

**UNE EXPOSITION *IN UTERO* ET PENDANT L'ALLAITEMENT AUX
RETARDATEURS DE FLAMES BROMÉS ENVIRONNEMENTAUX A-T-
ELLE UN EFFET NÉFASTE SUR LE DÉVELOPPEMENT POSTNATAL
DES GLANDES MAMMAIRES ?**

Par

Rita-Josiane Audrey Douin Guouessé

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Dr. Yves St-Pierre
INRS - Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Dre. Céline Van Themsche
Département de biologie médicale
Université du Québec à Trois-Rivières

Examineur externe

Dr. Benoit Barbeau
Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal

Directrice de recherche

Dre. Isabelle Plante
INRS - Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

DÉDICACE

À mes très chers parents Jules Gouessé et Makoni Bamba

Papa, Maman, aucun mot ne serait assez fort pour exprimer ma gratitude et mon amour envers vous. Merci d'avoir fait passer mes rêves et mon bien-être avant les vôtres. Merci d'avoir été là jour et nuit à m'encourager, me guider, et me donner la force de persévérer durant chacune des étapes de ma vie, et de cette aventure qui a commencé depuis plus de dix ans loin de vous. Par cette thèse, j'aimerais vous rendre une infime partie de tout ce que vous m'avez donnée durant toutes ces années.

À mon oncle, Olivier Bamba

Toi sans qui toute cette aventure n'aurait jamais commencé. Jamais je n'oublierai ce premier jour où tu m'as accueillie chez toi et depuis lequel tu n'as cessé de veiller à mon bien-être et à ma réussite dans tout ce que j'entreprends. Merci pour ta présence, tes sacrifices et ton amour.

À mon frère et mes sœurs

Valère, Laurence, Julie, Flora, merci pour vos prières, vos pensées et vos encouragements.

Ma très chère Nadine, merci d'être un véritable modèle de persévérance, de courage et de sagesse pour moi. Merci d'être mon ange-gardien et de toujours veiller sur moi peu importe le nombre de kilomètres qui nous séparent.

À la meilleure partie de moi, Mohamed Bamba,

Merci d'avoir été présent depuis toutes ces années, bien avant que cette aventure ne commence en France. Merci de m'avoir encouragée à poursuivre mes rêves quels qu'ils soient et où qu'ils soient et cela même aux dépens des tiens et de ton bien-être. Merci d'avoir été là à chaque seconde, de m'avoir fait rire quand l'aventure m'amenait à pleurer, d'avoir pris sur toi toutes mes peines et mes larmes quand je fléchissais. Merci de m'aimer tout simplement.

À tous, ce travail est le fruit de longues années au cours desquelles j'ai pu tenir grâce à votre amour et soutien, vos encouragements et votre présence, et cela malgré des milliers de kilomètres de distance. Je vous suis reconnaissante à jamais et je vous aime profondément.

« La louange est à Dieu par la grâce de qui se réalisent les bonnes choses »

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été l'une des aventures les plus enrichissantes, exquises mais aussi difficiles que j'ai eu à vivre jusqu'à présent. J'aimerais saisir cette opportunité qui m'ait donnée pour adresser ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation et à la finalisation de cette aventure qui me marquera à jamais. Exprimer beaucoup en peu de mots n'est pas la meilleure de mes qualités mais j'espère que chacun de mes mots permettra d'exprimer à chacun d'entre vous, ma sincère reconnaissance.

À ma directrice de recherche, **Dre Isabelle Plante**, merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire alors qu'on me disait trop jeune pour faire un doctorat. Dès notre entretien j'ai senti que tu serais la superviseuse idéale et tu m'as inspirée cette confiance nécessaire à faire mes valises depuis la France pour venir réaliser un doctorat au Canada. Depuis le début de mon doctorat tu as toujours su me guider, me former et m'inspirer. Tout en ayant la rigueur qui me permet aujourd'hui de réaliser à quel point j'ai eu une formation exceptionnelle, tu as su être à l'écoute de mes besoins/sentiments mais aussi de mes aspirations. Grâce à toi j'ai en plus de ce doctorat, pu développer l'idée qui a donné naissance au Journal La Synthèse qui progresse aujourd'hui au niveau institutionnel. Merci pour chaque réunion, congrès, présentation orale et écrite, fous rires, restaurants d'équipe, correction de manuscrit etc; pour ton soutien lorsque les jours et/ou expériences n'étaient pas lumineux et pour ton accompagnement financier lors de mon doctorat; et particulièrement pour ton soutien indéfectible, le temps que tu m'as accordé et pour tes encouragements pendant la rédaction de cette thèse. Pour tout cela et plus encore, j'aimerais t'exprimer ma gratitude et mon admiration.

Merci aux membres de mon jury **Dre. Céline Van Themsche, Dr. Yves St-Pierre et Dr. Benoit Barbeau** pour votre disponibilité et votre bienveillance ainsi que d'avoir accepté d'être membres du jury de ma thèse et ce, malgré un temps de correction limité. J'aimerais également adresser des remerciements particuliers à **Dre. Céline Van Themsche, Dre. Catherine Jumarie et Dr. Yves St-Pierre** qui ont été présents lors de mes examens doctoraux précédents et qui ont su me guider grâce à leurs conseils et critiques avisés et constructifs.

Merci à mes collaborateurs et co-auteur.e.s **Dre. Barabara Hales, Dr. Bernard Robaire et Dr. Mike Wade** pour votre contribution si constructive et votre bienveillante lors de la révision de chacun de mes articles ou résumés. Je suis honorée d'avoir pu travailler avec vous et d'avoir bénéficié de votre expertise reconnue aussi bien sur le plan national qu'international.

À maman **Djénéba Koné, Corine Kourma et Mohamed Osseni**, je n'aurai pas assez de mots pour vous décrire ma reconnaissance. Je ne serai peut-être jamais arrivée au Canada sans vous. Merci de m'avoir toujours ouvert vos portes depuis cet hiver froid de janvier 2017 jusqu'à ce jour. Merci pour votre soutien indéfectible pendant toutes ces années et particulièrement pendant la rédaction de cette thèse.

Un grand merci à ma famille de France, **Les Lagrenades**, pour votre soutien et votre présence depuis le premier jour de notre rencontre jusqu'aujourd'hui. Je vous aime énormément.

À mes ami.e.s **Dre. Hadia Moindjie et Dr. Fabien Duval**, merci d'avoir été les premiers à m'inspirer la passion pour la recherche, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours soutenue malgré la distance et le décalage horaire.

Mes très chers ami.e.s et collègues **Bélinda Crobbedu, Mélany Juarez, Alexandre Petit**, j'aimerais vous dire à quel point je suis heureuse d'avoir partagé cette expérience de vie avec vous. Au-delà de nos fous rires (ou pleures) au laboratoire, c'est toute une belle amitié que nous avons développée. Vous faites partie de ces personnes exceptionnelles qui rentrent dans une vie et la transforment avec votre joie et votre bonne humeur. Merci ma Bélinda pour ta présence, merci d'avoir été une amie et une épaule sur laquelle je pouvais m'appuyer peu importe le jour et l'heure. Merci de m'avoir soutenue depuis le premier jusqu'au dernier. Tu es une personne exceptionnelle et l'une de mes plus belles rencontres à Montréal! Merci ma Mélany pour ton aura si joyeuse qu'elle suffisait à transformer toutes les journées en belle journée, merci d'avoir été toujours là pour moi, tu es une âme exceptionnelle et je t'aime énormément. Nos *tea-time* vont me manquer les filles! Merci mon cher Alexandre pour ta présence et ton soutien au laboratoire (mais aussi lors de mes nombreux déménagements), pour chaque blague et belle promenade à Montréal. Je vous aime énormément.

À tous les collègues et ami.e.s présents et précédents du laboratoire, **Alec McDermott, Dre. Elham Dianati, Dre. Mélanie Busby et Julie Salagnad**, merci pour nos discussions enrichissantes lors des réunions et pour vos conseils quand je vous sollicitais pour mes examens et/ou expériences. J'aimerais spécifiquement adresser mes remerciements à **Alec McDermott** pour son expertise qui m'a aidée à finaliser mon deuxième article en pleine pandémie et surtout pour sa grande gentillesse. Merci également à **Mélanie Busby** tes conseils et ces belles discussions quand tu étais présente au laboratoire, mais aussi pour la relecture de mon manuscrit pour l'examen de synthèse. De plus, je tiens particulièrement à remercier **Elham Dianati** qui en plus de ses conseils en tant que co-auteure m'a grandement inspirée depuis le début de ma thèse.

À mes stagiaires **Éva Charpentier**, **Laurine Mattia**, **Élodie Renard**, merci d'avoir contribué à ma formation en me permettant de vous transmettre mon savoir-faire et ma passion pour la recherche. Merci pour votre excellent travail qui a participé à la réalisation de mes articles. J'aimerais adresser des remerciements particuliers à **Dre Géraldine Dèlbes** ainsi que les membres de son équipe, particulièrement **Dre. Arlette Rwigemera**, **Rhizlane El Omri**, et **Dre. Laetitia Lecante**. Merci pour votre sympathie et votre contribution au développement de ma rigueur scientifique grâce à votre participation à chaque discussion enrichissante durant les « *journal-clubs* » et chaque perfectionnement de présentation.

Merci à tous les autres professeurs que j'ai rencontrés au cours de mon parcours et particulièrement à **Dr. Jacques Bernier** et **Dr. Denis Girald** qui ont contribué à mon avancement mais aussi à mon épanouissement grâce à leurs conseils et surtout leur bonne humeur.

J'aimerais également remercier tous mes ami.e.s et collègues **Clément**, **Parfait**, **Paulin**, **Wesley**, **Aicha**, **Josianne**, **Léna**, **Zoé**, **Zénéba**, **Zoé**, **Vincent**, **Richard**, **Léa**, **Laurie**, **Claudia**, **Gabriel**, **Lamoussa**, qui ont rendu mon séjour à l'INRS et au Québec si chaleureux. Merci pour votre soutien, pour ces lunchs remplis de bonne humeur et ces belles discussions/sorties aussi bien à l'institut qu'en dehors. Votre présence à rendu mon expérience si belle et pleine de beaux souvenirs et vous faites partie de la famille.

Merci à mes ami.es **Betty Kassa** et **Abbebe Mamo** qui m'ont accueillie chez eux durant l'un des moments les plus difficiles de mon expérience Montréalaise.

Un grand merci à ma chère amie et colocataire idéale **Anaïs Anton**. Dès ton emménagement avec moi tu as toujours été d'une bienveillance et d'une douceur qui m'ont particulièrement touchée. Merci pour ces fous rires, pour ton soutien en tout temps, pour tes conseils, ton écoute et pour tous ces beaux moments passés ensemble.

Enfin j'aimerais remercier mes ami.e.s qui malgré les milliers de kilomètres ont toujours su être présents et me soutenir dans cette aventure. Une pensée toute particulière pour **Emmalaurie Baptiste**, **Josepha Sedzro** et **Mawamba Kémo** qui m'ont toujours montré le sens de l'expression « loin des yeux mais près du cœur ».

A toutes les personnes que je n'ai pas pu citer et qui ont participé de près ou de loin à la bonne réalisation de cette aventure doctorale, j'aimerais vous adresser mes sincères remerciements. Puissiez-vous trouver en l'accomplissement de cette expérience de vie et en chacun des mots de cette thèse, l'expression de ma profonde gratitude.

RÉSUMÉ

Le développement des glandes mammaires est indépendant des hormones durant la vie *in utero* et pré-pubertaire, bien que des récepteurs hormonaux et/ou des voies de signalisations fonctionnels soient présents et les rendent sensibles à une exposition hormonale inappropriée. Le développement devient hormonodépendant à partir de la puberté où les glandes subissent un remodelage majeur. Les jonctions intercellulaires sont essentielles au développement et à la fonction des glandes mammaires et sont également régulées par les hormones. Cette dépendance hormonale rend les glandes mammaires susceptibles d'être altérées par les perturbateurs endocriniens (PE), des molécules pouvant perturber l'homéostasie endocrinienne.

Les retardateurs de flammes bromés (BFR) sont des molécules ajoutées aux produits de consommation pour respecter les normes anti-incendies. Les enfants y sont les plus exposés d'une part *via* leur mère au cours de la vie *in utero* et par l'allaitement, d'autre part en raison de leur tendance à porter des objets à la bouche. L'exposition aux BFR a été associée avec des altérations de diverses fonctions physiologiques aussi bien chez les humains directement exposés que chez leur descendance. Le pic d'exposition aux BFR des femmes, ainsi que de leurs filles exposées durant leur développement précoce, a eu lieu durant les années 1990-2000. Notre laboratoire a précédemment observé qu'une exposition à un mélange de BFR représentatif de l'exposition humaine durant la gestation et la lactation, perturbe l'adhésion cellulaire dans les glandes mammaires des mères rats (Dianati *et al.*, 2017).

Ainsi, notre projet consistait à déterminer les effets d'une exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR chez les ratons femelles exposées *via* leur mère, à différentes doses d'une mixture de BFR représentative de l'exposition humaine environnementale en Amérique du Nord.

Nos résultats indiquent que l'exposition *in utero* et lactationnelle, majoritairement à la faible dose de BFR, entraîne (1) un développement mammaire prématuré chez les ratons prépubères, (2) une altération des jonctions adhérentes et communicantes, de l'homéostasie cellulaire, ainsi que de l'expression de THR α 1 chez les pubères, et (3) aucun effet quantifiable à l'âge adulte. Ces données suggèrent que l'exposition précoce aux BFR entraîne des modifications qui sont caractéristiques de facteurs pouvant contribuer à des anomalies développementales et/ou à la progression du cancer du sein à long terme.

Nos données supportent la notion de prendre en compte (1) les fenêtres de développement sensibles des glandes mammaires ainsi que (2) des doses et composés représentatifs de l'exposition humaine dans le processus d'évaluation de la toxicité des PE.

Mots clés : perturbateurs endocriniens, retardateurs de flammes bromés, exposition *in utero* et lactationnelle, glandes mammaires, jonctions adhérentes et communicantes, homéostasie cellulaire, récepteur aux hormones thyroïdiennes, effet de la faible dose.

ABSTRACT

Mammary gland development occurs in a hormone independent manner during *in utero* and early postnatal life and becomes dependent of systemic hormones at the onset of puberty, thus driving important remodeling. Moreover, although the early development of the gland does not require systemic hormone control, the immature gland already contains functional hormonal receptors thus rendering it sensitive to an inappropriate hormone exposure. Proper development of the glands also requires direct intercellular junctions that are regulated by hormones. Such important hormone dependency renders the mammary gland highly susceptible to endocrine disruptors (EDs), molecules that can alter the endogenous hormonal homeostasis.

Brominated flame retardants (BFR) are EDs added to consumer products to comply to safety policies. Although banned because of their persistence and biomagnification properties, BFR are still continuously released from current use of existing products or waste stream processes. Thus, human exposure to BFR is ubiquitous. Toddlers are the most exposed population in part due to *in utero* and lactational exposure from the mother, but also because there are more prone to hand-to-mouth contact. The highest use of BFR occurred in the late 1990-2000, suggesting that both mothers and their daughters were majorly exposed at this time. We have previously shown that gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR alters adherens junctions in the lactating glands of dams in Sprague-Dawley rat model.

Thus, our project aimed to unravel the effects of *in utero* and lactational exposure of the offspring that were exposed, through their mothers, to different doses of a BFR mixture that was designed to represent human environmental exposure in North America house dust.

Our results indicate that early exposure, mainly to the low dose of the BFR mixture led to (1) premature mammary development in prepubertal pups, (2) disruption of adherens and gap junctions as well as cellular, and $\text{THR}\alpha 1$ homeostasis in pubescent pups, and (3) no quantifiable effects in adults. Such findings suggest that *in utero* and lactational exposure to BFR induces alterations that may contribute to mammary developmental abnormalities or breast cancer progression later in life.

Altogether, our results support the need to take into consideration (1) sensitive windows of mammary gland development and (2) low and/or typical environmentally relevant doses and mixtures to better assess the risks related to ED components.

Key words: endocrine disruptors, brominated flame retardants, *in utero* and lactational exposure, mammary gland, precocious development, adherens and gap-junctions, cellular homeostasis, thyroid hormone receptor, low-dose effects.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----------|
| DÉDICACE..... | IV |
| REMERCIEMENTS..... | V |
| RÉSUMÉ..... | IX |
| ABSTRACT..... | XI |
| TABLE DES MATIÈRES | XIII |
| LISTE DES FIGURES..... | XVII |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | XIX |
| 1 INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 GLANDE MAMMAIRE : PRÉSENTATION GÉNÉRALE | 1 |
| 1.2 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DES GLANDES MAMMAIRES CHEZ LES FEMELLES..... | 1 |
| 1.3 DÉVELOPPEMENT DES GLANDES MAMMAIRES | 3 |
| 1.3.1 <i>Développement hormono-indépendant</i> | 4 |
| 1.3.2 <i>Développement hormono-dépendant</i> | 5 |
| 1.4 RÉGULATIONS ENDOCRINES, PARACRINES ET LOCALES DU DÉVELOPPEMENT MAMMAIRE | 10 |
| 1.4.1 <i>Contrôle endocrinien</i> | 10 |
| 1.4.2 <i>Caractérisation des signaux hormonaux impliqués dans le développement mammaire</i> .. | 11 |
| 1.5 LES JONCTIONS INTERCELLULAIRES : IMPLICATIONS DANS LE DÉVELOPPEMENT MAMMAIRE | 18 |
| 1.5.1 <i>Jonctions communicantes ou Gap</i> | 18 |
| 1.5.2 <i>Jonctions adhérentes</i> | 21 |
| 1.5.3 <i>Jonctions serrées</i> | 25 |
| 1.6 RÉGULATION ENDOCRINE DES JONCTIONS INTERCELLULAIRES | 28 |
| 1.6.1 <i>Les hormones gonadiques et gonadotropes</i> | 28 |
| 1.6.2 <i>Les hormones thyroïdiennes, la prolactine et les glucocorticoïdes</i> | 29 |
| 1.7 LE CANCER DU SEIN..... | 29 |
| 1.7.1 <i>Définition et épidémiologie</i> | 29 |
| 1.7.2 <i>La cancérogenèse du sein</i> | 30 |
| 1.7.3 <i>Implication des jonctions intercellulaires dans la cancérogenèse</i> | 31 |
| 1.7.4 <i>Les facteurs de risques du cancer du sein</i> | 32 |
| 1.8 LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS | 35 |
| 1.8.1 <i>Fonctionnement du système endocrinien</i> | 36 |
| 1.8.2 <i>Mode d'action et caractéristiques inhérents aux perturbateurs endocriniens</i> | 37 |
| 1.9 PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET DÉVELOPPEMENT DES GLANDES MAMMAIRES | 38 |
| 1.10 PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET JONCTIONS INTERCELLULAIRES | 40 |
| 1.11 LES RETARDATEURS DE FLAMMES BROMÉS | 41 |
| 1.11.1 <i>Voies d'exposition et contamination humaine</i> | 43 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1.11.2 | <i>Impact de l'exposition aux BFR sur la santé endocrinienne et reproductive</i> | 43 |
| 1.11.3 | <i>Impact des BFR sur les glandes mammaires</i> | 46 |
| 1.12 | CONTEXTE DE RECHERCHE | 48 |
| 1.13 | PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS | 49 |
| 2 | PREMIER ARTICLE | 53 |
| 2.1 | INTRODUCTION | 56 |
| 2.2 | MATERIALS AND METHODS | 58 |
| 2.3 | RESULTS..... | 61 |
| 2.4 | DISCUSSION..... | 73 |
| 2.5 | CONCLUSION..... | 79 |
| 2.6 | ACKNOWLEDGEMENTS | 80 |
| 2.7 | SUPPLEMENTARY DATA DESCRIPTION | 81 |
| 3 | DEUXIÈME ARTICLE | 86 |
| 3.1 | INTRODUCTION | 89 |
| 3.2 | MATERIALS AND METHODS | 91 |
| 3.3 | RESULTS..... | 94 |
| 3.4 | DISCUSSION..... | 100 |
| 3.5 | CONCLUSION..... | 105 |
| 3.6 | ACKNOWLEDGEMENTS | 105 |
| 3.7 | SUPPLEMENTARY DATA | 106 |
| 4 | DISCUSSION GÉNÉRALE | 109 |
| 4.1 | LES JONCTIONS INTERCELLULAIRES ET L'ÉQUILIBRE PROLIFÉRATION-APOPTOSE SONT DES CIBLES PRIVILÉGIÉES PAR LES BFR ET CES EFFETS IMPLIQUERAIENT UNE PERTURBATION DES RÉCEPTEURS AUX HORMONES THYROÏDIENNES | 109 |
| 4.2 | LES EFFETS DES BFR DÉPENDENT DE LA FENÊTRE DE DÉVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE..... | 112 |
| 4.3 | IMPACT DES BFR SUR LES GLANDES MAMMAIRES : EFFETS MATERNELS, DÉVELOPPEMENTAUX, PERSISTANTS ET/OU LATENTS ?..... | 115 |
| 4.4 | L'EXPOSITION AUX BFR INFLUENCE-T-ELLE LES RISQUES DE CANCER DU SEIN ? | 118 |
| 4.5 | LES BFR INDUISENT DES EFFETS À LA FAIBLE DOSE ET DES COURBES NON LINÉAIRES | 119 |
| 4.6 | PHYSIOLOGIE HUMAINE VS RAT : QUELLE EST LA PERTINENCE DE NOTRE ÉTUDE ? | 122 |
| 6 | ORIGINALITÉ ET LIMITES DE L'ÉTUDE | 124 |
| 7 | ATTEINTE DES OBJECTIFS DU PROJET ET PERSPECTIVES | 125 |
| 8 | CONTRIBUTIONS GÉNÉRALES | 127 |
| 9 | BIBLIOGRAPHIE | 129 |
| 10 | ANNEXE I | 180 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 10.1 | PRINCIPAUX SIGNAUX LOCAUX IMPLIQUÉS DANS LA MORPHOGENÈSE DES GLANDES MAMMAIRES <i>IN UTERO</i> ET CHEZ LES FEMELLES VIERGES | 180 |
| 10.2 | EFFETS DE L'EXPOSITION <i>IN UTERO</i> ET LACTATIONNELLE SUR LES MARQUEURS DU DÉVELOPPEMENT, DES JONCTIONS ET DE L'HOMÉOSTASIE CELLULAIRE CHEZ LES RATONS À L'ÂGE ADULTE..... | 181 |
| 10.2.1 | <i>Toxicité générale</i> | 181 |
| 10.2.2 | <i>Développement macroscopique</i> | 182 |
| 10.2.3 | <i>Jonctions adhérentes</i> | 183 |
| 10.2.4 | <i>Jonctions communicantes</i> | 184 |
| 10.2.5 | <i>Récepteur aux hormones thyroïdiennes</i> | 185 |
| 10.2.6 | <i>Prolifération et apoptose</i> | 185 |
| 11 | ANNEXE II : REVUE | 188 |
| 11.1 | BROMINATED FLAME RETARDANTS: THE FIVE W'S | 190 |
| 11.2 | EFFECTS OF EXPOSURE TO PBDES AND HBCDD ON FEMALE ENDOCRINE AND REPRODUCTIVE SYSTEMS: STATE-OF-THE-ART | 192 |
| 11.2.1 | <i>Effects on development and homeostasis of thyroid and ovarian hormones</i> | 192 |
| 11.2.2 | <i>Experimental model: in vivo and in vitro</i> | 194 |
| 11.3 | EFFECTS ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM AND DEVELOPMENTAL OUTCOME..... | 196 |
| 11.4 | OVERVIEW OF MAMMARY GLAND DEVELOPMENT AND HORMONE ACTION | 198 |
| 11.4.1 | <i>Systemic hormone-independent development</i> | 198 |
| 11.4.2 | <i>Systemic hormone- dependent development</i> | 199 |
| 11.4.3 | <i>Intercellular junctions in mammary gland development</i> | 201 |
| 11.5 | BREAST CARCINOGENESIS: ROLE OF HORMONES AND JUNCTIONS..... | 204 |
| 11.6 | EXPOSURE TO PBDES AND HBCDD AND THE MAMMARY GLANDS: EXPERIMENTAL MODELS UNRAVEL INTRICATE EFFECTS ON ENDOCRINE, REPRODUCTIVE AND INTERCELLULAR JUNCTIONS' ENDPOINTS..... | 206 |
| 11.6.1 | <i>Exposure to BFR: effects of in utero and lactational exposure to DE-71</i> | 207 |
| 11.6.2 | <i>Effects of exposure to an environmentally relevant mixture of PBDEs and HBCDD</i> | 209 |
| 11.7 | LOW DOSE AND AGE-DEPENDENT' EFFECTS OF BFR..... | 215 |
| 11.8 | PROPOSED MECHANISMS FOR BFR ACTIONS IN THE MAMMARY DURING POSTNATAL DEVELOPMENT..... | 215 |
| 11.9 | BFR-INDUCED DISRUPTION OF MAMMARY GLAND DEVELOPMENT: CAUSE FOR CONCERN? | 216 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| FIGURE 1-1 : REPRESENTATION DES GLANDES MAMMAIRES DES FEMELLES CHEZ L'HUMAIN (A) ET CHEZ LE RAT (B) | 2 |
| FIGURE 1-2 : GLANDES MAMMAIRES FONCTIONNELLES CHEZ LES FEMELLES HUMAINS ET RONGEURS | 3 |
| FIGURE 1-3 : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES GLANDES MAMMAIRES CHEZ LES FEMELLES RONGEURS | 4 |
| FIGURE 1-4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BOURGEON TERMINAL | 7 |
| FIGURE 1-5 : DEVELOPPEMENT POSTNATAL DES GLANDES MAMMAIRES CHEZ LES RONGEURS | 8 |
| FIGURE 1-6 : SYSTEME ENDOCRINIEN CHEZ LES FEMELLES | 11 |
| FIGURE 1-7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CONNEXINES, CONNEXONS ET DES JONCTIONS COMMUNICANTES..... | 19 |
| FIGURE 1-8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES JONCTIONS ADHERENTES DANS L'EPITHELIUM MAMMAIRE | 23 |
| FIGURE 1-9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES JONCTIONS SERREES DANS LA GLANDE MAMMAIRE..... | 26 |
| FIGURE 1-10 : PERIODES DE DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE LES PLUS SENSIBLES A UNE EXPOSITION AUX PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET POTENTIELLES ALTERATIONS OBSERVABLES | 40 |
| FIGURE 2-1 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURES ON ADHERENS JUNCTION PROTEIN LEVELS IN THE MAMMARY GLANDS OF THE OFFSPRING | 63 |
| FIGURE 2-2 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON B-CATENIN SIGNALING IN THE MAMMARY GLANDS OF THE OFFSPRING AT PND 4 | 64 |
| FIGURE 2-3 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON GAP JUNCTION PROTEIN LEVELS IN THE MAMMARY GLANDS OF THE OFFSPRING | 65 |
| FIGURE 2-4 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON E-CADHERIN LOCALIZATION IN THE MAMMARY GLANDS OF OFFSPRING AT PND 46 | 67 |
| FIGURE 2-5 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON ENDOGENOUS B-CATENIN AND P-B-CATSER675 LOCALIZATION IN THE MAMMARY GLANDS OF OFFSPRING AT PND 46 | 68 |
| FIGURE 2-6 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON CX43 LOCALIZATION IN THE MAMMARY GLANDS OF OFFSPRING AT PND 46..... | 69 |
| FIGURE 2-7 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS PROTEIN LEVELS IN THE MAMMARY GLANDS OF OFFSPRING | 71 |
| FIGURE 2-8 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON THE PROTEIN LEVELS OF THYROID HORMONE RECEPTORS IN THE MAMMARY GLANDS OF OFFSPRING | 72 |

| | |
|--|-----|
| FIGURE 2-9 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON PROTEIN LEVELS OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS MARKERS IN THE MAMMARY GLANDS OF OFFSPRING..... | 73 |
| FIGURE 2-10 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION MARKERS IN THE MAMMARY GLANDS OF PND 46 OFFSPRING | 81 |
| FIGURE 2-11 : EFFECTS OF EXPOSURE TO A BFR MIXTURE ON EPITHELIAL SURFACE AREA AND ELONGATION OF THE MAMMARY GLAND IN PND 46 OFFSPRING..... | 82 |
| FIGURE 3-1 : LOW DOSE EXPOSURE TO BFR MIXTURE INCREASES THE EPITHELIAL SURFACE AREA OF PREPUBERTAL MAMMARY GLANDS..... | 96 |
| FIGURE 3-2 : LOW DOSE EXPOSURE TO THE BFR MIXTURE TENDS TO INCREASE DUCT SIZE | 97 |
| FIGURE 3-3 : EXPOSURE TO THE LOWEST DOSE OF BFR INCREASES PROTEIN LEVELS OF THE EARLY APOPTOTIC MARKER CLEAVED CASPASE-9..... | 98 |
| FIGURE 3-4 : LOW DOSE EXPOSURE TO THE BFR TREATMENT ENHANCES KI67 CELL INDEX..... | 99 |
| FIGURE 3-5 : EXPOSURE TO BFR MIXTURES DOES NOT AFFECT THYROID HORMONE RECEPTOR ALPHA 1 BUT IMPAIRS ESTROGEN RECEPTOR ALPHA PROTEIN LEVELS | 99 |
| FIGURE 3-6 : EXPOSURE TO A LOW DOSE BFR MIXTURE TENDS TO INCREASE THE NUMBER OF CELLS POSITIVE FOR NUCLEAR THYROID HORMONE RECEPTOR ALPHA 1..... | 100 |
| FIGURE 4-1 : MODELE HYPOTHETIQUE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LES EFFETS DES BFR SUR LES GLANDES MAMMAIRES CHEZ LES RATONS PREPUBERES ET PUBERES..... | 112 |
| FIGURE 4-2 : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR LE DEVELOPPEMENT POSTNATAL DES GLANDES MAMMAIRES..... | 118 |
| FIGURE 10-1 : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR LA TOXICITE GENERALE A PND 208 | 181 |
| FIGURE 10-2 : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR LA SURFACE ET L'ELONGATION EPITHELIALE A PND 208..... | 182 |
| FIGURE 10-3 : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR LES PROTEINES DES JONCTIONS ADHERENTES A PND 208 | 183 |
| FIGURE 10-4 : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR LES PROTEINES DES JONCTIONS GAP A PND 208 | 184 |
| FIGURE 10-5 : : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR L'EXPRESSION DU RECEPTEUR ALPHA1 AUX HORMONES THYROÏDIENNES A PND 208..... | 185 |
| FIGURE 10-6 : EFFETS DE L'EXPOSITION AU MELANGE DE BFR SUR LES MARQUEURS DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET DE L'APOPTOSE A PND 208 | 185 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP : Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APC : Protéine adénomateuse de polypose Coli

AR : Récepteur aux androgènes

ATP : Adénosine triphosphate

BFR : Brominated flame retardants ou Retardateurs de flammes bromés

BPA : Bisphénol A

Cx : Connexine

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DecaBDE : Décabromodiphényléther

DES : Diéthylstilbestrol

DMBA : 7,12-Dimethylbenz[a]anthracène

E2 : Œstrogènes

ECM : Matrice extracellulaire ou Extracellular matrix

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EL : Boucle extracellulaire

EMT : Epithelial to mesenchymal transition

EPA : Agence américaine de protection de l'environnement

ER α : Estrogen receptor α

ER β : Estrogen receptor β

GH : Growth hormone ou hormone de croissance

GJIC : gap junctional intercellular communication

GLUT : Transporteur de glucose

GSK3 β : Glycogène synthase kinase 3 β

HBCDD : Hexabromocyclododécane

HCB : Hexachlorobenzène

HPG : Hypothalamo-hypophysaire-gonadique

hPL : Hormone lactogène placentaire

InsP3 : Inositol trisphosphate

JAK2 : Janus Kinase 2

JAMs : Junctional Adhesion molecule

KO : knockout (muté)
LEF : Lymphoid enhancer factor
LOAEL : Plus faible dose produisant un effet indésirable
MAP : Mitogen-activated protein kinase
MCT : Transporteur monocarboxylate
MEHP : mono-2-ethylhexyl phtalate
MMTV : Virus de la tumeur mammaire de souris
MT : Domaine transmembranaire
NMDRC : Non-monotonic dose-response curve ou courbe dose réponse non monotones
OctaBDE : Octabromodiphényléther
OT : Ocytocine
OTR : Récepteur à l'ocytocine
PABC : Pregnancy-associated breast cancer
PAH : Polycyclic aromatic hydrocarbon ou hydrocarbures aromatiques polycycliques
PBB : Biphényles polybromés
PBDE : Polybromodiphényléthers
PCB : Biphényles polychlorés
pentaBDE : Pentabromodiphényléther
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B
PKC : Protéine Kinase C
POP : Polluants organiques persistants
ppm : Partie par million
ppt : Partie par billion
PR : Récepteur à la progestérone
PRL : Prolactine
PRLR : Récepteur à la prolactine
p- β catSer675 : Phosphorylation de β -caténine sur Ser675
STAT5 : Signal Transducers and Activators of Transcription 5
T3 : Triiodothyronine
T4 : Thyroxine
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TCF : T-cell factor
TEB : Terminal end bud

TH : Hormones thyroïdiennes

THR α : Thyroid hormone receptor α

THR β : Thyroid hormone receptor β

U.S EPA : Agence Américaine de Protection de l'environnement

UNEP : United Nations Environment Program ou Programme des Nations unies pour
l'environnement

WAP : Whey acidic protein ou la protéine acide de lactosérum

1 INTRODUCTION

1.1 Glande mammaire : présentation générale

Les glandes mammaires sont des organes accessoires du système reproducteur féminin spécifiques à la classe des mammifères. Bien que leur nombre et leurs caractéristiques morphologiques varient en fonction des espèces, les glandes mammaires ont pour rôle fondamental de synthétiser, sécréter et éjecter le lait afin d'assurer au nouveau-né, nutrition, protection et développement (Medina, 1996).

À l'opposé de la plupart des organes, la majeure partie du développement de la glande mammaire se fait durant la vie postnatale à partir de la puberté, et la glande atteint sa maturité à l'âge adulte lors du cycle grossesse-lactation (Macias & Hinck, 2012). Les étapes du développement menant à la différenciation d'une glande fonctionnelle sont quasi-similaires chez la plupart des espèces (Hovey *et al.*, 2002). Cependant, des dissemblances anatomiques peuvent être observées en fonction des spécificités physiologiques de chaque espèce (Hovey *et al.*, 2002).

Dans le cadre de mon doctorat, mon projet visait à étudier les effets d'une exposition environnementale à un mélange de perturbateurs endocriniens sur le développement postnatal des glandes mammaires dans un modèle *in vivo* de rat. *In fine*, celui-ci servirait de base aux études permettant de caractériser les effets des BFR sur la glande mammaire *in vivo* afin de mieux comprendre leurs potentielles conséquences chez l'humain. Ainsi, ma revue de littérature sera restreinte à la description du développement et de la physiologie des glandes mammaires chez les femelles rongeurs et chez l'humain.

1.2 Anatomie et physiologie des glandes mammaires chez les femelles

Il existe six paires de glandes mammaires chez le rat, dont une paire cervicale, deux thoraciques, une abdominale et deux paires inguinales (Masso-Welch *et al.*, 2000). L'espèce humaine ne possède qu'une seule paire de glandes mammaires qui est annexée à la paroi antérieure du thorax (Russo & Russo, 2004) (Figure 1-1). Dans les deux cas, il s'agit de structures ramifiées et complexes dont la forme fonctionnelle est présente en fin de grossesse et lors de la lactation (Figure 1-2).

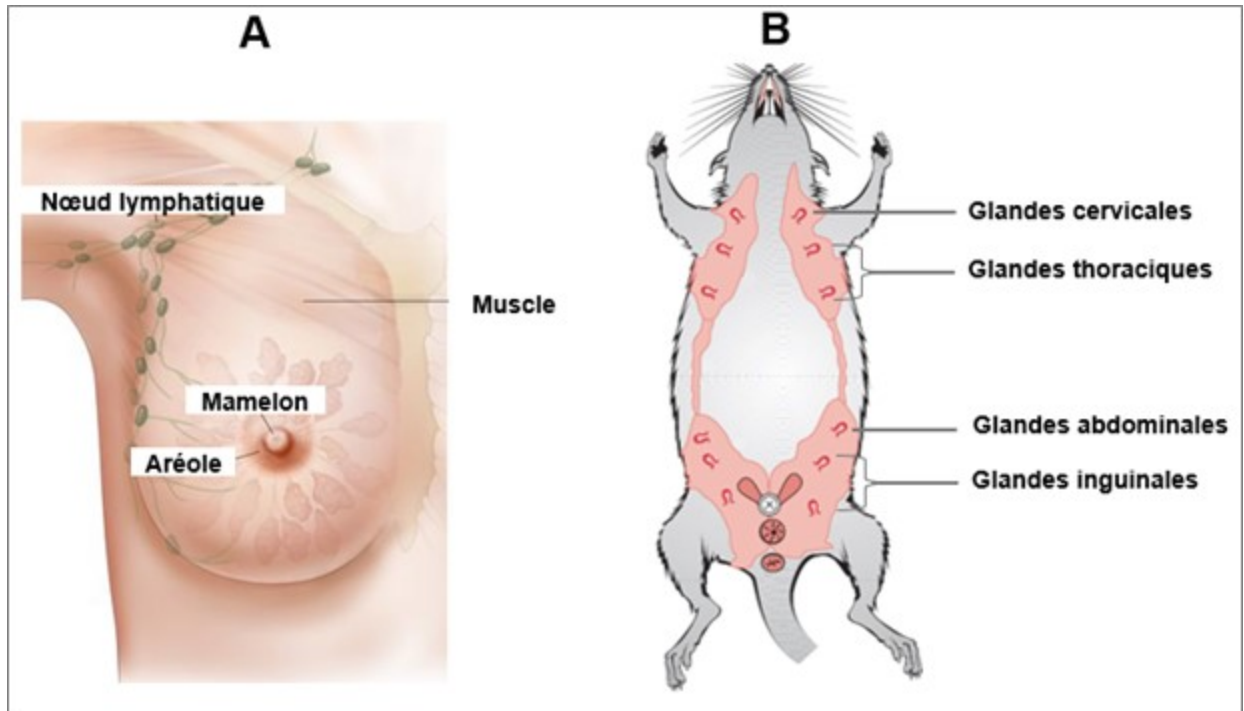


Figure 1-1 : Représentation des glandes mammaires des femelles chez l'humain (A) et chez le rat (B)

Les glandes mammaires sont des organes annexes du système reproducteur féminin des mammifères dont la fonction ultime est de synthétiser et sécréter le lait pour nourrir le nouveau-né. Il existe une paire de glandes mammaires thoraciques chez l'humain et six paires réparties depuis la zone cervicale jusqu'à la région inguinale chez le rat (B). D'après nci-media.cancer.gov et © vetopsy.fr.

Chez le rat, la glande mammaire fonctionnelle est constituée d'un arbre épithélial émanant d'un canal primaire unique, connecté à l'environnement extérieur par le mamelon. Le compartiment épithélial est entouré du mésenchyme, ou stroma adipeux, duquel il est séparé par une lame basale (Masso-Welch *et al.*, 2000) (Figure 1-2). L'unité fonctionnelle de la glande mammaire est l'alvéole ou acinus, une structure sphérique comportant un épithélium bicouche composé de cellules luminales sécrétrices de lait, elles-mêmes entourées d'une couche de cellules myoépithéliales contractiles (Geddes, 2007; Munford, 1963a) (Figure 1-2). Les alvéoles se forment à l'extrémité des canaux les plus distants du mamelon ou canaux terminaux; elles s'assemblent en lobules dont plusieurs forment des lobes alvéolaires (Hassiotou & Geddes, 2013; Munford, 1963a). Chaque lobe est drainé par un canal lactifère convergeant vers le mamelon (Hassiotou & Geddes, 2013; Masso-Welch *et al.*, 2000) (Figure 1-2). Chez l'humain, le compartiment épithélial de chaque glande mammaire est composé d'un regroupement de branchements canaux émanant d'une vingtaine de canaux primaires qui se rejoignent au niveau du mamelon, et le stroma est majoritairement composé de tissus fibreux (Medina, 1996).

