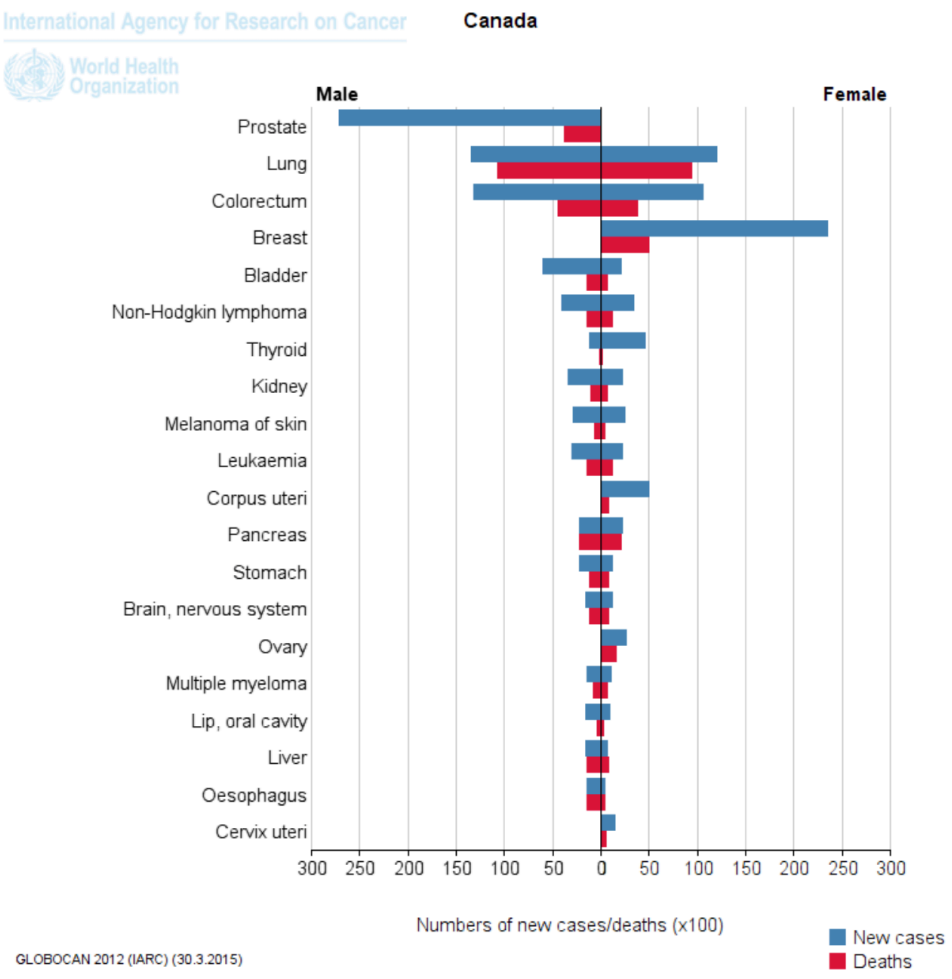


Figure 7: Incidence et taux de mortalité des différents types de cancer au Canada. Le cancer du sein occupe la première position en incidence et la deuxième position par rapport à son taux de mortalité chez la femme (IARC 2012).

1.2.4 Les stades de cancer du sein

Afin de caractériser les tumeurs du sein et d'établir un pronostic, des stades ont été défini sur une échelle de 0 à IV (Figure 8). Le stade 0 reflète un cancer non-invasif se trouvant à son endroit initial (canal, lobule) et le stade IV décrit un cancer ayant migré de la glande mammaire pour envahir d'autres organes, comme par exemple le cerveau et les poumons. Il s'agit alors de métastases (*breastcancer.org* 2016).

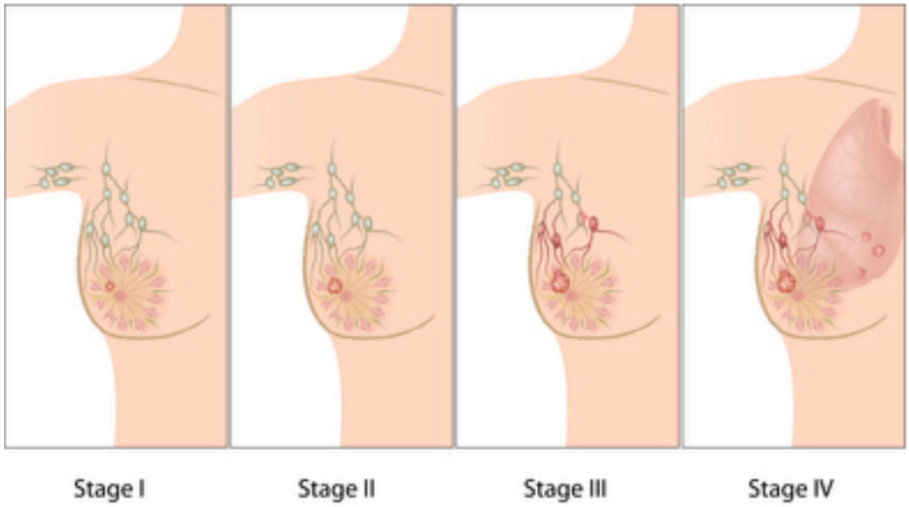


Figure 8: Schéma représentant les différents stades de cancer du sein. Au stade I, la tumeur se situe au niveau du lobule (ou d'un canal) et ne mesure pas plus de 2 cm. Au stade II, la tumeur mesure entre 2 et 5 cm et des cellules cancéreuses sont présentes (ou non) dans le nœud lymphatique. Au stade III, la tumeur mesure 5 cm ou plus et des cellules cancéreuses sont présentes dans le nœud lymphatique ou dans les nœuds lymphatiques axillières. Le stade IV est défini par l'étendue du cancer dans d'autres organes ou tissus (*Breast Cancer Society of Canada* 2016).

1.2.5 Les grades de développement du cancer

Afin d'établir un pronostic, les tumeurs sont également catégorisées selon leur grade cellulaire, variant entre 1 et 3, et qui représente le niveau de différenciation des cellules. Les cellules de la catégorie des tumeurs de grade 1 présentent une atypie nucléaire minime et focale. À ce grade, les mitoses sont exceptionnelles, ce qui fait en sorte qu'il est peu probable qu'il y ait propagation des cellules. Toutefois, les cellules de tumeurs de grade 2 se divisent un peu plus vite que normalement et présentent une atypie plus marquée. Finalement, les cellules cancéreuse de tumeurs de grade 3 sont des cellules entièrement dé-différenciées et se divisent très rapidement, augmentant de beaucoup le risque de propagation. Le grade des tumeurs peut aussi être confirmé suite à l'analyse de différents marqueurs tels les niveaux de molécules d'adhésion, l'index Ki-67 (l'index Ki-67 est un marqueur de prolifération cellulaire qui nous donne une mesure du taux de cellules qui sont activement en division (Komen 2015)), la ploïdie et les niveaux de protéines de régulation du cycle cellulaire (*breastcancer.org* 2016).

1.2.6 Les sous-types de cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie dite hétérogène où les tumeurs sont classées selon leur expression génique et selon leur phénotype (Barnard, Boeke et Tamimi 2015 ; Perou et al. 2000). Bien que toujours utilisé en clinique, le système de classification en fonction du phénotype (stade et grade) a généralement été remplacé par un classement en sous-types moléculaires dans le milieu de la recherche. Nous retrouvons quatre principaux sous-types de cancer du sein: Luminal A, Luminal B, HER2 et triple-négatif. Des marqueurs définissant chaque sous-type sont d'ailleurs utilisés afin de sélectionner une thérapie ciblée (Khan et al. 2012) (Figure 9). Certains sous-types moins communs, comme par exemple le sous-type «claudin-low», ne seront pas traités dans cet ouvrage.

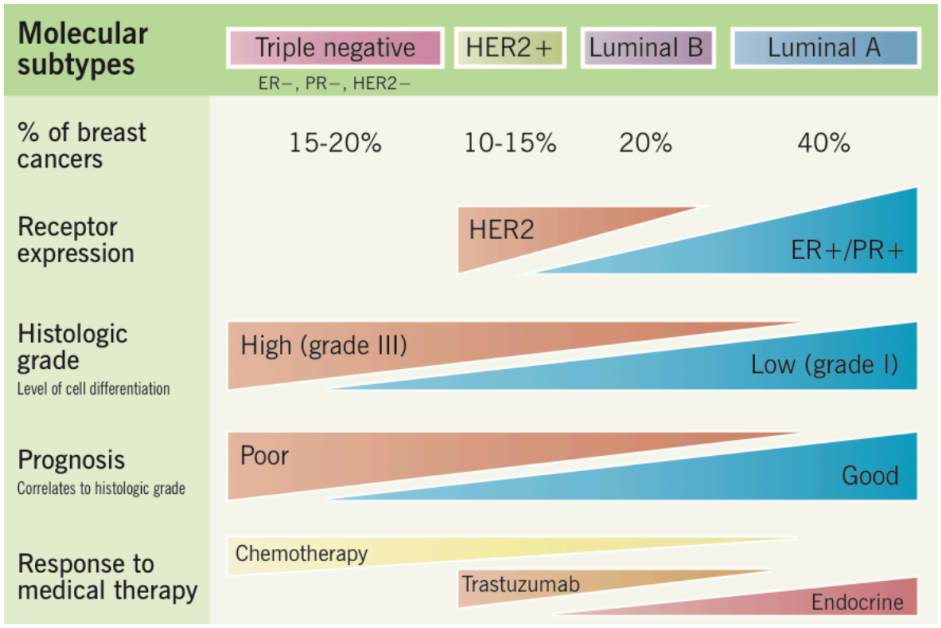


Figure 9: Schéma résumé des différentes caractéristiques des sous-types moléculaires du cancer du sein (prévalence, récepteurs exprimés, grade histologique, pronostic et réponse aux thérapies médicales) (Wong 2012)

1.2.6.1 Cancers de sous-type luminal

Les cancers de type luminal sont les plus fréquents dans l'ensemble des cancers du sein et prennent source dans la couche interne des canaux galactophores. Environ 60% des cancers des femmes pré-ménopausées et 75% des femmes post-ménopausées sont des cancers

estrogènes-dépendant (Khan et al. 2012). Les cancers de sous-type luminal sont estrogène-dépendants (Khan et al. 2012). Ils sont donc aussi les plus facilement traitables puisque les cellules en cause expriment les récepteurs aux estrogènes, et ainsi, peuvent être ciblés efficacement par des modulateurs et antagonistes des récepteurs à l'estrogène, ou des inhibiteurs de la synthèse des estrogènes, qui ont tous fait leur preuve de longue date en clinique. Le cancer luminal A a un meilleur pronostic que le cancer luminal B (Komen 2015).

1.2.6.1.1 Luminal A

Ce sous-type moléculaire est le plus commun des cancers du sein, représentant un pourcentage entre 30 et 70% du total des tumeurs. Ce type de tumeur est positif pour ER, PR, mais est négatif pour HER2. L'indice Ki-67 est peu élevé. Les cancer luminal A peuvent être pour la plupart du temps traités par des anti-estrogènes ou des inhibiteurs de l'aromatase (Komen 2015).

1.2.6.1.2 Luminal B

Les tumeurs classées comme sous-type luminal B sont elles aussi positives pour ER et PR, mais sont généralement positives pour HER2, et ont un indice Ki-67 élevé (Prat et Perou 2011). Ce sous-type moléculaire mène à un moins bon pronostic que le luminal A, avec généralement un grade plus avancé, une tumeur de plus grande taille et le nœud lymphatique plus souvent affecté (Komen 2015).

1.2.6.2 Cancers de sous-type HER2

Ce sous-type moléculaire est représenté par des cellules ayant subi un enrichissement de l'expression de HER2, mais n'exprimant pas ER ni PR (Komen 2015). Environ 15% des cancers du sein sont de sous-type HER2 et 75% de ces derniers comportent des mutations dans le gène *p53* (facteur de transcription suppresseur de tumeur) (Komen 2015 ; Ahmed, Sami et Xiang 2015). Les femmes diagnostiquées d'un cancer du sein HER2 sont habituellement plus jeunes que celles diagnostiquées d'un cancer de type luminal. Il est possible de traiter ces tumeur avec un anti-HER2, le trastuzumab (Herceptin) (Komen 2015 ; Gonzalez-Angulo et al. 2009).

1.2.6.3 Cancer de type triple négatif

Comme son nom l'indique, les tumeurs de sous-type moléculaire triple négatif n'expriment pas les marqueurs ER, PR et HER2 (Komen 2015). Ce sous-type inclut plusieurs autres sous-types de tumeurs, dont celles présentant des caractéristiques semblables aux cellules basales entourant les canaux de la glande mammaire (tumeurs « basal-like »). La plupart des tumeurs triple-négatives contiennent des mutations dans le gène *p53*, un des plus important suppresseurs de tumeurs (Komen 2015).

Ce sous-type de cancer tend à être plus fréquent chez les jeunes femmes, ainsi que chez les femmes afro-américaines (Komen 2015). La majorité des cancers reliés à une mutation au gène *BRCA1* sont des cancers triple-négatifs. Il est plus difficile de traiter ce sous-type de cancer, qui est souvent très agressif et associé à un pronostic de moins de cinq ans (Komen 2015). Le traitement consiste habituellement à une combinaison entre de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie, puisque qu'aucune thérapie ciblée n'a encore fait ses preuves (Komen 2015).

1.3 Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude

Plusieurs lignées cellulaires épithéliales mammaires sont disponibles commercialement afin d'étudier le cancer du sein, dont certaines ont des caractéristiques similaires aux différents sous-types de cancer. Deux lignées cellulaires ont été utilisées dans cette étude: une lignée cellulaire dite « normale » (les cellules hTERT-HME1) et une lignée cancéreuse (les cellules T-47D).

1.3.1 Les cellules T-47D

La lignée cellulaire T-47D est de type épithélial et a été isolée à partir d'une effusion pleurale d'une femme de 54 ans atteinte d'un cancer du sein, plus précisément d'un carcinome des canaux infiltrant (*American Type Culture Collection (ATCC)* 2016). Ces cellules expriment les principaux récepteurs impliqués dans les sous-types de cancer du sein: les récepteurs aux estrogènes, les récepteurs à la progestérone et le récepteur HER2. Elles représentent donc le sous-type luminal B.

1.3.2 Les cellules hTERT-HME1

La lignée cellulaire hTERT-HME1 est aussi de type épithélial et a été isolée d'une chirurgie de réduction mammaire chez une femme de 53 ans. Cette femme n'avait pas de prédisposition de cancer. Ses cellules ont été immortalisées par infection avec un rétrovirus contenant le vecteur hTERT, permettant aux cellules de se multiplier sur une plus grande période de temps (*American Type Culture Collection (ATCC)* 2016). Contrairement aux cellules T-47D, les cellules hTERT-HME1 n'expriment pas les récepteurs aux estrogènes, à la progestérone et HER2.

1.4 Des récepteurs importants dans la pathologie du cancer du sein

1.4.1 Les récepteurs nucléaires ERα et ERβ

Le principal rôle de l'estrogène dans l'organisme est de supporter le développement et le maintien des fonctions sexuelles et de la reproduction. La forme d'estrogène ayant l'activité la plus puissante est le 17β-estradiol (E_2) (Heldring et al. 2007). La majorité des effets de l'E_2 dans ces contextes, ainsi que dans celui de la tumorigenèse de la glande mammaire, sont médiés via les deux récepteurs nucléaires ERα et ERβ (Leygue et Murphy 2013).

1.4.1.1 Les isoformes

Les deux isoformes d'ER (ERα et ERβ) sont issues de deux chromosomes différents, le sixième et le quatorzième, mais leurs structures sont très semblables et leur affinité pour l'estradiol est similaire (Heldring et al. 2007). ERα et ERβ n'ont pas été découverts en même temps; l'isoforme α est connue depuis 1962 (Jensen 1962), alors que l'isoforme β a été découverte plusieurs années plus tard (Kuiper et al. 1996).

1.4.1.1.1 ERα

ERα est présent dans de nombreux tissus, mais se retrouve majoritairement dans les ovaires, l'utérus, le placenta, l'hypophyse, les os, les reins, le tissu adipeux, l'épididyme, la prostate et la glande mammaire (Diel 2002). Malgré la grande importance d'ERα dans les fonctions reproductrices, ce récepteur est aussi important dans l'homéostasie des os et dans le

métabolisme (Paterni et al. 2014). C'est pourquoi une déficience en ERα est souvent associée avec l'ostéoporose et la dégénération du système nerveux central (Diel 2002). À l'opposé, il a été démontré qu'une augmentation de l'activité de ce récepteur est fréquemment reliée au développement du cancer du sein et de l'endomètre (Diel 2002).

1.4.1.1.2 ER *β*

ERβ est présent dans plusieurs tissus incluant la prostate, les ovaires, le placenta, les poumons, la vessie, le cerveau, le cœur et la glande mammaire (Diel 2002). Ses rôles dans ces différents organes sont toujours sous investigation. ERβ pourrait avoir un effet anti-prolifératif dans les tissus reproductifs et ainsi s'opposer aux effets de ERα (Weihua et al. 2000).

1.4.1.2 Les cascades de signalisation induites

Les ERs font partie de la grande famille des récepteurs nucléaires (Heldring et al. 2007). ER est d'abord synthétisé dans le cytosol et rapidement acheminé et entreposé au noyau sous sa forme inactive, mais facilement activable (Diel 2002). Sa conformation inactive est maintenue par l'association de protéines de chocs thermiques (« heat shock proteins », HSP), HSP90 et HSP56 (Diel 2002).

À l'arrivée d'E_2, son ligand endogène, ER se dissocie des HSPs et de ses co-répresseurs, comme par exemple SMRT et N-CoR afin de s'associer ensuite avec ses co-activateurs, comme l'acétyltransférase et l'ubiquitine ligase (Diel 2002). C'est ensuite que deux monomères d'ER interagissent ensemble afin de former un homodimère. Ce dimère est particulièrement important afin qu'il y ait une haute affinité de liaison avec l'ADN aux sites des éléments de réponse à l'estrogène (« estrogen response elements », EREs), situés dans les promoteurs des gènes cibles de l'E_2 (Diel 2002). Grâce aux co-régulateurs, le complexe formé peut modifier la structure de la chromatine et favoriser le recrutement de l'ARN polymérase II (Heldring et al. 2007).

Comme mentionné précédemment, les structures des différents isoformes des ERs sont très semblables, surtout au niveau des domaines de liaison à l'ADN, faisant en sorte que les ligands pouvant s'y lier sont semblables aussi (Heldring et al. 2007). Les structures des récepteurs sont différentes quant à leur section N-terminale (Heldring et al. 2007). Le récepteur adopte une conformation différente selon le ligand auquel il se lie, influençant aussi les co-activateurs/répresseurs recrutés (Diel 2002).

La réponse transcriptionelle de ER varie selon plusieurs facteurs tels le tissu dans lequel la cellule se trouve, les co-régulateurs disponibles et les autres voies de signalisations activées en parallèle (Heldring et al. 2007). Sous certaines conditions, la voie estrogénique peut activer ainsi la transcription du PR, du IGF-1R et de la protéine inhibitrice 1 dépendante des cyclines (p21), entre autres (Heldring et al. 2007).

1.4.1.3 Les ERs dans le cancer du sein

Normalement, dans la glande mammaire, seule une petite proportion (entre 20 et 30%) des cellules luminales expriment ERα (A. M. Fowler et Alarid 2007). Par contre, dans le cancer du sein, plus de 50% des cellules luminales expriment ERα et de façon beaucoup plus soutenue (A. M. Fowler et Alarid 2007). Cette surexpression a pour conséquence d'augmenter la transcription génique de façon E_2-dépendante, perturbant le contrôle de la croissance, de la prolifération, de la différenciation et aussi du cycle cellulaire (A. M. Fowler et Alarid 2007). Enfin, une réponse paracrine sera aussi provoquée chez les cellules mammaires ERα- par l'E_2, stimulant la production de facteurs de croissance et favorisant leur prolifération à elles aussi (Heldring et al. 2007). Il a ainsi été clairement démontré qu'une exposition soutenue aux estrogènes est considérée comme un facteur de risque important au développement de cancers de sein (Hankinson, Colditz et Willett 2004).

1.4.1.4 Influence de l'estradiol (E_2) sur la glande mammaire

L'élongation des canaux dans la glande mammaire est dépendante d'ERα (Kenney et al. 2003). L'estradiol joue aussi un rôle crucial dans l'adhésion des cellules de la glande mammaire. Ce processus influence la structure normale de l'épithélium mammaire, mais aussi la migration et l'invasion durant la cancérogenèse et la propagation de métastases, entre autres par le réarrangement des filaments intermédiaires et d'actine (DePasquale, Samsonoff et Gierthy 1994). ERβ est aussi activé par l'estradiol pour supporter la croissance lobulaire et alvéolaire de la glande mammaire ainsi que la différenciation des cellules lors du développement (C. Forster et al. 2002). Des altérations tant par rapport de l'expression de molécules d'adhésion et des protéines impliquées dans la migration telles les cadhérines, les caténines, les intégrines ont été démontrées lors de cancer du sein (Parker et al. 2001). Par exemple, dès l'étape de la transformation néoplasique, ERα a la capacité d'activer Snail, un facteur de transcription inhibant à son tour la transcription de E-cadhérine, la protéine clé des jonctions adhérentes dans

les cellules luminales (Oesterreich et al. 2003). Ce phénomène est une caractéristique clé de la transition épithélio-mésenchymale.

1.4.1.5 Expression d'ERα et ERβ dans le cancer du sein

En conjonction avec d'autres informations telles que le statut du récepteur à la progestérone et l'amplification ou non de HER2, cette information permettra d'établir un pronostic et d'orienter le choix du traitement. Les changements dans les niveaux d'hormones, par exemple à la ménopause, modifient l'expression des ERs. Il a été démontré que ERα, qui favorise la prolifération et la survie des cellules cancéreuses, est exprimé dans près de 70% des tumeurs mammaires, soit un pourcentage significativement plus élevé que pour ERβ (Planas-Silva et al. 2001).

Au moment du diagnostic, les cancers du sein sont testés systématiquement afin de détecter l'expression de ERα (Heldring et al. 2007). Les thérapies endocrines varient selon le tissu ou l'organe et incluent les modulateurs sélectifs de ER («Selective estrogenic receptor modulators», SERM), comme le tamoxifène, qui agissent en tant qu'antagoniste de ERα dans la glande mammaire. Il est également possible d'utiliser un antagoniste pur tel que le fulvestrant et d'inhiber l'aromatase et bloquer la synthèse d'estrogènes avec le letrozole (Johnston et Dowsett 2003). Pour sa part, le rôle de ERβ dans le cancer du sein n'est pas encore clairement démontré et les traitements disponibles à ce jour continuent de cibler ERα (Haldosen, Zhao et Dahlman-Wright 2014). En général, les taux de ERβ ont tendance à décliner durant le développement des tumeurs mammaires (Leygue et Murphy 2013). D'ailleurs, l'expression de hauts niveaux de ERβ a été associée à un meilleur pronostic (Gruvberger-Saal et al. 2007) et il a été démontré que ERβ diminue le potentiel prolifératif et invasif des cellules du cancer du sein (Lazennec et al. 2001), notamment en contrecarrant l'effet de l'estradiol dans les cellules ER+ (Strom et al. 2004).

1.4.2 Le récepteur à la progestérone (PR)

Le récepteur à la progestérone fait aussi partie de la famille des récepteurs hormonaux nucléaires (Obr et Edwards 2012). La progestérone (P4) a un rôle dans le développement de la glande mammaire, soit dans la prolifération des canaux à la puberté et la différenciation des cellules durant la grossesse (Graham et Clarke 1997). Par contre, contrairement à l'estrogène,

la voie de signalisation P4/PR n'est pas essentielle à l'élongation des canaux à la puberté, mais elle l'est au stade de la grossesse (Lydon et al. 1995).

1.4.2.1 Les isoformes

Contrairement aux isoformes de ER, les isoformes de PR, PR-A et PR-B, sont produits à partir du même gène; ce dernier est situé sur le chromosome 11. PR-A est en fait la forme tronquée de PR-B au niveau N-terminal (Bjornstrom et Sjoberg 2005). Les deux isoformes possèdent le même pouvoir de liaison avec le ligand et avec l'ADN (Aupperlee et al. 2005).

1.4.2.2 Les signalisations des PRs

PR est un facteur de transcription ligand-dépendant, qui se lie à des gènes spécifiques au niveau des éléments de réponse à la progestérone (« Progesterone response element », PREs). Cette fonction implique le recrutement de protéines co-régulatrices et affecte la structure de la chromatine afin de réguler la transcription génique (Bulynko et O'Malley 2011)

Il a été démontré que plusieurs cibles secondaires sont impliquées dans la réponse proliférative de la progestérone: la voie Wnt4, l'amphiréguline, la calcitonine, l'inhibiteur de la liaison à l'ADN 4 (Id4) et le récepteur activateur du facteur nucléaire ligand κB (RANKL) (Beleut et al. 2010). Une attention particulière doit être apportée à la voie RANKL (Figure 10) puisqu'il a été démontré que cette voie est dérégulée dans le cancer du sein (Gonzalez-Suarez et al. 2010).

RANKL est une cytokine de la famille des facteurs de nécrose tumorale (« tumor necrosis factor α », TNF α) provoquant ses effets biologiques en se liant au récepteur transmembranaire RANK. RANKL a initialement été défini comme un facteur essentiel à la différenciation des ostéoclastes (Fata et al. 2000). Toutefois, il a ensuite été démontré qu'il est exprimé dans un grand nombre de tissus et que son rôle est essentiel à l'alvéologenèse de la glande mammaire lors de la grossesse (Fata et al. 2000). Lorsque RANK est activé, une série de cascades de signalisation est mise en branle menant, entre autre, à l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (« nuclear factor kappa B », NFκB) et la régulation à la hausse d'un de ses gènes cibles: la cycline D1 (Gonzalez-Suarez 2011). Dans la glande mammaire, la cycline D1 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération et l'angiogenèse (Hernandez-Hernandez et Camacho-Arroyo 2013). Chez la souris, il a été démontré qu'une dérégulation de la voie RANKL-RANK est impliquée dans l'initiation et la progression de tumeurs mammaires P4-

dépendantes (Gonzalez-Suarez et al. 2007). Enfin, RANKL est surexprimé dans plusieurs cancers du sein (Gonzalez-Suarez 2011).

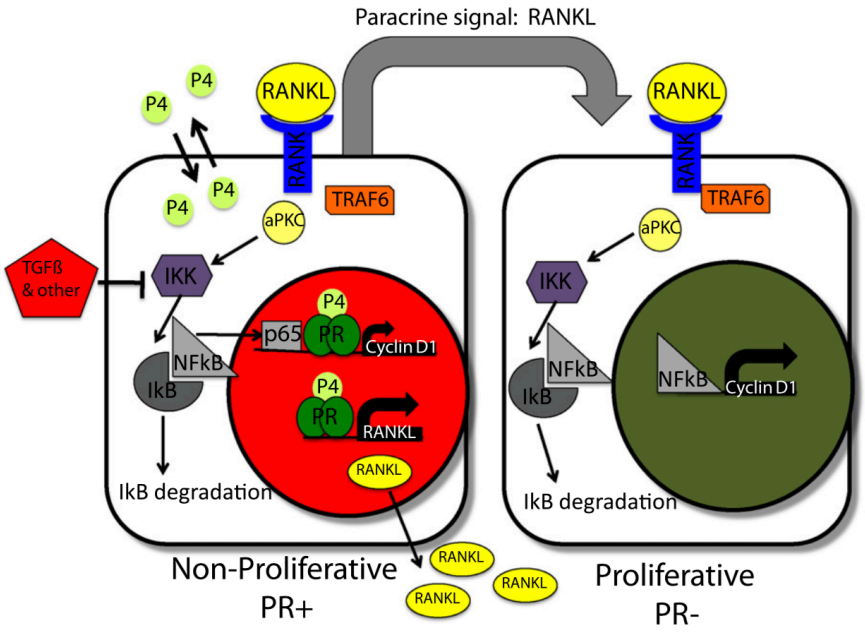


Figure 10: Modèle de la régulation de la prolifération cellulaire par la progestérone initiée par la voie de signalisation paracrine RANK-RANKL. RANKL est une cible directe de PR induite par la progestérone et est relâché pour ensuite interagir avec le récepteur RANK autant chez les cellules PR+ ou PR- avoisinantes. RANKL active ensuite la voie de signalisation IKK/IkB/NFκB/cyclin D1 afin de stimuler la prolifération. RANKL ne génère pas d'activation continue de la prolifération par NFκB/cyclin D1 chez les cellules PR+ grâce entre autres aux actions suppressives de TGFβ (Obr et Edwards 2012).

Une certaine communication est aussi possible entre les PRs et les ERs. En effet, la majorité des cellules épithéliales exprimant PR expriment aussi ERα. PR est un gène cible régulé à la hausse par ERα et l'estrogène est requis afin de maintenir un haut niveau d'expression de PR (Mallepell et al. 2006).

En plus de son action en tant que facteur de transcription, une sous-population de PRs est aussi retrouvée dans le cytoplasme afin d'induire une réponse rapide à la progestérone en activant une cascade de phosphorylations de protéines ayant entre autres un effet sur la prolifération (Ballare et al. 2003). Des études d'immunofluorescence ont démontré que PR est exclusivement exprimé par les cellules épithéliales dans la glande mammaire, sans évidence d'expression par les cellules myoépithéliales ou les cellules stromales (Grimm et al. 2002). PR est exprimé de façon différente selon les stades de développement des glandes mammaires. Les cellules

épithéliales juvéniles expriment toutes ce récepteur tandis que son expression tend à diminuer à la puberté et à la vie adulte. Chez l'adulte, environ 40% des cellules épithéliales mammaires expriment PR; les cellules PR- peuvent tout de même proliférer en réponse à la P4 grâce aux mécanismes d'action paracrine, type de signalisation cellulaire possible à proximité de la cellule qui aura sécrété des messagers chimiques. Dans ce cas-ci, la cellule PR+ reçevra le signal de proliférer par la P4, ce qui lui fera sécréter des facteurs de croissance qui feront proliférer à leur tour les cellules PR- situées aux alentours (Anderson 2002).

1.4.2.3 Les PRs dans le cancer du sein

La progestérone influençant directement la régulation du système endocrinien, l'évaluation de la relation entre l'exposition à cette hormone et le cancer du sein est d'une grande importance (Soyal et al. 2002). Des études cliniques ont démontré que par son action prolifération dans la glande mammaire, une dérégulation de la signalisation induite par la progestérone est un facteur de risque pour le cancer du sein (Anderson 2002).

1.4.2.3.1 PR-A et PR-B

Des chercheurs ont investigué les effets physiologiques des deux différents isoformes (PR-A et PR-B) dans la glande mammaire en utilisant des approches transgéniques. Une surexpression de PR-A engendre un embranchement plus important des canaux et de l'hyperplasie (Shyamala et al. 1998), tandis que la surexpression de PR-B est plutôt associée à une réduction de l'élongation des canaux chez la souris (Shyamala et al. 2000). Par contre, une autre étude *in vivo* chez la souris démontre le contraire; PR-B est plus important que PR-A dans la réponse proliférative à la progestérone dans l'épithélium mammaire (Mulac-Jericevic et al. 2000). Il a aussi été démontré que dans les lignées cellulaires mammaires cancéreuses, PR-B est un activateur de la transcription plus puissant que PR-A et que l'activation de la prolifération est initiée en grande partie par l'isoforme PR-B (Jacobsen et al. 2003).

Toutefois, en ce qui a trait aux niveaux d'expression des deux isoformes et de leur implication dans l'agressivité de la tumeur, il a été démontré que le patron d'expression change au cours du processus tumorigénique. Un ratio PR-A/PR-B élevé serait associé à des tumeurs plus agressives et à une plus grande résistance aux thérapies endocrines (Hopp et al. 2004).

1.4.3 Le récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2)

HER2 est un des quatre membres de la famille des facteurs de croissance épidermiques («epidermal growth factor receptor», EGFRs) et est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules épithéliales, mésenchymales, neuronales et cardiaques (Roskoski 2014). Environ 20% de tous les cancers du sein sont positifs pour la protéine HER2. Avant la découverte de la thérapie ciblant HER2, le pronostic relié aux cancers du sein HER2-positif était assez mauvais (Gonzalez-Angulo et al. 2009). Le développement de thérapies ciblant directement HER2, par exemple l'Herceptine, a révolutionné la façon de traiter les femmes affectées par ce type de cancer en augmentant de façon considérable leur chances de survie (Ahmed, Sami et Xiang 2015).

1.4.3.1 La signalisation de HER2

L'activation de HER2 permet le déclenchement d'un grand nombre de processus impliquant des kinases (Roskoski 2014). Ces voies de signalisation régulent plusieurs processus cellulaires importants tel que l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et la transcription génique (Roskoski 2014). Ainsi, les protéines kinases représentent une cible thérapeutique de choix puisque leur dérégulation se produit dans plusieurs affections, dont le cancer (Roskoski 2014).

1.4.3.2 L'enrichissement de HER2 dans le cancer du sein

L'activation de HER2 est associée à un grand pouvoir mitogénique (Atalay et al. 2003). Dans le cancer du sein, cet hétérodimère est la plupart du temps constitutivement actif (Atalay et al. 2003). En temps normal, HER2 est inactivé soit par dissociation du complexe récepteur-ligand, par déphosphorylation du récepteur ou par internalisation et dégradation par les lysosomes (Harari et Yarden 2000). Toutefois, lorsqu'il y a surexpression de HER2, dans près de 20% des cas, il y a amplification du gène (augmentation du nombre de copies) sur son chromosome, ce qui induit une surexpression génique et le temps de signalisation via les protéines kinases activées par les mitogènes (« mitogen-activated protein kinases », MAPKs) est significativement allongé. De plus, l'affinité de plusieurs ligands avec HER2 est augmentée et est accompagnée d'un recyclage accru à la membrane (Harari et Yarden 2000). Ces événements permettent donc

d'accroître l'activité de HER2 (Harari et Yarden 2000), faisant en sorte de favoriser la prolifération, la migration et l'invasion dans le cancer du sein (Yarden et Sliwkowski 2001).

1.4.4 Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR)

AhR est un facteur de transcription appartenant à une famille de protéines régulant les réponses rapides de l'organisme envers les changements dans l'environnement cellulaire (McIntosh, Hogenesch et Bradfield 2010). C'est un récepteur présent dans plusieurs tissus et il est impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques (Denison et al. 2011). Il est important dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'apoptose, l'immunité, le maintien des cellules souches, la neurogenèse, le métabolisme et plus encore (Safe, Lee et Jin 2013). Il a été suggéré que les nombreuses réponses cellulaires différentes induites par AhR sont potentiellement liées avec le nombre important d'interactions que fait ce récepteur avec des facteurs de transcription et d'autres voies de signalisation (Safe, Lee et Jin 2013). AhR est déjà connu comme ayant un rôle dans la cancérogenèse par induction de ligands exogènes, c'est-à dire que des molécules environnementales sont aptes à activer ce récepteur de la même manière que le ferait son ligand endogène (Feng, Cao et Wang 2013).

