Université du Québec
INRS-Santé

MODULATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE PAR LES ORGANOCHLORÉS DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES MAMMAIRES HUMAINES

Par
Ninon Lyrette

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Dr Kannan Krishnan, Département de médecine du travail et hygiène du milieu, Université de Montréal
Examinateur interne	Dr Édouard Kouassi INRS-Santé
Directeur de recherche	Dr Michel Charbonneau INRS-Santé

24 Août 1998

© droits réservés de Ninon Lyrette 1998

RÉSUMÉ

Au Canada, une femme sur neuf sera atteinte du cancer du sein au cours de sa vie. Plusieurs facteurs génétiques, nutritionnels et hormonaux connus sont impliqués dans la cancérogenèse mammaire. Par ailleurs, depuis quelques années plusieurs études épidémiologiques suggèrent que certains contaminants environmentaux, notamment les organochlorés, pourraient être impliqués dans le développement du cancer du sein.

L'objectif des présents travaux est de déterminer le potentiel mitogène des organochlorés dans un système cellulaire cible, soit les cellules épithéliales mammaires humaines non-tumorigènes (MCF-10A) en culture, et d'élucider le mécanisme responsable d'une induction de la prolifération cellulaire. Les organochlorés visés dans cette problématique sont l'hexachlorobenzène (HCB), les deux isomères du 1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène (soit l'*o,p'*-DDE et le *p,p'*-DDE) et l'hexachlorocyclohexane (β-HCH).

Tout d'abord, les résultats montrent que l'HCB (20 μM) augmente de façon significative ($p<0.05$) la prolifération des MCF-10A, telle que mesurée par le contenu total en ADN et le dénombrement cellulaire. L'effet mitogène de l'HCB est comparable en intensité à celui induit par le 17β-estradiol (E_2) (30 et 43 %, respectivement); l'effet des deux traitements combinés est égal à celui de l'HCB ou de l'E_2 seul. De plus, en présence de tamoxifène (1 μM), un antagoniste du récepteur à l'estrogène, l'E_2 n'est pas mitogène, mais ce bloqueur n'exerce aucun effet sur l'accroissement de la division cellulaire induite par l'HCB. L'effet activateur de l'HCB ne semble donc pas médié via une activité impliquant le récepteur à l'estrogène.

L'augmentation de la prolifération cellulaire des MCF-10A induite par l'HCB est abolie si l'EGF exogène (20 ng/ml) est retiré du milieu de culture. Ceci suggère que l'activation induite par l'EGF ("epidermal growth factor" ou facteur de croissance épidermique) est essentielle afin que l'HCB puisse exercer son pouvoir mitogène envers ces cellules mammaires. Une étude de ce rôle au niveau moléculaire démontre que l'HCB, à une concentration de 5, 10 ou 20 µM, module à la hausse le degré de phosphorylation du récepteur à l'EGF, un "commutateur" important en amont d'une cascade de signalisation cellulaire conduisant à l'activation d'oncogènes, donc à la division cellulaire.

Notre étude de trois autres contaminants de l'environnement soit l'*o,p'*-DDE, le *p,p'*-DDE et le β-HCH (10 et 20 µM), a montrée qu'à l'inverse de l'HCB, ces substances n'induisent aucune hausse de la prolifération cellulaire des cellules MCF-10A.

Les résultats obtenus montrent que l'HCB, un contaminant de l'environnement présent dans le tissu adipeux chez virtuellement tous les Canadiens, possède une activité biologique sur les cellules mammaires épithéliales humaines qui est compatible avec une action cancérogène. En effet, l'augmentation de la prolifération cellulaire, qui pourrait résulter d'une augmentation de l'activation du récepteur à l'EGF, est un mécanisme reconnu pour expliquer l'action des cancérogènes épigénétiques. Ces travaux appuient fortement l'hypothèse d'un rôle de l'HCB dans le cancer du sein.

REMERCIEMENTS

Mes premières pensées vont d'abord pour mon directeur de recherche, Michel Charbonneau. Ce dernier a été d'une très grande aide durant cette période de mes études et sans qui la rédaction de ce mémoire aurait été une tâche beaucoup plus ardue. Le temps passé à ces côtés à été très enrichissant et je garderais beaucoup de lui tout au long de ma carrière et plus particulièrement, son intégrité scientifique.

Je voudrais aussi remercier ma famille, plus spécialement mes parents pour tout leur amour et leurs encouragements dans la poursuite de ces études. Je ne peux me permettre d'oublier le soutien financier de mon père qui a grandement facilité les fins de mois difficiles.

Je tiens à remercier particulièrement Isabelle qui fût ma collègue de travail mais également ma colocataire. Nous avons passé à travers tellement d'émotions ensemble et ces moments vont demeurer à jamais gravés dans ma mémoire.

Je remercie également Helga pour son temps et sa patience. Elle a été pour moi d'une très grande aide. De plus, je remercie Guylaine pour tous les petits conseils pratiques et sa bonne humeur contagieuse, elle a su mettre beaucoup de vie dans le laboratoire.

Finalement je tiens à remercier mes amis qui m'ont encouragé durant mes études graduées et avec qui je me suis amusée plus d'une fois: Caro, Yann, Isa et Jean-François. Vous m'avez été d'un support moral extraordinaire.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ....ii
REMERCIEMENTS....iv
TABLE DES MATIÈRES....v
LISTE DES FIGURES....ix
LISTE DES TABLEAUX....xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS....xii

INTRODUCTION....1

CHAPITRE 1: RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET DÉFINITION DES OBJECTIFS....3

1.1 La cancérogenèse....4

1.2 Mécanismes de cancérogenèse....6

1.3 Importance de la prolifération cellulaire dans la cancérogenèse....8

1.4 Cycle cellulaire et signaux de mitogenèse....10

1.5 Les organochlorés....14

1.5.1 L'hexachlorobenzène....14

1.5.2 Le β-hexachlorocyclohexane....17

1.5.3 Le DDT et ses isomères....17

1.6 Potentiel cancérogène de l'HCB, du β–HCH et du DDE....18

1.7 Le cancer du sein....19
1.7.1 Les facteurs de risques....19
1.7.2 Physiologie et histologie de la glande mammaire....22
1.7.3 Cellules mammaires en culture....23
1.7.4 Réponses aux facteurs mitogènes....24

1.8 Les xénoestrogènes....25

1.9 Implication des organochlorés dans le cancer du sein....26

1.10 Objectifs de la recherche....28

CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES....30

2.1 Matériel....30

2.2 Culture cellulaire....31

2.3 Mesure de la cytotoxicité: test de la formation de colonies....31

2.4 Dosage cytosolique du récepteur à l'estrogène....32

2.4.1 Mise en culture et traitement des cellules....32

2.4.2 Préparation de la fraction cytosolique contenant le RE....32

2.5 Mesure du contenu en ADN....34

2.6 Décompte cellulaire....34

2.7 Phosphorylation du récepteur à l'EGF....35

2.7.1 Préparation des échantillons....35

2.7.2 Immunobuvardage....36

2.8 Dosage des protéines....37

2.9 Statistiques....37

CHAPITRE 3: RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX....38

3.1 Mesure de la cytotoxicité des organochlorés....38

3.2 Dosage cytosolique du récepteur à l'estrogène et caractérisation du potentiel mitogène de l'estradiol....38

3.3 Caractérisation du potentiel mitogène de l'hexachlorobenzène....42

3.4 Modulation de la voie de la signalisation médiée par l'EGF....48

3.5 Caractérisation du potentiel mitogène de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH....52

CHAPITRE 4: DISCUSSION.....57

4.1 Mesure de la cytotoxicité des organochlorés.....57

4.2 Détermination de la présence du récepteur à l'estrogène.....58

4.3 Caratérisation du potentiel mitogène de l'estradiol et de l'hexachlorobenzène chez les MCF-10A.....59

4.4 Étude des mécanismes responsables du potentiel mitogène de l'hexachlorobenzène.....60

4.5 Caractérisation du potentiel mitogène de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH chez les MCF-10A.....64

CONCLUSIONS.....65

RÉFÉRENCES.....66

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: Processus de la cancérogenèse.....5

FIGURE 1.2: Voies responsables de la prolifération cellulaire induite par les cancérogènes épigénétiques.....7

FIGURE 1.3: Schématisation du rôle de la prolifération cellulaire dans le processus de cancérogenèse.....9

FIGURE 1.4: Voies de signalisation cellulaire.....13

FIGURE 1.5: Stucture chimique de quelques organochlorés.....16

FIGURE 1.6: Structure anatomique du sein.....23

FIGURE 1.7: Structure chimique des hormones stéroïdiennes.....25

FIGURE 3.1: Effet de l'estradiol sur la prolifération cellulaire des MCF-10A.....41

FIGURE 3.2: Effet de l'HCB et de la combinaison HCB/17β-estradiol sur la prolifération cellulaire des MCF-10A.....43

FIGURE 3.3: Effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire induite par l'estradiol.....44

FIGURE 3.4: Effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire induite par l'HCB.....45

FIGURE 3.5: Effet de la privation en EGF sur la prolifération cellulaire des MCF-10A.....47

FIGURE 3.6: (A) Effet de l'HCB sur la phosphorylation du récepteur à l'EGF en fonction du temps.....50

(B) Effet de différentes concentrations d'HCB sur la phosphorylation du récepteur à l'EGF.....51

FIGURE 3.7: Effet de la progestérone sur la prolifération cellulaire des MCF-10A.....53

FIGURE 3.8: Effet de la progestérone sur l'effet de stimulation exercée par l'HCB.....54

FIGURE 3.9: Effet de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH sur la prolifération cellulaire des MCF-10A.....55

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1: Composition d'une préparation commerciale de DDT.....18

TABLEAU 1.2: Types de cancer les plus fréquents chez la femme.....20

TABLEAU 1.4: Risques de cancer du sein selon l'âge chez la femme canadienne.....21

TABLEAU 1.4: Propriétés de divers contaminants environmentaux.....27

TABLEAU 3.1: Mesure de la cytotoxicité de divers organochlorés chez les MCF-10A.....39

TABLEAU 3.2: Étude comparative du dosage cytosolique du récepteur à l'estrogène chez les MCF-7 et les MCF-10A.....40

TABLEAU 3.3: Effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire induite par l'estradiol et l'HCB sur le dénombrement cellulaire.....46

TABLEAU 3.4: Effet du retrait en EGF sur le dénombrement cellulaire.....49

TABLEAU 3.5: Effet de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH sur le dénombrement cellulaire.....56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN.....acide désoxyribonucléique

β-HCH.....bêta-hexachlorocyclohexane

BPC.....biphényles polychlorés

DDD.....1,1-dichloro-2,2-di(2-chlorophényl)éthane

DDE..... 1,1-dichloro-2,2-di(2-chlorophényl)éthylène

DDT.....1,1,1-trichloro-2,-2-di(4-chlorophényl)éthane

DES.....diéthylstylbestrol

DMEM-F12.....milieu de culture mixte (Dulbecco/Ham)

DMSO.....diméthylsulfoxide

E2.....17β-estradiol

EDTA.....éthylène diamine tétraacétate

EGF.....facteur de croissance épithélial

FCS.....sérum de veau foetal

HCB.....hexachlorobenzène

HEPES.....N-2-Hydroxyéthyl-piperazine-N'-2-éthanesulfonate

HS.....sérum de cheval

NaCl.....chlorure de sodium

NaP.....phosphate de sodium (+ azide de sodium)

o,p'-DDE.....ortho,para'-1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène

PAGE.....électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS.....tampon phosphate-salin

p,p'-DDE.....para,para'-1,1-dichlro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène

Pg.....progestérone

RE.....récepteur à l'estrogène

TCDD.....2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine

INTRODUCTION

Le cancer du sein est une maladie à haute prévalence dans notre société nord-américaine. En effet, une femme canadienne sur neuf sera atteinte au cours de sa vie (Engel, 1997). Au cours des trente dernières années l'incidence du cancer du sein a augmenté de 28 %. Il s'agit de la deuxième cause de mortalité par cancer dans cette population. Plusieurs facteurs responsables du déclenchement et de l'évolution de la maladie sont reconnus. L'âge des premières menstruations et l'âge auquel la ménopause se présente sont des facteurs de risque bien documentés (Kelsey et Berkowitz, 1988).

Le tissu mammaire est extrêmement sensible aux diverses hormones sexuelles féminines (Engel, 1997). C'est l'exposition globale aux estrogènes qui semble être le facteur prédominant. Ce type d'hormone agit comme un facteur mitogène au niveau de ces cellules. L'histoire familiale joue également un rôle important dans l'incidence du cancer du sein puisque deux gènes spécifiques à cette maladie ont été isolés, soit les gènes BRCA 1 et BRCA 2, ainsi que les diverses habitudes nutritionnelles. (Kelsey et Berkowitz, 1988)

Parmi les facteurs pouvant être impliqués dans la cancérogenèse mammaire, les contaminants de l'environnement attirent de plus en plus l'attention. En effet, la littérature rapporte un nombre croissant de facteurs chimiques environnementaux pouvant contibuer à l'incidence du cancer du sein. Les organochlorés sont plus particulièrement visés dû à leur potentiel carcinogène chez l'animal, leur bioconcentration et leur persistance dans le tissu adipeux chez l'humain (IARC, 1991).

Parmi la famille des organochlorés on retrouve des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés regroupant divers pesticides anciennement utilisés tels l'hexachloro-cyclohexane, le DDT et l'hexachlorobenzène. Ces produits, actuellement bannis dans les pays industrialisés, sont encore retrouvés dans l'environnement comme sous-produits provenant de certains procédés industriels (Foster *et al.*, 1995). Ces composés liposolubles, et relativement persistants dans l'environnement, se retrouvent dans les tissus adipeux chez pratiquement tous les gens vivant dans les pays industrialisés et ils sont régulièrement présents dans le lait maternel indiquant ainsi leur présence dans la glande cible. De plus, ces organochlorés induisent tous des tumeurs au foie chez l'animal suite à une administration chronique. Ces composés ont d'ailleurs été classés comme des cancérogènes possibles par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1987).

Plusieurs études épidémiologiques de nature écologique suggèrent un lien possible entre l'incidence du cancer du sein et divers organochlorés tels l'HCB, le β-HCH , le DDT et les BPC (Dewailly *et al.*, 1994; Wolff *et al.*, 1993; Falck *et al.*, 1992 et Mussalo-Rauhamaa *et al.*, 1990). De plus certains organochlorés, tels l'*o,p'*-DDT et ses métabolites (DDE et DDD), ont été identifiés comme des "xénoestrogènes" dû à leur habileté à se lier au récepteur à l'estrogène et à mimer une activité estrogénique (Davis et Bradlow, 1995).

Le chapitre 1 du présent mémoire présente une revue de la littérature qui permet de rappeler les connaissances sur la problématique de recherche. On y retrouve également les objectifs spécifiques des travaux de recherche. Le chapitre 2 décrit les méthodologies appliquées pour répondre aux objectifs des travaux. Le chapitre 3 expose les résultats expérimentaux, alors que ces derniers sont finalement discutés et comparés avec ceux de la littérature au niveau du chapitre 4.

CHAPITRE 1

RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET PRÉSENTATION DES OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le présent chapitre présente les connaissances actuelles entourant la problématique étudiée dans ce mémoire. Ce chapitre est divisé en plusieurs sections afin de mieux comprendre l'ensemble de cette problématique. D'abord, il est impératif de discuter des différentes phases de la cancérogenèse afin de mieux comprendre cette maladie qui est de plus en plus présente dans notre société. Il est reconnu qu'il existe plusieurs causes au développement du cancer; dans le cas présent, l'intérêt est dirigé plus particulièrement vers les agents cancérogènes chimiques. On verra donc les deux mécanismes généraux de cancérogenèse proposés pour ces types d'agents. Par la suite, on retrouvera une section sur la prolifération cellulaire qui est un phénomène impliqué dans les trois phases de la cancérogenèse, ainsi qu'une section portant sur la signalisation cellulaire. On enchaînera le tout avec une description des contaminants chimiques ciblés dans ce travail, c'est-à-dire la famille des organochlorés, ainsi que de diverses notions concernant le cancer du sein. Finalement, on verra l'implication des organochlorés dans l'incidence du cancer du sein, ce qui permettra au lecteur de bien comprendre la problématique et les objectifs du présent projet de recherche.

1.1 Cancérogenèse

Pour mieux comprendre la problématique du projet de recherche, on se doit d'aborder les principaux évènements impliqués lors du développement d'un cancer. En effet, le cancer fait intervenir de multiples changements que ce soit au niveau de l'expression des gènes ou au niveau de la physiologie cellulaire. Le développement du cancer est un processus complexe pouvant être divisé en trois phases soit l'initiation, la promotion et la progression (Cohen et Ellwein, 1990), qui sont basées sur différentes caractéristiques cellulaires. Le processus de cancérogenèse est illustré à la figure 1.1.

L'initiation est sans aucun doute la phase la plus importante car elle amène des changements permanents à l'ADN qui vont conduire à une modification du phénotype. Cette première phase est définie comme l'évènement qui éventuellement amène à un stade multicellulaire différencié. La modification de l'ADN via un agent quelconque (chimique, viral, etc...). conduit à l'apparition d'une mutation. L'exemple classique est l'alkylation de l'ADN par une molécule électrophile, ce qui peut alors résulter en un mauvais appariement des bases de l'ADN suite à la réplication. Il pourra par la suite y avoir réparation des erreurs mais cette capacité cellulaire n'est pas infinie. En effet, les systèmes de réparation ne peuvent corriger toutes les mutations qui surviennent dans la cellule, en particulier si leur nombre est très élevé. Si une mutation persiste, la cellule initiée possède alors le potentiel de développer une tumeur si les autres stades s'ensuivent (figure 1.1).

La promotion est une période durant laquelle, sous certaines conditions, on peut avoir expansion clonale de la cellule initiée (figure 1.1). Cette expansion peut se faire suite à la rencontre de divers agents promoteurs endogènes ou exogènes. Par définition, un agent promoteur pur n'est pas en lui-même cancérogène (Lutz et Maier, 1988). Enfin, la progression est le stage final dans le développement du cancer et elle est caractérisée par l'invasion et la métastase (Pitot, 1989).