Dans les deux cas, le lait est sécrété au niveau des unités lobulo-alvéolaires terminales et acheminé vers le mamelon (Hassiotou & Geddes, 2013; Naccarato *et al.*, 2000) (Figure 1-2).

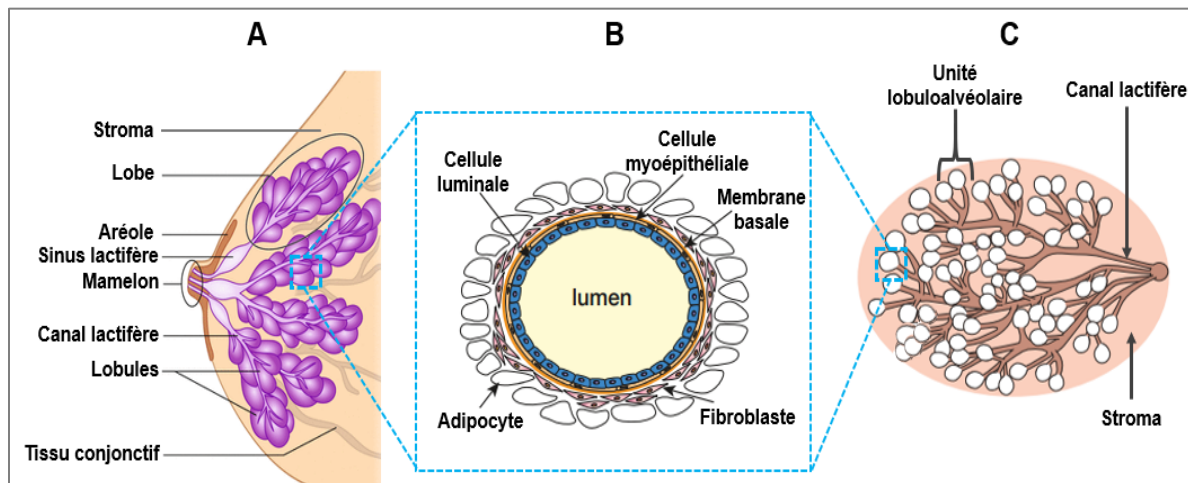


Figure 1-2 : Glandes mammaires fonctionnelles chez les femelles humains et rongeurs

Durant la gestation et la lactation, les glandes mammaires humaines (A) ou murines (C) sont composées de lobules alvéolaires dont l'unité fonctionnelle est l'alvéole ou acinus (B) qui assure la sécrétion du lait. L'alvéole (B) est composée de cellules luminales délimitant un lumen et reposant sur une couche de cellules myoépithéliales. Adapté de Fu *et al.*, 2020 ; Rehfeld *et al.*, 2017.

1.3 Développement des glandes mammaires

Autant chez l'humain que chez les rongeurs, les glandes mammaires se développent de façon discontinue au cours la vie (Hovey *et al.*, 2002). La vie embryonnaire, la puberté et le cycle grossesse-lactation sont des périodes de remodelage majeur (Geddes, 2007; Macias & Hinck, 2012; Sternlicht, 2006), alors que la prépuberté et l'âge adulte représentent des fenêtres de développement minimal (Masso-Welch *et al.*, 2000; Medina, 1996). Le développement *in utero* et pré-pubertaire des glandes mammaires se fait de façon indépendante des hormones systémiques; en revanche, à la puberté le développement devient majoritairement dépendant du contrôle endocrinien (Briskin & Ataca, 2015; Hovey *et al.*, 2002; Sternlicht, 2006).

Tout au long de la vie, le développement de la glande mammaire est finement régulé par des signaux paracrines, autocrines et endocrines (Briskin & Ataca, 2015; Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006). Chez les femelles rats et chez l'humain, la régulation endocrinienne des glandes mammaires implique plusieurs hormones dont les œstrogènes (E2), la progestérone (P4), les hormones thyroïdiennes (TH), la prolactine (PRL), l'hormone lactogène placentaire (hPL), et l'ocytocine (OT) (Briskin & Ataca, 2015; Hovey *et al.*, 2002; Neville *et al.*, 2002).

1.3.1 Développement hormono-indépendant

1.1.1.1 Développement embryonnaire et fœtal

Bien que le développement embryonnaire ait été majoritairement décrit chez la souris, il a été démontré que les glandes mammaires chez toutes les espèces mammifères sont dérivées de l'ectoderme embryonnaire (Ofstedal, 2002) et se différencient sous l'influence de signaux mésodermiques (Sakakura *et al.*, 1976; Sakakura *et al.*, 1982). Le développement mammaire *in utero* commence vers le 10^{ème} jour embryonnaire (E 10.5) chez la souris, le 10-11^{ème} chez le rat et vers la 6^{ème} semaine post-conception chez l'humain lorsque les cellules ectodermiques s'agglomèrent sur la surface ventrale selon l'axe rostro-caudal et forment deux épaissements symétriques appelés crêtes mammaires ou lignes de lait (Hassiotou & Geddes, 2013; Hens & Wysolmerski, 2005; Macias & Hinck, 2012). Il s'en suit une atrophie des cellules épithéliales sur toute la surface des lignes de lait à l'exception des régions cervicales, thoraciques, abdominales et inguinales chez la souris et chez le rat (Macias & Hinck, 2012; Veltmaat *et al.*, 2003) et de la zone thoracique chez l'humain (Medina, 1996; Russo & Russo, 2004). Cela aboutit à la formation de placodes mammaires aux différentes positions auxquelles les futures glandes mammaires se formeront (Figure 1-3).

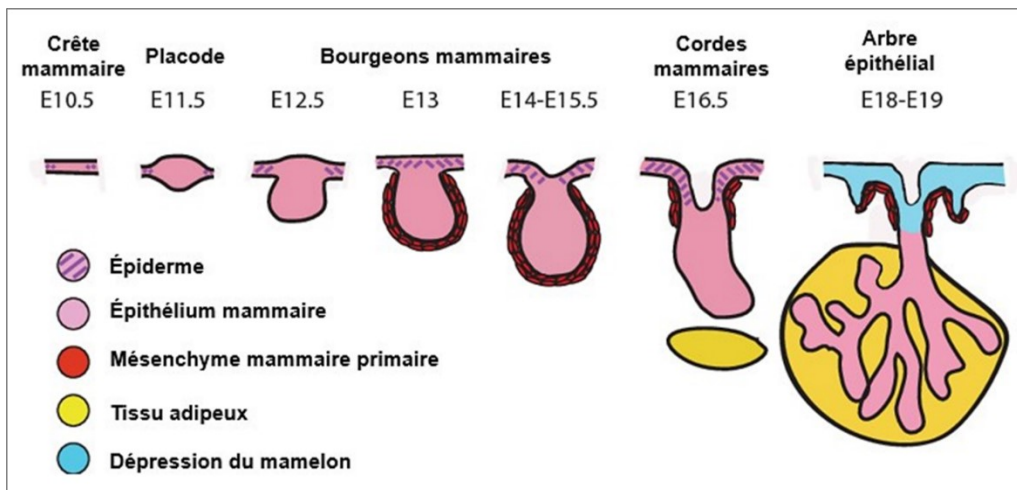


Figure 1-3 : Développement embryonnaire des glandes mammaires chez les femelles rongeurs

La prolifération des cellules ectodermiques embryonnaires résulte en la formation de crêtes mammaires qui vont bourgeonner et envahir le mésenchyme sous-jacent. Progressivement, les bourgeons se différencient en un canal primaire puis se ramifient de façon dichotomique alors que le mésenchyme se différencie en stroma adipeux. L'ensemble de ces étapes aboutit à la formation d'un arbre épithélial rudimentaire entouré d'un stroma volumineux à la naissance. D'après Cowin *et al.*, 2015.

Au jour E14, les placodes mammaires prolifèrent et forment des bourgeons mammaires qui vont progressivement migrer et s'invaginer dans le mésoderme sous-jacent au fur et à mesure

de leur croissance (Balinsky, 1950; Cowin & Wysolmerski, 2010; Macias & Hinck, 2012). À ce stade, le mésoderme va se différencier en stroma adipeux suivant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (Cowin & Wysolmerski, 2010; Hovey & Aimo, 2010; Sakakura *et al.*, 1982). Au jour E16.5, la morphogenèse des canaux commence par la formation de structures épithéliales solides et allongées ayant une apparence similaire à des cordes (Balinsky, 1950). Celles-ci s'invaginent davantage dans le stroma adipeux dans lequel elles subissent une ramification dichotomique qui va aboutir à la formation de l'arbre épithélial primaire constitué d'environ 10 à 15 branches initiales (Cowin & Wysolmerski, 2010). La formation du lumen résulte de la fusion de plusieurs cavités préalablement formées dans les cordes épithéliales par divers mécanismes impliquant l'apoptose et l'autophagie (Hogg *et al.*, 1983; Macias & Hinck, 2012). De façon simultanée, les mamelons sont formés par un épaissement de l'épiderme kératinisé de la peau (Cowin & Wysolmerski, 2010; Foley *et al.*, 2001). L'invagination subséquente d'un anneau de kératinocytes formera une gaine au contact de l'arbre épithélial au fur et à mesure que celui-ci se connecte au milieu extérieur par la formation du lumen (Foley *et al.*, 2001). À la fin du développement embryonnaire des rongeurs, les glandes mammaires sont composées d'un arbre épithélial rudimentaire, ouvert sur le milieu extérieur par le lumen et entouré d'un stroma adipeux volumineux (Cowie, 1974; Cowin & Wysolmerski, 2010; Macias & Hinck, 2012) (Figure 1-3). Chez l'humain, l'organogenèse aboutit à la formation de plusieurs canaux pour chacun des bourgeons mammaires, et mène à la formation d'environ une vingtaine d'arbres épithéliaux qui se regroupent au niveau du mamelon (Macias & Hinck, 2012; Medina, 1996; Russo & Russo, 2004).

1.1.1.2 Développement néonatal et pré-pubertaire

De la naissance à la période pré-pubertaire, les glandes mammaires de la plupart des espèces se développent de façon minimale par des elongations et ramifications canalaire de faible intensité (Hovey *et al.*, 2002). Durant cette période, la croissance est dite isométrique car les glandes s'allongent à la même vitesse que le reste du corps (Hovey *et al.*, 2002; Medina, 1996).

1.3.2 Développement hormono-dépendant

1.1.1.3 Développement pubertaire

La puberté définit la période d'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HPG) (Peper *et al.*, 2010) et de maturation du système reproducteur (Bell, 2018). Elle se situe entre le 35^{ème} et le 42^{ème} jour postnatal chez le rat (Masso-Welch *et al.*, 2000), et commence vers

8-12 ans chez la jeune fille (Russo & Russo, 2004). Le développement pubertaire des glandes mammaires est caractérisé par une croissance exponentielle, ou allométrique, et par un remodelage important autant chez les rongeurs que chez les humains (Hovey *et al.*, 2002; Masso-Welch *et al.*, 2000; Russo & Russo, 2004). Cependant, étant donné que les spécificités relatives au développement de la glande mammaire à la puberté et durant la vie postnatale ont été principalement décrites chez les rongeurs (Richert *et al.*, 2000), et en particulier chez la souris, les paragraphes suivants seront majoritairement axés sur ces deux espèces.

Chez les rongeurs, l'augmentation des concentrations systémiques d'hormones ovariennes et des facteurs de croissances pituitaires stimule la prolifération des cellules épithéliales, ce qui aboutit à l'élongation des canaux, mais aussi à la formation de bourgeons terminaux (*Terminal end bud* (TEB)) (Daniel *et al.*, 1987; Sternlicht, 2006) (Figure 1-4). Les TEB sont des structures bulbaires composées de cellules épithéliales immatures qui se forment à l'extrémité des canaux en cours d'élongation (Daniel *et al.*, 1987; Daniel & Smith, 1999; Paine & Lewis, 2017). Ils sont spécifiques à la glande mammaire pubertaire et sont responsables du remodelage important que subit celle-ci à ce stade, en raison de leur fort potentiel de prolifération, d'apoptose et de différenciation (Masso-Welch *et al.*, 2000; Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006). Ils sont identifiables par leur position distale au mamelon soit à l'extrémité de l'arbre épithélial, leur structure bulbeuse, l'absence de tunique myoépithéliale ainsi que la minceur de la membrane basale et du tissu conjonctif apposé au stroma adipeux (Masso-Welch *et al.*, 2000). Les TEB sont constitués d'une monocouche externe de cellules de la coiffe qui délimite une multicouche de cellules dites du corps du bourgeon (Daniel *et al.*, 1987; Daniel & Smith, 1999; Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006). Les cellules de la coiffe expriment les marqueurs des cellules basales (Actine des muscles lisses ou *Smooth Muscle Actine* (SMA), P-cadhérine, la protéine p63, et faiblement les cytokératines (CK) 5 et 14), et sont les précurseurs des cellules myoépithéliales (Deugnier *et al.*, 2002). Les cellules du corps du bourgeon, qui expriment les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, ainsi que les cytokératines luminales (CK8/18), sont à l'origine du lignage luminal (Daniel *et al.*, 1987; Daniel *et al.*, 1995; Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006) (Figure 1-4).

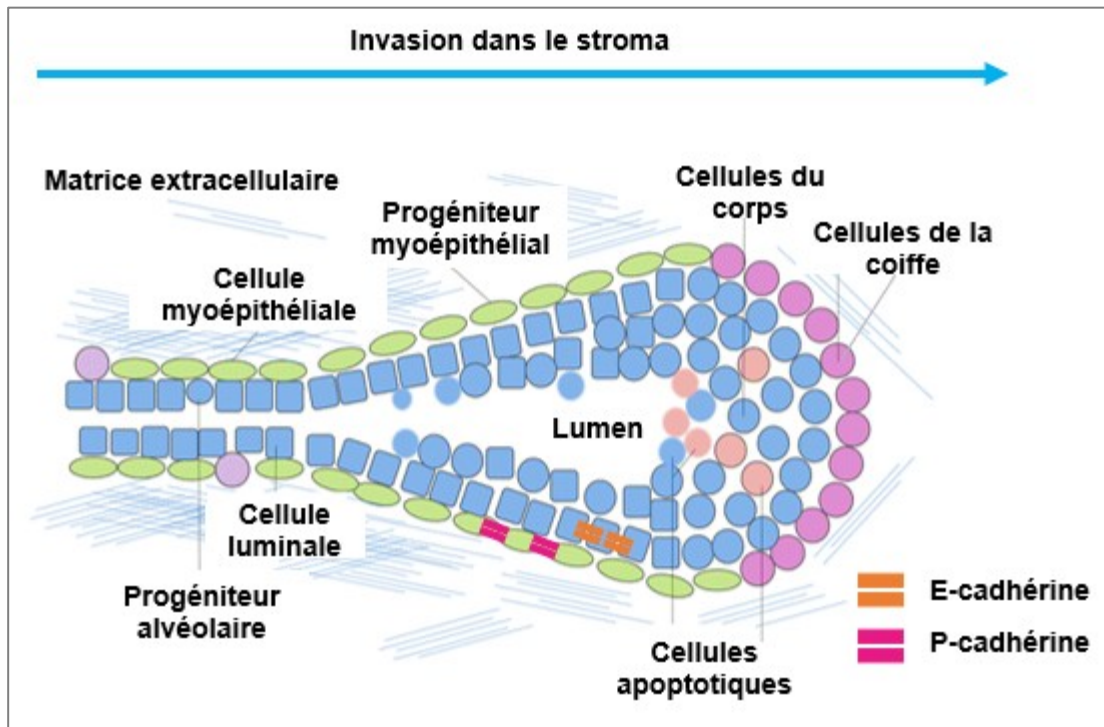


Figure 1-4 : Représentation schématique du bourgeon terminal

Les TEB sont des structures bulbeuses qui assurent le remodelage des glandes mammaires à la puberté. Ils sont composés d'une monocouche externe de cellules de la coiffe qui délimite une multicouche interne de cellules du corps. Les TEB régissent la morphogenèse canalaire et l'invasion de l'épithélium dans le stroma. Ils se différencient en nouveaux canaux au fur et à mesure de leur progression dans le stroma. Les cellules de la coiffe se différencient en cellules myoépithéliales alors que les cellules du corps deviendront des cellules luminales. Parallèlement, les cellules du corps du TEB les plus internes meurent à apoptose et contribuent à la formation du lumen des canaux naissants. Adapté de Paine *et al.*, 2010.

Les œstrogènes stimulent l'élongation épithéliale en induisant l'activité mitotique des cellules du TEB et du canal sous-tendant (Bocchinfuso & Korach, 1997; Daniel *et al.*, 1987; Sternlicht *et al.*, 2006a). En parallèle, les canaux en cours de formation se divisent de façon dichotomique sous l'effet de la progestérone au fur et à mesure de leur progression dans le stroma adipeux, ce qui permet la formation de canaux secondaires (Haslam, 1988; Humphreys *et al.*, 1996; Humphreys *et al.*, 1997a; Humphreys *et al.*, 1997b; Lydon *et al.*, 1995; Paine & Lewis, 2017) (Figure 1-5). De façon concomitante à l'élongation et à la différenciation canalaire, les cellules au centre du bourgeon subissent une apoptose majeure afin de permettre la formation du lumen des nouveaux canaux (Humphreys *et al.*, 1996; Sreekumar *et al.*, 2017). L'ensemble de ces modifications est influencé par des signaux découlant d'interactions entre l'épithélium et le stroma, tels que l'amphiréguline (Hovey & Aimo, 2010; Hovey *et al.*, 1998; Hovey *et al.*, 1999; Sakakura *et al.*, 1976). Celui-ci subit une réorganisation structurale et physiologique afin de contrôler l'invasion des TEB (Arendt *et al.*, 2010; Hovey & Aimo, 2010) (Figure 1-4).

Le développement se fait de façon continue au fur et à mesure de la progression pubertaire, bien que les glandes mammaires subissent une légère régression à la fin de chaque cycle ovarien (Hovey *et al.*, 2002). À l'âge adulte, les ramifications canales atteignent l'extrémité du stroma adipeux et les TEB régressent en des canaux bicouches présentant une extrémité époincée et une faible activité mitotique; ce sont les canaux terminaux (Masso-Welch *et al.*, 2000; Medina, 1996; Richert *et al.*, 2000). Par la suite, tout au long de la vie reproductive, un remodelage modeste se fait lors de chaque cycle ovarien *via* des cycles de prolifération, de différenciation et de régression des glandes mammaires (Hovey *et al.*, 2002; Masso-Welch *et al.*, 2000) (Figure 1-5).

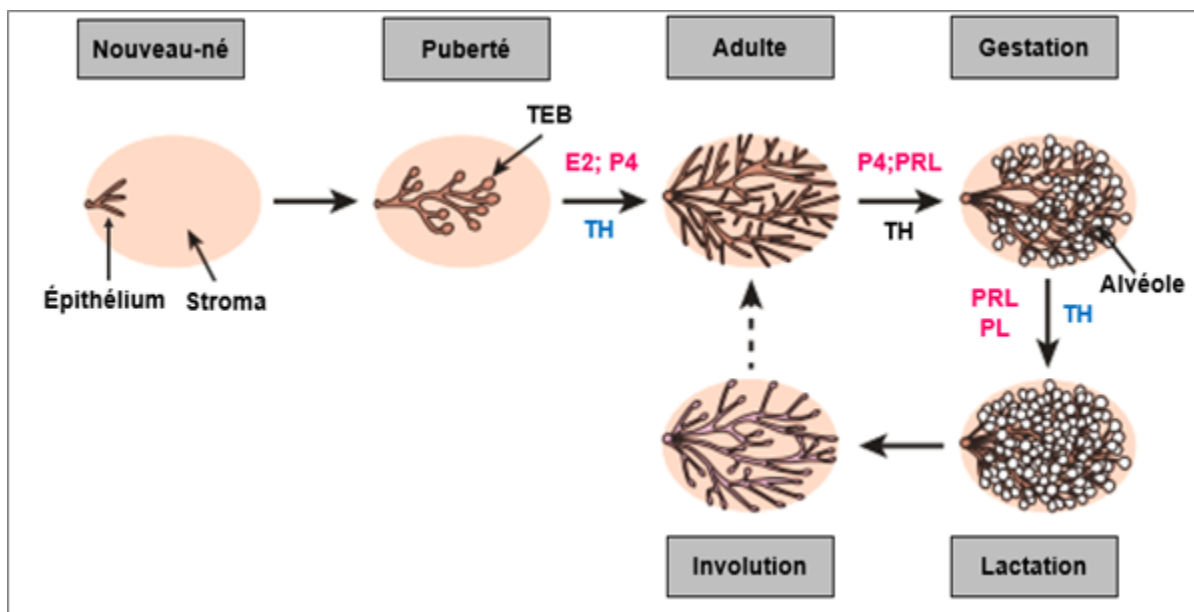


Figure 1-5 : Développement postnatal des glandes mammaires chez les rongeurs

Chez le nouveau-né, l'épithélium mammaire est rudimentaire et entouré d'un stroma volumineux. À partir de la puberté, les canaux vont s'allonger et se ramifier sous l'effet des œstrogènes (E2) et de la progestérone (P4), respectivement. Lors de la gestation, l'action de P4, de la prolactine (PRL) et de l'hormone placentaire lactogène (PL) entraîne la formation des alvéoles puis leur différenciation en unités sécrétrices de lait au moment de la lactation. En fin de lactation, les glandes subissent une involution et régressent à un état pré-gestationnel. Les hormones thyroïdiennes (TH) jouent un rôle permissif dans le développement mammaire aussi bien chez les vierges que durant le cycle gestation-lactation. Rose : hormones essentielles ; Bleu : hormones permissives. D'après Fu *et al.*, 2020.

Bien que l'ensemble de ces étapes soit principalement régulé par les stéroïdes ovariens, il a été montré que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle permissif dans le développement mammaire postnatal (Briskin & Ataca, 2015; Vonderhaar & Greco, 1979; Vonderhaar & Greco, 1982; Vonderhaar *et al.*, 1986) (Figure 1-5).

1.1.1.4 Développement durant la grossesse et la lactation

Le remodelage épithélial commence au début de la gestation par une phase dite de prolifération (Geddes, 2007). L'action combinée de la prolactine et de la progestérone (Brisken, 2002) entraîne une prolifération importante des cellules des canaux lactifères terminaux et conduit à la formation de bourgeons alvéolaires (Joshi *et al.*, 1986; Munford, 1963b; Neville *et al.*, 2002; Traurig, 1967). Les hormones thyroïdiennes jouent également un rôle important dans le développement alvéolaire en potentialisant l'action de la prolactine (Capuco *et al.*, 2008; Capuco *et al.*, 1999; Ziska *et al.*, 1988) (Figure 1-5). Les bourgeons alvéolaires augmentent en taille et en nombre, puis se différencient en structures sphériques qui seront responsables de la sécrétion du lait maternel, les alvéoles ou acini (Geddes, 2007; Macias & Hinck, 2012; Munford, 1963a; Neville *et al.*, 2002). Les alvéoles sont regroupées en lobules qui eux-mêmes s'assemblent en lobes. Au cours de la grossesse, les lobules alvéolaires croissent progressivement et se multiplient jusqu'à ce que tous les espaces inter-canalaires soient envahis par l'épithélium (Masso-Welch *et al.*, 2000; Munford, 1963a; Russo *et al.*, 2001). Puis, les cellules luminales alvéolaires commencent leur différenciation en lactocytes, capables de sécréter le lait sous l'action séquentielle de la prolactine et de l'hormone placentaire lactogène (Pang & Hartmann, 2007). L'activation de la sécrétion du lait se fait en fin de gestation et constitue l'étape finale de maturation des glandes mammaires (Geddes, 2007; Munford, 1963a; Munford, 1963b; Pang & Hartmann, 2007).

Lors de l'allaitement, la succion du mamelon par les bébés induit la sécrétion d'ocytocine qui stimule l'activité contractile des cellules myoépithéliales afin de permettre l'éjection du lait depuis le lumen et son acheminement vers les canaux lactifères puis vers le mamelon (Hassiotou & Geddes, 2013; Lollivier *et al.*, 2006). La lactation dure environ 3 semaines chez les rongeurs et varie en moyenne entre 3 et 24 mois chez les femmes (Hassiotou & Geddes, 2013; Masso-Welch *et al.*, 2000).

1.1.1.5 Involution

Au sevrage, l'accumulation du lait dans la lumière des canaux ainsi que la baisse du taux circulant de prolactine inhibent la synthèse et la sécrétion du lait (Marti *et al.*, 1997; Watson & Kreuzaler, 2011). Des processus tels que l'apoptose des cellules lumineales, la désorganisation de la matrice extracellulaire (ou *extracellular matrix* (ECM)) et la régression des alvéoles entraîne la transition de la glande mammaire vers un état non-fonctionnel, structurellement similaire à la glande adulte, jusqu'à la prochaine grossesse (Holst *et al.*, 1987; Hurley, 1989b; Li *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 1996; Marti *et al.*, 1997). On parle d'involution post-allaitement (Masso-Welch *et al.*, 2000) (Figure 1-5).

Après la ménopause, la diminution des taux circulants d'œstrogènes et de progestérone conduit à une régression irréversible de l'épithélium mammaire autant chez les femelles nullipares que chez les primipares et les multipares. L'épithélium ainsi atrophié laisse place à une plus grande proportion de tissu adipeux et stromal (Macias & Hinck, 2012); on parle d'involution postménopause (Hassiotou & Geddes, 2013; Russo & Russo, 2004).

1.4 Régulations endocrines, paracrines et locales du développement mammaire

1.4.1 Contrôle endocrinien

Plusieurs hormones sont impliquées dans le développement des glandes mammaires. Elles agissent généralement par l'entremise de récepteurs spécifiques dont l'expression et la caractérisation dans la glande mammaire humaine et chez les rongeurs sera discutée ci-après (Figure 1-6).

En plus des hormones, chaque étape du développement mammaire implique des signaux locaux et des interactions locales au sein de l'épithélium, du stroma ainsi qu'entre ces deux compartiments (Sternlicht *et al.*, 2006b). Ces interactions, dépendantes ou non de signaux systémiques, se font de façon différentielle afin de sustenter les besoins de chaque fenêtre développementale. Les principaux signaux locaux impliqués dans la morphogenèse postnatale des glandes mammaires chez les rongeurs sont décrits dans l'annexe I (section. 10.1)

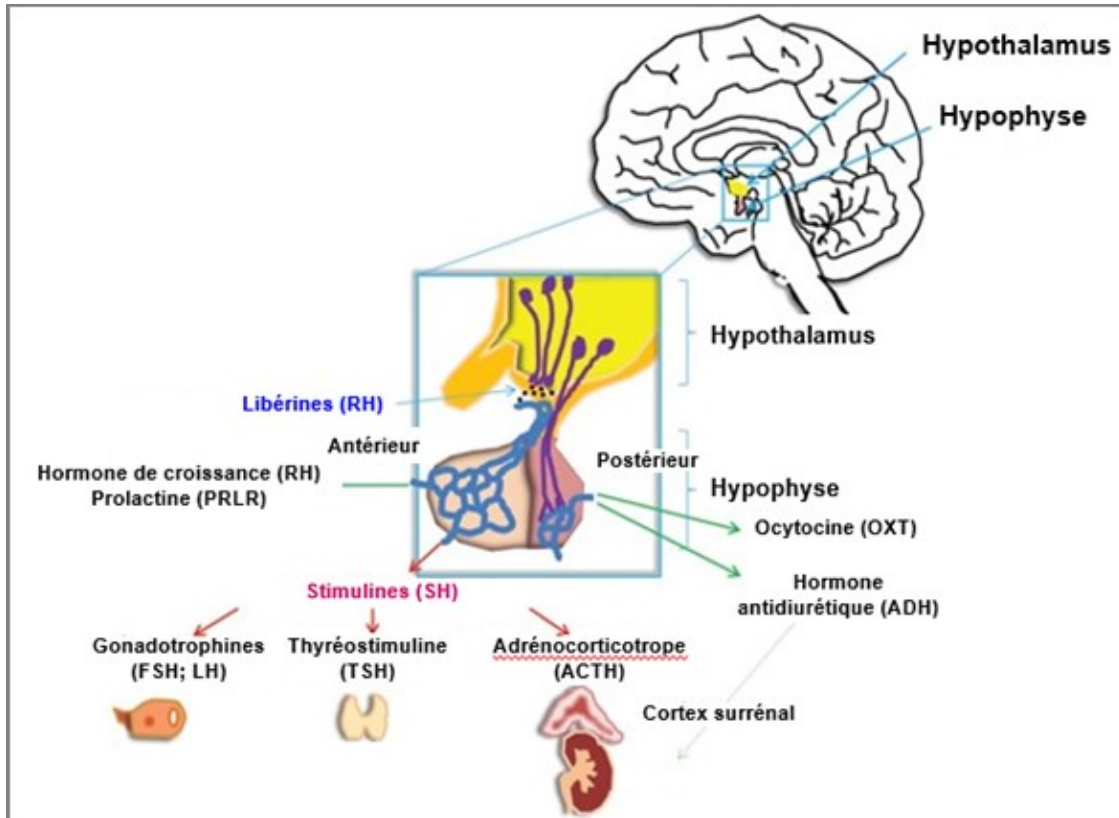


Figure 1-6 : Système endocrinien chez les femelles

Le système endocrinien féminin est organisé en plusieurs axes qui régulent le développement et la fonction de nombreux organes dont les glandes mammaires. Les signaux gonadiques, la prolactine ainsi que l'ocytocine sont les mieux décrits chez les femelles rongeurs et chez l'humain. D'après Brisken & Ataca, 2015.

1.4.2 Caractérisation des signaux hormonaux impliqués dans le développement mammaire

1.1.1.6 Les œstrogènes

Les œstrogènes (E2) sont des hormones stéroïdiennes majoritairement sécrétées par les ovaires sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien (Brisken & O'Malley, 2010). Ils agissent *via* leurs récepteurs ER α et ER β qui sont différentiellement exprimés dans la glande mammaire en fonction du compartiment tissulaire, mais aussi du stade de développement (Saji *et al.*, 2000). Chez les rongeurs, les ER sont exprimés dans le mésenchyme de la glande mammaire à partir du 12^{ème} jour du développement embryonnaire (Heuberger *et al.*, 1982; Hovey *et al.*, 2002). Ils sont présents dans le stroma et l'épithélium mammaire dès le 3^{ème} jour après la naissance chez la souris (Haslam & Nummy, 1992). Leur expression augmente progressivement jusqu'à la puberté, puis elle varie de façon compartiment-spécifique tout au long de la vie (Haslam & Nummy, 1992). Des études chez le rat ont permis de démontrer qu'ER β est majoritairement

exprimé dans le noyau des cellules épithéliales et dans une faible proportion de cellules stromales de façon continue depuis la première semaine de vie jusqu'à l'involution des glandes mammaires (Saji *et al.*, 2000). ER α est présent dans l'épithélium (Saji *et al.*, 2000) et dans le stroma des glandes mammaires (Daniel *et al.*, 1987). Son expression est faible durant les premières semaines postnatales, augmente à la puberté, puis diminue progressivement jusqu'à la grossesse avant d'augmenter fortement durant la lactation et de diminuer à nouveau au sevrage (Filgo *et al.*, 2016; Haslam & Nummy, 1992; Saji *et al.*, 2000) (Tableau 1-1). Chez l'humain, les ER sont exprimés dans l'épithélium mammaire dès la 30^{ème} semaine de gestation et leur expression augmente progressivement jusqu'à la puberté (Keeling *et al.*, 2000; Naccarato *et al.*, 2000). Cependant, au meilleur de nos connaissances, la variation de leur expression au cours du développement mammaire n'a pas été élucidée.

Au niveau fonctionnel, bien que ces récepteurs soient exprimés de façon précoce dans la glande mammaire, les souris mutées pour ER présentent un développement mammaire normal avant la puberté (Bocchinfuso & Korach, 1997; Couse & Korach, 1999), confirmant ainsi que le développement pré-pubertaire se fait naturellement en absence de signaux estrogéniques. Il a été démontré que l'expression d'ER α dans l'épithélium, mais pas dans le stroma, est essentielle au développement normal des glandes mammaires à partir de la puberté (Mallepell *et al.*, 2006). L'expression épithéliale d'ER α est requise pour l'élongation des canaux et le remodelage de la glande mammaire à la puberté, ainsi que pour la croissance et le maintien des alvéoles durant la gestation (Briskin & O'Malley, 2010; Mallepell *et al.*, 2006). Cependant sa présence dans le stroma serait également nécessaire pour le développement de la glande mammaire adulte (Mueller *et al.*, 2002). ER α joue également un rôle essentiel dans l'induction de l'expression du récepteur à la progestérone (PR) dans l'épithélium mammaire (Haslam & Shyamala, 1979; Hewitt & Korach, 2003) et dans l'induction de la sécrétion de prolactine par l'hypophyse (Scully *et al.*, 1997).

En revanche, bien qu'il ait été montré que les souris déficientes en ER β (muté ou knockout (KO)) ont un retard de développement en raison d'une perturbation du développement et de la stéroïdogénèse ovarienne (Cheng *et al.*, 2002; Krege *et al.*, 1998), l'implication des récepteurs ER β dans le développement mammaire n'a pas été étudiée en détails à ce jour. Le faible nombre d'études disponibles propose une implication d'ER β dans la différenciation terminale de la glande durant la grossesse et plus particulièrement dans l'adhésion cellulaire et l'organisation tissulaire. En effet, les souris ER β -KO sécrètent moins de matrice extracellulaire et de lame basale que les souris sauvages. Cela est associé à une réduction des niveaux d'expression des protéines des

jonctions cellulaires (E-cadhérine, connexine 32, occludine, zonula occludens et intégrine (Forster *et al.*, 2002). L'expression d'ER β augmente avec la parité (Dall *et al.*, 2018) et les souris ER β -KO présentent une augmentation de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules luminales mutées (Forster *et al.*, 2002). Ainsi, il a été proposé qu'ER β contribuerait à une réduction du risque de cancer du sein chez les femelles multipares en facilitant la différenciation terminale de la glande mammaire (Forster *et al.*, 2002).

1.1.1.7 La progestérone

La progestérone (P4) est également une hormone stéroïdienne sécrétée par les ovaires sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Hiller-Sturmhofel & Bartke, 1998). Elle possède deux isoformes de récepteurs nucléaires, PR-A (forme courte) et PR-B (forme longue), dont l'expression est majoritairement détectée dans le compartiment épithélial des glandes mammaires (Haslam & Shyamala, 1981). L'expression génique (Hovey *et al.*, 2001) et protéique (Aupperlee *et al.*, 2005; Mote *et al.*, 2001) de PR n'est pas détectée avant la 3^{ème} semaine de vie chez la souris (Hovey *et al.*, 2001) et chez le rat (Filgo *et al.*, 2016; Kariagina *et al.*, 2007). Au niveau tissulaire, PR-A est très faiblement présent dans le noyau des cellules épithéliales mammaires des rats femelles avant la 5^{ème} semaine postnatale (Kariagina *et al.*, 2007). Son expression est maximale à la 6^{ème} semaine au moment de la puberté, puis elle diminue progressivement jusqu'à devenir indétectable durant la lactation (Kariagina *et al.*, 2007). Un faible pourcentage de cellules exprime PR-A après l'involution post-allaitement, lorsque la glande mammaire a quasi-totalement régressé (Aupperlee *et al.*, 2005; Kariagina *et al.*, 2007) (Tableau 1-1).

Chez le rat, PR-B est présent dans le noyau des cellules luminales, ainsi que dans le noyau et le cytoplasme des cellules myoépithéliales à partir de la 3^{ème} semaine de vie, puis tout au long du développement (Kariagina *et al.*, 2007). Son expression est modérée chez les femelles rats à la prépuberté, soit 21 jours après la naissance, puis augmente jusqu'à atteindre un pic lors de la gestation (Kariagina *et al.*, 2007). PR-B est présent dans le cytoplasme des cellules myoépithéliales lors de la lactation, puis redevient nucléaire pendant l'involution (Kariagina *et al.*, 2007) (Tableau 1-1). Chez l'humain, PR est exprimé à des niveaux très faibles dans l'épithélium mammaires avant la puberté (Naccarato *et al.*, 2000). Cependant à l'instar des ER, la variation de leur niveau expression au cours du développement mammaire n'est pas élucidée, au meilleur de nos connaissances.

Il a été montré que chez les souris PRKO, bien que le développement pré-pubertaire soit normal, les canaux lactifères ne subissent pas de ramification et ne se différencient pas en bourgeons alvéolaires même lorsque la progestérone est administrée aux souris préalablement ovariectomisées (Lydon *et al.*, 1995). Plus tard, des techniques d'ingénierie génétique ont permis de démontrer que PR-A et PR-B induisent des voies de signalisation différentes dans la reproduction et dans le développement des glandes mammaires (Conneely *et al.*, 2003). PR-A est nécessaire pour induire la signalisation de P4 dans le tractus génital, mais n'est pas requise pour son action trophique dans la glande mammaire (Mulac-Jericevic *et al.*, 2000). A l'opposé, l'absence de PR-B entraîne une diminution de la prolifération des cellules épithéliales, des branchements canaux, de l'alvéologénèse et de la survie des alvéoles dans les glandes mammaires (Mulac-Jericevic *et al.*, 2003; Mulac-Jericevic *et al.*, 2000). Ainsi, seule l'expression de PR-B dans l'épithélium mammaire est nécessaire pour la ramification des canaux lactifères et pour un développement lobuloalvéolaire normal.

1.1.1.8 La prolactine et l'hormone lactogène placentaire

La prolactine (PRL) est une hormone peptidique sécrétée par l'adénohypophyse, et dont le rôle principal est de stimuler la synthèse et la sécrétion de lait lors de la lactation (Hiller-Sturmhofel & Bartke, 1998). Son action est médiée par sa fixation sur ses récepteurs membranaires PRLR et l'activation de la voie *Janus Kinase 2/Signal Transducers and Activators of Transcription 5* (JAK2/STAT5), ainsi que la voie de signalisation de la Protéine Kinase B (PKB) (Briskin & Ataca, 2015; Gallego *et al.*, 2001; Neville *et al.*, 2002).

Les PRLR sont présents aussi bien dans l'épithélium que dans le stroma des glandes mammaires chez les rongeurs et leur expression varie en fonction de la période développementale (Hovey *et al.*, 2001). *Prlr* est présent de façon homogène dans l'épithélium et dans le stroma des rongeurs avant la puberté (Hovey *et al.*, 2001). À partir de la 6^{ème} semaine postnatale, l'expression de ce récepteur augmente dans le compartiment épithélial alors qu'elle devient indécélable dans le stroma (Hovey *et al.*, 2001). L'expression maximale de PRLR est détectée lors de la grossesse et de la lactation, majoritairement dans l'épithélium et reste inchangée au niveau stromal (Camarillo *et al.*, 2001).