1.4.4.1 La signalisation d'AhR

AhR fait partie de la famille des protéines basique-hélice-boucle-hélice/PAS (« basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM », bHLH/PAS) (Feng, Cao et Wang 2013). Ce facteur de transcription se trouve dans le cytoplasme jusqu'à son activation, où il subira un changement de conformation afin de transloquer au noyau et d'exercer son rôle (Denison et al. 2011). Une fois dans le noyau, l'hétérodimère formé d'AhR et de son translocateur nucléaire (« AhR nuclear translocator », ARNT) interagit avec des co-régulateurs afin de remodeler la chromatine et ainsi rejoindre la séquence d'éléments de réponse des xénobiotiques (« xenobiotic response elements », XRE), située sur le promoteur des gènes cibles (Feng, Cao et Wang 2013). Une inhibition d'AhR est possible grâce au répresseur d'AhR (« aryl hydrocarbon receptor repressor », AHRR), dont l'expression est régulée par AhR lui-même (Denison et al. 2011).

Le ligand endogène d'AhR n'a toujours pas été identifié malgré les nombreuses années de recherche, faisant d'AhR un récepteur orphelin (Denison et al. 2011). Les ligands ayant le plus d'affinité avec AhR sont des contaminants environnementaux hydrophobes comme les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques

non-halogénés (HAPs) (Denison et al. 2011). Des ligands exogènes d'AhR sont aussi présents dans notre alimentation. Les flavonoïdes sont le groupe le plus important de ligands exogènes d'AhR retrouvés naturellement dans l'environnement (Denison et al. 2011)

1.4.4.2 AhR et le cancer

AhR étant connu pour être activé autant par des ligands endogènes qu'exogènes, il a surtout été étudié pour son rôle dans la toxicité et la cancérogenèse induites par les xénobiotiques (Feng, Cao et Wang 2013). Il est maintenant évident qu'en plus de réguler des enzymes de biotransformation de la phase I et II, qui contribuent au métabolisme et à la bioactivation de promutagènes et d'initiateur de tumeurs, AhR joue un rôle significatif autant dans la promotion que dans la progression du cancer (Diry et al. 2006). Les effets d'AhR sont principalement liés à son interaction avec les voies de signalisation de prolifération et d'inhibition de l'apoptose (Barouki, Coumoul et Fernandez-Salguero 2007). Par exemple, le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), un carcinogène ayant une grande affinité pour AhR, est connu pour favoriser de nombreux types de cancers comme le cancer du foie, du colon, de l'estomac, du poumon, du pancréas, etc. (Safe, Lee et Jin 2013)

1.5 Des structures potentiellement modulées par les perturbateurs endocriniens: les jonctions intercellulaires

Les jonctions intercellulaires sont présentes aux points de rencontre cellules-cellules de tous les tissus, et sont particulièrement nombreuses dans les tissus épithéliaux. Elles peuvent être classées selon trois groupes fonctionnels: les jonctions lacunaires, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (Alberts et al. 2002).

1.5.1 Les jonctions lacunaires

Les jonctions lacunaires (aussi appelées jonctions communicantes) sont formées de protéines nommées connexines (Cxs) (Figure 11). Les Cxs s'oligomérisent en hexamères, communément appelés des connexons, puis deux connexons de deux cellules adjacentes peuvent se lier l'un à l'autre afin de former un canal. Plusieurs canaux rassemblés formeront la plaque jonctionnelle, ou la jonction lacunaire (Goodenough, Goliger et Paul 1996). Ainsi, les jonctions lacunaires relient deux cellules adjacentes en permettant la communication intercellulaire directe d'une cellule à l'autre (Laird 2006). Les molécules échangées incluent les ions et les seconds

messagers tels le calcium et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Laird 2006). Vingt-et-une Cxs ont été découvertes chez l'humain. Toutefois, les canaux formés par différents types de Cxs ont des propriétés différentes, faisant en sorte que la perte d'une Cx est rarement compensée par une autre (Harris 2007).

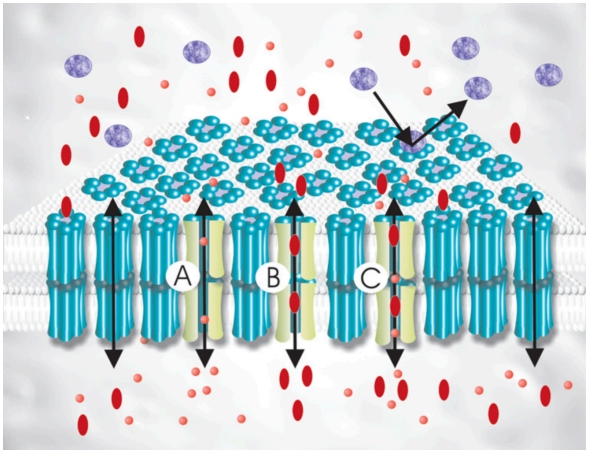


Figure 11: Diagramme schématique illustrant les propriétés trans-jonctionnelles sélectives des jonctions lacunaire dans la communication intercellulaire. Les jonctions communicantes sont perméables aux petites molécules (A), aux petites molécules avec une taille allongée (B) ou à ces deux types de molécules (C). La charge de la molécule gouverne ses propriétés perméables et la taille de la molécule ne peut généralement pas excéder 1kDa (violet) (Laird 2006).

Il est important de noter que les jonctions lacunaires sont présentes dans presque toutes les cellules de notre corps, incluant celles de la glande mammaire. Ces jonctions sont dynamiquement orchestrées au cours de la morphogenèse de cet organe, suggérant un rôle dans la régulation développementale (Wei, Xu et Lo 2004 ; Dianati et al. 2016b).

Pendant longtemps, nous avons pensé que seulement deux Cxs étaient présentes dans la glande mammaire humaine: Cx43 et Cx26. Il est bien établi que Cx43 est localisée principalement entre les cellules myoépithéliales. Pour sa part, Cx26 est surtout localisée entre les cellules luminales (Monaghan et al. 1996 ; Laird et al. 1999). Toutefois, de récentes études démontrent que les cellules luminales humaines expriment aussi les Cx32 et Cx30, comme il avait été démontré chez les rongeurs (Teleki et al. 2014).

Les Cxs et les jonctions communicantes ont longtemps été considérées comme des suppresseurs de tumeurs puisque leur expression est diminuée dans plusieurs tumeurs et qu'elles redonnent un phénotype plus épithélial à des cellules cancéreuses lorsqu'on les ré-exprime (Mesnil et al. 2005 ; Jamieson et al. 1998). Toutefois, des études récentes ont

démontré que les Cxs peuvent au contraire être surexprimées (Hirschi et al. 1996) dans certains cancers comme celui de type luminal ou à certains stades du cancer (Fu et al. 2015). Ces observations suggèrent que la régulations des Cxs dans le cancer serait contexte-dépendante (Laird 2010). Finalement, plusieurs études ont démontré que des polluants environnementaux peuvent promouvoir le cancer en dérégulant les Cxs ou la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires (« gap junctional intercellular communication », GJIC) (T. Forster et al. 2014 ; B. K. Lee, Chung et Lee 2015 ; Pointis et al. 2011). Par exemple, il a démontré qu'une exposition chronique à l'hexachlorobenzène, un cancérigène épigénétique, diminue l'expression de Cx43 dans la glande mammaire (Delisle, Ferraris et Plante 2015)(Annexe II).

1.5.2 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes facilitent l'adhésion des cellules entre elles grâce à l'attachement homodimérique des cadhérines de deux cellules adjacentes (Yeatman 2004). Les cadhérines sont liées à un complexe cytoplasmique permettant de relier la jonction au cytosquelette d'actine de la cellule (Figure 12). Ce complexe est formé de α-caténine, de β-caténine et de p120-caténine. La protéine c-SRC peut s'associer à ce complexe afin de réguler l'adhésion de E-cadhérine. Un autre contrôle est effectué par la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) qui a la capacité de déphosphoryler et d'activer c-SRC et ainsi de réguler l'adhérence cellulaire (Yeatman 2004). Les jonctions adhérentes vont s'assembler entre les cellules épithéliales afin de former une *zonula adherens*, juste en-dessous des jonctions serrées, qui seront discutées dans la prochaine section. Ces ceintures d'adhésion permettent aux cellules d'être bien attachées les unes avec les autres (Alberts et al. 2002).

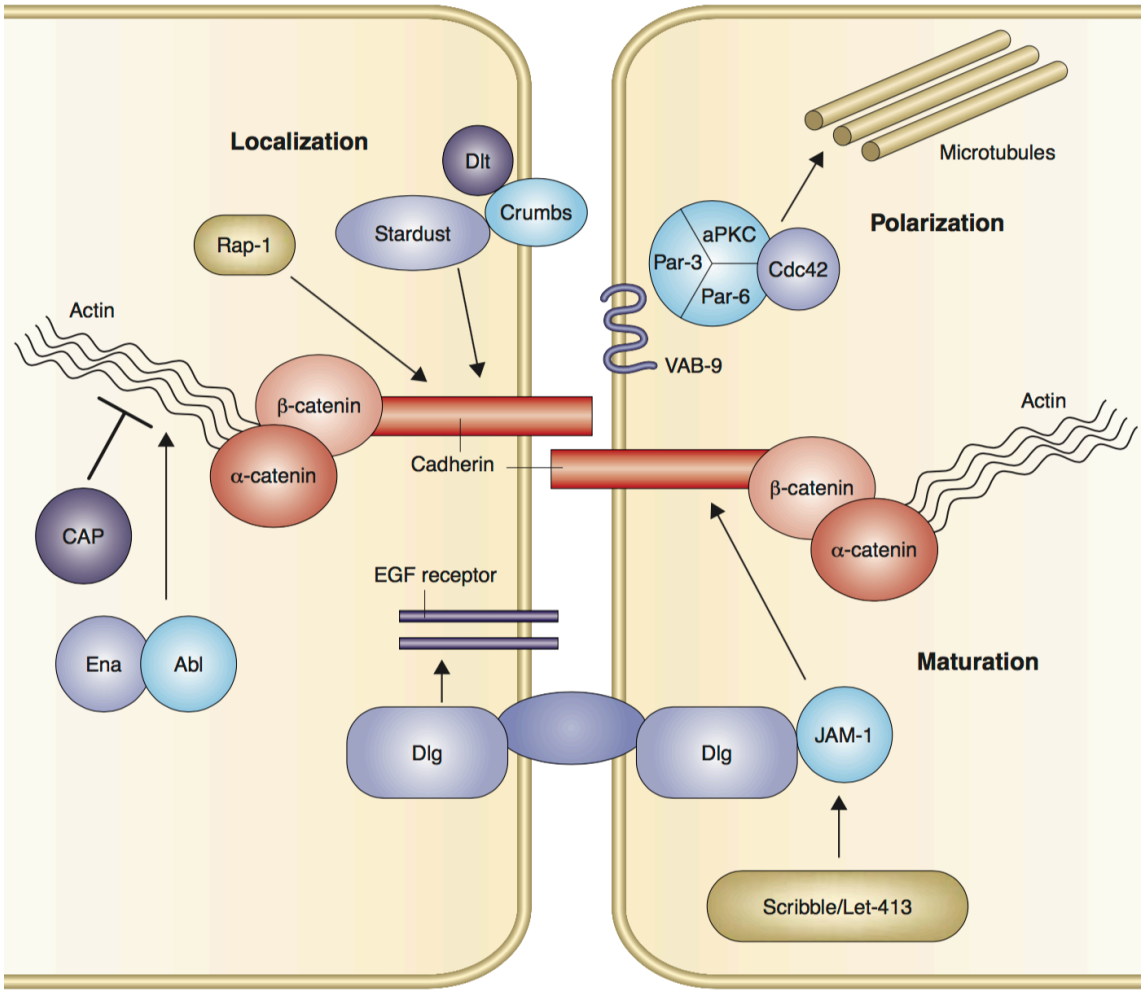


Figure 12: Schéma représentant la jonction permettant l'adhésion des cellules épithéliales: la jonctions adhérente (Braga et Harwood 2001)

Dans la glande mammaire, E-cadhérine est exprimé au niveau des cellules luminales, alors que les cellules myoépithéliales expriment P-cadhérine (Knudsen et Wheelock 2005). E-cadhérine est essentielle au bon fonctionnement de la glande mammaire. En effet, l'inhibition spécifique de E-cadhérine dans cet organe empêche une bonne production de lait, soit la fonction principale de la glande mammaire (Delmas et al. 1999). Plus spécifiquement, la perte de la fonction de E-cadhérine rend incomplète la différenciation des cellules luminales en lactocytes, ce qui fait en sorte que le lait ne peut plus être produit en quantité normale (Delmas et al. 1999). La perte des jonctions adhérentes affecte plus précisément la phase terminale de différenciation de la glande mammaire se préparant à la lactation (Boussadia et al. 2002)

Les cancers du sein sont parfois associés à une diminution de l'expression de E-cadhérine (Wendt et al. 2011 ; Zhang et al. 2015). Une inhibition de E-cadhérine est un des événements se

produisant lors de la TEM. Le changement de phénotypes cellulaires associé avec la TEM augmente le risque d'invasion et de formation de métastases et reflète un stade avancé de cancer (Thiery et al. 2009).

1.5.3 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées, aussi appelées *zona occludens,* sont d'importants membres du complexe jonctionnel. Ces jonctions font le pont entre le cytosquelette de deux cellules adjacentes au pôle apical des cellules. Le rôle principal des jonctions serrées est d'assurer un bon accolement des cellules, d'agir comme une barrière semi-perméable afin d'empêcher les ions et les petites molécules à passer du côté épithélial au côté endothélial (Stevenson et Keon 1998). Les jonctions serrées sont constituées de plusieurs protéines transmembranaires et cytoplasmiques distinctes dont entre autres l'occludine et les claudines (Furuse et al. 1998).

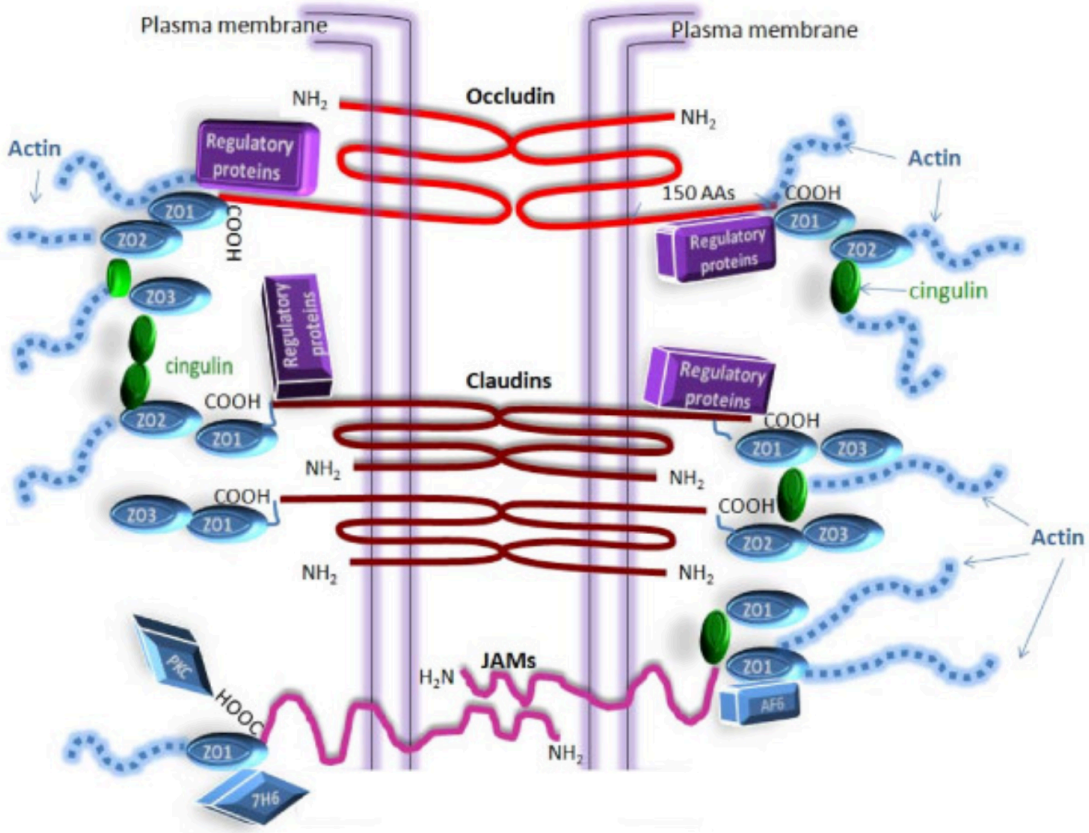


Figure 13: Illustration des principales protéines impliquées dans les jonctions serrées (*Tight junctions* 2011).

L'épithélium de la glande mammaire se distingue par ses fonctions de synthèse et de sécrétion du lait maternel. Pour que ce processus sécrétoire fonctionne, il est important qu'il y ait une bonne maintenance de différence de potentiel, se situant entre 30-35mV, entre le côté basolatéral (sang) et le côté apical (lait) (Berga 1984 ; Stelwagen et al. 1994). Les jonctions serrées ont un rôle clé dans la préservation de cet état polarisé. Une perte de l'intégrité de ces jonctions pendant l'allaitement a été liée à une réduction de sécrétion de lait et à la présence de sang dans le lait maternel, et vice versa (Hogeveen et al. 2001).

Dans le cancer, il a été démontré que les jonctions serrées jouent un rôle dans la prévention de la progression du cancer du sein. En effet, une altération de ces jonctions contribue à la perte de la polarité des cellules et à des problèmes d'inhibition de contact (Itoh et Bissell 2003). Les cellules épithéliales voulant toujours être en contact avec d'autres cellules autour d'elles, elles vont palier à ce manque de contact en proliférant davantage (Itoh et Bissell 2003). De plus, il a été démontré qu'une perte des jonctions serrées pouvait augmenter le rythme de la progression du cancer du sein puisque cela donne un avantage aux cellules tumorales qui peuvent s'échapper du tissu d'origine et favoriser les métastases (McSherry et al. 2007).

1.6 Un modulateur potentiel des jonctions intercellulaires, de la prolifération cellulaire et de l'équilibre hormonal: le diéthyhexylphtalate (DEHP)

Les phtalates sont des plastifiants largement utilisés de nos jours et sont ajoutés aux emballages de nourriture, au matériel médical, aux jouets, aux adhésifs, aux cosmétiques, aux accessoires de sports, à la peinture, etc (Chen et Chien 2014). Leur rôle est de rendre les produits plus souples et plus durables (Mankidy et al. 2013). Les phtalates ajoutés aux polymères ne sont, par contre, pas liés de façon covalente, ce qui a comme conséquence qu'ils sont facilement détachables de leur matrice (Fromme et al. 2013). Ceci fait en sorte que notre exposition est considérée comme chronique, c'est à dire que nous y sommes exposés de manière continue, contrairement à une exposition aigue qui se définit comme étant unique et de courte durée (Mankidy et al. 2013). Les phtalates représentent une production mondiale annuelle d'environ 3 tonnes, dont 54% consiste en du DEHP. C'est donc celui qu'on retrouve en plus grande quantité dans notre environnement (*Market Study: Plasticizers (3rd edition)* 2013).

Chez les humains, le DEHP a été détecté dans plusieurs matrices incluant le sang, l'urine, la salive, le liquide amniotique, le lait maternel et le sang de cordon (Latini et al. 2003). La voie d'exposition majeure à ce contaminant environnemental est sans aucun doute la voie orale,

mais nous sommes tout de même exposés par inhalation et par absorption cutanée (Adibi et al. 2003). Les enfants sont généralement les plus exposés, d'abord puisqu'ils amènent beaucoup de jouets et d'objets à bouche, mais aussi parce que le ratio nourriture ingérée/poids corporel est élevé à cet âge (Mankidy et al. 2013).

Le DEHP est un perturbateur endocrinien ayant été relié à plusieurs problèmes de santé. Plusieurs études ont démontré un effet anti-androgénique sur la reproduction masculine se traduisant par une diminution du compte spermatique et des altérations à l'ADN des spermatozoïdes (Wang et al. 2015 ; Rozati et al. 2002 ; Desdoits-Lethimonier et al. 2012). D'autres études ont démontré que certains phtalates devancent la puberté chez la fille (Wolff et al. 2010) et occasionnent des anomalies au système reproducteur mâle (Desdoits-Lethimonier et al. 2012). Le DEHP a aussi un effet sur le développement de désordres métaboliques tel que l'obésité (J. H. Kim et al. 2016), l'asthme et les problèmes respiratoires (Shin et al. 2014).

Les mécanismes d'actions de ces contaminants environnementaux ne sont toujours pas bien établis et la cible précise du DEHP est encore méconnue. Par contre, de plus en plus d'études font un lien entre l'exposition à certains phtalates et l'augmentation de marqueurs reliés au métabolisme lipidique (Dimastrogiovanni et al. 2015 ; Hao et al. 2012 ; K. I. Lee et al. 2015 ; Schmidt 2012).

1.6.1 Le métabolisme du DEHP

Une fois entré dans l'organisme, une partie du DEHP ($C_{24}H_{38}O_4$) subit une première hydrolyse dans l'estomac grâce aux lipases présentes à cet endroit. C'est à ce moment qu'une première portion de monoéthylhexylphtalate (mEHP, $C_{16}H_{22}O_4$) est produite et peut être libérée, et mesurée, dans le sang (Carriere et al. 1993). Lors d'ingestion, le temps d'absorption de ce composé est dépendant du métabolisme de tous et chacun. Cela implique plusieurs facteurs dont le temps de vidange gastrique et le péristaltisme intestinal. Les lipases intestinales continueront à hydrolyser le DEHP dans les intestins. Les autres voies d'entrée mènent le DEHP à la circulation sanguine et ensuite au foie où il est métabolisé (Kessler et al. 2012).

Le mEHP peut aussi subir des oxydations subséquentes, afin de pouvoir être bien éliminé par l'organisme (Figure 14). Ce processus occasionne la formation de trois principaux métabolites secondaires: le 6-OH-mEHP, le 5-OH-mEHP et le 5-oxo-mEHP (Testa et al. 2012). Toute forme de métabolites peut aussi subir une glucuronidation, soit l'addition d'acides glucuroniques activés sous forme de d'UDP-acide glucuronique par la glucuronyl-transférase. Cette réaction de

conjugaison favorise la solubilisation des molécules hydrophobes et ainsi son élimination par l'urine (Testa et al. 2012). Le mEHP ou ses métabolites secondaires sont retrouvés dans l'urine en moyenne 22 heures suite à l'administration du DEHP (Kessler et al. 2012).

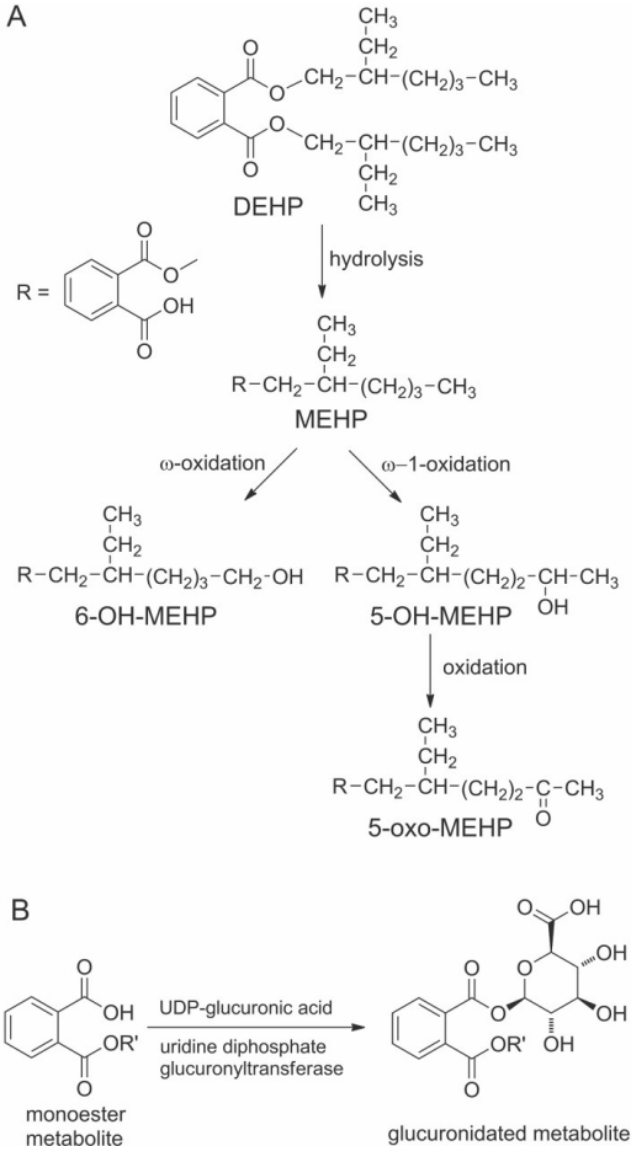


Figure 14: Schéma du métabolisme du diéthylhexylphtalate. Le DEHP subit d'abord une voie hydrolytique afin d'être converti en mEHP, qui peut ensuite être oxydé afin de former un métabolite secondaire (A). Ensuite, il peut y avoir formation de conjugués glucuroniques à partir des métabolites du DEHP (B) (Testa et al. 2012).

Le DEHP est déjà considéré comme un perturbateur endocrinien (Martinez-Arguelles et Papadopoulos 2015 ; Hao et al. 2012 ; Herreros et al. 2013). De plus, ses métabolites peuvent eux aussi occasionner des effets néfastes dans des processus importants tels la puberté et le

métabolisme des lipides (C. Y. Chen et al. 2013 ; Hao et al. 2012 ; S. Kim et al. 2015). Toutefois, la voie de signalisation et les mécanismes d'actions en lien avec la toxicité des phtalates restent encore à être élucidés.

Le DEHP et son métabolite sont biodistribués jusqu'à la glande mammaire. Des concentrations d'en moyenne 6 nM de DEHP et 9 nM de mEHP sont retrouvées dans le lait maternel humain (Zimmermann et al. 2012 ; S. Kim et al. 2015). Dans le même ordre d'idées, des concentrations semblables sont mesurées dans le tissu adipeux, tissu qui constitue une grande partie de la glande mammaire (Johns et al. 2015).

1.6.2 Études épidémiologiques

Il est aujourd'hui bien établi que nous sommes exposés de manière chronique au DEHP. Il a été établi que la dose journalière de DEHP à laquelle nous sommes exposés est en moyenne de 20µg/kg/jour pour les adultes, tandis que les enfants sont pour leur part exposés à des niveaux entre 21-25µg/kg/jour. Toutefois, les nouveau-né prématurés et hospitalisés sont ceux qui sont le plus exposés au DEHP avec une moyenne de 1780µg/kg/jour, soit une exposition de presque 100 fois celle de l'adulte (Koch, Preuss et Angerer 2006). Ils y sont exposés surtout par l'intermédiaire du matériel médical comme entre autres les sacs de fluides. De plus, il a été démontré que la majorité des individus présentent des niveaux détectables de métabolites de DEHP dans leurs urines (Martino-Andrade et Chahoud 2010).

D'un point de vue pathologique, des niveaux élevés de mEHP dans l'urine des femmes enceintes ont été corrélés avec un risque plus élevé de cryptorchidisme et de développement génital problématique chez la descendance masculine (Martino-Andrade et Chahoud 2010 ; Suzuki et al. 2012). Il a aussi été démontré que les garçons pubaires présentant une gynécomastie (hypertrophie mammaire) avaient des taux de mEHP urinaires plus grands que le groupe témoin (Durmaz et al. 2010). Des études épidémiologiques récentes ont démontré que les phtalates ont également un effet sur l'augmentation de marqueurs reliés à l'obésité et l'augmentation du poids des nouveaux-nés (S. Kim et al. 2015).

1.6.3 Le DEHP lie de nombreux récepteurs influençant la biologie des cellules de la glande mammaire

Malgré le fait que les cibles exactes du DEHP ne soient pas encore connues, il est maintenant clairement établi que le DEHP et son métabolite peuvent moduler les fonction normales des

cellules de la glande mammaire. Pendant que certains chercheurs démontrent que le DEHP a une activité estrogénique (Buteau-Lozano et al. 2008 ; Moyer et Hixon 2012) ou anti-androgénique (Wang et al. 2015 ; Desdoits-Lethimonier et al. 2012), d'autres démontrent plutôt que le DEHP se lie au PPAR dans la glande mammaire (Venkata et al. 2006 ; Ma et al. 2011). Dans la plupart des cas, les effets observés sont une augmentation du poids corporel, un débalancement hormonal, une puberté précoce, l'infertilité et l'apparition de tumeurs.

1.6.4 Le DEHP peut perturber les jonctions intercellulaires

Selon la littérature, le DEHP aurait la capacité de moduler l'expression de certaines protéines jonctionnelles adhérentes. Plus spécifiquement, le DEHP aurait la capacité d'induire la TEM dans plusieurs tissus (Oral et al. 2016). De plus, il a été démontré que le DEHP peut diminuer l'expression protéique des jonctions lacunaires dans le testicule du rat sans pour autant avoir un effet sur les jonctions serrées (Sobarzo et al. 2009).

1.6.5 Le DEHP et le mEHP et l'augmentation de la prolifération cellulaire

Il a été démontré que le DEHP peut induire la prolifération de cellules dans différents tissus. C'est entre autres le cas des hépatocytes (X. Chen et al. 2013), des cellules de glioblastomes (Sims et al. 2014) et des cellules endométriales (Y. H. Kim et al. 2010). Peu d'études ont investigué l'effet des phtalates sur la glande mammaire, mais il a été démontré qu'une exposition à des niveaux environnementaux (nM) de DEHP avait un effet significatif sur l'augmentation de la viabilité et de la prolifération des cellules MCF-7, une lignée cellulaire épithéliale cancéreuse (Chen et Chien 2014). À des concentrations un peu plus élevées, quelques études ont aussi démontré que le DEHP pouvait inhiber l'apoptose et favoriser la prolifération *in vitro* chez les cellules MCF-7 (Okubo 2003 ; I. Y. Kim, Han et Moon 2004). *In vivo,* il a été démontré qu'à des concentrations de 1 000mg/kg de mEHP, les glandes mammaires des souris F1 (exposées *in utero*) présentent de l'hyperplasie à l'âge d'un an, démontrant qu'une exposition périnatale aux phtalates peut avoir des conséquences sur l'organisme à l'âge adulte (Moyer et Hixon 2012). Les glandes mammaires de ces souris présentent une augmentation de l'embranchement des canaux et la présence de nodules hyperplasiques (Moyer et Hixon 2012).

1.7 Problématique

L'impact du DEHP et de son métabolite sur la biologie des cellules du sein normales et cancéreuses, incluant notamment la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que l'expression et l'intégrité structurelle et fonctionnelle des protéines des jonctions intercellulaires, n'est pas bien comprise. Très peu d'études ont été réalisées afin d'étudier l'effet de l'exposition chronique aux phtalates et les changements que cela pouvaient occasionner dans le développement de la glande mammaire et dans la cancérogenèse de cet organe. L'élucidation de ces questions permettra entre autres de mieux réglementer l'utilisation manufacturière des phtalates et de permettre une meilleure prévention.

Rationnelle et hypothèse de travail

D'une part, il est connu que l'activation de divers récepteurs dont plusieurs sont nucléaires par des perturbateurs endocriniens peut induire la prolifération de plusieurs types de cellules mammaires, saines et cancéreuses. L'un de ces perturbateurs, le DEHP, peut notamment augmenter la prolifération des cellules du cancer du sein. Le DEHP peut lier plusieurs récepteurs influençant la biologie des cellules mammaires, dont PR, ER et PPAR. D'autre part, des changements dans l'expression de protéines jonctionnelles peuvent occasionner, ou être liés à, un débalancement dans l'équilibre cellulaire pouvant contribuer à la transformation néoplasique. Le DEHP fait partie des molécules perturbant l'intégrité des jonctions intercellulaires. L'hypothèse en lien avec ce projet est donc qu'une exposition au DEHP ou à son métabolite pourrait altérer la signalisation cellulaire normale et modifier l'expression génique dans des cellules épithéliales de la glande mammaire engendrant des perturbations dans l'homéostasie cellulaire et favorisant l'apparition de cancers du sein.

Objectifs

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'impact de l'exposition au DEHP et à son métabolite, le mEHP, sur deux lignées cellulaires épithéliales mammaires, une saine et une cancéreuse. Plus spécifiquement, ce projet a pour but de déterminer dans ces cellules les effets du DEHP et du mEHP 1) sur les caractéristiques tumorigéniques (prolifération cellulaire, apoptose, jonctions intercellulaires et l'expression de récepteurs associés avec le cancer du sein) et 2) si PR et PPAR sont impliqués dans les mécanismes de toxicité.

CHAPITRE 2: AN EXPOSURE TO DIETHYLHEXYLPHTHALATE (DEHP) INCREASES PROLIFERATION AND TRIGGERS THE NUCLEAR TRANSLOCATION OF THE PROGESTERONE RECEPTOR IN EPITHELIAL BREAST CELLS

Traduction du titre en français: Une exposition au diéthylhexylphtalate (DEHP) augmente la prolifération et déclenche la translocation nucléaire du récepteur à la progestérone chez les cellules épithéliales mammaires

Version non-finale

2.1 Présentation des auteurs

2.1.1 Auteurs

Emanuelle Ferraris, étudiante à la maîtrise en sciences expérimentales de la santé, INRS-Institut Armand-Frappier

Elise Kolasa, stagiaire postdoctorale, INRS-Institut Armand-Frappier

Isabelle Plante, directrice de recherche, INRS-Institut Armand-Frappier

2.1.2 Contributions des auteurs

Toutes les expériences et analyses contribuant au développement de cet article ont été réalisées par la première auteure, Emanuelle Ferraris. Elise Kolasa a contribué au succès des expériences par ses conseils et son expertise autant au plan pratique que théorique. L'article a été rédigé par Emanuelle Ferraris, en collaboration avec sa directrice de recherche Isabelle Plante, qui a aussi dirigé et supervisé l'avancement du projet de recherche.