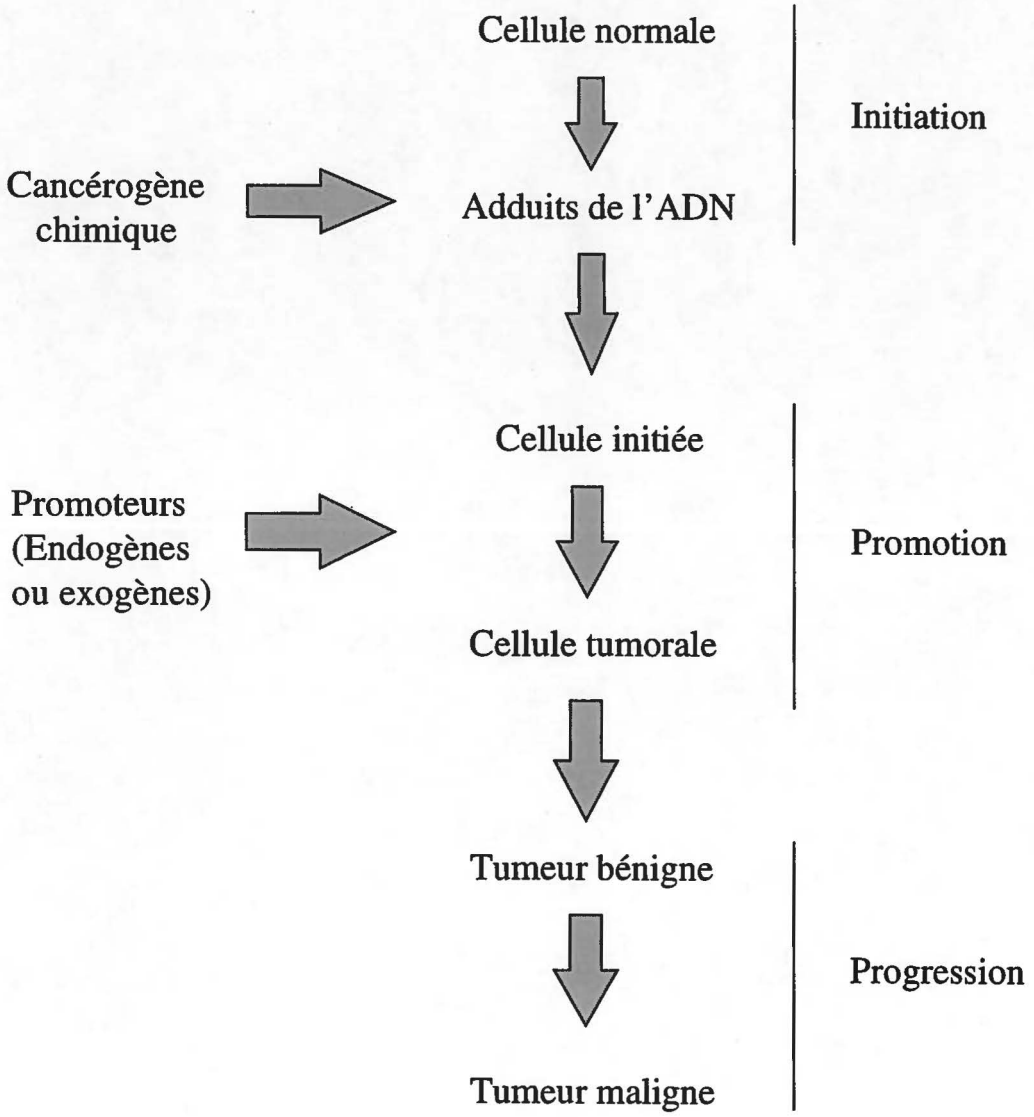


Figure 1.1: Processus de la cancérogenèse:
Initiation, promotion et progression.

1.2 Mécanismes de cancérogenèse

Plusieurs facteurs ou agents peuvent intervenir dans le développement du cancer. Dans le cas présent, l'intérêt est porté vers les agents chimiques cancérogènes. Mécanistiquement, les agents cancérogènes chimiques peuvent être divisés en deux catégories distinctes, soit les cancérogènes génotoxiques et les cancérogènes non-génotoxiques ou dits de type épigénétique (figure 1.2). Les composés génotoxiques attaquent directement l'ADN et amènent la formation d'adduits donc, la formation de diverses mutations. Ces composés sont impliqués dans l'initiation qui constitue la première phase de la cancérogenèse. Les composés dits épigénétiques ne conduisent pas à la formation de réactifs électrophiles et par conséquent, ils ne réagissent donc pas avec l'ADN (Williams *et al.*, 1996).

Les cancérogènes épigénétiques montrent un résultat négatif lorsque testés dans une série de tests de mutagenèse. Par contre, ils peuvent quand même engendrer des mutations mais de façon indirecte. Un facteur important à la base de la promotion induite par ces cancérogènes est la hausse de la prolifération cellulaire. Celle-ci peut être directe, c'est-à-dire résulter d'une action mitogène auprès de la population de la cellule initiée ou soit indirecte, c'est-à-dire être conséquente à une augmentation de la cytotoxicité regénérative (Cohen et Ellwein, 1990). Un mécanisme important partagé par une majorité des cancérogènes épigénétiques semble donc d'exercer une activité mitogène sur la cellule. En résumé, les dommages à l'ADN et la mitogenèse sont donc deux facteurs importants dans le processus de la cancérogenèse.

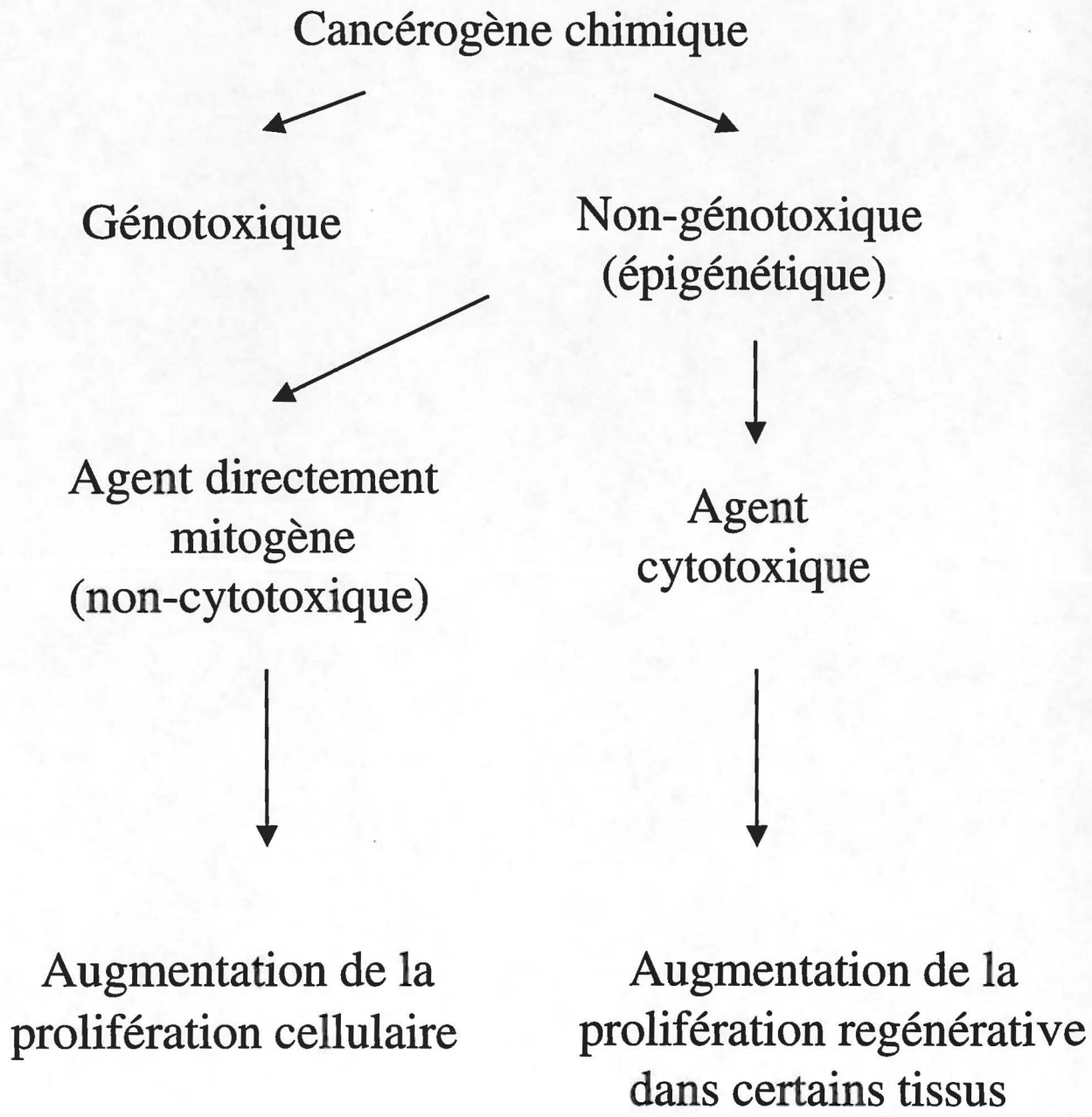


Figure 1.2: Voies responsables de la prolifération cellulaire induite par les cancérogènes de type épigénétique

1.3. Importance de la prolifération cellulaire dans la cancérogenèse

La prolifération cellulaire est un phénomène impliqué dans les trois phases de la cancérogenèse. Il s'agit d'un évènement critique et d'une extrême importance au niveau de la cancérogenèse chimique (Farber, 1995; Moolgavkar et Luebeck, 1995). En effet, la mitogenèse est susceptible d'augmenter la mutagenèse (phase initiale du processus de cancerogenèse) par les mécanismes suivants:

i) La division cellulaire amène la conversion des adduits en mutations;

ii) Durant la division cellulaire l'ADN se retrouve dénudé et sous forme simple-brin, ce qui le rend beaucoup plus sensible aux dommages;

iii) La division cellulaire amène la duplication de gènes, ce qui peut augmenter l'expression d'oncogènes (*c-myc* et *c-fos*);

iv) La division cellulaire amène des recombinaisons mitotiques qui peuvent également augmenter l'amplification de certains oncogènes;

De ce qui précède on peut donc voir qu'une cellule en division cellulaire est beaucoup plus à risque de mutagenèse qu'une cellule quiescente (Preston-Martin *et al.*,1990). L'apparition de mutations peut provenir soit via des agents endogènes ou soit par l'action d'agents exogènes. Suite à un évènement initiateur quelconque, la modification de l'ADN n'est point dramatique en elle-même si elle demeure silencieuse. Telle qu'illustrée à la figure 1.3, une expansion clonale de la cellule initiée suite à une prolifération accrue augmentera le nombre de cellules possédant la mutation initiale. De plus, suite au maintien de cette prolifération accrue on aura également plus de mutations au niveau d'une même cellule ce qui pourra alors conduire à une cellule cancéreuse (Swenberg *et al.*, 1987). Les cancérogènes épigénétiques peuvent donc amener indirectement la formation de mutations en induisant la prolifération cellulaire (Cohen et Ellwein, 1990).

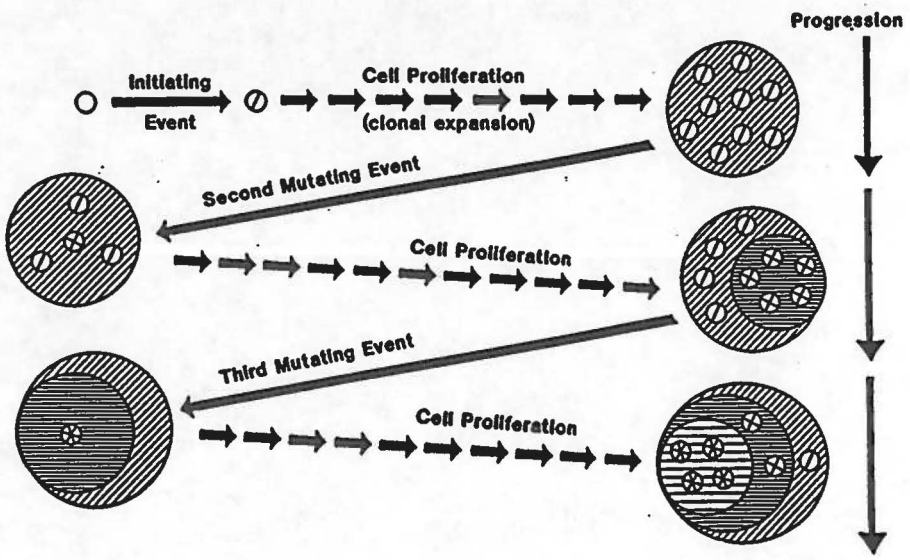


Figure 1.3: Schématisation du rôle de la prolifération cellulaire dans le processus de cancérogenèse (Reproduction de Swenberg *et al.*, 1987)

1.4 Cycle cellulaire et signaux de mitogenèse

Les cellules sont à la base de l'organisation structurelle et fonctionnelle de tous les organismes eucaryotes. Divers processus assurent le bon fonctionnement cellulaire. Une machinerie complexe permet le contrôle adéquat de la division cellulaire. La division cellulaire permet le maintien et le renouvellement de certaines cellules, phénomène indispensable à la survie des organismes. On distingue deux étapes successives au niveau de la division cellulaire, soit la division nucléaire (mitose) et la division du cytoplasme (cytodiérèse) (Le Peuch, 1990). Durant la mitose, le contenu du noyau se condense pour former des chromosomes, visibles au microscope, qui sont ensuite séparés en deux ensembles égaux. Au cours de la cytodiérèse, la cellule est alors scindée en deux cellules filles contenant chacune un ensemble complet de chromosomes. Au niveau biochimique le cycle cellulaire comporte quatre phases distinctes (O'Farrell *et al.*, 1989; Laskey *et al.*, 1989) soit:

- La phase G1 ("Gap 1" ou intervalle 1);

-La phase S (Synthèse d'ADN);

-La phase G2 ("Gap 2 ou intervalle 2);

-La phase M (Mitose).

La durée du cycle cellulaire varie selon l'espèce et selon les tissus. Le cycle peut s'étendre à moins d'une heure ou à plus d'un an, mais en moyenne il a une durée de 16 à 24 heures. Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase et correspondent normalement à 90 % de la durée totale du cycle. La phase M, qui ne dure en moyenne qu'une à deux heures, comporte aussi quatre étapes, soit la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

La plus grande partie de la variabilité dans le cycle cellulaire est due à la durée de la phase G1. Cette phase peut être pratiquement nulle ou à l'opposé être tellement longue que les cellules semblent avoir cessé de progresser dans leur cycle et être dans un état de quiescence. On dira alors que les cellules dans cet état G1 quiescent sont en phase G0. Le cycle cellulaire débute donc avec la phase G1 pendant laquelle il y a accélération des activités biosynthétiques. Dans cette phase on dénote un point critique appelé point de restriction ("start") où les cellules peuvent marquer une pause si l'environnement n'est pas favorable à la croissance. Une fois ce point dépassé, il n'y a plus de retour en arrière (Le Peuch, 1990) et la cellule s'engage alors dans l'achèvement de son cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire comprend, tel qu'identifié plus haut, différentes phases successives dans le temps. Il doit donc régner dans la cellule une certaine coordination, et par conséquent un contrôle très précis, pour permettre l'enchaînement du processus. Aussi le cycle cellulaire comporte plusieurs points de contrôle pour assurer cette harmonie. Chez les eucaryotes on distingue notamment trois stades de transition majeurs:

-La conversion de l'état quiescent à l'état prolifératif (G0 / G1);

-Le point d'initiation de la biosynthèse de l'ADN dans une cellule en croissance (G1 / S);

-Le point d'induction de l'entrée en phase M dans les cellules ayant répliqué leur génome (G2 / M).

Ces évènements clés de la régulation du cycle cellulaire dépendent non pas d'un seul mais bien d'un réseau d'éléments de contrôle. Plusieurs voies de signalisation cellulaire sont responsables du relai de l'action de facteurs de croissance, d'hormones et de xénobiotiques mitogènes ou anti-prolifératifs et du contrôle du cycle cellulaire (Shawver *et al.*, 1995).

Au niveau du signal de mitogenèse, on note:

i) La voie du récepteur à l'EGF conduisant à une cascade de phosphorylations au niveau de plusieurs protéines notamment celle de la voie des MAP kinases;

ii) La voie des récepteurs aux interleukines faisant intervenir les protéines JAKS et STATS;

iii) La voie des protéines G faisant intervenir les phosphatases;

iv) La voie des hormones stéroïdiennes.

La voie du récepteur à l'EGF est la voie majeure de signalisation cellulaire de la cellule mammaire (Yarden *et al.*, 1996). Ce récepteur est une protéine membranaire de type tyrosine kinase impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire. Ce dernier répond à son ligand, l'EGF. L'EGF est une protéine de 53 acides aminés comportant trois ponts disulfures. Il permet le déclenchement de la division cellulaire pour une grande variété de cellules notamment les cellules épithéliales *in vivo* et *in vitro* (Carpenter et Cohen, 1979).

Le signal du récepteur à l'EGF passe par une série d'interactions protéine-protéine opérée par une cascade de phosphorylation protéique (figure 1.4). L'évènement clé de l'activation de cette voie cellulaire est l'autophosphorylation du récepteur à l'EGF suite à la liaison de son ligand (Migliaccio *et al.*, 1996). Cette phosphorylation amène l'intéraction du récepteur avec de multiples protéines dont notamment la protéine Ras. Il est à noter que la voie de Ras est fondamentale dans la prolifération et la différenciation cellulaire car c'est cette dernière qui amènera l'activation de la MAP kinase. La MAP kinase activée pourra alors pénétrer le noyau et phosphoryler des facteurs de transcription tel *c-jun* et *c-fos* qui contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la division cellulaire. De plus, il est à noter que les différentes voies de signalisation cellulaire ne sont pas isolées dans la cellule mais intéragissent entre elles. Il s'agit bel et bien de voies entrecroisées.

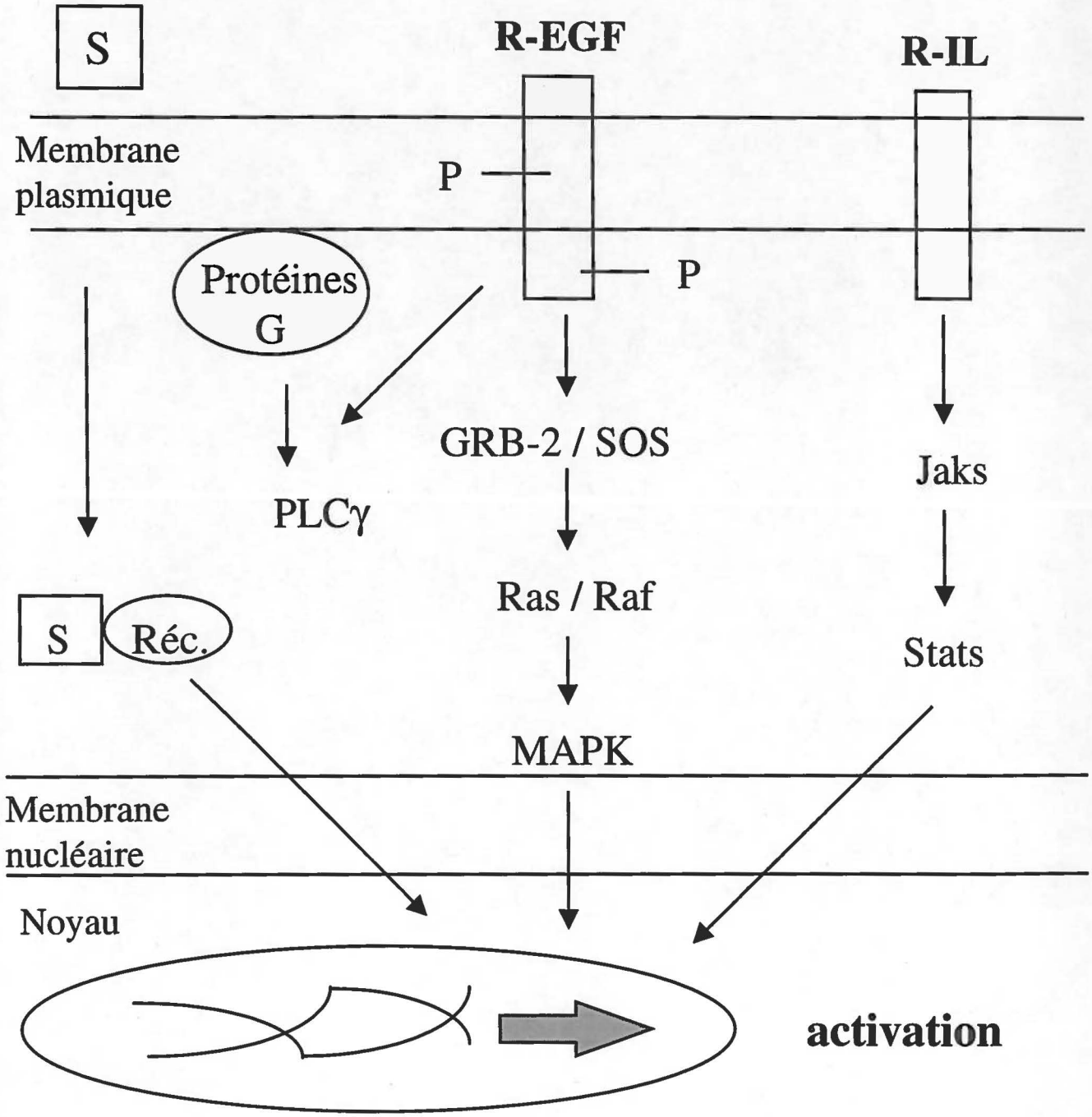


Figure 1.4: Aperçu des voies de signalisation cellulaire
S=hormone stéroïdienne, IL=interleukine,
PLC=phospholipase

1.5 Les organochlorés

Les cancérogènes chimiques et, plus particulièrement la famille des organochlorés pourraient jouer un rôle très important dans l'incidence du cancer du sein. Les organochlorés, des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés, sont une famille de composés organiques regroupant divers contaminants environnementaux tels les biphényles polychlorés (BPC), l'hexachlorobenzène (HCB), l'hexachlorocyclohexane (HCH) dont l'isomère important en regard au cancer du sein semble être le bêta (β), le 1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthane (DDT) et son métabolite majeur, le 1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène (DDE) (figure 1.5). La plupart des organochlorés, par leur nature lipophile, se retrouvent dans les tissus adipeux à des niveaux mesurables chez pratiquement tous les gens vivant dans les pays industrialisés. La présence de chlore confère à ces composés une très grande résistance face à la dégradation enzymatique. Dû à cette grande stabilité ces composés sont très persistants et bioaccumulables. Ils sont associés à une grande variété d'effets toxiques.