La mutation homozygote de *Prlr* dans l'épithélium, mais pas dans le stroma (Ormandy *et al.*, 1997), conduit à une élongation et une ramification normale (Briskin *et al.*, 1999). Cependant, ces souris présentent un défaut de différenciation des bourgeons terminaux en bourgeons alvéolaires (Briskin *et al.*, 1999). L'absence de gouttelettes lipidiques, de granules

cytoplasmiques et d'expression des marqueurs associés à la production du lait, tels que β -caséine, la protéine acide de lactosérum (WAP) et la forme phosphorylée de STAT5A, traduisent également une altération de la lactogénèse (Bachelot & Binart, 2007; Brisken *et al.*, 1999). Ainsi, la présence de PRLR dans l'épithélium mammaire est nécessaire pour un développement lobulo-alvéolaire et une lactogénèse normale au cours du cycle gestation-lactation (Brisken *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que PRL agit de façon conjointe avec P4 et l'hormone placentaire lactogène pour assurer la différenciation des alvéoles et la sécrétion de lait (Neville *et al.*, 2002).

1.1.1.9 Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (TH), thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3), sont des hormones synthétisées dans la glande thyroïde à partir d'iode et de d'acides aminés de type tyrosine. Leur principal rôle est de réguler le métabolisme, la croissance et le développement (Mendoza & Hollenberg, 2017). L'action des TH est majoritairement médiée par leurs récepteurs nucléaires $THR\alpha$ et $THR\beta$ (Abel *et al.*, 1999).

Seulement un nombre limité d'études ont analysé l'expression des récepteurs aux TH dans la glande mammaire humaine et animale. $THR\alpha$ et $THR\beta$ sont présents dans le cytoplasme et le noyau des cellules épithéliales et stromales des glandes mammaires de vaches durant la lactation (Capuco *et al.*, 2008). Chez le rat, l'expression génique de *Thra1* a été détectée au cours de la puberté, l'âge adulte, la grossesse et lors de l'involution, avec une expression plus importante chez les animaux pubertaires et durant la mi-gestation (Anguiano *et al.*, 2004). Au contraire, *Thrb1* est faiblement exprimé durant la puberté et à l'âge adulte, son expression augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic durant la lactation, puis diminue au sevrage (Anguiano *et al.*, 2004). $THR\alpha$ est également présent aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules épithéliales de glandes mammaires humaines (Alyusuf *et al.*, 2014) (Tableau 1-1).

L'importance des TH dans le développement des glandes mammaires a été démontrée grâce à un modèle de souris chez lesquelles les chercheurs ont induit chimiquement soit une réduction (hypothyroïdie) ou une augmentation (hyperthyroïdie) des taux circulants de T4 (Vonderhaar & Greco, 1979). Les souris en hypothyroïdie présentent un retard d'élongation et de ramification des canaux lactifères dès 21 jours après la naissance et ce défaut de développement persiste jusqu'à 6 mois de vie (Vonderhaar & Greco, 1979). À l'opposé, il y a une augmentation du nombre de ramifications des canaux lactifères et une accélération du développement chez les souris en hyperthyroïdie (Vonderhaar & Greco, 1979). Chez ces souris, l'aspect des glandes

mammaires à 3 mois est similaire à celui des glandes de souris gestantes (Vonderhaar & Greco, 1979). Par la suite, il a été démontré que les TH participent au développement lobulo-alvéolaire et potentialisent l'action lactogène de l'hormone de croissance et de PRL et de l'hormone de croissance GH (Bhattacharya & Vonderhaar, 1979; Capuco *et al.*, 1999; Meites & Kragt, 1964). Ainsi, sans être nécessaires, T4 et la T3 participent au développement postnatal des glandes mammaires et leurs actions semblent être médiées par GH et PRL (Figure 1-5).

1.1.1.10 L'ocytocine

L'ocytocine (OT) est une neurohormone produite par le complexe hypothalamo-neurohypophysaire afin de contrôler plusieurs processus biologiques tels que la contraction utérine durant la parturition, l'éjection du lait lors de la lactation ainsi que le comportement sexuel (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Dans la glande mammaire de rongeurs et chez l'humain, OT agit sur les cellules myoépithéliales afin d'induire leur contraction et permettre l'éjection du lait. Le récepteur à OT (OTR) est exprimé dans les cellules des glandes mammaires en lactation chez le rat (Adan *et al.*, 1995), mais est également présent dans le compartiment épithélial des glandes humaines hors de la période de lactation (Kimura *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été montré qu'en plus de stimuler la contraction myoépithéliale, OT agirait sur l'épithélium afin de stimuler le transport intracellulaire des caséines (protéines du lait) dans les glandes mammaires de lapin (Lollivier *et al.*, 2006).

Tableau 1-1 : Récapitulatif des structures et des récepteurs hormonaux présents dans la glande mammaire au cours du développement

| | | Naissance | Prépuberté | Puberté | Adulte | Gestation | Lactation |
|---------------------------|------------------|-----------|------------|---------|--------|-----------|-----------|
| Développement | Canaux formés | | | | | | |
| | Lumen présent | | | | | | |
| | TEB formés | | | | | | |
| | Alvéoles formées | | | | | | |
| Expression des récepteurs | ER α | | | | | | |
| | ER β | | | | | | |
| | PRA | | | | | | |
| | PRB | | | | | | |
| | THR α | | | | | | |
| | THR | | | | | | |

L'intensité de la couleur bleue est représentative du degré de développement ou du niveau d'expression des récepteurs. La couleur grise signifie que cette information n'est pas caractérisée au meilleur de nos connaissances. Adapté de Filgo *et al.*, 2016 et d'après Alyusuf *et al.*, 2014; Anguiano *et al.*, 2004; Kariagina *et al.*, 2007 et Saji *et al.*, 2000.

1.5 Les jonctions intercellulaires : implications dans le développement mammaire

Le développement et la fonction des glandes mammaires nécessitent des interactions complexes et finement régulées entre les différents types cellulaires qui la composent. Parmi les interactions essentielles au maintien de l'homéostasie des glandes mammaires, nous nous intéresserons aux interactions cellulaires directes qui se font *via* des jonctions intercellulaires telles que les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées.

1.5.1 Jonctions communicantes ou *Gap*

Les jonctions communicantes sont des canaux protéiques qui s'établissent entre deux cellules adjacentes afin de permettre l'échange direct de composés cytoplasmiques sans transiter par le milieu extérieur (Aasen *et al.*, 2016) (Figure 1-7). Chacune des cellules participant à la jonction possède à sa membrane plasmique des héli-canaux jonctionnels, ou connexons, qui s'apparient avec ceux de la cellule adjacente pour former un canal fonctionnel avec la cellule adjacente (Laird, 2006; Sohl & Willecke, 2004). Ces canaux jonctionnels s'agrègent à certains endroits de la membrane plasmique, appelés plaques jonctionnelles, ce qui entraîne une dépression membranaire locale, laquelle leur donne l'appellation de jonctions « lacunaires » ou « *Gap* ». Les jonctions *gap* permettent le passage intercellulaire d'une variété de petites molécules de masse moléculaire inférieure à 1 kilodalton (kDa), telles que les seconds messagers et petits métabolites (ATP/ADP, AMPc, InsP3 etc) (Aasen *et al.*, 2016) (Figure 1-7).

Les connexons sont formés dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi par oligomérisation de six petites protéines transmembranaires, appelées connexines (Cx), avant leur translocation à la membrane plasmique (Laird, 2006) (Figure 7). L'oligomérisation de Cxs identiques ou différentes conduit à la formation de connexons (Goodenough *et al.*, 1996). Les Cxs composent une famille multigénique dont l'expression varie selon les types cellulaires; différentes Cxs peuvent être exprimées dans un même type cellulaire (Laird, 2006). Il existe 20 Cxs chez la souris et 21 chez l'humain (Sohl & Willecke, 2003; Sohl & Willecke, 2004).

Au niveau moléculaire, les Cxs possèdent deux boucles extracellulaires (EL-1 et EL-2), quatre domaines transmembranaires (MT1 à MT4), une boucle cytoplasmique (CL), ainsi que les domaines C-terminal (CT) et N-terminal (NT) exposés à la face interne du cytoplasme (Laird, 2006) (Figure 1-7). Elles diffèrent entre elles principalement par la variation de la séquence et de la taille de leur domaine CT (Goodenough *et al.*, 1996) et leur nomenclature est déterminée à l'aide de leur masse moléculaire en kDa (Beyer *et al.*, 1990). Les Cxs sont ainsi nommées par le préfixe Cx suivi de leur masse moléculaire (Beyer *et al.*, 1990).

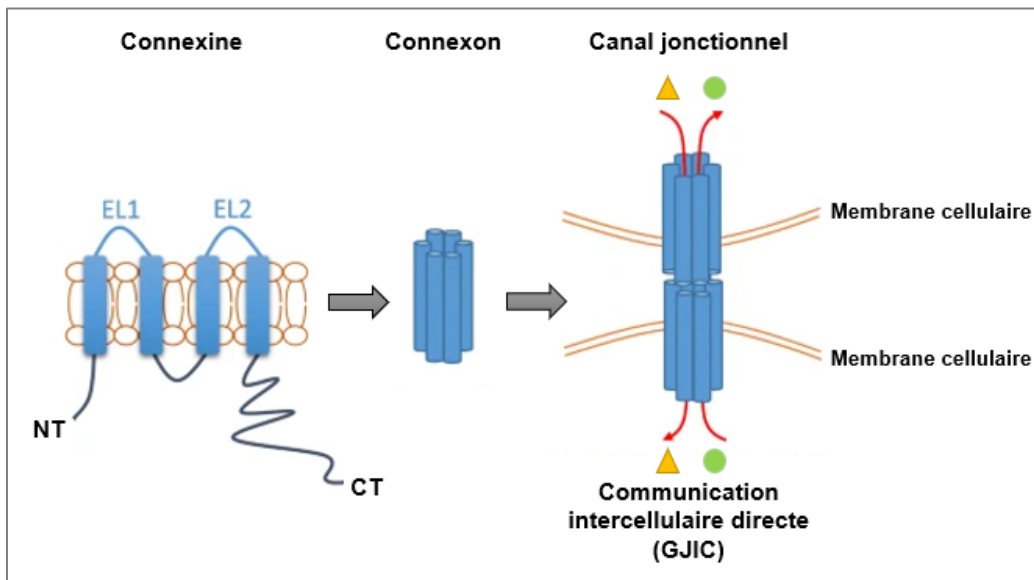


Figure 1-7 : Représentation schématique des connexines, connexons et des jonctions communicantes

Les connexons sont formés à la suite de l'assemblage de six connexines dans le milieu intracellulaire. Ceux-ci sont transloqués à la membrane plasmique où ils s'apparient avec des connexons présents à la surface des cellules adjacentes pour former des canaux jonctionnels (CJs). Les CJs assurent une communication directe entre les cytoplasmes des cellules adjacentes et plusieurs CJs forment une jonction communicante ou jonction *Gap*. Adapté de Wu & Wang, 2019.

La formation, la fonction, la sélectivité et la dégradation des jonctions *gap* est un processus dynamique qui est régulé par plusieurs stimuli dont la variation du pH, du potentiel membranaire et la phosphorylation des Cxs (Laird, 2006; Lampe & Lau, 2004).

1.1.1.11 Importance de la phosphorylation des connexines dans la régulation des GJs

L'importance de la phosphorylation dans la régulation du cycle de vie des Cxs et dans la fonction des jonctions *gap* a été étudiée en profondeur pour Cx43 en raison de son expression ubiquitaire. La phosphorylation des Cxs a été associée à la régulation de la communication

cellulaire en agissant sur plusieurs étapes du cycle de vie des Cxs dont leur oligomérisation, transport, assemblage et désassemblage ainsi que leur endocytose (Johnson *et al.*, 2013; Kwak & Jongsma, 1996; Lampe & Lau, 2004; Lin *et al.*, 2001; Moreno & Lau, 2007; Musil & Goodenough, 1991a; Postma *et al.*, 1998; Puranam *et al.*, 1993; Saez *et al.*, 1998; Solan & Lampe, 2005; Zhou *et al.*, 1999). La phosphorylation régule aussi la taille des jonctions *gap*, les interactions protéiques au sein de celles-ci (Duffy *et al.*, 2004; Toyofuku *et al.*, 2001), ainsi que le cycle cellulaire (Duflo-Dancer *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2002; Kardami *et al.*, 2007; Krutovskikh *et al.*, 2000; Moorby & Patel, 2001; Solan *et al.*, 2002; Solan & Lampe, 2005). Pour la plupart des Cxs, la région CT est le site primaire de phosphorylation (Aasen *et al.*, 2018; Berthoud *et al.*, 1997; Traub *et al.*, 1989). Cx43 est phosphorylée par plusieurs kinases dont AKT/PKB (Park *et al.*, 2007), MAP (Warn-Cramer *et al.*, 1996), PKC (Bao *et al.*, 2004; Ek-Vitorin *et al.*, 2006; Lampe *et al.*, 2000; Saez *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 2002) et PKA (Lampe & Lau, 2004; Shah *et al.*, 2002).

Des expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et à l'aide de marqueurs radioactifs ont permis de démontrer que Cx43 possède plusieurs isoformes électrophorétiques dont des isoformes pas ou peu phosphorylés (Musil *et al.*, 1990; Solan *et al.*, 2003) (NP) et des isoformes plus phosphorylés (P1- P2, ou p-Cx43) qui généralement retrouvés dans les jonctions membranaires dans les cellules (Musil & Goodenough, 1991b; Solan & Lampe, 2009).

1.1.1.12 Expression et rôle des Cxs dans la glande mammaire

Cx43, Cx30, Cx32 et Cx26 sont retrouvées dans la glande mammaire des rongeurs et leur expression, leur rôle et leur fonction ont été bien caractérisés chez les souris (Dianati *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2007; Locke *et al.*, 2000; Locke *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 1994; Pozzi *et al.*, 1995; Talhouk *et al.*, 2005). Chez l'humain, Cx43 ainsi que Cx26 y sont également exprimées (Lee *et al.*, 1992; Monaghan *et al.*, 1996; Pozzi *et al.*, 1995; Wilgenbus *et al.*, 1992). Cependant, la présence de Cx30 et Cx32 est controversée (Teleki *et al.*, 2014).

Chez la souris, Cx43 est principalement exprimée dans la couche myoépithéliale, mais aussi entre les cellules myoépithéliales et luminales, entre les cellules luminales et dans le stroma (Dianati *et al.*, 2016; Talhouk *et al.*, 2005). C'est la principale Cx exprimée dans les glandes mammaires de souris tout au long du développement (Dianati *et al.*, 2016). Cx32, Cx30 et Cx26 sont présentes entre les cellules épithéliales luminales et leur expression varie en fonction du stade de développement (Dianati *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2000; Monaghan *et al.*, 1994; Plante & Laird, 2008; Pozzi *et al.*, 1995). Cx26 et Cx30 sont exprimées à partir de la mi-gestation et

durant la lactation, alors que l'expression de Cx32 ne commence qu'après la parturition et perdure pendant la lactation (Dianati *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2007; Locke *et al.*, 2000; Locke *et al.*, 2004; McLachlan *et al.*, 2007; Monaghan *et al.*, 1994; Talhouk *et al.*, 2005).

L'importance de Cx43 dans le développement des glandes mammaires a été montrée chez les souris portant une mutation autosomale dominante du gène *Gja1* (*Gja1^{Jrt/+}*) codant pour Cx43, entraînant une diminution de plus de 50% du taux de Cx43 (Flenniken *et al.*, 2005; Plante & Laird, 2008) et une réduction supérieure à 70% de p-Cx43 (Plante & Laird, 2008). Cette diminution des niveaux de Cx43 résulte en une réduction de la communication intercellulaire *via* les jonctions *gap* (*gap junctional intercellular communication* ou *GJIC*) entre les cellules myoépithéliales *in vitro* et en un retard du développement postnatal global des glandes mammaires. Les animaux ont des glandes mammaires plus petites avec des canaux plus courts et une diminution du nombre de TEB à la prépuberté et à la puberté (Plante & Laird, 2008). Le nombre de jonctions *gap* est diminué à la parturition et les souris sont incapables d'allaiter, dû à une déficience d'éjection du lait (Plante & Laird, 2008; Plante *et al.*, 2010).

La mutation conditionnelle du gène *Gjb2* codant pour Cx26 a permis de préciser son implication dans le développement mammaire. La perte conditionnelle de Cx26 avant la puberté entraîne un défaut du développement alvéolaire, une dégénérescence des alvéoles durant la gestation et un défaut d'allaitement (Bry *et al.*, 2004). Cependant, lorsque *Gjb2* est muté après la mi-gestation, aucun défaut de développement n'est observé (Bry *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2014). Ainsi, la présence de Cx26 est essentielle durant les phases précoces du développement alvéolaire, mais pas à l'élongation canalaire durant la puberté ou pendant les phases finales de l'alvéologénèse (Bry *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2014).

Finalement, il a été proposé que Cx32 et Cx30 ne sont pas indispensables au développement et à la fonction des glandes mammaires car les souris portant une forme inactive de *Gjb1* (Cx32) (Bry *et al.*, 2004) ou ayant une diminution significative de l'expression de l'expression de Cx30 (Stewart *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2015a) ne présentent aucune anomalie développementale, ni fonctionnelle.

1.5.2 Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes ont pour rôle principal d'assurer l'adhésion cellulaire, mais elles contribuent également à la polarisation des cellules, à la signalisation intracellulaire et à la régulation transcriptionnelle (Cavallaro & Christofori, 2004; Hartsock & Nelson, 2008). Elles sont formées à la suite de l'interaction homophilique et calcium-dépendante de deux homodimères de

protéines transmembranaires, les cadhérines, à raison d'un dimère par cellule adjacente. Au niveau cytoplasmique, l'homodimère de cadhérines est amarré au cytosquelette par des protéines d'ancrage appelées caténines (p-120 caténine, β -caténine, et α -caténine) (Cavallaro & Christofori, 2004; Hartsock & Nelson, 2008) (Figure 1-8).

Les caténines sont des protéines cytoplasmiques associées aux cadhérines dans les jonctions adhérentes et qui permettent leur liaison au cytosquelette d'actine (Hartsock & Nelson, 2008) (Figure 1-8). β -caténine, en plus de son rôle de protéine d'ancrage, joue un rôle de facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation canonique des facteurs Wnt (Incassati *et al.*, 2010b). Il existe au moins deux fractions de β -caténine qui jouent des rôles distincts : une fraction membranaire qui est associée avec E-cadhérine et impliquée dans les jonctions adhérentes (Gottardi *et al.*, 2001), ainsi qu'une fraction cytoplasmique pouvant être transloquée dans le noyau et participer à la signalisation de la voie canonique Wnt (Polakis, 2007).

L'interaction de β -caténine membranaire avec E-cadhérine ainsi que l'accumulation et la fonction transcriptionnelle de sa fraction cytoplasmique sont toutes les deux régulées par plusieurs mécanismes, dont la phosphorylation (Daugherty & Gottardi, 2007). La phosphorylation sur les résidus serine (ser) 834, ser836 et ser842 augmente l'interaction de β -caténine avec les cadhérines (Choi *et al.*, 2006; Huber & Weis, 2001), alors que sa phosphorylation sur Tyr654 prévient son interaction avec E-cadhérine (Huber & Weis, 2001). La fraction cytoplasmique de β -caténine est également continuellement régulée *via* une cascade de phosphorylation sur ses résidus (Ser), thréonine (Thr) et tyrosine (Tyr) (Daugherty & Gottardi, 2007). En condition basale, la fraction cytoplasmique de β -caténine interagit avec un complexe multiprotéique comprenant, en autres, la protéine adénomateuse de polypose Coli (APC), l'axine et la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), qui contrôle son accumulation cytoplasmique (Ikeda *et al.*, 1998; Polakis, 2007). La phosphorylation du résidu sérine 45 (Ser45) de β -caténine par la Caséine Kinase α (CK1 α), suivie de la phosphorylation de Ser33, Ser37 et de la thréonine 41 (Thr41) par la Glycogène synthase Kinase 3 β (GSK3 β), entraînent l'ubiquitinylation et la dégradation de β -caténine dans le protéasome (Liu *et al.*, 2002; Yost *et al.*, 1996). En revanche, l'activation de la voie Wnt inhibe GSK3 β et entraîne la phosphorylation de β -caténine par PKA sur Ser675, ce qui empêche sa dégradation, et induit sa translocation nucléaire (Hino *et al.*, 2005; Spirli *et al.*, 2013; Taurin *et al.*, 2006). Une fois dans le noyau, β -caténine interagit avec le facteur de transcription *T-cell factor/Lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) et module la transcription de gènes cibles, majoritairement impliqués dans le contrôle Wnt-dépendant de la prolifération et l'apoptose (Daugherty & Gottardi, 2007; Incassati *et al.*, 2010b). p120-caténine régule la solidité des

jonctions adhérentes en assurant la stabilité des cadhérines à la membrane plasmique (McEwen *et al.*, 2012) alors qu' α -caténine maintient la liaison du complexe jonctionnel au cytosquelette (Yamada *et al.*, 2005).

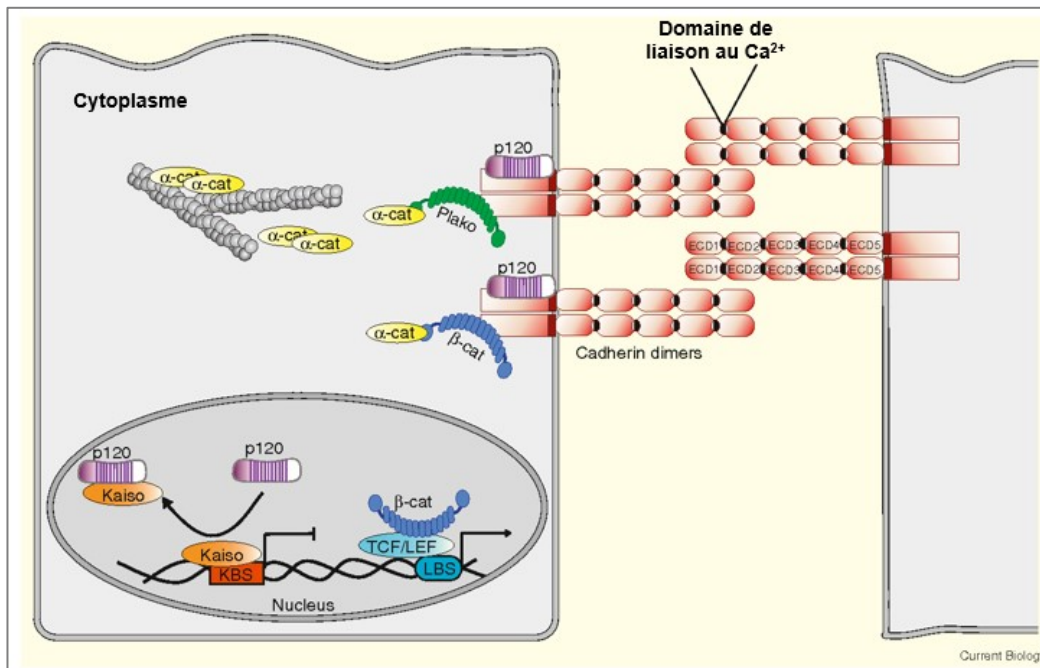


Figure 1-8 : Représentation schématique des jonctions adhérentes dans l'épithélium mammaire

Les jonctions adhérentes s'établissent à la suite de l'association homophile et calcium dépendante de deux homodimères de cadhérines. Celles-ci sont ancrées au cytosquelette grâce aux interactions cadhérines/caténines. Les jonctions adhérentes jouent un rôle essentiel dans l'adhésion mais aussi dans la signalisation cellulaire via l'activité transcriptionnelle de β -caténine. Adapté de (Rudini & Dejana, 2008).

1.1.1.13 Expression et rôle des jonctions adhérentes dans la glande mammaire

1.1.1.1.1 Les cadhérines

Plusieurs cadhérines, dont E-, N-, P, et R-cadhérine, sont retrouvées dans la glande mammaire (Andrews *et al.*, 2012), mais l'expression d'E-cadhérine dans l'épithélium mammaire est la mieux décrite (Andrews *et al.*, 2012). Elle est exprimée dans la plupart des cellules épithéliales mammaires depuis les premiers stades embryonnaires jusqu'à l'âge adulte (Shamir & Ewald, 2015) et détectée de façon abondante dans les cellules du corps des TEB à la puberté (Andrews *et al.*, 2012; Daniel *et al.*, 1995). Les expériences pionnières de Daniel et de ses collaborateurs ont permis de mieux comprendre le rôle d'E-cadhérine dans le développement

mammaire. Chez les souris, la neutralisation d'E-cadhérine grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques, libérés dans les glandes mammaires à l'aide d'implants *in situ*, conduit à une perte d'adhésion et à la mort des cellules épithéliales luminales (Daniel *et al.*, 1995). La surexpression d'une forme tronquée d'E-cadhérine, ne possédant pas de domaine extracellulaire, conduit à un développement alvéolaire précoce dans les glandes de souris vierges sans entrainer de défauts histologiques apparents. Cependant, cela conduit à une altération de l'adhésion, de la polarité cellulaire, ainsi que de la membrane basale durant la lactation (Delmas *et al.*, 1999). Une autre étude a démontré qu'une mutation conditionnelle d'E-cadhérine dans l'épithélium luminal, sous le contrôle du promoteur MMTV majoritairement exprimé à partir de mi-gestation et pendant la lactation, entraîne une altération du développement et de la différenciation des alvéoles, ainsi que de la sécrétion de lait, et induit une apoptose massive durant la lactation (Boussadia *et al.*, 2002). Enfin, il a été montré qu'E-cadhérine est également essentielle à une morphogenèse normale durant la puberté. Alors que les cellules non-mutées forment des embranchements et des structures semblables aux canaux en cours de formation et aux alvéoles lorsqu'elles sont cultivées dans une matrice (culture organotypique en 3D), les cellules déficientes pour E-cadhérine (E-Cad⁻) en sont incapables (Shamir *et al.*, 2014). De plus, en utilisant la technique de transplantation orthotopique qui permet de reformer un arbre épithélial *de novo* dans le stroma de souris receveuses ayant préalablement été dépourvue de leur épithélium (Deome *et al.*, 1959), il a été montré que seules les cellules E-Cad⁺ permettent de reformer des TEB et un arbre épithélial *in vivo*, alors que les cellules E-Cad⁻ sont exclues de ces structures et ne participent pas à la morphogenèse (Shamir *et al.*, 2014).

P-cadhérine est impliquée dans la formation des jonctions adhérentes de la couche basale de l'épithélium mammaire (Andrews *et al.*, 2012; Daniel *et al.*, 1995). Elle est retrouvée dans les cellules de la coiffe du bourgeon et dans les cellules myoépithéliales des canaux chez l'adulte (Daniel *et al.*, 1995; Nose & Takeichi, 1986; Radice *et al.*, 2003). La neutralisation de P-cadhérine à l'aide d'anticorps spécifiques entraîne une désorganisation de la couche myoépithéliale dans les glandes mammaires murines (Daniel *et al.*, 1995). Par ailleurs, la mutation homozygote de P-cadhérine conduit à une différenciation précoce des alvéoles chez les souris vierges, et à une hyperplasie de l'épithélium mammaire plus tard à l'âge adulte (Radice *et al.*, 1997).

Enfin, N-cadhérine est exprimée dans le compartiment stromal (Andrews *et al.*, 2012) et son expression ectopique dans les cellules épithéliales de cancer du sein MCF-7 est associée à une augmentation de la motilité et de l'invasion cellulaire (Hazan *et al.*, 1997; Hazan *et al.*, 2000).

1.1.1.1.2 Les caténines

Dans la glande mammaire normale, β -caténine est associée aux cadhérines dans les jonctions adhérentes à la membrane plasmique, et seulement une faible proportion est présente dans le cytoplasme (Incassati *et al.*, 2010b; Polakis, 2007). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle important durant la plupart des étapes de la morphogénèse des glandes mammaires (Cowin & Wysolmerski, 2010; Kessenbrock *et al.*, 2017). Elle est aussi bien requise pour la spécification des lignes de lait, le développement des placodes durant la vie embryonnaire (Chu *et al.*, 2004; Hens *et al.*, 2009; Hens *et al.*, 2007; Lindvall *et al.*, 2006; Lindvall *et al.*, 2009), la formation des bourgeons terminaux, l'extension et la ramification des canaux à la puberté (Badders *et al.*, 2009; Lindvall *et al.*, 2006; Lindvall *et al.*, 2009), que pour une alvéologenèse normale (Hsu *et al.*, 2001; Tepera *et al.*, 2003b). Par conséquent, la dérégulation de l'expression et de la signalisation de β -caténine conduit à une plusieurs effets, tels que l'altération du développement embryonnaire, un défaut ou une accélération du développement des glandes mammaires à la puberté, à l'âge adulte et pendant la gestation, ainsi qu'à un défaut de lactation.

1.5.3 Jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des jointures protéiques qui s'établissent au pôle apical de deux cellules épithéliales adjacentes (Itoh & Bissell, 2003). Elles assurent principalement deux fonctions. Tout d'abord, elles empêchent le passage des protéines entre le pôle apical et basolatéral, assurant ainsi la polarité cellulaire. Ensuite, elles forment une barrière semi-perméable qui maintient l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires tout en permettant le passage paracellulaire de petites molécules telles que les ions et les solutés (Hartsock & Nelson, 2008; Lee *et al.*, 2018). Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires, l'occludine et les claudines, qui sont rattachées au cytosquelette par des protéines cytoplasmiques, telles que les Zonula Occludens (ZO). Elles contiennent également des protéines jonctionnelles d'adhésion (*Junctional Adhesion molecule* ou JAMs) qui facilitent la polarisation cellulaire et la localisation des ZO et d'occludine aux points de contacts cellulaires (Hartsock & Nelson, 2008) (Figure 1-9).

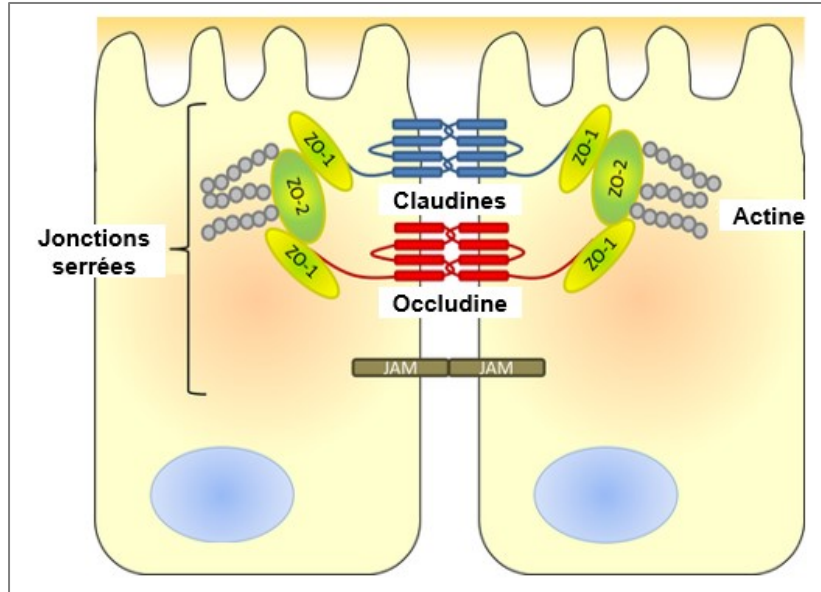


Figure 1-9 : Représentation schématique des jonctions serrées dans la glande mammaire

Les jonctions serrées sont formées à la suite de l'assemblage entre une occludine, des claudines et des protéines adaptatrices (JAMs) entre deux cellules adjacentes. Elles assurent le maintien de la polarité des cellules et de l'homéostasie au sein de l'épithélium mammaire. Adapté de (Collins *et al.*, 2017).

1.1.1.14 Expression et rôle des jonctions serrées dans la glande mammaire

Il existe 24 claudines (Cldns) parmi lesquelles Cldn-1, -3, -4, -7 et -8 ont été identifiées dans les glandes mammaires murines, et leur expression varie selon le stade de développement (Baumgartner *et al.*, 2017; Blackman *et al.*, 2005; Dianati *et al.*, 2016; Stelwagen & Singh, 2014). Le niveau protéique de Cldn-1 reste stable tout au long du développement mammaire (Baumgartner *et al.*, 2017; Dianati *et al.*, 2016). Ceux de Cldn-3 et 7 sont stables durant le développement pré-gestationnel, augmentent fortement pendant la gestation et la lactation, et diminuent ensuite aux niveaux initiaux (Blackman *et al.*, 2005; Dianati *et al.*, 2016). L'expression protéique de Cldn-4 est beaucoup plus variable et est caractérisée par des pics à la puberté, à la mi-gestation et durant l'involution (Dianati *et al.*, 2016). Enfin, l'expression génique de *Cldn-8* augmente au début de la gestation, puis diminue pendant l'involution (Baumgartner *et al.*, 2017).

Durant la lactation, les jonctions serrées forment une barrière imperméable entre les lactocytes afin de prévenir l'écoulement du lait hors de l'épithélium (Itoh & Bissell, 2003; Nguyen & Neville, 1998). Cependant, celles-ci perdent leur étanchéité au moment du sevrage, lorsque le lait s'accumule dans les unités lobulo-alvéolaires (Nguyen & Neville, 1998). La perte des jonctions serrées est associée à un défaut de sécrétion du lait (Itoh & Bissell, 2003; Nguyen & Neville, 1998; Stelwagen & Singh, 2014) et à une involution précoce (Fischer *et al.*, 2007).

Notre laboratoire récemment démontré que les protéines des jonctions communicantes, adhérentes et serrées résident au sein de nexus jonctionnels et que leurs interactions varient en fonction du stade de développement des glandes mammaires murines (Dianati *et al.*, 2016). Ces observations sont soutenues par des études antérieures montrant que les Cxs s'associent en jonctions (Locke *et al.*, 2000) dont la sélectivité varie au moment de la lactation (Locke *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré que le recrutement d' α - et β -caténine et de ZO-2 dans les jonctions communicantes stimule la *GJC* ainsi que la différenciation fonctionnelle des cellules épithéliales mammaires *in vitro* (Talhouk *et al.*, 2008).

Sachant que le développement mammaire est finement régulé par les hormones, cela laisse supposer qu'à l'instar de plusieurs tissus, l'expression, la fonction et les interactions des protéines jonctionnelles pourraient être régulées par les hormones au cours du développement mammaire.

1.6 Régulation endocrine des jonctions intercellulaires

L'expression, la fonction et l'assemblage des protéines jonctionnelles sont régulées aussi bien au niveau génique qu'au niveau protéique par des mécanismes impliquant plusieurs acteurs, dont des facteurs de transcription, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), les rétinoïdes, des modificateurs post-traductionnelles et des hormones (Balda & Matter, 2009; Bertocchi *et al.*, 2012; Firestone & Kapadia, 2014; Meng & Takeichi, 2009; Oyamada *et al.*, 2005). Parmi ces facteurs, nous nous intéresserons particulièrement au rôle des hormones.

1.6.1 Les hormones gonadiques et gonadotropes

E2 et P4 sont impliquées dans la régulation des jonctions adhérentes, communicantes et serrées dans plusieurs tissus aussi bien chez l'humain que chez les modèles expérimentaux. P4 inhibe l'expression de Cx43 dans le myomètre de rats gestantes, ce qui entraîne une diminution de sa contractilité, alors qu'E2 en stimule l'expression (Petrocelli & Lye, 1993). Ainsi, l'augmentation du ratio E2/P4 promeut l'expression de Cx43 et la contraction du myomètre durant la parturition chez le rat (Lye *et al.*, 1993a). Chez l'humain, cette régulation différentielle des Cxs par les stéroïdes a également été observée pour Cx43 dans le myomètre (Chow & Lye, 1994a) et pour Cx26 et Cx32 dans l'endomètre (Saito *et al.*, 1997). De façon similaire, l'expression de Cx26 est stimulée par E2, mais inhibée par P4 dans l'endomètre de rat (Grummer *et al.*, 1994; Grummer *et al.*, 1999a). Il a également été montré que P4 contrôle l'expression de CLDN-4 et d'occludine dans l'épithélium utérin des rats gestantes, ce qui contribue à créer un environnement plus réceptif à l'implantation du blastocyte (Nicholson *et al.*, 2010). E2 est également impliquée dans la régulation de Cx32 dans le foie de rat (Plante *et al.*, 2002). LH et FSH affectent la formation et la fonction des jonctions *gap* dans plusieurs tissus *in vitro* et *in vivo* (El-Hayek & Clarke, 2015; Gilula *et al.*, 1978; Kalma *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 1981). Enfin, la diminution des taux circulants de P4 en fin de gestation est essentielle à la fermeture des jonctions serrées dans la glande mammaire de souris, lors que processus de préparation pour la lactation (Nguyen & Neville, 1998; Nguyen *et al.*, 2001).

Les hormones stéroïdiennes jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'intégrité des jonctions adhérentes. E2 perturbe l'adhésion des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines *in vitro* (Groten *et al.*, 2005; Groten & Schnaper, 2003) et altère les jonctions adhérentes dans les cellules somatotropes GH3 de rat *via* un effet négatif sur l'expression génique et protéique de N-cadhérine et β -caténine *in vitro* (Heinrich *et al.*, 1999). L'administration de P4 à des brebis gestantes entraîne une diminution de l'expression protéique d'E-cadhérine et

de β -caténine dans l'épithélium glandulaire et cela contribuerait à faciliter l'implantation du *conceptus* (Satterfield *et al.*, 2007). Enfin, il a été montré que FSH régule l'organisation des jonctions adhérentes dans les cellules de Sertoli *in vitro* et *in vivo* (Sluka *et al.*, 2006).

1.6.2 Les hormones thyroïdiennes, la prolactine et les glucocorticoïdes

À l'instar d'E2, les TH stimulent l'expression génique et protéique de Cx43, ainsi que la *GJC* dans la lignée épithéliale hépatique de rat B-F344 *in vitro* (Stock *et al.*, 1998), vraisemblablement par une liaison directe à un élément de réponse dans le promoteur de *Gja1* (Stock & Sies, 2000). Au niveau des jonctions adhérentes, il a été montré que T3 stimule l'expression hépatique d'E-cadhérine et de β -caténine au cours de la morphogénèse de la larve de têtard *Rhinella arenarum* (Izaguirre & Casco, 2010). T3 induit la phosphorylation PKA-dépendante de β -caténine sur Ser765, ce qui résulte en l'augmentation de son activité transcriptionnelle et la prolifération des hépatocytes de rat *in vivo* et *in vitro* (Fanti *et al.*, 2014). Les auteurs ont également montré que β -caténine est essentielle à l'activité mitogénique de T3 (Fanti *et al.*, 2014). La signalisation des TH joue aussi un rôle important dans la morphogénèse intestinale *via* leur implication dans la régulation de la voie canonique Wnt/ β caténine (Kress *et al.*, 2009; Plateroti *et al.*, 2006). Enfin, les TH auraient un rôle permissif dans la régulation du transport paracellulaire dans le tube rénal chez le rat (Matty & Green, 1964).

L'activation de voie de signalisation de PRL contribue à réguler la fermeture des jonctions serrées dans l'épithélium des glandes mammaires durant la lactation (Nguyen *et al.*, 2001), et l'effet positif de PRL sur la formation de ces jonctions est potentialisé en présence de glucocorticoïdes (Stelwagen & Singh, 2014).

1.7 Le cancer du sein

1.7.1 Définition et épidémiologie

Le mot *cancer* signifiant crabe en latin, a été pour la première fois utilisé par Hippocrate (460-377 avant J-C) pour décrire la forme des tumeurs du sein en raison de leur similitude avec la morphologie de cet animal lorsqu'elles s'étendent dans le tissu. Plus tard, Gallien (131-201 après J-C) reporta « *De même que chez cet animal il existe des pattes des deux côtés du corps, de même, dans cette affection, les veines étendues sur cette tumeur contre nature présentent une forme semblable à celle d'un crabe* » (In Galien, "de la méthode thérapeutique, à Glaucon, livre II.").