2.2 Résumé de l'article

Le diéthylhexylphtalate (DEHP) est un plastifiant largement utilisé dans les produits de consommation tels que les contenants de nourriture, les bouteilles de plastiques, les cosmétiques, le matériel médical, l'électronique et les jouets. Le DEHP ne forme pas de liens covalents avec sa matrice, faisant en sorte qu'il est graduellement relâché, résultant en une exposition chronique pour les humains. Le DEHP est déjà reconnu comme un perturbateur endocrinien, mais les mécanismes impliqués dans sa toxicité sont peu compris. L'objectif de

cette étude était de déterminer les effets d'une exposition au DEHP et au monoéthylhexylphtalate (mEHP), son métabolite, sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires et sur les marqueurs impliqués dans la cancérogenèse mammaire. Pour se faire, deux lignées cellulaires ont été utilisées: les cellules T-47D et hTERT-HME1, une lignée tumorigénique et non-tumorigénique. Les cellules ont été exposées à des doses de DEHP et de mEHP entre 0,01 et 10 000nM pour 5-7 jours. Les résultats démontrent que des expositions à 10 000nM de DEHP et à 0,1nM de mEHP augmentent significativement la prolifération des cellules T-47D, sans affecter les cellules hTERT-HME1. Les protéines jonctionnelles n'ont pas été affectées par les phtalates tandis qu'une augmentation significative de l'expression protéique du récepteur à la progestérone (PR) a été mesurée, en plus de sa translocation nucléaire chez les cellules T-47D exposées à 10 000nM de DEHP. De plus, une exposition au mEHP cause une augmentation de l'expression de la vimentine chez les cellules hTERT-HME1. Une exposition au DEHP et au mEHP pourrait augmenter les risques de développer un cancer du sein, autant par l'augmentation de la prolifération cellulaire que par l'activation de PR. Le lien entre la translocation nucléaire de PR et l'augmentation de la prolifération cellulaire reste à être élucidée.

2.3 Article

An Exposure to Diethyhexylphthalate (DEHP) Increases Proliferation and Triggers the Nuclear Translocation of the Progesterone Receptor in Epithelial Breast Cells

Emanuelle Ferraris[1], Elise Kolasa[1] and Isabelle Plante[1,2]
1 : INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec

2 : For correspondence : Isabelle Plante
INRS-Institut Armand-Frappier
531 boul. des Prairies
Laval, QC
H7V 1B7
isabelle.plante@iaf.inrs.ca

Keywords: diethylhexylphthalate (DEHP); monoethylhexylphthalate (mEHP); endocrine disruptors; mammary gland; proliferation; junctions; progesterone

2.3.1 Abstract

The diethylhexylphthalate (DEHP) is a plasticizer widely used in consumer products, such as food containers, plastic bottles, cosmetics, medical devices, electronics and toys. Because DEHP does not form covalent bounds with plastic matrices, it is gradually released from these products, resulting in a chronic exposure for humans. Although DEHP is generally recognized as an endocrine disruptor, mechanisms implicated in its toxicity are yet poorly understood. Our objectives were to determine the effects of an exposure to DEHP and to its metabolite, the monoethylhexylphthalate (mEHP), on breast cells proliferation and on markers involved in breast carcinogenesis. Two cells lines were used: T-47D and hTERT-HME1 cells, a tumorigenic and a non-tumorigenic cell line, respectively. Cells were exposed to environmentally relevant and higher doses of DEHP and mEHP (0.01 to 10 000 nM) for 5 days. Ours results showed that an exposure to 10 000 nM of DEHP and 0.1 nM of mEHP significantly increased cell proliferation in T-47D cells, without affecting hTERT-HME1 cells. The levels and localization of junctional proteins were not changed in the two cell lines exposed to phthalates. However, a significative increase in the progesterone receptor (PR) protein expression and of its translocation into the nucleus were observed in T-47D cells exposed to 10 000 nM of DEHP. In addition, exposure to mEHP resulted in increased expression of vimentin. These results suggest that a DEHP and mEHP exposure could potentially increase the risks to develop breast cancer by increasing tumorigenic characteristics of breast cells. Whether or not the nuclear translocation of PR is linked to the increased proliferation in T-47D cells remains to be elucidated.

2.3.2 Introduction

Despite advances in diagnosis and treatment, breast cancer remains a major public health problem and cause of death for women worldwide (*GLOBOCAN* 2012). While the causes of breast cancer are pleomorphic and mostly unknown, it is generally admitted that 70-90% of all cancers are linked to behavioral, dietary and environmental factors (Doll et Peto 1981). Over the years, studies have demonstrated that breast cancer rates are typically higher in industrialized countries compared to emergent or third world countries (Pfeifer 2015). Interestingly, women who move from countries with low rates of risk to industrialized countries “acquire” the higher risk associated with their new country, especially if they migrate at a younger age (Maskarinec et Noh 2004). It suggests that living in an industrialized environment increases the risk of breast cancer.

Breast cancer is a heterogeneous disease encompassing multiple subtypes with different molecular characteristics, prognoses and responses to therapies. Tumors are generally divided into at least four major molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2-overexpressing and triple-negative subtypes (Barnard, Boeke et Tamimi 2015); Luminal A and luminal B subtypes being the most common. This classification is based mainly on the presence/absence of molecular markers such as the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR) and the human epidermal receptor 2 (HER2) (Komen 2015). These receptors allow, among other things, the activation of signaling pathways implicated in cell proliferation, in the control of the cell cycle and in apoptosis (Brisken et O'Malley 2010). Hormonal imbalances and over-activation of those receptors are associated with development of breast cancer (Brisken et O'Malley 2010 ; Fenton et Birnbaum 2015).

Endocrine disruptors are defined as chemicals that interfere with the body's endocrine system and produce adverse developmental, reproductive, neurological, and immune effects. Phthalates are widely used plasticizers found in a lot of costumer's products nowadays, and some are considered as endocrine disruptors (Chen et Chien 2014). These plasticizers are added to plastic matrices to render them more flexible and sustainable (Mankidy et al. 2013). Among the family, Diethylhxylphthalate (DEHP) is the most produced and thus more abundant in our environment (*Market Study: Plasticizers (3rd edition)* 2013). Once ingested, DEHP is metabolized to monoethylhexylphthalate (mEHP) (Kessler et al. 2012). Both DEHP and mEHP have been found in a variety of human tissues and fluids, including breast and breast milk (Latini et al. 2003). Exposure to DEHP have been linked with many health issues such as infertility, premature puberty and obesity (Wang et al. 2015 ; Rozati et al. 2002 ; Wolff et al. 2010 ; J. H. Kim et al. 2016). However, mechanisms of actions of phthalates still have to be elucidated.

Cell-cell interactions are required for the proper development of the mammary gland, and dysregulation of these interactions has been linked to breast cancer (Bissell et al., 1999, Brisken et al., 2010, Hinck et al., 2005). Gap junctions (GJ) are specialized transmembrane channels which allow direct communication between adjacent cells (El-Saghir et al., 2011). They are made of a family of proteins named connexins (Cxs). Cx26 and Cx43 are expressed in human breast (McLachlan et al., 2007). Dysregulation of Cxs has been associated with delayed development and impaired function of mammary gland, as well as increased breast carcinogenesis (Naus et al., 2010; Plante et al., 2011; Plante and Laird, 2008). GJ are also found in association with adherens junctions, which mediate cell-cell adhesion in epithelial cells (Dianati et al. 2016a). Adherens junctions are made of transmembrane proteins, the cadherins,

and cytoplasmic proteins, the catenins (Lien et al., 2006). Down-regulation of E-cadherin is one of the hallmarks of the epithelial to mesenchymal transition (EMT), a process by which epithelial cells acquire mesenchymal characteristics that enable them to migrate towards surrounding tissues (Eger et al., 2000). EMT causes the epithelial cells to lose their polarity and helps them to gain motility during breast cancer progression (Kalluri et al., 2003). Interestingly, some environmental pollutant can disrupt cell-cell interactions, thus promoting cancer (Delisle, Ferraris et Plante 2015 ; Plante, Charbonneau et Cyr 2002 ; Chipman, Mally et Edwards 2003).

This study aimed to evaluate the impact of DEHP and mEHP exposures on epithelial breast cells. More specifically, the goal were to assess the effects of DEHP and mEHP on 1) cell proliferation; 2) cell-cell junctions and 3) receptors associated with breast cancer.

2.3.3 Materials and methods

2.3.3.1 Compounds

Plasticizers were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO) (diethylhexylphthalate D201154, purity > 99.5 % and from Chromatographic Specialties Inc (Brockville, ON) (monoethylhexylphthalate AALR138SCN 100µg/mL) and were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) as 10 mM stock solutions.

2.3.3.2 Cell culture

T-47D and hTERT-HME1 cells were obtained from the American Type Culture Collection. T-47D were grown in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) without phenol red, supplemented with 10% of foetal bovine serum and 0.2 Units/ml of bovine insulin. hTERT-HME1 were grown in mammary epithelial base medium (MEBM) supplemented with 0.4% Bovine Pituitary Extract, 0.1% of hEGF, 0.1% of insulin, 0.1% of hydrocortisone and 0.1% of GA-1000 (Gentamicin and Amphotericin) (Lonza/Clonetics Corporation). All cells were kept in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C and used for a maximum of 10 passages.

2.3.3.3 DEHP/mEHP exposures

Treatments were initiated on subconfluent cell cultures (24 h after plating) by the addition of media containing 0.1% (v/v) DMSO as a vehicle, 0.01 to 10 000 nM of DEHP or nM mEHP in

DMSO. Cells were treated for 5 days and the media was changed every day. T-47D cells were starved with 2% stripped-foetal bovine serum 1 week before treatments.

2.3.3.4 Assessment of cell proliferation and viability in real-time using xCELLigence technology

Cell proliferation and viability were measured quantitatively and in real-time using an xCELLigence™ RTCA DP instrument (ACEA Biosciences). The cell index, which represents the number of cells in a specific well, is measured by the changes in impedance detected by gold electrode microarrays at the bottom of each well. The cell impedance was measured every 10 min during a 7 day period using the ACEA Biosciences RTCA software program (version 2,0).

2.3.3.5 Apoptosis analysis of T47-D cells by annexin V/PI in flow cytometry

Cells were treated with DEHP and mEHP for 5 days and then harvested (pooled with floating cells in media), centrifuged and stained with propidium iodide (PI) and FITC annexin V with the Dead Cells Apoptosis kit following the manufacturer's recommendations (#V13242, Molecular probes, OR, USA). Cells were analysed for DNA content by flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The percentage of cells in each quadrant was determined by Cell Quest Pro software (Becton Dickinson). Cells challenged with 1µM of staurosporine for 24 hours were used as a positive control.

2.3.3.6 Western blot analysis

Cell monolayers were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) before the addition of lysis buffer (pH: 8) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate) that was supplemented with NaF 1.25 M, $NaVO_3$ 1M and Halt Protease and Phosphatase Cocktail Inhibitor (Fisher Scientific). Cells were scraped, collected and incubated on ice for 5 min. Cells lysates were centrifuged for 10 min at 2500 rpm at 4 °C. The supernatants were aliquoted and stored at 80 °C until further processing. Lysate protein concentrations were measured using the Bicinchoninic acid protein assay reagent kit (Thermo scientific #23227). Protein samples (20µg) were resolved on stain-free acrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 10%, Bio-Rad, Mississauga, On) and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1 % Tween 20 containing 3 % bovine serum albumin (BSA) and incubated overnight at 4°C with

primary antibodies: anti-AhR 1/1000 (sc-133088, Santa Cruz, Dallas, TX), anti-PR A/B 1/1000 (#16661, Abcam, Cambridge, MA), anti-β-catenin 1/1000 (#8840), anti-E-Cadherin 1/1000 (#3195), anti-HER2 1/1000 (#2165), anti-p-HER2 1/1000 (#2243), anti-Vimentin 1/1000 (#5741) (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and anti-Cx43 1/4000 (C6219, Sigma-Aldrich, Oakville, On). Bound primary antibody was detected using HRP-conjugated secondary antibodies (goat-anti-rabbit 1/10 000 (#7074); horse-anti-mouse 1/10 000 (#7076) (Cell Signaling Technology) followed by visualization and quantification using the Bio-Rad ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories). Chemiluminescent signals were detected using the Clarity western ECL substrate (Bio-Rad Laboratories). Protein levels were normalized on total lane loading using stain-free technology (Bio-Rad Laboratories) and analyzed using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

2.3.3.7 Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips and fixed with ice-cold 80% methanol/20% acetone before being blocked with PBS containing 2% BSA and 0.1% Triton. Cells were then immunolabeled with primary antibodies: anti-PR 1/1000 (#16661, Abcam, Cambridge, MA), anti-E-Cadherin (Alexa Fluor 555-conjugated (#4295) 1/50 and anti-β-Catenin 1/200 (#2677) (Cell Signaling Technology). After being washed, cells were exposed to appropriate secondary antibodies: Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse 1/1000 (#4409, Cell Signaling Technology) and Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit 1/1000 (#A10042, Life Technologies). DAPI staining was used to visualize nuclei prior to mounting with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, Al). Immunofluorescence images were obtained with a Nikon A1R+ confocal microscopic laser equipped with a spectral detector and analyzed using NIS-elements software (version 4).

2.3.3.8 Statistical analysis and n-values

All *in vitro* experiments were repeated 3 to 5 times with different cell passages and were independently processed. Values are presented as the mean ± SEM. Data were analyzed using ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test when conditions of applications were respected. Otherwise, a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test were used. $p<0.05$ was considered significant. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism version 6.0 for Mac (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

2.3.4 Results

2.3.4.1 A 5 days exposure to DEHP and mEHP increases cell proliferation of T-47D but does not affect hTERT-HME1 cells.

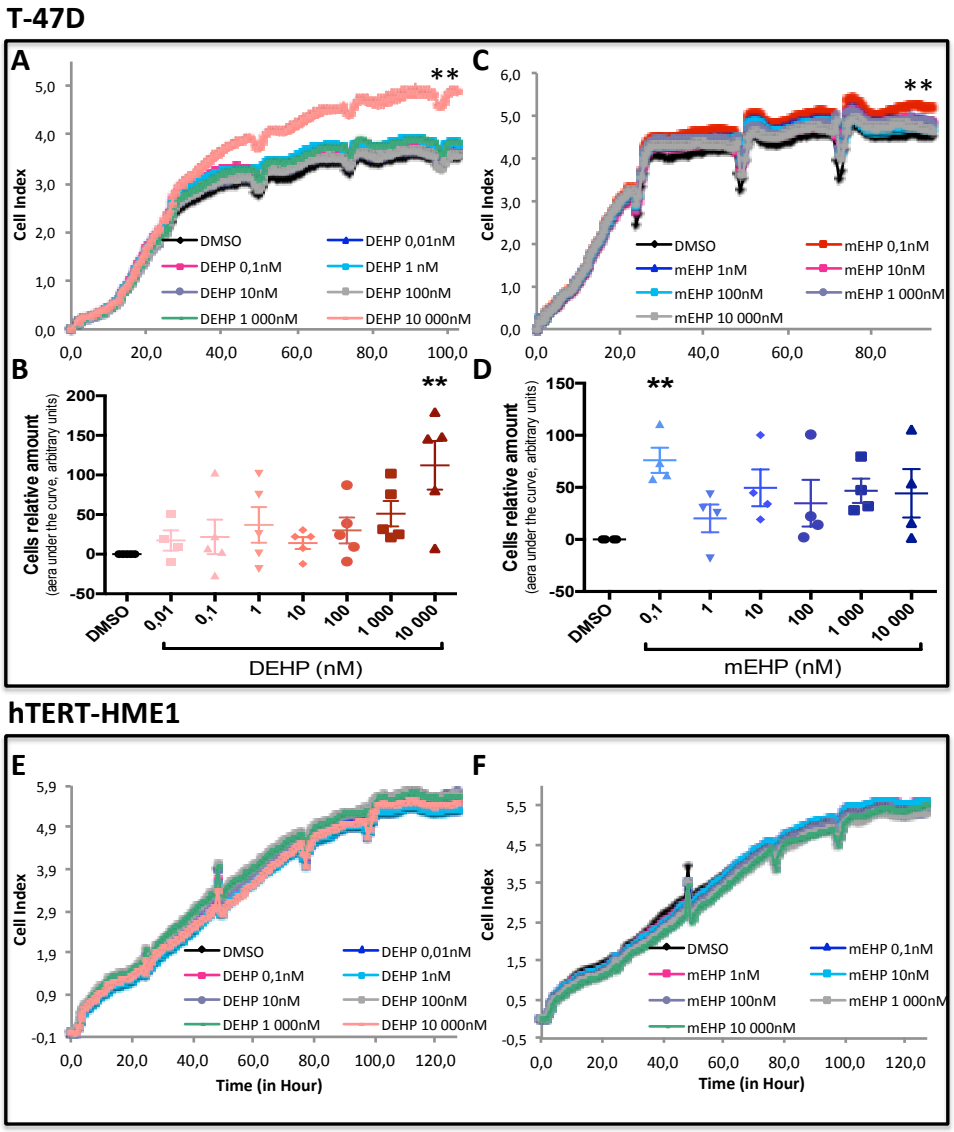


Figure 1: A five-day exposure to DEHP and mEHP increases cell proliferation of T-47D but does not affect hTERT-HME1 cells. T47D and hTERT-HME1 cells were exposed to doses of DEHP ranging from 0.01 to 10 000 nM or to 0.1 and 10 000 nM of mEHP for 5 days. T47D **(A,C)** and hTERT-HME1 **(E,F)** proliferation was assessed in real-time using the xCELLigence system. Control was set up as baseline, and area under the curve was determined for the T-47D cells (**B,D).** Graphs represent means of 4-5 different experiments (Means ± SEM). Kruskal-Wallis test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

In order to assess proliferative effects of environmentally relevant and higher doses of DEHP and mEHP on mammary gland epithelial cells, T-47D and hTERT-HME1 cells were exposed for a period of 5 days (Figure 1). The cell index was measured in real time using the xCELLigence RTCA technology and the E-plate system. While an increase in proliferation was observed for T-47D cells at all doses tested for both DEHP and mEHP, it reached significance only at 10 000 nM and 0.1 nM for DEHP and mEHP, respectively (Figure 1 A-D). No impacts on the proliferation were observed for hTERT-HME1 cells (Figure 1 E,F).

2.3.4.2 An exposure to DEHP and mEHP does not influence apoptosis in T47D and hTERT-HME1 cells

To determine whether DEHP and mEHP exposures can reduce apoptosis and verify that the treatment was not toxic for the cells, apoptosis was assessed in cell exposed to phthalates (Figure 2). Western blot analysis showed that in cells exposed to 1µM of staurosporine for 24 hours, a positive control for apoptosis, there was an increase in the levels of cleaved-PARP as compared to DMSO-treated cells for both T-47D and hTERT-HME1 cells (Figure 2A, B). While in hTERT-HME1 cells there was no evidence of PARP cleavage in both control and DEHP- or mEHP-treated cells, a band for cleaved-PARP was observed in T-47D cells for all conditions, but was not significantly increased by DEHP and mEHP treatments (Figure 2A). To further confirm that apoptosis was not affected by exposure to the phthalates, T-47D cells were stained with Annexin V and propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry. A significant increase of cells positive for Annexin V and PI was observed in cell treated with staurosporine (Supplementary figure 1). Similar to the previous results, T-47D cells positive for both Annexin 5 and PI were observed in all condition, but there was no difference in the percentage of Annexin V or PI positive cells between the control cells and the cells exposed to DEHP and mEHP (Figure 2C).

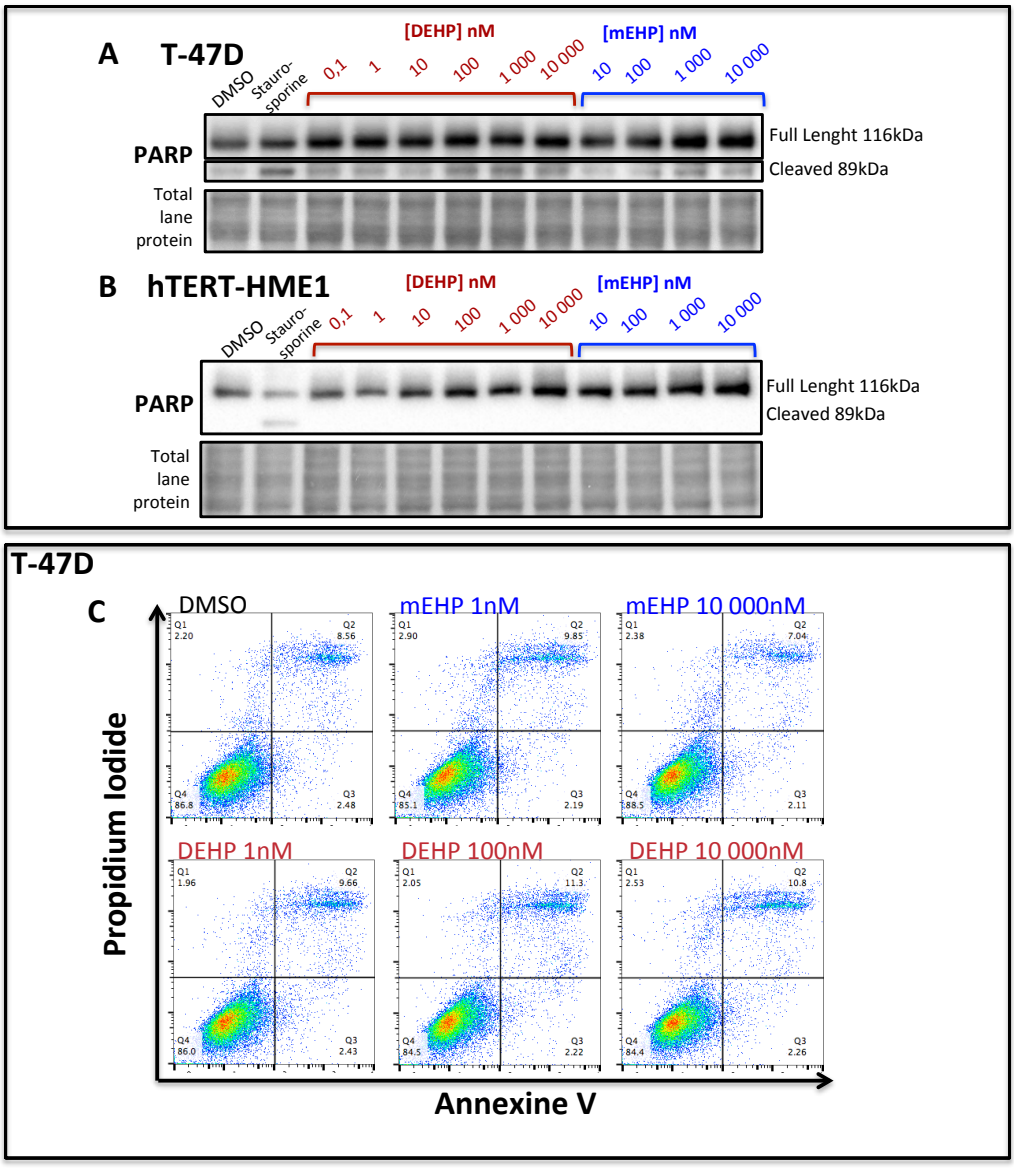


Figure 2: Environmental exposure to DEHP and mEHP does not trigger apoptosis in T-47D and hTERT-HME1 cells. T-47D and hTERT-HME1 cells were exposed to doses of DEHP ranging from 0.01 to 10 000 nM or to 0.1 and 10 000 nM of mEHP for 5 days. **(A, B)** T-47D **(A)** and hTERT-HME1 **(B)** cells were lysed and total protein was extracted. PARP (Full-length and cleaved) expression was determined by western blot analyses. **(C)** Apoptosis analysis with Annexin V/PI staining of T-47D cells was performed by flow cytometric analysis. In each graph, the lower left quadrant (Q4) indicates viable cells, the upper left quadrant (Q1) represents necrotic cells (PI positive only), the lower right quadrant (Q3) shows early apoptotic cells (Annexin V positive only), and the upper right quadrant (Q2) represents late apoptotic cells (PI and Annexin V positive) (n=3).

2.3.4.3 Junctional proteins and markers of EMT are not affected in DEHP- and mEHP-treated T-47D, while vimentin expression is increased in hTERT-HME1 cells

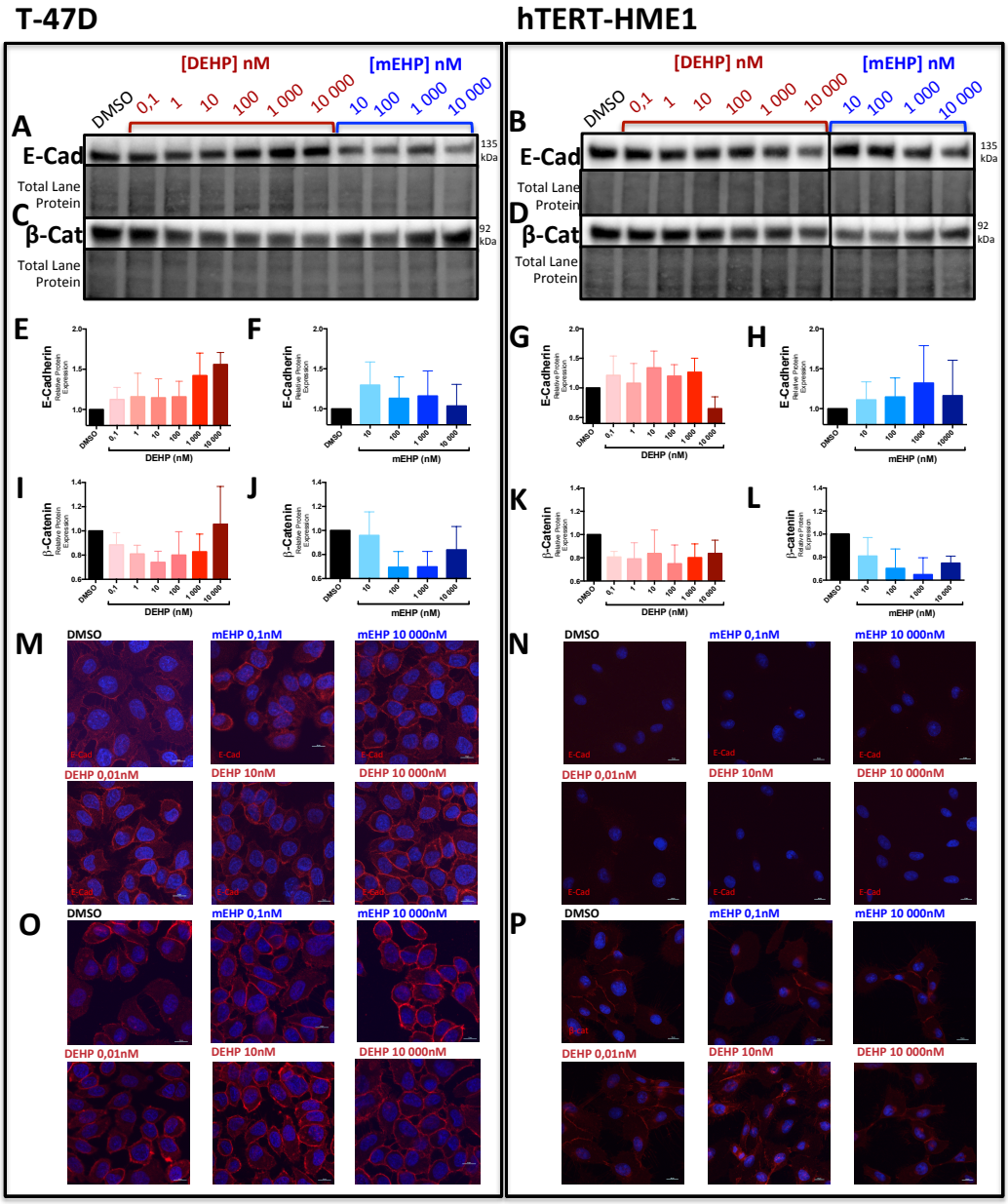


Figure 3: Junctional protein and EMT are not affected by exposure to DEHP and mEHP in T-47D and hTERT-HME1 cells. T-47D and hTERT-HME1 cells were exposed to DEHP or mEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM for 5 days. Cells were lysed and total protein was extracted. E-Cadherin **(A,B)** and β-Catenin **(C,D)** expression were determined by western blot analyses and are shown by representative immunoblots. Graphs represent means of 5 different experiments for E-Cadherin **(E,F,G,H)**, and β-Catenin **(I,J,K,L).** (Means ± SEM)**.** Total lane protein was used for normalization. Cells were fixed and processed for immunofluorescent staining. E-Cadherin **(M, N)** and β-Catenin **(O, P)** expression are represented in red for each conditions.

Because intercellular junctions are important in cells homeostasis and are commonly decreased during breast cancer and EMT, we next wanted to verify if DEHP and mEHP exposure had an effect on the expression of junctional proteins or markers of the EMT. Our results showed that E-Cadherin and β-Catenin protein levels and localization were not affected by the treatments in both T-47D and hTERT-HME1 cells (Figure 3). Levels of the gap junction protein Cx43 were not affected either, nor the levels of the EMT marker N-cadherin (Supplementary figure 2 and data not shown). Surprisingly, an increase of vimentin levels, another marker of EMT, was observed at all doses in hTERT-HME1 cells, and this increase was significative at 1 000 and 10 nM for DEHP and mEHP, respectively (Figure 4).

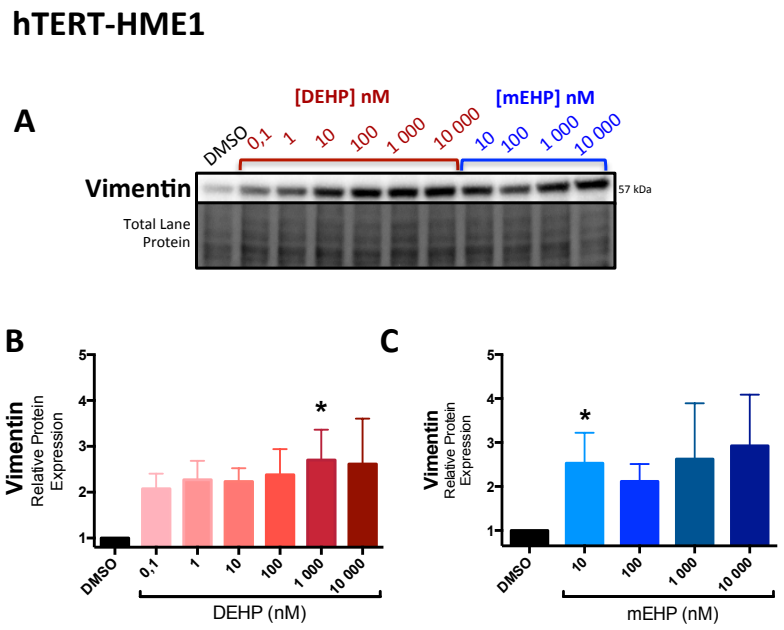


Figure 4: Vimentin expression is up-regulated by DEHP and mEHP exposure in hTERT-HME1 cells. hTERT-HME1 cells were exposed to DEHP or mEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM for 5 days. Cells were lysed and total protein was extracted. Vimentin expression were determined by western blot analyses and are shown by a representative immunoblot (**A**). Graphs represent means of 5 different experiments (Means ± SEM) **(B-C).** Total lane protein was used for normalization. Kruskal-Wallis Test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.3.4.4 Progesterone receptor (PR-A) protein expression is increased by DEHP exposure in T-47D cells

Since a dysregulation of hormonal signalling can lead to breast cancer and that DEHP have shown some endocrine disruptive properties, we then assessed the expression of the hormonal receptors involved in the classification of breast cancer subtypes. Our results showed that ER, HER2, and p-HER2 are not affected by DEHP and mEHP in T-47D cells (Figure 5B, D, F, I, J, M, N, Q, R). The levels of AhR, an orphan receptor involved in many cellular function and linked to carcinogenesis, were not affected either (Figure 5A, G, H).

However, PR-A was significantly increased in T-47D cells exposed to 10 and 10 000 nM of DEHP (Figure 5E, O, P). Surprisingly, PR-B was found to be down-regulated by 10 000 nM of mEHP (Figure 5C, K, L). The hormonal receptors tested were not expressed by hTERT-HME1 cells, nor re-expressed following the treatments (data not shown).

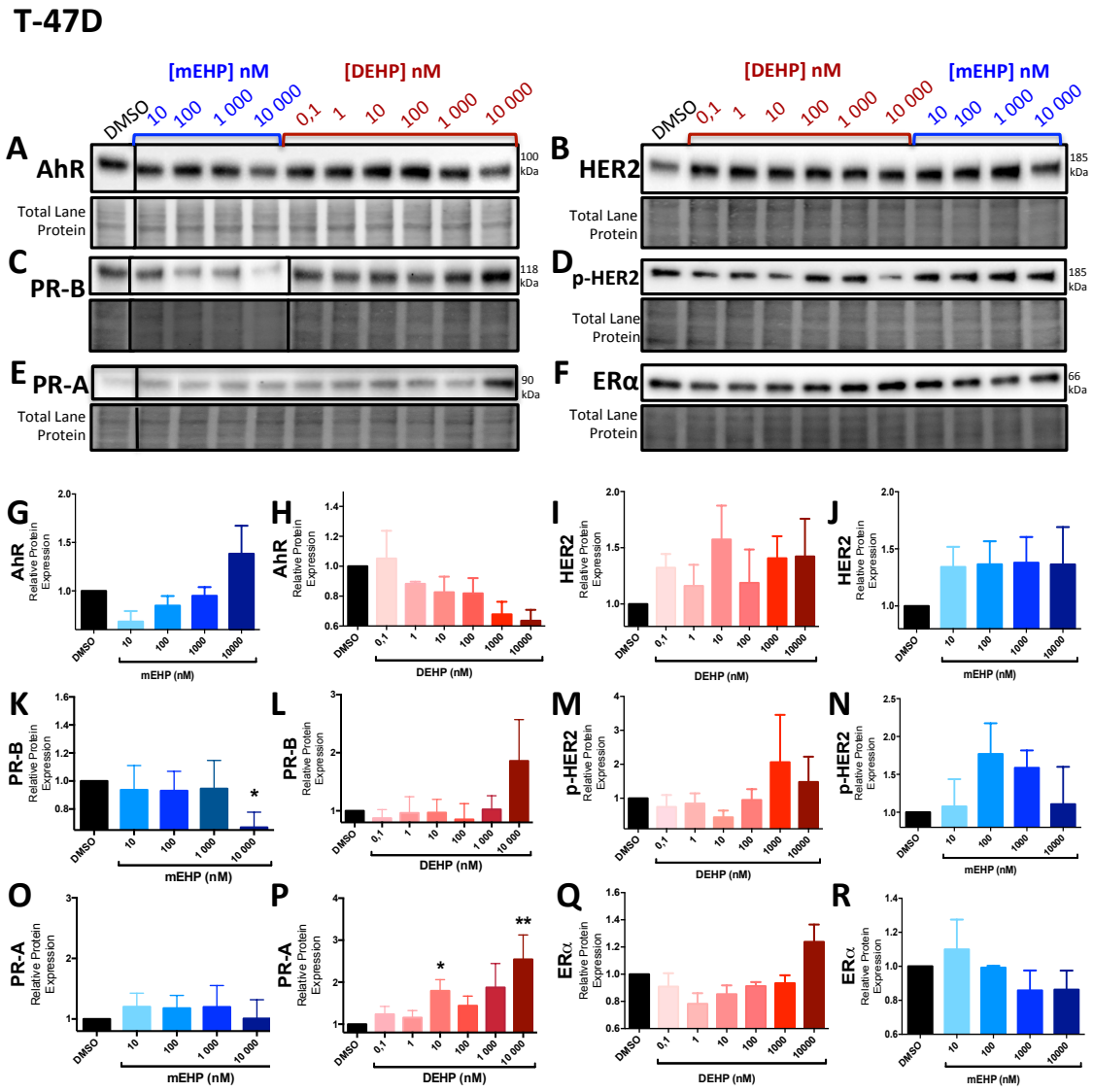


Figure 5: PR-A protein expression is increased by DEHP exposure while AhR, HER2, p-HER2 and ERα are not affected in T-47D cells. T47D cells were exposed to DEHP or mEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM for 5 days. Cells were lysed and total protein was extracted. AhR **(A)**, HER2 **(B)**, PR-B **(C)** p-HER2 **(D),** PR-A **(E)** and ERα **(F)** expression were determined by western blot analyses and are shown by representative immunoblots. Graphs represent means of 3-5 different experiments for AhR **(G,H)**, HER2 **(I,J)**, PR-B **(K,L)**, p-HER2 **(M,N),** PR-A **(O-P)** and ERα **(Q,R)** (Means ± SEM)**.** Total lane protein was used for normalization. Kruskal-Wallis test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.3.4.5 Progesterone receptor is translocated to the nucleus in T-47D cells exposed to DEHP

To determine whether the up-regulation of PR-A was associated with its activation, PR localisation was assessed by immunofluorescence in cells exposed to 10 and 10 000 nM of DEHP and 0.1 and 10 000 nM of mEHP, the doses at which an increased in proliferation and/or changes in PR expression were observed. In both control and treated cells, PR was localized in the nucleus, but the staining was more intense in DEHP- and mEHP-treated cells (Figure 6A-F). The observation was confirmed by measuring the nuclear fluorescence intensity of PR (Figure 6G-I). While the signal seems to be increased for all doses tested, the nuclear intensity of PR was significantly increased only at 10 000 nM of DEHP.