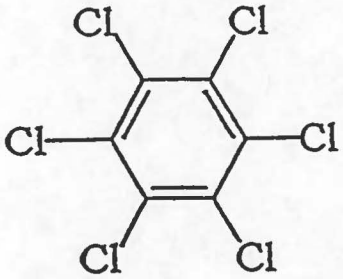
1.5.1 L'hexachlorobenzène

L'HCB est un contaminant environnemental persistant et très répandu. Sa distribution massive dans l'environnement provient du fait qu'il était autrefois utilisé comme fongicide pour les récoltes de blé et de seigle. Son application a été discontinuée au Canada en 1972. Aujourd'hui, on le retrouve comme sous-produit dans certains procédés industriels (IARC 1979a; Foster *et al.*, 1995).

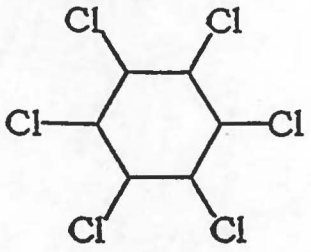
La présence de l'HCB dans l'environnement est généralisée. On retrouve ce contaminant dans l'air, l'eau potable, le sol et dans la nourriture. Il peut être absorbé par la peau, les poumons et le tractus gastro-intestinal (Newhook et Meek, 1994). Suite à une exposition, l'HCB emprunte d'abord la circulation entérohépatique et le foie est l'organe principal de son métabolisme. L'HCB étant un produit liposoluble, ce dernier sera alors entreposé dans les divers tissus adipeux de l'organisme. L'HCB est donc peu éliminé par les reins et il est généralement réabsorbé suite à une excrétion biliaire.

Une étude Canadienne a démontré que l'HCB était retrouvé dans les tissus adipeux chez virtuellement 100 % des citoyens testés. (Williams *et al.*, 1988). De plus, le gouvernement canadien estime que la moyenne ingérée d'HCB quotidiennement pour une femme adulte Canadienne est de 3.9 ng/kg/d. On le retrouve également en concentration appréciable dans le lait maternel des Canadiennes. Durant la lactation cet organochloré est mobilisé des tissus adipeux vers le lait maternel. Pour les six premiers mois de sa vie, un nourisson Canadien aura une prise moyenne provenant de la lactation estimée à 210 ng/kg/d (Newhook et Meek, 1994).

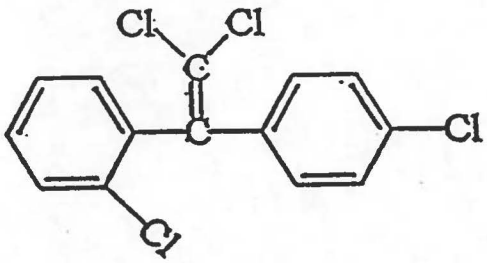
L'administration orale de façon chronique à des rats de différentes souches augmente la fréquence de tumeurs hépatiques. Il est à noter que les rats femelles sont beaucoup plus sensibles que les rats mâles. Une autre caractéristique importante de l'HCB est l'induction de la porphyrie hépatique, aussi observée plus fréquemment chez le rat femelle (Newhook et Meek, 1994).



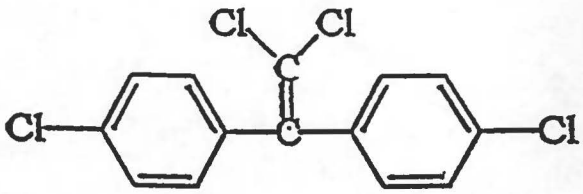
Hexachlorobenzène (HCB)



Hexachlorocyclohexane (β-HCH)



o,p'-DDE



p,p'-DDE

Figure 1.5: Structure chimique de quelques organochlorés

1.5.2 Le β-Hexachlorocyclohexane

L'HCH est un des plus ancien pesticide organochloré. La production commerciale de l'HCH a été rapportée pour la toute première fois en 1945 et elle a atteint son maximum en 1951. L'HCH fut utilisé principalement comme pesticide en agriculture, mais également pour le contrôle de la Malaria dans les pays sous-développés. Son utilisation a été banie en 1978 (IARC, 1979b).

L'HCH comporte plusieurs isomères dont trois de plus grande importance (isomères α, β et γ). L'isomère γ, aussi couramment appelé Lindane, est sans aucun doute le plus connu. L'activité insecticide de l'HCH est médiée par cet isomère et il s'agit de celui qui est le plus toxique. Contrairement aux autres organochlorés, ce dernier est rapidement métabolisé et, il possède une demie-vie très courte (Ahlborg *et al.*, 1995).

Les isomères α et β ne possèdent essentiellement aucune activité insecticide. Le β-HCH est l'isomère le plus persistant. On le retrouve en grande concentration dans l'environnement. Dans les pays industrialisés, ce dernier est retrouvé dans l'environnement à des niveaux beaucoup plus élevés que le lindane (IARC, 1979b).

1.5.3 Le DDT et ses isomères

Le DDT est un insecticide qui fut introduit dans les années 40. Il est l'hydrocarbure aromatique le mieux connu, le moins dispendieux et probablement l'un des insecticides synthétiques les plus efficace (IARC, 1991). Le DDT fut utilisé à travers le monde pour le contrôle des insectes en agriculture et également pour lutter contre la Malaria. L'utilisation de ce dernier a été abolie en 1975 mais il est encore utilisé dans certains pays en voie de développement dans la luttre contre la Malaria (Nair *et al.*, 1996).

Les plus grandes concentrations de DDT sont retrouvées dans la viande, la volaille, le poisson et les produits laitiers. Le DDT étant dégradé très lentement dans l'environnement, des concentrations approximatives de 2 ppm sont retrouvés dans le tissus adipeux de l'Homme (IARC, 1991).

Le métabolite majeur du DDT est le DDE. Ce dernier est plus persistant que son produit-mère et, par le fait même, des concentrations encore plus élevées sont retrouvées dans les tissus adipeux. Les concentrations de DDT et de DDE dans le lait maternel sont similaires à celles retrouvées dans les tissus adipeux (Jensen, 1983). La composition d'une préparation commerciale typique de DDT est donnée au tableau 1.1.

Isomères	**%**
p,p'-DDT	77.1
o,p'-DDT	14.9
p,p'-DDE	4.0
o,p'-DDE	0.1

Tableau 1.1 Composition typique d'une préparation commerciale de DDT

1.6 Potentiel cancérogène de l'HCB, du β-HCH et du DDE

L'HCB, le β–HCH et le DDE induisent tous trois des tumeurs au foie chez l'animal suite à une administration chronique (IARC, 1979a; IARC, 1979b; IARC, 1991). Ces trois organochlorés ont tous été classés comme des cancérogènes possibles par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1987). Tout récemment, l'HCB à été classifié comme cancérogène probable chez l'humain par la Direction de Santé Environnementale du Canada (Newhook et Meek, 1994).

L'HCB, le β–HCH et le *p,p'*-DDE n'ont pas été trouvés mutagène via le test de Ames et divers autres tests *in vitro* tel le test d'abbération chromosomale et le test de réparation d'ADN (IARC, 1987). Ces trois organochlorés sont donc des cancérogènes dits non-génotoxiques ou épigénétiques. Il est à noter que la formation de tumeurs au niveau du foie est un effet commun des cancérogènes épigénétiques. Ces composés sont également considérés comme des agents promotteurs de tumeurs (Siekel *et al*, 1991).

Aucune de ces substances conduit à la formation de tumeurs mammaires chez l'animal. La présence d'autres sites de cancérogenèse "plus sensibles" pourrait être un facteur important dans l'absence de cancérogenèse mammaire chez les rongeurs. D'ailleurs, sans la présence d'un initiateur chimique la glande mammaire des rongeurs ne semble pas très susceptible à la cancérogenèse.

1.7 Le cancer du sein

1.7.1 Les facteurs de risque

Depuis les trente dernières années l'incidence du cancer du sein au Canada a pratiquement doublé. Ce type de cancer est le plus fréquent chez la femme. Par contre, au point de vue du taux de mortalité il est supplanté par le cancer du poumon (tableau 1.2). Statistiquement, une femme nord-américaine sur neuf sera atteinte du cancer du sein au cours de sa vie (Saez et Martin, 1995)

Types de cancers	% de l'ensemble des cancers Incidence / Mortalité	
Sein	30	20
Côlon et rectum	13	11
Poumon	12	23

Tableau 1.2: Importance des cancers les plus fréquents chez la femme en terme d'incidence et de mortalité.

On dénote plusieurs facteurs responsables du déclenchement et de l'évolution du cancer du sein (Henderson *et al.*, 1988; Millikan *et al.*, 1995). L'incidence de ce type de cancer augmente avec l'âge (tableau 1.3). L'âge au moment des premières menstruations et l'âge auquel la ménopause se présente sont des facteurs de risque bien connus. L'âge de la première grossesse est également un autre facteur important. Le trait commun entre ces évènements est le nombre de cycles ovulatoires que la femme aura au cours de sa vie. Plus le nombre de cycles est élevé, plus le risque de développer un cancer du sein augmente. C'est donc dire que l'exposition globale aux estrogènes joue un rôle prédominant dans le risque du cancer du sein (Kelsey et Berkowitz, 1988; Hulka *et al.*, 1994). Plus particulièrement, c'est l'exposition cumulative aux estrogènes biologiquement actifs qui est fondamentale car ces derniers influencent diverses fonctions physiologiques dont notamment la croissance des cellules mammaires. Il est à noter que 30 % de tous les cancers chez l'humain sont médiés par les hormones soit, le cancer de la prostate, du sein, de l'endomètre et des ovaires (Henderson *et al.*, 1982).

Âge	Risque
30	1 sur 2472
40	1 sur 262
50	1 sur 63
60	1 sur 28
70	1 sur 14
80	1 sur 12
85	1 sur 10

Tableau 1.3: Risques du cancer du sein à différents âges chez la femmes canadiennes (Tiré de Engel, 1997)

Les habitudes nutritionnelles, c'est-à-dire le niveau et le type de gras consommé et la prise d'alcool, ainsi que le degré d'activité physique sont aussi des facteurs importants dans l'étiologie du cancer du sein. Un autre facteur est l'histoire familiale puisque 5 % des cancers du sein sont de type héréditaire et ils semblent dépendre de la présence de deux gènes isolés, le gène BRCA 1 et le gène BRCA 2. Néanmoins, l'ensemble de ces facteurs n'explique qu'environ 30 % des cas de cancer du sein (Kelsey et Berkowitz, 1988; Chen *et al*, 1995; Wooster *et al.*, 1995).

Depuis quelques années, la littérature rapporte un nombre croissant de facteurs environmentaux susceptibles d'augmenter l'incidence du cancer chez l'humain. Certaines études tendent à démontrer que les polluants chimiques, particulièrement les composés à base de chlore, auraient une certaine influence sur l'apparition du cancer du sein. L'hypothèse de l'implication des facteurs environnementaux dans l'incidence du cancer du sein s'appuie sur diverses observations et sont:

i) L'incidence du cancer du sein est plus élevé en Amérique et en Europe qu'en Afrique et en Asie (Miller, 1991);

ii) Les descendantes des japonaises qui immigrent au Canada démontrent une incidence du cancer du sein plus élevée que chez la génération de départ (Miller, 1991);

iii) Un certain nombre de composés présents dans l'environnement sont des cancérogènes mammaires (Wolff *et al.*, 1996);

iv) Certains contaminants environnementaux possèdent des propriétés estrogéniques (Wolff et Toniolo, 1995)

À l'heure actuelle, l'implication des contaminants environnementaux se retrouve donc comme élément central dans un débat très controversé.

1.7.2 Physiologie et histologie de la glande mammaire

Le sein de la femme comprend divers éléments fonctionnels dont les lobes et les canaux galactophores. Il comporte également plusieurs éléments structuraux: le tissu conjonctif, le tissu épithélial, les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques (figure 1.6). Du point de vue anatomique, le sein possède environ vingt lobes servant à la production du lait. Chacun de ces lobes se termine par un canal, le canal galactophore, servant à transporter le lait jusqu'aux mamelons. Il est à noter que le sein ne comporte aucun muscle, excepté ceux du mamelon qui permettent l'érection de ce dernier. Le mamelon est entouré d'une zone de peau pigmenté, l'aréole. L'aréole est parsemée de minuscules protubérances, les glandes sudoripares et les glandes de Montgomery (Engel, 1997).

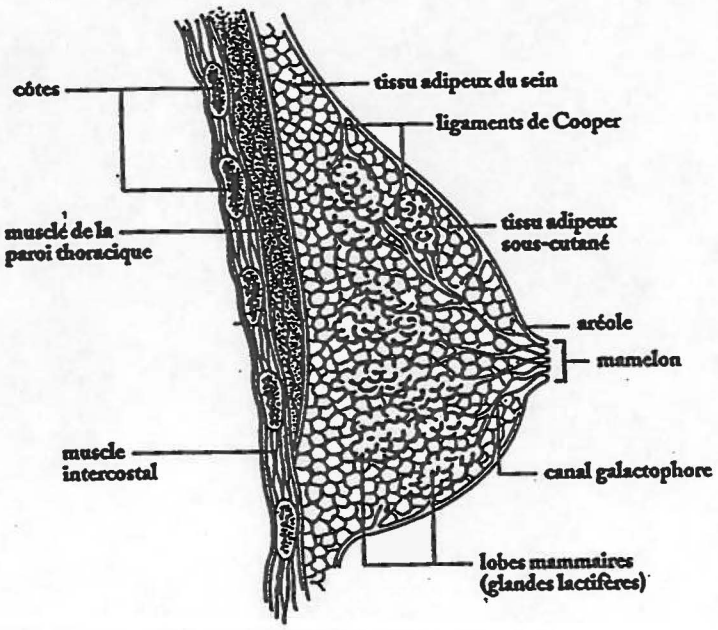


Figure 1.6: Structure anatomique du sein
(Reproduction de Engel, 1997)

1.7.3 Cellules mammaires en culture

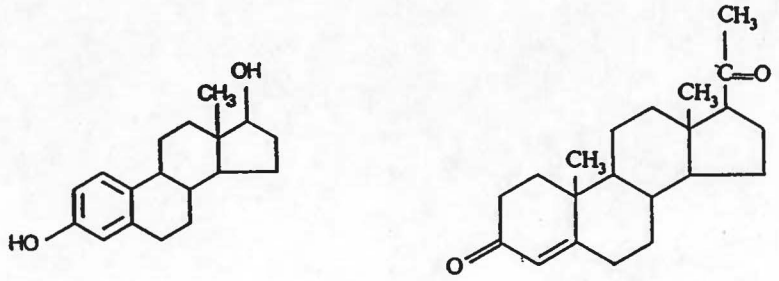
Les cultures cellulaires sont devenues un outil de laboratoire de plus en plus important dans de nombreuses disciplines. Les cellules ainsi cultivées retiennent généralement leurs caractéristiques propres et conservent leur structure et leur fonctionnalité. De plus, la culture cellulaire permet l'étude de la division des cellules dans un environnement contrôlé.

Plusieurs types de cellules peuvent être cultivés *in vitro*. Les cellules épithéliales des glandes mammaires font partie de ce groupe. En effet plusieurs lignées de cellules mammaires sont disponibles commercialement ou via des dons entre chercheurs. On distingue principalement deux catégories: les lignées non-tumorigènes et les lignées tumorigènes. Les cellules MCF-10 sont un exemple de lignées de cellules mammaires humaines non-tumorigènes. On retrouve notamment chez ce type cellulaire les MCF-10F et les MCF-10A (Soule *et al.*, 1990; Tait *et al.*, 1990). À l'inverse, les MCF-7 sont une lignée de cellules mammaires humaines tumorigènes (Soule *et al.*, 1973). Ces cellules possèdent une activité tumorigène lorsqu'elles sont injectées aux souris.

1.7.4 Réponses aux facteurs mitogènes

Chez la femme, le tissu mammaire est extrêmement sensible aux hormones sexuelles féminines telle les estrogènes et la progestérone (figure 1.7). Ces différentes hormones déclenchent, maintiennent et contrôlent les divers changements touchant les seins de la femme et ce, de la puberté à la ménopause. Le tissu mammaire se modifie donc constamment selon les variations de concentration des hormones sexuelles de la femme (Yager et Liehr, 1996). Par exemple, lors du cycle menstruel de la femme, les concentrations plasmatiques d'estradiol et de progestérone peuvent passer respectivement de 50 pg/ml à 600 pg/ml et de 1 ng/ml à 28 ng/ml (Goodman et Gilman's, 1990).

Les cellules épithéliales du tissu mammaire sont dotées de récepteurs sensibles aux estrogènes et à la progestérone. De plus, le nombre de ces récepteurs varie d'une femme à l'autre, et aussi en fonction de l'âge. Les estrogènes agissent comme des facteurs mitogènes au niveau de ce type de cellules. Le rôle précis de la progestérone au niveau des cellules épithéliales mammaires n'est point clair à l'heure actuelle. Ces hormones contribuent donc à la croissance et à la régulation de la glande mammaire mais elles peuvent également être impliquées dans son dysfonctionnement.



Estradiol Progestérone

Figure 1.7: Structure des hormones stéroïdiennes féminines: l'estradiol et la progestérone

1.8 Les xénoestrogènes

Tel que décrit précédemment, les estrogènes jouent un rôle d'une grande importance au niveau du tissu mammaire. Aussi au cours des dernières années une nouvelle hypothèse exploitant ce fait a vu le jour pour tenter d'expliquer l'incidence du cancer du sein: l'exposition à des agents xénoestrogènes (Wolff et Toniolo, 1995). Les xénoestrogènes sont des substances chimiques provenant de l'environnement et ayant le pouvoir soit de mimer les estrogènes endogènes des cellules soit d'altérer l'activité de ces hormones (Davis et Bradlow, 1995). Les xénoestrogènes agissent donc au niveau de la pharmacocinétique et/ou de la pharmacodynamique des hormones endogènes.

Certains composés xénoestrogènes peuvent se lier au récepteur à l'estrogène et déclencher les effets normalement régulés par ce dernier, dont la prolifération cellulaire. À l'inverse, certains autres xénoestrogènes ne peuvent se lier à ce type de récepteur mais ils peuvent quand même promouvoir l'incidence du cancer du sein en augmentant la production du 16α-hydroxyestrone. En effet, en plus d'être un composé génotoxique, le 16α-hydroxyestrone possède une très forte affinité pour le récepteur à l'estrogène et par conséquent conduit à la promotion de gènes de croissance (Swaneck et Fishman, 1988; Davis *et al.*, 1993; Bradlow *et al.*, 1996).