Le cancer du sein est la forme de cancer la plus répandue chez la femme au Canada à l'exclusion des cancers de la peau, autres que le mélanome (Brenner *et al.*, 2020a; Société canadienne du cancer, 2020). C'est la deuxième principale cause de décès par cancer chez les canadiennes, après le cancer du poumon et des bronches. Selon les statistiques de la société canadienne du cancer, en 2020 une canadienne sur huit sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie et une femme sur trente-trois en mourra (Brenner *et al.*, 2020b).

1.7.2 La cancérogenèse du sein

L'une des représentations les plus simplifiées du processus de cancérogenèse est un modèle triphasique constitué d'étapes d'initiation, de promotion et de progression tumorale (Ito *et al.*, 1995). L'initiation, caractérisée par une altération irréversible du génome, héréditaire ou sporadique (Hahn & Weinberg, 2002; Hayflick, 1997; Ito *et al.*, 1995; Kinzler & Vogelstein, 1998) serait suivie par l'étape de promotion tumorale, au cours de laquelle une partie des cellules initiées subit une expansion clonale sélective afin de constituer une sous-population tumorale dominante (Greaves & Maley, 2012). Ces cellules progressent ensuite vers un phénotype malin caractérisé, entre autres, par une déperdition de l'adhésion entre les cellules épithéliales qui résulte d'une transition épithélio-mésenchymateuse (Epithelial to mesenchymal transition ou EMT) non développementale (Kalluri & Weinberg, 2009). Au cours de l'EMT, les cellules épithéliales perdent progressivement leur phénotype épithélial au profit de caractéristiques mésenchymateuses (Kalluri & Weinberg, 2009) et acquièrent une capacité de migration, mais aussi d'invasion métastatique (Gupta & Massague, 2006; Klein, 2009).

Bien que ce modèle triphasique permette de conceptualiser la cancérogenèse de façon simplifiée, il est bien admis que la formation d'un cancer est un processus bien plus complexe qui implique des mécanismes et facteurs encore inconnus à ce jour (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). Hanahan et Weinberg ont proposé dix caractéristiques que peuvent acquérir les cellules au cours du développement tumoral, permettant ainsi de rationaliser les complexités des maladies néoplasiques. Ces caractéristiques sont : (1) l'autosuffisance en signaux prolifératifs, (2) l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, (3) l'échappement du système immunitaire, (4) un potentiel de division illimité, (5) la capacité à induire une inflammation locale, (6) l'invasion cellulaire et la diffusion métastatique, (7) l'angiogenèse, (8) l'instabilité génomique, (9) la résistance à l'apoptose et (10) une perturbation du métabolisme cellulaire (Hanahan & Weinberg, 2011). L'acquisition de ces caractéristiques serait subséquente à et/ou générée majoritairement par l'instabilité génomique et par l'inflammation (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.7.3 Implication des jonctions intercellulaires dans la cancérogenèse

1.1.1.15 Jonctions communicantes

Les Cxs ont été initialement décrites comme suppresseurs de tumeurs dans les cellules épithéliales mammaires humaines 76N par les études pionnières de Lee et collaborateurs (Lee *et al.*, 1991). Par la suite, plusieurs études, aussi bien sur les tissus de cancers du sein humain que sur des modèles expérimentaux, ont montré une association entre la diminution des niveaux d'expression des Cxs et les premiers stades du cancer (Kanczuga-Koda *et al.*, 2005; Laird *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1992; Singal *et al.*, 2000; Wilgenbus *et al.*, 1992). Il a été suggéré que Cx26 et Cx43 participent à l'inhibition de la progression de la tumeur vers le stade métastatique (Hirschi *et al.*, 1996; Momiyama *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2002). En revanche, des études subséquentes ont suggéré que les Cxs pourraient également favoriser la cancérogenèse. Jamieson et collaborateurs ont montré que plus d'un tiers des cancers du sein invasifs étudiés présentent une augmentation de l'expression de Cx26 et Cx43 (Jamieson *et al.*, 1998). De même, il a été montré que les cellules métastatiques d'adénocarcinomes invasifs de rat forment plus de jonctions communicantes avec les cellules endothéliales *in vitro* comparativement aux cellules peu métastatiques (Elsabban & Pauli, 1991). Plus tard, il a été montré que la surexpression de Cx43 dans les cellules HBL100 *GJIC*-déficientes conduit à une augmentation de la formation de jonctions communicantes hétérocellulaires fonctionnelles avec les cellules endothéliales humaines HMVECs et à une augmentation de leur diapédèse. Cette stimulation de la migration trans-endothéliale est inhibée en présence d'une forme mutée de Cx43 et/ou d'un inhibiteur de *GJIC* (Pollmann *et al.*, 2005). Le rôle des Cxs dans le cancer du sein serait donc stade-dépendant (Naus & Laird, 2010). De plus, notre laboratoire a récemment démontré que le rôle de Cx43 dans les tumeurs du sein est bien plus complexe et dépend aussi du sous-type moléculaire du cancer (Busby *et al.*, 2018).

1.1.1.16 Jonctions adhérentes

La mutation ou la perte d'expression d'E-cadhérine a été détectée au cours de la cancérogenèse et de la progression métastatique de plusieurs tissus épithéliaux et il est bien admis qu'E-cadhérine possède des propriétés anti-cancéreuses et anti-métastatiques dans la plupart des cancers, dont celui du sein (Birchmeier, 1995; Birchmeier & Behrens, 1994; Gamallo *et al.*, 1993; Gottardi *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 1993; Palacios *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2001). Il a été démontré qu'au cours de la progression tumorale, les cellules luminales perdent l'expression d'E-cadhérine et commencent à exprimer la cadhérine stromale N-cadhérine (Hazan

et al., 2000; Nagi *et al.*, 2005; Nieman *et al.*, 1999). Ces changements interviennent au cours de l'EMT et sont associés à une augmentation de la capacité migratoire et invasive des cellules (Hazan *et al.*, 2000). De façon cohérente, la perte d'expression d'E-cadhérine dans les cancers du sein est un marqueur biochimique d'agressivité et est associée à un mauvais pronostic clinique (Li *et al.*, 2017; Younis *et al.*, 2007). À l'opposé, dans le cas de P-cadhérine c'est sa surexpression qui est associée à un mauvais pronostic clinique du cancer du sein (Gamallo *et al.*, 2001; Kovacs *et al.*, 2003; Kovacs & Walker, 2003; Palacios *et al.*, 1995; Paredes *et al.*, 2005; Paredes *et al.*, 2002; Soler *et al.*, 1999).

L'expression d'une forme stabilisée de β -caténine dans les cellules luminales de glandes mammaires de souris conduit à une alvéologénèse précoce, une hyperplasie mammaire et à un développement de tumeurs mammaires à l'âge adulte (Imbert *et al.*, 2001; Michaelson & Leder, 2001; Ridgeway *et al.*, 2006; Teissedre *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré que la diminution du niveau de β -caténine liée à E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes dans les tissus cancéreux humains et son accumulation dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau est corrélée à un mauvais pronostic clinique (Dolled-Filhart *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2000; Ozaki *et al.*, 2005).

1.1.1.17 Les jonctions serrées

Des études génétiques ont montré que l'expression de *Cldn-1* (Tokes *et al.*, 2005) et *Cldn-7* (Kominsky *et al.*, 2003) est significativement réduite dans certains tissus cancéreux mammaires humains. La perte d'expression des *Cldn-3*, *-4* et *-7* représente une caractéristique importante du sous-type de cancer du sein « *claudin-low* » (Prat *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que la localisation de ZO-1 dans les jonctions serrées, est significativement réduite dans les tissus de cancers du sein peu différenciés chez l'humain (Hoover *et al.*, 1998).

1.7.4 Les facteurs de risques du cancer du sein

Bien que la description la plus ancienne du cancer remonte à l'antiquité, l'étiologie de cette pathologie n'est pas totalement élucidée à ce jour. Il est admis que la formation du cancer du sein est d'origine multifactorielle (Ataollahi *et al.*, 2015; Paduch, 2015; Sun *et al.*, 2017) avec des facteurs internes, inhérents à l'individu, mais aussi à des composantes externes, liées aux habitudes de vie, au régime alimentaire et à l'environnement (Sun *et al.*, 2017).

1.1.1.18 Facteurs internes génétiques

L'origine génétique: Entre cinq et dix pourcents des cancers du sein auraient une origine héréditaire (Greene, 1997; Wideroff *et al.*, 2005). Dans ces cas, la cancérogenèse est généralement la résultante de mutations dans des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire, dont les plus importants sont *Breast cancer associated gene 1* et 2 (BRCA1/2) (Chappuis *et al.*, 2000; Deng, 2006; Foulkes *et al.*, 2004; Kuchenbaecker *et al.*, 2017), *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Ali & Wendt, 2017; Appert-Collin *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2014; Elizalde *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017), c-Myc (Green *et al.*, 2016) ainsi que les facteurs de la famille Ras (Siewertsz van Reesema *et al.*, 2016).

1.1.1.19 Facteurs internes non génétiques

Les pathologies sous-jacentes : Certaines pathologies mammaires sous-jacentes, des seins denses ou des hyperplasies atypiques, peuvent également contribuer à augmenter le risque de cancer du sein (Société canadienne du cancer, 2020).

L'âge et l'imprégnation hormonale au cours de la vie : En dehors du sexe, l'âge représente l'un des facteurs de risque les plus importants associés au cancer du sein (Siegel *et al.*, 2017). Environ cinquante pourcents des cas de cancer du sein sont diagnostiqués entre cinquante et soixante-neuf ans contre moins de vingt pourcents avant cinquante ans (Siegel *et al.*, 2017). Une grande imprégnation hormonale endogène, c'est-à-dire une longue période de vie durant laquelle l'individu est exposé à des hormones reproductives, serait également un facteur important (Eshre Capri Workshop Group, 2004; Henderson & Feigelson, 2000; Kelsey *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2008; Pompei & Fernandes, 2020). Durant cette exposition, les hormones stéroïdiennes, et particulièrement E2, stimuleraient la prolifération des cellules et, de façon indirecte, l'accumulation de mutations génétiques (Henderson & Feigelson, 2000). Ainsi, une puberté précoce et/ou une ménopause tardive sont toutes deux associées à un risque plus élevé de cancer du sein, et inversement (Hormones *et al.*, 2013; Key *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008).

L'âge à la première grossesse, la parité et l'allaitement : La grossesse et l'allaitement, en favorisant la différenciation cellulaire, confèreraient au tissu mammaire une protection contre une prolifération incontrôlée, et l'involution permettrait d'éliminer les cellules pré-cancéreuses (Albrektsen *et al.*, 2005; Fortner *et al.*, 2019; Troisi *et al.*, 2018). Cependant, cet effet protecteur

serait dépendant de plusieurs composantes, telles que l'âge à la première grossesse et le temps *postpartum*. En effet, la grossesse est associée à court terme à une augmentation du risque de cancer du sein; on parle de cancer du sein associé à la grossesse ou *Pregnancy-associated breast cancer* (PABC). L'un des facteurs majeurs sous-jacents au PABC serait l'augmentation drastique des taux circulants d'E2 et de P4 durant la grossesse (Bouasker *et al.*, 2020; Schedin, 2006).

1.1.1.20 Facteurs environnementaux

La détermination des risques de cancer attribuables à l'environnement reste à ce jour inconsistante en raison du manque de consensus lié à la définition de l'environnement (McGuinn *et al.*, 2012). En effet, le terme « environnement » est fréquemment utilisé pour caractériser de façon globale tous les facteurs externes non génétiques, mais aussi de façon restrictive pour inclure uniquement les polluants de l'air, de l'eau, du sol et des aliments (Boffetta & Nyberg, 2003). Dans la présente étude, notre définition de facteurs environnementaux sera restreinte aux composantes comportementales, aux traitements hormonaux et enfin aux polluants, tel que proposé par Boffetta et collaborateurs (Boffetta & Nyberg, 2003).

Les habitudes de vie et les traitements hormonaux : Le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité, l'inactivité physique et une alimentation déséquilibrée sont tous associés à davantage de risques de développer un cancer du sein (Sun *et al.*, 2017). Alors que le tabac est un carcinogène avéré pour l'homme (International Agency for Research on Cancer, 2004), le risque associé aux traitements hormonaux, tels que la contraception et la thérapie hormonale substitutive lors de la ménopause relève de leur habilité à induire une perturbation de l'équilibre hormonal au sein de l'organisme chez la femme (Ataollahi *et al.*, 2015; Henderson & Feigelson, 2000; Sun *et al.*, 2017).

Les polluants environnementaux : L'une des composantes environnementales contribuant à l'augmentation du risque de cancer du sein serait l'exposition aux polluants environnementaux (Andreeva & Pokhrel, 2012; Danaei *et al.*, 2005). En effet, des études ont mis en évidence une association entre l'exposition à des polluants environnementaux tels que DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et les dixioxines et une augmentation du risque de cancer du sein (Rodgers *et al.*, 2018). Parmi les polluants auxquels nous sommes exposés en Amérique du Nord, particulièrement au Canada, nous avons choisi de nous intéresser aux substances pouvant altérer l'équilibre hormonal au sein de l'organisme, soit les perturbateurs endocriniens (Zoeller *et al.*, 2012).

1.8 Les perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens ont été initialement décrits par l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA), comme « *des agents qui interfèrent avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou l'élimination d'hormones naturelles qui dans le corps sont responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement* » (Kavlock *et al.*, 1996). Plus tard, il a été démontré que les PE individuels peuvent éliciter des effets différents lorsqu'ils sont utilisés en mélange avec d'autres PE : on parle alors d'effets de mixtures (Rajapakse *et al.*, 2002a; Silva *et al.*, 2002a). De plus, des études expérimentales dans des modèles cellulaires et animaux, et épidémiologiques chez l'humain, ont mis en évidence la capacité des PE à induire des effets aussi bien chez l'individu exposé que chez sa descendance (Gupta, 2000; Nagel *et al.*, 1997). L'OMS proposa alors une nouvelle définition selon laquelle un PE est « *une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait, induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture, ou au sein de (sous)-populations* » (OMS 2002). Cependant, la société d'endocrinologie américaine a apporté une définition plus globale permettant de contourner la notion de causalité entre l'exposition aux PE et l'observation d'un effet « *néfaste* ». Ainsi, la définition la plus récente et relativement consensuelle d'un PE est « *un produit chimique exogène, ou un mélange de produits chimiques, qui peut interférer avec n'importe quel aspect de l'action hormonale* » (Zoeller *et al.*, 2012).

Selon leur origine, les PE sont assignés à deux catégories : (1) les PE naturels, tels que les phytoestrogènes, la génistéine et le coumestrol, et (2) les PE artificiels (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Kabir *et al.*, 2015). Ces derniers peuvent être classifiés en sous-groupes, dont quelques exemples sont cités ci-après :

- Les produits chimiques de synthèse utilisés comme solvants ou lubrifiants industriels et leurs sous-produits :
 - Les biphényles polychlorés (PCB) ou polybromés (PBB)
 - Les dioxines
 - Les retardateurs de flammes bromés (BFR)
- Les plastiques et les plastifiants :
 - Le bisphénol A (BPA)
 - Les phtalates
- Les pesticides et les fongicides :
 - Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)

- La vinclozoline
- Les agents pharmaceutiques ayant des effets hormonaux :
 - Le diéthylstilbestrol (DES)

1.8.1 Fonctionnement du système endocrinien

Le système endocrinien est un ensemble de glandes qui sécrètent des hormones qui vont être libérées dans la circulation afin que celles-ci puissent réguler le développement et/ou la fonction d'un tissu cible sensible aux hormones (Hiller-Sturmhofel & Bartke, 1998). Après leur synthèse, les hormones hydrophiles (catécholamines, adrénaline, mélatonine etc.) vont circuler librement dans le sang, alors que les hormones insolubles (thyroïdiennes et stéroïdiennes) vont être amarrées à des protéines de liaisons (Hammond, 2016). Ces protéines de liaison, pour la plupart produites par le foie et pouvant être spécifiques aux hormones ou ubiquitaires (albumine), vont stabiliser l'hormone et augmenter sa demi-vie en la protégeant de la dégradation enzymatique (Hammond, 2016).

Le taux d'hormones circulant dépend du rythme sécrétion, mais aussi de sa métabolisation et de son mode de transport dans le sang. De plus, la quantité d'hormone bioactive pouvant induire un effet physiologique est considérée comme étant la fraction libre de l'hormone qui n'est pas liée aux protéines de transport ou qui leur est liée avec une faible affinité (Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003). Ainsi, alors que les hormones sont libérées à de faibles concentrations, de l'ordre de la partie par billion (ppt) ou de la partie par million (ppm), seulement des quantités encore plus faibles sont biologiquement actives (Vandenberg, 2014). De façon classique, l'efficacité d'une hormone dépend de sa fraction libre, du nombre de récepteurs disponibles et de son affinité pour le récepteur, mais également de la fonctionnalité des récepteurs qui elle, peut être influencée par le stade de développement de l'individu (Barouki *et al.*, 2012; Charlton, 2009; Lees *et al.*, 2004; Vandenberg, 2014; Welshons *et al.*, 2003). Ainsi, l'effet des hormones varie en fonction du stade de développement (Mangoni & Jackson, 2004; Schulz *et al.*, 2009). Lors des périodes critiques telles que la vie *in utero* et néonatale, mais aussi la puberté, l'exposition à certaines hormones induit des changements qui modifient de façon durable la réaction de l'individu aux stimulations hormonales subséquentes ; on parle ici d'effets organisationnels (Baum, 1979; Berenbaum & Beltz, 2011; Phoenix *et al.*, 1959; Wallen, 2009). À l'opposé, les hormones peuvent induire des changements biologiques temporels, qui s'arrêtent de façon concomitante à la cessation du stimulus; ce sont des effets activationnels, qui sont élicités typiquement à la puberté ou chez l'adulte (Schulz *et al.*, 2009).

1.8.2 Mode d'action et caractéristiques inhérents aux perturbateurs endocriniens

Il est généralement admis que l'action cellulaire des PE implique un effet mimétique ou antagoniste du récepteur de l'hormone ciblée (Combarrous & Nguyen, 2019). Cependant, tel que décrit précédemment, les PE peuvent également interférer avec la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison ou l'élimination des hormones endogènes (Combarrous & Nguyen, 2019; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Tabb & Blumberg, 2006). En raison de leurs caractéristiques intrinsèques, il est proposé que les PE puissent éliciter les mêmes effets que les hormones (Vandenberg *et al.*, 2012). Ainsi, à l'instar des hormones, les effets des PE :

1. **Dépendent de l'âge de l'individu exposé** : La perturbation endocrinienne peut induire des altérations différentes qui sont spécifiques à l'état physiologique (Mangoni & Jackson, 2004), au stade de différenciation et à la sensibilité aux hormones de l'organisme au moment de l'exposition (Bern, 1992; Medina *et al.*, 2001; Mittendorf, 1995).
2. **Peuvent être latents** : les conséquences d'une exposition aux PE durant le développement, peuvent se manifester plus tard au cours de la vie (puberté, adulte, au cours du vieillissement). Tout comme les hormones, les PE peuvent induire des effets organisationnels pouvant se répercuter plus tard dans la vie, en présence de stimuli précis (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Hatch *et al.*, 2001; Heindel, 2005; Heindel, 2008; Schug *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2008; Trichopoulos, 1990).
3. **Peuvent être manifestés à de faibles doses** : Cela résulterait du fait que les PE puissent avoir une fraction biologiquement active différente, voire plus importante que celle de l'hormone car ils pourraient utiliser différentes molécules de transport ou avoir une affinité différente pour celles-ci. De plus, les PE pourraient avoir une affinité différente avec le récepteur de l'hormone endogène, et/ou recruter des cofacteurs et des voies de signalisations distinctes (Dechaud *et al.*, 1999; Milligan *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2009; Nagel *et al.*, 1999; Nagel *et al.*, 1997; Sheehan & Young, 1979).
4. **Peuvent induire des effets non-linéaires/non monotones** : En plus des courbes doses-réponses linéaires modélisables, les PE peuvent induire des relations non-linéaire modélisées par une courbe ou encore dont la pente ne change pas de signe mais change de valeur au fur et à mesure des doses testées (Vandenberg *et al.*, 2012). Ils peuvent également induire des courbes non linéaires, dans lesquelles la pente de la courbe change de signe dans la gamme des doses testées, on parle alors de courbes dose-réponse non monotones (*Non-monotonic dose-response curve* (NMDRC)). La corrélation de Spearman peut permettre d'évaluer la monotonie d'une courbe non linéaire. Les

NMDRC sont généralement en forme de U, U inversé ou multiphasique (Vandenberg *et al.*, 2012). On peut y observer les réponses les plus élevées aux doses d'exposition faibles et élevées, ou encore une réponse diminuée ou aucune réponse à des niveaux d'exposition faibles et élevés (Kohn & Melnick, 2002; Lagarde *et al.*, 2015). Autant pour les courbes non-linéaires que pour les NMDRC, le fait de tester de fortes doses ne pourrait pas permettre de prédire les effets à des doses faibles ou intermédiaires. Ce type d'effets a été associé à plusieurs PE (revue ((Vandenberg *et al.*, 2012))). Ainsi, la prémisse de base selon laquelle « *Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison; seule la dose fait qu'une chose n'est pas un poison* » (Paracelse 1493–1541) pourrait ne pas être applicable à certains PE (Vandenberg *et al.*, 2012).

5. **Peuvent résulter d'une action combinée d'un mélange de plusieurs PE** : Les effets des PE découlent généralement d'une exposition à un mélange de plusieurs composés différents. Ces effets dits de mixtures ou combinés (Kortenkamp, 2006; Kortenkamp *et al.*, 2007) pourraient être la résultante de plusieurs mécanismes additifs, synergiques et/ou antagonistes propres aux différents PE constituant la mixture (Kortenkamp, 2008). Le besoin d'intégrer des combinaisons de PE dans l'étude des risques toxicologiques est de plus en plus reconnu (Kortenkamp, 2007; Kortenkamp, 2008).
6. **Peuvent engendrer des effets multigénérationnels et transgénérationnels** : les PE peuvent avoir un effet sur l'individu exposé, mais aussi sur sa descendance. Ils peuvent également être transférées au fœtus et au nouveau-né par transport placentaire et *via* le lait maternel, respectivement (Anway *et al.*, 2005; Blatt *et al.*, 2003; Brouwers *et al.*, 2006; Bruner-Tran *et al.*, 2017; Reed & Fenton, 2013; Xin *et al.*, 2015).
7. **Dépendent de la fenêtre d'exposition** : les PE peuvent induire des effets délétères majeurs lorsque les individus sont exposés pendant les phases critiques du développement, telles que le développement embryonnaire, néonatal et périnatal, ou encore la puberté et le cycle grossesse-lactation dans le cas des glandes mammaires (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Fenton *et al.*, 2012; Soto & Sonnenschein, 2010). Ces périodes sont généralement caractérisées par une faible différenciation cellulaire et tissulaire, une prolifération importante et une capacité limitée de réparation de l'ADN (Fenton, 2012; Landrigan *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2008).

1.9 Perturbateurs endocriniens et développement des glandes mammaires

Autant chez les humains que chez les rongeurs, l'exposition à différents PE a été associée à une perturbation du développement des glandes mammaires, qui est parfois liée à des

pathologies chez l'adulte (Fenton, 2006). Ce développement pathologique chez l'adulte est d'autant plus prononcé lorsque l'exposition aux PE a lieu durant les phases précoces de la vie, telles que la période *in utero*, périnatale et néonatale (Fenton, 2012; Macon & Fenton, 2013). Ce sont des fenêtres de sensibilité au cours desquelles les PE sont plus susceptibles d'induire des changements, qu'ils soient minimes ou substantiels, chez l'organisme en développement, et qui peuvent se répercuter en des altérations cellulaires ou histo-morphologiques au cours de la vie postnatale (Fenton, 2009). Dans le cas des glandes mammaires, la période péri-pubertaire et le cycle grossesse-lactation représentent également des périodes de vulnérabilité en raison de leurs caractéristiques prolifératives plus importantes (Fenton, 2006; Rudel *et al.*, 2011) (Figure 1-10).

Ainsi il a été démontré que plusieurs PE, dont le Diéthylstilbestrol (DES), le BPA, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), le PCB ou encore le DDT altèrent le développement mammaire (Calaf *et al.*, 2020; Fenton *et al.*, 2012; Rudel *et al.*, 2011). Bien que la plupart des PE ne soient pas mutagènes, il est admis qu'ils perturbent le développement mammaire et peuvent en influencer la carcinogenèse, entre autres, par leurs effets sur (1) la prolifération des cellules épithéliales, (2) la composition du stroma, (3) la réponse/réceptivité aux hormones endogènes, (4), la communication cellule-cellule, (5) le nombre, la taille et la période de présence des bourgeons terminaux, ainsi que (6) la réponse immunitaire (Fenton *et al.*, 2012; Rudel *et al.*, 2011). L'ensemble de ces mécanismes peut être influencé par des modifications épigénétiques ou encore par l'altération de processus cellulaires physiologiques (Knower *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2015). Ces effets sont non mutuellement exclusifs et leur est influencée par la période initiale durant laquelle l'exposition aux PE a eu lieu (Fenton, 2006; Macon & Fenton, 2013).

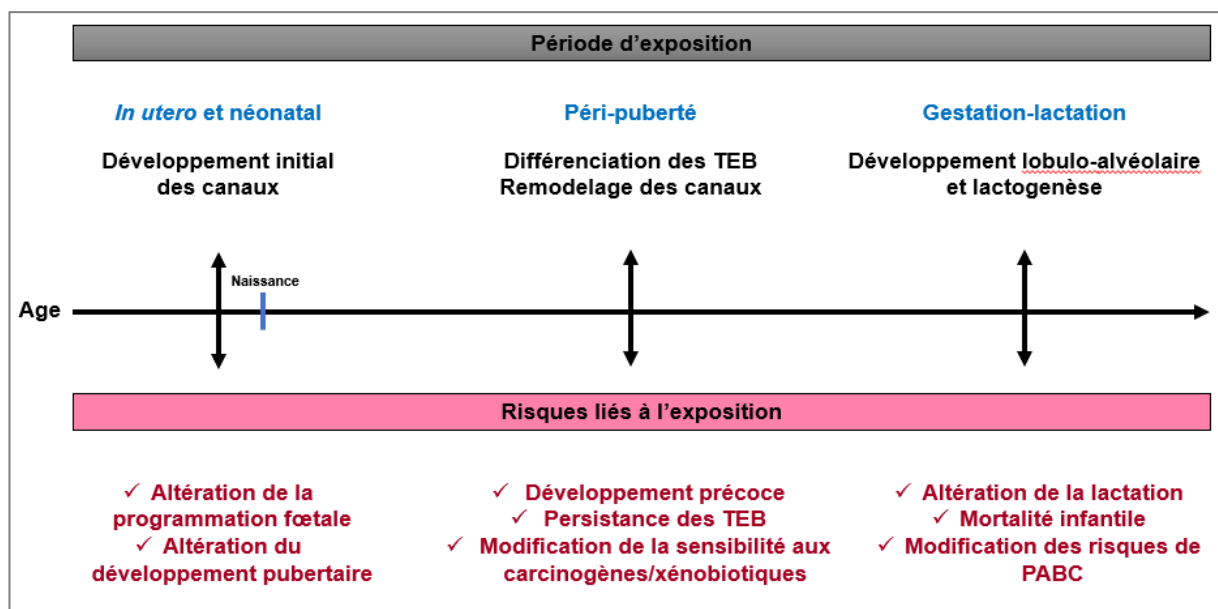


Figure 1-10 : Périodes de développement de la glande mammaire les plus sensibles à une exposition aux perturbateurs endocriniens et potentielles altérations observables

Les glandes mammaires sont plus susceptibles d'être affectées par une exposition aux PE durant la vie *in utero* et néonatale mais aussi durant la péri-puberté et le cycle gestation-lactation en raison de leur immaturité et de leur fort potentiel prolifératif, respectivement. Les PE induisent différentes altérations qui sont spécifiques à la fenêtre d'exposition. Adapté de Fenton, 2006.

1.10 Perturbateurs endocriniens et jonctions intercellulaires

À l'instar des hormones qui jouent un rôle important dans l'expression, l'assemblage et la fonction des jonctions intercellulaires dans plusieurs tissus, l'exposition aux PE influence ces processus dans de nombreux tissus *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, l'exposition des cellules de Leydig TM3 aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) entraîne une diminution de la *GJIC* subséquente à une relocalisation de Cx43 de la membrane vers le cytoplasme (Kubincova *et al.*, 2019). De façon similaire, une diminution de la *GJIC* potentiellement causée par l'internalisation et la dégradation de Cx43 a été observée dans les cellules non-tumorigéniques de foie de rat IAR20 exposées à l'ioxynil (Leithe *et al.*, 2010). L'expression de Cx43 est également altérée par l'hexachlorobenzène (HCB) dans les cellules épithéliales non-tumorigéniques de glandes mammaires MCF-12A (Delisle *et al.*, 2015), et celle de Cx26 et Cx32 dans le foie de rat femelle *in vivo* (Plante *et al.*, 2002).

Il a été montré que l'expression d'E-cadhérine est inhibée par le BPA dans la prostate dorsolatérale chez le rat *in vivo* (Huang *et al.*, 2018), ainsi que dans le foie de rat après un traitement à l'HCB (Plante *et al.*, 2005). L'exposition aux BPA entraîne également une réduction de l'expression d'E-cadhérine dans les cellules de choriocarcinome placentaire Bewo (Wang *et*

al., 2015), et cela est associé à une augmentation des niveaux de N-cadhérine et à l'induction d'EMT dans les cellules épithéliales humaines de cancer colorectal SW480 (Chen *et al.*, 2015).

Au niveau des jonctions serrées, une exposition périnatale des rats au BPA perturbe l'expression des CLND-3, 4, -6 et -7 ainsi que de ZO-1 dans l'épithélium utérin plus tard lors de la gestation (Martinez-Pena *et al.*, 2017). De façon similaire, l'exposition au mono-2-ethylhexyl phtalate (MEHP) perturbe les jonctions serrées *via* une diminution de l'expression de ZO-1 et d'occludine dans les cellules primaires de Sertoli isolées chez le rat (Zhang *et al.*, 2008).

Parmi la multitude de perturbateurs endocriniens auxquels nous sommes exposés au quotidien, nous nous sommes intéressés à un groupe de composés ignifuges : les retardateurs de flammes bromés.

1.11 Les retardateurs de flammes bromés

Les incendies constituent chaque année une source importante de dommages matériels et de pertes en vie humaines. En 2018, les incendies ont causé la mort de plus de 3000 personnes aux États-Unis (United States Fire Administration), 109 personnes au Canada (Statistics Canada) et ils représentaient une perte économique de plus de 25,6 milliards de dollars américains (United States Fire Administration). Depuis les années 1970, l'industrialisation et la technologie grandissantes ont conduit à une augmentation de l'utilisation de matériaux synthétiques inflammables dans la manufacture d'objets du quotidien, tels que les ordinateurs et les appareils électroniques utilisés dans les espaces intérieurs. En 2016, l'association internationale des services d'incendie et de sauvetage estimait que près de 94% des incendies avaient lieu dans les maisons et les bâtiments clos (Center of Fire Statistics of CTIF, 2016). Pour limiter les risques d'incendies, des normes de sécurité relatives à l'utilisation des matériaux combustibles ont été progressivement érigées durant les dernières décennies ; l'une d'entre elle consiste en l'utilisation de composés ignifuges ou retardateurs de flammes (Janssen, 2005).

Les retardateurs de flammes représentent une famille de près de 175 composés qui sont ajoutés aux matériaux manufacturés combustibles, tels que la mousse, les plastiques, les textiles et le bois afin d'en réduire l'inflammabilité (Birnbaum & Staskal, 2004a; de Wit, 2002). Ils sont majoritairement utilisés dans l'industrie de la construction lors de la fabrication de matériaux d'isolation (Shaw *et al.*, 2010). Parmi ces ignifuges, les retardateurs de flammes bromés ou *Brominated flame retardants* (BFR) ont été les plus utilisés en raison de leur faible coût, associé à une relative haute efficacité (Janssen, 2005). Les polybromodiphényléthers (PBDE) et

l'hexabromocyclododécane (HBCDD) sont les BFR les plus ubiquitaires en Amérique du Nord (de Wit, 2002; Janssen, 2005; Segev *et al.*, 2009; Stapleton *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2005).

Les PBDE constituent une famille de 209 composés hétérogènes qui contiennent un noyau éther diphenylique commun, mais qui diffèrent par leur degré de bromation (Rahman *et al.*, 2001). Ils sont généralement disponibles sous forme de mélanges commerciaux dont les plus prépondérantes sont le décabromodiphényléther (DecaBDE), l'octabromodiphényléther (OctaBDE) et le pentabromodiphényléther (pentaBDE) (Birnbbaum & Staskal, 2004a; Janssen, 2005). L'HBCDD est un hydrocarbure cyclique aliphatique également présent commercialement sous forme de mélanges composés de trois diastéréoisomères (α -, β - et γ -HBCDD) parmi lesquels les diastéréoisomères γ sont les plus importants (Alaee *et al.*, 2003). Enfin, le TBPPA est fabriqué par bromation du bisphénol A dans un solvant organique. Il est disponible sous forme de résine époxy et de polycarbonate (Alaee *et al.*, 2003; Janssen, 2005).

Les BFR agissent principalement en empêchant la libération de radicaux libres hautement inflammables lors de la phase gazeuse de la réaction de combustion afin de limiter l'apparition du feu (International Bromine Council). Ils sont, pour la plupart, hydrophobes afin de pouvoir réagir avec les polymères synthétiques qui sont, eux aussi, généralement des produits hydrophobes dérivés du pétrole (Eljarrat *et al.*, 2011). Ils possèdent également une grande stabilité afin d'avoir une efficacité correspondant au besoin de longévité des objets auxquels ils sont adjoints (Eljarrat *et al.*, 2011). Lorsqu'ils sont incorporés à la matrice du polymère avant la synthèse des objets, ils s'y lient de façon covalente. En revanche, ils établissent des liaisons faibles lorsqu'ils y sont ajoutés après la réaction de polymérisation. On parlera de BFR réactifs et additifs, respectivement (de Wit, 2002; Janssen, 2005). Les PBDE et l'HBCDD sont des ignifuges additifs, alors que le TBPPA est principalement utilisé comme réactif (de Wit, 2002; Janssen, 2005). Ainsi, les PBDE et l'HBCDD sont plus susceptibles de se détacher des objets et de se retrouver dans l'environnement (Besis & Samara, 2012; Janssen, 2005). Par conséquent, en raison de leur caractère stable, parfois volatile et hydrophobe, ils sont retrouvés dans les sédiments, le sol, les tissus animaux et humains, mais aussi dans l'air et l'eau (Darnerud, 2003; Darnerud *et al.*, 2001). Les BFR s'accumulent dans le tissu adipeux des organismes vivants, aussi bien dans les zones industrielles et isolées comme l'Arctique, et sont bio-amplifiés dans la chaîne alimentaire (Darnerud, 2003; Eljarrat *et al.*, 2011; Hale *et al.*, 2003; Markham *et al.*, 2018).

En raison de ces caractéristiques représentant un risque pour l'environnement, les PBDE et l'HBCDD ont été classifiés comme polluants organiques persistants (POP) selon le programme des Nations unies pour l'environnement (UNEP) et identifiés pour une réduction à l'échelle globale

par la Convention de Stockholm (Stockholm Convention). De même, leur utilisation, vente, mise en vente et importation a été restreinte en Europe, puis en Amérique du Nord, dont au Canada, entre 2002 et 2018 (Environment and Climate Change Canada, 2013; Environment Canada, 2008). Le TBBPA, quant à lui, n'a pas été identifié comme présentant un haut risque de dommage pour les organismes vivants et l'environnement en raison de son caractère non persistant et non bioaccumulable (Environnement Canada, 2013).

Cependant, malgré la législation des PBDE et de l'HBCDD, les objets contenant ces BFR sont utilisés encore aujourd'hui et le seront potentiellement pour plusieurs années encore, constituant ainsi une source majeure d'exposition environnementale. Par ailleurs, les processus associés à leur recyclage et à leur élimination contribuent à la libération continue des BFR dans l'environnement (Eljarrat *et al.*, 2011).

1.11.1 Voies d'exposition et contamination humaine

L'exposition humaine non-occupationnelle aux BFR se fait majoritairement dans les zones intérieures, telles que les maisons et les bâtiments résidentiels (Butt *et al.*, 2004; Schechter *et al.*, 2005; Stapleton *et al.*, 2005; Wilford *et al.*, 2005) en raison de leur concentration en équipements technologiques, en meubles et autres éléments rembourrés. La principale voie d'exposition est l'ingestion et l'inhalation de poussière de maison, mais aussi la consommation de denrées contaminées (Allen *et al.*, 2006; Bocio *et al.*, 2003; Schechter *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2005). En conséquence, les BFR sont retrouvés dans plusieurs tissus humains, tels que le sérum, le tissu adipeux, le placenta, le cordon ombilical et le lait maternel (Johnson-Restrepo *et al.*, 2005; Mazdai *et al.*, 2003; Morland *et al.*, 2005; Schechter *et al.*, 2010; Schechter *et al.*, 2003; She *et al.*, 2002; Sjodin *et al.*, 2004; Toms *et al.*, 2009a; Toms *et al.*, 2009b; Zota *et al.*, 2013). Les enfants en bas-âge représentent la population la plus exposée. Ils sont en effet exposés d'une part par voie maternelle *via* le transfert placentaire *in utero* et par le lait maternel durant l'allaitement (Chen *et al.*, 2014; Frederiksen *et al.*, 2010b; Herbstman *et al.*, 2007; Leonetti *et al.*, 2016; Schechter *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2013), et d'autre part à cause de leur tendance à porter leurs mains ainsi que les objets environnants à leur bouche (Jones-Otazo *et al.*, 2005b; Stapleton *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2005; Toms *et al.*, 2009b).

1.11.2 Impact de l'exposition aux BFR sur la santé endocrinienne et reproductive

Au cours des dernières décennies, un grand nombre d'études ont mis en lumière le potentiel des BFR à perturber divers processus biologiques essentiels, tels que la fonction

endocrinienne, le système reproducteur, le développement, le système nerveux ainsi que l'immunité (Birnbau & Staskal, 2004a; Ceccatelli *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2014; Costa & Giordano, 2007; Ema *et al.*, 2008; Eriksson *et al.*, 2006; Eriksson *et al.*, 2001; Eskenazi *et al.*, 2013; Fa *et al.*, 2014; Harley *et al.*, 2010; Herbstman *et al.*, 2010; Kibakaya *et al.*, 2009; Reistad *et al.*, 2006; Viberg & Eriksson, 2011; Zhang *et al.*, 2013b). Nous nous intéressons particulièrement aux effets des BFR persistants, les PBDE et l'HBCDD, sur le système endocrinien et la fonction reproductive et développementale chez les femelles.

1.1.1.21 Impact des BFR sur le système endocrinien

Aussi bien chez l'humain que dans les modèles expérimentaux, l'un des effets majeurs élicités par les BFR est une altération de l'homéostasie de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien. Des études épidémiologiques ont montré une association entre des concentrations sériques élevées de BDE-47, -99 et -100 et un risque de maladies thyroïdiennes dans une population de femmes (*National Health and Examination Survey*, NHANES 2003-2004), et le risque était davantage important chez la sous-population de femmes ménopausées (Allen *et al.*, 2016). Des observations similaires ont été mises en évidence chez des femmes canadiennes chez lesquelles des taux plasmatiques élevés de BDE-100 étaient associés à une plus forte prévalence d'hypothyroïdie (Oulhote *et al.*, 2016). Une association similaire a été montrée entre des concentrations élevées d'HBCDD et des troubles de la thyroïde dans une population de femmes à proximité de sources de productions d'HBCDD en Chine (Li *et al.*, 2014).