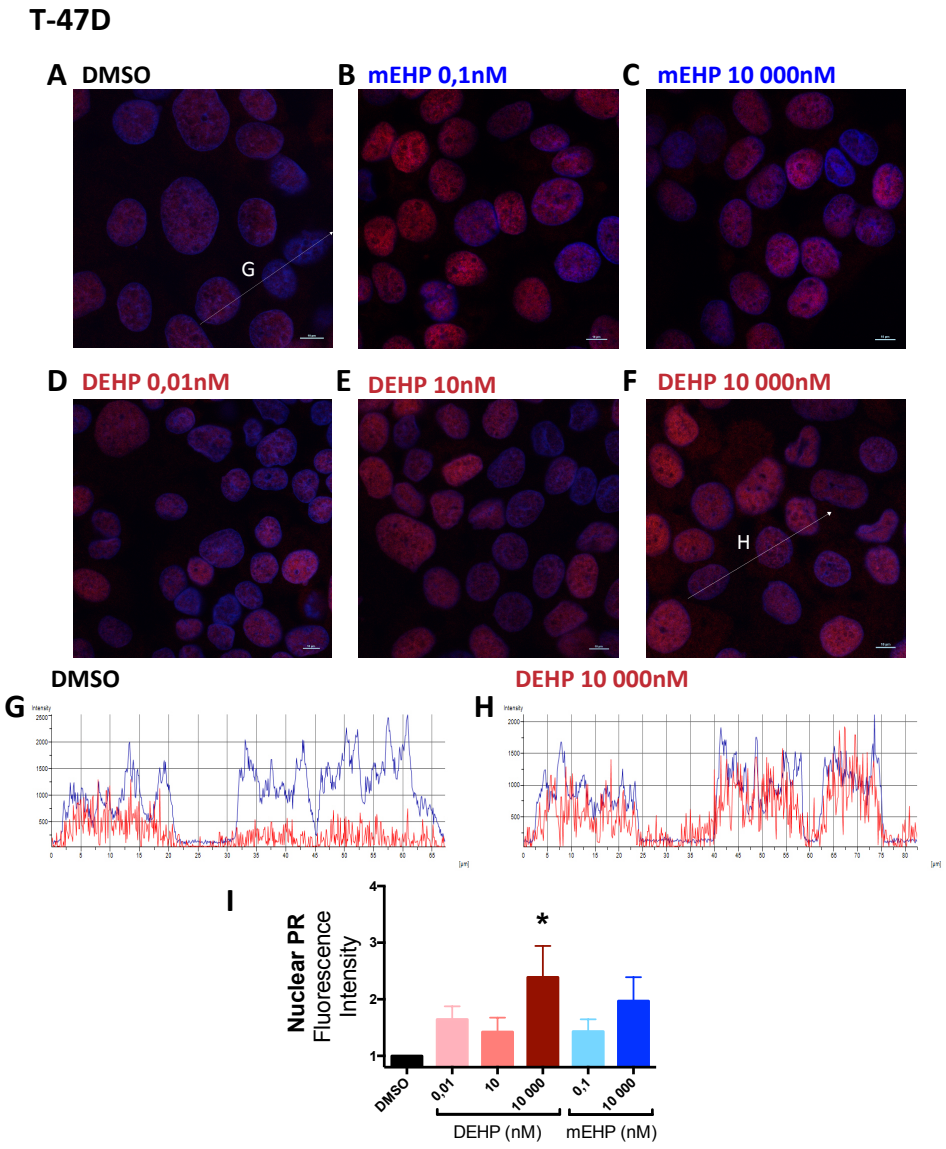


Figure 6: Progesterone receptor is translocated to the nucleus when T-47D cells are exposed to DEHP. T47D cells were exposed to DEHP or mEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM for 5 days. Cells were fixed and processed for immunofluorescent staining. PR expression is represented in red for each of the CTRL **(A)**, mEHP **(B,C)** and DEHP **(D,E,F)** exposures. PR fluorescence intensity is represented by the arrows for CTRL **(G)** and for 10 000nM of DEHP **(H)**. Graph represents means of 5 different experiments **(I)** (Means ± SEM). Kruskal-Wallis test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.3.5 Discussion

Breast cancer remains an actual problem in our society although its survival rate has increased in the last decades. The constant evolution and improvement of medicine and diagnostic methods have collaborated to this survival rate improvement. However, human exposure to environmental contaminants did not change and still continues to produce its consequences.

There is an actual need for understanding the precise effects of endocrine disruptors on cancer. Thus, our objectives aimed to evaluate the impact of DEHP and mEHP exposure on epithelial normal and cancerous cells from mammary gland origin. More specifically, the goals were to assess the effects of DEHP and mEHP on mammary gland and to determine mechanisms implicated in DEHP and mEHP toxicity. Briefly, our results showed that the exposure to DEHP and mEHP significantly increase the proliferation of cancer cells at the highest and the lowest doses respectively, without affecting healthy cells. This increase in proliferation is associated with nuclear translocation and activation of PR in T-47D cells. For instance, MCF-7 and T-47D cells, in which DEHP induced proliferation, are also PR positive (Chen et Chien 2014). Together, our results suggest that the mechanisms of action of DEHP and its metabolite, mEHP, may imply the progesterone pathway.

2.3.5.1 DEHP and mEHP exposure results in increased breast cancer cells proliferation without having an effect on normal cells

Our results showed that proliferation was increased in T-47D tumorigenic cells but not in non-tumorigenic cells (hTERT-HME1) upon DEHP and mEHP treatments. At least two potential explanations can explicate the different response of the two cells lines. First, the absence of proliferation in hTERT-HME1 exposed to DEHP or mEHP can be linked to the lack of hormonal receptor in these cells, compared to T-47D cells. In the ERα-positive human breast cancer cells line MCF-7, an exposure to DEHP also increased proliferation in an estrogenic-dependant manner (Chen et Chien 2014). Similarly, it has been showed that out of the 22 phthalates tested, nine compounds, including DEHP, were found to induce ERα-mediated estrogenic activity (Takeuchi et al. 2005). The estrogenic response can be suppressed by the ER antagonist, tamoxifen, suggesting that DEHP could bind to ERα (Takeuchi et al. 2005). Interestingly, DEHP also showed antiestrogenic effect in an ERβ assay (Takeuchi et al. 2005). On the opposite, it has been demonstrated that DEHP can also induce proliferation in human ERα negative MDA-MB-231 cells (Tanay Das, Kumar et Thakur 2014), suggesting that DEHP also has toxicological effects that are independent of ERα signaling pathway. In our study, ER expression was not affected by DEHP or mEHP treatments. However, ER activity was not tested; because ER is part of nuclear receptors that their localization can change without affecting the total levels. Moreover, other hormonal receptors could be involved.

A second possibility is that DEHP and mEHP can have a more important influence in the cancer progression than initiation. Because T-47D are tumorigenic cells, they might be more prone to

the effects of endocrine disruptors than hTERT-HME1 cells. To our knowledge, no other study have yet evaluate the effects of plasticizers on non-tumorigenic cells *in vitro.* More experiments are thus needed to evaluate this possibility.

2.3.5.2 DEHP exposure increases and triggers nuclear localisation of the progesterone receptor A (PR-A) in T-47D cells

Progesterone is essential for the mammary gland development. It has a proliferative effect on epithelial cells (Humphreys et al. 1997 ; Obr et Edwards 2012 ; Hilton, Graham et Clarke 2015), and dysregulation in the progesterone pathway is known to be a risk factor for breast cancer development (Anderson 2002). Two isoforms of PR are expressed at similar levels in the mammary gland, PR-A and PR-B (Mote et al. 2002). In our study, PR-A expression was significantly increased when T-47D cells were exposed to 10 and 10 000 nM of DEHP. Using immunofluorescence assays, we confirmed that PR was activated, as demonstrated by its nuclear translocation, by a 10 000 nM DEHP exposure, the same dose that showed a significative increase in proliferation. An *in silico* study recently showed that DEHP have the potential to compete with the endogene substrate binding to PR (Sheikh 2016), thus supporting our results. Interestingly, while PR-B levels were also increased but highly variable at the highest dose, they were not significantly affected. It has been suggested that the two PR isoforms are functionally distinct in mammary gland, PR-B acting mostly as a transcriptional activator, whereas PR-A can act as a transdominant inhibitor of PR-B in situations where PR-A has little or no transactivational activity (Vegeto et al. 1993). Unbalance of PR-A and PR-B ratios has been suggested as an early marker of breast cancer development and is observed in premalignant lesions (Mote et al. 2002). In addition, an elevated PR-A/PR-B ratio is linked with more aggressive tumors and to biggest resistance to endocrine treatments (Hopp et al. 2004). Consistently, an overexpression of PR-A can generate an increase in the ductal elongation, hyperplasia, a disorganized basement membrane and decreased cell-cell adhesion (Shyamala et al. 1998). Similarly, overexpression of PR-A in T-47D cells genetically modified cell lines, promoted the acquisition of phenotypes associated with cancer, such as decreased cell adhesion and increased migration into bone marrow stroma (McGowan et Clarke 1999 ; McGowan et al. 2004 ; Graham et al. 2009). Together, these data suggested that DEHP-induced activation of PR-A can enhance tumorigenic activity in T-47D cells. More studies are required to determine whether activation of PR-A is linked with the observed increased proliferation observed upon DEHP exposure.

2.3.5.3 mEHP affects T-47D cells proliferation at lower environmental doses compared to DEHP

Many of the effects of DEHP on cells were assessed at high doses that were not necessarily representative of the human exposure (X. Chen et al. 2013 ; Sims et al. 2014 ; Y. H. Kim et al. 2010) (Schaedlich K, Schmidt JS, Kwong WY et al., 2015). In human breast tissues and milk samples, levels up to 60 nM and 170 nM of DEHP and mEHP have been measured in women human milk, respectively (Zimmermann et al. 2012 ; S. Kim et al. 2015 ; Fromme et al. 2011). Approximately the same concentrations have been found in serum and urina (Meeker, Calafat et Hauser 2009 ; Frederiksen, Jorgensen et Andersson 2010). Therefore, we used concentration ranging from 0.1 nM to 10 µM to get concentrations that were environmentally relevant, and concentrations similar to what other studies have used. Although non-statistically increases in proliferation were observed in lower doses, we found that DEHP significantly affects T-47D cell proliferation at 10 000 nM and PR at 10 nM and 10 000 nM (10 µM). In comparison, in MCF-7 cells, a study by Chen and Chien (Chen et Chien 2014), showed that cell proliferation was significantly increased at 10 nM-1 000 nM, while Blom and collaborators (Blom et al. 1998) found that 10 µM was the lowest concentration at which proliferation was increased. Similarly, while an exposure to 0.1-100 µM induced proliferation in both MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells in a study (Tanay Das, Kumar et Thakur 2014), 10 M of DEHP increased proliferation in MCF-7 cells, but not in MDA-MB-231 cells in another study (I. Y. Kim, Han et Moon 2004). While there are some variation between the results, our results using T-47D cells, which express ER and PR similar to MCF-7 cells, are consistent with what have been showed by others.

To our knowledge, no other study have looked at the effect of DEHP metabolites on breast cancer cells proliferation. Interestingly, mEHP also induced proliferation in T-47D cells, but was significant only at the 0.1 nM dose. This non-monotonic dose-response relationship is consistent with an endocrine disruptive effects (Vandenberg et al. 2013). Because human are mainly exposed to DEHP by food and dust ingestion and because DEHP is rapidly metabolized in mEHP, breast cells are more likely exposed to mEHP than DEHP in human, as reflected by the levels of both compounds found in breast tissues and milk (Zimmermann et al. 2012 ; S. Kim et al. 2015 ; Fromme et al. 2011). Moreover, it has been showed that breast cells, including T-47D cells, are capable of metabolizing certain pollutants (Spink et al. 2008 ; Agarwal et al. 1997 ; John et al. 2010). As a result, it is crucial and relevant to determine the effects of mEHP on cells. Although mEHP induced proliferation of T-47D cells, no other significant effects were observed during our studies. However, we found that 10 nM of mEHP increased vimentin expression in

hTERT-HME1 cells; a similar effect was observed at 1 000 nM for DEHP (Figure 4). Vimentin is one of the major cytoskeletal component of mesenchymal cells, which is thus increased during EMT in breast cells (Al Saleh, Sharaf et Luqmani 2011). In our study, we did not find any other evidences of EMT, as levels of E-Cadherin, β-Catenin and N-cadherin remains unchanged in both tumorigenic and normal cells. Further studies are thus needed to understand the consequence of this up-regulation in non-tumorigenic cells.

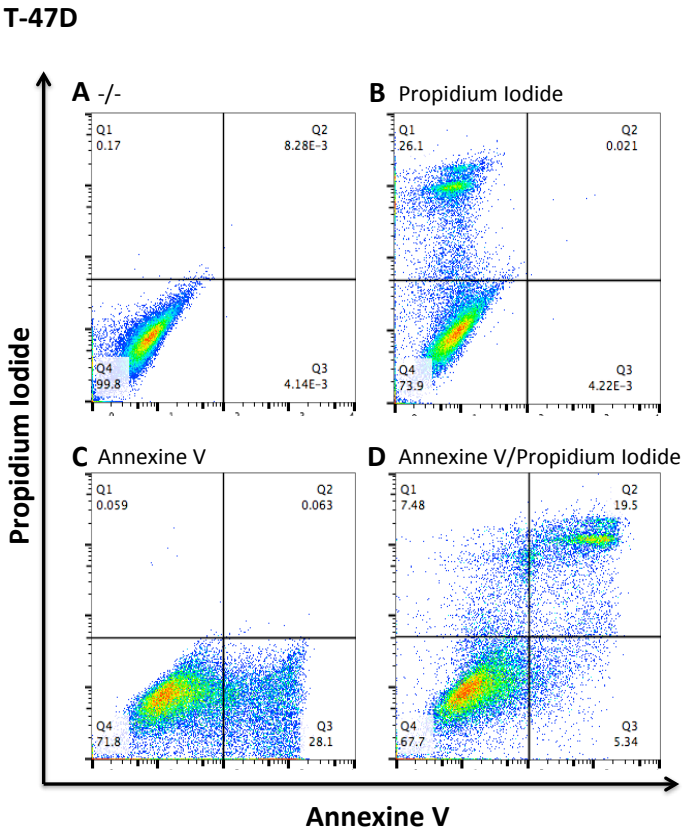
2.3.6 Conclusion

Overall, our results have demonstrated that DEHP and mEHP can increase cell proliferation of T-47D cells without causing apoptosis in the higher doses. We also demonstrated that PR-A levels were increased upon DEHP exposure, and is translocated to the nucleus. Further experiments are needed to understand de relationship between those two effects. We also showed that both DEHP and mEHP can increase vimentin expression in non-tumorigenic hTERT-HME1 cells, at high and environmentally-relevant doses, respectively. Together, these data suggested that exposure to DEHP and mEHP can enhance tumorigenic characteristics of breast cells.

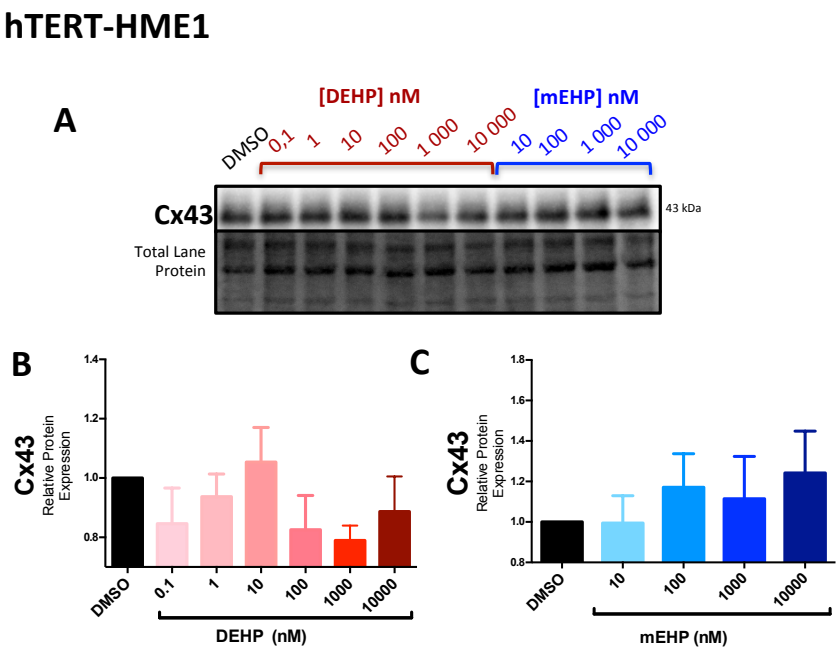
2.3.7 Acknowledgements

This work is supported by a jointed grant from the Quebec Breast Cancer Fundation (QBCF) and the Cancer Research Society (CRS #17023) to IP, and by internships and scholarships from the Fondation Universitaire Armand-Frappier INRS to EF and EK and from the Fonds de recherche en santé du Québec (FRQS) to EK. IP is also supported by a Junior 1 Career Award jointly granted by the FRQS and the QBCF. The authors thank Martine Caplette for their technical assistance.

2.3.8 Supplementary figures



Supplementary figure 1: Staurosporine exposure induces apoptosis in T-47D. T-47D cells were exposed to 1µM of staurosporine for 24h. **(A)** Cells were analysed by flow cytometry without being stained. **(B)** Simple staining with Propidium Iodide. **(C)** Simple staining with Annexin V. **(D)** Double staining with Annexin V and Propidium Iodide**.**



Supplementary figure 2: Cx43 protein expression is not affected in hTERT-HME1 cells. hTERT-HME1 cells were exposed to DEHP or mEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM for 5 days. Cells were lysed and total protein was extracted. Cx43 **(A-C)** expression was determined by western blot analyses and are shown by representative immunoblots. Graphs represent means of 5 different experiments (Means ± SEM). Total lane protein was used for normalization.

References

Agarwal, R., S. L. Coffing, W. M. Baird, A. S. Kiselyov, R. G. Harvey et A. Dipple. 1997. « Metabolic activation of benzo[g]chrysene in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. » *Cancer Res* 57 (3): 415-419.

Al Saleh, S., L. H. Sharaf et Y. A. Luqmani. 2011. « Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). » *Int J Oncol* 38 (5): 1197-1217. doi: 10.3892/ijo.2011.942.

Anderson, E. 2002. « The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. » *Breast Cancer Res* 4 (5): 197-201.

Barnard, M. E., C. E. Boeke et R. M. Tamimi. 2015. « Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. » *Biochim Biophys Acta* 1856 (1): 73-85. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.002.

Blom, A., E. Ekman, A. Johannisson, L. Norrgren et M. Pesonen. 1998. « Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). » *Arch Environ Contam Toxicol* 34 (3): 306-310.

Brisken, C. et B. O'Malley. 2010. « Hormone action in the mammary gland. » *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (12): a003178. doi: 10.1101/cshperspect.a003178.

Chen, F. P. et M. H. Chien. 2014. « Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. » *Climacteric* 17 (4): 377-384. doi: 10.3109/13697137.2013.865720.

Chen, X., Q. Qin, W. Zhang, Y. Zhang, H. Zheng, C. Liu, Y. Yang, W. Xiong et J. Yuan. 2013. « Activation of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway promotes DEHP-induced Hep3B cell proliferation. » *Food Chem Toxicol* 59: 325-333. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.016.

Chipman, J. K., A. Mally et G. O. Edwards. 2003. « Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. » *Toxicol Sci* 71 (2): 146-153.

Delisle, A., E. Ferraris et I. Plante. 2015. « Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast. » *Environ Res* 143 (Pt A): 229-240. doi: 10.1016/j.envres.2015.10.020.

Dianati, E., J. Poiraud, A. Weber-Ouellette et I. Plante. 2016. « Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and beta-catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. » *Dev Biol* 416 (1): 52-68. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.011.

Doll, R. et R. Peto. 1981. « The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. » *J Natl Cancer Inst* 66 (6): 1191-1308.

Fenton, S. E. et L. S. Birnbaum. 2015. « Timing of Environmental Exposures as a Critical Element in Breast Cancer Risk. » *J Clin Endocrinol Metab* 100 (9): 3245-3250. doi: 10.1210/jc.2015-2848.

Frederiksen, H., N. Jorgensen et A. M. Andersson. 2010. « Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. » *J Anal Toxicol* 34 (7): 400-410.

Fromme, H., L. Gruber, E. Seckin, U. Raab, S. Zimmermann, M. Kiranoglu, M. Schlummer, U. Schwegler, S. Smolic, W. Volkel et Hbmnet. 2011. « Phthalates and their metabolites in breast milk--results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). » *Environ Int* 37 (4): 715-722. doi: 10.1016/j.envint.2011.02.008.

GLOBOCAN 2012. Consulted on July 16, 2016. http://globocan.iarc.fr/Default.aspx.

Graham, J. D., P. A. Mote, U. Salagame, J. H. van Dijk, R. L. Balleine, L. I. Huschtscha, R. R. Reddel et C. L. Clarke. 2009. « DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast. » *Endocrinology* 150 (7): 3318-3326. doi: 10.1210/en.2008-1630.

Hilton, H. N., J. D. Graham et C. L. Clarke. 2015. « Minireview: Progesterone Regulation of Proliferation in the Normal Human Breast and in Breast Cancer: A Tale of Two Scenarios? » *Mol Endocrinol* 29 (9): 1230-1242. doi: 10.1210/me.2015-1152.

Hopp, T. A., H. L. Weiss, S. G. Hilsenbeck, Y. Cui, D. C. Allred, K. B. Horwitz et S. A. Fuqua. 2004. « Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. » *Clin Cancer Res* 10 (8): 2751-2760.

Humphreys, R. C., J. Lydon, B. W. O'Malley et J. M. Rosen. 1997. « Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. » *Mol Endocrinol* 11 (6): 801-811. doi: 10.1210/mend.11.6.9891.

John, K., R. L. Divi, C. Keshava, C. C. Orozco, M. E. Schockley, D. L. Richardson, M. C. Poirier, J. Nath et A. Weston. 2010. « CYP1A1 and CYP1B1 gene expression and DNA adduct formation in normal human mammary epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene in the absence or presence of chlorophyllin. » *Cancer Lett* 292 (2): 254-260. doi: 10.1016/j.canlet.2009.12.008.

Kessler, W., W. Numtip, W. Volkel, E. Seckin, G. A. Csanady, C. Putz, D. Klein, H. Fromme et J. G. Filser. 2012. « Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood and of DEHP metabolites in urine of male volunteers after single ingestion of ring-deuterated DEHP. » *Toxicol Appl Pharmacol* 264 (2): 284-291. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.009.

Kim, I. Y., S. Y. Han et A. Moon. 2004. « Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. » *J Toxicol Environ Health A* 67 (23-24): 2025-2035. doi: 10.1080/15287390490514750.

Kim, J. H., H. Park, J. Lee, G. Cho, S. Choi, G. Choi, S. Y. Kim, S. H. Eun, E. Suh, S. K. Kim, H. J. Kim, G. H. Kim, J. J. Lee, Y. D. Kim, S. Eom, S. Kim, H. B. Moon, J. Park, K. Choi, S. Kim et S. Kim. 2016. « Association of diethylhexyl phthalate with obesity-related markers and body mass change from birth to 3 months of age. » *J Epidemiol Community Health* 70 (5): 466-472. doi: 10.1136/jech-2015-206315.

Kim, S., J. Lee, J. Park, H. J. Kim, G. Cho, G. H. Kim, S. H. Eun, J. J. Lee, G. Choi, E. Suh, S. Choi, S. Kim, Y. D. Kim, S. K. Kim, S. Y. Kim, S. Kim, S. Eom, H. B. Moon, S. Kim et K. Choi. 2015. « Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. » *Sci Total Environ* 508: 13-19. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.11.019.

Kim, Y. H., S. H. Kim, H. W. Lee, H. D. Chae, C. H. Kim et B. M. Kang. 2010. « Increased viability of endometrial cells by in vitro treatment with di-(2-ethylhexyl) phthalate. » *Fertil Steril* 94 (6): 2413-2416. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.027.

Komen, Susan G. 2015. « Molecular Subtypes of Breast Cancer. ». Consulted on June 5, 2016. http://ww5.komen.org/BreastCancer/SubtypesofBreastCancer.html.

Latini, G., C. De Felice, G. Presta, A. Del Vecchio, I. Paris, F. Ruggieri et P. Mazzeo. 2003. « Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. » *Biol Neonate* 83 (1): 22-24. doi: 67012.

Mankidy, R., S. Wiseman, H. Ma et J. P. Giesy. 2013. « Biological impact of phthalates. » *Toxicol Lett* 217 (1): 50-58. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.11.025.

Market Study: Plasticizers (3rd edition). 2013. Consulted on July 6, 2016.

Maskarinec, G. et J. J. Noh. 2004. « The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. » *Ethn Dis* 14 (3): 431-439.

McGowan, E. M. et C. L. Clarke. 1999. « Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. » *Mol Endocrinol* 13 (10): 1657-1671. doi: 10.1210/mend.13.10.0356.

McGowan, E. M., S. Saad, L. J. Bendall, K. F. Bradstock et C. L. Clarke. 2004. « Effect of progesterone receptor a predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. » *Breast Cancer Res Treat* 83 (3): 211-220. doi: 10.1023/B:BREA.0000014041.58977.80.

Meeker, J. D., A. M. Calafat et R. Hauser. 2009. « Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. » *J Androl* 30 (3): 287-297. doi: 10.2164/jandrol.108.006403.

Mote, P. A., S. Bartow, N. Tran et C. L. Clarke. 2002. « Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. » *Breast Cancer Res Treat* 72 (2): 163-172.

Obr, A. E. et D. P. Edwards. 2012. « The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. » *Mol Cell Endocrinol* 357 (1-2): 4-17. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.030.

Pfeifer, G. P. 2015. « How the environment shapes cancer genomes. » *Curr Opin Oncol* 27 (1): 71-77. doi: 10.1097/CCO.0000000000000152.

Plante, I., M. Charbonneau et D. G. Cyr. 2002. « Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. » *Carcinogenesis* 23 (7): 1243-1249.

Rozati, R., P. P. Reddy, P. Reddanna et R. Mujtaba. 2002. « Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. » *Fertil Steril* 78 (6): 1187-1194.

Sheikh, I. A. 2016. « Stereoselectivity and the potential endocrine disrupting activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) against human progesterone receptor: a computational perspective. » *J Appl Toxicol* 36 (5): 741-747. doi: 10.1002/jat.3302.

Shyamala, G., X. Yang, G. Silberstein, M. H. Barcellos-Hoff et E. Dale. 1998. « Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2): 696-701.

Sims, J. N., B. Graham, M. Pacurari, S. S. Leggett, P. B. Tchounwou et K. Ndebele. 2014. « Di-ethylhexylphthalate (DEHP) modulates cell invasion, migration and anchorage independent growth through targeting S100P in LN-229 glioblastoma cells. » *Int J Environ Res Public Health* 11 (5): 5006-5019. doi: 10.3390/ijerph110505006.

Spink, D. C., S. J. Wu, B. C. Spink, M. M. Hussain, D. D. Vakharia, B. T. Pentecost et L. S. Kaminsky. 2008. « Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. » *Toxicol Appl Pharmacol* 226 (3): 213-224. doi: 10.1016/j.taap.2007.08.024.

Takeuchi, S., M. Iida, S. Kobayashi, K. Jin, T. Matsuda et H. Kojima. 2005. « Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. » *Toxicology* 210 (2-3): 223-233. doi: 10.1016/j.tox.2005.02.002.

Tanay Das, M., M. Kumar et I. S. Thakur. 2014. « Differential toxicological endpoints of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines: possible estrogen receptor alpha (ERalpha) independent modulations. » *Indian J Exp Biol* 52 (11): 1052-1061.

Vandenberg, L. N., T. Colborn, T. B. Hayes, J. J. Heindel, D. R. Jacobs, Jr., D. H. Lee, J. P. Myers, T. Shioda, A. M. Soto, F. S. vom Saal, W. V. Welshons et R. T. Zoeller. 2013. « Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. » *Reprod Toxicol* 38: 1-15. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.02.002.

Vegeto, E., M. M. Shahbaz, D. X. Wen, M. E. Goldman, B. W. O'Malley et D. P. McDonnell. 1993. « Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. » *Mol Endocrinol* 7 (10): 1244-1255. doi: 10.1210/mend.7.10.8264658.

Wang, Y. X., Q. Zeng, Y. Sun, L. You, P. Wang, M. Li, P. Yang, J. Li, Z. Huang, C. Wang, S. Li, Y. Dan, Y. F. Li et W. Q. Lu. 2015. « Phthalate exposure in association with serum hormone levels, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis: A cross-sectional study in China. » *Environ Res*. doi: 10.1016/j.envres.2015.11.023.

Wolff, M. S., S. L. Teitelbaum, S. M. Pinney, G. Windham, L. Liao, F. Biro, L. H. Kushi, C. Erdmann, R. A. Hiatt, M. E. Rybak, A. M. Calafat, Cancer Breast et Centers Environment Research. 2010. « Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. » *Environ Health Perspect* 118 (7): 1039-1046. doi: 10.1289/ehp.0901690.

Zimmermann, S., L. Gruber, M. Schlummer, S. Smolic et H. Fromme. 2012. « Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels. » *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29 (11): 1780-1790. doi: 10.1080/19440049.2012.704529.

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Plusieurs études démontrent que les contaminants environnementaux s'accumulant au sein de l'environnement ont une influence négative sur le développement de plusieurs maladies. Entre autres, il est de plus en plus clair que certains toxiques favorisent les cancers et que l'exposition chronique à ces perturbateurs endocriniens devance aussi la puberté des jeunes d'aujourd'hui (Bulus et al. 2016 ; Brophy et al. 2012 ; Partsch et Sippell 2001).

Les phtalates, dont le DEHP, font partie de ces perturbateurs endocriniens qui ont plusieurs conséquences chez l'humain dont l'implication dans l'apparition de cancers comme le cancer du sein, mais aussi de la précocité de la puberté chez les adolescents (Bulus et al. 2016 ; C. Y. Chen et al. 2013 ; Chen et Chien 2014). Cependant, les mécanismes impliqués dans leur tumorigénicité ne sont pas bien compris pour le moment.

Il a été démontré que le DEHP peut induire la prolifération de cellules dans différents tissus comme le foie (X. Chen et al. 2013), le cerveau (Sims et al. 2014) et l'utérus (Y. H. Kim et al. 2010). Peu d'études ont investigué l'effet des phtalates spécifiquement sur la glande mammaire, mais il a été démontré qu'une augmentation de la viabilité et de la prolifération des cellules MCF-7 était causée par l'exposition au DEHP (Chen et Chien 2014). Aussi, quelques études ont démontré que le DEHP pouvait inhiber l'apoptose et favoriser la prolifération *in vitro* chez les cellules MCF-7 (Okubo 2003 ; I. Y. Kim, Han et Moon 2004). *In vivo,* il a été démontré que le mEHP pouvait aussi avoir un effet sur l'hyperplasie des glandes mammaires de souris (Moyer et Hixon 2012). Notre objectif était donc de déterminer les effets d'une exposition au DEHP et au mEHP sur les caractéristiques tumorigéniques des cellules épithéliales de la glande mammaire et de cibler les mécanismes en lien avec leur toxicité dans la glande mammaire.

Les cellules T-47D et hTERT-HME1 ont été sélectionnées puisqu'elles possèdent des caractéristiques différentes. Les cellules T-47D sont des cellules cancéreuses de type luminal B exprimant plusieurs récepteurs dont ERα, ERβ, PR-A, PR-B, HER2, AhR. Les cellules hTERT-HME1 sont pour leur part des cellules saines n'exprimant aucun de ces récepteurs (*American Type Culture Collection (ATCC)* 2016). Une des raisons pour laquelle nous avons choisi ces 2 types de cellules est que nous voulions voir si le DEHP et le mEHP auraient un effet semblable chez les 2 lignées cellulaires, ou si un certain récepteur était essentiel pour que les molécules exercent leurs effets sur la cellule.

De plus, il est important de noter que les effets mesurés dans cette étude ont été détectés à des doses de DEHP et de mEHP retrouvés normalement dans notre organisme (urine, sang, tissus) dû à notre constante exposition à ces toxiques (Zimmermann et al. 2012 ; Meeker, Calafat et Hauser 2009). Cette étude est donc le reflet d'une exposition environnementale au DEHP et au mEHP.