Durant les quinzes dernières années, diverses expérimentations ont démontré que certains composés possèdent effectivement des propriétés estrogéniques. Le tableau 1.4 donne un aperçu de ces composés (Davis *et al.*, 1993; Ahlborg *et al.*, 1995; Kelce *et al*, 1995). L'intérêt des contaminants environnementaux et de leur relation avec le cancer du sein provient donc de leur persistance, de leur pouvoir cancérogène, mais également au fait que certains de ces composés possèdent des propriétés estrogéniques (Wolff et Toniolo, 1995; Hunter *et al.*, 1997).

1.9 Implication des organochlorés dans le cancer du sein

Plusieurs études épidémiologiques récentes suggèrent une association possible entre l'incidence du cancer du sein et certains organochlorés (Wolff *et al.*, 1996). L'équipe de Mussalo-Rauhamaa et *al.* (1990) a mesuré le taux de plusieurs organochlorés dans les tissus adipeux mammaires et ce chez un groupe de femmes atteintes du cancer du sein comparativement à un groupe de femmes témoins. L'étude a démontré un lien possible entre le β-HCH et le cancer du sein. Le groupe de Falck *et al.* (1992) a également démontré un lien possible entre l'incidence du cancer du sein et l'exposition aux organochlorés. En effet, les taux du *p,p'*-DDT, du *p,p'*-DDE et des BPC étaient plus élevés dans les échantillons de tissus adipeux mammaires des femmes atteintes de cancer du sein comparativement à des patientes subissant une réduction mammaire.

Contaminants	Propriétés	Références
o,p'-DDT	Fortement estrogénique	Kelce *et al.*, 1995
p,p'-DDT	Non-estrogénique	Kelce *et al.*, 1995
o,p'-DDE	Estrogénique	Ahlborg *et al.*, 1995
p,p'-DDE	Non-estrogénique	Ahlborg *et al.*, 1995
β-HCH	Estrogénique	Coosen et Val Velsen, 1989
TCDD	Anti-estrogénique	Kociba *et al.*, 1978
BPC	Estrogénique Anti-estrogénique	Jansen *et al.*, 1993

Tableau 1.4: Propriétés estrogéniques de divers contaminants environnementaux

En 1993, Wolff *et al.* ont réalisé une étude similaire mais cette fois-ci au niveau du plasma. Ils ont eux aussi observé un taux plus élevé de *p,p'*-DDE chez le groupe de femmes atteintes du cancer du sein. À l'opposé, Krieger *et al.* (1994) n'ont pas observé d'association significative entre l'exposition aux DDE et aux BPC et l'incidence du cancer du sein.

Finalement, une équipe de chercheurs Québécois (Dewailly *et al.*, 1994) a rapporté une différence significative entre un groupe de femmes atteintes du cancer du sein et un groupe de femmes non-atteintes en ce qui concerne l'HCB plasmatique (0.32 µg/L versus 0.23 µg/L, respectivement).

1.10 Objectifs de la recherche

Comme nous venons de le voir plusieurs études épidémiologiques récentes de type écologiques suggèrent que certains contaminants environnementaux, notamment les organochlorés, pourraient être impliqués dans l'incidence du cancer du sein.

À l'heure actuelle le rôle possible des organochlorés dans l'incidence du cancer du sein est encore très controversé. Jusqu`à présent, les diverses recherches concernant cette problématique se sont limitées à la caractérisation du potentiel estrogénique de ces contaminants environnementaux. Pour établir un lien de causalité possible entre l'exposition aux organochlorés et l'incidence du cancer du sein, il est essentiel d'effectuer des recherches fondamentales au niveau des aspects mécanistiques de l'action des organochorés. L'attention devrait être dirigée vers le potentiel mitogène de ces divers composés chimiques chez les cellules épithéliales mammaires.

L'objectif général de ce mémoire est donc de caractériser le potentiel mitogène de l'HCB, du β-HCH, de l'*o,p'*-DDE et du *p,p'*-DDE envers les cellules épithéliales mammaires humaines et, d'élucider le ou les mécanismes responsables d'une induction possible de la prolifération cellulaire. Pour ce faire, nous utiliserons une lignée de cellules mammaires humaines non-cancérogènes, les MCF-10A. Les objectifs spécifiques des présents travaux sont:

A) d'étudier l'effet mitogène des divers organochlorés (HCB, β–HCH, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE) envers la lignée MCF-10A;

B) d'évaluer la présence du récepteur à l'estrogène chez les MCF-10A par une étude de liaison à l'estradiol marqué;

C) d'étudier l'effet de l'estradiol et de la progestérone envers les MCF-10A.

Les différentes informations de la littérature nous ont incités à cibler deux voies de signalisation cellulaire pour l'étude des mécanismes pouvant être responsables de la mitogenèse induite par les divers organochlorés:

1) La voie de signalisation activée par le récepteur à l'estrogène;

2) La voie de signalisation activée par le récepteur à l'EGF.

Aussi, un des objectifs spécifiques est de vérifier si l'un de ces deux mécanismes visés est à la base de l'effet si un produit s'avère mitogène.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les produits suivants proviennent de chez Sigma (St-Louis, MO): le milieu de culture DMEM/F-12, l'EGF (>97 %), l'hydrocortisone (>97 %), l'ADN de sperme de hareng ("herring sperm"), le bisbenzimide (réactif d'Hoechst), le DMSO, le tris-Cl, le triton X-100, l'HEPES, le Tween 20, la glycine, l'albumine bovine, l'aprotinine, le sulfate de protamine, le glycérol (>99.8 %), le monothioglycérol (<98 %), le DES, le trypan bleu, le bleu de coomassie, la progestérone (76 mg/g), le 17β-estradiol (42 mg/g) et le tamoxifène. L'HCB (>99 %), le *p,p'*-DDE (>99 %) et l'azide de sodium ont été achetés de la compagnie Aldrich Chemical (Milwakee, Wis). L'*o,p'*-DDE et le β-HCH pour leur part proviennent de chez Supelco (Ontario, Canada). De chez Gibco Life Technologies proviennent l'insuline (27 USP/mg), la toxine de choléra, les divers sérums (sérum de cheval, de chèvre et de veau foetal), le RPMI 1640, la pénicilline/streptomycine (10 000 unités/ml) et la trypsine/EDTA. Le NaCl, l'EDTA et le sucrose quant à eux proviennent de la compagnie Biopharm (Québec, Canada) alors que l'[^{3}H]17β-estradiol (119 Ci/mmol) ainsi que la trousse de chemiluminescence (ECL) ont été achetés chez Amersham (Ontario, Canada). Le violet de crystal (>98 %) et le phosphate de sodium proviennent de chez Fisher Chemical (Ontario, Canada). L'hydroxyde d'hyamine et l'Ecolite® ont été achetés chez ICN Biomedicals (Ontario, Canada). Finalement, l'anticorps anti-phosphotyrosine PY20 provient de chez "Transduction Laboratories" (Lexington, Ky).

2.2 Culture cellulaire

Les diverses expériences ont été effectuées chez les lignées MCF-10A et MCF-7. Les cellules MCF-10A ont été obtenues de "l'American Type Culture Collection" (Rockville, MO) alors que nous avons eu accès aux cellules MCF-7 par le biais d'une collaboration avec l'équipe du Dr. R. Mandeville (Institut Armand-Frappier, Québec, Canada). De façon routinière, les MCF-10A sont maintenues en culture dans le milieu DMEM/F-12 additionné de toxine de choléra (100 ng/ml), d'hydrocortisone (500 ng/ml), d'EGF (20 ng/ml), d'insuline (10 µg/ml) et de sérum de cheval (5 %). Les MCF-7 sont maintenues en culture dans le RPMI 1640 supplémenté avec de l'HEPES (1 M; pH: 7.3) et du sérum de veau foetal (10 %).

Les deux lignées sont cultivées dans des bouteilles de 75 cm^2 avec 5 ml de pénicilline/streptomycine (50 000 unités) et incubées à 37 ^0C sous une atmosphère contrôlée contenant 5 % en CO_2. Les cultures sont repiquées au moins une fois par semaine à l'aide d'un mélange de trypsine (0,25 %) et d'EDTA (1mM). Pour la culture des MCF-10A et des MCF-7, le milieu de culture utilisé ne contient pas de rouge de phénol car ce dernier possède des propriétés estrogéniques qui pourrait ajouter un biais méthodologique (Berthois *et al.*, 1986)

2.3 Mesure de la cytotoxicité: test de la formation de colonies

Les MCF-10A sont mises en culture dans des pétris de 5 cm de diamètre au nombre de 1000 cellules par pétri et incubées durant 24 h pour permettre leur adhérence à la surface. Les cellules sont alors exposées aux organochlorés ajoutés à différentes concentrations pour une période de 24 h. Tous les organochlorés sont dissous dans le DMSO dont la concentration maximale est de 0.1 %. Suite au traitement, les cellules sont lavées avec 5 ml de PBS ("phosphate buffer saline") et incubées durant dix jours

dans le milieu DMEM/F-12 complet. À la fin de l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec 5 ml de PBS, puis 2 ml d'une solution de violet de crystal (0.3 % dans de l'éthanol 100 %) sont ajoutés pour la coloration des cellules. Le nombre de colonies par pétri est compté au binoculaire afin de calculer l'efficacité de formation de colonies permettant d'établir la cytotoxicité du contaminant.

2.4 Dosage cytosolique du récepteur à l'estrogène

2.4.1 Mise en culture et traitement des cellules

Les MCF-10A et les MCF-7 mises en culture parallèlement dans des pétris de 10 cm de diamètre sont incubées jusqu'à l'obtention d'une confluence de 90 %. Les cellules sont alors exposées à l'estradiol (1 nM) pour 1 h. Les cultures servant de témoin ne reçoivent aucun traitement. Après l'exposition, les cellules sont rincées avec 5 ml de PBS froid puis congelées à - 80 °C.

2.4.2 Préparation de la fraction cytosolique contenant le récepteur estrogénique

Le dosage cytosolique du RE est déterminé en se basant sur la méthode de Coosen et Velsen (1989). Les échantillons congélés sont remis en suspension avec 0.8 ml de NaP (10 mM sodium de phosphate, 3 mM d'azide de sodium, pH 7.4). Les cellules sont ensuite récupérées à l'aide d'un "policeman", transférées dans des tubes Falcon de 15 ml auquel on ajoute 5.4 ml de NaP puis elles sont alors déposées sur la glace durant une heure. Après cette incubation les cellules sont homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem, dans un volume de 54 ml d'aprotinine (50 000 KIU/ml) permettant l'inhibition des protéases. Les homogénats préparés dans un volume de 1.08 ml de tampon NaP contenant 1.8 M de sucrose sont alors centrifugés pendant 30 minutes à 100 000 g à l'aide d'une centrifugeuse Beckman LKB-80 équi-

pée d'un rotor 80Ti. Le sucrose empêche la rupture des organelles (noyau, lysosomes et mitochondries en particulier) minimisant du même coup le relarguage de diverses enzymes protéolytiques.

Suite à la centrifugation, le surnageant est prélevé et transféré dans des microtubes de type "Eppendorf" de 1.5 ml. On procède alors aux dosages des protéines. Pour la précipitation à froid du RE des aliquots de 0.7 ml du cytosol sont incubés pendant 15 minutes avec le même volume d'une solution de 2 mg/ml de protamine sulfate dans du NaPMG (5 mM phosphate de sodium, 1 mM monothioglycérol, 10 % v/v de glycérol) Les échantillons sont alors centrifugés de nouveau pendant dix minutes à 2500 g à l'aide d'une centrifugeuse Beckman.

Le culot est conservé et chaque échantillon est incubé durant 18 h en présence de 237 µl de [^{3}H]17β-estradiol (5 nM). Pour déterminer le degré de liaison non-spécifique de l'estradiol, des échantillons parallèles reçoivent un excès de DES (10 µM). Les échantillons sont remis en suspension et sont chauffés à 90 ^{0}C pendant 30 minutes. Ces derniers sont ensuite centrifugés à 2500 g pendant 10 minutes et lavés quatre fois au NaPMG froid. Le culot est alors digéré à l'aide de 500 µl d'hydroxyde d'hyamine commerciale et transféré dans des vials à scintillation.

Quinze millilitres de liquide à scintillation Ecolite® sont ajoutés aux vials puis la basicité des échantillons est supprimée par l'addition de deux ml d'HCl 0.5 N. On laisse reposer les échantillons durant 18 h pour réduire la chemiluminescence puis la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation LKB. Le compteur à scintillation a été calibré pour tenir compte du "quenching" et du type de vials utilisés. La concentration du RE est exprimée en Fmol/mg de protéines en utilisant l'activité spécifique du ligand radioactif.

2.5 Mesure du contenu en ADN

La mesure du contenu en ADN est déterminée en se basant sur la méthode de Blaheta *et al.*, 1991). Les cellules MCF-10A sont mises en culture au nombre de 50 000 cellules/puit dans une plaque de six puits et elles sont incubées en présence de 1 ml de DMEM/F-12 complet durant 24 h pour permettre l'adhérence des cellules aux plaques. Elles sont ensuite exposées, en triplicata, aux différents organochlorés et ce, en présence ou en absence d'estradiol (1 nM) pour une période de 96 h. Après l'exposition, les cellules sont alors récupérées des plaques à l'aide du mélange de trypsine (0.25 %) et d'EDTA (1 mM). Les cellules sont centrifugées dans des microtubes de 1 ml à 2500 RPM pour 10 minutes et lavées deux fois avec 2 ml de PBS. Il y a ajout de 10 µl de Triton X-100 (0.1%) dans chacun des échantillons qui sont ensuite soumis aux ultrasons pendant une minute.

Cinquante microlitres de chaque échantillon est mélangé avec 2 ml de tampon Hoechst pH 7.0 (10 nM tris-Cl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.2 g de bisbenzimide 33258/l (réactif de Hoechst)). La fluorescence est mesurée (Exc. 356 nm, Émis. 458 nm) après trente minutes d'incubation à la noirceur. Le contenu en ADN de chaque lysat est calculé en utilisant un étalon d'ADN ("herring sperm DNA" (50 µg/ml)). Le contenu en ADN est exprimé en ng/puit.

2.6 Décompte cellulaire

Le décompte cellulaire s'effectue à l'aide d'un hématocytomètre. Cet instrument comporte deux chambres d'un volume individuel de 0.1 µl et chaque chambre est divisée en quatre sous-unités de seize compartiments. Pour effectuer le décompte, 900 µl de trypan bleu est ajouté à 100 µl de la suspension cellulaire (dilution 1:10) et le tout est alors inséré dans les deux chambres. Le nombre de cellules viables se retrouvant dans

chaque sous-unité est déterminé par comptage à l'aide d'un microscope optique. Par extrapolation au volume total, le nombre total de cellules dans le puit ou dans le pétri est déterminé. Le décompte cellulaire s'effectue en triplicata.

2.7 Phosphorylation du récepteur à l'EGF

2.7.1 Préparation des échantillons

Les MCF-10A sont mises en culture dans des pétris de 10 cm de diamètre au nombre de 500 000 cellules/pétri et sont incubées jusqu'à l'obtention d'une confluence de 80 %. Seize heures avant le traitement, le milieu de culture des cellules servant de témoin positif et de témoin négatif est remplacé par du DMEM/F-12 supplémenté avec seulement 0.1 % de sérum de cheval. Les cellules du groupe "témoin positif" sont exposées pendant 10 minutes à l'EGF (100 ng/ml). Les cellules du groupe "témoin négatif" ne reçoivent aucun traitement. Pour l'exposition au HCB deux traitements distincts sont effectués. Pour le premier cas les MCF-10A sont exposées à une concentration unique d'HCB (20 µM) pour une période de 0, 5, 10 ou 20 minutes alors que dans la deuxième situation les cellules sont traitées pendant 10 minutes avec 0, 5, 10 ou 20 µM d'HCB et ce toujours en présence de 20 ng/ml d'EGF..

À la fin des expositions, les cellules sont récupérées à l'aide d'un "policeman", lavées au PBS et centrifugées à 1500 rpm pendant 1 minute. Il y a ajout de 1 ml de tampon HNMETG (50 mM HEPES; pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 10 % glycérol et 2 mM de vanadate de sodium) à chaque échantillon. Les cellules sont transférées dans des microtubes et lysées par sonication à puissance et intensité modérées pendant 15 secondes et les débris cellulaires sont éliminées par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et conservé pour le dosage des protéines et l'analyse par immunobuvardage.

2.7.2 Immunobuvardage

Les lysats cellulaires (25 µg) sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) selon la méthode de Laemmli (1970). Après le SDS-PAGE, les protéines sont électro-transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) immergée dans un tampon de glycine/Tris. Les sites non-spécifiques de la membrane sont préalablement bloqués par trempage durant une heure à la température de la pièce dans un tampon TBS ("tris buffer saline"-0.1% Tween-20, 0.1 % de sérum de chèvre, 1% d'albumine bovine). La membrane est ensuite lavée deux fois avec du tampon TBS-Tween 20 (0.1%) à la température de la pièce pendant une heure. Le premier anticorps anti-phosphotyrosine PY20 est alors ajouté au tampon de blocage à une dilution de 1:1000 et interfère avec la membrane pour une période d`une heure. La membrane est alors de nouveau lavée à deux reprises pendant 5 minutes suivi de deux autres lavages d'une durée individuelle de 10 minutes avec du tampon TBS-Tween 20 (0.1 %). Le deuxième anticorps anti-souris couplé à la "horseradish peroxidase" est par la suite ajouté au tampon de blocage à une dilution de 1:10 000 pour une durée d`une heure. La membrane est ensuite lavée extensivement dans de grands volumes de TBS-Tween 20 (0.1%) pendant 10 minutes et ce, à plusieurs reprises.

La détection des protéines qui sont reconnues par l'anticorps primaire et par l'anticorps secondaire couplé à la "horseradish peroxidase" est effectuée en utilisant une trousse de chemiluminescence (ECL, Amersham). Brièvement, la membrane est incubée en présence d'un substrat de la peroxidase qui une fois oxydé dégage de la luminescence pendant une minute. Par la suite, l'excès de liquide est enlevé et la membrane est emballée hermétiquement dans une pellicule de plastique. La membrane est alors exposée à un film sensible aux rayons X (Kodak) pendant 2 à 5 minutes et le film est développé selon le processus traditionnel.

2.8 Dosage des protéines

Les protéines ont été mesurées dans les échantillons selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant comme étalon protéique l'albumine de boeuf et comme réactif, une solution commerciale de bleu de coomassie. Les lectures d'absorbance se font à l'aide d'un lecteur multiplaque automatisé EL X 800 (Bio-Tek Instruments Inc.) ajusté à 595 nm.

2.9 Statistiques

La moyenne et l'erreur sur la moyenne (SEM) ont été calculées pour chaque échantillon et groupe analysé. Pour comparer les moyennes de groupes exposés aux organochlorés à celles des témoins on procède à une analyse de variance (Two way ANOVA) suivi d'un test de comparaison *a posteriori* (Test de Bonferroni). Le niveau de probabilité inférieur à 0.05 a été retenu comme seuil significatif.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1 Mesure de la cytotoxicité des organochlorés

Le tableau 3.1 présente les résultats de l'évaluation du potentiel toxique des divers organochlorés (*o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, β-HCH et HCB) chez les MCF-10A, tel que mesuré par le test de formation de colonies, et ce pour des concentrations allant de 1 µM à 1000 µM. Le taux moyen de formation de colonies pour l'ensemble des quatre groupes témoins est de 3,70 ± 0.13 %. Le seuil de cytotoxicité, qui correspond à la plus petite concentration causant une réduction significative du taux de formation de colonies (environ 2.5 à 3 %) est de 75 µM pour l'*o,p'*-DDE et le *p,p'*-DDE et de 100 µM pour le β-HCH et l'HCB (tableau 3.1). Aussi, toutes les expériences ultérieures seront effectuées en utilisant des concentrations inférieures à ces seuils cytotoxiques.