De telles dérégulations de l'homéostasie thyroïdienne ont également été observées chez les femmes enceintes chez qui de fortes concentrations plasmatiques de PBDE ont été corrélées à une réduction des niveaux circulants de TSH et à un risque plus important d'hyperthyroïdie subclinique (TSH faible et T4 libre normale) (Chevrier *et al.*, 2010). A l'opposé, des niveaux élevés de PBDE faiblement bromés et leurs métabolites ont été corrélés avec des taux élevés de TSH dans une autre étude (Zota *et al.*, 2011). La dissimilitude entre les deux études pourrait être due à une différence entre les stades de grossesse ciblés puisque les concentrations circulantes de TH varient en fonction du stade d'avancement de la grossesse (Soldin *et al.*, 2004). De façon intéressante, une altération de l'homéostasie des TH a été observée chez les enfants exposés *in utero* et dont les mères présentaient de forts taux de PBDE dans la circulation (Abdelouahab *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2011; Mazdai *et al.*, 2003) ou dans le lait maternel (Kim *et al.*, 2011), suggérant que les effets sur la mère pourraient affecter le fœtus. Une autre étude a montré que, bien que les taux sériques d'HBCDD soient plus élevés chez les mères

de nourrissons atteints d'hypothyroïdie congénitale, les niveaux d'HBCDD chez la mère n'étaient pas corrélés avec une altération des niveaux de TH chez les enfants (Kim & Oh, 2014). Cependant, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'un tel manque d'association pourrait être influencé par le fait que ces enfants reçoivent des injections thérapeutiques de T4 synthétique (Kim *et al.*, 2012; Kim & Oh, 2014).

Au meilleur de nos connaissances, seulement deux études épidémiologiques ont analysé le lien entre l'exposition aux PBDE et les hormones sexuelles chez les femmes et elles n'ont démontré aucune association avec l'expression des récepteurs ER, les enzymes de conversion des E2 (Karmaus *et al.*, 2011) ou encore les taux de 17 β -estradiol (Wan *et al.*, 2010).

Les liens épidémiologiques entre les PBDE et l'HBCDD et les effets thyroïdiens sont soulignés par un grand nombre d'études expérimentales. Ces études montrent que l'exposition aux PBDE et à l'HBCDD induit majoritairement une diminution des taux sériques de T4, associés ou non à une altération de TSH et T3, aussi bien chez les générations exposées que chez leur descendance femelle (Blanco *et al.*, 2013; Bondy *et al.*, 2011; Bondy *et al.*, 2013; Bowers *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2011; Driscoll *et al.*, 2009; Ellis-Hutchings *et al.*, 2006; Ellis-Hutchings *et al.*, 2009; Ema *et al.*, 2008; Fowles *et al.*, 1994; Hallgren & Darnerud, 2002; Hallgren *et al.*, 2001; Kodavanti *et al.*, 2010b; Kuriyama *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2012; Palace *et al.*, 2010; Palace *et al.*, 2008; Poon *et al.*, 2011; Stoker *et al.*, 2004; Szabo *et al.*, 2009; Tung *et al.*, 2016; van der Ven *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002). Les mécanismes impliqués seraient liés au potentiel qu'ont ces BFR ou leurs métabolites à agir comme agonistes ou antagonistes des récepteurs TR (Kojima *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2019; Ren & Guo, 2013), ou encore à agir sur le transport des TH (Hamers *et al.*, 2006; Meerts *et al.*, 2001b) et/ou sur leur métabolisation (Szabo *et al.*, 2009; Tung *et al.*, 2016).

1.1.1.22 Impact des BFR sur la reproduction et le développement

Plusieurs groupes de recherche ont analysé les effets des PBDE sur la reproduction et le développement chez les femelles. Il a été montré qu'une forte concentration sérique de PBDE est associée à une ménarche précoce chez les adolescentes (Chen *et al.*, 2011). À l'opposé, une plus grande exposition prénatale, déterminée par la mesure de taux élevés de PBDE dans le sérum maternel, a été corrélée à une ménarche tardive chez les filles (Harley *et al.*, 2017). Notons que, des concentrations élevées de PBDE dans le sérum (Wainman *et al.*, 2016) ou dans le lait maternel (Chao *et al.*, 2010) sont également associées à une perturbation de la durée du cycle menstruel chez les femmes. Des paramètres plus pathologiques, telles qu'une diminution de la

fécondabilité (Harley *et al.*, 2010) ou une augmentation des risques d'échecs d'implantation embryonnaire (Johnson *et al.*, 2012), ont également été corrélés avec d'importantes concentrations de PBDE dans le sérum et dans le fluide folliculaire, respectivement. Au meilleur de nos connaissances, aucune étude épidémiologique n'a investigué le lien entre l'exposition aux HBCDD et la reproduction et le développement chez les femmes.

Au niveau expérimental, plusieurs études ont également mis en évidence un lien entre l'exposition aux PBDE et à l'HBCDD et des altérations reproductives et développementales. L'exposition à ces BFR a été associée à une perturbation du développement folliculaire et de la stéroïdogenèse aussi bien chez les femelles vierges (Maranghi *et al.*, 2013; Rasinger *et al.*, 2018; Stoker *et al.*, 2004) que chez les adultes (Ema *et al.*, 2008; Lefevre *et al.*, 2016a). Il en est de même chez les femelles exposées *via* leur mère durant la gestation et/ou la lactation (Allais *et al.*, 2020; Ceccatelli *et al.*, 2006; Ema *et al.*, 2008; Lilienthal *et al.*, 2006; Talsness *et al.*, 2008). L'exposition développementale (*in utero* et/ou lactationnelle) à différents BFR entraîne aussi bien une ouverture vaginale précoce (Allais *et al.*, 2020) que tardive (Lilienthal *et al.*, 2006) chez les rats femelles. Une ouverture vaginale tardive a également été observée chez les rats femelles vierges exposées directement par gavage (Stoker *et al.*, 2004). Même si ces divergences peuvent être dues aux différences entre les congénères de BFR utilisés ainsi que le moment et la voie d'exposition, elles montrent que l'exposition aux PBDE et à l'HBCDD est capable de perturber la progression pubertaire chez les rongeurs.

Finalement, plusieurs études en laboratoire ont démontré que les BFR pouvaient éliciter des effets agonistes, antagonistes ou perturber les voies de signalisations médiées par les ER, PR et AR (Christen *et al.*, 2010; Dang *et al.*, 2007; Dorosh *et al.*, 2011; Fa *et al.*, 2014; Hamers *et al.*, 2006; Karpeta *et al.*, 2013; Kojima *et al.*, 2009; Lefevre *et al.*, 2016b; Li *et al.*, 2010; Meerts *et al.*, 2001b; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b; Schriks *et al.*, 2007; Schriks *et al.*, 2006). Ces études ont permis de confirmer les observations épidémiologiques et des modèles *in vivo*, et de proposer des mécanismes cellulaires sous-tendant les effets des BFR décrits précédemment.

1.11.3 Impact des BFR sur les glandes mammaires

Bien que les études précédentes rapportent un nombre important d'indications montrant un effet négatif des BFR sur les systèmes endocrinien et reproducteur, peu d'études ont, à ce jour, analysé les effets d'une exposition aux BFR sur les glandes mammaires. Puisque le système endocrinien est essentiel au développement des glandes mammaires, ces effets pourraient se

traduire par des anomalies développementales des glandes mammaires et/ou par une augmentation du risque de cancer du sein.

Chez l'humain, les trois études analysant le lien entre l'exposition aux PBDE et le développement des seins ont rapporté des observations contradictoires. La présence de fortes concentrations sériques de PBDE dans le sang des jeunes filles a été associée à une thélarche, ou bourgeonnement des seins, précoce (Deodati et al 2016) ou tardive (Windham et al 2015) ou alors, à aucun effet (Leijs 2008). Tout comme dans les études *in vivo*, ces divergences pourraient être dues, entre autres, aux types de congénères analysés, aux différences entre les concentrations sériques moyennes de PBDE détectées, à l'âge des filles au moment de l'analyse, mais aussi au nombre d'individus dans la cohorte qui variait entre $n = 9$ (Leijs *et al.*, 2008), $n = 31-56$ (Deodati *et al.*, 2016) et $n = 645$ (Windham *et al.*, 2015).

Une étude *in vivo* visant à évaluer les effets des BFR sur les glandes mammaires a montré qu'une exposition périnatale à une mixture commerciale de PBDE, le DE-71, induit une diminution significative de la croissance de l'épithélium glandulaire, des ramifications latérales des canaux et des TEB chez les femelles ratons prépubères (21 jours après la naissance) (Kodavanti *et al.*, 2010b). *In vitro*, il a été démontré que l'exposition au DE-71 induit une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales humaines cancéreuses MCF-7, et celle-ci est inhibée en présence d'anti-œstrogènes (Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b). De même, les MCF-7 présentent une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération lorsqu'elles sont exposées de façon conjointe à une mixture de PBDE (BDE-47, -99, -100 et -209) et au 17- β -œstradiol (Kwiecinska *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que les PBDE seraient capables (1) d'altérer le développement des glandes mammaires et (2) qu'ils pourraient influencer la promotion du cancer du sein (Brisken, 2008), possiblement *via* une interférence avec la signalisation des œstrogènes. Par contre, les organismes vivants, et plus particulièrement les humains, sont exposés quotidiennement à un mélange de BFR, dont les plus importants dans leur environnement résidentiel sont des mélanges de PBDE et d'HBCDD (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). Cependant, notre connaissance des effets d'une exposition à de tels mélanges de BFR environnementaux, en particulier durant les fenêtres de sensibilité du développement et de la cancérogenèse mammaire (*vie in utero* et périnatale, puberté et cycle gestation-lactation), reste limitée au regard des études décrites précédemment.

1.12 Contexte de recherche

Dans le but de mieux comprendre les effets d'une exposition à un mélange de BFR représentatif de l'exposition humaine environnementale sur le développement et la fonction des glandes mammaires, une étude modélisant l'exposition humaine, chez les femelles rats, a récemment été réalisée dans notre laboratoire (Dianati *et al.*, 2017). Pour ce faire, des femelles rats ont été exposées *via* l'alimentation, à un mélange de BFR formulé afin de correspondre aux congénères de BFR retrouvées dans les poussières de maisons Nord-Américaines. La mixture d'exposition était composée d'un mélange de trois mixtures commerciales de PBDE (DE-71, DE-79 et BDE-209) et d'une mixture d'HBCDD qui ont été combinées afin de correspondre aux niveaux médians de ces composés dans la poussière domestique, telle que caractérisée dans les résidences de la ville de Boston (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). Les mères ont été exposées ou non (contrôle) par l'alimentation à trois doses initiales du mélange (0,75, 250 et 750 mg/kg) qui ont été formulées afin d'entraîner une exposition réelle à 0,06, 20 et 60 mg/kg/jour après alimentation, en supposant une consommation alimentaire quotidienne de 80 g/kg de poids corporel/jour (Berger *et al.*, 2014). La faible dose d'exposition réelle après alimentation représente une proche approximation de l'exposition humaine maximale, sur la base d'un taux d'ingestion de poussière de 100 mg/jour chez les enfants (16,5 kg de poids corporel) et de l'équivalence de la dose chez l'humain vers les rongeurs (1:6,9 étant utilisé pour rapport de la surface corporelle du rat et de l'humain). L'exposition a commencé pendant la période péri-conceptionnelle et a été poursuivie pendant la gestation jusqu'à la fin de la lactation. Les mères ont par la suite été euthanasiées et leurs glandes mammaires prélevées, puis analysées (Dianati *et al.*, 2017; Tung *et al.*, 2016).

L'exposition aux BFR durant la fenêtre de sensibilité qu'est le cycle gestation-lactation a entraîné une perturbation des jonctions adhérentes et de la signalisation cellulaire dans les glandes mammaires des mères en lactation (Dianati *et al.*, 2017). Il avait été montré que le niveau protéique p- β -cat^{Ser675} ainsi son interaction avec E-Cadhérine étaient diminués chez les mères exposées à la faible dose de BFR, et que la présence de p- β -cat^{Ser675} à la membrane des cellules luminales était réduite chez les mères exposées à 0,06 ainsi qu'à 20 mg/kg de p.c./jour (Dianati *et al.*, 2017). Enfin, cette perturbation des jonctions adhérentes semblait impliquer une potentielle inhibition de la voie de signalisation de PKA (Dianati *et al.*, 2017). Partant du postulat que les PE pourraient avoir des effets sur la descendance, et que ceux-ci peuvent être particulièrement importants lorsque les individus sont exposés durant le développement précoce (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Fenton, 2012), ces résultats suggèrent que les glandes mammaires des

ratons ayant été exposés de façon indirecte aux BFR, *in utero* et par l'allaitement, pourraient également être affectées.

1.13 Problématique, hypothèse et objectifs

L'ensemble de cette revue de littérature peut être résumé en quelques points importants, qui constituent la base de notre projet de recherche :

1. Le développement des glandes mammaires se fait majoritairement au cours de périodes critiques que sont la vie embryonnaire, la puberté, la gestation et la lactation. Il est indépendant du système endocrinien avant la puberté, puis les glandes se développent sous influence hormonale jusqu'à la ménopause.
2. Le maintien d'une régulation hormonale adéquate est essentiel au bon développement des glandes mammaires et une perturbation du contrôle endocrinien peut influencer la cancérogenèse du sein.
3. Certains récepteurs hormonaux sont exprimés et fonctionnels dès la vie embryonnaire et pendant le développement pré-pubertaire, rendant ces périodes sensibles à une exposition hormonale inappropriée.
4. Les jonctions intercellulaires assurent les interactions entre les différents types cellulaires au sein du parenchyme, du stroma et entre ces deux compartiments. Elles sont régulées par les hormones dans plusieurs tissus, dont les glandes mammaires, et elles sont nécessaires à leur développement.
5. Une perturbation des jonctions intercellulaires peut résulter en des altérations développementales pouvant affecter la fonction des glandes mammaires et/ou en augmenter les risques de cancérogenèse.
6. Les PE sont omniprésents et ils peuvent interférer avec toutes les composantes de la régulation hormonale, de même qu'influencer l'organisme exposé ainsi que sa descendance.
7. Les effets des PE sont dépendants de l'âge de l'individu exposé et par extension de son état de différenciation et de sa sensibilité hormonale. Ils peuvent être plus importants à la faible dose d'exposition et induire des réponses non linéaires et non monotones. Leurs effets peuvent également être latents ou activationnels.
8. Les BFR sont des composés ubiquitaires dans notre environnement, nous y sommes exposés de façon quotidienne, et ce depuis et pour plusieurs années en raison de leur persistance.

9. Certains BFR sont des PE qui peuvent altérer la signalisation des E2, P4 et des TH aussi bien chez l'humain que chez les modèles expérimentaux. Bien que ces hormones jouent un rôle essentiel ou permissif dans la régulation du développement des glandes mammaires et peuvent en influencer la cancérogenèse, seulement un nombre limité d'étude ont investigué les effets de la perturbation hormonale induite par les BFR sur le développement normal et pathologique des glandes mammaires.
10. Des évidences suggèrent un effet néfaste des PBDE sur le développement pré-pubertaire des glandes mammaires *in vivo* et une potentielle action promotrice de tumeur *in vitro*.
11. L'exposition à un mélange de BFR (PBDE et HBCDD) représentatif de l'exposition environnementale humaine, entraîne une altération jonctions adhérentes et de la signalisation cellulaire dans les glandes mammaires de mères rats en lactation.

Sur la base de ces observations, notre **hypothèse** est qu'une *exposition indirecte des ratons aux BFR, durant la vie in utero et l'allaitement, pourrait altérer le développement postnatal de leur glandes mammaires. Ces altérations impliqueraient une dérégulation de la fonction endocrinienne et des jonctions intercellulaires et pourraient favoriser l'apparition d'anomalies développementales, voire de cancer plus tard à l'âge adulte.*

Nos **objectifs** étaient de déterminer :

- 1- Les effets à court terme, de l'exposition à une mixture de BFR durant la vie *in utero* et par l'allaitement, au moment de la **prépuberté** soit la période à laquelle la glande se développe de façon indépendante des hormones systémiques;
- 2- L'impact à moyen terme ou les effets latents de cette exposition précoce lors de la **puberté**, qui est la première période postnatale où la glande subit un remodelage important sous l'influence des hormones systémiques;
- 3- L'impact à long terme et la latence de l'exposition *in utero* et lactationnelle, tel que mesuré à l'**âge adulte**, période à laquelle la glande est relativement différenciée mais aussi plus susceptible à l'apparition/détection d'un cancer.

Pour l'ensemble de ces objectifs, les effets des BFR sur les glandes mammaires ont été déterminés au niveau organisationnel par analyses morphologiques et histologiques. Puis nos observations macroscopiques ont été approfondies par l'analyse de marqueurs moléculaires de la régulation hormonale, du développement, des jonctions intercellulaires et du cancer du sein. Ces objectifs ont abouti à la conception de deux articles (objectif 1 et 2) et d'une revue (objectifs 1-3) :

1. **Article 1** : *Gestational and Lactational Exposure to an Environmentally-relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Down-regulates Junctional Proteins, Thyroid Hormone Receptor α 1 Expression and the Proliferation-Apoptosis Balance in Mammary Glands Post Puberty*. Gouesse RJ, Lavoie M, Dianati E, Wade M, Hales B, Robaire B, Plante I.
Publié : Toxicol Sci. 2019 Jun 26;171(1):13-31. doi: 10.1093/toxsci/kfz147.

2. **Article 2** : *In utero and lactational Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Induces a Premature Development of the Mammary Glands*. Gouesse RJ, Dianati E, Alec M, Wade M, Hales B, Robaire B, Plante I.
Publié : Toxicol Sci, Nov 2020, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa176>

3. **Revue** : *Environmental exposure to brominated flame retardants: unravelling intricate effects on mammary glands and potential concern for breast carcinogenesis*,
Version préliminaire

2 PREMIER ARTICLE

Gestational and Lactational Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Downregulates Junctional Proteins, Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$ Expression, and the Proliferation-Apoptosis Balance in Mammary Glands Post Puberty

Une exposition durant la gestation et la lactation à un mélange de retardateurs de flammes bromés représentatif de l'exposition environnementale entraîne une diminution de l'expression des protéines jonctionnelles, du récepteur alpha aux hormones thyroïdiennes et perturbe la balance prolifération-apoptose dans les glandes mammaires de rat après la puberté

Auteurs :

Rita-Josiane Gouesse¹, Mélanie Lavoie¹, Elham Dianati¹, Mike Wade², Barbara Hales³, Bernard Robaire^{3,4} and Isabelle Plante^{1*}

1) INRS, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada

2) Health Canada, Environmental Health Science and Research Bureau, Ottawa, ON, Canada

3) McGill University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology & Therapeutics, Montreal, QC, Canada

4) McGill University, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics & Gynecology, Montreal, QC, Canada

* For correspondance : Isabelle Plante

INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

531 boul. des Prairies

Laval, QC

H7V 1B7

isabelle.plante@inrs.ca

Toxicological Sciences

Publication : 26 Juin 2019

DOI : 10.1093/toxsci/kfz147

Contribution des auteurs :

- Rita-Josiane Gouesse : 50%, conception et réalisation de la plupart des expériences. Rédaction et correction du manuscrit
- Mélanie Lavoie : 10%, conception et réalisation de quelques expériences
- Elham Dianati : 5%, conception du protocole expérimental, échantillonnage des animaux et participation à la correction du manuscrit
- Mike Wade, Barbara Hales, Bernard Robaire : 5% chacun, conception du protocole expérimental et participation à la correction du manuscrit
- Isabelle Plante : 20%, conception du projet et assistance dans la réalisation des expériences. Supervision dans la réalisation des expériences et correction du manuscrit.

Abstract

Mammary gland development requires hormonal regulation during puberty, pregnancy, and lactation. Brominated flame retardants (BFR) are endocrine disruptors; they are added to consumer products to satisfy flammability standards. Previously, we showed that gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR disrupts proteins of the adherens junctions in rat dam mammary glands at weaning. Here, we hypothesize that perinatal exposure to the same BFR mixture also disrupts junctional proteins and signaling pathways controlling mammary gland development in pups.

Dams were exposed through diet to a BFR mixture based on the substances in house dust; doses of the mixture used were 0, 0.06, 20, or 60 mg/kg/day. Dams were exposed continuously beginning prior to mating until pups' weaning; female offspring were euthanized on postnatal day (PND) 21, 46, and 208.

The lowest dose of BFR significantly downregulated adherens junction proteins, E-cadherin, and β -catenin, and the gap junction protein p-Cx43, as well as thyroid hormone receptor alpha 1 protein at PND 46. No effects were observed on estrogen or progesterone receptors. The low dose also resulted in a decrease in cleaved caspase-3, a downward trend in PARP levels, proteins involved in apoptosis, and an upward trend in proliferating cell nuclear antigen, a marker of proliferation. No effects were observed on ductal elongation or on the numbers of terminal end buds.

Together, our results indicate that gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR disrupts cell-cell interactions, thyroid hormone homeostasis and the proliferation-apoptosis balance at PND 46, a critical stage for mammary gland development.

Key words: endocrine disruptors; brominated flame retardants; gestational and lactational exposure; mammary gland; adherens junctions; gap junctions; thyroid hormone receptor; apoptosis; low-dose effect.

2.1 Introduction

Brominated flame retardants (BFR) are chemicals widely used in consumer products to reduce flame propagation and ignition rates (Aasen *et al.*, 2016; Birnbaum & Staskal, 2004a). They can be found in many items containing synthetic polymers, including electronics, vehicles, and home furnishings. Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) and hexabromocyclododecane (HBCDD) have been extensively used as BFR in North America (Janssen, 2005; Stapleton *et al.*, 2008). Because most of the BFR are non-covalently bound to the polymers, they leach into the environment, resulting in a widespread contamination of homes and other indoor spaces (Allen *et al.*, 2008; Frederiksen *et al.*, 2009). During the last decade, numerous studies have raised concerns about their persistence, bioaccumulation, and potential toxicity in animals and humans (Birnbaum & Staskal, 2004a; Sjodin *et al.*, 2003). Several studies have also highlighted the potential of various congeners of BFR to disrupt the endocrine system. Specifically, exposure to PBDE and HBCDD has been associated with adverse effects on thyroid and ovarian function and signaling (Ema *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014; Lefevre *et al.*, 2016a; Lilienthal *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 2016; Tung *et al.*, 2017). As a result, PBDE and HBCDD use, sale, offer for sale, and import have been restricted in Europe and North America (Environment and Climate Change Canada, 2013; Environment Canada, 2008). However, restricted BFR continue to be released from sources that remain in the built environment or waste streams and their environmental persistence will result in continued human exposure for years to come.

Human exposure occurs mostly through dust ingestion, food consumption and dermal absorption (Besis & Samara, 2012; Janssen, 2005). BFR can be detected in human serum, adipose tissue, placenta, umbilical cord and breast milk (Birnbaum & Staskal, 2004a; Hites *et al.*, 2004; Mazdai *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2010; Toms *et al.*, 2009b; Zota *et al.*, 2013). Toddlers are the most exposed, in part due to their ingestion of dust given their closer proximity to ground and hand-to-mouth contact, in addition to gestational and lactational exposure *via* their mother (Hites *et al.*, 2004; Mazdai *et al.*, 2003; Toms *et al.*, 2009b; Zota *et al.*, 2013).

Unlike most organs, mammary gland development occurs mainly after birth in a multistage process. At birth, the mammary epithelium is rudimentary (Hinck & Silberstein, 2005). Development resumes at the onset of puberty as the ovaries produce a surge of estrogens and progesterone (Mallepell *et al.*, 2006). Thyroid hormones also play an important role in mediating ductal outgrowth (Vonderhaar & Greco, 1979). Under this hormonal surge, highly proliferative structures called terminal end buds (TEB) form at the end of the ductal trees (Paine & Lewis, 2017) and drive elongation of the epithelium during puberty (Paine & Lewis, 2017). A second

phase of development occurs during pregnancy and lactation, with the differentiation of milk-secreting structures called *alveoli* (Hurley, 1989b; Sternlicht *et al.*, 2006a). After lactation, at weaning, the gland undergoes an important phase of apoptosis and regression named involution and returns to the pre-gestational stage (Hurley, 1989a; Masso-Welch *et al.*, 2000). The development of the gland is tightly regulated by the interaction between multiple hormones, rendering this organ particularly vulnerable to the adverse effects of exposure to endocrine disruptors.

Modifications of the *in utero* environment by exposures to endocrine modifying chemicals could interfere with maturation of the endocrine signaling pathways of the offspring and cause adverse effects later in life (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Fenton, 2012; Fenton *et al.*, 2012; Soto & Sonnenschein, 2010). Mammary development relies on three critical windows of growth and differentiation: fetal life, puberty and pregnancy/lactation (Hassiotou & Geddes, 2013), when the glands are the most susceptible to exogenous factors such as endocrine disruptors (EDs) (Fenton, 2012; Fenton *et al.*, 2012). Exposure to EDs during those periods has been associated with developmental defects and breast cancer later in life (Fenton, 2012; Fenton *et al.*, 2012). Accordingly, female Sprague-Dawley rats perinatally exposed to DE-71, a mixture of pentabrominated PBDE, showed a significant delay in mammary gland ductal outgrowth associated with reduced elongation and altered structure at postnatal day 21 (PND 21) (Kodavanti *et al.*, 2010b). More recently, we showed that gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR resulted in reduced serum levels of T4 and altered adherens junctions in the mammary glands of dams at weaning (Dianati *et al.*, 2017; Tung *et al.*, 2016).

Adherens junctions are protein complexes composed of transmembrane cadherins and cytoplasmic catenins (Lien *et al.*, 2006). They are involved in the physical association between cells, cell polarity, growth, structure, migration and differentiation, as well as in signaling (Incassati *et al.*, 2010a). We showed that exposure to BFR decreased the protein levels of one of the active phosphorylated forms of β -catenin (p- β -catenin^{Ser675}) and its interaction with E-cadherin, likely in a PKA-dependent manner (Dianati *et al.*, 2017). Interestingly, these effects were observed only at the lowest, environmentally relevant dose of the mixture. β -catenin plays important roles in mammary development through its pleiotropic functions in cell adhesion, signal transduction and regulation of gene expression (Incassati *et al.*, 2010b). An appropriate β -catenin signal is required for normal development of the mammary gland (Tepera *et al.*, 2003a), and its dysregulation has been associated with developmental defects and carcinogenesis (Incassati *et al.*, 2010a).

Similarly, loss of E-cadherin and β -catenin interaction has been correlated with poor clinical outcome in breast cancer (Dolled-Filhart *et al.*, 2006). We showed that β -catenin and E-cadherin interact with connexins (Cxs), the proteins forming gap junctions, during most mammary gland developmental stages (Dianati *et al.*, 2016). Gap junctions (GJs) are specialized transmembrane channels that allow direct communication through the cytoplasm of adjacent cells (El-Saghir *et al.*, 2011). GJs are crucial for the proper development of the mammary gland (Stewart *et al.*, 2015b; Talhouk *et al.*, 2005), and dysregulation of gap junctional intercommunication (GJIC) or Cxs has been associated with delayed development and impaired function of the mammary gland, as well as breast carcinogenic progression (Naus & Laird, 2010).

Expression of Cxs, catenin, and cadherin is regulated by multiple hormones (de Montgolfier *et al.*, 2011; Grummer *et al.*, 1999b; Lye *et al.*, 1993b; Mitchell *et al.*, 2001; Nguyen & Neville, 1998; Petrocelli & Lye, 1993; Satterfield *et al.*, 2007; Stelwagen & Singh, 2014; Stock & Sies, 2000; Winterhager *et al.*, 1991) and dysregulated by various endocrine disruptors (Chen *et al.*, 2015; de Freitas *et al.*, 2016; Dianati *et al.*, 2017; Salian *et al.*, 2009; Tsang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Disruption of expression of these proteins is associated with the epithelial to mesenchymal transition (EMT), a process by which epithelial cells acquire mesenchymal characteristics that enable them to migrate into surrounding tissues (Eger *et al.*, 2000). Dysregulation of EMT is a crucial step during breast cancer progression (Hanahan & Weinberg, 2000; Kalluri & Neilson, 2003).

Because BFR have adverse effects on the lactating mammary glands of dams, we hypothesized that the exposure of pups in early life to the same environmentally relevant BFR treatment will also have observable effects on mammary gland development and signaling pathways that are manifested later in life. Specifically, the current study reports the effects of gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of PBDE and HBCDD on cell-cell interactions, hormone signaling and development in the mammary glands of offspring before puberty (at postnatal day (PND) 21), after puberty (PND 46), and in adulthood (PND 208).

2.2 Materials and methods

BFR mixture formulation

Formulation of the BFR mixture was described previously (Ernest *et al.*, 2012). Briefly, three technical PBDE mixtures (DE-71, DE-79 and BDE 209) and one HBCDD mixture were combined to yield a ratio of PBDE congeners and HBCDD comparable to the median levels observed in Boston house dust (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). This BFR mixture was

incorporated into an isoflavone-free diet (Teklad Global 2019 diet; Harlan Laboratories, Madison, WI) with 4.3g/kg corn oil. Diets were formulated to contain 0, 0.75, 250 or 750 mg of BFR mixture/kg. These diet formulations were intended to deliver nominal doses of 0, 0.06, 20 and 60 of body weight/day (mg/kg/day), respectively. The low dose was estimated to be a close approximation of maximum human exposure, based on a dust ingestion rate of 100 mg/day in children (16.5 kg body weight) and the scaling of dose from humans to rodents (1:6.9, human to rat body surface area ratio). This is the third study examining the effects of dietary exposure to this mixture. The previous studies involved subchronic exposure of sexually mature males (Ernest *et al.*, 2012) and exposure during gestation only with assessment of fetal toxicity (Berger *et al.*, 2014). Dietary levels were confirmed in the initial study and were published (Poon *et al.*, 2014a). Relative exposure levels have been confirmed for the animals in the current study (Tung *et al.*, 2016), as well as in the previous two (Berger *et al.*, 2014; Poon *et al.*, 2014a) by analysis of PBDE levels in various tissues.

Animals

All procedures and animal studies were conducted in accordance with the procedures and principles as provided by the Canadian Council on Animal Care and were reviewed and pre-approved by the Health Canada Animal Care Committee (Protocol #2012-015). Animals and the treatment method were described in detail previously (Tung *et al.*, 2016). Briefly, virgin female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (Charles River, St-Constant, QC, Canada). Following one week of acclimatization to the control diet, animals were randomized to one of four BFR treatments and fed with a BFR supplemented diet for 2-4 weeks before mating (Tung *et al.*, 2016). During this period, estrous cyclicity was evaluated by analyzing vaginal cytology, as previously described (Goldman *et al.*, 2007). Females in proestrus were caged with proven breeder male Sprague-Dawley rats (maintained on the control diet) overnight. After mating, females were returned to their assigned cages and provided with water and the appropriate dietary mixture *ad libitum*, throughout gestation and lactation (between 9 to 14 dams for all groups). All dams were allowed to deliver (denoted as post-natal day (PND) 0). Dams and pups body weights were recorded at intervals throughout the treatment period. Litter size was balanced at 8 pups per dam at PND 4 (Tung *et al.*, 2016);(Dianati *et al.*, 2017). One female pup per litter was euthanized by exsanguination under isofluorane anesthesia at PND 21, PND 46 and PND 208. Left abdominal and both inguinal mammary glands (pair 4 and 5, respectively) were dissected, weighed, and immediately snap-frozen after excision then stored at -80°C. There were used for western blot analyses. Right abdominal mammary glands were immediately transferred

onto large slides then fixed in Carnoy's fixative for subsequent whole-mount studies. Upper-thoracic and thoracic mammary glands (pair 2 and 3, respectively) were excised, embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (VWR International, Ville Mont-Royal, QC, Canada) on dry ice and stored at -80°C for subsequent histology and immunofluorescence analyses.

Western blots

Abdominal (pair 4) or inguinal (pair 5) snap-frozen glands were mechanically ground into a powder on dry ice. Powdered samples once weighed, were homogenized in ice-cold triple detergent lysis buffer (pH 8) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with 1.25 M of NaF, 1 M of NaVO₃ and Halt Protease and Phosphatase Cocktail Inhibitor (Fisher Scientific). After sonication, samples were centrifuged at 13000 *rpm* (10 minutes at 4°C). Supernatants were aliquoted and stored at -80°C until further processing. All steps were performed on ice. Protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA). For each sample, total protein was separated using SDS-PAGE gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 10%, BIO-RAD, Mississauga, ON) and transferred onto PVDF membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD). After transfer, total lane proteins were visualized using the ChemiDoc MP imaging system (BIO-RAD). Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1 % supplemented with 3 % bovine serum albumin (BSA) or 5% dry milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (supplementary table 1) diluted in 5% dry milk or 3% BSA in TBS-Tween 0.1%, depending on manufacturers' recommendations. Blotted membranes were washed with TBS-Tween 0.1% 3 times for 5 minutes then probed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (supplementary table 1). The chemiluminescent signals were revealed using Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (BIO-RAD) and visualized using the ChemiDoc MP imaging system (BIO-RAD). The density of each protein band was quantified and normalized to the total proteins in the lane using ImageLab 6.0 software (BIO-RAD).

Whole-mounts and carmine stain of mammary glands

After sacrifice, right abdominal mammary fat pads were excised and processed for whole mount staining, as described with slight modifications (Plante *et al.*, 2011b). Briefly, the glands were first fixed for a minimum of 2 days in Carnoy's solution (100% EtOH, chloroform, glacial acetic acid; 6:3:1) at room temperature. The fixed glands were washed in 70% EtOH for 1h and then rehydrated in water for 30 minutes. Then, the mammary glands were stained in carmine alum stain (2% carmine and 5% aluminum potassium sulfate in water) for a minimum of 2 days.

Gradually the glands were dehydrated through an EtOH series, cleared in xylene (minimum 2 days) then mounted using Permount (FisherScientific, Burlington, ON). High resolution images of mammary whole mounts were collected using a Zeiss SteREO Discovery.V20 microscope. Whole mounts of mammary glands were analyzed with Image J software. Mammary epithelium surface area was measured by tracing the best-adjusted contour of the mammary epithelium. Epithelial elongation was measured from the lowest lymph node to the end of the longest branch of the epithelium.

Immunofluorescence and image acquisition

Immunofluorescence staining and analyses methods were described in previous publications (Dianati *et al.*, 2016; Dianati *et al.*, 2017). Briefly, tissue cryosections (7 μ m) were fixed in formaldehyde (4%) and blocked in 3% BSA dissolved in TBS-Tween 0.1%. Sections were incubated with the primary antibody (supplementary table 2) diluted in TBS-Tween 0.1% for 60 minutes at room temperature or overnight at 4°C followed with the appropriate secondary antibody (supplementary table 2) for 60 minutes at room temperature. Sections were then washed 3 times, for 5 minutes each, stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and slides were mounted with Fluoromount-G (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Immunofluorescence images were obtained with a Nikon A1R+ confocal microscopic laser equipped with a spectral detector. All the analyses were performed using NIS-elements software (version 4). The numbers of Cx43 junctional plaques were quantified using the NIS-elements software localisation tool and normalized to that of the nucleus (DAPI) for each image.

Statistical analysis

All the data were analyzed using GraphPad Prism, version 6.01. First, the normal distribution of each data set and the presence of outliers were assessed with D'Agostino & Pearson omnibus normality test and ROUT' test (ESD method), respectively. Data that satisfied assumptions of normality and homoscedascity were analysed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests. Otherwise, a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was used. For all experiment and statistical analysis, one pup per litter was evaluated.

2.3 Results

Gestational and lactational exposure to BFR disrupts adherens junctions' proteins without affecting p- β -cat^{Ser675} at PND 46

We previously reported that a low dose of the BFR mixture (0.06 mg/kg/day) reduced E-cadherin interaction with β -catenin in the adherens junctions of the mammary gland of dams exposed during pregnancy and lactation (Dianati *et al.*, 2017). Thus, our first objective here was to assess whether gestational and lactational exposure to these BFR had the same effects in female offspring. We quantified E-cadherin and β -catenin protein levels by western blots at PND 21, PND 46 and PND 208 (Figure 1). While the BFR treatment had no effects at PND 21 or PND 208 (Figure 1 A, C, D, F), exposure to the 0.06 mg/kg/day dose led to a significant decrease of E-cadherin and β -catenin protein levels at PND 46 (Figure 1B, E). Similar to the results in dams, no significant effects were observed for the two higher doses.

In dams treated with the BFR, in addition to reduced E-cadherin levels, a significant decrease in p- β -cat^{Ser675} protein levels was observed in the mammary glands, as well as lower levels of p-CREB, suggesting dysregulation of the PKA pathway (Dianati *et al.*, 2017). Again, gestational and lactational exposure did not affect the levels of p- β -cat^{Ser675} at PND 21 and PND 208 (Figure 2A, C). However, at PND46, a downward trend was observed in the animals treated with the 0.06 mg/kg/day BFR dose, although it was not significant ($p=0.16$) (Figure 2B). Similarly, although a downward trend was observed in CREB levels in the animals exposed to the 0.06 mg/kg/day dose, it did not reach statistical significance ($p=0.48$), and no changes were observed in p-CREB levels (Figure 2D-E). Together, these results suggested that gestational and lactational exposure to the lowest environmentally relevant dose of the BFR mixture results in decreased E-cadherin and β -catenin levels at PND 46 and that the PKA pathway may not be involved.