3.1 Limitations de la culture *in vitro*

La culture cellulaire 2D possède ses avantages. Entre autres, elle permet de réduire l'utilisation animale, d'être rapide, peu coûteuse et de produire des résultats fiables. La culture cellulaire est effectivement un outil indispensable à la recherche fondamentale et aussi pour un grand éventail d'études cliniques. Ce modèle a par contre ses limitations (Wrzesinski et Fey 2015 ; Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. et National Research Council (U.S.) 1999). Entre autres, la culture cellulaire conventionnelle 2D ne représente pas exactement toutes les conditions présentes dans un organisme vivant (Hess et al. 2010). Un organisme vivant possède des centaines de tissus différents et ce sont toutes les réactions et les interactions physiologiques présentes dans cet organisme qui sont exposées à un contaminant environnemental lors d'une étude de toxicité. Lors de culture cellulaire 2D, un seul type de cellule est utlisé et la matrice extracellulaire est inexistante. De plus, ce n'est pas un apport sanguin qui apporte les nutriments nécessaire à la croissance cellulaire, mais bien un milieu de culture enrichi afin de reproduire le plus fidèlement possible l'environnement naturel des cellules (Wetmore 2015).

Cela nous amène à réfléchir à propos de cette question: Est-ce que les résultats obtenus dans une étude *in vitro* peuvent être extrapolés à un organisme vivant? C'est une question qui revient régulièrement et qui nécessite une certaine réflexion. Il est bien évident qu'il n'est pas possible d'extrapoler définitivement tous les résultats obtenus à partir d'un modèle *in vitro* à un organisme vivant. Par contre, les résultats obtenus en culture cellulaire peuvent nous servir d'indices avant d'aller directement *in vivo* et d'utiliser des animaux de laboratoire. D'ailleurs, les modèles animaux possèdent aussi leurs limitations. Ils ne reflètent pas non plus parfaitement le corps humain.

De plus en plus d'efforts sont déployés en recherche en ce moment afin de développer des modèles de culture cellulaire 3D. Plusieurs avantages sont associés à ce type de modèle qui se

situe un peu entre la culture cellulaire 2D et le modèle animal. En effet, la culture 3D permet de reproduire en partie le microenvironnement cellulaire. En plus de pouvoir ensemencer différentes cellules ensembles, comme par exemple des cellules luminales avec des cellules myoépithéliales mammaires qui formeront ainsi des acini, ces cellules prolifèrent dans une matrice se rapprochant de très près de la matrice extracellulaire se trouvant dans un organisme vivant, celle-ci étant composé de collagène, de laminine, de facteurs de croissance, etc (Smart et al. 2013).

Bref, tous les modèles *in vitro* et *in vivo* possèdent leurs avantages et leurs limitations. Cette étude présente les résultats associés à une exposition *in vitro* au DEHP et au mEHP. Il serait très intéressant de répéter ces analyses dans le contexte de modèle 3D. Il est aussi important de noter qu'une étude *in vivo* est présentement effectuée en parallèle chez le rat et que les résultats se rapprochent de ceux obtenus en culture cellulaire.

3.2 Profil protéique des cellules

Les cellules T-47D possédant tous les principaux récepteurs nucléaires impliqués dans les sous-types de cancer du sein, il fut relativement facile d'investiguer les effets du DEHP et du mEHP sur l'expression protéique de ces différents récepteurs. Lorsqu'il a été établi que PR-A était surexprimé chez les cellules T-47D lors d'une exposition à 10 et à 10 000 nM de DEHP, nous avons vérifié si le même processus était présent chez les cellules hTERT-HME1 malgré le fait que ces dernières n'expriment normalement pas PR. Toutefois, le résultat fut négatif. La prolifération des cellules hTERT-HME1 n'était pas affectée par l'exposition au DEHP et mEHP non plus, supportant l'hypothèse ici de l'implication de PR dans la toxicité du DEHP.

Afin de confirmer l'implication de PR dans la prolifération cellulaire activée par le DEHP, il aurait été intéressant de comparer les résultats obtenus chez les cellules T-47D à une lignée cellulaire saine exprimant PR. Sachant que PR est exprimé chez environ 40% des cellules épithéliales mammaires chez la femme adulte, il aurait été très intéressant de vérifier l'impact du DEHP et du mEHP sur ces dernières. Cela aurait pu être possible à partir de cellules épithéliales mammaires primaires. L'approche inverse aurait aussi été intéressante, soit d'inhiber pharmacologiquement ou via édition de l'ADN l'expression de PR dans les T-47D avant traitement avec phtalates.

3.3 Cible du DEHP

Une hypothèse relative aux résultats de notre étude est qu'étant donné que le DEHP et le mEHP ont un effet plus prononcé chez les cellules cancéreuses (T-47D) que chez les cellules saines (hTERT-HME1), ce perturbateur endocrinien pourrait donc avoir un plus grand effet dans la progression que dans l'initiation du cancer. Des chercheurs ont déjà soulevé cette hypothèse, mais dans le cancer de la prostate, où le mEHP aurait la capacité d'activer la voie hedgehog, une voie de signalisation ayant un rôle critique dans la progression de ce cancer (Yong et al. 2016). Dans le cas de notre étude, l'impact du DEHP dans la glande mammaire pourrait plutôt impliquer l'activation de PR et des récepteurs activés par les prolifférateurs de peroxysomes (PPAR, «peroxysome proliferated activator receptors»), l'implication de ce dernier ayant déjà fait l'objet d'études préliminaires dont les résultats sont présentés dans l'annexe I,

Aussi, nous savons qu'au cours de la vie, les cellules subissent plusieurs mutations, la plupart de ces dernières étant inhibées par les systèmes de défense. Toutefois, les cellules initiées, en présence de contaminants environnementaux comme les phthalates, pourraient être plus sensibles que les cellules saines et ainsi subir des changements et des transformations pouvant être la cause du développement tumoral.

Bref, le fait que les cellules T-47D répondent aux DEHP et au mEHP contrairement aux cellules hTERT-HME1 peut être lié au fait qu'elles expriment PR, mais peut aussi être lié au fait qu'elles sont déjà cancéreuses et que leur épigénome, transcriptome, protéome, métabolome sont différents des cellules saines. Il est possible que les phthalates n'aient pas d'effets sur les cellules normales, mais qu'ils affectent les cellules déjà initiées. Dans ce cas, le DEHP et le mEHP agiraient directement au niveau de la progression tumorale. Ceci pourrait être vérifié en exposant des lignées cellulaires cancéreuses supplémentaires.

3.4 Microenvironnement tumoral

Nous savons que les cellules ont besoin d'un environnement favorable afin de croître. Il en est de même pour les cellules cancéreuses. En effet, de récentes évidences mettent en lumière que les tumeurs pourraient consister non seulement de cellules néoplasiques, mais aussi d'un stroma ayant subi des altérations et rendant favorable la croissance des cellules cancéreuses. (Hu et al. 2005). Il est de plus en plus utile de considérer le microenvironnement tumoral comme un élément critique au développement et à la progression du cancer. De plus, déjà plusieurs

études ont démontré que certaines "signatures" telles que des modulations de l'expression génique des cellules du microenvironnement tumoral peuvent prédire le pronostic du patient (Hu et al. 2005 ; Finak et al. 2008). Composé entre autres de fibroblastes, de matrice extracellulaire et de facteurs de croissance, le microenvironnement tumoral représente un réseau complexe impliquant beaucoup de voies de signalisation. Ainsi, en présence d'un système immunitaire affaibli, d'une matrice extracellulaire altérée et/ou de changements au niveau des fibroblastes ou des adipocytes, les systèmes de protection peuvent être enfreints. Dans ce cas, la progression du cancer du sein est favorable. L'inflammation locale induite par la tumeur pourrait d'ailleurs être responsable de l'échec du système immunitaire à restreindre l'expansion du cancer (Soysal, Tzankov et Muenst 2015).

L'épithélium de la glande mammaire étant soutenu par un stroma composé en grande partie de cellules adipeuses, il est important de les inclure dans l'équation lors de l'apparition d'un cancer. En effet, de plus en plus d'études démontrent que les adipocytes pourraient subir des altérations lors d'une exposition à des carcinogènes. Entre autres, le DEHP et le mEHP pourraient affecter le métabolisme des lipides et l'adipogenèse principalement par l'activation de PPAR. Les ligands de PPAR, qui de manière endogène sont entre autres des acides gras, se lient au récepteur nucléaire PPAR. La forme activée de PPAR dimérise alors avec RXR (Retinoid X Receptor) afin de déclencher la transcription de gènes majoritairement impliqués dans le métabolisme lipidique, comme par exemple FABP3, FABP4 et le gène pour la leptine.

Une hypothèse relative aux perturbateurs endocriniens comme les phtalates et à l'activation de PPAR serait qu'ils pourraient contribuer à la haute prévalence des maladies telles que l'obésité, l'hypertension, le diabète de type 2 et le cancer (Grun et Blumberg 2009). Leurs effets pourraient débuter dès le développement foetal, en causant d'importantes altérations métaboliques permanentes, pouvant potentiellement contribuer au développement de l'obésité et des maladies associées plus tard dans la vie adulte (P. A. Fowler et al. 2012) Au cours de notre étude, nous avons pu mesurer une surexpression et une activation de PPARβδ chez les cellules T-47D et les cellules hTERT exposées au DEHP et au mEHP, reflétant une activation du métabolisme lipidique. Les résultats sont démontrés à l'annexe I.

3.5 CONCLUSION

En ce qui concerne les lignées cellulaires analysées dans cette étude, l'ensemble de nos résultats indique qu'une exposition au DEHP et au mEHP augmente la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, en n'ayant pas d'effet sur les cellules normales de la glande mammaire. Cette étude démontre aussi que le DEHP et son métabolite n'affectent pas des jonctions intercellulaires des cellules de la glande mammaire. Par contre, les résultats suggèrent que l'augmentation de la prolifération pourrait être reliée à une activation de PR-A, ce récepteur étant surexprimé et transloqué au noyau lors d'une exposition des cellules T-47D au DEHP et au mEHP. Enfin, ces résultats permettront d'appuyer l'argumentation pour une meilleure législation quant à l'utilisation des phtalates dans les produits de consommation courante. Effectivement, les effets observés dans cette étude ont été mesuré à des niveaux retrouvés normalement dans l'environnement.

CHAPITRE 4: RÉFÉRENCES

Adibi, J. J., F. P. Perera, W. Jedrychowski, D. E. Camann, D. Barr, R. Jacek et R. M. Whyatt. 2003. « Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. » *Environ Health Perspect* 111 (14): 1719-1722. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14594621.

Agarwal, R., S. L. Coffing, W. M. Baird, A. S. Kiselyov, R. G. Harvey et A. Dipple. 1997. « Metabolic activation of benzo[g]chrysene in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. » *Cancer Res* 57 (3): 415-419. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012467.

Ahmed, S., A. Sami et J. Xiang. 2015. « HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. » *Breast Cancer* 22 (2): 101-116. doi: 10.1007/s12282-015-0587-x.

Al Saleh, S., L. H. Sharaf et Y. A. Luqmani. 2011. « Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). » *Int J Oncol* 38 (5): 1197-1217. doi: 10.3892/ijo.2011.942.

Alberts, B, A Johnson, J Lewis et et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition.*

American Type Culture Collection (ATCC). 2016. http://www.atcc.org/products/all/HTB-133.aspx - generalinformation.

Anderson, E. 2002. « The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. » *Breast Cancer Res* 4 (5): 197-201. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223124.

Antal, M. C., A. Krust, P. Chambon et M. Mark. 2008. « Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (7): 2433-2438. doi: 10.1073/pnas.0712029105.

Atalay, G., F. Cardoso, A. Awada et M. J. Piccart. 2003. « Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. » *Annals of Oncology* 14 (9): 1346-1363. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954573.

Aupperlee, M. D., K. T. Smith, A. Kariagina et S. Z. Haslam. 2005. « Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. » *Endocrinology* 146 (8): 3577-3588. doi: 10.1210/en.2005-0346.

Ballare, C., M. Uhrig, T. Bechtold, E. Sancho, M. Di Domenico, A. Migliaccio, F. Auricchio et M. Beato. 2003. « Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. » *Mol Cell Biol* 23 (6): 1994-2008. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612073.

Barnard, M. E., C. E. Boeke et R. M. Tamimi. 2015. « Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. » *Biochim Biophys Acta* 1856 (1): 73-85. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.002.

Barouki, R., X. Coumoul et P. M. Fernandez-Salguero. 2007. « The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. » *FEBS Lett* 581 (19): 3608-3615. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.046.

Beleut, M., R. D. Rajaram, M. Caikovski, A. Ayyanan, D. Germano, Y. Choi, P. Schneider et C. Brisken. 2010. « Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (7): 2989-2994. doi: 10.1073/pnas.0915148107.

Berga, S. E. 1984. « Electrical potentials and cell-to-cell dye movement in mouse mammary gland during lactation. » *Am J Physiol* 247 (1 Pt 1): C20-25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6742181.

Bjornstrom, L. et M. Sjoberg. 2005. « Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. » *Mol Endocrinol* 19 (4): 833-842. doi: 10.1210/me.2004-0486.

Blom, A., E. Ekman, A. Johannisson, L. Norrgren et M. Pesonen. 1998. « Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). » *Arch Environ Contam Toxicol* 34 (3): 306-310. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504980.

Boussadia, O., S. Kutsch, A. Hierholzer, V. Delmas et R. Kemler. 2002. « E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. » *Mech Dev* 115 (1-2): 53-62. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049767.

Braga, V. et A. J. Harwood. 2001. « 'Super glue'. » *Nat Cell Biol* 3 (7): E168-170. doi: 10.1038/35083128.

Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche et J. Pouyssegur. 2007. « Hypoxia and cancer. » *J Mol Med (Berl)* 85 (12): 1301-1307. doi: 10.1007/s00109-007-0281-3.

Breast Cancer Society of Canada. 2016. Consulté le 19 mai 2016. http://www.bcsc.ca/p/40/l/507/t/Breast-Cancer-Society-of-Canada---Stages-of-Breast-Cancer.

breastcancer.org. 2016. Consulté le 19 mai 2016. http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging.

Brisken, C., S. Kaur, T. E. Chavarria, N. Binart, R. L. Sutherland, R. A. Weinberg, P. A. Kelly et C. J. Ormandy. 1999. « Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. » *Dev Biol* 210 (1): 96-106. doi: 10.1006/dbio.1999.9271.

Brisken, C. et B. O'Malley. 2010. « Hormone action in the mammary gland. » *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (12): a003178. doi: 10.1101/cshperspect.a003178.

Brisken, C., S. Park, T. Vass, J. P. Lydon, B. W. O'Malley et R. A. Weinberg. 1998. « A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (9): 5076-5081. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560231.

Brophy, J. T., M. M. Keith, A. Watterson, R. Park, M. Gilbertson, E. Maticka-Tyndale, M. Beck, H. Abu-Zahra, K. Schneider, A. Reinhartz, R. Dematteo et I. Luginaah. 2012. « Breast cancer risk in relation to occupations with exposure to carcinogens and endocrine disruptors: a Canadian case-control study. » *Environ Health* 11: 87. doi: 10.1186/1476-069X-11-87.

Buick, R. N. et M. N. Pollak. 1984. « Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. » *Cancer Res* 44 (11): 4909-4918. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386145.

Bulus, A. D., A. Asci, P. Erkekoglu, A. Balci, N. Andiran et B. Kocer-Gumusel. 2016. « The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. » *Toxicol Mech Methods* : 1-8. doi: 10.3109/15376516.2016.1158894.

Bulynko, Y. A. et B. W. O'Malley. 2011. « Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. » *Biochemistry* 50 (3): 313-328. doi: 10.1021/bi101762x.

Buteau-Lozano, H., G. Velasco, M. Cristofari, P. Balaguer et M. Perrot-Applanat. 2008. « Xenoestrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. » *J Endocrinol* 196 (2): 399-412. doi: 10.1677/JOE-07-0198.

Carriere, F., J. A. Barrowman, R. Verger et R. Laugier. 1993. « Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. » *Gastroenterology* 105 (3): 876-888. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8359655.

Chen, C. Y., Y. Y. Chou, Y. M. Wu, C. C. Lin, S. J. Lin et C. C. Lee. 2013. « Phthalates may promote female puberty by increasing kisspeptin activity. » *Hum Reprod* 28 (10): 2765-2773. Research Support, Non-U.S. Gov't. doi: 10.1093/humrep/det325.

Chen, F. P. et M. H. Chien. 2014. « Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. » *Climacteric* 17 (4): 377-384. doi: 10.3109/13697137.2013.865720.

Chen, X., Q. Qin, W. Zhang, Y. Zhang, H. Zheng, C. Liu, Y. Yang, W. Xiong et J. Yuan. 2013. « Activation of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway promotes DEHP-induced Hep3B cell proliferation. » *Food Chem Toxicol* 59: 325-333. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.016.

Chipman, J. K., A. Mally et G. O. Edwards. 2003. « Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. » *Toxicol Sci* 71 (2): 146-153. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563100.

Chuong, C. M., R. Bhat, R. B. Widelitz et M. J. Bissell. 2014. « SnapShot: Branching Morphogenesis. » *Cell* 158 (5): 1212-1212 e1211. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.019.

Ciarloni, L., S. Mallepell et C. Brisken. 2007. « Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (13): 5455-5460. doi: 10.1073/pnas.0611647104.

Cooper, Astley Paston. 1840. *On the Anatomy of the Breast*. London.

Cox, D. B., J. C. Kent, T. M. Casey, R. A. Owens et P. E. Hartmann. 1999. « Breast growth and the urinary excretion of lactose during human pregnancy and early lactation: endocrine relationships. » *Exp Physiol* 84 (2): 421-434. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226182.

Daniel G. Cyr, Patrick J. Devine et Isabelle Plante. 2016. « Immunohistochemistry and Female Reproductive Toxicology: The Ovary and Mammary Glands. » In *Technical Aspects of Toxicological Immunohistochemistry: System Specific Biomarkers*, 113-145. : Springer New York.

Delisle, A., E. Ferraris et I. Plante. 2015. « Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast. » *Environ Res* 143 (Pt A): 229-240. doi: 10.1016/j.envres.2015.10.020.

Delmas, V., P. Pla, H. Feracci, J. P. Thiery, R. Kemler et L. Larue. 1999. « Expression of the cytoplasmic domain of E-cadherin induces precocious mammary epithelial alveolar formation and affects cell polarity and cell-matrix integrity. » *Dev Biol* 216 (2): 491-506. doi: 10.1006/dbio.1999.9517.

Denison, M. S., A. A. Soshilov, G. He, D. E. DeGroot et B. Zhao. 2011. « Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. » *Toxicol Sci* 124 (1): 1-22. doi: 10.1093/toxsci/kfr218.

DePasquale, J. A., W. A. Samsonoff et J. F. Gierthy. 1994. « 17-beta-Estradiol induced alterations of cell-matrix and intercellular adhesions in a human mammary carcinoma cell line. » *J Cell Sci* 107 (Pt 5): 1241-1254. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929632.

Desdoits-Lethimonier, C., O. Albert, B. Le Bizec, E. Perdu, D. Zalko, F. Courant, L. Lesne, F. Guille, N. Dejucq-Rainsford et B. Jegou. 2012. « Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. » *Hum Reprod* 27 (5): 1451-1459. doi: 10.1093/humrep/des069.

Dianati, E., J. Poiraud, A. Weber-Ouellette et I. Plante. 2016a. « Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and beta-catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. » *Dev Biol* 416 (1): 52-68. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.011.

Dianati, E, J. Poiraud, A. Weber-Ouellette et I. Plante. 2016b. « Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and beta-catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. » *Dev Biol*. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.011.

Diel, P. 2002. « Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. » *Toxicol Lett* 127 (1-3): 217-224. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052661.

Dimastrogiovanni, G., M. Cordoba, I. Navarro, O. Jauregui et C. Porte. 2015. « Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. » *Aquat Toxicol* 165: 277-285. Research Support, Non-U.S. Gov't. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.06.005.

Diry, M., C. Tomkiewicz, C. Koehle, X. Coumoul, K. W. Bock, R. Barouki et C. Transy. 2006. « Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. » *Oncogene* 25 (40): 5570-5574. doi: 10.1038/sj.onc.1209553.

Doll, R. et R. Peto. 1981. « The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. » *J Natl Cancer Inst* 66 (6): 1191-1308. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017215.

Durmaz, E., E. N. Ozmert, P. Erkekoglu, B. Giray, O. Derman, F. Hincal et K. Yurdakok. 2010. « Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. » *Pediatrics* 125 (1): e122-129. doi: 10.1542/peds.2009-0724.

Elsheikh, S. E., A. R. Green, E. A. Rakha, D. G. Powe, R. A. Ahmed, H. M. Collins, D. Soria, J. M. Garibaldi, C. E. Paish, A. A. Ammar, M. J. Grainge, G. R. Ball, M. K.

Abdelghany, L. Martinez-Pomares, D. M. Heery et I. O. Ellis. 2009. « Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. » *Cancer Res* 69 (9): 3802-3809. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3907.

Fata, J. E., Y. Y. Kong, J. Li, T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R. A. Moorehead, R. Elliott, S. Scully, E. B. Voura, D. L. Lacey, W. J. Boyle, R. Khokha et J. M. Penninger. 2000. « The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. » *Cell* 103 (1): 41-50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051546.

Feitelson, M. A., A. Arzumanyan, R. J. Kulathinal, S. W. Blain, R. F. Holcombe, J. Mahajna, M. Marino, M. L. Martinez-Chantar, R. Nawroth, I. Sanchez-Garcia, D. Sharma, N. K. Saxena, N. Singh, P. J. Vlachostergios, S. Guo, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Bilsland, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S. S. Ashraf, C. S. Boosani, G. Guha, M. R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S. I. Mohammed, A. S. Azmi, D. Bhakta, D. Halicka, W. N. Keith et S. Nowsheen. 2015. « Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. » *Semin Cancer Biol* 35 Suppl: S25-54. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.

Feng, S., Z. Cao et X. Wang. 2013. « Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. » *Biochim Biophys Acta* 1836 (2): 197-210. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.05.001.

Fenton, S. E. et L. S. Birnbaum. 2015. « Timing of Environmental Exposures as a Critical Element in Breast Cancer Risk. » *J Clin Endocrinol Metab* 100 (9): 3245-3250. doi: 10.1210/jc.2015-2848.

Finak, G., N. Bertos, F. Pepin, S. Sadekova, M. Souleimanova, H. Zhao, H. Chen, G. Omeroglu, S. Meterissian, A. Omeroglu, M. Hallett et M. Park. 2008. « Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. » *Nat Med* 14 (5): 518-527. doi: 10.1038/nm1764.

Fondation canadienne du cancer du sein. 2016. Consulté le 18 mai 2016. http://www.cbcf.org.

Forster, C., S. Makela, A. Warri, S. Kietz, D. Becker, K. Hultenby, M. Warner et J. A. Gustafsson. 2002. « Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24): 15578-15583. doi: 10.1073/pnas.192561299.

Forster, T., V. Rausch, Y. Zhang, O. Isayev, K. Heilmann, F. Schoensiegel, L. Liu, M. Nessling, K. Richter, S. Labsch, C. C. Nwaeburu, J. Mattern, J. Gladkich, N. Giese, J. Werner, P. Schemmer, W. Gross, M. M. Gebhard, C. Gerhauser, M. Schaefer et I. Herr. 2014. « Sulforaphane counteracts aggressiveness of pancreatic cancer driven by dysregulated Cx43-mediated gap junctional

intercellular communication. » *Oncotarget* 5 (6): 1621-1634. doi: 10.18632/oncotarget.1764.

Fowler, A. M. et E. T. Alarid. 2007. « Amping up estrogen receptors in breast cancer. » *Breast Cancer Res* 9 (4): 305. doi: 10.1186/bcr1748.

Fowler, P. A., M. Bellingham, K. D. Sinclair, N. P. Evans, P. Pocar, B. Fischer, K. Schaedlich, J. S. Schmidt, M. R. Amezaga, S. Bhattacharya, S. M. Rhind et P. J. O'Shaughnessy. 2012. « Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. » *Mol Cell Endocrinol* 355 (2): 231-239. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.021.

Frederiksen, H., N. Jorgensen et A. M. Andersson. 2010. « Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. » *J Anal Toxicol* 34 (7): 400-410. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20822678.

Fromme, H., L. Gruber, R. Schuster, M. Schlummer, M. Kiranoglu, G. Bolte et W. Volkel. 2013. « Phthalate and di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) intake by German infants based on the results of a duplicate diet study and biomonitoring data (INES 2). » *Food Chem Toxicol* 53: 272-280. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.004.

Fromme, H., L. Gruber, E. Seckin, U. Raab, S. Zimmermann, M. Kiranoglu, M. Schlummer, U. Schwegler, S. Smolic, W. Volkel et Hbmnet. 2011. « Phthalates and their metabolites in breast milk--results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). » *Environ Int* 37 (4): 715-722. doi: 10.1016/j.envint.2011.02.008.

Fu, Y., Z. M. Shao, Q. Z. He, B. Q. Jiang, Y. Wu et Z. G. Zhuang. 2015. « Hsa-miR-206 represses the proliferation and invasion of breast cancer cells by targeting Cx43. » *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19 (11): 2091-2104. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125274.

Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1998. « Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. » *J Cell Biol* 141 (7): 1539-1550. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647647.

GLOBOCAN 2012. Consulté le 16 juillet 2016. http://globocan.iarc.fr/Default.aspx.

Gonzalez-Angulo, A. M., J. K. Litton, K. R. Broglio, F. Meric-Bernstam, R. Rakkhit, F. Cardoso, F. Peintinger, E. O. Hanrahan, A. Sahin, M. Guray, D. Larsimont, F. Feoli, H. Stranzl, T. A. Buchholz, V. Valero, R. Theriault, M. Piccart-Gebhart, P. M. Ravdin, D. A. Berry et G. N. Hortobagyi. 2009. « High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-

positive, node-negative tumors 1 cm or smaller. » *Journal of Clinical Oncology* 27 (34): 5700-5706. doi: 10.1200/JCO.2009.23.2025.

Gonzalez-Suarez, E. 2011. « RANKL inhibition: a promising novel strategy for breast cancer treatment. » *Clin Transl Oncol* 13 (4): 222-228. doi: 10.1007/s12094-011-0646-5.

Gonzalez-Suarez, E., D. Branstetter, A. Armstrong, H. Dinh, H. Blumberg et W. C. Dougall. 2007. « RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. » *Mol Cell Biol* 27 (4): 1442-1454. doi: 10.1128/MCB.01298-06.

Gonzalez-Suarez, E., A. P. Jacob, J. Jones, R. Miller, M. P. Roudier-Meyer, R. Erwert, J. Pinkas, D. Branstetter et W. C. Dougall. 2010. « RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. » *Nature* 468 (7320): 103-107. doi: 10.1038/nature09495.

Goodenough, D. A., J. A. Goliger et D. L. Paul. 1996. « Connexins, connexons, and intercellular communication. » *Annu Rev Biochem* 65: 475-502. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355.

Graham, J. D. et C. L. Clarke. 1997. « Physiological action of progesterone in target tissues. » *Endocr Rev* 18 (4): 502-519. doi: 10.1210/edrv.18.4.0308.

Graham, J. D., P. A. Mote, U. Salagame, J. H. van Dijk, R. L. Balleine, L. I. Huschtscha, R. R. Reddel et C. L. Clarke. 2009. « DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast. » *Endocrinology* 150 (7): 3318-3326. doi: 10.1210/en.2008-1630.

Grimm, S. L., T. N. Seagroves, E. B. Kabotyanski, R. C. Hovey, B. K. Vonderhaar, J. P. Lydon, K. Miyoshi, L. Hennighausen, C. J. Ormandy, A. V. Lee, M. A. Stull, T. L. Wood et J. M. Rosen. 2002. « Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. » *Mol Endocrinol* 16 (12): 2675-2691. doi: 10.1210/me.2002-0239.

Grun, F. et B. Blumberg. 2009. « Endocrine disrupters as obesogens. » *Mol Cell Endocrinol* 304 (1-2): 19-29. doi: 10.1016/j.mce.2009.02.018.

Gruvberger-Saal, S. K., P. O. Bendahl, L. H. Saal, M. Laakso, C. Hegardt, P. Eden, C. Peterson, P. Malmstrom, J. Isola, A. Borg et M. Ferno. 2007. « Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. » *Clin Cancer Res* 13 (7): 1987-1994. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1823.

Haldosen, L. A., C. Zhao et K. Dahlman-Wright. 2014. « Estrogen receptor beta in breast cancer. » *Mol Cell Endocrinol* 382 (1): 665-672. doi: 10.1016/j.mce.2013.08.005.

Hanahan, D. et R. A. Weinberg. 2000. « The hallmarks of cancer. » *Cell* 100 (1): 57-70. Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931.

Hankinson, S. E., G. A. Colditz et W. C. Willett. 2004. « Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. » *Breast Cancer Res* 6 (5): 213-218. doi: 10.1186/bcr921.

Hao, C., X. Cheng, H. Xia et X. Ma. 2012. « The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. » *Biosci Rep* 32 (6): 619-629. Research Support, Non-U.S. Gov't. doi: 10.1042/BSR20120042.

Harari, D. et Y. Yarden. 2000. « Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. » *Oncogene* 19 (53): 6102-6114. doi: 10.1038/sj.onc.1203973.

Harris, A. L. 2007. « Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. » *Prog Biophys Mol Biol* 94 (1-2): 120-143. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011.

Hecht, S. S. 2012. « Lung carcinogenesis by tobacco smoke. » *Int J Cancer* 131 (12): 2724-2732. doi: 10.1002/ijc.27816.

Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner et J. A. Gustafsson. 2007. « Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. » *Physiol Rev* 87 (3): 905-931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.

Hennighausen, L. et G. W. Robinson. 2005. « Information networks in the mammary gland. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (9): 715-725. doi: 10.1038/nrm1714.

Hernandez-Hernandez, O. T. et I. Camacho-Arroyo. 2013. « Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF. » *Mini Rev Med Chem* 13 (5): 635-642. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432380.

Herreros, M. A., T. Encinas, L. Torres-Rovira, R. A. Garcia-Fernandez, J. M. Flores, J. M. Ros et A. Gonzalez-Bulnes. 2013. « Exposure to the endocrine disruptor di(2-ethylhexyl)phthalate affects female reproductive features by altering pulsatile LH secretion. » *Environ Toxicol Pharmacol* 36 (3): 1141-1149. doi: 10.1016/j.etap.2013.09.020.

Hess, M. W., K. Pfaller, H. L. Ebner, B. Beer, D. Hekl et T. Seppi. 2010. « 3D versus 2D cell culture implications for electron microscopy. » *Methods Cell Biol* 96: 649-670. doi: 10.1016/S0091-679X(10)96027-5.

Hilton, H. N., J. D. Graham et C. L. Clarke. 2015. « Minireview: Progesterone Regulation of Proliferation in the Normal Human Breast and in Breast Cancer: A Tale of Two Scenarios? » *Mol Endocrinol* 29 (9): 1230-1242. doi: 10.1210/me.2015-1152.

Hirschi, K. K., C. E. Xu, T. Tsukamoto et R. Sager. 1996. « Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. » *Cell Growth Differ* 7 (7): 861-870. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809403.

Hogeveen, H., W. Ouweltjes, C. J. A. M. de Koning et K. Stelwagen. 2001. « Milking interval, milk production and milk flow-rate in an automatic milking system. » *Livestock Production Science* 72 (1-2): 157-167. doi: Doi 10.1016/S0301-6226(01)00276-7.

Hopp, T. A., H. L. Weiss, S. G. Hilsenbeck, Y. Cui, D. C. Allred, K. B. Horwitz et S. A. Fuqua. 2004. « Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. » *Clin Cancer Res* 10 (8): 2751-2760. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102680.

Hu, M., J. Yao, L. Cai, K. E. Bachman, F. van den Brule, V. Velculescu et K. Polyak. 2005. « Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. » *Nat Genet* 37 (8): 899-905. doi: 10.1038/ng1596.

Hughes, K., J. A. Wickenden, J. E. Allen et C. J. Watson. 2012. « Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. » *J Pathol* 227 (1): 106-117. doi: 10.1002/path.3961.

Humphreys, R. C., J. Lydon, B. W. O'Malley et J. M. Rosen. 1997. « Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. » *Mol Endocrinol* 11 (6): 801-811. doi: 10.1210/mend.11.6.9891.

IARC. 2012. *Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Consulté le 2 juin 2016. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. et National Research Council (U.S.). 1999. *Monoclonal antibody production*. Washington, D.C.: National Academy Press.

Itoh, M. et M. J. Bissell. 2003. « The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. » *J Mammary*

Gland Biol Neoplasia 8 (4): 449-462. doi: 10.1023/B:JOMG.0000017431.45314.07.

Jacobsen, B. M., J. K. Richer, C. A. Sartorius et K. B. Horwitz. 2003. « Expression profiling of human breast cancers and gene regulation by progesterone receptors. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8 (3): 257-268. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973372.

Jamieson, S., J. J. Going, R. D'Arcy et W. D. George. 1998. « Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. » *J Pathol* 184 (1): 37-43. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199801)184:1<37::AID-PATH966>3.0.CO;2-D.

Jensen, E. V. 1962. « On the mechanism of estrogen action. » *Perspect Biol Med* 6: 47-59. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13957617.

John, K., R. L. Divi, C. Keshava, C. C. Orozco, M. E. Schockley, D. L. Richardson, M. C. Poirier, J. Nath et A. Weston. 2010. « CYP1A1 and CYP1B1 gene expression and DNA adduct formation in normal human mammary epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene in the absence or presence of chlorophyllin. » *Cancer Lett* 292 (2): 254-260. doi: 10.1016/j.canlet.2009.12.008.

Johns, L. E., G. S. Cooper, A. Galizia et J. D. Meeker. 2015. « Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates. » *Environ Int* 85: 27-39. Review. doi: 10.1016/j.envint.2015.08.005.

Johnston, S. R. et M. Dowsett. 2003. « Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. » *Nat Rev Cancer* 3 (11): 821-831. doi: 10.1038/nrc1211.

Kang, N. J., S. H. Shin, H. J. Lee et K. W. Lee. 2011. « Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. » *Pharmacol Ther* 130 (3): 310-324. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.02.004.

Kenney, N. J., A. Bowman, K. S. Korach, J. C. Barrett et D. S. Salomon. 2003. « Effect of exogenous epidermal-like growth factors on mammary gland development and differentiation in the estrogen receptor-alpha knockout (ERKO) mouse. » *Breast Cancer Res Treat* 79 (2): 161-173. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12825851.

Kessler, W., W. Numtip, W. Volkel, E. Seckin, G. A. Csanady, C. Putz, D. Klein, H. Fromme et J. G. Filser. 2012. « Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood and of DEHP metabolites in urine of male volunteers after single ingestion of ring-deuterated DEHP. » *Toxicol Appl Pharmacol* 264 (2): 284-291. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.009.