3.2 Dosage cytosolique du récepteur à l'estrogène et caractérisation du potentiel mitogène del'estradiol

Le récepteur à l'estrogène estimé par la liaison spécifique du [^{3}H]17β-estradiol est présent à une concentration de 9,7 Fmol/mg de protéines chez les MCF-7 et à une concentration de 4,85 Fmol/mg de protéines chez les MCF-10A (tableau 3.2). Suite à l'exposition de 1 nM d'estradiol, le niveau du récepteur à l'estrogène au niveau du cytosol, pour les MCF-7 et pour les MCF-10A est virtuellement nul. Le récepteur aux estrogènes étant un facteur de transcription ce dernier, en présence de son ligand, est retenu plus fortement dans la fraction nucléaire.

	Efficacité à former des colonies (# / 100 cellules mises en culture)			
Traitement	***o,p'*-DDE**	***p,p'*-DDE**	**β-HCH**	**HCB**
Témoin	3,80 ± 0,10	3,50 ± 0,01	4,03 ± 0,09	3,47 ± 0,09
DMSO	3,63 ± 0,12	3,41 ± 0,08	3,90 ± 0,10	3,43 ± 0,03
1 µM	3,73 ± 0,03	3,60 ± 0,06	3,90 ± 0,06	3,57 ± 0,3
10 µM	3,67 ± 0,15	3,35 ± 0,08	3,80 ± 0,06	3,33 ± 0,09
25 µM	3,63 ± 0,09	3,13 ± 0,07	3,77 ± 0,09	3,40 ± 0,06
50 µM	-	-	-	3,33 ± 0,09
75 µM	**2,50 ± 0,06** *	**2,58 ± 0,01** *	-	3,23 ± 0,09
100 µM	**2,13 ± 0,09** *	**2,04 ± 0,01** *	**3,03 ± 0,12** *	**2,70 ± 0,06** *
200 µM	-	-	-	**2,43 ± 0,03** *
500 µM	**0** *	**0** *	**1,80 ± 0,06** *	-
1000 µM	**0** *	**0** *	**1,13 ± 0,12** *	-

Tableau 3.1 Mesure de la cytotoxicité par le test de formation de colonies chez les MCF-10A exposées durant 24 h à différents organochlorés. Chaque donnée du tableau est exprimée comme la moyenne ± SEM pour trois essais. * La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

	Concentration du RE dans le cytosol (Fmol/mg prot.)	
Traitement	**MCF-7**	**MCF-10A**
Témoin	9,7 ± 2,6	4,85 ± 1,5
E_2 (1 nM)	2,7 ± 2,5 (0, 0.5, 7.6)	1,5 ± 1,5 (0, 0, 4.5)

Tableau 3.2 Effet de l'estradiol (E_2) sur la concentration de son récepteur cytosolique chez deux lignées de cellules épithéliales mammaires humaines. Chaque donnée du tableau est exprimée comme la moyenne ± SEM pour trois essais.

En ce qui concerne le potentiel mitogène de l'estradiol, ce dernier amène une nette induction de la prolifération cellulaire chez les MCF-10A (figure 3.1). L'ajout de 1 nM, 5 nM et 10 nM d'estradiol conduit à une augmentation significative ($p<0.05$) de la prolifération cellulaire des MCF-10A (38 %, 37 % et 58 % respectivement).

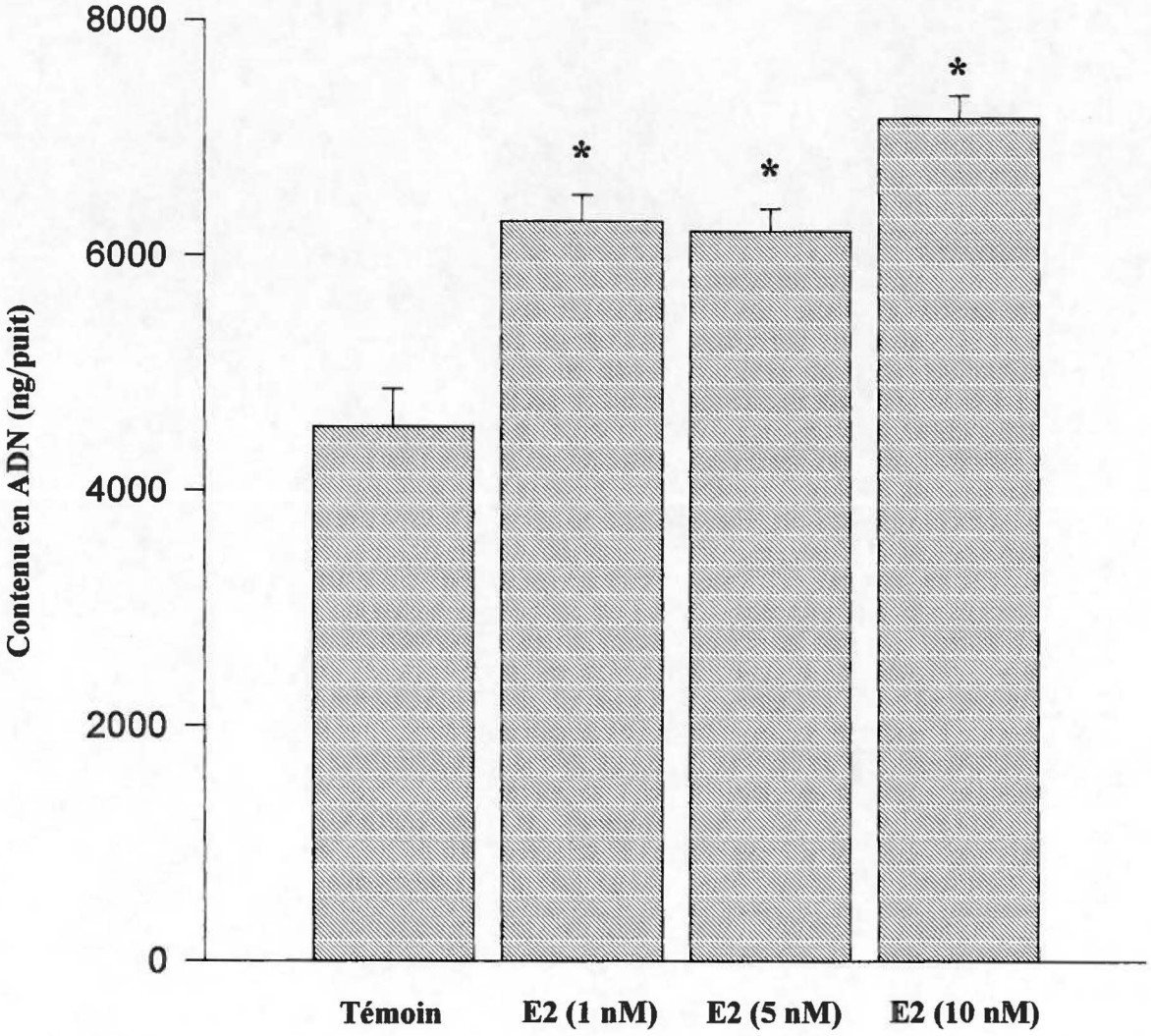


Figure 3.1 Effet de l'estradiol (E2) sur la prolifération cellulaire des MCF-10A. Chaque barre du graphique représente la moyenne ± SEM pour trois essais.
* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

3.3 Caractérisation du potentiel mitogène de l'hexachlorobenzène

La figure 3.2 indique que l'HCB entraîne une induction de la mitogenèse chez les MCF-10A. En effet, à une concentration de 20 µM, l'HCB cause une augmentation significative ($p<0.05$) de 39 % du contenu total en ADN. Il est à noter qu'aux concentrations utilisées aucune synergie n'est observée dans le niveau de prolifération cellulaire résultant de l'effet combiné de l'HCB (20 µM) et de l'estradiol (1nM).

Dans le but de déterminer si la stimulation de la mitogenèse s'effectuait via le récepteur aux estrogènes, nous avons utilisé le tamoxifène, un antagoniste de ce récepteur. Tel qu'attendu, la présence de ce dernier (0.1 ou 1 µM) dans le milieu de culture bloque l'augmentation significative ($p<0.05$) de la prolifération induite par l'estradiol (1 nM) (figure 3.3). Le tamoxifène a toutefois été sans effet sur la hausse de prolifération cellulaire des MCF-10A induite par l'HCB (figure 3.4). En effet, suite au traitement d'HCB (20 µM) une augmentation significative ($p<0.05$) du contenu en ADN de 33 % et de 40 % a été observée en absence et en présence de 1 µM de tamoxifène.

L'effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire des MCF-10A induite par l'estradiol et l'HCB a été confirmé par le dénombrement des cellules à la fin de l'exposition (tableau 3.3). Une augmentation significative ($p<0.05$) de 36 % a été observée chez les cellules traitées à l'estradiol (1 nM) alors qu'en présence de tamoxifène le nombre total était légèrement inférieur ($p>0.05$) au niveau témoin. Chez les cellules incubées en présence d'HCB le nombre total de cellules à la fin de l'exposition était de 36 % et de 35 % pour les milieux respectivement dépourvus et additionnés de tamoxifène (tableau 3.3).

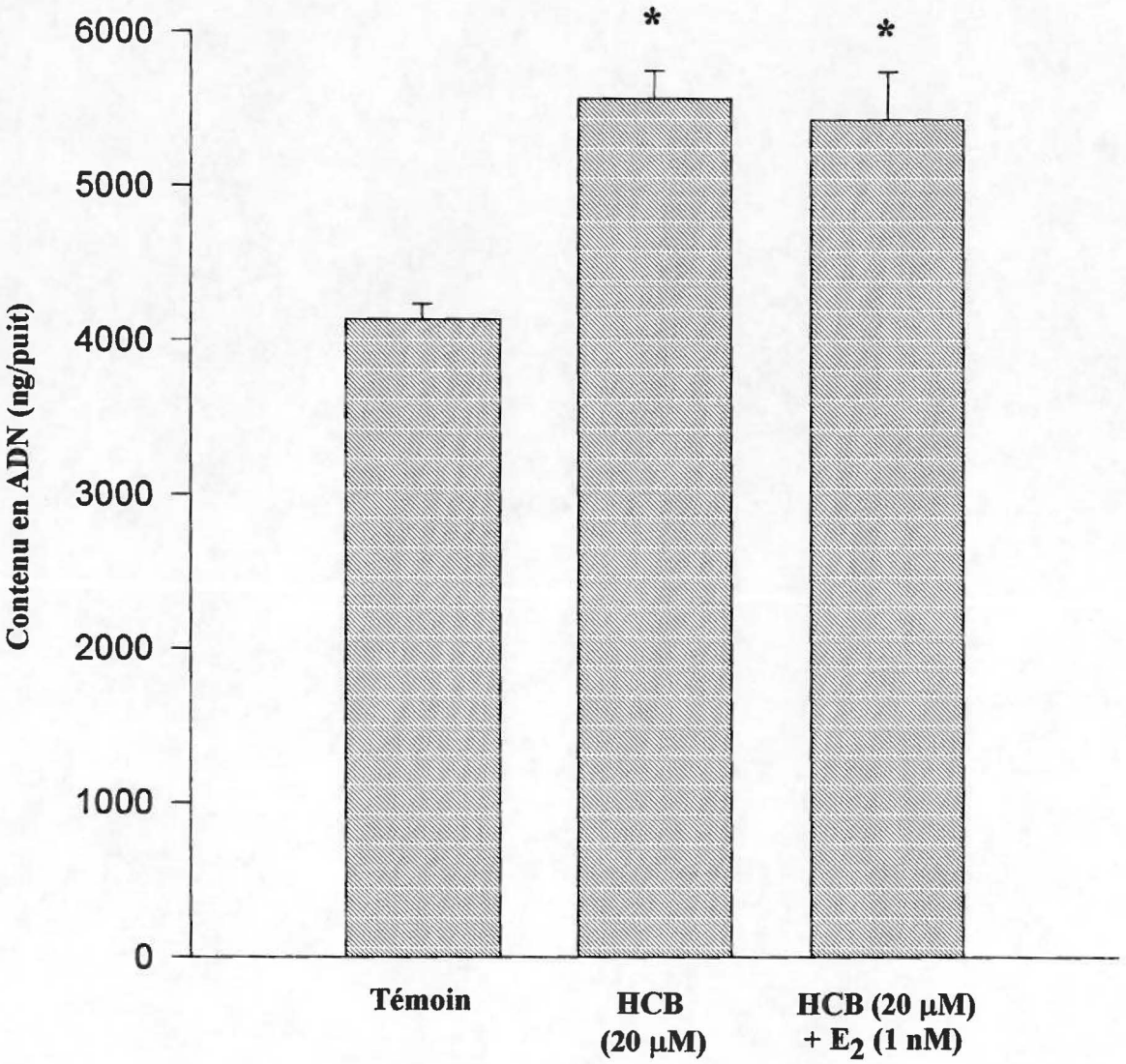


Figure 3.2 Effet de l'HCB et de la combinaison HCB/estradiol (E2) sur la prolifération cellulaire des MCF-10A. Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.
* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

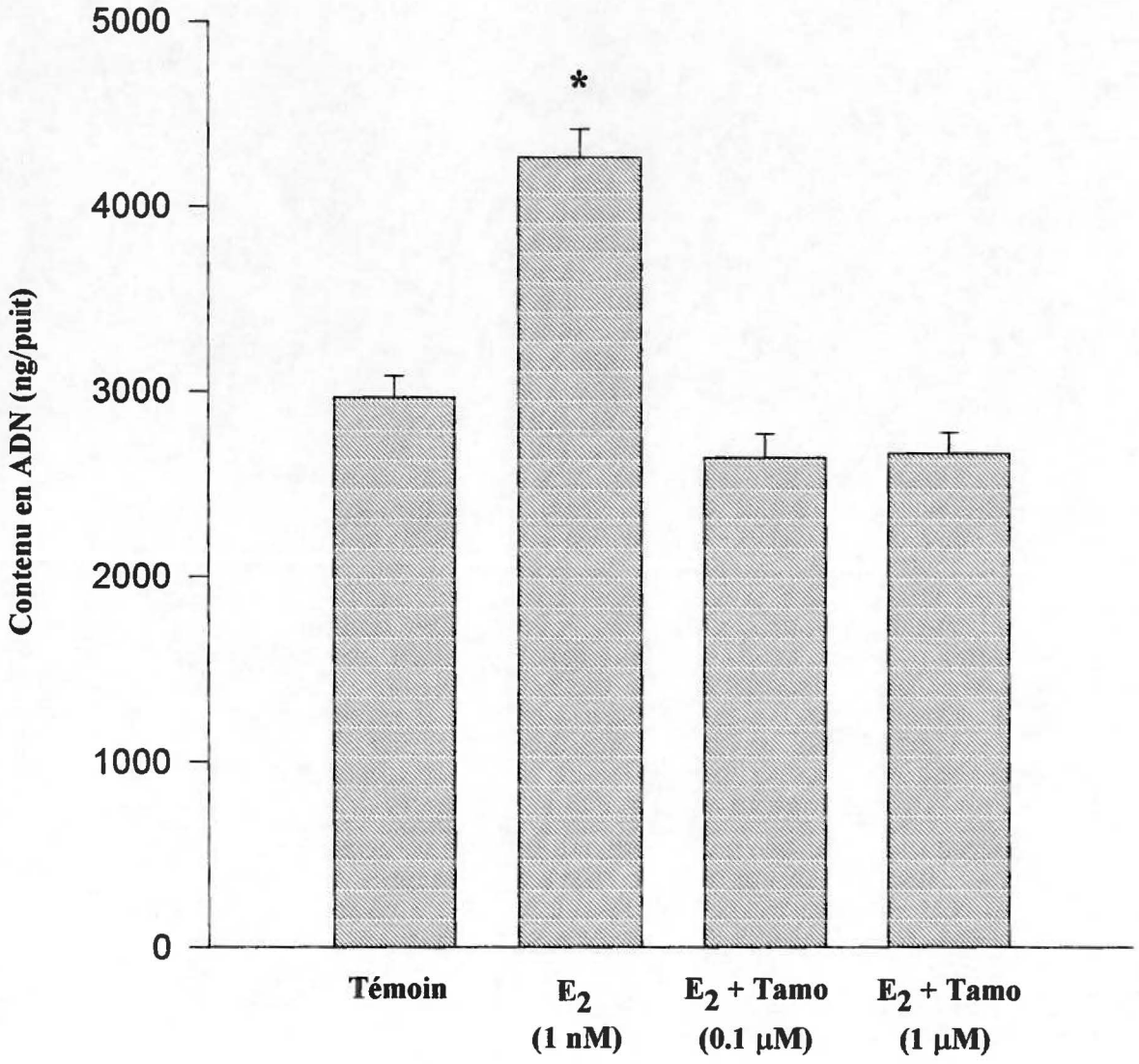


Figure 3.3 Effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire induite par l'estradiol (E2). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.
* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

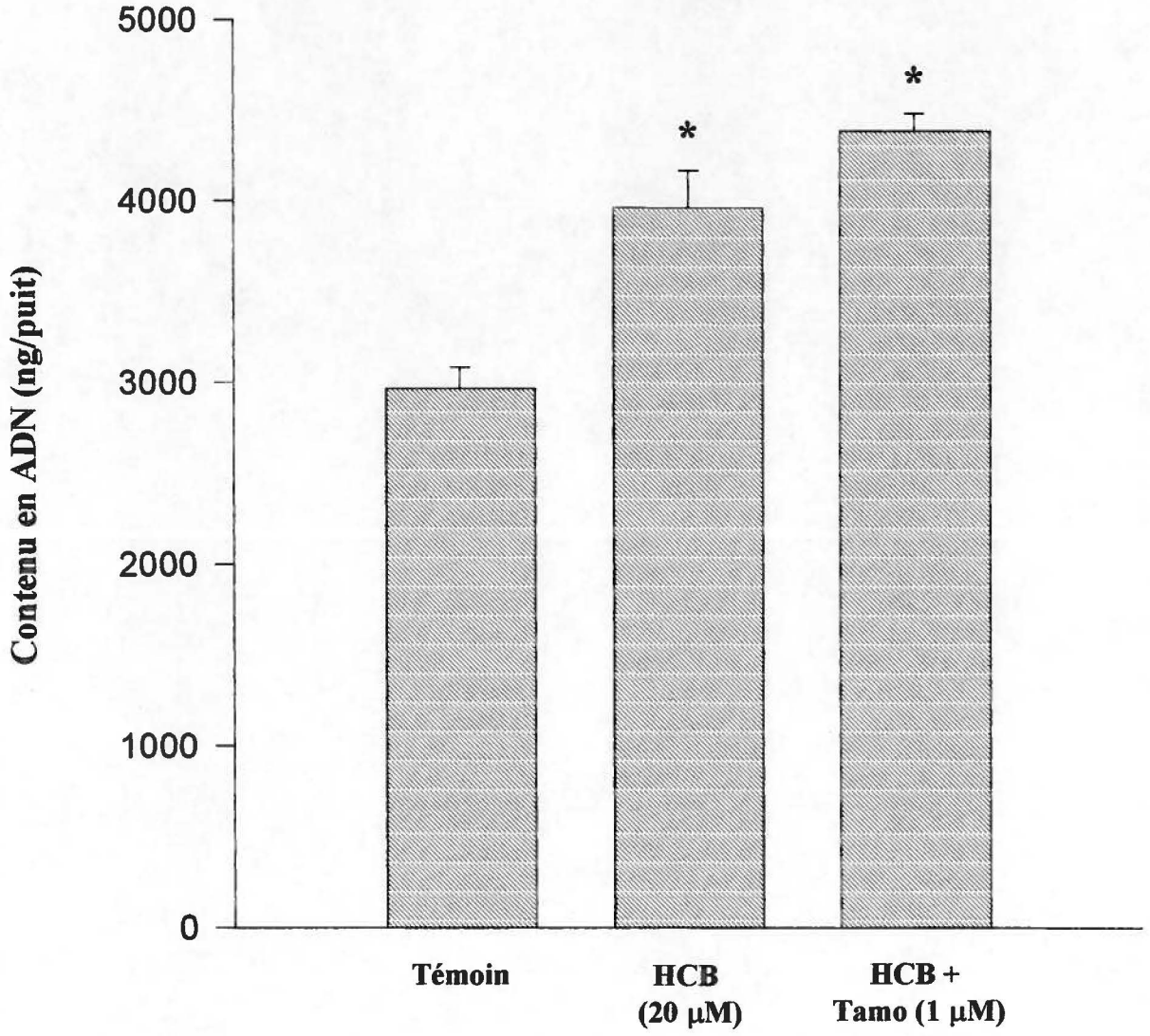


Figure 3.4 Effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire induite par l'HCB. Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.
* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

Traitement	# de cellules (10^4)
Témoin	9.55 ± 1.0
E2 (1nM)	13.0 ± 0.95 *
E2 + Tamo (0.1 µM)	9.32 ± 0.80
E2 + Tamo (1 µM)	9.20 ± 1.1
HCB (20 µM)	12.8 ± 0.95 *
HCB (20 µM) + Tamo (1 µM)	12.89 ± 0.85 *

Tableau 3.3 Effet du tamoxifène sur la prolifération cellulaire des MCF-10A induite par l'estradiol (E_2) et l'HCB sur le nombre total de cellules en culture à la fin de l'exposition. Initialement 5 X 10^4 cellules ont été mises en culture. Chaque donnée du tableau est exprimée comme la moyenne ± SEM pour trois essais. * La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

Le retrait de l'EGF (20 ng/ml) du milieu de culture amène une diminution de 54 % ($p<0.05$) de la croissance des cellules MCF-10A témoins (figure 3.5). Par ailleurs, l'HCB (20 µM) qui, tel que démontré précédemment (figure 3.2, 3.4, tableau 3.3), exerce un pouvoir mitogène significatif ($p<0.05$) en présence d'EGF (20 ng/ml), ne possède aucune activité mitogène suite au retrait de l'EGF (figure 3.5).