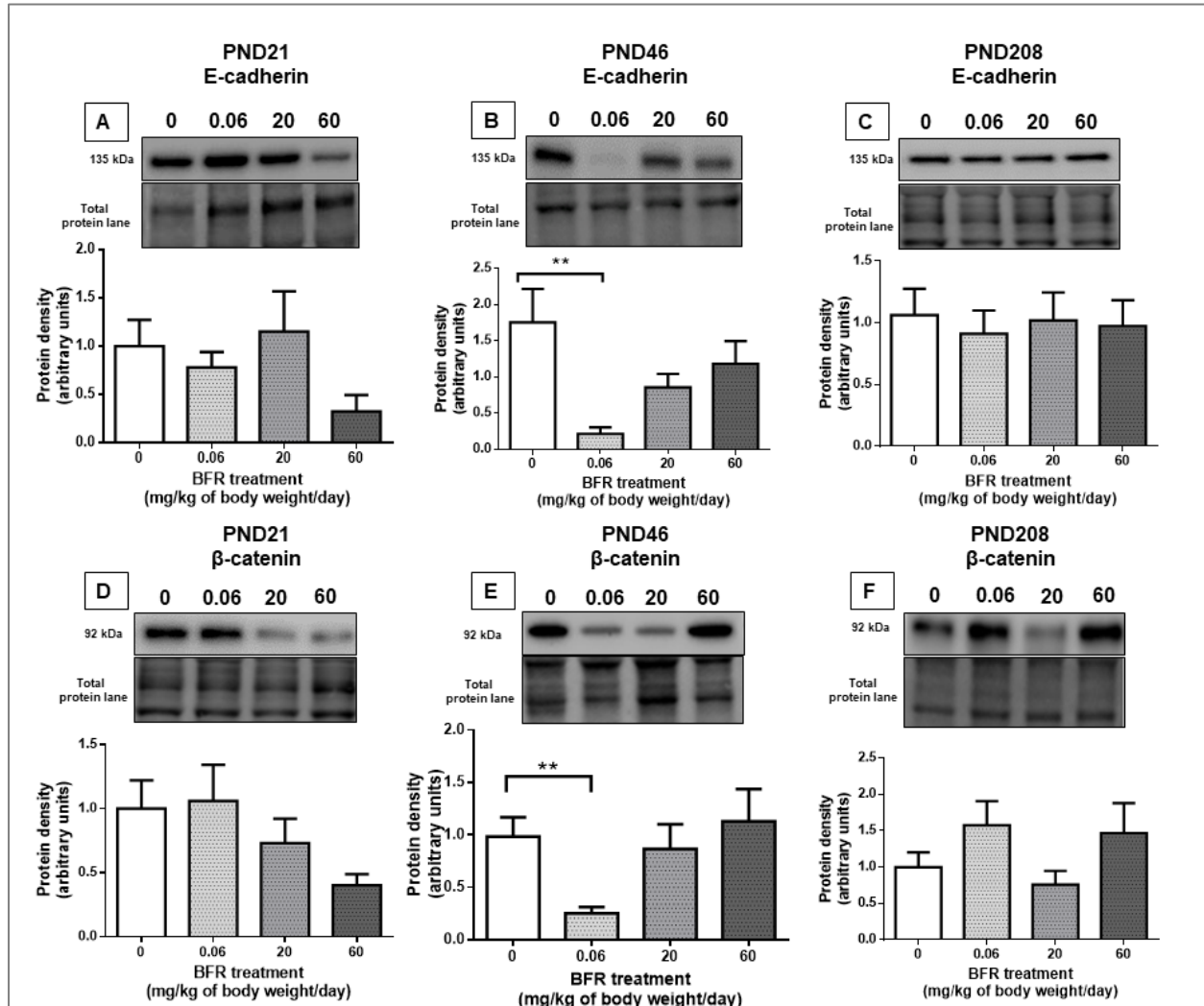


Figure 2-1 : Effects of exposure to a BFR mixtures on adherens junction protein levels in the mammary glands of the offspring

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation with a diet formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show E-cadherin (A-C), β-catenin (D-F), protein expression at PND 21 (A; D), PND 46 (B; E) and PND 208 (C; F). Histograms represent the means ± SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level. *p*-values were calculated with a Kruskal-wallis statistical test or ANOVA. * *p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01.

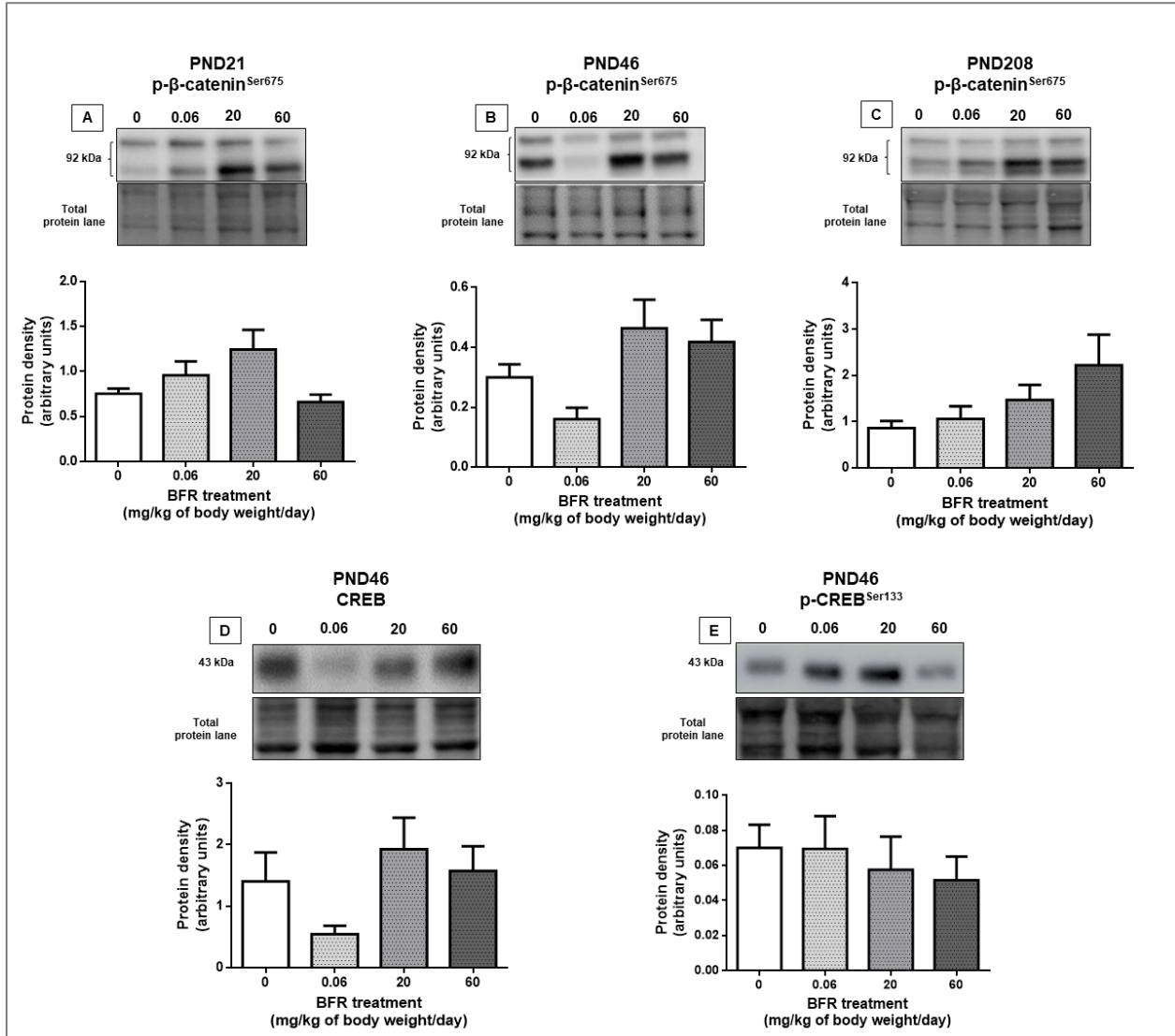


Figure 2-2 : Effects of exposure to a BFR mixture on β -catenin signaling in the mammary glands of the offspring at PND 4

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation to a diet formulated to deliver a daily nominal BFR mixture dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day. Graphs show p- β -cat^{Ser675} (A-C), CREB (D) and p-CREB^{Ser133} (E) protein levels at PND 46. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level. *p*-values were calculated with a Kruskal-wallis statistical test or ANOVA.

BFR treatment dysregulates p-Cx43 protein levels during postnatal development

Adherens and gap junctions form a dynamic junctional nexus during mammary gland development (Dianati *et al.*, 2016; Talhouk *et al.*, 2008). We have shown that β -catenin and E-cadherin interact with Cx43 across mammary development (Dianati *et al.*, 2016). Thus, we assessed the effects of BFR on Cx43 protein levels in the mammary glands of the offspring. Western blot analysis showed no significant impact of the treatments on total Cx43 protein levels at all stages (Figure 3A-C). However, exposure to the lowest dose of BFR, 0.06 mg/kg/day, induced a significant increase in the highly phosphorylated form of Cx43 (P1-P2) at PND 21 (Figure 3D) but a significant decrease of this form at PND 46 (Figure 3E).

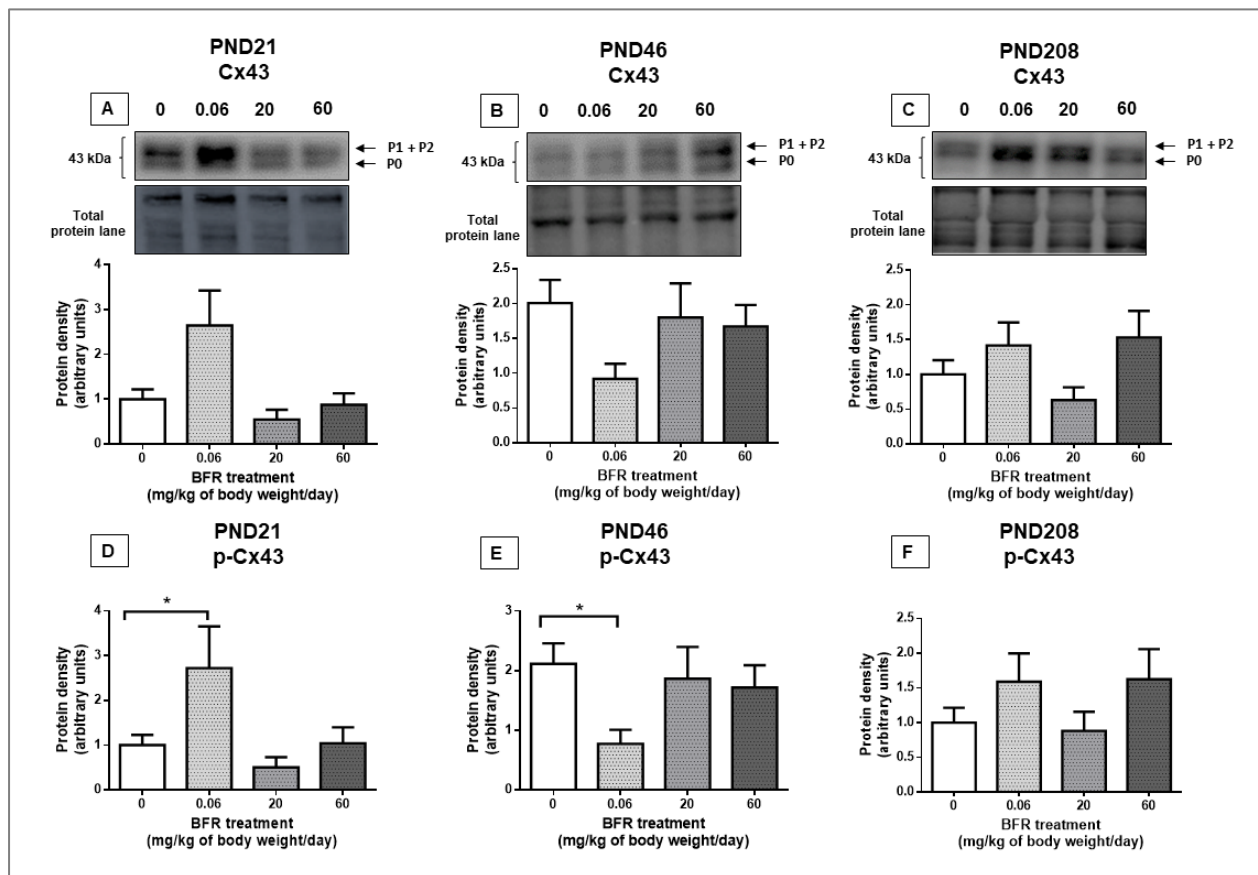


Figure 2-3 : Effects of exposure to a BFR mixture on gap junction protein levels in the mammary glands of the offspring

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation to a diet formulated to deliver a daily nominal BFR mixture dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show Cx43 (A-C) and p-Cx43 (D-F) protein expression at PND 21 (A; D), PND 46 (B; E) and PND 208 (C; F). Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level. *p*-values were calculated with a Kruskal-wallis statistical test or ANOVA. * *p* \leq 0,05.

Exposure to BFR does not affect adherens or gap junction protein localization at PND 46

Because E-cadherin and β -catenin were downregulated by BFR treatment at PND 46, we determined whether their cellular localization was impacted using confocal immunofluorescence. No apparent changes were observed in staining intensity of E-cadherin or β -catenin among the control and treated groups (Figures 4 and 5). p- β -cat^{Ser675} was localized at the membrane and throughout the cytoplasm and co-localized with β -catenin (Figure 5). However, no differences were observed within the treatments. Finally, we counted Cx43 junctional plaques, as p-Cx43 protein levels were reduced in the animals treated with the 0.06 mg/kg/day BFR dose. The numerical reduction in Cx43 junctional plaques in the group treated with the low 0.06 mg/kg/day dose failed to reach statistical significance ($p=0.37$ Figure 6).

BFR treatment has no effect on EMT markers

Downregulation of E-cadherin and junctional proteins is one of the hallmarks of EMT and contributes to breast cancer progression. Because previous reports suggested that perinatal exposure to EDs is linked to breast cancer in adulthood (Fenton, 2012; Fenton *et al.*, 2012), we aimed to determine whether BFR could promote EMT in rat mammary glands at PND 46. We thus determined the protein levels at PND 46 of N-cadherin and vimentin, two mesenchymal markers that are upregulated during EMT. Our western blot analyses showed that neither mesenchymal marker was impacted in the treated groups compared to the control group (Supplementary Figure S1A-B).

Together, these results suggested that the impact of gestational and lactational exposure to BFR is maximally manifested on PND 46 during the pubertal stage of mammary gland development. Because this stage is characterized by complex hormonal changes and because BFR can act as endocrine disruptors, we then examined whether the levels of hormonal receptors were affected by the treatments at PND 46.

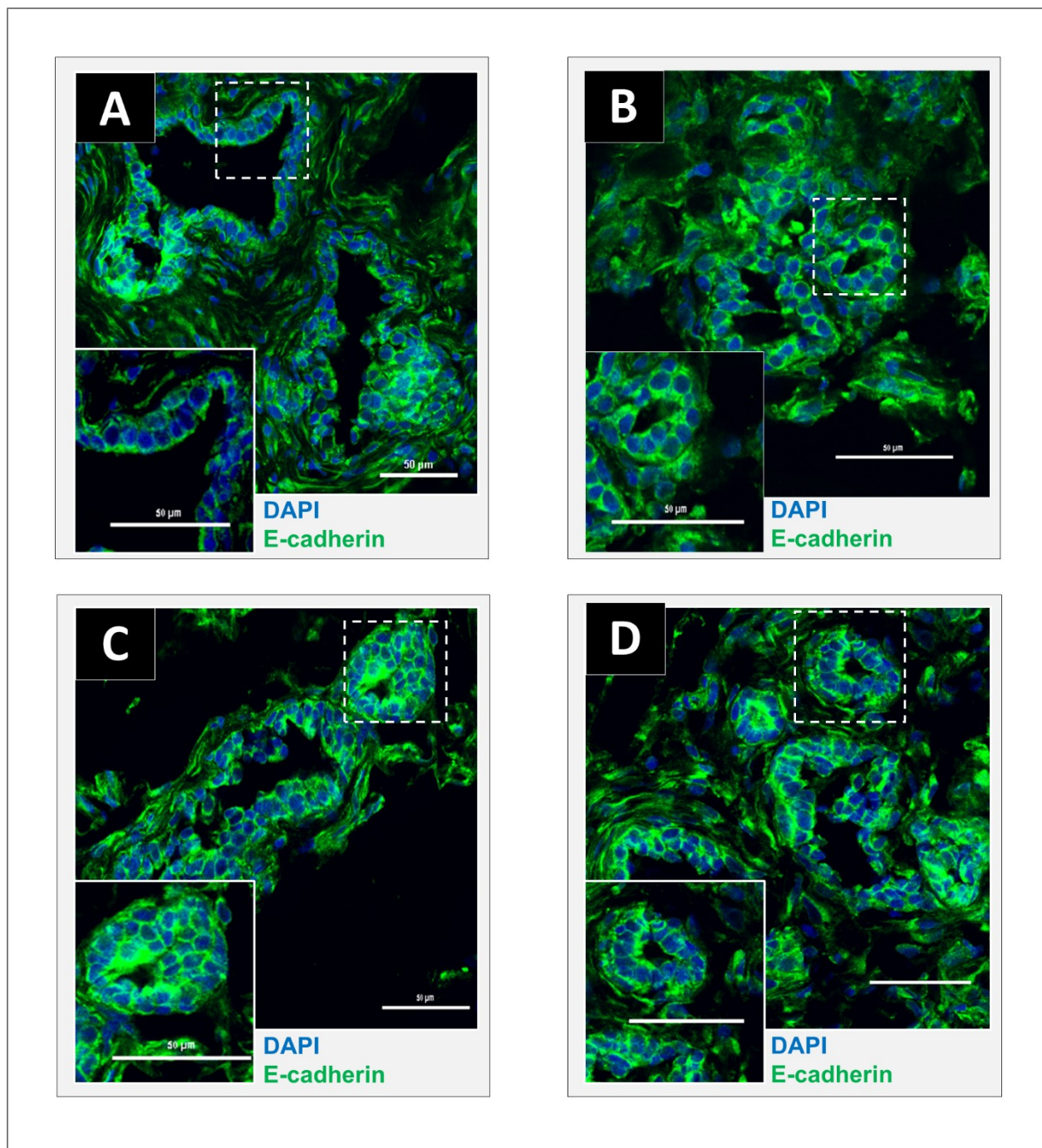


Figure 2-4 : Effects of exposure to a BFR mixture on E-cadherin localization in the mammary glands of offspring at PND 46

Cryosections were cut (7 µm) and processed for immunofluorescence staining from vehicle controls (A) or animals from the 0.06 (B), 20 (C) or 60 (D) mg/kg/day BFR mixture treatment groups. Nuclei were stained with DAPI (blue). E-cadherin (green) was localized at the membrane and no apparent changes were noted in its protein levels or localization among groups. Images were obtained with a Nikon A1R+ equipped with a spectral detector and analyzed using NIS-elements software.

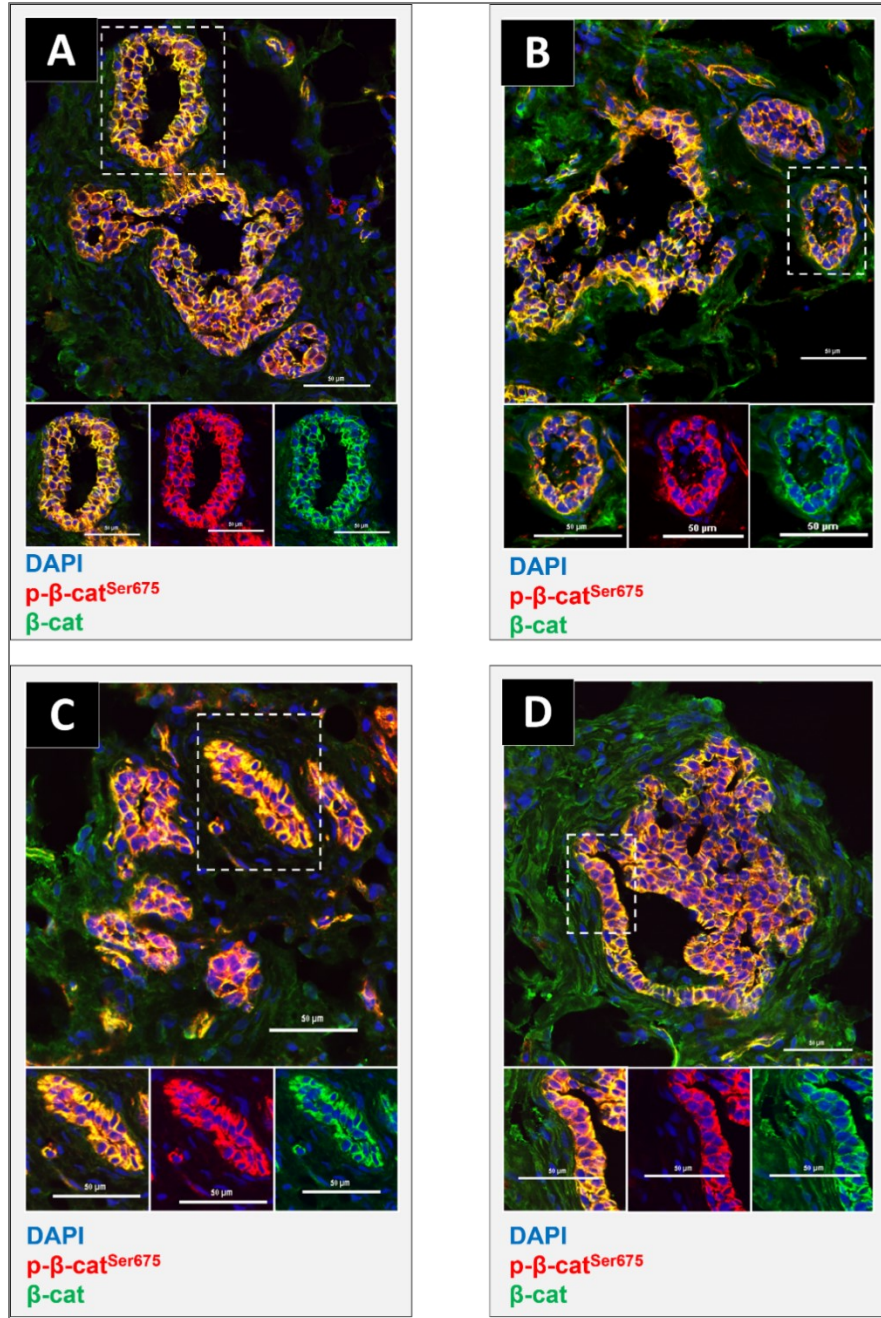


Figure 2-5 : Effects of exposure to a BFR mixture on endogenous β -catenin and p- β -catser675 localization in the mammary glands of offspring at PND 46

Cryosections were cut (7 μ m) and processed for immunofluorescence staining from vehicle controls (A) or animals from the 0.06 (B), 20 (C) or 60 (D) mg/kg/day BFR treatment groups. Nuclei were stained with DAPI (blue). β -catenin (green) and p- β -cat^{Ser675} (red) co-localized at the membrane although no apparent change was noticed on their protein levels or localization among groups. Images were obtained with a Nikon A1R+ equipped with a spectral detector and analyzed using NIS-elements software.

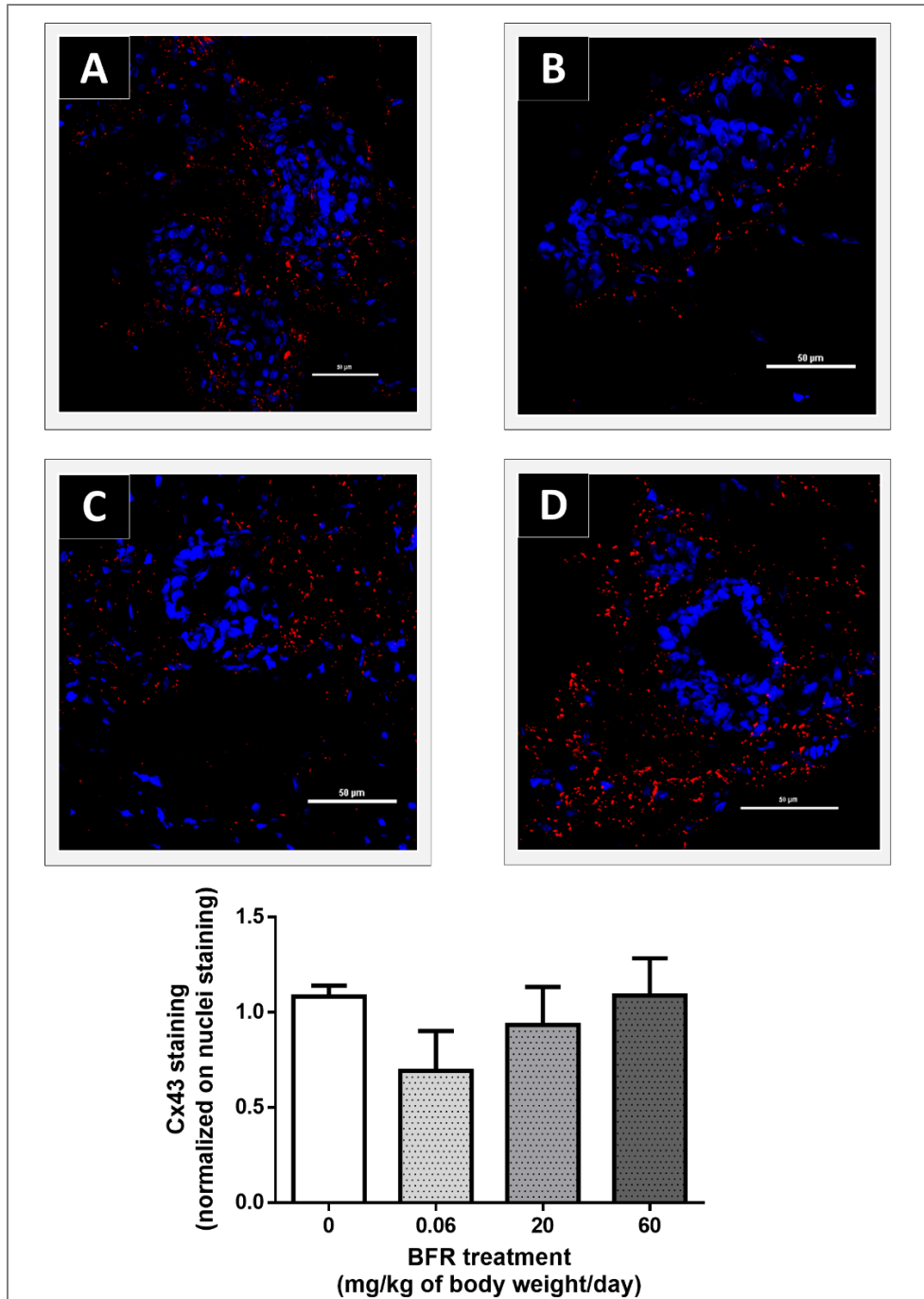


Figure 2-6 : Effects of exposure to a BFR mixture on Cx43 localization in the mammary glands of offspring at PND 46

Cryosections were cut (7 µm) and processed for immunofluorescence staining from vehicle controls (A) and animals from the 0.06 (B), 20 (B) or 60 (C) mg/kg/day BFR mixture treatment groups. Nuclei were stained with DAPI (blue). Cx43 junctional plaques (red) were localized at the membrane; the number of plaques tended to decrease in animals treated with the 0.06 mg/kg/day dose compared to control animals. Histograms represent the means ± SEM (n=4 pups from 4 different litters) of the number of junctional plaques normalized on the number of nuclei. Images were obtained with a Nikon A1R+ equipped with a spectral detector and analyzed using NIS-elements software.

BFR treatment downregulates thyroid hormone receptor alpha1 (THR α 1) protein levels, whereas estrogen and progesterone receptors are not affected at PND 46

Estrogens and progesterone act *via* their receptors ER α and PR-B to drive mammary elongation and side branching, respectively (Briskin, 2008; Briskin & Ataca, 2015). Western blot analysis showed no effects on ER α and ER β protein levels (Figure 7A-B). A numerical increase in PR-A and PR-B levels was seen in glands from 0.06 mg/kg/day exposed PND 46 females, but these results did not reach statistical significance ($p=0.46$ (PR-A) and $p=0.08$ (PR-B); Figure 7C).

Thyroid hormones also play an important role in the development and function of mammary glands (Conde *et al.*, 2006; Neville *et al.*, 2002; Vonderhaar & Greco, 1979). This BFR treatment significantly reduced serum T4 in dams exposed to the highest dose of the BFR mixture, as well as in female pups perinatally exposed to the two highest doses at PND 21 (Tung *et al.*, 2016). Therefore, we analyzed whether mammary glands thyroid hormone receptors α 1 (THR α 1) and β (THR β) were affected in PND 46 females (Figure 8). Levels of THR β protein remained unaffected (Figure 8B), while corresponding THR α 1 levels were significantly downregulated only in the animals treated with the 0.06 mg/kg/day dose of BFR compared to the control group (Figure 8A).

BFR treatment disrupts the proliferation-apoptosis balance at PND 46

Puberty is a period of dynamic growth, tissue organization and apoptosis during ductal development of the body cells of the TEBs, leading to the cavitation of ducts (Paine & Lewis, 2017). At age PND 46, there is a continued postpubertal mammary gland growth with terminal ends beginning to differentiate at the edges of the fat pad (Filgo *et al.*, 2016). We thus assessed proliferation and apoptosis by analyzing proliferating cell nuclear antigen (PCNA), PARP, cleaved-PARP and cleaved caspase-3 protein levels. A non-significant increase in PCNA ($p=0.57$) in the animals treated with the 0.06 mg/kg/day dose was observed (Figure 9A). In addition, western blot results showed no effects on the cleaved-PARP protein levels (Figure 9D), although PARP levels tended to decrease ($p=0.16$) (Figure 9C). However, a significant decrease was observed in the cleaved caspase-3 protein levels in the animals treated with the low BFR dose compared to the control group, while an increase was observed at the medium dose (Figure 9B). These results suggest that the low dose of BFR dysregulates the proliferation-apoptosis balance in the PND 46 female mammary gland.

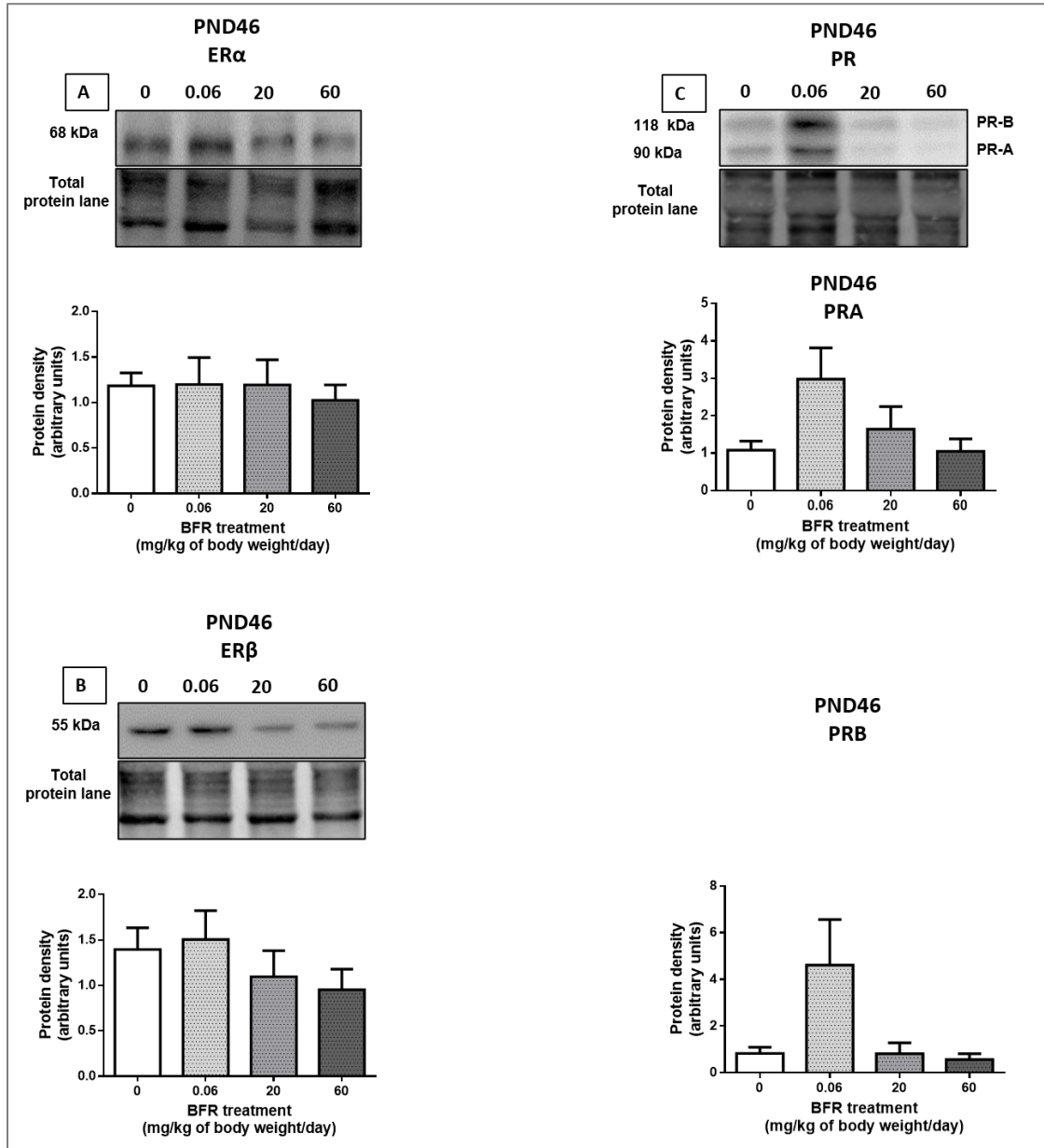


Figure 2-7 : Effects of exposure to a BFR mixture on estrogen and progesterone receptors protein levels in the mammary glands of offspring

Effects of exposure to a BFR mixture on estrogen and progesterone receptors protein levels in the mammary glands of offspring. Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation to a dietary BFR mixture formulated to deliver daily nominal mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show ER α (A), ER β (B) and PR A/B (C) protein expression at PND 46. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level.

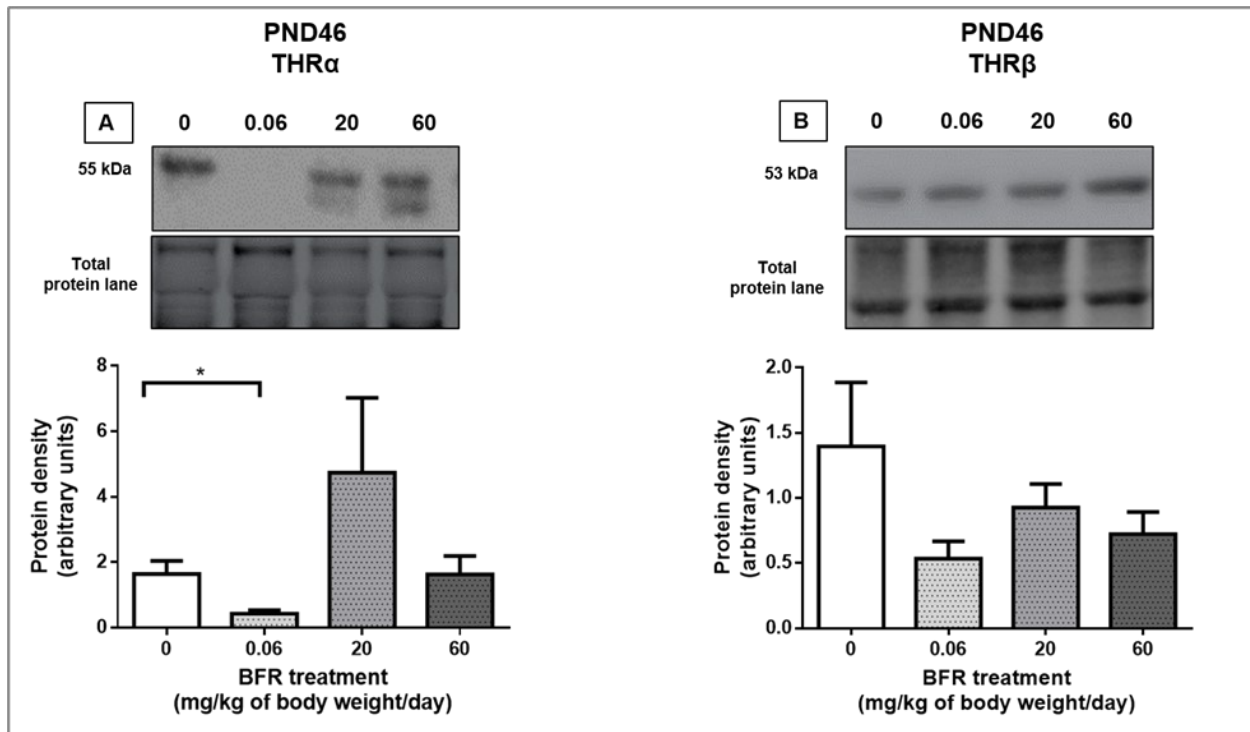


Figure 2-8 : Effects of exposure to a BFR mixture on the protein levels of thyroid hormone receptors in the mammary glands of offspring

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation to a dietary BFR mixture formulated to deliver a daily nominal dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show THR α 1 (A) and THR β (B) protein expression at PND 46. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level. *p*-values were calculated with a Kruskal-wallis statistical test or ANOVA. * *p* \leq 0,05.

Exposure to BFR does not affect mammary gland morphogenesis at PND 46

Finally, we assessed whether the observed effects of the low dose of BFR on junctional proteins, hormone signaling, proliferation and apoptosis affected global morphogenesis of the mammary gland at puberty. Consistent with normal development of the mammary gland at PND 46, TEBs were numerous, ducts were reaching toward the periphery of the fat pad and side branches were abundant in whole mount analysis (supplementary figure S2 A; B). No effects of the BFR were observed on epithelial elongation (supplementary figure S2 A), epithelial surface area (supplementary figure S2 B) or the number of TEBs (supplementary figure S2 C) in treated animals. In addition, exposure to BFR had no effects on either body weight or on mammary gland weight (Supplementary figure S2 D-F). Together, these data suggested that although the treatment disrupted junctional proteins, THR α 1, and proliferation-apoptosis homeostasis, gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR did not impact global mammary gland development of the female offspring at PND 46.

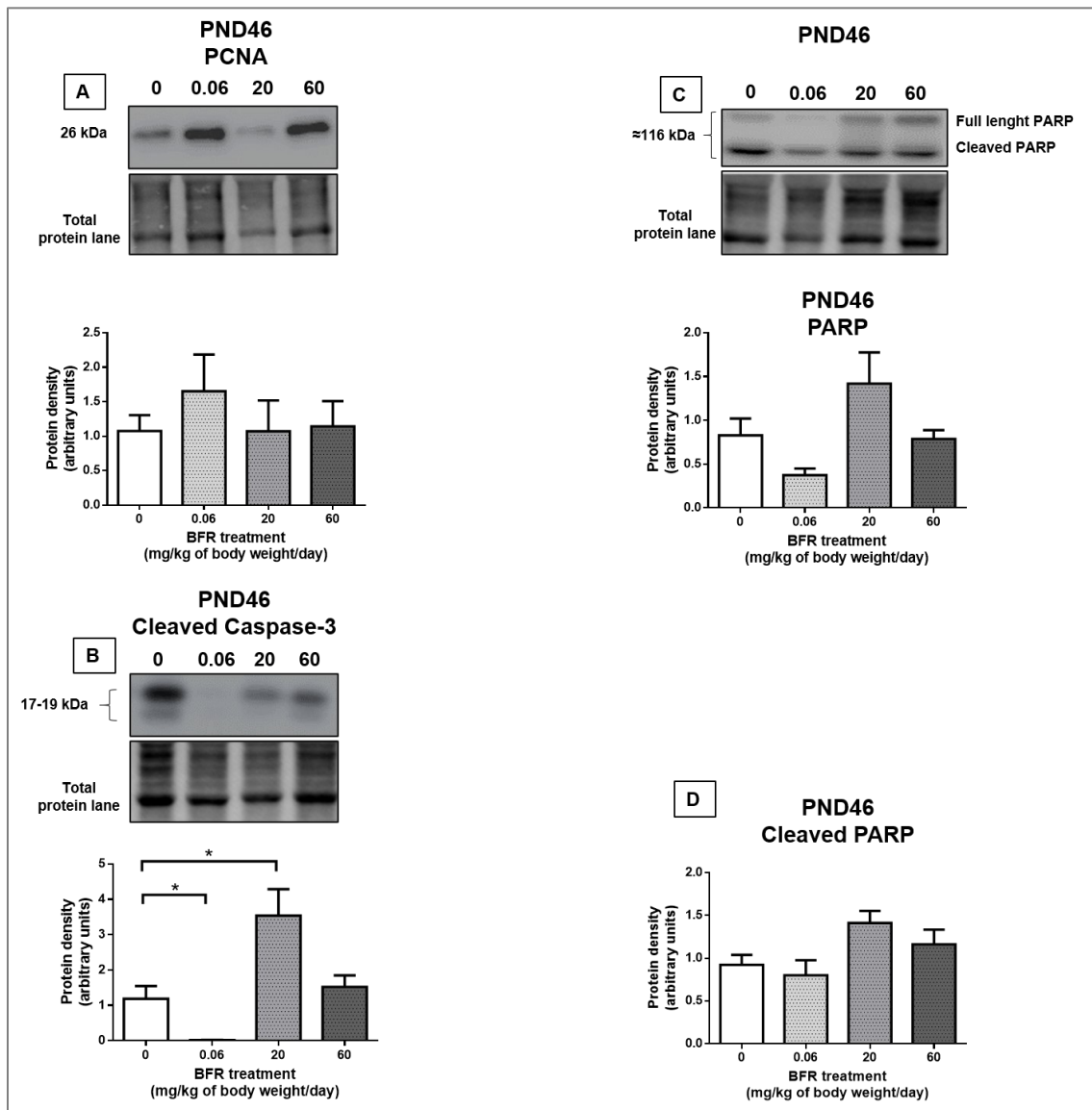


Figure 2-9 : Effects of exposure to a BFR mixture on protein levels of proliferation and apoptosis markers in the mammary glands of offspring

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation to a dietary BFR mixture formulated to deliver a daily nominal dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show PCNA (A); Cleaved Caspase-3 (B), PARP (C) and Cleaved-PARP (D) protein levels at PND 46. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level. p-values were calculated with a Kruskal-wallis statistical test or ANOVA. * p \leq 0,05.