Key, T. J., P. K. Verkasalo et E. Banks. 2001. « Epidemiology of breast cancer. » *Lancet Oncol* 2 (3): 133-140. doi: 10.1016/S1470-2045(00)00254-0.

Khan, S. I., P. Aumsuwan, I. A. Khan, L. A. Walker et A. K. Dasmahapatra. 2012. « Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. » *Chem Res Toxicol* 25 (1): 61-73. Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review. doi: 10.1021/tx200378c.

Kim, I. Y., S. Y. Han et A. Moon. 2004. « Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. » *J Toxicol Environ Health A* 67 (23-24): 2025-2035. doi: 10.1080/15287390490514750.

Kim, J. H., H. Park, J. Lee, G. Cho, S. Choi, G. Choi, S. Y. Kim, S. H. Eun, E. Suh, S. K. Kim, H. J. Kim, G. H. Kim, J. J. Lee, Y. D. Kim, S. Eom, S. Kim, H. B. Moon, J. Park, K. Choi, S. Kim et S. Kim. 2016. « Association of diethylhexyl phthalate with obesity-related markers and body mass change from birth to 3 months of age. » *J Epidemiol Community Health* 70 (5): 466-472. doi: 10.1136/jech-2015-206315.

Kim, S., J. Lee, J. Park, H. J. Kim, G. Cho, G. H. Kim, S. H. Eun, J. J. Lee, G. Choi, E. Suh, S. Choi, S. Kim, Y. D. Kim, S. K. Kim, S. Y. Kim, S. Kim, S. Eom, H. B. Moon, S. Kim et K. Choi. 2015. « Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. » *Sci Total Environ* 508: 13-19. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.11.019.

Kim, Y. H., S. H. Kim, H. W. Lee, H. D. Chae, C. H. Kim et B. M. Kang. 2010. « Increased viability of endometrial cells by in vitro treatment with di-(2-ethylhexyl) phthalate. » *Fertil Steril* 94 (6): 2413-2416. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.027.

Knudsen, K. A. et M. J. Wheelock. 2005. « Cadherins and the mammary gland. » *J Cell Biochem* 95 (3): 488-496. doi: 10.1002/jcb.20419.

Koch, H. M., R. Preuss et J. Angerer. 2006. « Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. » *Int J Androl* 29 (1): 155-165; discussion 181-155. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00607.x.

Komen, Susan G. 2015. « Molecular Subtypes of Breast Cancer. ». http://ww5.komen.org/BreastCancer/SubtypesofBreastCancer.html.

Kondaveeti, Y., I. K. Guttilla Reed et B. A. White. 2015. « Epithelial-mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. » *Cancer Lett* 364 (1): 44-58. doi: 10.1016/j.canlet.2015.04.025.

Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Pelto-Huikko, S. Nilsson et J. A. Gustafsson. 1996. « Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (12): 5925-5930. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650195.

Laird, D. W. 2006. « Life cycle of connexins in health and disease. » *Biochem J* 394 (Pt 3): 527-543. doi: 10.1042/BJ20051922.

Laird, D.W. 2010. « The gap junction proteome and its relationship to disease. » *Trends Cell Biol* 20 (2): 92-101. doi: 10.1016/j.tcb.2009.11.001.

Laird, D. W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H. T. Huynh, G. D. Carystinos et M. A. Alaoui-Jamali. 1999. « Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. » *Cancer Res* 59 (16): 4104-4110. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463615.

Lange, C. A. et D. Yee. 2008. « Progesterone and breast cancer. » *Womens Health (Lond Engl)* 4 (2): 151-162. doi: 10.2217/17455057.4.2.151.

Latini, G., C. De Felice, G. Presta, A. Del Vecchio, I. Paris, F. Ruggieri et P. Mazzeo. 2003. « Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. » *Biol Neonate* 83 (1): 22-24. doi: 67012.

Lazennec, G., D. Bresson, A. Lucas, C. Chauveau et F. Vignon. 2001. « ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. » *Endocrinology* 142 (9): 4120-4130. doi: 10.1210/endo.142.9.8395.

Lee, B. K., M. Y. Chung et K. W. Lee. 2015. « Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inhibits gap junction intercellular communication via phosphorylation of tumor progression locus 2 in WB-F344 rat liver epithelial cells. » *Mol Carcinog* 54 (5): 351-358. doi: 10.1002/mc.22103.

Lee, K. I., C. W. Chiang, H. C. Lin, J. F. Zhao, C. T. Li, S. K. Shyue et T. S. Lee. 2015. « Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure deregulates blood pressure, adiposity, cholesterol metabolism and social interaction in mouse offspring. » *Arch Toxicol*. doi: 10.1007/s00204-015-1539-0.

Leygue, E. et L. C. Murphy. 2013. « A bi-faceted role of estrogen receptor beta in breast cancer. » *Endocr Relat Cancer* 20 (3): R127-139. doi: 10.1530/ERC-12-0389.

Lodish, H., A. Berk, CA. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon et MP. Scott. 2000. *Molecular Cell Biology, Seventh Edition*. : Parker K.

Lydon, J. P., F. J. DeMayo, C. R. Funk, S. K. Mani, A. R. Hughes, C. A. Montgomery, Jr., G. Shyamala, O. M. Conneely et B. W. O'Malley. 1995. « Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. » *Genes Dev* 9 (18): 2266-2278. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557380.

Ma, M., Y. Zhang, X. Pei et Z. Duan. 2011. « [Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure on reproductive development and PPARs in prepubertal female rats]. » *Wei Sheng Yan Jiu* 40 (6): 688-692, 697. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279657.

Mallepell, S., A. Krust, P. Chambon et C. Brisken. 2006. « Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (7): 2196-2201. doi: 10.1073/pnas.0510974103.

Mankidy, R., S. Wiseman, H. Ma et J. P. Giesy. 2013. « Biological impact of phthalates. » *Toxicol Lett* 217 (1): 50-58. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.11.025.

Market Study: Plasticizers (3rd edition). 2013.

Martinez-Arguelles, D. B. et V. Papadopoulos. 2015. « Identification of hot spots of DNA methylation in the adult male adrenal in response to in utero exposure to the ubiquitous endocrine disruptor plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate. » *Endocrinology* 156 (1): 124-133. doi: 10.1210/en.2014-1436.

Martino-Andrade, A. J. et I. Chahoud. 2010. « Reproductive toxicity of phthalate esters. » *Mol Nutr Food Res* 54 (1): 148-157. doi: 10.1002/mnfr.200800312.

Maskarinec, G. et J. J. Noh. 2004. « The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. » *Ethn Dis* 14 (3): 431-439. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328946.

McGowan, E. M. et C. L. Clarke. 1999. « Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. » *Mol Endocrinol* 13 (10): 1657-1671. doi: 10.1210/mend.13.10.0356.

McGowan, E. M., S. Saad, L. J. Bendall, K. F. Bradstock et C. L. Clarke. 2004. « Effect of progesterone receptor a predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. » *Breast Cancer Res Treat* 83 (3): 211-220. doi: 10.1023/B:BREA.0000014041.58977.80.

McIntosh, B. E., J. B. Hogenesch et C. A. Bradfield. 2010. « Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. » *Annu Rev Physiol* 72: 625-645. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135922.

McSherry, E. A., S. Donatello, A. M. Hopkins et S. McDonnell. 2007. « Molecular basis of invasion in breast cancer. » *Cell Mol Life Sci* 64 (24): 3201-3218. doi: 10.1007/s00018-007-7388-0.

Medina, D. 1996. « The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1 (1): 5-19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887477.

Meeker, J. D., A. M. Calafat et R. Hauser. 2009. « Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. » *J Androl* 30 (3): 287-297. doi: 10.2164/jandrol.108.006403.

Mesnil, M., S. Crespin, J. L. Avanzo et M. L. Zaidan-Dagli. 2005. « Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. » *Biochim Biophys Acta* 1719 (1-2): 125-145. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.11.004.

Monaghan, P., C. Clarke, N. P. Perusinghe, D. W. Moss, X. Y. Chen et W. H. Evans. 1996. « Gap junction distribution and connexin expression in human breast. » *Exp Cell Res* 223 (1): 29-38. doi: 10.1006/excr.1996.0055.

Moolgavkar, S. H. et A. G. Knudson, Jr. 1981. « Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. » *J Natl Cancer Inst* 66 (6): 1037-1052. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6941039.

Mote, P. A., S. Bartow, N. Tran et C. L. Clarke. 2002. « Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. » *Breast Cancer Res Treat* 72 (2): 163-172. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038707.

Moyer, B. et M. L. Hixon. 2012. « Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). » *Reprod Toxicol* 34 (1): 43-50. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.02.006.

Mulac-Jericevic, B., R. A. Mullinax, F. J. DeMayo, J. P. Lydon et O. M. Conneely. 2000. « Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. » *Science* 289 (5485): 1751-1754. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976068.

Obr, A. E. et D. P. Edwards. 2012. « The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. » *Mol Cell Endocrinol* 357 (1-2): 4-17. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.030.

Oesterreich, S., W. Deng, S. Jiang, X. Cui, M. Ivanova, R. Schiff, K. Kang, D. L. Hadsell, J. Behrens et A. V. Lee. 2003. « Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. » *Cancer Res* 63 (17): 5203-5208. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500345.

Ohtake, T., I. Kimijima, T. Fukushima, M. Yasuda, K. Sekikawa, S. Takenoshita et R. Abe. 2001. « Computer-assisted complete three-dimensional reconstruction of the mammary ductal/lobular systems: implications of ductal anastomoses for breast-conserving surgery. » *Cancer* 91 (12): 2263-2272. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413514.

Okubo, T; Suzuki, T; Yokoyama, Y; Kano, K; Kano, I. 2003. « Estimation of Estrogenic and Anti-estrogenic Activities of Some Phthalate Diesters and Monoesters by

MCF-7 Cell Proliferation Assay in Vitro. » *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26 (8): 1219-1224.

Oral, D., P. Erkekoglu, B. Kocer-Gumusel et M. W. Chao. 2016. « Epithelial-Mesenchymal Transition: A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A. » *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 35 (1): 43-58. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016014200.

Pang, W. W. et P. E. Hartmann. 2007. « Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12 (4): 211-221. doi: 10.1007/s10911-007-9054-4.

Parker, C., R. S. Rampaul, S. E. Pinder, J. A. Bell, P. M. Wencyk, R. W. Blamey, R. I. Nicholson et J. F. Robertson. 2001. « E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. » *Br J Cancer* 85 (12): 1958-1963. doi: 10.1054/bjoc.2001.2178.

Partsch, C. J. et W. G. Sippell. 2001. « Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. » *Hum Reprod Update* 7 (3): 292-302. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11392376.

Paterni, I., C. Granchi, J. A. Katzenellenbogen et F. Minutolo. 2014. « Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. » *Steroids* 90: 13-29. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown et D. Botstein. 2000. « Molecular portraits of human breast tumours. » *Nature* 406 (6797): 747-752. doi: 10.1038/35021093.

Pfeifer, G. P. 2015. « How the environment shapes cancer genomes. » *Curr Opin Oncol* 27 (1): 71-77. doi: 10.1097/CCO.0000000000000152.

Pitot, H. C. et Y. P. Dragan. 1991. « Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. » *FASEB J* 5 (9): 2280-2286. Review. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860619.

Planas-Silva, M. D., Y. Shang, J. L. Donaher, M. Brown et R. A. Weinberg. 2001. « AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. » *Cancer Res* 61 (10): 3858-3862. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358796.

Plante, I., M. Charbonneau et D. G. Cyr. 2002. « Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. » *Carcinogenesis* 23 (7): 1243-1249. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117784.

Pleasance, E. D., R. K. Cheetham, P. J. Stephens, D. J. McBride, S. J. Humphray, C. D. Greenman, I. Varela, M. L. Lin, G. R. Ordonez, G. R. Bignell, K. Ye, J. Alipaz, M. J. Bauer, D. Beare, A. Butler, R. J. Carter, L. Chen, A. J. Cox, S. Edkins, P. I. Kokko-Gonzales, N. A. Gormley, R. J. Grocock, C. D. Haudenschild, M. M. Hims, T. James, M. Jia, Z. Kingsbury, C. Leroy, J. Marshall, A. Menzies, L. J. Mudie, Z. Ning, T. Royce, O. B. Schulz-Trieglaff, A. Spiridou, L. A. Stebbings, L. Szajkowski, J. Teague, D. Williamson, L. Chin, M. T. Ross, P. J. Campbell, D. R. Bentley, P. A. Futreal et M. R. Stratton. 2010. « A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. » *Nature* 463 (7278): 191-196. doi: 10.1038/nature08658.

Pointis, G., J. Gilleron, D. Carette et D. Segretain. 2011. « Testicular connexin 43, a precocious molecular target for the effect of environmental toxicants on male fertility. » *Spermatogenesis* 1 (4): 303-317. doi: 10.4161/spmg.1.4.18392.

Polyak, K. 2007. « Breast cancer: origins and evolution. » *J Clin Invest* 117 (11): 3155-3163. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Review. doi: 10.1172/JCI33295.

Prat, A. et C. M. Perou. 2011. « Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. » *Mol Oncol* 5 (1): 5-23. doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.003.

Roskoski, R., Jr. 2014. « The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. » *Pharmacol Res* 79: 34-74. doi: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.

Rozati, R., P. P. Reddy, P. Reddanna et R. Mujtaba. 2002. « Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. » *Fertil Steril* 78 (6): 1187-1194. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477510.

Russo, J., G. Calaf, L. Roi et I. H. Russo. 1987. « Influence of age and gland topography on cell kinetics of normal human breast tissue. » *J Natl Cancer Inst* 78 (3): 413-418. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3469454.

Russo, J., R. Rivera et I. H. Russo. 1992. « Influence of age and parity on the development of the human breast. » *Breast Cancer Res Treat* 23 (3): 211-218. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1463860.

Safe, S., S. O. Lee et U. H. Jin. 2013. « Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. » *Toxicol Sci* 135 (1): 1-16. doi: 10.1093/toxsci/kft128.

Schmidt, J.S; Schaedlich, K; Fiandanese, N; Pocar, P; Fisher, B. 2012. « Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and Adipogenesis in C3H/N Mice. » *Environmental Health Perspectives* 120. doi: 10.1289/.

Sheikh, I. A. 2016. « Stereoselectivity and the potential endocrine disrupting activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) against human progesterone receptor: a computational perspective. » *J Appl Toxicol* 36 (5): 741-747. doi: 10.1002/jat.3302.

Shin, I. S., M. Y. Lee, E. S. Cho, E. Y. Choi, H. Y. Son et K. Y. Lee. 2014. « Effects of maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) during pregnancy on susceptibility to neonatal asthma. » *Toxicol Appl Pharmacol* 274 (3): 402-407. doi: 10.1016/j.taap.2013.12.009.

Shyamala, G., X. Yang, R. D. Cardiff et E. Dale. 2000. « Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7): 3044-3049. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737785.

Shyamala, G., X. Yang, G. Silberstein, M. H. Barcellos-Hoff et E. Dale. 1998. « Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2): 696-701. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435255.

Sims, J. N., B. Graham, M. Pacurari, S. S. Leggett, P. B. Tchounwou et K. Ndebele. 2014. « Di-ethylhexylphthalate (DEHP) modulates cell invasion, migration and anchorage independent growth through targeting S100P in LN-229 glioblastoma cells. » *Int J Environ Res Public Health* 11 (5): 5006-5019. doi: 10.3390/ijerph110505006.

Smart, C. E., B. J. Morrison, J. M. Saunus, A. C. Vargas, P. Keith, L. Reid, L. Wockner, M. Askarian-Amiri, D. Sarkar, P. T. Simpson, C. Clarke, C. W. Schmidt, B. A. Reynolds, S. R. Lakhani et J. A. Lopez. 2013. « In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. » *PLoS One* 8 (6): e64388. doi: 10.1371/journal.pone.0064388.

Sobarzo, C. M., L. Lustig, R. Ponzio, M. O. Suescun et B. Denduchis. 2009. « Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on gap and tight junction protein expression in the testis of prepubertal rats. » *Microsc Res Tech* 72 (11): 868-877. doi: 10.1002/jemt.20741.

Société canadienne du cancer. 2016. Consulté le 4 mai 2016. http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/anatomy-and-physiology/?region=qc.

Soyal, S., P. M. Ismail, J. Li, B. Mulac-Jericevic, O. M. Conneely et J. P. Lydon. 2002. « Progesterone's role in mammary gland development and tumorigenesis as disclosed by experimental mouse genetics. » *Breast Cancer Res* 4 (5): 191-196. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223123.

Soysal, S. D., A. Tzankov et S. E. Muenst. 2015. « Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. » *Pathobiology* 82 (3-4): 142-152. doi: 10.1159/000430499.

Spink, D. C., S. J. Wu, B. C. Spink, M. M. Hussain, D. D. Vakharia, B. T. Pentecost et L. S. Kaminsky. 2008. « Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. » *Toxicol Appl Pharmacol* 226 (3): 213-224. doi: 10.1016/j.taap.2007.08.024.

Stelwagen, K., S. R. Davis, V. C. Farr, C. G. Prosser et R. A. Sherlock. 1994. « Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. » *J Dairy Sci* 77 (2): 426-432. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)76969-1.

Stevenson, B. R. et B. H. Keon. 1998. « The tight junction: morphology to molecules. » *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 89-109. doi: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.89.

Strom, A., J. Hartman, J. S. Foster, S. Kietz, J. Wimalasena et J. A. Gustafsson. 2004. « Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (6): 1566-1571. doi: 10.1073/pnas.0308319100.

Suzuki, Y., J. Yoshinaga, Y. Mizumoto, S. Serizawa et H. Shiraishi. 2012. « Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. » *Int J Androl* 35 (3): 236-244. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01190.x.

Takeuchi, S., M. Iida, S. Kobayashi, K. Jin, T. Matsuda et H. Kojima. 2005. « Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. » *Toxicology* 210 (2-3): 223-233. doi: 10.1016/j.tox.2005.02.002.

Tanay Das, M., M. Kumar et I. S. Thakur. 2014. « Differential toxicological endpoints of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines: possible estrogen receptor alpha (ERalpha) independent modulations. » *Indian J Exp Biol* 52 (11): 1052-1061. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434100.

Teleki, I., A. M. Szasz, M. E. Maros, B. Gyorffy, J. Kulka, N. Meggyeshazi, G. Kiszner, P. Balla, A. Samu et T. Krenacs. 2014. « Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. » *PLoS One* 9 (11): e112541. doi: 10.1371/journal.pone.0112541.

Testa, C., F. Nuti, J. Hayek, C. De Felice, M. Chelli, P. Rovero, G. Latini et A. M. Papini. 2012. « Di-(2-ethylhexyl) phthalate and autism spectrum disorders. » *ASN Neuro* 4 (4): 223-229. doi: 10.1042/AN20120015.

Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang et M. A. Nieto. 2009. « Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. » *Cell* 139 (5): 871-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.

Tight junctions. 2011. https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/2011_Group_3_Project.

Trosko, J. E. 1996. « Role of low-level ionizing radiation in multi-step carcinogenic process. » *Health Phys* 70 (6): 812-822. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635905.

Trosko, J. E. et R. J. Ruch. 1998. « Cell-cell communication in carcinogenesis. » *Front Biosci* 3: d208-236. Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9458335.

Vandenberg, L. N., T. Colborn, T. B. Hayes, J. J. Heindel, D. R. Jacobs, Jr., D. H. Lee, J. P. Myers, T. Shioda, A. M. Soto, F. S. vom Saal, W. V. Welshons et R. T. Zoeller. 2013. « Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. » *Reprod Toxicol* 38: 1-15. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.02.002.

Vegeto, E., M. M. Shahbaz, D. X. Wen, M. E. Goldman, B. W. O'Malley et D. P. McDonnell. 1993. « Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. » *Mol Endocrinol* 7 (10): 1244-1255. doi: 10.1210/mend.7.10.8264658.

Venkata, N. G., J. A. Robinson, P. J. Cabot, B. Davis, G. R. Monteith et S. J. Roberts-Thomson. 2006. « Mono(2-ethylhexyl)phthalate and mono-n-butyl phthalate activation of peroxisome proliferator activated-receptors alpha and gamma in breast. » *Toxicol Lett* 163 (3): 224-234. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.11.001.

Visvader, J. E. 2009. « Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. » *Genes Dev* 23 (22): 2563-2577. doi: 10.1101/gad.1849509.

Wang, Y. X., Q. Zeng, Y. Sun, L. You, P. Wang, M. Li, P. Yang, J. Li, Z. Huang, C. Wang, S. Li, Y. Dan, Y. F. Li et W. Q. Lu. 2015. « Phthalate exposure in association with serum hormone levels, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis: A cross-sectional study in China. » *Environ Res*. doi: 10.1016/j.envres.2015.11.023.

Wei, C. J., X. Xu et C. W. Lo. 2004. « Connexins and cell signaling in development and disease. » *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 811-838. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.144309.

Weihua, Z., S. Saji, S. Makinen, G. Cheng, E. V. Jensen, M. Warner et J. A. Gustafsson. 2000. « Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. »

Proc Natl Acad Sci U S A 97 (11): 5936-5941. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823946.

Weinstein, I. B. 1988. « The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. » *Cancer Res* 48 (15): 4135-4143. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3292040.

Wendt, M. K., M. A. Taylor, B. J. Schiemann et W. P. Schiemann. 2011. « Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. » *Mol Biol Cell* 22 (14): 2423-2435. doi: 10.1091/mbc.E11-04-0306.

Wetmore, B. A. 2015. « Quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation in a high-throughput environment. » *Toxicology* 332: 94-101. doi: 10.1016/j.tox.2014.05.012.

Wolff, M. S., S. L. Teitelbaum, S. M. Pinney, G. Windham, L. Liao, F. Biro, L. H. Kushi, C. Erdmann, R. A. Hiatt, M. E. Rybak, A. M. Calafat, Cancer Breast et Centers Environment Research. 2010. « Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. » *Environ Health Perspect* 118 (7): 1039-1046. doi: 10.1289/ehp.0901690.

Wong, Eric. 2012. *Breast cancer pathogenesis and histologic vs. molecular subtypes*. Consulté le 25 mai 2016. http://www.pathophys.org/breast-cancer/.

Wrzesinski, K. et S. J. Fey. 2015. « From 2D to 3D--a New Dimension for Modelling the Effect of Natural Products on Human Tissue. » *Curr Pharm Des* 21 (38): 5605-5616. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26429710.

Yarden, Y. et M. X. Sliwkowski. 2001. « Untangling the ErbB signalling network. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2): 127-137. doi: 10.1038/35052073.

Yeatman, T. J. 2004. « A renaissance for SRC. » *Nat Rev Cancer* 4 (6): 470-480. doi: 10.1038/nrc1366.

Yong, W., C. Jiao, W. Jianhui, Z. Yan, P. Qi, W. Xiu, S. Zuyue et Z. Yunhui. 2016. « Mono-2-ethyhexyl phthalate advancing the progression of prostate cancer through activating the hedgehog pathway in LNCaP cells. » *Toxicol In Vitro* 32: 86-91. doi: 10.1016/j.tiv.2015.12.012.

Zhang, X. L., H. S. Wang, N. Liu et L. C. Ge. 2015. « Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. » *Arch Biochem Biophys* 585: 10-16. doi: 10.1016/j.abb.2015.09.006.

Zimmermann, S., L. Gruber, M. Schlummer, S. Smolic et H. Fromme. 2012. « Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels. » *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29 (11): 1780-1790. doi: 10.1080/19440049.2012.704529.

ANNEXE I : Résultats supplémentaires

Des études ont démontré que les phthalates pourraient influencer l'activité des PPARs, des acteurs importants dans l'homéostasie de l'énergie cellulaire. Ainsi, une exposition au DEHP pourrait provoquer un déséquilibre dans le métabolisme lipidique, altérer la prolifération et la différenciation cellulaire et augmenter les risques de développer un cancer du sein. Les expériences présentées dans cette annexe avaient pour but de déterminer si une exposition au DEHP et au mEHP pouvait activer la voie de signalisation des PPARs *in vitro*. Ces résultats seront inclus dans un manuscrit (en préparation) dans lequel des résultats similaires quant à la régulation de PPAR sont reportés suite à une exposition périnatale au DEHP chez le rat donc dans un contexte *in vivo*.

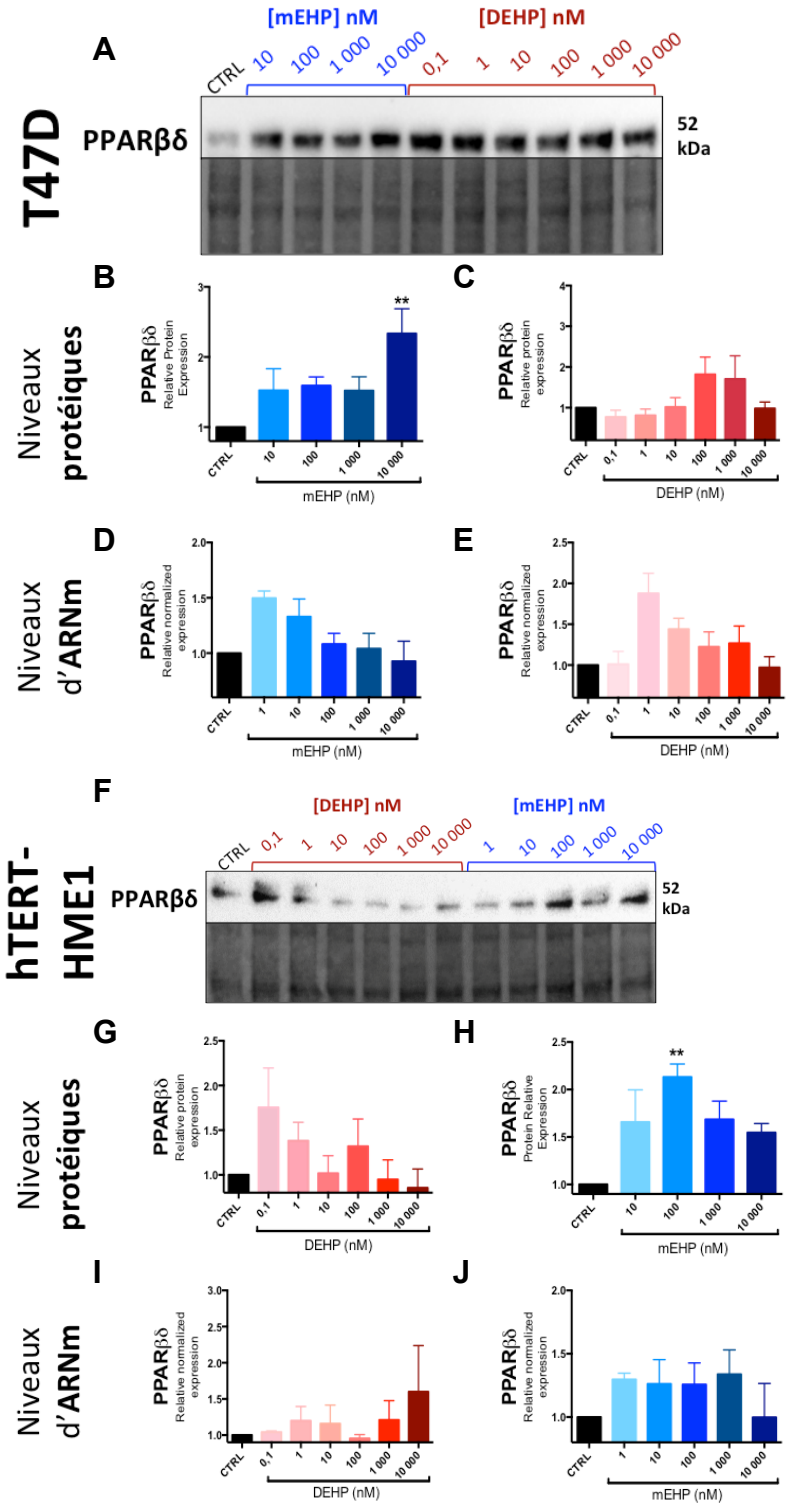


Figure 1: L'exposition au DEHP et au mEHP augmente l'expression protéique de PPARβδ chez les cellules T47D et les cellules hTERT-HME1. Les cellules T47D and hTERT-HME1 ont été exposées à des doses allant de 0.1 à 10 000 nM de DEHP et de mEHP pour 5 jours. Les cellules ont été lysées et les protéines et l'ARNm ont été extraits. L'expression protéique **(B,C,G,H)** et génique **(D,E,I,J)** de PPARβδ ont été déterminé par western blot et par RT-qPCR respectivement. Un immunoblot représentatif de PPARβδ est démontré en **(A)** pour les cellules T47D et en **(F)** pour les cellules hTERT-HME1. Les graphiques représentent entre 3-5 différentes expérimentations **(B-E,G-J)** (Means ± SEM). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

T-47D

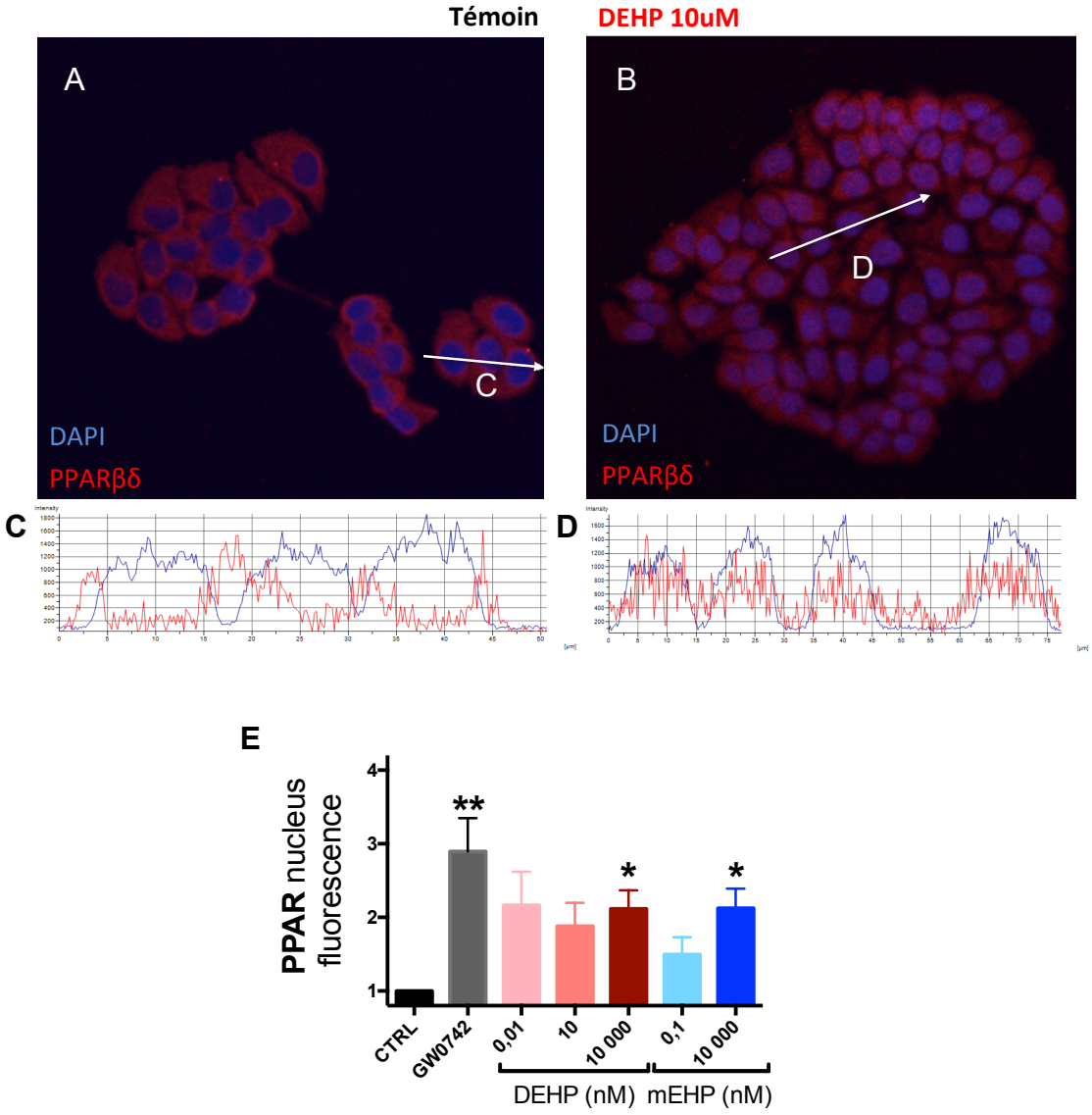


Figure 2: Une exposition au DEHP et au mEHP déclenche la translocation nucléaire de PPARβδ chez les cellules T-47D. Les cellules T-47D ont été exposé au DEHP et au mEHP à des doses entre 0,1 et 10 000 nM pour 5 jours. Les cellules ont d'abord été fixées pour ensuite être soumises à l'immunofluorescence. La présence de PPARβδ est représenté en rouge pour les cellules témoins **(A)** et pour les cellules exposées à 10 000nM de DEHP **(B)**. L'intensité nucléaire de PPARβδ est représentée par les flèches pour les cellules témoins **(C)** et les cellules ayant été exposées à 10 000nM de DEHP **(D)** Le graphique représente la moyenne de 5 expériences différentes, GW0742 étant un agoniste de PPARβδ **(E)** (Means ± SEM). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

hTERT-HME1

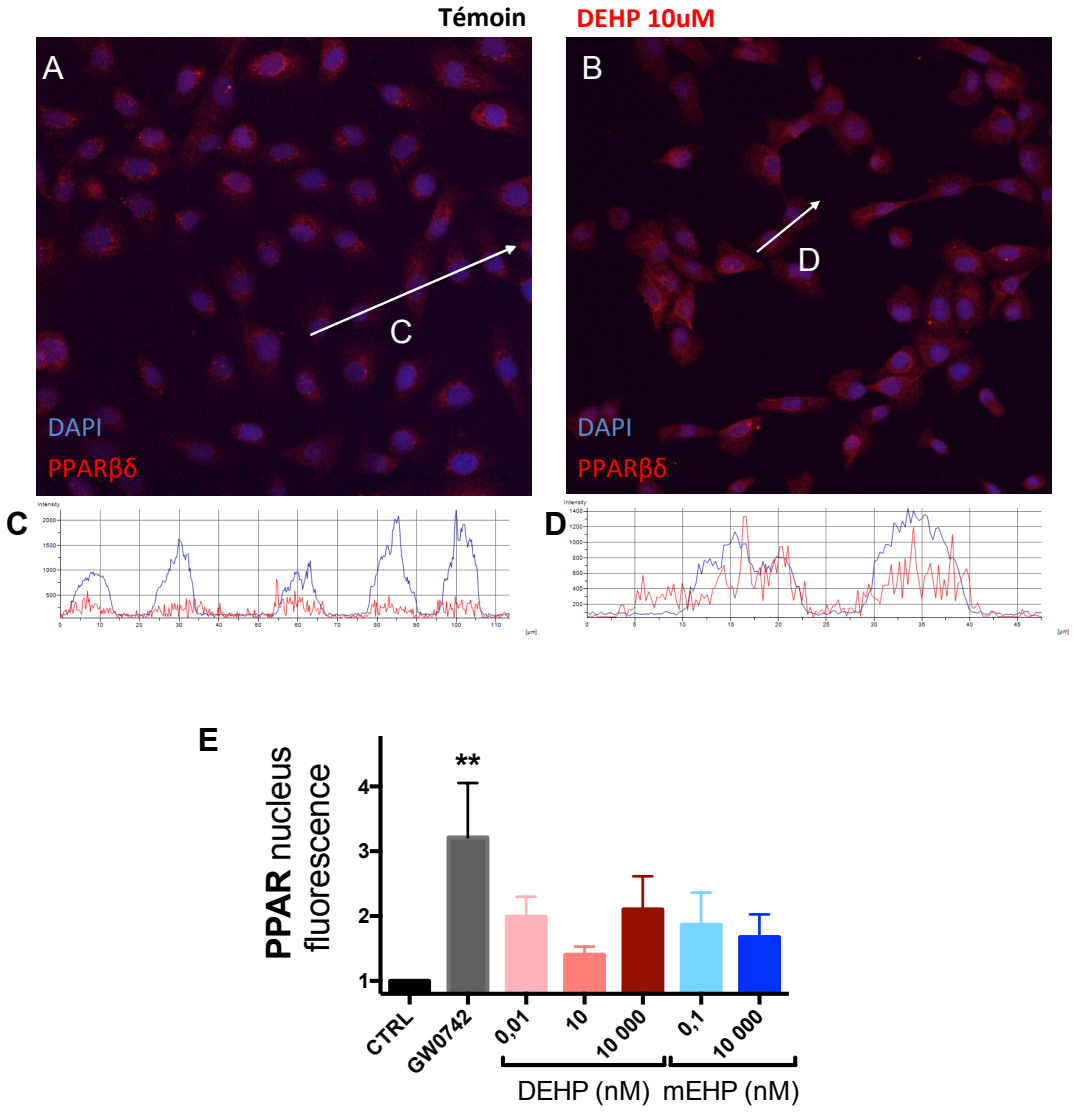


Figure 3: Une exposition au DEHP et au mEHP tend à déclencher la translocation nucléaire de PPARβδ chez les cellules hTERT-HME1. Les cellules hTERT-HME1 ont été exposé au DEHP et au mEHP à des doses entre 0,1 et 10 000 nM pour 5 jours. Les cellules ont d'abord été fixées pour ensuite être soumises à l'immunofluorescence. L'expression de PPARβδ est représenté en rouge pour les cellules témoins **(A)** et pour les cellules exposées à 10 000nM de DEHP **(B)**. L'intensité de PPARβδ est représentée par les flèches pour les cellules témoins **(C)** et les cellules ayant été exposées à 10 000nM de DEHP **(D)** Le graphique représente la moyenne de 5 expériences différentes, GW0742 étant un agoniste de PPARβδ **(E)** (Means ± SEM). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