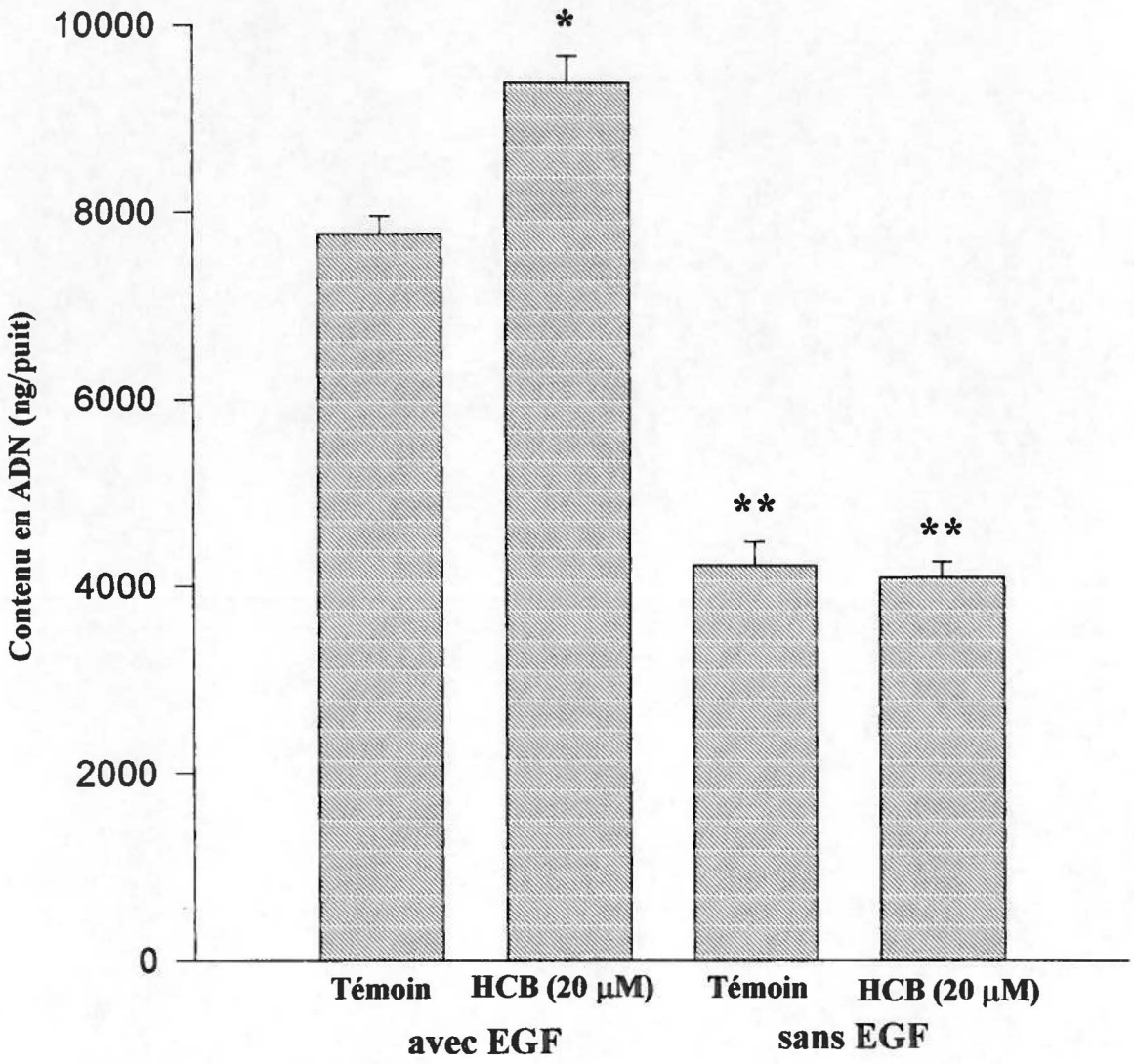


Figure 3.5 Effet de la privation en EGF sur la prolifération cellulaire des MCF-10A induite par l'HCB. Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.

* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin correspondant.

** La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin avec EGF.

Cet effet est corroboré par l'analyse du nombre total de cellules en culture à la fin de l'exposition (tableau 3.4). En absence d'EGF (20 ng/ml) on observe une réduction d'environ 59 % ($p<0.05$) de la croissance des MCF-10A. En ce qui concerne le traitement à l'HCB (20 µM), en présence d'EGF on observe une prolifération d'environ 16 % ($p<0.05$) vis-à-vis le témoin correspondant alors qu'en l'absence d'EGF aucune augmentation n'est observée (tableau 3.4).

3.4 Modulation de la voie de signalisation médiée par l'EGF

Pour déterminer si l'HCB exerce son pouvoir mitogène en modulant la voie de signalisation cellulaire à l'EGF, nous avons effectué des analyses par immunobuvardage pour déterminer si l'HCB pourrait moduler le degré de phosphorylation du récepteur de ce facteur de croissance (figure 3.6A). L'EGF (100 ng/ml, 0.1 % sérum) qui a été utilisé comme témoin positif montre une bande importante d'une protéine phosphorylée dont le poids moléculaire est de 190 KDa, soit celui connu pour le récepteur à l'EGF. Le deuxième puits (- EGF) correspond au témoin négatif et le résultat montre bien l'absence d'une bande phosphorylée. Les quatre puits suivants correspondent à des cellules exposées à l'HCB (20 µM) pour une durée de respectivement 0, 5, 10 et 20 minutes et ce en présence de 20 ng/ml d'EGF. On note que le traitement à l'HCB engendre l'apparition d'une bande à 190 KDa à 5, 10 et 20 min. par comparaison au temps zéro (troisième puits) qui montre une bande faible en accord avec le fait que ces cellules ont été exposées de façon continue à 20 ng/ml d'EGF. Il est à noter qu'au niveau du cinquième puits on note l'apparition d'une deuxième bande de phosphorylation qui n'est pas constante d'un traitement à l'autre. On ne connait point la correspondance de cette bande.

La figure 3.6B présente les membranes pour les cellules qui ont été exposées à l'HCB pour une durée fixe de 10 minutes et ce à différentes concentrations contenant toujours 20 ng/ml d'EGF.. Les concentrations de 5, 10 et 20 µM d'HCB (puits 1 à 4) augmentent le niveau de phosphorylation du récepteur à l'EGF. Parmi les groupes étudiés la concentration de 10 µM d'HCB pour 10 minutes d'exposition des cellules a causé le degré de phosphorylation du récepteur à l'EGF le plus élevé.

Traitement	# de cellules (10^4)
Témoin (+EGF)	19.8 ± 0.80
HCB (20 µM) (+EGF)	23.0 ± 0.70 *
Témoin (-EGF)	11.7 ± 0.95 **
HCB (20 µM) (-EGF)	11.9 ± 0.90 **

Tableau 3.4 Effet du retrait en EGF (20 ng/ml) sur le nombre total de cellules à la fin de l'exposition. Initialement 10 X 10^4 cellules ont été mises en culture. Chaque donnée du tableau est exprimée comme la moyenne ± SEM pour trois essais.
* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin correspondant.
** La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin avec EGF.

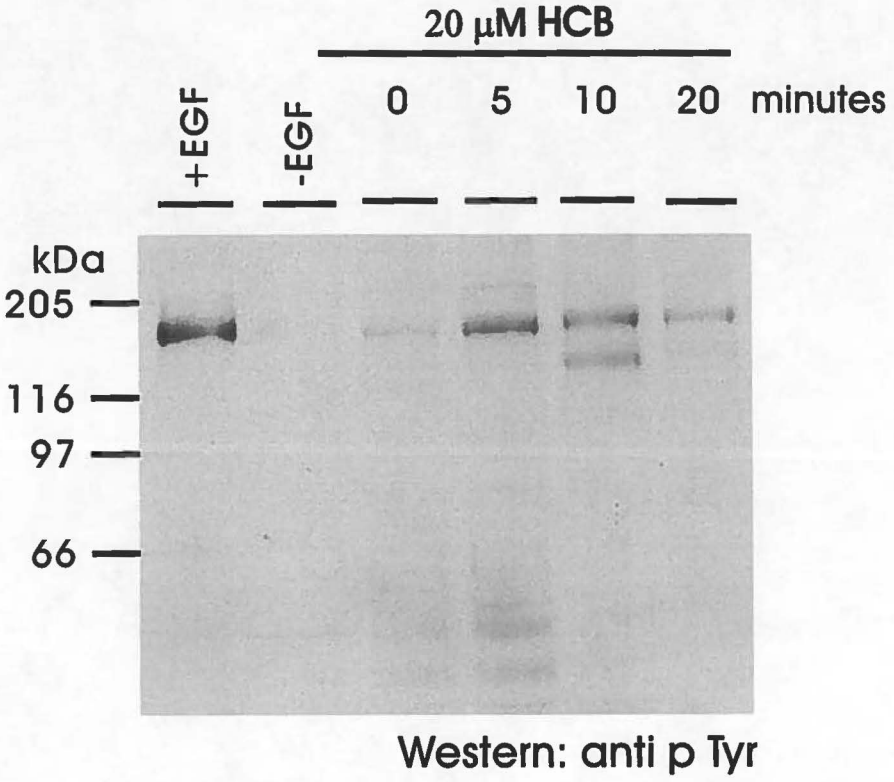
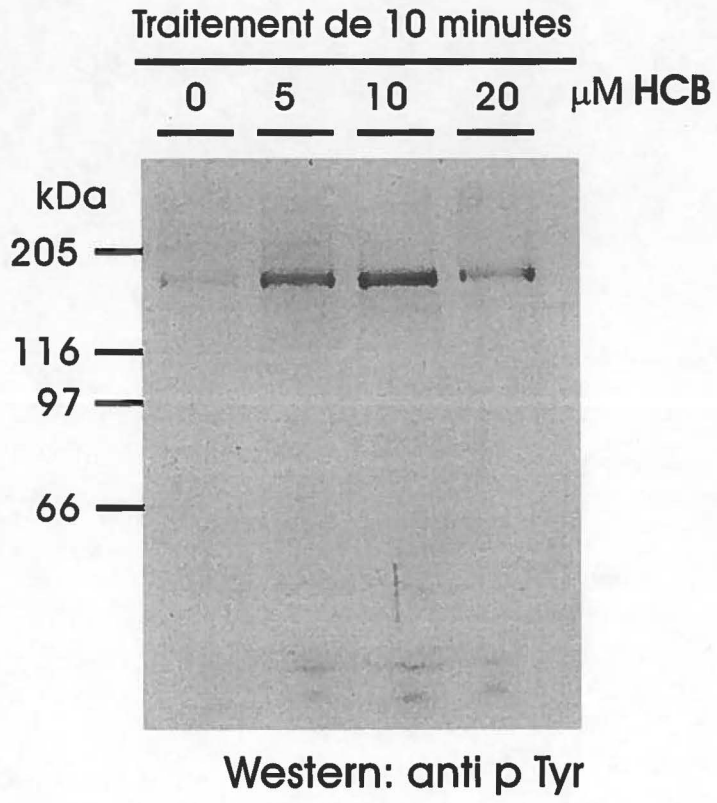


Figure 3.6 Effet de l'HCB sur la phosphorylation du récepteur à l'EGF mesuré par immunobuvardage à l'aide d'un anti-phosphotyrosine.

A Puits 1: témoin positif, puits 2: témoin négatif. Les puits 3,4, 5 et 6 correspondent à différents temps d'exposition au HCB (20 µM) et ce, en présence de 20 ng/ml d'EGF.



B Les cellules sont traitées avec différentes d'HCB pour un temps fixe de 10 minutes et ce, en présence de 20 ng/ml d'EGF.

L'effet de l'ajout de différentes concentrations de progestérone (1nM à 1000 nM) sur la prolifération cellulaire des MCF-10A est présenté à la figure 3.7. À l'inverse de l'estradiol, la progestérone conduit non pas à une stimulation mais à une inhibition de la prolifération cellulaire chez les cellules mammaires, et ce uniquement à la concentration de 1000 nM (équivalent à 1 µM) où une réduction significative ($p<0.05$) de 29 % est observée. Par ailleurs, la présence concommitante de progestérone (1 µM) dans le milieu bloque la stimulation mitogène causée par l'HCB et résulte en une inhibition de 30 % ($p<0.05$) comparativement au témoin correspondant (figure 3.8). Il est à noter que dans tous les traitements aucun changement n'as été observé chez les cellules MCF-10A et ce, tant au niveau morphologique qu'au niveau de la viabilité cellulaire.

3.5 Caractérisation du potentiel mitogène de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH

Contrairement à l'HCB, l'*o,p'*-DDE, le *p,p'*-DDE et le β-HCH ne modifient aucunement la prolifération cellulaire des MCF-10A, pour des concentrations de 10 et de 20 µM (figure 3.9) aucune différence significative ($p>0.05$) du contenu total en ADN n'est observée entre le groupe des cellules témoins et les groupes de cellules exposés. Ceci est également confirmé par le dénombrement des cellules en culture mesuré à la fin de l'exposition aux organochlorés (tableau 3.5) puisqu'aucune différence significative ($p>0.05$) n'est observée entre le groupe des cellules témoins et les divers groupes de cellules exposés.

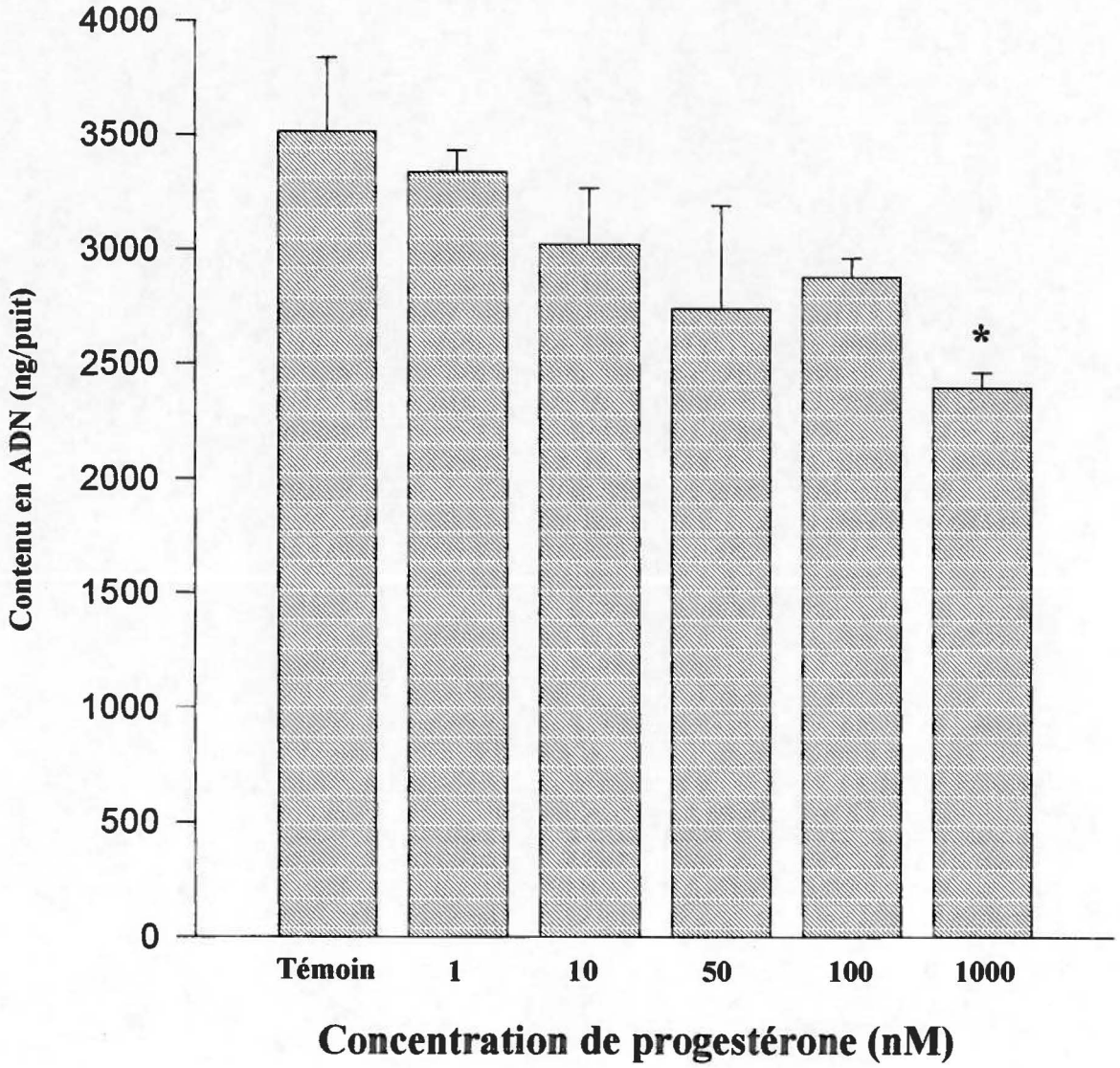


Figure 3.7 Effet de la progestérone sur la prolifération cellulaire des MCF-10A. Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.
* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin.