2.4 Discussion

Adherens junctions are sensitive targets of BFR exposure

Exposure to the lowest dose of the BFR mixture dysregulated proteins from the adherens junctions in both this study and in our previous study. In dams exposed during pregnancy and

lactation, we showed decreases in the expression of p- β -cat^{Ser675} and its interaction with E-cadherin at the cell membrane (Dianati *et al.*, 2017). While the levels of β -catenin were also decreased, the effect was not statistically significant. In female pups from these same dams, the mammary glands collected at PND 46 showed levels of E-cadherin and β -catenin that were significantly decreased. These results suggest that adherens junctions are especially sensitive to the effects of BFR. Many studies have demonstrated a decrease in adherens junction protein levels upon exposure to pollutants. For example, E-cadherin downregulation was also detected in human mammary stem cells (Yang *et al.*, 2013), in rat dorsolateral prostate (Huang *et al.*, 2018) and colon cancer cells (Chen *et al.*, 2015) when exposed to bisphenol A, another endocrine-disrupting chemical that has been studied extensively. In addition, our previous results showed a similar later downregulation of E-cadherin and of hepatic connexins 45 days after the last exposure to hexachlorobenzene in female rat livers (Plante *et al.*, 2002; Plante *et al.*, 2005).

Together, these findings demonstrated that the BFR treatment disrupted adherens junctions both in the dams' lactating glands and in the mammary glands of the pups exposed *in utero* and throughout lactation. Interestingly, the decrease in adherens junction protein levels seems to involve dysregulation of PKA signaling in dams (Dianati *et al.*, 2017) but not in their offspring at PND 46 because p- β -cat^{Ser675}, CREB and p-CREB levels were not affected by exposure to BFR. These findings support the hypothesis that exposure to EDs, such as BFR, can have different effects based on the window of exposure but that adherens junctions seem to be a prime target (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Adherens junctions play a major role in mammary gland development. As a result, disruption of E-cadherin in the normal mammary gland has been associated with impaired epithelial survival and function of the gland (Boussadia *et al.*, 2002; Delmas *et al.*, 1999), and to disorganization of the luminal layer of the mammary gland in mice (Daniel *et al.*, 1995). E-cadherin interacts with β -catenin to form a cell-cell adhesion complex (Andrews *et al.*, 2012). In addition, β -catenin acts as a transcription factor that mediates the canonical WNT/ β -catenin signaling pathway (Incassati *et al.*, 2010a). The E-cadherin/ β -catenin membrane complex prevents β -catenin translocation to the nucleus, where it induces the expression of genes that promote cell proliferation and survival (Incassati *et al.*, 2010a). Dysregulation of β -catenin signaling led to impaired lobuloalveolar development and has been significantly correlated with poor clinical outcome in breast cancer (Dolled-Filhart *et al.*, 2006; Tepera *et al.*, 2003a). Moreover, loss of β -catenin from the cell-cell adhesive complex and its cytoplasmic accumulation and nucleus translocation occur during breast cancer progression (Incassati *et al.*, 2010a; Teuliere *et al.*,

2005). Despite our observations of molecular changes in adherens junctional proteins, we did not observe any morphological effects on mammary gland development in either dams or pups. Whether these changes have long-term effects on breast cancer promotion remains to be determined.

Similar to what has been observed in dams, p- β -cat^{Ser675} was localized not only to the cell membrane but also throughout the cytoplasm at PND 46. Phosphorylation of β -catenin at Ser675 was shown to prevent its degradation and promote its nuclear transcriptional activity (Incassati *et al.*, 2010a; Spirli *et al.*, 2013; Taurin *et al.*, 2006). To date, only a few articles have studied the role and/or expression of p- β -cat^{Ser675}; most of these are *in vitro* studies (Estus *et al.*, 2016; Fanti *et al.*, 2014; Hino *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2012). To our knowledge, our studies are the first to determine the localization of p- β -cat^{Ser675} in mammary gland tissues. Additional studies are thus required to fully understand the role of this phosphorylation site *in vivo* and its impact on mammary gland development and function.

T4 levels and THR α 1 are decreased upon exposure to BFR during the gestation-lactation period in dams and in offspring at PND 46, respectively

Many studies have demonstrated an effect of BFR on thyroid hormone homeostasis, including decreases in T4 levels and increases in thyroid stimulating hormone (TSH) levels, in both exposed pregnant rats and their female offspring (Kim *et al.*, 2013; Kodavanti *et al.*, 2010b; Tung *et al.*, 2016; van der Ven *et al.*, 2006). However, to the best of our knowledge, the effects of BFR on THR protein expression in the mammary gland has not been assessed before this. Previous reports suggested that decreased serum T4 levels could be linked to a competition between some BFR and T4 for binding to human transthyretin, the T4-transporting protein in plasma, as demonstrated *in vitro* (Hamers *et al.*, 2006; Meerts *et al.*, 2000). Alternatively, exposure to PBDEs can increase expression of enzymes that metabolize T4, leading to increased removal from circulation and reduced serum levels (Szabo *et al.*, 2009). Elevated activity of enzymes associated with these pathways was observed in the livers of exposed dams and pups in whom reduced T4 was observed, suggesting that BFR-enhanced hepatic metabolism of TH underlies the observed reduction in serum T4 (Tung *et al.*, 2016). However, no change in circulating T4 was observed in animals exposed to the 0.06 mg/kg diet at any stage of development.

Our results show a significant downregulation of THR α 1, but not THR β , in PND 46 female offspring exposed *in utero* and during lactation to the BFR mixture but only in animals from the 0.06 mg/kg diet group. Unlike ER and PR, the expression of THRs as predictive markers of cancer

has been assessed poorly (Ditsch *et al.*, 2013; Jerzak *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2002b; Smallridge & Latham, 1980), and the exact role of THRs in breast cancer remains to be elucidated. High THR α expression has been associated with disease-free survival in women with invasive breast cancer (Conde *et al.*, 2006), although the specific role of THR α isoforms was not assessed. Other studies have shown that THR α 2 expression correlates with survival (Ditsch *et al.*, 2013), and patients who had low THR α 1 and high THR α 2 expression had the highest overall survival (Jerzak *et al.*, 2015).

Thyroid hormones/THRs are involved in mammary gland development and differentiation (Hovey *et al.*, 1999; Vonderhaar & Greco, 1979). Specifically, they have been shown to regulate tertiary epithelial branching and lobuloalveolar development in mice (Hovey *et al.*, 2002). Alteration of thyroid hormone/THR signaling has also been associated with impaired mammary development (Hovey *et al.*, 1999; Vonderhaar & Greco, 1979) or breast cancer (Conde *et al.*, 2006; Ditsch *et al.*, 2013; Jerzak *et al.*, 2015). Whether the observed changes in thyroid signaling in dams or female pups at PND 21 and PND 46 have long-term effects on mammary development and carcinogenesis remains to be investigated. In addition, the relationship between the effects observed in dams and those observed later in pups is intriguing.

Gestational and lactational exposure to BFR dysregulates p-Cx43 protein levels later in postnatal development

Many studies have demonstrated that components of adherens junctions interact, co-localize and immunoprecipitate with components of GJ (Dianati *et al.*, 2016; Talhouk *et al.*, 2013; Talhouk *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2001). Moreover, E-cadherin and Cxs are downregulated concomitantly in many tumors and can be regulated through common pathways (Plante *et al.*, 2006; Plante *et al.*, 2005). Because BFR exposure disrupted adherens junction proteins, we investigated whether Cx43, the only Cx that is expressed at significant levels at PND 21, PND 46 and PND 208, was impacted (Dianati *et al.*, 2016; McLachlan *et al.*, 2007). Cx43 gap junctions are essential for mammary gland development and function (Plante & Laird, 2008). An autosomal dominant mutant of *Gja1*, the gene encoding Cx43, led to low levels of Cx43, specifically P1-P2 species, delayed mammary development at puberty and ultimately impaired milk ejection at parturition (Plante & Laird, 2008). Although Cx43 has been considered a tumor suppressor for a long time, its role in breast cancer is still controversial (Busby *et al.*, 2018; McLachlan *et al.*, 2007). We observed no effects of the BFR on total Cx43 protein levels. However, the highly phosphorylated form of Cx43, widely called P1-P2, was significantly upregulated at PND 21. Current investigations are ongoing to further elucidate the consequences of p-Cx43

upregulation at PND 21. In contrast, consistent with the observed decrease in adherens junction proteins, P1-P2 Cx43 species were downregulated at PND 46. Cx43 phosphorylation is typically associated with its localization at the cell membrane and with functional GJIC (Laird, 2006; Lampe & Lau, 2004). P1-P2 were shown to be typically enriched in gap junction plaques, while the Cx43-P0 species are generally found in intracellular compartments (Laird, 2006). Thus, we examined whether membrane localization was also impacted at PND 46. We observed a numerical reduction in Cx43 gap junctional plaques in the low 0.06 mg/kg/day diet, but this decrease was not statistically significant. Interestingly, a decrease in Cx43 was observed both at the mRNA and protein levels in testes of males exposed to BDE-209 during lactation at PND 21 and PND 28 (Sarkar & Singh, 2017). Similarly, another BFR - tetrabromobisphenol A (TBBPA) - was shown to inhibit GJIC in an epithelial liver cell line (Samuelsen, 2014). The long-term consequences and the mechanisms involved in p-Cx43 dysregulation by BFR in mammary glands remain to be determined.

Interconnection between the effects of BFR treatment on cell-cell interactions and thyroid homeostasis

Exposure to BFR resulted in decreased levels of the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin, as well as the gap junction protein p-Cx43, concomitant with a significant decrease in THR α 1 protein expression at PND 46. These results suggest a relationship between THR α 1 signaling and junctional protein regulation in the mammary gland. A few studies have investigated the regulation of junctional proteins in other tissues. For instance, THR α 1 was shown to stimulate the transcription of the *Cttnb1* gene, the gene encoding β -catenin, in precursor cells of the mouse intestinal epithelium through its binding to an intronic TRE element, and hypothyroidism led to downregulation of *Cttnb1* expression and translation (Plateroti *et al.*, 2006). T3 also increased the stabilization and transcriptional activity of β -catenin in rodent liver cells, thus promoting proliferation (Fanti *et al.*, 2014). Interestingly, in the same study, T3 treatment increased β -catenin phosphorylation at Ser675; administration of a PKA inhibitor *in vivo* and *in vitro* inhibited p- β -cat^{Ser675} and simultaneously decreased Cyclin-D1 expression, blocking hepatocyte proliferation (Fanti *et al.*, 2014). T3 was reported to regulate E-cadherin and β -catenin expression in the stomach during the metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum* (Izaguirre & Casco, 2010). Similarly, links between Cx43 expression and thyroid hormones have been reported. T3 directly stimulated Cx43 expression in brook trout Sertoli cells (de Montgolfier *et al.*, 2011). In addition, Cx43 knockdown was associated with a significant increase in β -catenin transcriptional activity and enhanced human neuronal differentiation (Rinaldi *et al.*, 2014).

However, to the best of our knowledge, no study has examined the interconnection between thyroid hormones/THR signaling and β -catenin, E-cadherin and Cx43 expression in the mammary gland. Further *in vivo* and *in vitro* investigations will help elucidate these relationships.

BFR treatment induces dysregulation of the balance between apoptosis and proliferation but has no effect on global mammary gland development

Most of the effects of our BFR treatment occurred at PND 46, a period of continued cell proliferation and apoptosis for ductal elongation and side branching (Humphreys *et al.*, 1996; Masso-Welch *et al.*, 2000; Paine & Lewis, 2017; Williams & Daniel, 1983). We thus examined the impact of BFR exposure on apoptosis and proliferation using cleaved caspase-3 and PARP and PCNA levels. At the low dose of BFR, the levels of the two markers of apoptosis decreased, while the proliferation marker tended to increase, suggesting a dysregulation of the proliferation-apoptosis balance. Interestingly, independent studies have demonstrated that in MCF-7 breast cells, concomitant exposure to DE-71 and 17 β -estradiol reduced apoptosis (Kwiecinska *et al.*, 2011), while some PBDEs stimulated proliferation (Li *et al.*, 2012; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b), thus supporting our results. Inhibition of caspase-3 activity has been shown to impair TEB cavitation in mouse mammary glands at puberty (Sreekumar *et al.*, 2017).

Given the disruption of cell-cell interactions, thyroid hormone homeostasis and proliferation-apoptosis balance, we sought to determine the effects of our BFR treatment on mammary gland development. Our results suggest that global epithelial growth was not affected by exposure to the BFR mixture, and no differences were observed in mammary weight, epithelial elongation and surface, or TEB number at PND 46. In contrast, a previous study showed that perinatal exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71, induced a significant delay in mammary gland development in female offspring, as demonstrated by an inhibition of epithelial outgrowth at PND 21 and fewer TEBs and branches present at the time of puberty (Kodavanti *et al.*, 2010a). The discrepancy between these results and ours could be due the many differences in study design (Kodavanti *et al.*, 2010b). While using DE-71 alone can provide information on the direct impact of this mixture, our BFR mixture allows for a better characterization of the impact of BFR in terms of environmental exposure. To the best of our knowledge, our study is the first to report the effects of gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR on mammary gland development and signaling pathways in offspring.

BFR treatment induces low-dose effects and nonmonotonic response

Most of the effects of our BFR treatment has been observed consistently in the mammary gland of the dams (Dianati *et al.*, 2017) as well as their pups at PND 21 and PND 46 after exposure to our lowest dose treatment group. Low-dose effects were defined as doses that are in the range of human exposure, or doses below those traditionally tested in toxicological studies by the scientific panel of the National Toxicology Program (Melnick *et al.*, 2002). Number of studies using our environmentally-relevant mixture of BFR show significant low-dose effects in different biological processes and tissues such as plasma hormones levels, bone formation, thyroid gland and ovaries structure and maturation, as well as in neurodevelopmental-related behavior in both directly exposed females, males and their offspring across development (Berger *et al.*, 2014; Lefevre *et al.*, 2016a; Tung *et al.*, 2017). Several other studies using technical commercial mixture have shown low-dose effects of PBDEs *in vitro* and in *in vivo* (Chen *et al.*, 2018a; Lilienthal *et al.*, 2006; Talsness *et al.*, 2008). It is well established in the endocrine literature that as natural hormones, increasing number of endocrine disruptors act also at low doses (Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003). Non-monotonic dose-response curve is related to endocrine disruptors and has been observed in mammary gland following our environmentally-relevant exposure to BFR and in several *in vitro*, *in vivo* and epidemiological studies for PBDEs, DES, BPA, DEHP, PCB, dioxins and DDT among others (Ahn *et al.*, 2005; Alm *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018a; Dianati *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 1996; Grande *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2011; Lefevre *et al.*, 2016a; Lim *et al.*, 2008; Lind & Lind, 2011; Love *et al.*, 2003; Mandrup *et al.*, 2016; Melzer *et al.*, 2010; Palanza *et al.*, 2001; Talsness *et al.*, 2008; Tung *et al.*, 2017; vom Saal *et al.*, 1997). This frequent occurrence of low-dose effects and nonmonotonicity in biological phenomena, and specially in mammary gland development highlight the importance of understanding the underlying mechanisms and strengthen the overall weight of evidence supporting inclusion of low doses in future endocrine-disrupting chemical-related studies and risk assessment.

2.5 Conclusion

Overall, our results showed that while no effect was observed on global mammary gland development, expression levels of the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin and gap junction protein p-Cx43, THR α 1 and cleaved caspase-3 were downregulated at PND 46 in the animals that received the lowest dose of BFR *in utero* and during lactation. Modifications, such as altered hormone signaling, at the time of puberty have been shown to increase the risk of breast cancer development (Fenton *et al.* 2012). In this study, the timing of the observed effects may have important long-term consequences, as the pubertal period is known to be sensitive for

mammary development and carcinogenesis. Further analyses will allow us to determine the mechanisms involved in the effects of BFR on cell-cell interactions, thyroid homeostasis and the apoptosis-proliferation balance in the mammary gland, as well as the long-term consequences on mammary gland development and function.

2.6 Acknowledgements

Martine Caplette and Elodie Renard are thanked for their technical assistance. This study was supported by CRSNG, FRQS and QBCF (IP), MESRSCI, RQR-CIRD (RJG), FUAFI (ML) and CIHR (ML, BH, BR, MW).

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare

2.7 Supplementary Data Description

Supplementary data present different markers that were not affected by the BFR mixture treatments. These data include mammary gland/body weight ratios and the levels of markers of the epithelial-mesenchymal transition in offspring. Tables of the different antibodies used in this study are also included.

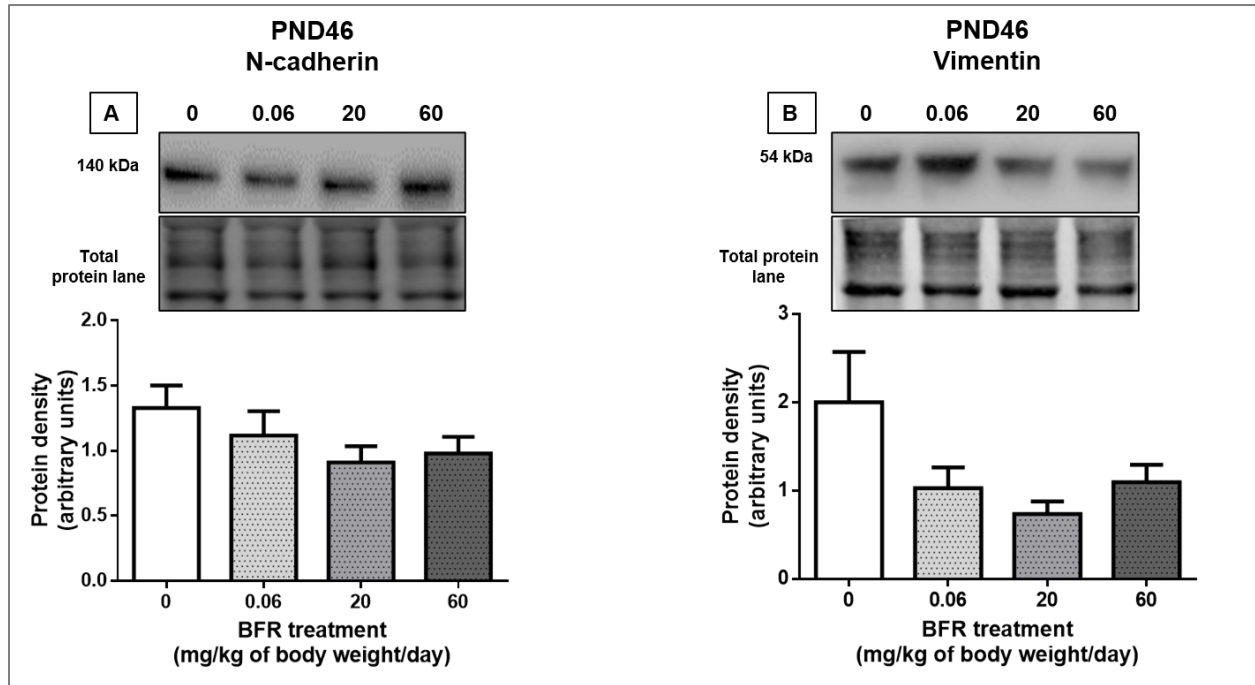


Figure 2-10 : Effects of exposure to a BFR mixture on epithelial to mesenchymal transition markers in the mammary glands of PND 46 offspring

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation to a dietary BFR mixture formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show N-cadherin (A) and Vimentin (B) protein expression at PND 46. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level.

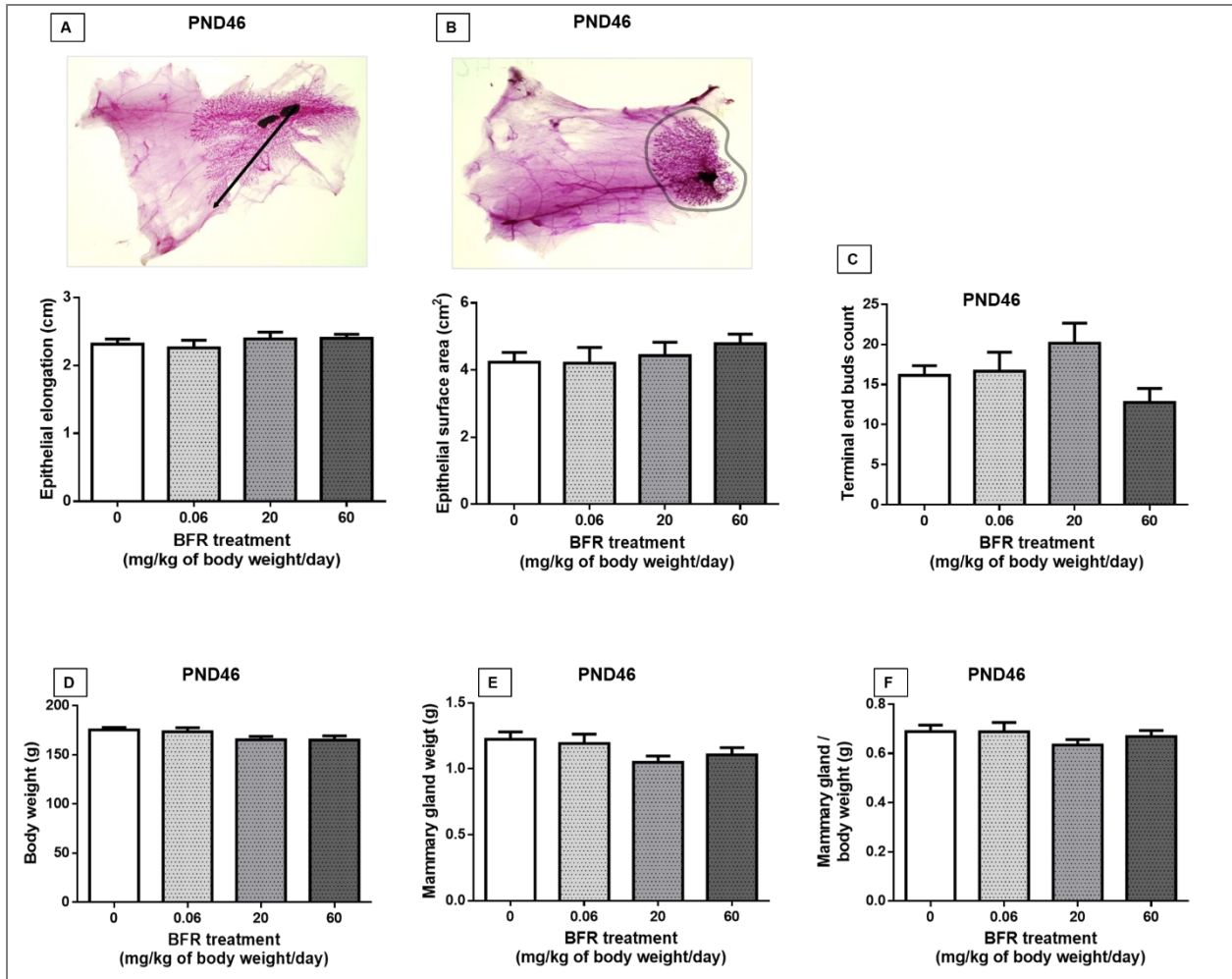


Figure 2-11 : Effects of exposure to a BFR mixture on epithelial surface area and elongation of the mammary gland in PND 46 offspring.

Whole mounts of mammary glands were analyzed with Image J software. Mammary epithelium elongation or surface area were quantified at PND 46 (A; C) from control pups or pups exposed during gestation and lactation to a dietary BFR mixture intended to deliver nominal BFR mixture dose of 0.06, 20, or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Elongation was measured from the lowest lymph node to the end of the longest branch of the epithelium (A). Surface area was measured by tracing the best-adjusted contour of the mammary epithelium at PND 46 (C). Terminal end buds were counted in PND 46 mammary glands using Image J software (C). Total body or mammary gland weight were measured at time of sacrifice of PND 46 (D; E). The mammary gland weight of PND 46 (F) were normalized to the total body weight. Histograms represent the mean \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter). P-values were calculated with a Kruskal-wallis or an ANOVA statistical tests

Tableau 2-1 : Supplementary table - Antibodies used for western blot analysis

| Target protein | Description/Host | Dilution | Catalogue number | Manufacturer |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| E-cadherin | (4A2) Mouse | 1/1000 | 14472 | Cell signaling |
| β -catenin | (L54E2) Mouse | 1/1000 | 8480 | Cell signaling |
| Phospho- β -Catenin (Ser675) | (D2F1) Rabbit | 1/1000 | 4176 | Cell signaling |
| Cx43 | Rabbit | 1/500 | C6219 | Sigma Aldrich |
| Cx26 | Mouse | 1/750 | 33-5800 | Invitrogen |
| ER α | Rabbit | 1/400 | Ab75635 | Abcam |
| ER β | Rabbit | 1/500 | SC-8974 | Santa Cruz biotechnology |
| PR A/B | Rabbit | 1/500 | Ab16661 | Abcam |
| Thyroid Hormone Receptor α 1 | Rabbit | 1/500 | Ab53729 | Abcam |
| Thyroid Hormone Receptor β | Rabbit | 1/500 | Ab196484 | Abcam |
| N-cadherin | Rabbit | 1/1000 | 4061 | Cell signaling |
| Vimentin | Rabbit | 1/1000 | 5741 | Cell signaling |
| CREB | (C21) Rabbit | 1/500 | Sc-186 | Santa Cruz biotechnology |
| Phospho-CREB(Ser133) | (87G3) Rabbit | 1/1000 | 9198 | Cell signaling |
| PARP | Rabbit | 1/1000 | 9532 | Cell signaling |

| | | | | |
|-------------------------------------|--------|---------|-------|----------------|
| Cleaved Caspase-3 | Rabbit | 1/1000 | 9661 | Cell signaling |
| PCNA | Mouse | 1/2000 | 2586S | Cell signaling |
| Secondary antibodies | | | | |
| Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody | | 1/10000 | 7074s | Cell signaling |
| anti-mouse IgG HRP-linked antibody | | 1/10000 | 7076s | Cell signaling |

Tableau 2-2 : Supplementary table 2 - Antibodies used for immunofluorescence blot analysis

| Target protein | Description/Host | Dilution | Catalogue number | Manufacturer |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|---------------------|
| E-cadherin | (4A2) Mouse | 1/1000 | 14472 | Cell signaling |
| β -catenin | (L54E2) Mouse | 1/1000 | 8480 | Cell signaling |
| Phospho- β -Catenin (Ser675) | (D2F1) Rabbit | 1/1000 | 4176 | Cell signaling |
| Cx43 | Rabbit | 1/500 | C6219 | Sigma Aldrich |
| Secondary antibodies | | | | |
| anti-rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor 488 | | 1/1000 | 4412s | Cell signaling |
| anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor 555 | | 1/1000 | 4409s | Cell signaling |

3 DEUXIÈME ARTICLE

***In utero* and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants induces a premature development of the mammary glands**

Une exposition *in utero* et durant l'allaitement à un mélange de retardateurs de flammes bromés représentatif de l'exposition environnementale résulte en un développement mammaire prématuré

Auteurs :

Rita-Josiane Gouesse¹, Elham Dianati¹, Alec McDermott¹, Michael G. Wade², Barbara Hales³, Bernard Robaire^{3,4} and Isabelle Plante^{1*}

1) INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada

2) Health Canada, Environmental Health Science and Research Bureau, Ottawa, ON, Canada

3) McGill University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology & Therapeutics, Montreal, QC, Canada

4) McGill University, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics & Gynecology, Montreal, QC, Canada

* For correspondance : Isabelle Plante

INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

531 boul. des Prairies

Laval, QC

H7V 1B7

isabelle.plante@inrs.ca

Toxicological Sciences

En cours de publication : 30 novembre 2020

doi.org/10.1093/toxsci/kfaa176

Contribution des auteurs :

- Rita-Josiane Gouesse : 58%, conception et réalisation de la plupart des expériences. Rédaction et correction du manuscrit
- Elham Dianati : 5%, conception du protocole expérimental, échantillonnage des animaux et participation à la correction du manuscrit
- Alec McDermott : 2% réalisation de quelques expériences et assistance dans la correction.
- Mike Wade, Barbara Hales, Bernard Robaire : 5% chacun, conception du protocole expérimental et participation à la correction du manuscrit
- Isabelle Plante : 20%, conception du projet et assistance dans la réalisation des expériences. Supervision dans la réalisation des expériences et correction du manuscrit.

Lien entre l'article ou les articles précédents et le suivant :

Nous avons précédemment démontré que l'exposition *in utero* et lactationnelle entraînait une altération du développement mammaire des rats pubères.

Le but de cet article était de déterminer si cette exposition aux BFR pourrait également induire des effets néfastes à un âge précoce où les glandes sont immatures et se développent de façon indépendante des hormones.

Abstract

In utero and prepubertal development of the mammary glands occurs minimally in a hormone-independent manner until puberty where maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis drives an extensive remodelling. Nevertheless, because the immature glands contain functional hormone receptors, they are especially vulnerable to the effects of endocrine disruptors, such as brominated flame retardants (BFR).

BFR are widespread chemicals added to household objects to reduce their flammability, and to which humans are ubiquitously exposed. We previously reported that *in utero* and lactational exposure to BFR resulted in an impaired mammary gland development in peripubertal animals. Here, we assessed whether BFR-induced disruption of mammary gland development could manifest earlier in life. Dams were exposed prior to mating until pups' weaning to a BFR mixture (0, 0.06, 20, or 60 mg/kg/day) formulated according to levels found in house dust. The mammary glands of female offspring were collected at weaning.

Histo-morphological analyses showed that exposure to 0.06 mg/kg/day accelerates global epithelial development as demonstrated by a significant increase in total epithelial surface area, associated with a tendency to increase of the ductal area and thickness, and of lumen area. Significant increases of the Ki67 cell proliferation index and of the early apoptotic marker cleaved caspase-9 were also observed, as well as an upward trend in the number of thyroid hormone receptor α 1 positive cells. These molecular, histologic, and morphometric changes are suggestive of accelerated pubertal development. Thus, our results suggest that exposure to an environmentally relevant mixture of BFR induces precocious development of the mammary gland.

Keywords: endocrine disruptors, brominated flame retardants, *in utero* and lactational exposure, mammary gland, precocious development, low-dose effects, proliferation, apoptosis, thyroid hormone receptor, polybrominated diphenyl ethers, hexabromocyclododecane

3.1 Introduction

Brominated flame retardants (BFR) are a family of chemicals broadly used in various consumer products such as plastics, electronics, textiles, and home furnishings to reduce their fire hazard (Alaee *et al.*, 2003). They are either bound to the matrix as reactive mixtures or dissolved in the polymer materials as additives (de Wit, 2002). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hexabromocyclododecane (HBCDD) have been used extensively in North America (Allen *et al.*, 2008; Darnerud *et al.*, 2001; Stapleton *et al.*, 2008). As additive fire retardants, they easily migrate from products to the environment, resulting in ubiquitous contamination of homes and other indoor areas (Sjodin *et al.*, 2003). Due to their persistence, bioaccumulation and toxicity in animals and humans (Birnbaum & Staskal, 2004b; Darnerud *et al.*, 2001), PBDE and HBCDD use, sale, offer for sale and import have been restricted in Europe and North America (Environment and Climate Change Canada, 2013; Environment Canada, 2008) and identified for global elimination by the Stockholm Convention. Despite the legislation, items containing these compounds are still present in homes and other indoor environments as well as in waste disposal, and thus remain sources of chronic environmental and human exposure (Abbasi *et al.*, 2015; Lucas *et al.*, 2018).

Exposure to PBDEs and HBCDD has been associated with a wide range of effects including endocrine disruption and reproductive/developmental alterations *in vitro* and *in vivo* (Ema *et al.*, 2008; Hallgren *et al.*, 2001; Lilienthal *et al.*, 2006; Szabo *et al.*, 2009; Talsness *et al.*, 2008; Tung *et al.*, 2016). In humans, non-occupationally related exposure occurs mostly through dust ingestion and consumption of contaminated food (Besis & Samara, 2012; Frederiksen *et al.*, 2009; Jones-Otazo *et al.*, 2005a; Stapleton *et al.*, 2005; Wilford *et al.*, 2005). BFR can be detected in serum, adipose tissue, placenta, umbilical cord and breast milk (Chen *et al.*, 2018b; Gomara *et al.*, 2007; Mazdai *et al.*, 2003; Ryan & Rawn, 2014; Tang & Zhai, 2017; Toms *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2017). Toddlers are the most exposed due to *in utero* and lactational exposure *via* their mother, in addition to their greater ingestion of dust given their closer proximity to ground and hand-to-mouth contacts (Ionas *et al.*, 2016; Linares *et al.*, 2015; Stapleton *et al.*, 2005; Zuurbier *et al.*, 2006).

The mammary gland develops through distinct stages regulated mainly by systemic hormones and local cues (Brisken & O'Malley, 2010; Macias & Hinck, 2012; Sternlicht *et al.*, 2006a). *In utero* and early development is hormone-independent (Brisken & O'Malley, 2010) and results in a gland composed of a rudimentary epithelial tree surrounded by a voluminous stroma

in newborn rodents (Hovey *et al.*, 2002; Masso-Welch *et al.*, 2000). At the onset of puberty, systemic ovarian steroids induce exponential ductal growth and branching of the mammary glands as estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) expression increases (Filgo *et al.*, 2016; Hovey *et al.*, 2002). This hormone stimulation promotes cell division and the formation of multilayered club-shaped terminal end buds (TEBs) at the end of the ductal trees (Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006). Thyroid hormone also contributes in regulating mammary growth (Neville *et al.*, 2002; Vonderhaar & Greco, 1979). TEBs are highly proliferative structures that drive epithelial elongation and ramification throughout the fat pad (Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006). As the ducts elongate and undergo side branching, apoptosis occurs in the stroma and in the center cells of the TEB to allow lumen formation (Humphreys *et al.*, 1996; Sreekumar *et al.*, 2017) and ductal invasion (Paine & Lewis, 2017). At adulthood, the ductal tree has reached the edge of the fat pad (Masso-Welch *et al.*, 2000). Milk-secreting structures named *alveoli* differentiate during pregnancy and lactation (Geddes, 2007; Neville *et al.*, 2002). At weaning, in the absence of suckling from the pups, the *alveoli* undergo apoptosis and the gland ultimately regresses to the pre-gestational stage (Hurley, 1989a; Watson, 2006).

Given the major role of hormones in regulating mammary gland development, exposure to endocrine disruptors (EDs) can lead to mammary developmental abnormalities, altered lactation and increased breast cancer risks (Fenton *et al.*, 2012; Macon & Fenton, 2013). The vulnerability of mammary gland development to the effects of EDs is higher during specific developmental stages (i.e. embryonic life, puberty and the pregnancy/lactation cycle) when the glands undergo extensive remodeling (Fenton, 2012; Macon & Fenton, 2013). Although the embryonic, neonatal and prepubertal developmental stages occur independently of the regulation of systemic hormones, the early expression of functional receptors renders these immature glands also susceptible to EDs (Brown & Lamartiniere, 1995; Brown *et al.*, 1998; Fenton, 2006; Rudel *et al.*, 2011). Accordingly, in rodents, early exposure to EDs has been shown to impair timing of growth onset, TEB formation, number and persistence, and histological structure of the gland, in addition to increased susceptibility to carcinogens later in life (Macon & Fenton, 2013).

Previously we reported that gestational and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR altered intercellular junctions and signaling in the lactating glands of dams (Dianati *et al.*, 2017). In addition, in the mammary glands of the offspring exposed *in utero* and through lactation to the same mixture, we observed a disruption of thyroid hormone receptor alpha1 (THR α 1) homeostasis, of intercellular junctions and of the proliferation-apoptosis balance at PND 46 (Gouesse *et al.*, 2019). Hence, in the current study, we sought to assess whether this

BFR-induced disruption of the mammary gland development was apparent earlier in life. Our findings highlight, for the first time, that an *in utero* and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of PBDEs and HBCDD results in a precocious mammary gland development in offspring before puberty (PND 21).

3.2 Materials and methods

Formulation of the BFR mixture

Formulation of the BFR mixture was described previously (Dianati *et al.*, 2017; Ernest *et al.*, 2012; Gouesse *et al.*, 2019). Briefly, three technical PBDE mixtures (DE-71, DE-79 and BDE 209) and one HBCDD mixture were combined to yield a ratio of PBDE congeners and HBCDD comparable to the median levels observed in Boston house dust (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). This BFR mixture was integrated into an isoflavone-free diet (Teklad Global 2019 diet; Harlan Laboratories, Madison, WI) with 4.3g/kg corn oil. Diets were formulated to contain 0, 0.75, 250 or 750 mg of BFR mixture/kg and calculated to provide nominal doses of 0, 0.06, 20 and 60 mg/kg/day of body weight, respectively. The low dose was estimated to be a close approximation of maximum human exposure, based on a dust ingestion rate of 100 mg/day in children (16.5 kg body weight) and the scaling of dose from humans to rodents (1:6.9, human to rat body surface area ratio). Treatment with the BFR mixture did not alter dam food consumption or weight gain during the exposure period; analysis of the levels of PBDEs in various tissues revealed that BFR ingestion achieved 74–86% of the target doses for the three experimental conditions (Berger *et al.*, 2014; Ernest *et al.*, 2012; Poon *et al.*, 2014b; Tung *et al.*, 2016).

Animals

All procedures and animal studies were done in accordance with the procedures and principles as provided by the Canadian Council on Animal Care and were reviewed and pre-approved by the Health Canada Animal Care Committee (Protocol #2012-015). Detailed treatment method and animal procedures were described previously (Tung *et al.*, 2016). In brief, virgin female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (Charles River, St-Constant, QC, Canada). After one week of acclimatization to the control diet, female rats were randomly assigned to one of the four experimental groups and fed with a BFR supplemented diet for 2-4 weeks before mating. During this time, estrous cyclicity was evaluated by analyzing vaginal cytology. Females in proestrus were caged with proven breeder male Sprague-Dawley rats (maintained on the control diet) overnight. After mating, females were returned to their assigned cages and provided with water and the appropriate dietary mixture *ad libitum*, during gestation

and lactation. At postnatal day 4 (PND4; delivery = PND0, the 1st day pups were observed), litters were normalized to 8 pups (4 pups per sex if possible). Only one female pup from each litter was euthanized by exsanguination under isoflurane anesthesia at PND 21. The mammary glands were sampled and conserved separately depending on the downstream applications. Left inguinal mammary glands (pair 4 and 5, respectively) were dissected, weighed, and immediately snap-frozen before being stored at -80°C for subsequent western blot analyses. Right inguinal mammary glands (pair 4) were immediately transferred onto slides, fixed in Carnoy's fixative (100% ethyl alcohol [EtOH], chloroform, glacial acetic acid; 6:3:1) and stained for whole-mount studies. Upper-thoracic and thoracic mammary glands (pairs 2 and 3, respectively) were excised, and either processed for paraffin-embedding or embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (VWR International, Ville Mont-Royal, QC, Canada) on dry ice and stored at -80°C, for subsequent histology and Masson's trichrome and immunofluorescence analyses.