ANNEXE II: Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast

Environmental Research 143 (2015) 229–240

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast

Ariane Delisle, Emanuelle Ferraris, Isabelle Plante *

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 July 2015
Received in revised form
29 September 2015
Accepted 19 October 2015

Keywords:
Connexin43
Hexachlorobenzene
Akt
Breast
Gap junction
ILK

ABSTRACT

Decreased expression of connexins has been associated with cancer, but the underlying mechanisms are poorly understood. We have previously shown that a 5 day exposure to hexachlorobenzene (HCB) resulted in decreased connexins expression in hepatocytes 45 days later, and that this down-regulation was linked to activation of Akt through the ILK pathway. Because HCB promotes cancer in both the liver and breast, the present study aimed to determine if the mechanisms are similar in both tissues. MCF-12A breast cells were thus transfected with vectors coding for either Akt or a constitutively active form of Akt. In those cells, activation of Akt was correlated with decreased Cx43 levels. Female rats were then exposed to HCB by gavage either following the same protocol used previously for the liver or through a chronic exposure. While no changes were observed after the 5 days exposure protocol, chronic exposure to HCB resulted in increased Akt levels and decreased Cx43 levels in breast cells. *In vitro*, Akt was activated in MCF-12A cells exposed to HCB either for 7 days or chronically, but no changes were observed in junctional proteins. Together, these results suggested that, while activation of Akt can decrease Cx43 expression in breast cells *in vitro*, other mechanisms are involved during HCB exposure, leading to a decrease in Cx43 levels in a model- and duration-dependent manner. Finally, we showed that HCB effects are tissue specific, as we did not observe the same results in breast and liver tissues.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hexachlorobenzene (HCB) is a widespread environmental pollutant that has been used as a fungicide and is a by-product of many industrial processes. Although its use has been banned in many countries, it bioaccumulates mainly due to its high lipid solubility and resistance to degradation (Tong and Yuan, 2012). As a result, it is still found in human tissues, including the breast, as well as in breast milk (Luzardo et al., 2013; Hernandez et al., 2009). Studies in rodents have demonstrated that HCB is an epigenetic carcinogen that promotes tumorigenesis in both the liver and breast (Randi et al., 2006; Gustafson et al., 2000; Cabral et al., 1996). The effects of HCB in the breast have been studied primarily by the Kleiman de Pisarev and Randi group, who examined mechanisms of HCB carcinogenicity in rats and in two breast cancer cells lines, MDA-MB-231 and MCF-7 cells (Randi et al., 2006; Garcia et al., 2010; Pontillo et al., 2011, 2013; Pena et al., 2012). They showed that HCB can increase cell proliferation and activate, among others, the estrogen receptor (ER), the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) and insulin receptor (Garcia et al., 2010); as well as the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Pontillo et al., 2011). However, the mechanisms linked to HCB carcinogenicity are still poorly understood.

Gap junctions are transmembrane channels formed by a family of proteins called connexins (Cxs). In humans and rodents, there are 20 and 21 members, respectively, each of which are encoded by different genes and have specific tissue distributions (Laird, 2006). Gap junctions allow for the exchange of small molecules, such as metabolites, secondary messengers and electrical signals, between adjacent cells, a process known as Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC). This intercellular communication is crucial for many tissue functions, as well as for cellular proliferation, differentiation and apoptosis (Herve and Derangeon, 2013). Not surprisingly, mutations in Cxs have been associated with human diseases, including cancer (Su and Lau, 2014). While Cx26 and Cx43, two Cxs that are expressed in breast tissue, were proposed as tumor suppressors in the early 1990s, their role in breast cancer remains poorly understood (Lee et al., 1992., 1991; Naus and Laird, 2010). Previous studies have shown that Cx26 and Cx43 are down-regulated or mis-localized in breast tumors from human patients (Lee et al., 1992, 1991; Laird et al., 1999). In tumor cell lines, re-expression of Cxs results in a re-differentiation toward a more

* Corresponding author. Fax: +1 450 686 5501.

URL: http://www.inrs.ca (I. Plante).

http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.10.020
0013-9351/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

normal phenotype (McLachlan et al., 2007; Hirschi et al., 1996), whereas normal cell lines become more migratory and invasive upon Cxs down-regulation (Shao et al., 2005). Our recent data have shown that decreased Cx43 levels in mammary glands results in hyperplasia and an increased number of metastases in the lung in a breast cancer animal model (Plante et al., 2011), confirming the potential link between Cx43 and cancer in the breast.

Similarly, decreased Cxs expression or GJIC has been suggested to be a mechanism linked to chemically induced carcinogenesis years ago (Paul, 1986; Trosko et al., 1994; Yamasaki, 1995). Since then, many studies have demonstrated that exposure to various chemical compounds can promote cancer by modulating gap junction function or Cxs regulation in various tissues (Chipman et al., 2003). We previously conducted a series of experiments to determine the mechanisms involved in HCB-induced hepatocarcinogenesis. Using both *in vivo* and *in vitro* models, we showed that exposure to HCB resulted in decreased hepatic Cxs (Cx26 and Cx32) expression and inhibition of GJIC in treated rats 45 days after the last HCB dose (Plante et al., 2002, 2005). There was also a concomitant decrease in expression of E-cadherin and a nuclear translocation of β-catenin, two components of adherens junctions. Many studies have suggested that components of adherens and gap junctions are regulated by common but unknown mechanisms and that their loss is linked to tumor progression (Foroni et al., 2012; Miyoshi and Takai, 2005; Giepmans, 2004). We demonstrated that in HCB-exposed animals, the inhibition of Cx32 and E-cadherin resulted from the activation of the Integrin-linked-kinase (ILK) pathway, but through two different effectors, Akt and GSK3β, respectively (Plante et al., 2005, 2006, 2007). Akt is activated in multistep manner that initially involves ATP-dependent phosphorylation. Once activated, Akt goes, in a first step, to the membrane where it is phosphorylated by different proteins, including ILK; it then translocates into the nucleus, where it participates in gene regulation (Saji et al., 2005; Andjelkovic et al., 1997). Thus, phosphorylated Akt (p-Akt) is thought to play a crucial role in cell proliferation and differentiation.

Importantly, although HCB is a tumor promoter, the original protocol used to induce hepatocarcinogenesis (named "ABC") was not a typical tumor "initiation–promotion–progression", as animals were exposed to HCB 95 days prior to tumor initiation by diethynitrosamine (DEN) (Larouche, 1993; Krishnan et al., 1991). Thus, those findings suggested that HCB caused structural changes to the liver prior to the tumor initiation that render the liver more susceptible to tumor development.

Because HCB promotes both liver and breast cancer, and because down-regulation of Cx32 and Cx43 is associated with cancer in the liver and breast, respectively, the present study aimed to determine if HCB can act through similar mechanisms in both tissues. More specifically, we wanted to determine whether exposure to HCB render breast cells more susceptible to tumorigenesis by activating ILK pathway, similar to what was observed 45 days after the exposure in liver. We thus used *in vivo* and *in vitro* models to assess the effects of HCB on ILK, GSKβ, Akt, Cx43, E-cadherin and β-catenin levels in mammary glands, as well as in a non-tumorigenic human breast cell line.

2. Materials and methods

2.1. Animals treatments

Female Sprague-Dawley rats (180–200 g) were purchased from Charles River Canada (St Constant, Quebec, Canada). Rats were maintained under a constant photoperiod of 12 h light:12 h dark and received food and water ad libitum. Rats were administered HCB (100 mg/kg) or vehicle (corn oil, controls) by gavage for 5 consecutive days and sacrificed 45 days after the last dose of HCB, as previously described (protocol ABC) (Plante et al., 2002, 2005). Alternatively, rats were administered HCB (100 mg/kg) or vehicle (corn oil, controls) by gavage twice a week for 50 days (protocol HCB). At the time of sampling, rats were anesthetized by isoflurane inhalation and bled. The mammary glands were removed and processed for epithelial cells isolation. All animal protocols used in this study were approved by the University Animal Care Committee.

2.2. Isolation of epithelial cells from mammary glands and protein extraction

Epithelial cells were isolated as described with slight modification (McGrath et al., 1985). Briefly, lymph nodes were removed from freshly isolated mammary glands. Mammary gland tissues were then minced and digested in 25 ml of collagenase solution (200 U/ml collagenase 1A; 8 U/ml hyaluronidase IV; 8 KU/ml DNAse I; 6.7% fetal bovine serum (FBS) in DMEM/F12 media) for two hours at 32 °C at 200 rpm. 25 ml of 2X isolation buffer were added (0.02 mM EGTA; 10 μg/ml Insulin; 2 U/ml heparin; 5% FBS in DMEM/F12 media). The cell suspension was then filtered through a 74 μm nylon mesh before being centrifuged for 10 min at 800 rpm. The pellet was resuspended in 1 ml of 1X isolation buffer containing 1 mg/ml DNAse 1 and 4% $MgCl_2$ and incubated for 15 min at room temperature. The cell suspension was layered on a Percoll gradient (4 ml Percoll and 6 ml isolation buffer centrifuged at 20,000 rpm for 30 min) and centrifuged at 4 °C at 3000 rpm for 20 min. The fraction containing epithelial cells was collected, washed with PBS, and resuspended in lysis buffer (25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 0.1% Triton 100-X; 10% glycerol; 10 μg/ml aprotinin; 1 mM sodium vanadate). After 10 min of incubation at 4 °C, the cells were sonicated and centrifuged for 10 min at 4 °C at 3000 rpm. The supernatant, which contained epithelial cell proteins, was aliquoted and stored at −80 °C.

2.3. Cell culture

MCF-12A cells were obtained from the American Type Culture Collection and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture (DMEM/F12) without phenol red, supplemented with 5% normal horse serum, 20 ng/ml epidermal growth factor, 500 ng/ml hydrocortisone, 10 μg/ml insulin and 100 ng/ml cholera toxin. All cells were grown in 10 cm diameter plastic tissue culture dishes kept in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C. MCF-12A cell lines were plated at 0.56 million cells per dish.

2.3.1. Short term HCB treatment

Treatments were initiated on subconfluent cell cultures (24 h after plating) by the addition of media containing 0.1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) as a vehicle, 30 μM or 50 μM HCB in DMSO, as previously described (Plante et al., 2005). Cells were treated for 7 days and the media was changed twice. 5 replicates of the DMSO- and HCB-treated groups were independently processed.

2.3.2. Long term HCB treatment

Treatments were initiated on subconfluent cell cultures (24 h after plating) by the addition of media containing 0.1% (v/v) DMSO or 20 μM HCB in DMSO. Cell cultures were thereafter continuously exposed to DMSO or HCB and maintained for 50 days in culture with passages every 2 or 3 days. 3 replicates of DMSO- and HCB-treated groups were grown independently. Cell counts and viability were assessed using trypan blue dye exclusion and a hemocytometer. After 50 days in culture, treatments were stopped and

the cells were collected.

2.4. Transfections and vectors

MCF-12A were plated at a density of 5200 cells/cm^2 in 6-well plates. 24 h later, cells were transfected with 500 ng of the expression vectors using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Burlington, ON) according to the manufacturer's recommendations. Cells were harvested 72 h after transfection. Vectors were purchased from Addgene: Akt (Addgene 9003: 896 pcDNA3 T7 Akt1) and Akt+ (Addgene 9008: 1036 pcDNA3 Myr HA Akt1) (Ramaswamy et al., 1999).

2.5. Assessment of the viability in real-time using xCELLigence technology

For short-term exposure, cell proliferation and viability were measured quantitatively and in real-time using an xCELLigence™ RTCA DP instrument (ACEA Biosciences). The cell index, which represents the number of cells in a specific well, is measured by the changes in impedance detected by gold electrode microarrays at the bottom of each well. The cell impedance was measured every 10 min during a 6 day period using the ACEA Biosciences RTCA software program (version 1.2.1).

2.6. Preparation of MCF-12A protein lysates

Cell monolayers were washed twice with PBS before the addition of lysis buffer (1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0.5% NP-40; 100 mM NaF; 100 mM sodium orthovanadate; Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce, Rockford, IL) adjusted to pH 7.4). Cells were scraped, collected and incubated on ice for 5 min. Cells lysates were centrifuged for 10 min at 3000 rpm at 4 °C. The supernatants were aliquoted and stored at −80 °C until further processing.

2.7. Western blot analysis

Lysate protein concentrations (from mammary gland epithelial cells and MCF-12A cells) were measured using the bicinchoninic acid protein assay reagent kit (Pierce). Protein samples (20–40 μg) were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or stain-free acrylamide gels (Bio-Rad, Mississauga, On) and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were immunoblotted with primary antibodies: anti-E-cadherin, anti-β-catenin, anti-Akt, anti-p-Akt, anti-ILK, anti-GSK3β, anti-p-GSK3β (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and anti-Cx43 (Sigma-Aldrich, Oakville, On). Bound primary antibody was detected using HRP-conjugated secondary antibodies followed by visualization and quantification using the Bio-Rad ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, On). Protein levels were normalized on total lane loading using either stain-free technology (Bio-Rad Laboratories) or MemCode Reversible Protein Stain Kit (Pierce) in a Bio-Rad ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories) and analyzed using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

2.8. Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips and fixed in 80% methanol/20% acetone before immunolabeling with primary antibodies: E-cadherin, β-catenin (Cell Signaling Technology) and anti-Cx43 (Sigma). Cells were then immunolabeled with secondary antibodies (Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit; Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse, Life Technologies). Hoechst staining was used to visualize nuclei prior to mounting with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, Al). Images of the staining were captured using a Zeiss LSM 780 confocal microscope.

2.9. Statistical analysis and n-values

All *in vitro* experiments were repeated at least 3 times with different cell passages, while *in vivo* test were performed on 5 or 6 different animals. Values are presented as the mean ± SEM. Statistics were analyzed using Student's *t* test or ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test (comparing all pairs) when data passed a test for normality. Otherwise, Mann–Whitney or Kruskal–Wallis (followed by a Dunn's analysis) tests were applied. $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Akt activation resulted in decreased Cx43 levels in MCF-12A

As a proof-of-concept, we first wanted to determine if activation of Akt could decrease E-cadherin, β-catenin and Cx43 expression in breast epithelial cells. Consequently, we transfected human non-tumorigenic breast cells (MCF-12A) with either an empty vector, a vector coding for Akt or a vector coding for a constitutively activated form of Akt (Akt+) (Fig. 1). Compared to cell transfected with the empty vector, Akt protein levels were about 2 and 7 times higher in cells transfected with Akt and Akt+ vectors, respectively (Fig. 1A and B). While levels of p-Akt were not significantly affected in cells transfected with Akt, p-Akt levels were significantly increased by approximately 20 times in Akt+ cells. Thus, the resulting ratio of p-Akt on Akt was increased by 4 times, only in cells transfected with Akt+, suggesting that Akt was effectively activated only in these cells (Fig. 1A and B). The effects of the increased p-Akt levels on E-cadherin, β-catenin and Cx43 levels were then analyzed by western blot. No effects were observed in E-cadherin and β-catenin levels (Fig. 1A, C and D). Interestingly, while Cx43 levels were not decreased by Akt, MCF-12A transfected with Akt+ showed an important decrease in Cx43 levels, especially in the highly phosphorylated species (P1–P2) (Fig. 1A and E). Together, these results suggested that Akt activation in breast cells results in decreased Cx43 levels.

3.2. A short exposure to HCB in vitro, but not in vivo, resulted in Akt activation, but did not affect Cx43 levels

To compare mechanisms involved in HCB-induced breast cancer with those found in liver, we first exposed animals to HCB using the same protocol as previously published (referred to as the ABC protocol) (Plante et al., 2002, 2005; Krishnan et al., 1991). Female rats were exposed for five consecutive days and sampled 45 days after the last exposure. Mammary gland epithelial cells were homogenized and protein extracts were analyzed by western blot. No significant effects of HCB exposure were found in ILK, GSK3β, p-GSK3β, Akt or p-Akt protein levels (Fig. 2A–D). Junctional protein E-cadherin, β-catenin and Cx43 were also not significantly affected (Fig. 2A and E–G). These results suggested that, in contrast to the liver, neither the ILK pathway nor the junctional proteins were affected in the breast 45 days after the final dose of a 5 day exposure to HCB.

To further compare the mechanisms implicated in HCB toxicology between the liver and breast, MCF-12A cells were exposed to HCB. Similar to previous studies that used MH_1C_1 hepatocytes (Plante et al., 2005), we exposed cells for 7 days to 30 or 50 μM of HCB. HCB exposure did not affect cells viability or proliferation

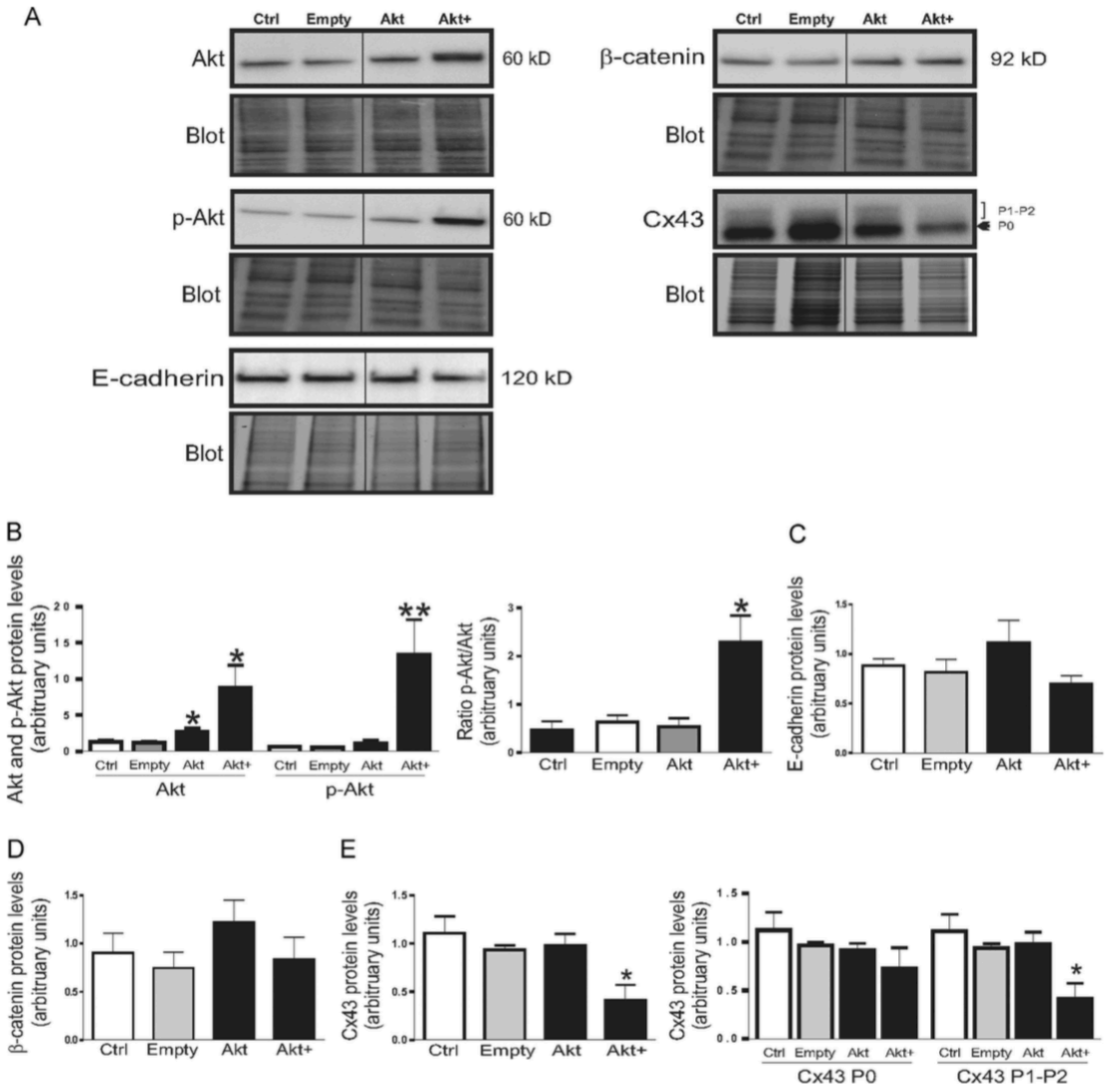


Fig. 1. Akt activation results in decreased Cx43 levels in MCF-12A cells.MCF-12A cells were transfected with an empty vector, a vector coding for Akt, or a vector coding for a constitutively active form of Akt. The cells were lysed, and proteins were isolated and subjected to western blot analysis using (A, B) Akt, p-Akt, (A, C) E-cadherin, (A, D) β-catenin, and (A, E) Cx43 antibodies. Protein levels were normalized to total protein loading, and graphical data are presented as the mean ± SEM. Samples were loaded on the same gels, but were separated by a well that was removed (line between samples). ($N=7$ independent experiments). *$=p<0.05$; **$=p<0.01$.

(Fig. 3). We then extracted protein and determined protein levels by western blot analysis. Although there was a trend in p-GSK3β, HCB treatment did not significantly increase ILK, GSK3β or p-GSK3β protein levels in MCF-12A cells (Fig. 4A–C), as it did in MH_1C_1 (Plante et al., 2005). Interestingly, we observed a dose-dependent increase in the phosphorylated form of Akt (p-Akt) and in the p-Akt/Akt ratios in HCB-treated MCF-12A cells, which reach significance at the higher dose (Fig. 4A and D). While E-cadherin levels appeared to decrease in a dose-related manner, there was no significant difference in E-cadherin, β-catenin and Cx43 protein levels upon treatment (Fig. 4A and E–G). This suggests that short-term exposure to HCB in breast cells can activate Akt through a mechanism other than ILK activation, but does not affect junctional proteins.

3.3. Chronic HCB exposures resulted in decreased Cx43 levels in vivo

We then hypothesized that a chronic exposure, rather than a 5 days exposure, might be needed in the breast to activate the ILK pathway and/or for Akt to affect junctional protein expression. Therefore, in a second series of experiments, female rats were exposed to HCB twice a week for 50 days. Western blot analysis demonstrated that chronic exposure did not affect ILK, GSK3β or p-GSK3β protein levels (Fig. 5A–C). Akt protein levels were

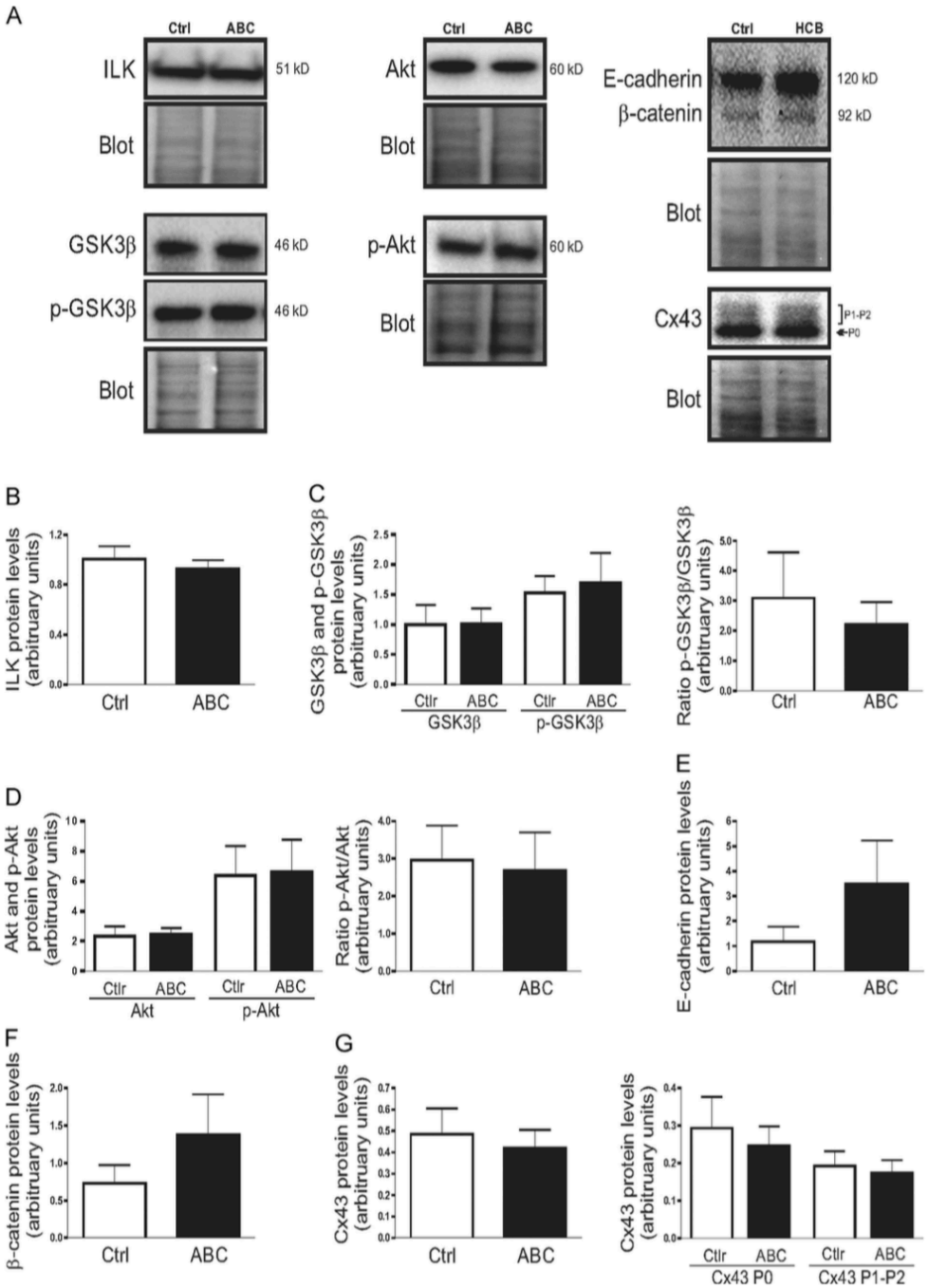


Fig. 2. The ILK pathway and junctional proteins are not affected in the breast 45 days after treatment with HCB. Rats were exposed to HCB for five consecutive days and the mammary glands were sampled 45 days later. Epithelial mammary cells were homogenized and proteins were subjected to Western blot analysis using (A, B) ILK, (A, C) GSK3β, p-GSK3β, (A, D) Akt, p-Akt, (A, E) E-cadherin, (A, F) β-catenin, and (A, G) Cx43 antibodies. Protein levels were normalized to total protein loading. Graphical data are presented as the mean ± SEM ($N=6$ for controls; $N=5$ for HCB-treated rats).

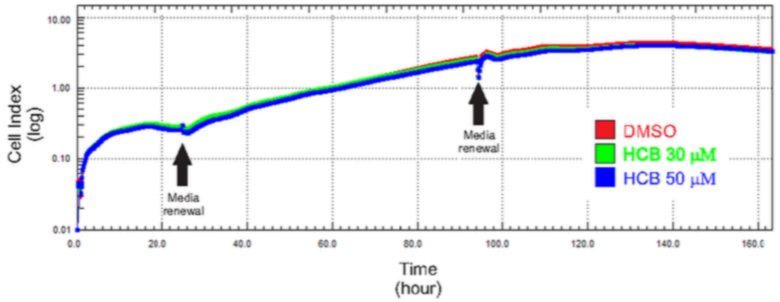


Fig. 3. Short-term HCB exposure does not affect cell proliferation or viability. MCF-12A cells were exposed to DMSO, 30 mM, or 50 mM of HCB for 6 days. Cells viability and proliferation were monitored in real-time using an xCELLigence™ RTCA DP instrument (ACEA Biosciences). The cell impedance was measured every 10 mins during a 6 day period.

significantly increased by approximately 25% in HCB-treated females compared to the controls, but not p-Akt (Fig. 5A and D). While there were no changes in E-cadherin and β-catenin protein levels, Cx43 levels were significantly decreased in HCB-treated females (Fig. 5A and E–G). The highly phosphorylated forms of Cx43 (P1–P2) showed a ≈25% decrease, while the "low phosphorylated" (or unphosphorylated) form of Cx43 (P0) was decreased approximately 45%, resulting in a total significant decrease of approximately 40% (Fig. 5A and G). Those data suggest that chronic exposure to HCB lead to increased Akt levels, but not to its activation, and decreased Cx43 expression in the breast.

To determine if, similar to what was observed *in vivo*, a chronic exposure is needed to affect Cx43 in breast cells, MCF-12A cells were exposed to lower doses of HCB for 50 days. The doubling time of cells was not affected by the treatment (data not shown), but ILK protein levels were significantly increased (Fig. 6A and B). Similar to what was seen in short-term exposure, while GSK3β and p-GSK3β were not affected by the treatment (Fig. 6A and C), the p-Akt level and p-Akt/Akt ratio were significantly increased in HCB-treated cells compared to the controls (Fig. 6A and D). However, E-cadherin, β-catenin and Cx43 protein levels and localizations were not affected by chronic *in vitro* exposure to HCB (Fig. 6A and E–G; Fig. 7). Those results suggest that a chronic *in vitro* exposure to HCB can activate Akt, without affecting junctional proteins or Cx43 levels.

4. Discussion

Our previous experiments showed that HCB exposure leads to the activation of the ILK pathway and its effectors Akt and GSK3β in the liver, resulting in decreased levels of Cx26 and Cx32, and E-cadherin, respectively. Because exposure to HCB has been associated with both liver and breast cancer, the aim of the current study was to determine if the mechanisms implicated in HCB toxicity were similar in both tissues. Therefore, to determine if activation of Akt can change Cx43 expression in the breast, we first transfected MCF-12A non-tumorigenic breast cells with a vector coding for a constitutively active form of Akt. We demonstrated that Cx43 expression was effectively reduced in those cells. We then used *in vivo* and *in vitro* models, as well as short-term or chronic exposures, to compare the effects of HCB on breast tissue to what was previously observed in the liver. We showed that HCB effects are tissue specific, as we did not observe the same results in breast and liver tissues. In the breast, results were ambiguous due to variation depending on the model and the type of exposure. *In vivo*, a 5 day exposure did not have any effect on Akt activation or Cx43, while a chronic exposure decreased Cx43 levels and increased Akt levels, but not p-Akt. *In vitro*, both short- and long-term treatment resulted in Akt activation, but did not affect Cx43 expression. Together, these results suggested that while forced activation of Akt can decrease Cx43 expression in breast cells *in vitro*, decreased Cx43 levels observed after chronic exposure to HCB *in vivo* is not linked to p-Akt.

4.1. Activation of Akt in the breast is not linked to ILK

We have previously shown that Akt activation was linked to ILK in rat livers and hepatocytes. In the present study, Akt levels were increased by HCB upon chronic exposure *in vivo*, and p-Akt levels increased following both short- and long-term exposure *in vitro*. However, ILK levels were increased only in *in vitro* chronic exposure of MCF-12A, suggesting that activation of Akt results from another stimulus in breast cells from HCB-treated rats and MCF-12A cells. Activation of the Akt cascade can be induced by many stimuli, such as receptor tyrosine kinases, integrins, B and T cell receptors, cytokine receptors, G-protein-coupled receptors, which all lead to the production of phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates (PtdIns(3,4,5)P3) by phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Bellacosa et al., 2005). It has been reported that HCB can increase levels of IGF-IR and insulin receptor in breast cancer cell lines (Garcia et al., 2010). Further experiments are needed to identify whether or not these effectors, or others, are involved in HCB-induced Akt activation in breast, but clearly, Akt activation is achieved by different effectors in the breast compared to the liver.