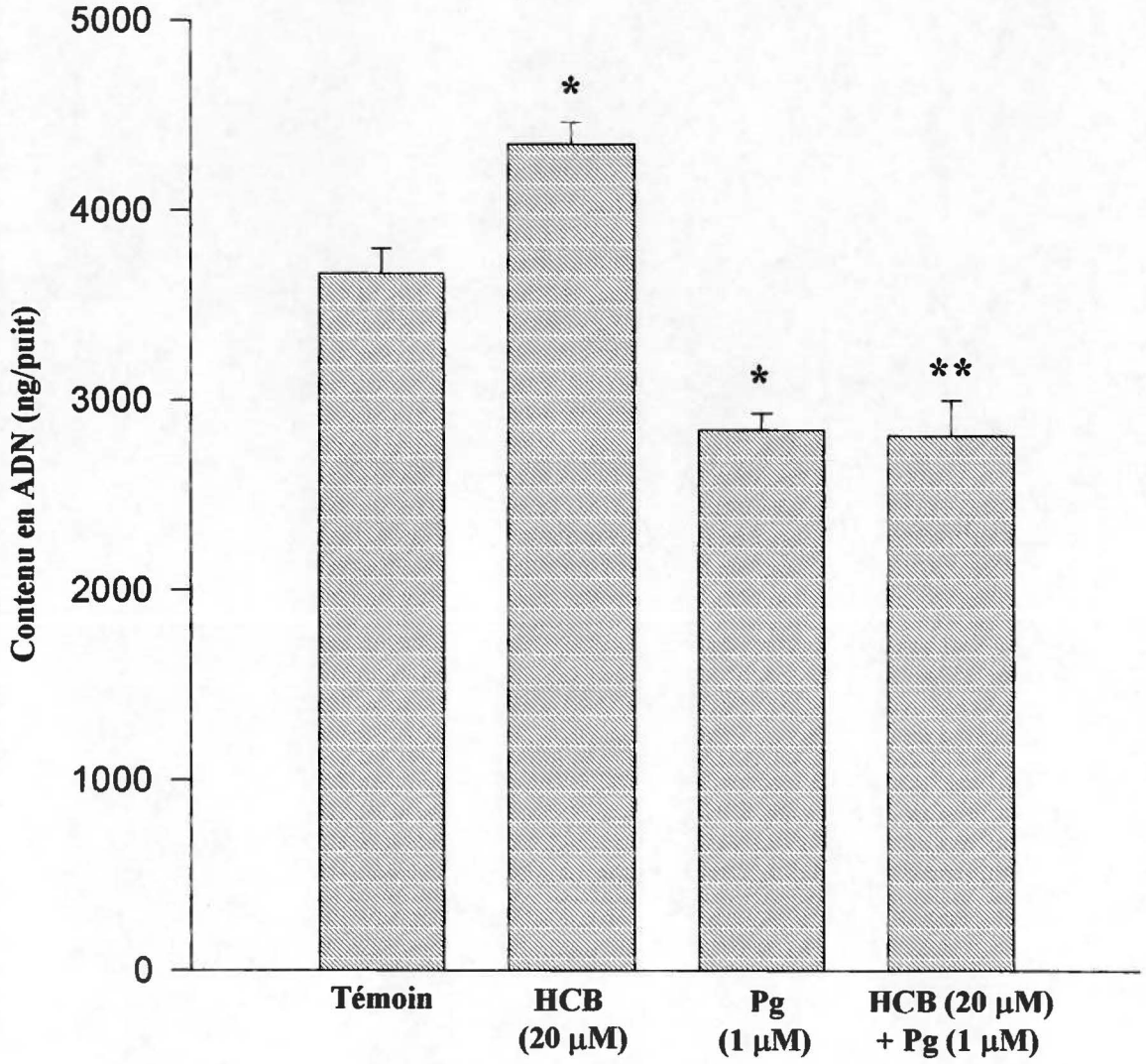


Figure 3.8 : Effet de la progestérone (Pg) sur l'effet de stimulation exercée par l'HCB sur la prolifération cellulaire des MCF-10A. Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.

* La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du témoin

** La moyenne est significativement différente ($p<0.05$) de celle du traitement HCB (20 µM)

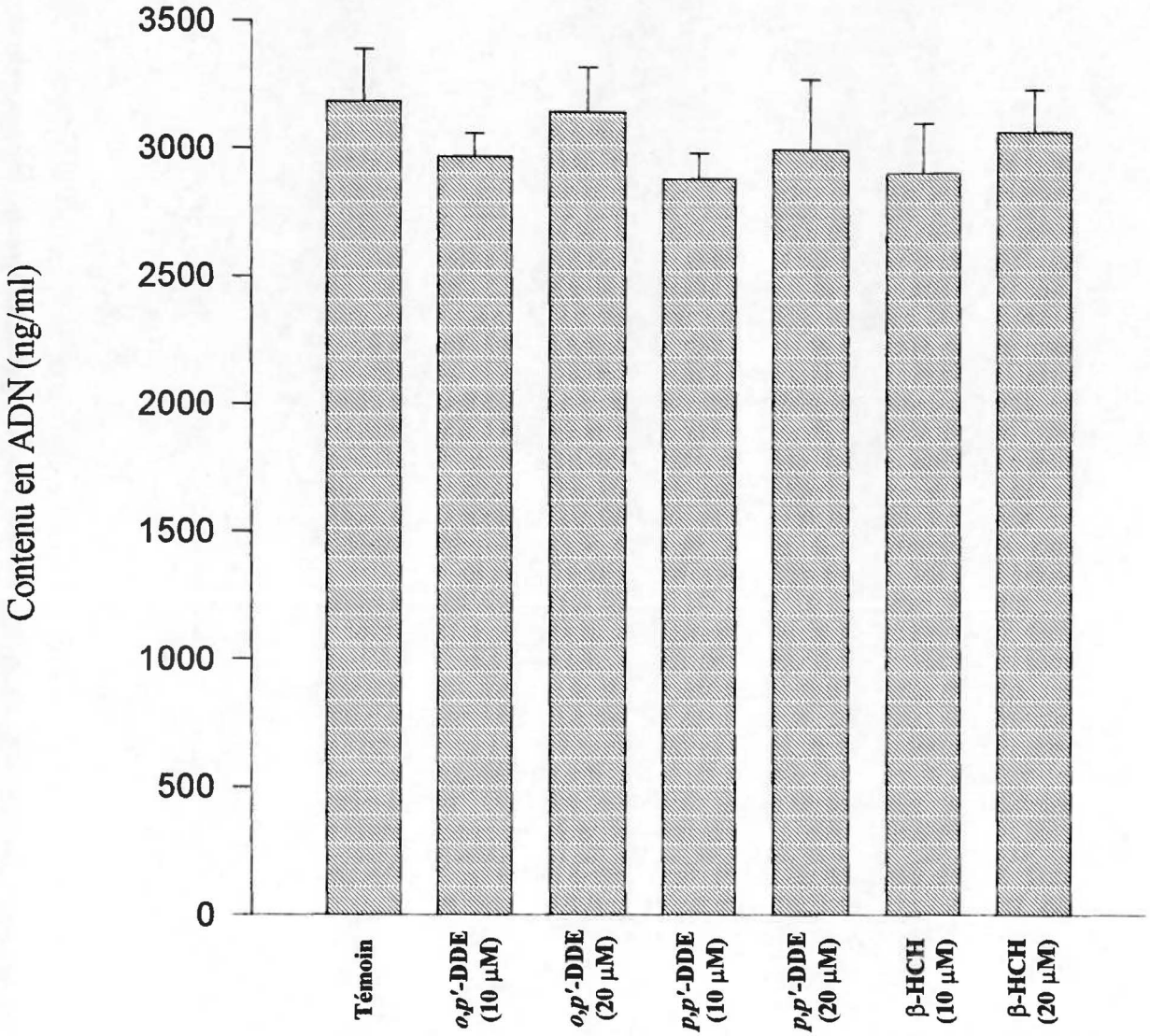


Figure 3.9 Effet de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH sur la prolifération cellulaire des MCF-10A. Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour trois essais.

	Nombre de cellules (10^4)		
Traitement	***o,p'*-DDE**	***p,p'*-DDE**	**β-HCH**
Témoin	9.60 ± 0.70		
10 µM	9.20 ± 0.95	9.30 ± 0.97	9.00 ± 0.88
20 µM	9.40 ± 1.10	9.55 ± 1.05	9.50 ± 1.15

Tableau 3.5 Effet des organochlorés sur le nombre total de cellules en culture à la fin de l'exposition. Initialement 5 X 10^4 cellules ont été mises en culture. Chaque donnée du tableau est exprimée comme la moyenne ± SEM pour trois essais.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Mesure de la cytotoxicité des organochlorés

Le degré de cytotoxicité d'une substance varie selon le type cellulaire. Nous nous sommes donc assurés dès le départ des travaux de déterminer les concentrations présentant un potentiel toxique au niveau de notre lignée cellulaire, les MCF-10A, et ce pour chacun des organochlorés. Ces résultats ont donc permis de cibler les seuils cytotoxiques des divers contaminants étudiés dans la présente problématique. Toutes les expériences ultérieures ont été réalisées en utilisant des doses nettement inférieures aux différents seuils cytotoxiques. Les concentrations idéales ont été fixées à moins de 20 µM, soit 1/5 de la concentration toxique dans le cas de l'HCB.

Il est à noter que la concentration retenue pour l'HCB, soit 20 µM, n'a pas été sélectionnée en fonction de la concentration retrouvée dans le système sanguin chez l'homme. Nous sommes ici en présence non pas d'un système dynamique où le renouvellement est toujours possible mais bien en présence d'un système cellulaire monocouche statique. Par conséquent la quantité d'HCB absorbée par les cellules épithéliales mammaires (MCF-10A) résulte en une concentration cellulaire sûrement inférieure à la concentration dans le pétri. L'équipe de Coosen et Velsen (1989) a utilisé des concentrations similaires pour effectuer leurs différentes études et ce, avec le β-HCH un contaminant de la même famille que l'HCB. Plus précisément ils ont déterminé l'effet d'une concentration de 10 µM de β-HCH sur la redistribution du récepteur à l'estrogène et ce, au niveau de la lignée cellulaire MCF-7.

4.2 Détermination de la présence du récepteur à l'estrogène

La littérature scientifique fait état de l'absence du récepteur à l'estrogène chez les MCF-10A (Soule *et al.*, 1990; Addeo *et al.*, 1996), mais fait surprenant aucune donnée précise n'est rapportée à ce sujet. Avant d'entreprendre différentes études avec l'estrogène nous avons voulu nous assurer de la présence de ce récepteur chez la lignée cellulaire MCF-10A. Tel que nous verrons dans la prochaine section, l'induction de la prolifération cellulaire amenée par l'estradiol (1 et 10 nM) suggère fortement la présence de ce récepteur au niveau des MCF-10A. Nous avons donc vérifié la présence de ce récepteur chez les cellules MCF-10A par une étude de la liaison d'un radioligand au récepteur à l'estrogène.

Les récepteurs d'hormones stéroïdiennes, tel le récepteur à l'estrogène, sont des facteurs de transcriptions retrouvés généralement au niveau de la région nucléaire et ce, même en absence de l'hormone endogène (Welahons *et al.*, 1984). Ce récepteur suite à l'intéraction avec son ligand peut alors activer directement divers gènes tel *c-fos* et *c-jun* (Guiochon *et al.*, 1996). Par contre, dans les préparations *in vitro* le récepteur à l'estrogène est retrouvé sous forme inactive au niveau du cytoplasme en absence de stimuli. En utilisant un radioligand on peut donc mesurer la présence du récepteur à l'estrogène au niveau des cellules cibles.

Les MCF-7, une lignée de cellules mammaires humaines tumorigènes, possèdent un niveau élevé de récepteurs à l'estrogène et leur système est biologiquement actif (Soule *et al.*, 1973). C'est pourquoi nous avons déterminé la présence de ce récepteur chez les MCF-10A dans le cadre d'une étude comparative avec la lignée MCF-7 en s'appuyant sur l'approche de la liaison spécifique du [^{3}H]17β-estradiol.

L'étude a démontré la présence du récepteur à l'estrogène et ce chez les deux types de lignées cellulaires, soit les MCF-10A et les MCF-7. La concentration de ce récepteur par unité de protéines est deux fois plus élevée chez les MCF-7. Par ailleurs, il est à noter que les MCF-7 sont plus petites et donc contiennent moins de protéines cytoplasmiques par unité que les MCF-10A. Des travaux récents dans les laboratoires des docteurs Cyr et Charbonneau de l'INRS-Santé ont montré que les cellules MCF-10A possèdent les récepteurs α et β; ce dernier semble présent à des niveaux plus élevés que le récepteur α (communication personnelle).

4.3 Caractérisation du potentiel mitogène de l'estradiol et de l'hexacholobenzène chez les MCF-10A

Il existe diverses méthodes afin de mesurer l'effet mitogène possible d'une certaine substance, notamment l'incorporation de la thymidine tritiée et la mesure du contenu total en ADN. Nous avons opté pour cette dernière car elle est simple, rapide et nettement plus précise que la première méthode.

Le 17β-estradiol amène une nette induction de la prolifération cellulaire chez les MCF-10A tel que mesurée par le contenu total en ADN. L'ajout de 1 nM durant 96h conduit à une hausse de la prolifération cellulaire de 38 % ($p<0.05$), alors que l'ajout de 10 nM pour la même durée nous amène une induction de près de 58 % ($p<0.05$). Aucune cytotoxicité n'a été observée pour ces différentes concentrations d'estradiol.

Une hausse similaire a été rapporté au niveau des MCF-7 avec l'estradiol (Villalobos *et al.*, 1995). L'effet de l'estradiol (1 nM) pour une période de traitement de 6 jours a été étudié par la technique du dénombrement cellulaire. L'addition de l'estradiol

(1nM) a conduit à une hausse significative de la prolifération cellulaire de près de quatre fois. Il est à noter que les chercheurs ont obtenu des résultats pratiquement identiques pour des cellules ayant été cultivées dans un milieu auparavant traité au charbon activé afin d'éliminer toute trace d'estrogènes pouvant s'y retrouver. L'équipe de Markaverich *et al.* (1988) a également démontré une induction de la prolifération cellulaire par l'estrogène chez les MCF-7. L'addition de 10 nM de 17 β-estradiol et ce pendant 6 jours conduit à une augmentation au niveau du contenu en ADN de près de quatre fois. De plus, l'équipe de Raju *et al.* (1992) a également démontré un effet de l'estradiol chez les MCF-7 et les MCF-10A. L'estradiol (1 et 10 nM) amène une hausse significative ($p<0.05$) de la prolifération cellulaire chez les MCF-7. Une concentration de 10 nM d'estradiol était par contre nécessaire pour induire le même effet au niveau des MCF-10A. Il est à noter que leur niveau de prolifération cellulaire était mesuré par l'incorporation de la [^{3}H] thymidine. Cette méthode amène une grande variation qui en réduit la sensibilité ce qui peut alors expliquer l'absence de résultats significatifs pour le traitement d'estradiol à 1 nM.

L'ajout de l'HCB (20 μM) dans le milieu d'incubation augmente significativement ($p<0.05$) le niveau de prolifération cellulaire chez les MCF-10A. La combinaison de l'HCB (20 μM) et de l'estradiol (1 nM) n'active pas davantage cette prolifération cellulaire. L'HCB et l'estradiol, à des concentrations différentes (20 μM) et 1 nM respectivement , possèdent un pouvoir mitogène comparable chez les cellules mammaires MCF-10A.

4.4 Étude des mécanismes responsables du potentiel mitogène de l'HCB

Dans une deuxième phase nous avons voulu déterminer le mécanisme responsable du potentiel mitogène de l'HCB. L'équipe de Coosen et Velsen (1989) a démontré que le β-HCH, un contaminant environnemental de la même famille que l'HCB possédait, à une concentration de 10 μM, une certaine affinité pour le récepteur à l'estrogène.

En raison de l'implication des estrogènes dans la problématique du cancer du sein nous avons donc tenté, en premier lieu, de vérifier si l'HCB exercait une action via le récepteur à l'estrogène, lui permettant d'induire une prolifération cellulaire chez les MCF-10A. Pour ce faire nous avons utilisé un antagoniste du récepteur à l'estrogène, le tamoxifène.

Nous nous sommes d'abord assuré de l'efficacité de l'antagoniste et ceci en bloquant la stimulation de la mitogenèse causée par l'estradiol. L'équipe de Pratt et Pollak (1993) a utilisé des concentrations de tamoxifène similaires à celles que nous avons utilisées (0.1 μM et 1 μM) dans leurs différentes études avec l'estrogène. La présence du tamoxifène (1 μM) a toutefois été sans effet sur la prolifération cellulaire des MCF-10A induite par l'HCB. Le caractère mitogène de l'HCB ne semble donc pas dépendre de la voie de signalisation du récepteur à l'estrogène. L'HCB ne semble donc pas un composé mimétique de l'estradiol, ou dit xénoestrogène au niveau mammaire.

Plusieurs études dans la littérature rapportent l'importance fondamentale des facteurs de croissance tel l'EGF et l'insuline et ce, au niveau de plusieurs lignées cellulaires (Ethier *et al.*, 1987; Ethier *et al.*,1990; Liu et Safe, 1996). Plus particulièrement, les MCF-10A requièrent absolument l'ajout d'EGF exogène pour assurer leur bonne croissance (Ram *et al.*, 1995). L'EGF est donc un facteur de croissance essentiel à la croissance de ce type cellulaire.

En effet, le retrait de l'EGF exogène (20 ng/ml) au niveau du milieu d'incubation amène une diminution significative ($p<0.05$) de la prolifération cellulaire des MCF-10A. De plus, l'HCB (20 μM) ne possède aucune activité mitogène suite au retrait de l'EGF exogène. L'EGF est donc un facteur de croissance essentiel pour assurer l'effet mitogène de l'HCB.

L'HCB pourrait exercer son pouvoir mitogène en modulant à la hausse la voie de signalisation cellulaire de l'EGF. Cette étude du retrait à l'EGF nous a donc permis de suggérer un lien possible entre le pouvoir mitogène de l'HCB et la voie de signalisation à l'EGF. Une explication alternative serait qu'en absence de la stimulation par l'EGF, les cellules deviennent non répondantes aux autres stimulations.

Des observations similaires sont rapportées dans la littérature. L'équipe de Modiano *et al.* (1991) a démontré un lien direct entre la prolifération cellulaire des K12 (lignée de cellules mammaires félines d'adénocarcinomes) induite par la progestérone et la voie du récepteur à l'EGF. En effet, en présence d'EGF (10 pM), la progestérone (100 nM) permet de doubler l'induction de la prolifération des cellules K12. L'équipe de Wölfle *et al.* (1993) a également démontré que la présence de l'EGF et de l'insuline est indispensable pour observer l'effet mitogène du TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine) et ce, au niveau d'hépatocytes primaires de rat. Le TCDD (1 pM) conduit à une hausse de la prolifération cellulaire des hépatocytes en culture et ce, seulement en présence d'insuline et d'EGF. L'ajout de 1 µM d'insuline et de 20 ng/ml d'EGF au niveau du milieu de culture est essentiel pour observer l'effet mitogène du TCDD envers ce type cellulaire.

Le facteur EGF est un élément très important impliqué au niveau du contrôle de la division cellulaire (Ram *et al.*, 1995). Nous avons donc voulu déterminer si l'HCB pourrait interférer dans cette voie de signalisation cellulaire et à quel endroit précisément il pourrait moduler son activité. De plus, il est reconnu que certains contaminants environnementaux, tel le TCDD, modulent la voie du récepteur à l'EGF en augmentant le nombre de ce récepteur ainsi qu'en augmentant le niveau de phosphorylation de ce dernier au niveau de cellules utérines de souris (Tuomisto *et al.*, 1996).

Nous avonc donc vérifié si l'HCB pouvait exercer son pouvoir mitogène en modulant le niveau de phosphorylation du récepteur à l'EGF. L'analyse par immunobuvardage du degré de phosphorylation du récepteur à l'EGF a donné des résultats forts intéressants. En effet l'apparition d'une bande de phosphorylation à 190 KDa, bande correspondant au récepteur à l'EGF phosphorylé, confirme que l'HCB engendre une hausse du degré de phosphorylation au niveau de ce récepteur et ce, pour des concentrations de 5, 10 et 20 µM d'HCB et ce en présence de 20 ng/ml d'EGF dans le milieu de culture. Ces résultats montrent que l'HCB exerce son pouvoir mitogène non pas via la voie du récepteur à l'estrogène tel que soupçonné pour plusieurs organochlorés mais, en modulant la voie du récepteur à l'EGF.