4.2. Akt as a regulator of connexin expression

In hepatocytes, we previously showed that both HCB-induced Akt activation and transfection with a constitutively active form of Akt resulted in decreased Cx32 expression (Plante et al., 2005, 2006). Cx32 is the major connexin expressed by the hepatocytes, but is only present during lactation in rodent mammary epithelium, and does not appear to be expressed in humans (Locke et al., 2007; El-Saghir et al., 2011). Therefore, we examined the effects of HCB and Akt on Cx43 in the breast because it is considered to be a tumor suppressor in the breast (McLachlan et al., 2007), because we have shown that Cx43 inhibits tumor progression and metastasis in the breast (Plante et al., 2011), and because Akt is a known regulator of Cx43 in other tissues (Dunn and Lampe, 2014; Dunn et al., 2012). Our results demonstrated that overexpression of a constitutively-active form of Akt in MCF-12A cells resulted in down-regulation of total Cx43 levels. Therefore, in both liver and breast cells, activation of Akt is linked to loss of Cxs expression.

Once activated, Akt is targeted to the plasma membrane, where it becomes phosphorylated at T308 and S473 (Alessi et al., 1996).

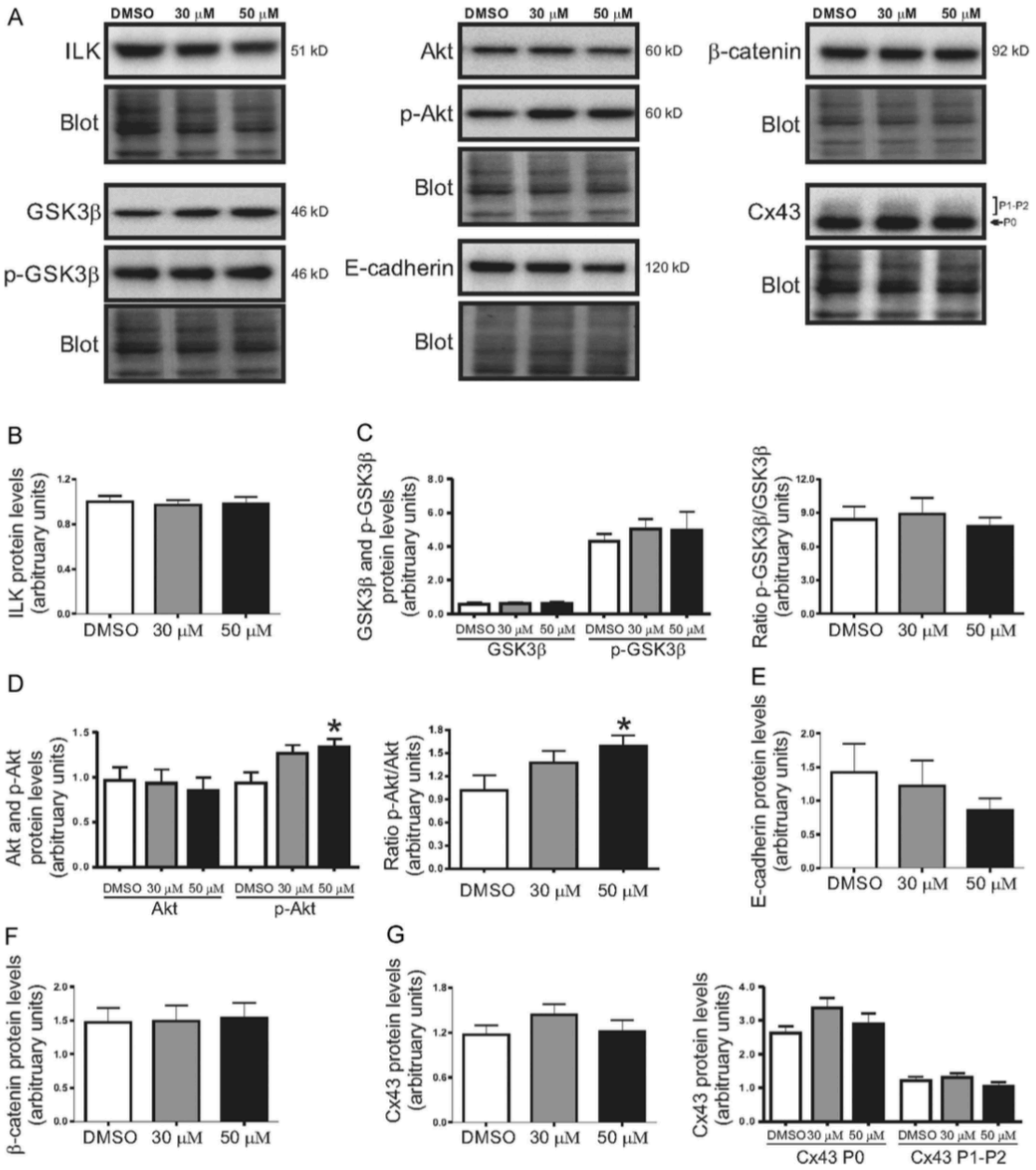


Fig. 4. Short-term HCB exposure results in increased p-Akt levels, but does not affect junctions in MCF-12A cells.MCF-12A cells were exposed to DMSO, 30 mM, or 50 mM of HCB for 7 days. Cells were lysed and proteins were isolated for western blot analysis using (A, B) ILK, (A, C) GSK3β, p-GSK3β, (A, D) Akt, p-Akt, (A, E) E-cadherin, (A, F) β-catenin, and (A, G) Cx43 antibodies. Protein levels were normalized to total protein loading and graphical data are presented as the mean ± SEM (N=5 independent experiments).

p-Akt can phosphorylate other proteins at the membrane and is then translocated to the nucleus where it either phosphorylates transcription factors or acts as a transcription factor (Saji et al., 2005; Andjelkovic et al., 1997; Nicholson and Anderson, 2002; Meier et al., 1997). Because Cxs levels can be regulated at both the transcriptional and the post-transcriptional levels, Akt could act on both mechanisms to regulate their expression (Nielsen et al., 2012). Analysis of the highly phosphorylated forms of Cx43 (P1–P2) separately from the "low phosphorylated" or unphosphorylated form of Cx43 (P0) in cells transfected by constitutively

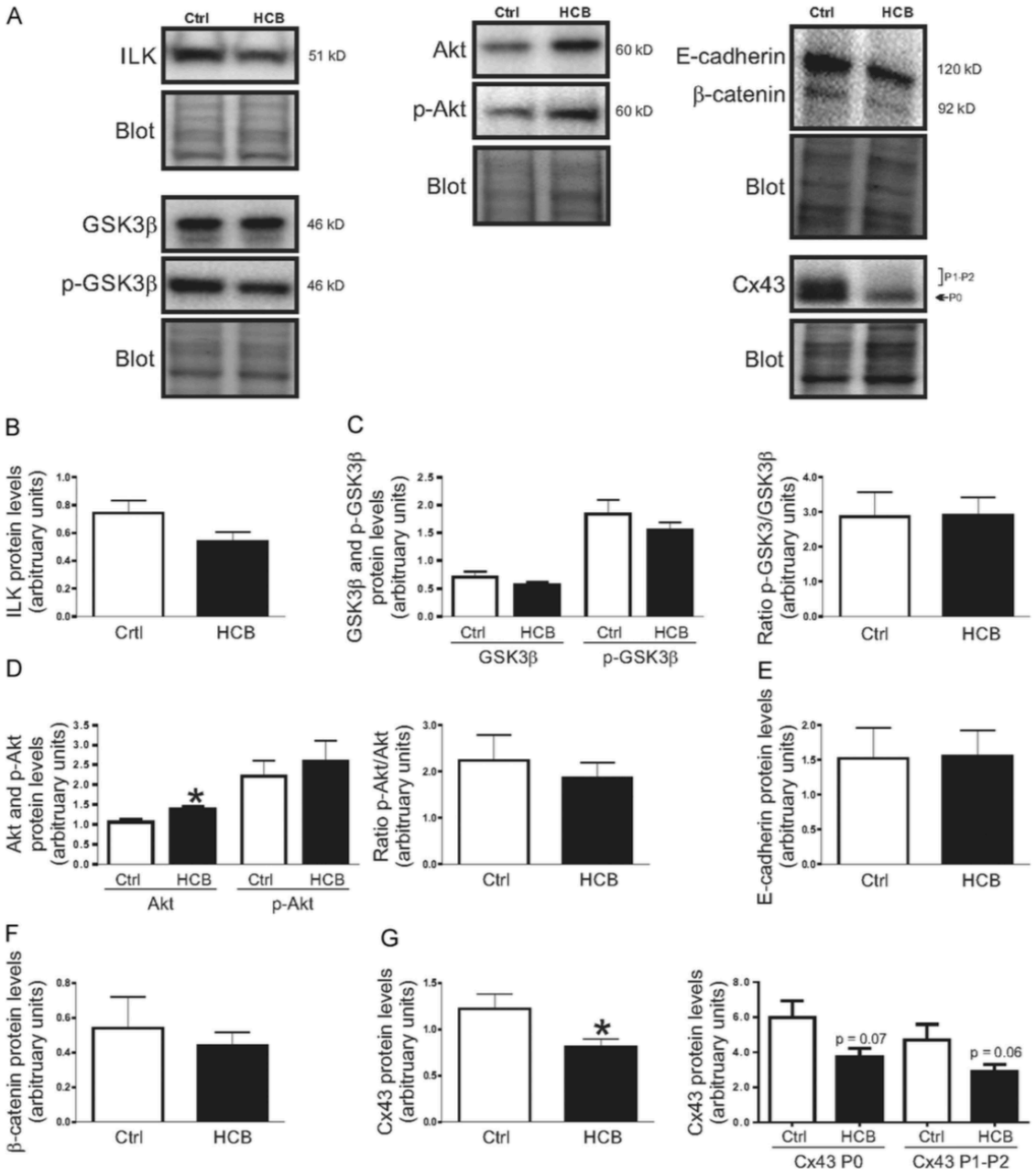


Fig. 5. Chronic exposure to HCB *in vivo* results in increased Akt and decreased Cx43 levels. Female rats were exposed twice a week for 50 days. Epithelial mammary cells were homogenized and proteins subjected to Western blot analysis using (A, B) ILK, (A, C) GSK3β, p-GSK3β, (A, D) Akt, p-Akt, (A, E) E-cadherin, (A, F) β-catenin, and (A, G) Cx43 antibodies. Protein levels were normalized to total protein loading and graphical data are presented as the mean ± SEM ($N=5$ for controls; $N=6$ for HCB-treated rats). $^{*}=p<0.05$.

active Akt revealed that P1–P2 were significantly decreased, while P0 was not affected. It has been shown that P1–P2 species are enriched in gap junction plaques, while the P0 species are typically found in intracellular compartments (Laird, 2005). Akt is known to phosphorylate Cx43 on S373, which is included in the P2 band. This phosphorylation leads to an increase in gap junction size and communication levels by limiting the interaction of ZO-1, a tight junction scaffolding protein, with Cx43 (Dunn and Lampe, 2014; Park et al., 2007). Consistently, inhibition of Akt by drugs or by dominant-negative constructs leads to a loss of gap junctions

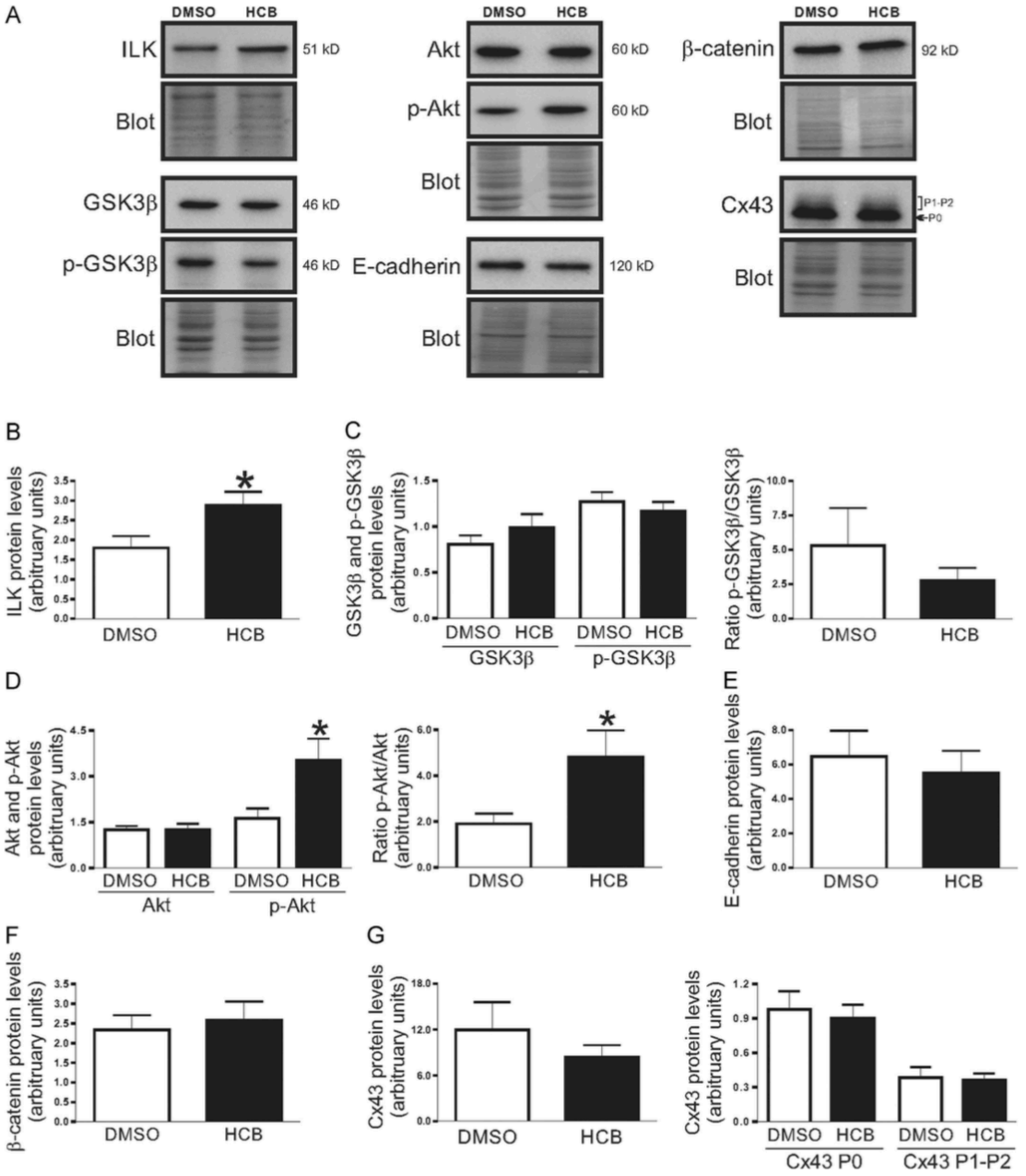


Fig. 6. Chronic HCB exposure results in increased ILK and p-Akt levels, but does not affect junction levels in MCF-12A cells. MCF-12A cells were exposed to DMSO or 20 mM of HCB for 50 days. Cells were lysed and proteins were isolated for western blot analysis using (A, B) ILK, (A, C) GSK3β, p-GSK3β, (A, D) Akt, p-Akt, (A, E) E-cadherin, (A, F) β-catenin, and (A, G) Cx43 antibodies. Protein levels were normalized to total protein loading and graphical data are presented as the mean ± SEM ($N=5$ independent experiments).

(Dunn et al., 2012; Park et al., 2007; Bhattacharjee et al., 2009). In MCF-12A cells, Akt appears to have the opposite effect, as its activation led to decreased Cx43 levels. However, recently reported data suggest that the increase in gap junction plaques upon Akt activation is transient (Solan and Lampe, 2014). After injury or growth factor treatment, Cx43 is first phosphorylated by Akt on S373 (5–15 min post-treatment), leading to increased gap junctions. Then, it is phosphorylated by MAPK on S279/S282 (15–

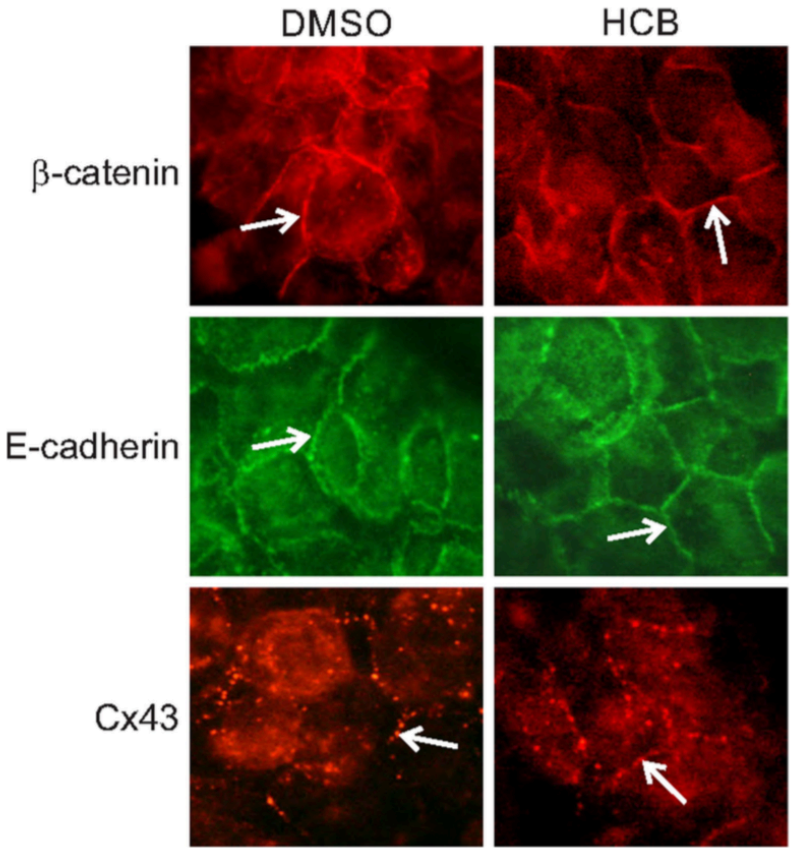


Fig. 7. Chronic HCB exposure does not affect junction localization in MCF-12A cells. MCF-12A cells were exposed to DMSO or 20 mM of HCB for 50 days. Cells were fixed and subjected to immunofluorescence analysis using E-cadherin, β-catenin and Cx43 antibodies. All junctional proteins were localized at the plasma membrane (arrows). Scale bar, 10 μm.

30 min post-treatment) and Src on pY247 (30 min to hours after treatment), which in turn result in an inhibition of GJIC and internalization of gap junctions (Solan and Lampe, 2014). In our experiments, MCF-12A cells were transfected with a constitutively active Akt and analyzed at 72 h after transfection, suggesting a sustained activation. Thus, one can speculate that continuous activation of Akt led to Cx43 channels internalization. While additional experiments are required to support this hypothesis, our results suggest that post-transcriptional mechanisms are involved in Cx43 down-regulation in MCF-12A cells after Akt activation.

4.3. Chronic exposure to HCB Resulted in Cx43 down-regulation and increased Akt levels

Chronic exposure to HCB resulted in Cx43 down-regulation in the breast *in vivo*. However, while Akt levels were significantly increased in treated rats, p-Akt levels were only slightly, but not significantly, increased. At least two postulates can explain these results. First, levels of p-Akt has not changed, but its localization could be different. Indeed, in the livers of rats exposed to HCB, and in MH_1C_1 cells transfected with constitutively active forms of Akt, we previously found that Cx32 down-regulation resulted in changes in the binding of transcription factors to its promoter following nuclear translocation of Akt (Plante et al., 2005, 2006, 2007). In the present study, when we analyzed Cx43 P1–P2 species separately from P0 in total extract of breast cells isolated from HCB-treated rats, P0 appeared to be the most affected species, suggesting a transcriptional rather than a post-transcriptional mechanism. Although Cx43 and Cx32 are transcribed from different genes and promoters, we can speculate that chronic exposure to HCB led to nuclear translocation of Akt in the breast, resulting to decreased Cx43 transcription. Additional studies would be necessary to further dissect this possibility which is currently not supported by our data.

Second, down-regulation of Cx43 in the breast following chronic exposure to HCB can be achieved by other mechanisms, independent from Akt. The effects of HCB in breast cancer have been studied in two breast cancer cells lines, MDA-MB-231 and MCF-7 cells, and in rats (Randi et al., 2006; Garcia et al., 2010; Pontillo et al., 2011, 2013). These studies demonstrated that HCB can bind and activate AhR in MDA-MB-231 (Pontillo et al., 2011). Interestingly, activation of AhR has been associated with decreased Cx43 levels in hepatocytes (Andrysik et al., 2013). Another interesting finding from the same group is that AhR activation leads to stimulation of the c-Src/HER1/STAT5b pathway (Pontillo et al., 2011). Further, the involvement of Src in the down-regulation of GJIC and gap junction disassembly has been known for many years (Atkinson and Sheridan, 1988). Src can phosphorylate Cx43 on

Y247 and Y265, which leads to junction disassembly and Cx43 down-regulation (Lin et al., 2001). Together, these data suggest that activation of AhR or Src could also explain the decreased Cx43 observed in the breast tissues of rats chronically exposed to HCB.

It has also been showed that HCB has estrogenic action in mammary gland and breast cancer cell lines (Garcia et al., 2010; Pena et al., 2012). Estrogens are essential for mammary epithelial cells proliferation and are involved in some subtypes of breast cancer (Bocchinfuso and Korach, 1997). Estrogens can also regulate Cxs expression in various tissues (Plante et al., 2002; Grummer et al., 2004). Thus, the observed HCB-induced Cx43 down-regulation without increase in p-Akt levels during chronic exposure *in vivo* could be linked to an estrogenic effect of HCB as rat epithelial express ER. Consistently, Cx43 levels were unaffected in HCB-exposed MCF12A cells, which do not express ER. Further experiments are needed to confirm these hypothesizes.

4.4. HCB exposure

Although uses has been banned in most industrial countries, HCB is still released in the environment as a by-product of many industrial processes and is bioaccumulable. As a result, it is found in various human matrices, including in breast and breast milk (Luzardo et al., 2013; Hernandez et al., 2009; To-Figueras et al., 1997). Concentrations found in human varies considerably among the populations, ranging from 0.01 to 2.62 mg/kg of lipid weight in milk and adipose tissues (or 0.17–5.8 ng/ml in milk, *i.e.* 5–20 μM) (To-Figueras et al., 1997; Wang et al., 2010; Ennaceur et al., 2008; Chen et al., 2014). When HCB is given as a solution orally in oil, 80% of the dose administrated is absorbed and subsequently found mainly in adipose tissues (To-Figueras et al., 1997). The *in vivo* and *in vitro* doses we used in the current study are thus higher than what human are typically exposed to. Those doses were originally chosen based on their capacity to induce a fully developed porphyria in a well-defined and predictable time frame (Krishnan et al., 1991), and to study HCB-induced hepatocarcinogenesis or breast cancer in female rats (Pena et al., 2012; Larouche, 1993). As a result, whether or not activation of Akt and decreased Cx43 are found in HCB-exposed human populations remain to be demonstrated.

Together, results from the present study suggested that: (1) activation of Akt, but not HCB treatment, decreases Cx43 *in vitro*; (2) exposure to HCB leads to Akt activation *in vitro*, and (3) chronic exposure to HCB results in decreased Cx43 expression and increase Akt levels, in a mechanism likely independent from Akt activation. As a result, while HCB exposure has been associated with both liver and breast cancer and can result in down-regulation of Cx32 and Cx43 respectively, Cxs down-regulation seems to be linked to activation of Akt only in the liver. Further studies are needed to understand the mechanisms involved in HCB-induced Cx43 down-regulation in the breast.

Conflicts of interest

None to declare.

Acknowledgment

This work is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC #418233-2012) grant to IP and by Fondation Universitaire Armand-Frappier INRS internship and scholarship to AD and EF. The authors thank William Sellers for the Akt and Akt+ plasmids (acquired through Addgene), and Robert Audet, Marie-André Cloutier, Martine Caplette and Guylaine Lassonde for their technical assistance. Dr Géraldine Delbès is thanked for her critical reviewing of the manuscript. Mammary gland tissues were a generous gift from Michel Charbonneau and Daniel G. Cyr, made available through a project funded by the Canadian Liver Foundation and the Toxic Substances Research Initiative (TSRI #157).

References

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J. 15 (23), 6541–6551.
Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., Hemmings, B.A., 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. J. Biol. Chem. 272 (50), 31515–31524.
Andrysik, Z., Prochazkova, J., Kabatkova, M., Umannova, L., Simeckova, P., Kohoutek, J., Kozubik, A., Machala, M., Vondracek, J., 2013. Aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of contact inhibition is associated with connexin43 downregulation and inhibition of gap junctional intercellular communication. Arch. Toxicol. 87 (3), 491–503.
Atkinson, M.M., Sheridan, J.D., 1988. Altered junctional permeability between cells transformed by v-ras, v-mos, or v-src. Am. J. Physiol. 255 (5 Pt 1), C674–C683.
Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., Testa, J.R., 2005. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. Adv. Cancer Res. 94, 29–86.
Bhattacharjee, R., Kaneda, M., Nakahama, K., Morita, I., 2009. The steady-state expression of connexin43 is maintained by the PI3K/Akt in osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 382 (2), 440–444.
Bocchinfuso, W.P., Korach, K.S., 1997. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 2 (4), 323–334.
Cabral, R., Hoshiya, T., Hakoi, K., Hasegawa, R., Ito, N., 1996. Medium-term bioassay for the hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene. Cancer Lett. 100 (1–2), 223–226.
Chen, X., Panuwet, P., Hunter, R.E., Riederer, A.M., Bernoudy, G.C., Barr, D.B., Ryan, P. B., 2014. Method for the quantification of current use and persistent pesticides in cow milk, human milk and baby formula using gas chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 970, 121–130.
Chipman, J.K., Mally, A., Edwards, G.O., 2003. Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. Toxicol. Sci. 71 (2), 146–153.
Dunn, C.A., Lampe, P.D., 2014. Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. J. Cell Sci. 127 (Pt 2), 455–464.
Dunn, C.A., Su, V., Lau, A.F., Lampe, P.D., 2012. Activation of Akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. J. Biol. Chem. 287 (4), 2600–2607.
El-Saghir, J.A., El-Habre, E.T., El-Sabban, M.E., Talhouk, R.S., 2011. Connexins: a junctional crossroad to breast cancer. Int. J. Dev. Biol. 55 (7–8–9), 773–780.
Ennaceur, S., Gandoura, N., Driss, M.R., 2008. Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human breast milk from various locations in Tunisia: levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. Environ. Res. 108 (1), 86–93.
Foroni, C., Broggini, M., Generali, D., Damia, G., 2012. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. Cancer Treat. Rev. 38 (6), 689–697.
Garcia, M.A., Pena, D., Alvarez, L., Cocca, C., Pontillo, C., Bergoc, R., de Pisarev, D.K., Randi, A., 2010. Hexachlorobenzene induces cell proliferation and IGF-I signaling pathway in an estrogen receptor alpha-dependent manner in MCF-7 breast cancer cell line. Toxicol. Lett. 192 (2), 195–205.
Giepmans, B.N., 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovasc. Res. 62 (2), 233–245.
Grummer, R., Hewitt, S.W., Traub, O., Korach, K.S., Winterhager, E., 2004. Different regulatory pathways of endometrial connexin expression: preimplantation hormonal-mediated pathway versus embryo implantation-initiated pathway. Biol. Reprod. 71 (1), 273–281.
Gustafson, D.L., Long, M.E., Thomas, R.S., Benjamin, S.A., Yang, R.S., 2000. Comparative hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, and 1,4-dichlorobenzene: application of a medium-term liver focus bioassay and molecular and cellular indices. Toxicol. Sci. 53 (2), 245–252.
Hernandez, F., Portoles, T., Pitarch, E., Lopez, F.J., 2009. Searching for anthropogenic contaminants in human breast adipose tissues using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. J. Mass Spectrom.: JMS 44 (1), 1–11.
Herve, J.C., Derangeon, M., 2013. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. Cell Tissue Res. 352 (1), 21–31.
Hirschi, K.K., Xu, C.E., Tsukamoto, T., Sager, R., 1996. Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. Cell Growth Differ. 7; , pp. 861–870.

Krishnan, K., Brodeur, J., Charbonneau, M., 1991. Development of an experimental model for the study of hexachlorobenzene-induced hepatic porphyria in the rat. Fundam. Appl. Toxicol. 17 (3), 433–441.
Larouche, L, 1993. Relation entre la porphyrie hépatique induite par l'hexachlorobenzène et l'hépatocancérogenèse chez le rat (Thèse M.Sc.). Université de Montréal, Montréal.
Laird, D.W., 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. Biochim. Biophys. Acta 1711 (2), 172–182.
Laird, D.W., 2006. Life cycle of connexins in health and disease. Biochem. J. 394 (Pt 3), 527–543.
Laird, D.W., Fistouris, P., Batist, G., Alpert, L., Huynh, H.T., Carystinos, G.D., Alaoui-Jamali, M.A., 1999. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. Cancer Res. 59 (16), 4104–4110.
Lee, S.W., Tomasetto, C., Sager, R., 1991. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (7), 2825–2829.
Lee, S.W., Tomasetto, C., Paul, D., Keyomarsi, K., Sager, R., 1992. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. J. Cell Biol. 118 (5), 1213–1221.
Lin, R., Warn-Cramer, B.J., Kurata, W.E., Lau, A.F., 2001. v-Src phosphorylation of connexin43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. J. Cell Biol. 154 (4), 815–827.
Locke, D., Jamieson, S., Stein, T., Liu, J., Hodgins, M.B., Harris, A.L., Gusterson, B., 2007. Nature of Cx30-containing channels in the adult mouse mammary gland. Cell Tissue Res. 328 (1), 97–107.
Luzardo, O.P., Ruiz-Suarez, N., Almeida-Gonzalez, M., Henriquez-Hernandez, L.A., Zumbado, M., Boada, L.D., 2013. Multi-residue method for the determination of 57 persistent organic pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure. Anal. Bioanal. Chem. 405 (29), 9523–9536.
McGrath, M., Palmer, S., Nandi, S., 1985. Differential response of normal rat mammary epithelial cells to mammogenic hormones and EGF. J. Cell. Physiol. 125 (2), 182–191.
McLachlan, E., Shao, Q., Laird, D.W., 2007. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. J. Membr. Biol. 218 (1–3), 107–121.
Meier, R., Alessi, D.R., Cron, P., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., 1997. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. J. Biol. Chem. 272 (48), 30491–30497.
Miyoshi, J., Takai, Y., 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. Adv. Drug Deliv. Rev. 57 (6), 815–855.
Naus, C.C., Laird, D.W., 2010. Implications and challenges of connexin connections to cancer. Nat. Rev. Cancer 10 (6), 435–441.
Nicholson, K.M., Anderson, N.G., 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cell. Signal. 14 (5), 381–395.
Nielsen, M.S., Nygaard Axelsen, L., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N.H., 2012. Gap junctions. Compr. Physiol. 2 (3), 1981–2035.
Park, D.J., Wallick, C.J., Martyn, K.D., Lau, A.F., Jin, C., Warn-Cramer, B.J., 2007. Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a "mode-1" binding site for 14-3-3. Cell. Commun. Adhes. 14 (5), 211–226.
Paul, D.L., 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. J. Cell Biol. 103 (1), 123–134.
Pena, D., Pontillo, C., Garcia, M.A., Cocca, C., Alvarez, L., Chiappini, F., Bourguignon, N., Frahm, I., Bergoc, R., Kleiman de Pisarev, D., et al., 2012. Alterations in c-Src/HER1 and estrogen receptor alpha signaling pathways in mammary gland and tumors of hexachlorobenzene-treated rats. Toxicology 293 (1–3), 68–77.
Plante, I., Charbonneau, M., Cyr, D.G., 2002. Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. Carcinogenesis 23 (7), 1243–1249.
Plante, I., Cyr, D.G., Charbonneau, M., 2005. Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. Toxicol. Sci. 88 (2), 346–357.
Plante, I., Charbonneau, M., Cyr, D.G., 2006. Activation of the integrin-linked kinase pathway downregulates hepatic connexin32 via nuclear Akt. Carcinogenesis 27 (9), 1923–1929.
Plante, I., Cyr, D.G., Charbonneau, M., 2007. Sexual dimorphism in the regulation of liver connexin32 transcription in hexachlorobenzene-treated rats. Toxicol. Sci. 96 (1), 47–57.
Plante, I., Stewart, M.K., Barr, K., Allan, A.L., Laird, D.W., 2011. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. Oncogene 30, 1681–1692.
Pontillo, C.A., Garcia, M.A., Pena, D., Cocca, C., Chiappini, F., Alvarez, L., Kleiman de Pisarev, D., Randi, A.S., 2011. Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways and cell migration by hexachlorobenzene in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. Toxicol. Sci. 120 (2), 284–296.
Pontillo, C.A., Rojas, P., Chiappini, F., Sequeira, G., Cocca, C., Crocci, M., Colombo, L., Lanari, C., Kleiman de Pisarev, D., Randi, A., 2013. Action of hexachlorobenzene on tumor growth and metastasis in different experimental models. Toxicol. Appl. Pharmacol. 268 (3), 331–342.
Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D.B., Perera, S., Roberts, T.M., Sellers, W.R., 1999. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (5), 2110–2115.
Randi, A.S., Cocca, C., Carbone, V., Nunez, M., Croci, M., Gutierrez, A., Bergoc, R., Kleiman de Pisarev, D.L., 2006. Hexachlorobenzene is a tumor co-carcinogen and induces alterations in insulin-growth factors signaling pathway in the rat mammary gland. Toxicol. Sci. 89 (1), 83–92.
Saji, M., Vasko, V., Kada, F., Allbritton, E.H., Burman, K.D., Ringel, M.D., 2005. Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332 (1), 167–173.
Shao, Q., Wang, H., McLachlan, E., Veitch, G.I., Laird, D.W., 2005. Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. Cancer Res. 65 (7), 2705–2711.
Solan, J.L., Lampe, P.D., 2014. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. FEBS Lett. 588, 1423–1429.
Su, V., Lau, A.F., 2014. Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. FEBS Lett. 588, 1212–1220.
To-Figueras, J., Sala, M., Otero, R., Barrot, C., Santiago-Silva, M., Rodamilans, M., Herrero, C., Grimalt, J., Sunyer, J., 1997. Metabolism of hexachlorobenzene in humans: association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population. Environ. Health Perspect. 105 (1), 78–83.
Tong, M., Yuan, S., 2012. Physiochemical technologies for HCB remediation and disposal: a review. J. Hazard. Mater. 229–230, 1–14.
Trosko, J.E., Chang, C.C., Madhukar, B.V., 1994. The role of modulated gap junctional intercellular communication in epigenetic toxicology. Risk Anal. 14 (3), 303–312.
Wang, G., Lu, Y., Han, J., Luo, W., Shi, Y., Wang, T., Sun, Y., 2010. Hexachlorobenzene sources, levels and human exposure in the environment of China. Environ. Int. 36 (1), 122–130.
Yamasaki, H., 1995. Non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis: studies of cell transformation and gap junctional intercellular communication. Toxicol. Lett. 77 (1–3), 55–61.