Des travaux récents effectués dans le laboratoire (Charbonneau, communication personnelle) indique que l'HCB ne serait pas un "EGF like" car en absence d'EGF exogène ce dernier n'est point mitogène. L'HCB, à lui seul, est alors incapable d'augmenter le niveau de phosphorylation du récepteur à l'EGF. L'HCB ne peut donc pas remplacer l'EGF en se liant directement à ce récepteur. Il exerce son pouvoir mitogène en modifiant la membrane cellulaire amenant ainsi une meilleure phosphorylation du récepteur à l'EGF. La protéine kinase *c*-neu, facteur de croissance reconnu, est une protéine possédant la capacité d'induire la tyrosine phosphorylation de divers récepteurs inclut dans la famille du récepteur à l'EGF (Ram *et al.*, 1995). L'HCB pourrait donc s'associer à cette protéine pour ainsi induire son effet mitogène. Il deviendrait alors un facilitateur de la voie du récepteur à l'EGF.

Il est à noter que l'équipe de Shen et Novak (1997) a démontré un effet mitogène du *p,p'*-DDT (10 nM) chez les MCF-10A, tel que démontré par une augmentation significative ($p<0.05$) de l'incorporation de la thymidine tritiée.

De plus, à l'instar de l'effet de l'HCB sur la phosphorylation du récepteur à l'EGF, ils ont observé une hausse de la phosphorylation du récepteur à l'EGF avec le *p,p'*-DDT (10 nM). Ainsi, au niveau mécanistique, le *p,p'*-DDT et l'HCB pourraient exercer leur pouvoir mitogène de façon fort similaire. À l'inverse, Shen et Novak (1997) ont cependant obtenu des résultats négatifs en ce qui concerne l'*o,p'*-DDT, un meilleur agoniste estrogénique que le *p,p'*-DDT.

Sur la base des informations obtenues et de l'importance des hormones stéroïdiennes dans l'incidence du cancer du sein, nous avons voulu déterminer l'effet de la progestérone sur le pouvoir mitogène de l'HCB. La progestérone bloque l'effet mitogène causé par l'HCB et ce, même en présence d'EGF. L'extrapolation de ces données suggère que la progestérone serait donc un facteur protecteur de l'effet potentiellement cancérogène de l'HCB au niveau du sein.

4.5 Caractérisation du potentiel mitogène de l'*o,p'*-DDE, du *p,p'*-DDE et du β-HCH chez les MCF-10A

Suite aux observations intéressantes obtenues avec l'HCB, nous avons entrepris une étude avec différents composés environnementaux de la même famille que l'HCB. À l'inverse des résultats obtenus avec l'HCB, l'*o,p'*-DDE, le *p,p'*-DDE et le β-HCH ne possèdent aucun pouvoir mitogène chez les MCF-10A pour des concentrations de 10 et de 20 µM et ce, même en présence d'EGF exogène. L'équipe de Shen et Novak (1997) ont observé une hausse de la prolifération cellulaire avec le produit mère du DDE, soit le *p,p'*-DDT. Ceci pourrait indiquer que seul le *p,p'*-DDT et non son métabolite est mitogène. Par ailleurs, il est à noter que cette équipe utilise un milieu de culture identique au nôtre pour cultiver les MCF-10A mais ils amènent par contre leur culture à une confluence de 100 % avant de procéder à l'exposition du *p,p'*-DDT. Lors de nos diverses expériences, en aucun cas nous avons utilisé une confluence de 100 % car à ce niveau les cellules perdent certaines caractéristiques et leur croissance devient alors incontrôlable.

CONCLUSION

Le présent travail constitue une des premières études sur le potentiel mitogène au niveau des cellules épithéliales mammaires non tumorigènes et les aspects mécanistiques des organochlorés dans la problématique du cancer du sein.

Les résultats obtenus montrent que l'HCB possède un pouvoir mitogène envers les MCF-10A et ce, à un niveau quasi identique à celui de l'estrogène. Bien qu'à l'heure actuelle la littérature scientifique met beaucoup d'emphase sur les composés environnementaux dits xénoestrogènes, dans le cas présent, le mécanisme d'activation de l'HCB agit non pas via la voie du récepteur à l'estrogène mais bien via une voie mitogène importante au niveau des cellules mammaires, la voie de signalisation cellulaire du récepteur à l'EGF.

L'HCB semble augmenter la prolifération cellulaire via l'activation d'une kinase pouvant phosphoryler le récepteur à l'EGF. Des travaux futurs devront tenter d'identifier cette action. La présente recherche permet d'identifier un facteur de risque potentiel pour le cancer du sein jusqu'à maintenant insoupçonné, l'exposition à l'HCB. Des études *in vivo* devraient être entreprises pour déterminer le potentiel cancérogène ou promoteur de l'HCB au niveau mammaire.

RÉFÉRENCES

ADDEO R., Altucci L., Battista T., Bonapace I.M., Cancemi M., Cicatiello L., Germano D., Pacilio C., Salzano S., Bresciani F. et Weisz A. 1996. "Stimulation of Human Breast Cancer MCF-7 Cells with Estrogens Prevents Cell Cycle Arrest by HMG-CoA Reductase Inhibitors". Biochemical and Biophysical Research Communications; 220: 864-870.

AHLBORG G. U., Lipworth L., Titus-Ernstoff L., Hsieh C. C., Hanberg A., Baron J., Trichopoulos D. et Adami O. H. 1995. "Organochlorine Compounds in Relation to Breast Cancer, Endometrial Cancer, and Endometriosis: An Assessment of Biological and Epidemiological Evidence". Critical Reviews in Toxicology; 25: 463-531.

AMES B et Gold L. 1990. "Chemical carcinogenesis: Too many rodent carcinogens". Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 87: 7772-7776.

BERTHOIS Y., Katzenellenbogen A. J. et Katzenellenbogen S. B. 1986. "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture". Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 83: 2496-2500.

BLAHETA R. A., Franz M., Auth M. K., Wenisch H. C. et Markus B. H. 1991. "A rapid non-radioactive fluorescence assay for the measurement of both cell number and proliferation". Journal of Immunological Methods; 142: 199-206.

BRADFORD M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Analytical Biochemistry; 72: 248-254.

BRADLOW H. L., Telang N. T., Spekovic D. W. et Osborne M. P. 1996. "2-Hydroxyestrone: the "good" estrogen". Journal of endocrinology; 150: 5259-5265.

CARPENTER G. et Cohen S. 1979. "Epidermal Growth factor". Annual Reviews of Biochemistry; 48: 193-216.

CHEN Y., Chen F. C.,Riley J. D., Allred C. D., Chen L. P., Von Hoff D., Osborne K. et Lee H. W. 1995. "Aberrant Subcellular Localization of BRCA 1 in Breast Cancer". Science; 270: 789-791.

COHEN M. S. et Ellwein B. L. 1990. "Cell Proliferation in Carcinogenesis". Science; 249: 1007-1011.

COOSEN R. et Van Velsen L.F. 1989. "Effects of β-Isomer of Hexachlorocyclohexane on Estrogen-Sensitive Human Mammary Tumor Cells". Toxicology and Applied Pharmacology; 101: 310-318.

DAVIS L. D., Bradlow L. H., Wolff M., Woodruff T., Hoel G. D. et Anton-Culver H. 1993. "Medical Hypothesis: Xenoestrogens As Preventable Causes of Breast Cancer". Environmental Health Perspectives; 101 (No. 5): 372-376.

DAVIS L. D. et Bradlow H.L. 1995. "Can Environnemental Estrogens Cause Breast Cancer?". Scientific American; 236: 166-172.

DEWAILLY E., Dodin S., Verreault R., Ayotte P., Sauv. L., Morin J. et Brisson J. 1994. "High Organochlorine Body Burdes in Women With Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer". Journal of the National Cancer Institute; 86: 232-234.

ENGEL J. "Le cancer du sein et autres maladies". Edition Guy St-Jean, Laval, Québec, 227 pages.

ETHIER S. P., Kudla A. et Cundiff K. C. 1987. "The influence of hormone and growth factor interactions on the proliferative potential of normal rat mammary epithelial cells *in vitro*". Journal of Cellular Physiology; 132: 161-167.

ETHIER S. P., Chiodino C. et Jones R. F. 1990. "Role of growth factor synthesis in the aacquisition of insulin/insulin-like growth factor I independence in rat mammary carcinoma cells". Cancer Research; 50: 5351-5357.

FALCK F., Ricci A., Wolff S. M., Godbold J. et Deckers P. 1992. "Pesticides and Polychlorinated Biphenyl Residues in Human Breast Lipids and Their Relation to Breast Cancer". Archives of Environmental Health; 47 (No. 2): 143-146.

FARBER E. 1995. "Cell Proliferation as a Major Risk Factor for Cancer: A Concept of Doubtful Validity". Cancer Research; 55: 3759-3762.

FOSTER G. W., Mertineit C., Yagminas A., McMahon A. et Lecavalier P. 1995. "The Effects of Hexachlorobenzene on Circulating Levels of Adrenal Steroids in the Ovariectomized Rat". Journal of Biochemistry and Toxicology; 10: 129-135.

GOODMAN et Gilman's. 1990. "The pharmacological Basis of therapeutics" 8ème Eds. Pergamon.

GUICHON-MANTEL A., Delabre K., Lescop P. et Milgrom. 1996. "Intracellular Traffic of Steroid Hormone Receptors". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology; 56: 3-9.

HENDERSON B. E., Ross R. K., Pike M. C. et Casagrande J. T. 1982. "Endogenous Hormones as a Major Factor in Human Cancer". Cancer Research; 42: 3232-3239.

HENDERSON B. E., Ross R. et Bernstein L. 1988. "Estrogens as a Cause of Human Cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture". Cancer Research; 48: 246-253.

HULKA B. S., Liu E. et lininger R. A. 1994. "Steroid Hormones and Risk of Breast Cancer". Cancer Supplement; 74 (No. 3): 1111-1124.

HUNTER D. J., Hankinson S. E., Laden F., Colditz G. A., Manson J. E., Willett W. C., Speizer S. E. et Wolff M. S. 1997. "Plasma Organochlorine Levels and the risk of Breast Cancer (see comments)". New England Journal of Medecine; 337 (No. 18): 1253-1258.

IARC. 1979a. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, IARC Monographs; 20: 155-177.

IARC. 1979b. "Hexachlorocyclohexane (Technical HCH and Lindane)". IARC Monographs; 20: 195-223.

IARC. 1987. "DDT and Associated Compounds". IARC Monographs; 53: 179-249.

IARC. 1991. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: DDT and associated compound. Lyon, France. IARC Monographs; 53: 179-249.

JANSEN H. T., Cooke P. S., Porcelli J., Liu T. C. et Hansen L. G. 1993. "Estrogenic and antiestrogenic actions of PBCs in the femelle rat: *in vitro* and *in vivo* studies". Reproductive Toxicology; 7: 237-242.

JENSEN A. A. 1983. "Chemical contaminants in human milk". Residue Reviews, Eds. Springer-Verlag, New-York.

KELCE R.W., Stone R.C., Laws C.S., Gray E.L., Kemppainen A.J. et Wilson M. E. 1995. "Persitent DDT metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist". Nature; 375: 581-585.

KELSEY J. L. et Berkowitz G. S. 1988. "Breast cancer epidemiology". Cancer Research; 48: 5615-5623.

KOCIBA R. J., Keyes D. G., Beyer J. G., Carreon R. M., Wade C. E., Dittenber C. N., Barnard S. D. et Humiston C G. 1978. "Results of a two-year toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats". Toxicology and Applied Pharmacology; 46: 279-303.

KRIEGER N., Wolff S. M., Hiatt A. R., Rivera M., Vogelman J. et Orentreich N. 1994. "Breast Cancer and Serum Organochlorines: a Prospective Study Among White, Black, and Asian Women.". Journal of the National Cancer Institute; 86: 589-599.

LAEMMLI U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4". Nature; 227: 680-685.

LASKEY R. A., Fairman M. P. et Blow J. J. 1989. "S Phase of the Cell Cylcle". Science; 246: 609-628.

LE PEUCH C. 1990. "La régulation de la division cellulaire". Médecine/Sciences; 6: 10-17.

LIU H. et Safe S. 1996. "Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on Insulin-Induced Responses in MCF-7 Human Breast Cancer Cells". Toxicology and Applied Pharmacology; 138: 242-250.

LUTZ W. K. et Maier P. 1988. "Genotoxic and epigenetic chemical carcinogenesis: One process, different mechanisms". TIPS; 9: 322-326.

MIGLIACCIO A. Domenico M., Castoria G., de Falco A., Bontempo P., Nola E. et Auricchio F. 1996. "Tyrosine kinase/p21^{ras}/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells". EMBO; 15: 1292-1300.

MILLER A. B. 1991. "Causes of breast cancer and high risk groups: Incidence and demographics". Breast diseases, Eds. Harris JR., Philadelphia.

MILLIKAN R., DeVoto E., Newman B. et Savitz D. 1995. "Studying environmental influences and breast cancer risk: Suggestions for an integrated population-based approach". Breast Cancer Research and Treatment; 35: 79-89.

MODIANO F. J., Kokai Y., Weiner B. D. Pykett M.J., Nowell C.P. et Lyttle R. 1991. "Progesterone Augments Proliferation Induced by Epidermal Growth Factor in a Feline Mammary Adenocarcinoma Cell Line". Journal of Cellular Biochemistry; 45: 196-206.

MOOLGAVKAR H. S. et Luebeck G. E. 1995. "Incorporating cell proliferation kinetics into models for cancer risk assessment". Toxicology; 102: 141-147.

MUSSALO-RAUHAMAA H., Häsänen E., Pyysalo H., Antervo K., Kauppila R. et Pantzar P. 1990. "Oxxurence of Beta-Hexachlorocyclohexane in Breast Cancer Patients". Cancer; 66: 2124-2128.

NAIR A., Mandapati R., Dureja P. et Pillai K. M. 1996. "DDT and HCH Load in Mothers and Their Infants in Delhi, India". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology: 56: 58-64.

NEWHOOK R. et Meek E.M. 1994. "Hexachlorobenzene: Evaluation of Risks to Health from Environmental Exposure in Canada". Environmental Carcinogens and Ecotoxicology Reviews; C12(2), 345-360.

O'FARRELL P. H., Edgar B. A., Lakich D. et Lehner C. F. 1989. "Directing Cell Division During Development". Science; 246: 635-640.

PITOT H. C. 1989. "Progression: The terminal stage in carcinogenesis". Jpn Journal of Cancer Research; 80: 599:607.

PRATT S. E. et Pollak N. 1993. "Estrogen and Antiestrogen Modulation of MCF7 Human Breast Cancer Cell Proliferation Is Associated with Specific Alterations in Accumulation of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins in Conditioned Media". Cancer Research; 53: 5193-5198.

PRESTON-MARTIN S., Pike M. C., Ross R. K., Jones P. A. et Henderson B. E. 1990. "Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer". Cancer Research; 50: 7415-1990.

RAJU U., Katz J et Levitz M. 1997. "Effect of bile acids and estradiol on thymidine incorporation into DNA in MCF-7 and MCF-10A breast cell lines". Steroids; 62: 643-646.

RAM T. G., Kokency K. E., Dilts C. A. et Ethier S. P. 1995. "Mitogenic Activity of Neu Differentiation Factor/Heregulin Mimics That of Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor-I Human Mammary Epithelial Cells". Journal of cellular Phsysiology; 163: 589-596.

SAEZ S. et Martin M. P. 1995. Le cancer du sein, modèle en oncologie biologique et clinique". Arch. Anat. Cytol. Path.; 43 (No. 1-2): 12-18.

SHAWVER L. K., Strawn L. M. et Ullrich A. 1995. "Membrane bound receptor tyrosine kinases and chemical carcinogenesis". Mutation Research; 333: 23-28.

SHEN K et Novak F. 1997. "DDT Stimulates C-erbB2, c-met, and STATS Tyrosine Phosphorylation, GRb2-Sos Association, MAPK Phosphorylation and Proliferation of Human Breast Epithelial Cells". Biochemical and Biophysical research communications; 231:17-21.

SIEKEL P., Chalupa I., Beno J., Blasko M., Novotny J. et Burian J. 1991. "A genotoxicological study of hexachlorobenzene and pentachloroanisole. Terat. and Carc. Muta.; 11: 55-60.

SOULE H. D., Vazguez J., Long A., Albert S. et Brennan M. 1973. "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". Journal Nstl Cancer Inst; 51: 1409-1414.

SOULE H. D., Maloney M. T., Wolman R.S., Peterson Jr., Brenz R., McGrath M. C., Russo J., Pauley F.R., Jones F.R. et Brooks C.S. 1990. "Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10". Cancer Research; 50: 6075-6086.

SWANECK E. G. et Fishman. 1988. "Covalent binding of the endogenous estrogen 16α-hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: Characterization and intranuclear localization". Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 85: 7831-7835.

SWENBERG A.J., Richardson C.F., Boucheron A.J., Deal H.F., Belinsky A.S., Charbonneau M. et Short G.B. 1987. "High- to Low-Dose Extrapolation: Critical Determinants Involved in the Dose Response of Carcinogenic Substances". Environmental Health Perspectives; 76: 57-63.

TAIT L., Soule D. H. et Russo J. 1990. "Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10". Cancer Research; 50: 6087-6094.

TUOMISTO J., Sewall C. H., Unkila M., Pohjanvirta R., Clark G. C., Viluksela M., Rozman K. et Lucier G. W. 1996. "Differences in binding of epidermal growth factor to liver membranes of TCDD-resistant and TCDD-sensitive rats after a single dose of TCDD". Environmental Toxicology and Pharmacology; 1: 109-116.

VILLALOBOS M., Olea N., Brotons A.J. Oleo-Serrano M., Ruiz de Almodovar J.M. et Pedraza V. 1995. "The E-Screen Assay: A Comparaison of Different MCF-7 Cell Stocks". Environmental Health Perspectives; 103 (No. 9): 844-850.

WELAHONS W. V., Lieberman M. E. et Gorski J. 1984. "Nuclear Localization of un occupied oestrogen receptors". Nature; 307: 747-749.

WILLIAMS D. T., LeBel G. L. et Junkins E. 1988. "Organohalogen residues in human adipose autopsy samples from six Ontario Municipalities". J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 71: 410-414.

WILLIAMS M. G., Iatropoulos J. M. et Weisburger H. J. 1996. "Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology". Experimental Toxicology and Pathology; 48: 101-111.

WOLFF S. M., Toniolo G. P., Lee W. E., Rivera M. et Dubin N. 1993. "Blood levels of Organochlorine Residues and Risk of Breast Cancer". Journal of the National Cancer Institute; 85 (No. 8): 648-652.

WOLFF S. M. et Toniolo G. P. 1995. "Environmental Organochlorine Exposure as a Potential Etiologic Factor in Breast Cancer". Environmental Health Perspectives; 103 (Supp. 7): 141-145.

WOLFF S. M., Collman G. W., Barrett J. C. et Huff J. 1996. "Breast cancer and environmental risk factors: Epidemiological ans Expirimental Findings". Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology; 36: 573-596.

WÖLFLE D., Becker E et Schmutte C. 1993. "Growyh stimulation of primary rat hepatocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin". Cell Biology and Toxicology; 9 (No. 1): 15-31.

WOOSTER R., Bignell G., Lancaster J. et al. 1995. "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2". Nature; 238 (No. 21): 789-792.

YAGER J. D. et Liehr J. G. 1996. "Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis". Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology; 36: 203-232.

YARDEN R. I., Lauber A. H., El-Ashry D. et Chrysogelos S. A. 1996. "Bimodal Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor by Estrogen in Breast Cancer Cells". Endocrinology; 137 (No. 7): 2739-2747.