Whole-mounts and carmine stain of mammary glands

Mammary glands were excised and processed for whole mount staining, as previously described (Plante *et al.*, 2011b) with minor modifications. Briefly, the glands were first fixed for at least 2 days in Carnoy's solution (100% EtOH, chloroform, glacial acetic acid; 6:3:1) at room temperature, then washed in 70% EtOH for 1h and rehydrated in water for 30 minutes. Then, the mammary glands were stained in carmine alum stain (2% carmine and 5% aluminum potassium sulfate in water) for a minimum of 2 days. The glands were progressively dehydrated through an EtOH series, cleared in xylene (minimum 2 days) and then mounted using Permount (Fisher Scientific, Burlington, ON). High resolution images of mammary whole mounts were collected using a Zeiss SteREO Discovery.V20 microscope. Morphological features were quantified in images using ImageJ (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Whole mounts from all animals (n=9-14 per group) were analysed.

Masson's trichrome stain

Mammary glands embedded in Tissue-Tek O.C.T compound (VWR) were cryosectioned (7 µm thickness) at -35°C and transferred onto slides. Then, cryosections were fixed in Bouin's solution overnight and rinsed with tap water for 10 minutes. The sections were successively incubated in Weigert's iron hematoxylin (10 minutes), in Biebrich scarlet-acid fuchsin (15 minutes), in phosphomolybdic-phosphotungstic acid (20 minutes), in aniline blue solution (5 minutes) and in 1% acetic acid (5 minutes). The slides were then dehydrated in 95% EtOH (5 minutes), absolute EtOH (5 minutes) and xylene (5 minutes) and mounted with Permount

(Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Cryosections from randomly picked animals (n=4-6) per group when feasible, were analysed.

Western blots

Snap-frozen mammary glands were mechanically ground into a powder on dry ice. After weighing, powdered samples were homogenized in ice-cold triple detergent lysis buffer (pH 8) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with 1.25 M NaF, 1 M NaVO³ and Halt Protease and Phosphatase Cocktail Inhibitor (Fisher Scientific). The samples were sonicated and centrifuged at 13000 *rpm* (10 minutes at 4°C) then the supernatants were aliquoted and stored at -80°C until further processing. All steps were performed on ice. Protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA). For each sample, total protein was separated using SDS-PAGE gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 7.5, 10 or 12%, BIO-RAD, Mississauga, ON) and transferred onto PVDF membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD). Following transfer, total lane proteins were imaged using the ChemiDoc MP imaging system (BIO-RAD). Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1 % supplemented with 3 % bovine serum albumin (BSA) dissolved in TBS-Tween 0.1%. or 5% dry milk and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (Supplementary table 1) diluted in 5% dry milk or 3% BSA in TBS-Tween 0.1%, depending on manufacturers' recommendations. Next, blotted membranes were washed with TBS-Tween 0.1% 3 times for 5 minutes and probed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Supplementary table 1). The chemiluminescent signals were revealed using Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (BIO-RAD) and visualized using the ChemiDoc MP imaging system (BIO-RAD). Density of each protein band was quantified and normalized to the total proteins in the lane using ImageLab 6.0 software (BIO-RAD). Protein extractions were done and analyzed for all animals (n=9-14 per group).

Immunofluorescence and image acquisition

Immunofluorescence staining and analyses were described previously (Dianati *et al.*, 2016; Dianati *et al.*, 2017; Gouesse *et al.*, 2019). Briefly, tissue cryosections (7 µm) were fixed in formaldehyde (4%) and blocked in 3% BSA dissolved in TBS-Tween 0.1%. Sections were incubated with the appropriate primary antibody (Supplementary table 2) diluted in TBS-Tween 0.1% with 3% BSA for 60 minutes at room temperature or overnight at 4°C, washed with TBS-

Tween 0.1% and then incubated with the corresponding secondary antibody (Supplementary table 2) for 60 minutes at room temperature. Tissue sections were then washed 3 times, for 5 minutes each, stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and slides were mounted with Fluoromount-G (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Images were obtained with a Nikon A1R+ confocal microscope equipped with a laser spectral detector (Nikon Canada Inc., Mississauga ON, Canada). All the analyses were done using NIS-elements analysis software (version 4). For Ki67, ER α , PR and THR α 1, cell index or the percentage of positive cells was determined as the number of positive nuclei divided by the number of total nuclei (recognizable by DAPI staining) times 100 for each image. Cryosections from randomly picked animals (n=4-6) per group when feasible, were analysed.

Statistical analyses

Only one PND21 female per litter was used for each experiment. All data were analyzed using GraphPad Prism, version 6.01. First, the normal distribution of each data set and the presence of outliers were assessed with D'Agostino & Pearson omnibus normality test and ROUT test, respectively. Data that satisfied assumptions of normality and homoscedascity were analysed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests. Otherwise, a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was utilized. Differences were considered as significant when p-values were ≤ 0.05 .

3.3 Results

***In utero* and lactational exposure to BFR induces precocious development of the mammary gland at prepuberty**

We previously reported that *in utero* and lactational exposure to the low dose of the BFR mixture dysregulated mammary gland development in the offspring at PND 46 (Gouesse *et al.*, 2019). Hence, we wanted to assess whether BFR-induced disruption of mammary gland development was apparent earlier in life, in prepubertal animals at PND 21, at a stage when the gland grows isometrically with the body, independently of systemic hormones. The BFR treatments did not affect total body or mammary gland weights at PND 21 (Gouesse *et al.*, 2019). To gain further insight on the impact of this exposure on mammary gland development, whole mount and histological analyses were undertaken (Fig 1). We did not observe any significant effects of the treatments on epithelial elongation (Fig 1A) or on the average number of TEBs (Fig 1C). However, exposure to 0.06 mg/kg/day seems to accelerate global epithelial growth as demonstrated by a significant increase in total epithelial surface area (Fig 1B). Interestingly, BFR

exposure did not affect the total number of ducts (Fig 2A) but it was associated with an increase in the average ductal area that approached statistical significance ($p = 0.08$) (Fig 2B), accompanied by a trend towards an increase in the average lumen area (Fig. 2C) and the average ductal thickness (Fig. 2D).

Low dose exposure to BFR hastens ductal formation and maturation in prepubertal mammary glands

Positive allometric development of the mammary gland is characterized by an important epithelial cell proliferation that leads to differentiation of TEBs and subsequently to newly formed ducts (Macias & Hinck, 2012; Paine & Lewis, 2017). As the cap and most of the body cells of the TEB proliferate to allow ductal elongation, the central body cell layer and stromal cells undergo apoptosis to ensure lumen formation and ductal invasion, respectively (Humphreys *et al.*, 1996; Paine & Lewis, 2017). Therefore, we evaluated whether the histo-morphological changes observed in the mammary gland were accompanied by modulation of proliferation and apoptosis at the molecular level. Protein expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the apoptotic marker Cleaved Caspase (CC)-9 was assessed. Levels of PCNA (Figure 3A) remained unaffected while exposure to the lowest dose of BFR significantly increased CC-9 protein expression (Figure 3B).

At PND 21, the mammary gland is mainly composed of a small epithelial arborescence surrounded by a more voluminous stroma (Macias & Hinck, 2012). As total protein extracted from the whole mammary gland was assessed in our western blot analyses, we hypothesized that protein quantification could be biased by the relative low amounts of epithelial proteins compared to stromal. Thus, we assessed proliferation at the histological level by analyzing Ki67 nuclear staining. Interestingly, Ki67 cell index was increased in the mammary glands of all treated pups; this increase was significant in the animals exposed to the 0.06 mg/kg/day dose (Fig 4). These changes in proliferation and apoptosis are consistent with the trends towards an increase the average lumen size (Fig 2C) and ductal thickness (ductal total area minus lumen area) (Fig 2D) we observed after low dose exposure to the BFR mixture.

BFR-induced precocious development of the mammary gland is associated to an upward trend of nuclear thyroid hormone receptor $\alpha 1$

Extensive growth of the mammary gland is initiated at the onset of puberty, following maturation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (Briskin & O'Malley, 2010). Increasing levels of estrogens and progesterone induce ductal elongation and side-branching through ER α and PR-B action, respectively (Briskin & Ataca, 2015; Briskin & O'Malley, 2010). Though not well characterized, thyroid hormones also regulate mammary gland outgrowth (Hovey *et al.*, 2002); disruption of the physiological balance of thyroid hormone has been associated with impaired mammary gland development (Vonderhaar & Greco, 1979). Thus, we assessed whether the BFR-induced premature development of the prepubertal gland was associated with dysregulation of signaling pathways of these hormones. As expected, PR protein levels were not detectable by western blot (Kariagina *et al.*, 2007). THR α protein expression remained unchanged regardless of the treatment (Figure 5A); however, a significant decrease in ER α protein levels was observed in the pups exposed to the 20 mg/kg/day dose of BFR (Figure 5B). As stated above, the prepubertal mammary gland is predominantly composed of stromal tissue that surrounds a less voluminous epithelium (Macias & Hinck, 2012). Hence, to further evaluate tissue levels and localisation of these receptors, we undertook immunofluorescence analysis. ER α and PR nuclear staining were detected in a subset of epithelial cells and their expression patterns were not affected by BFR treatment (data not shown). THR α 1 was present in a punctate pattern in the nucleus and cytoplasm of most epithelial cells and a few stromal cells (Figure 6). Quantification of positive nuclei demonstrated that the percentage of THR α 1 positive cells tended to increase ($p=0.1$) in the mammary glands of the pups exposed to the 0.06 mg/kg/day BFR dose (Figure 6).

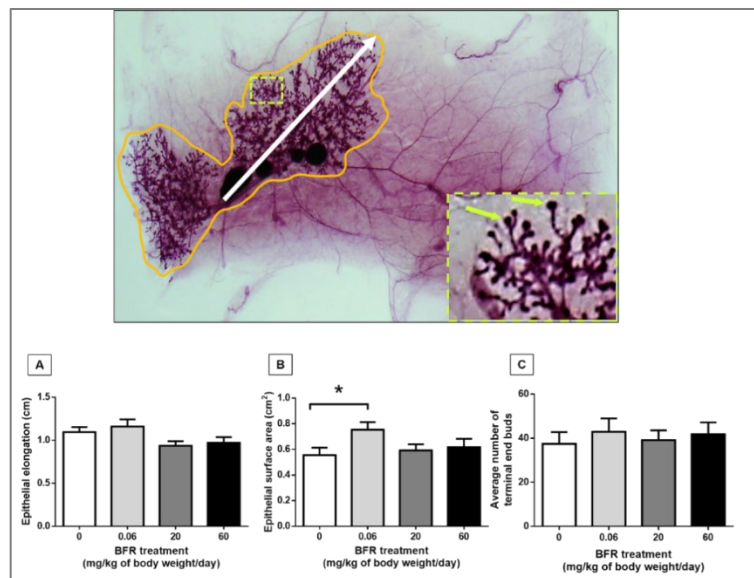


Figure 3-1 : Low dose exposure to BFR mixture increases the epithelial surface area of prepubertal mammary glands

Whole mounts of mammary glands of control pups or pups exposed *in utero* and through lactation to a BFR mixture diet formulated to deliver a daily nominal BFR mixture dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day were analyzed with ImageJ software. Epithelial elongation was measured from the lowest lymph node to the end of the longest branch (white arrow) (A). Epithelial surface area was measured by tracing the best adjusted contour of the epithelium (orange line) (B). The number of TEBs (peripheral bulb-like structures with area greater than 0.03 mm² (yellow arrow)) were counted by blinded volunteers for each animal (C). Histograms represent the mean of the groups \pm SEM (n=9-14). p-values were calculated with a Kruskal-Wallis or an ANOVA statistical test. * indicates statistical significance $p \leq 0.05$.

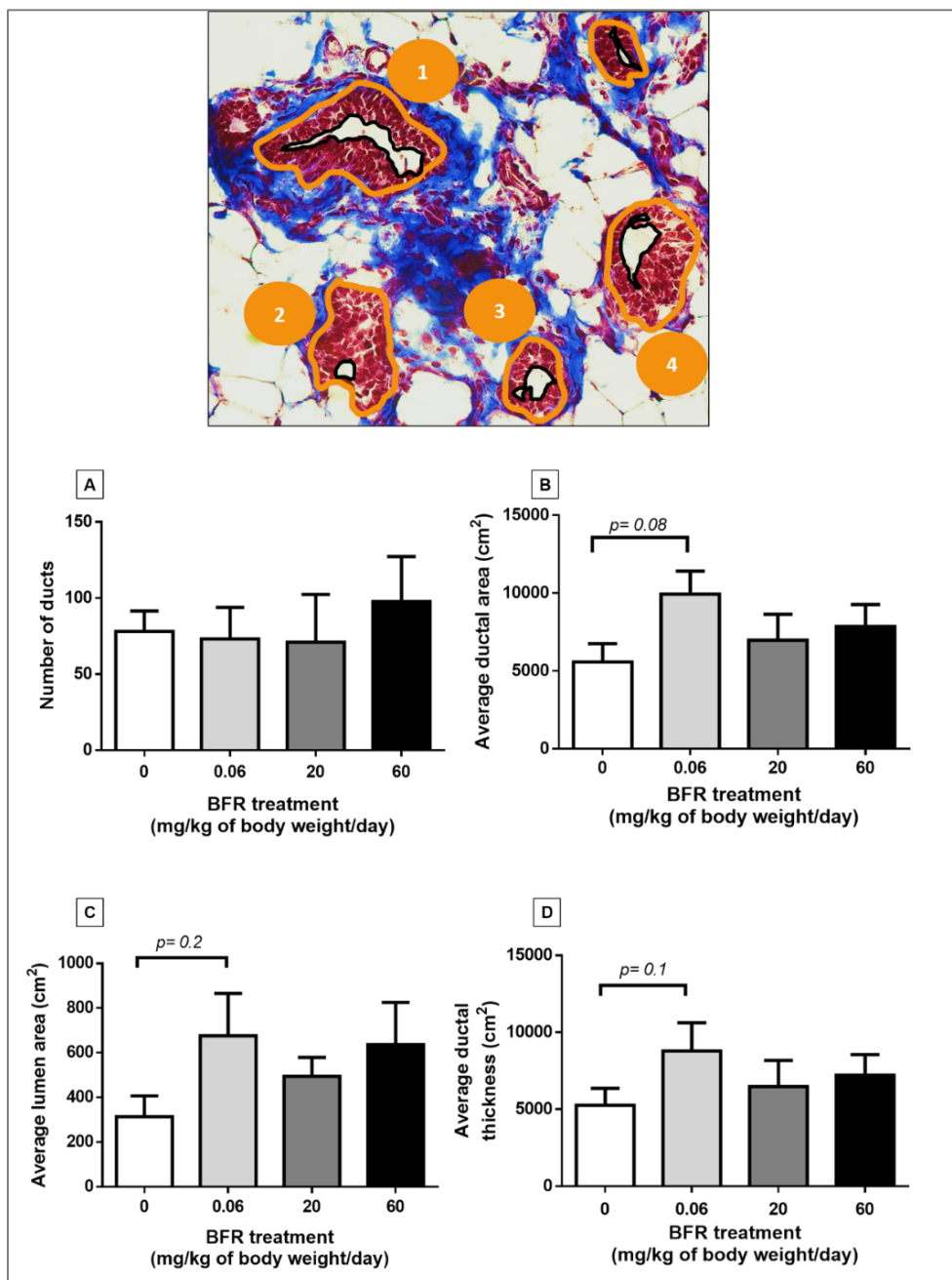


Figure 3-2 : Low dose exposure to the BFR mixture tends to increase duct size

Mammary gland sections (7 μ m) of control pups or pups exposed *in utero* and during lactation to a BFR mixture in diet formulated to deliver a daily nominal BFR mixture dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day, were fixed and stained with Masson's trichrome (luminal cells in red; extracellular matrix and fibroblast in blue; adipocytes remain

uncolored (white)). The number of ducts in the entire gland cross section (A) and their respective average area (B) were determined by delineating the outline of the ducts (orange lines) using NIS-elements analysis software. The average lumen size (C) and ductal thickness (total ductal area (orange line) minus lumen area (black line)) (D) were determined using the same method. Histograms represent the mean of the group \pm SEM (n=4-6).

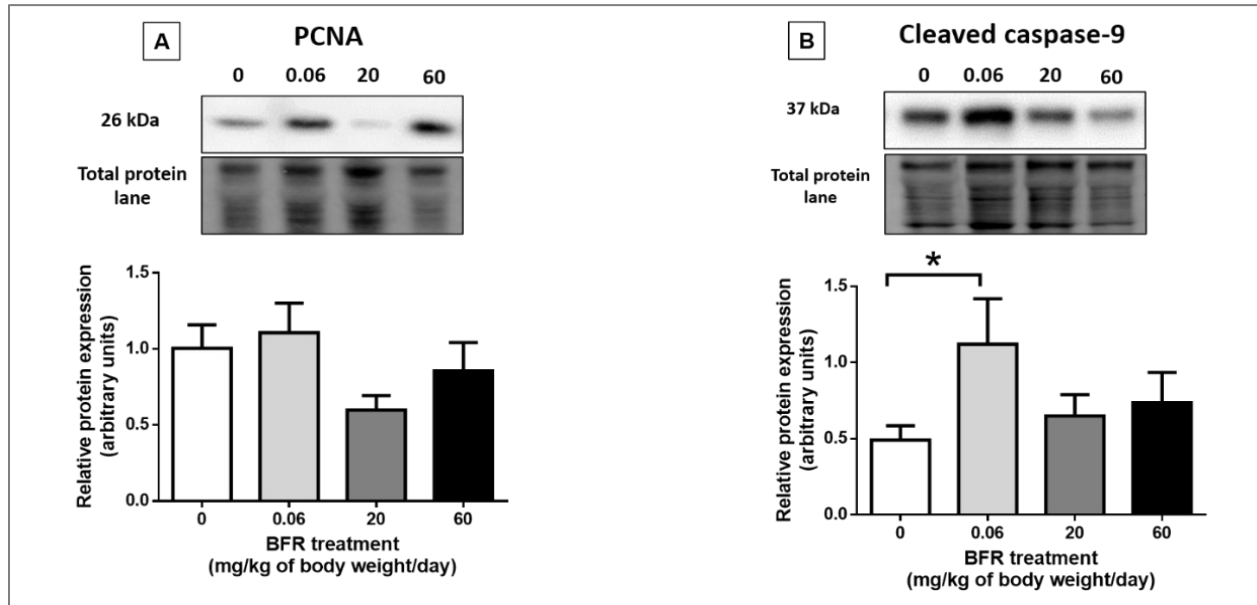


Figure 3-3 : Exposure to the lowest dose of BFR increases protein levels of the early apoptotic marker cleaved caspase-9

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed *in utero* and through lactation to a BFR dietary mixture formulated to deliver a daily nominal BFR mixture dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day. Graphs show PCNA (A) and Cleaved Caspase-9 (B) protein levels at PND 21. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14) for each band normalized to the total protein levels. p-values were calculated with a Kruskal-Wallis statistical test or ANOVA. * indicates statistical significance $p \leq 0.05$.

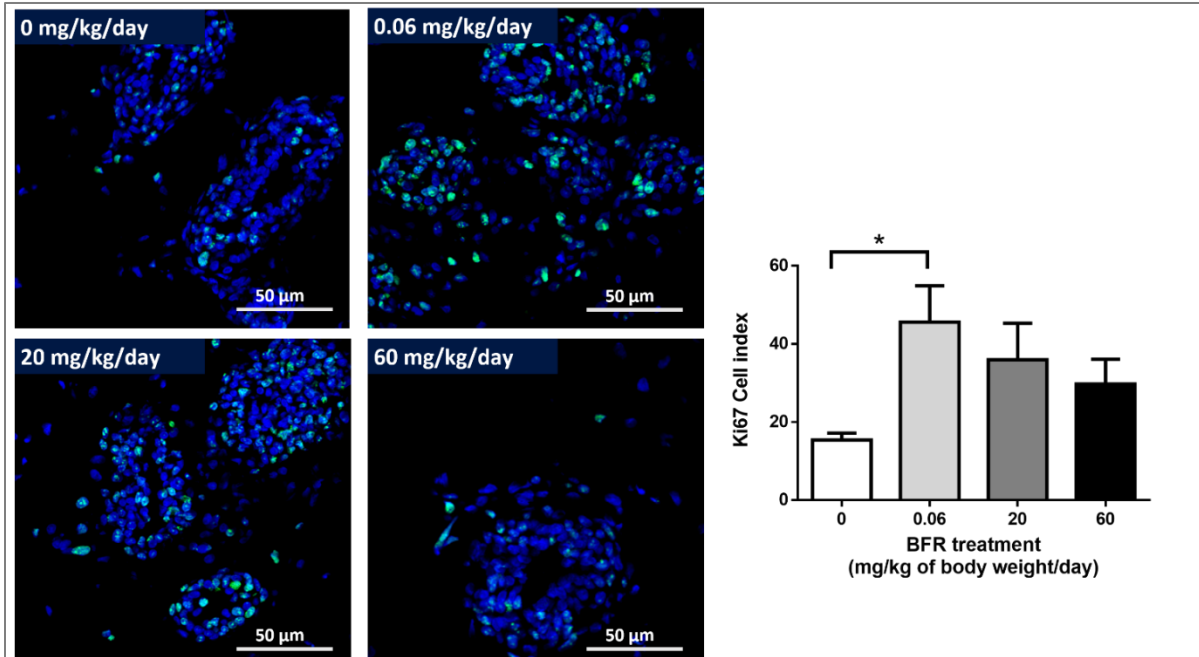


Figure 3-4 : Low dose exposure to the BFR treatment enhances Ki67 cell index

Mammary gland cryosections (7 μ m) from control or animal treated with 0.06, 20 or 60 mg/kg/day were processed for immunofluorescence staining. Ki67 (green) cell index was determined as a percentage of the number of positive nuclei against the number of total nuclei (DAPI) for each image. Images were obtained with a Nikon A1R+ equipped with a spectral detector and analyzed using NIS-elements analysis software. Histograms represent the mean of the group \pm SEM (n=5). * indicates statistical significance $p \leq 0.05$.

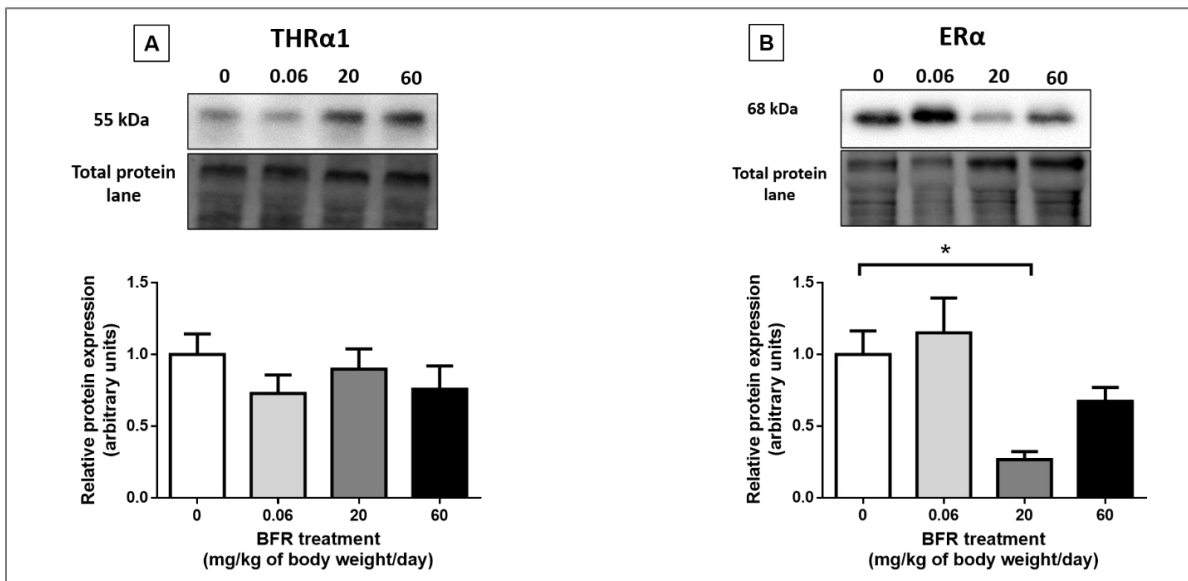


Figure 3-5 : Exposure to BFR mixtures does not affect thyroid hormone receptor alpha 1 but impairs estrogen receptor alpha protein levels

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed *in utero* and during lactation to a BFR dietary mixture formulated to deliver a daily nominal BFR mixture dose of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day. Graphs show THR α 1 (A) and ER α (B) protein levels at PND 21. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14) for each band normalized to the total protein level.

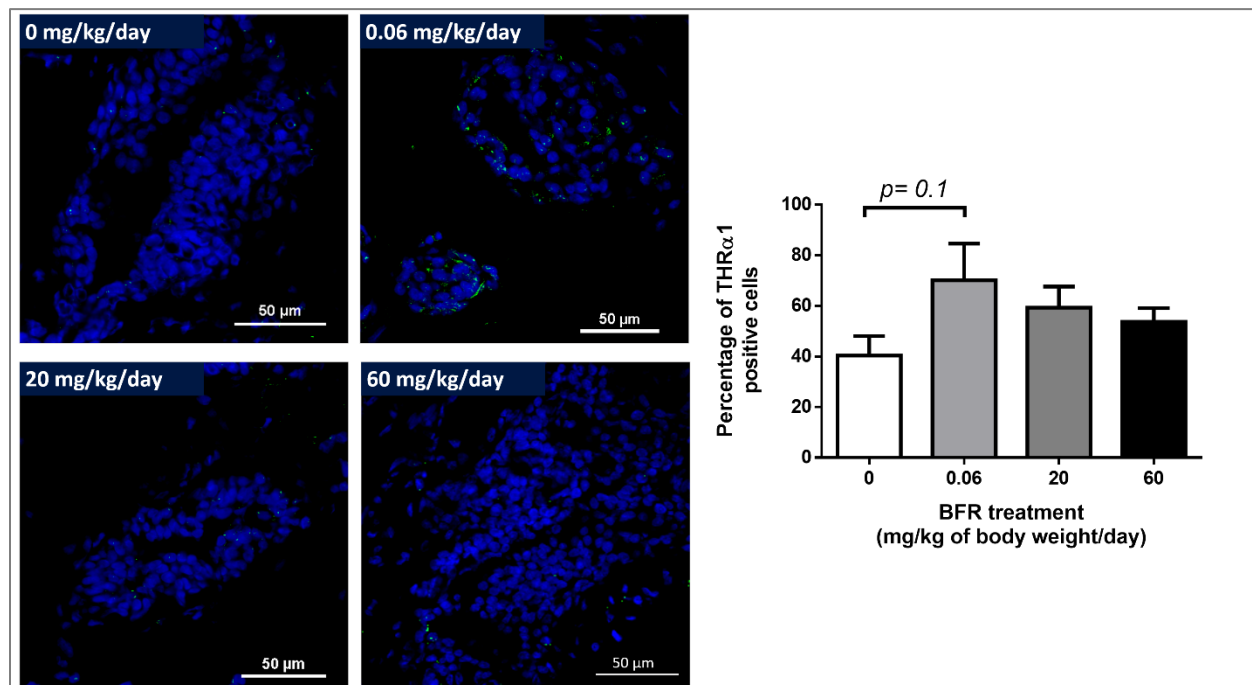


Figure 3-6 : Exposure to a low dose BFR mixture tends to increase the number of cells positive for nuclear thyroid hormone receptor alpha 1

Mammary gland cryosections (7 μ m) were processed for immunofluorescence staining from control 0 or animal treated with 0.06, 20 or 60 mg/kg/day. The number of cells positive for nuclear THR α 1 (green) was determined as a percentage of the number of positive nuclei against the number of total nuclei (DAPI) for each image. Images were obtained with a Nikon A1R+ equipped with a spectral detector and analyzed using NIS-elements analysis software. Histograms represent the mean \pm SEM (n=4).

3.4 Discussion

Early exposure to BFR induces precocious mammary gland development at PND 21

Previously, we demonstrated that *in utero* and lactational exposure to the lowest dose of an environmentally relevant mixture of BFR dysregulated mammary gland development in the dams (Dianati *et al.*, 2017) and their offspring at PND 46, when stimulation by ovarian and other hormones drives morphological and functional changes in this organ (Gouesse *et al.*, 2019). Here, we examined whether the same exposure had an impact on the mammary gland prior to puberty. In contrast to the absence of any morphological modifications in PND 46 pups (Gouesse *et al.*, 2019), low dose exposure to BFR induced a premature development of the overall mammary glands in PND 21 offspring, as demonstrated by a significant increase in epithelial surface area

associated with a trend towards an increase in the average ductal area; these changes are characteristic of pubertal mammary development. During extensive pubertal development of the mammary glands, epithelial cells undergo important proliferation for TEB formation (Paine & Lewis, 2017). Major apoptosis occurs concurrently in the inner body cell layer of the TEBs and in the stroma, allowing for lumen formation and ductal invasion, respectively (Humphreys *et al.*, 1996; Paine & Lewis, 2017; Sreekumar *et al.*, 2017). Interestingly, we demonstrated that mammary glands from PND 21 pups exposed to the 0.06 mg/kg/BFR dose had significantly more epithelial cells expressing Ki67, a marker of cell proliferation, and higher levels of CC-9, an indicator of early apoptosis. This was associated to a trend towards increases in their average lumen size and ductal thickness. Such an increase in lumen size may result from death and regression of the central body cells of the TEB (Humphreys *et al.*, 1996). Other studies demonstrating that early exposure to EDs such as bisphenol A, bisphenol S, diethylstilbestrol and nonylphenol can alter TEB formation and differentiation at puberty support our findings (Hovey *et al.*, 2005; Kolla *et al.*, 2018; Moon *et al.*, 2007; Munoz-de-Toro *et al.*, 2005). All together, these data indicate that low dose exposure to our BFR mixture induces precocious development of the prepubertal mammary gland at the morphologic and histologic level of organization, by modulating proliferation and apoptosis balance at the molecular level.

To our knowledge, only one previous *in vivo* study has reported the effects of a perinatal exposure to BFR on mammary glands in prepubertal rodents. Unlike our results, this study showed that exposure to DE-71, a commercial mixture of PBDEs, delayed mammary outgrowth and branching at PND 21 (Kodavanti *et al.*, 2010b). Besides the differences regarding the timing of exposure and the strains of the animals studied, the discrepancies observed between this study and our results could be due to the difference in the BFR mixture. DE-71 is a widespread pentabrominated mixture that has been shown to alter thyroid hormone homeostasis in rats (Ellis-Hutchings *et al.*, 2006; Szabo *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002) and elicit estrogenic activity *in vitro* (Meerts *et al.*, 2001b; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b) and *in vivo* (Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b). In contrast, our mixture is composed of three PBDEs (DE-71, DE-79 and BDE-209) and one HBCDD mixture (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008) that can exhibit THR-, ER-, PR-, and AR-, agonistic and anti-agonistic activities (Dang *et al.*, 2007; Hamers *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Meerts *et al.*, 2001b; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b; Schriks *et al.*, 2007; Schriks *et al.*, 2006; Yamada-Okabe *et al.*, 2005). Thus, it is possible that these different mixtures of BFR behave additively or even synergistically when used in combination (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). These diverse endocrine disruptive potencies of

our BFR mixture may explain the decrease of ER α protein levels observed in the 20 mg/kg/day treated pups. Other findings showing differential effects between exposure to a single ED versus a mixture of EDs support our results (Bunay *et al.*, 2018).

Induction of premature development of the mammary gland occurs independently of overall maturation of the reproductive system

Massive remodeling of the mammary glands occurs at the onset of sexual maturation or puberty (Howlin *et al.*, 2006). In humans, pubertal progression is assessed notably by the appearance of extensive mammary development (i.e. thelarche), while in rodents it is conventionally defined by the occurrence of vaginal opening and estrus cyclicity (Vandenbergh, 1976). Histologic and morphologic changes in the ovaries and the uterus also serve as landmarks of sexual development in rodents (Picut *et al.*, 2014). Although we demonstrated that low dose exposure to BFR led to premature mammary gland development at PND 21 in the prepubertal pups, changes in vaginal opening and estrus cyclicity were not observed in this group. However, pups exposed to 20 mg/kg/day had an advanced puberty, and disruption of ovarian follicular development was observed at the two highest doses (Allais *et al.*, 2020). The discrepancy between the low dose and non-monotonic effects of BFR in the mammary gland and the linear response observed in the ovaries could be due to variations in organization and in hormone responsiveness that are specific to these tissues (Vandenberg, 2014).

Similar to our findings, disruption of mammary gland development independently of any action on overall maturation of the reproductive system has previously been reported in rodents following exposure to EDs. Acute prenatal exposure to a low dose of an atrazine metabolite mixture resulted in a persistent delay in mammary gland development; this occurred without any effects on classical pubertal makers (ovary structure, vaginal opening or estrus cyclicity) (Enoch *et al.*, 2007a). A delayed initiation of breast development was also observed in girls with higher prenatal and lactational exposure to dioxins, while the age at menarche was not affected (Leijis *et al.*, 2008). However, only a limited number of studies have assessed pubertal progression by analyzing mammary gland development and differentiation in rodents (Enoch *et al.*, 2007b; Fenton *et al.*, 2002; Fenton *et al.*, 2012; Markey *et al.*, 2001; Padilla-Banks *et al.*, 2006). Precocious and delayed puberty, as determined by the stage of breast development, has been associated with increased breast cancer risks and long-term health consequences (Fenton, 2006; Fenton *et al.*, 2012; Rudel *et al.*, 2011). Thus, our findings contribute to fill some of the gaps in the research that investigates the effects of exposure to EDs on mammary gland development and in the etiology of breast pathologies.

BFR-induced precocious development of the mammary glands may involve interference with thyroid hormones signaling

We showed that early exposure to the 0.06 mg/kg/day dose tended to increase the number of cells positive for nuclear THR α 1 without affecting total protein levels from the whole mammary gland of PND 21 pups. Because it has been demonstrated that the expression of the various isoforms of ER and PR vary between tissue compartments and cell type in the mammary gland (Kariagina *et al.*, 2007; Saji *et al.*, 2000), we can speculate that similar differential tissue expression and cellular distribution of THR α s could explain the divergences observed between total protein and nuclear localization quantification. Only a limited number of studies have investigated the expression and localization of THR α s in the mammary gland of humans and animals. Cytoplasmic and nucleic staining of THR α 1 was detected in mammary epithelium in human (Alyusuf *et al.*, 2014), and THR α 1 and THR β were present in the nuclei of both stromal and epithelial cells in cows (Capuco *et al.*, 2008). In Sprague-Dawley rats, *THR α 1* mRNA was expressed during puberty, pregnancy and weaning, with the highest expression in the mammary glands of pubertal animals (Anguiano *et al.*, 2004). Although, to the best of our knowledge, no research has investigated THR tissue and subcellular expression and localization in the rat mammary gland across development, functional studies have demonstrated that thyroid hormones act as important regulators of mammary gland development and function (Neville *et al.*, 2002; Vonderhaar & Greco, 1979). Chemically induced hypothyroidism in mice, from weaning through adulthood, resulted in a delayed mammary gland development later at 3-months of age (Neville *et al.*, 2002; Vonderhaar & Greco, 1979). However, induction of hyperthyroidism caused an increased cell proliferation, extensive branching and lobuloalveolar development in adult animals (Neville *et al.*, 2002; Vonderhaar & Greco, 1979). Moreover, thyroxine (T₃) elicited a proliferative estrogen-like activity in several human breast cancer cell lines *in vitro* (Burke & Mcguire, 1978; de Launoit & Kiss, 1989; Dinda *et al.*, 2002; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b). Thus, the slight increase in the percentage of cells positive for THR α 1 in the mammary gland of pups exposed to the 0.06 mg/kg/day dose is consistent with their greater number of proliferative cells and with the upregulation of morphometric endpoints related to ductal growth.

Downregulation of T₄ plasma levels is one of the most described effects of BFR exposure, both in humans and experimental models (Ernest *et al.*, 2012; Hallgren *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2014; Kodavanti *et al.*, 2010b; Kuriyama *et al.*, 2007; Tung *et al.*, 2016; van der Ven *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002). Such dysregulation may result from a direct effect of BFR

on thyroid hormone transport (Hamers *et al.*, 2006; Meerts *et al.*, 2001b), metabolism (Szabo *et al.*, 2009; Tung *et al.*, 2016) and/or receptor binding (Kojima *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2019; Ren & Guo, 2013). In our study, PND 21 pups treated with 20 and 60, but not the 0.06, mg/kg/day doses of BFR, had decreased serum T4 levels (Tung *et al.*, 2016). Similarly, pups exposed to the two highest, but not 0.06 mg/kg/day, exhibited an increased liver weight and higher metabolic activity (Tung *et al.*, 2016). Thus, changes observed in T4 levels at higher doses may result from liver cytotoxicity (Tung *et al.*, 2016). It has been proposed that EDs can behave like hormones that can be toxic at high doses but still influence biological endpoints at low, physiologically relevant doses (Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003). Thus, we speculate that though the low dose of our BFR treatment did not elicit quantifiable effects on T4 levels, it can still exert biological changes on thyroid signaling, as demonstrated by changes in THR α 1 positive cell numbers. Such slight changes in thyroid signaling may result in an inappropriate hormone exposure and may contribute to the BFR-induced premature development observed at PND 21.

THRs bind to an element in the Cx43 promoter in rat liver (Stock & Sies, 2000), stimulate Cx43 gene expression in brook trout Sertoli cells (de Montgolfier *et al.*, 2011) and gap junctional intercommunication (GJIC) in rat liver cells (Stock *et al.*, 1998). Interestingly, we previously reported that *in utero* and lactational exposure to this BFR mixture resulted in increased protein levels of the highly phosphorylated (p) form of Cx43 in the mammary glands of PND 21 pups (Gouesse *et al.*, 2019). As Cx43 phosphorylation is usually associated with its localization at the cell membrane, and with effective GJIC (Lampe & Lau, 2004), this observation suggests that the BFR treatment increases cell-cell communication in the prepubertal pups. Collective migration of epithelial cells that retain their intercellular junctions contributes to the progression of TEBs into mammary stroma (Ewald *et al.*, 2008). Based on these observations, upregulated levels of p-Cx43 are coherent with the tendency to increase of the number of cells positive for THR α 1; further, the implied increases of GJIC may contribute to ductal development driven by the TEBs at this stage.

However, we previously reported that the same treatment resulted in downregulated expression of p-Cx43 and this was associated with decreases in protein levels of THR α 1 and of the apoptosis marker cleaved caspase-3 later at PND 46 (Gouesse *et al.*, 2019). These observations support the hypothesis that EDs can elicit different effects depending on the latency of exposure but also according to the developmental stage and hormone status of the individual (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Similar “age-specific” effects have been observed in BPA-treated animals (Markey *et al.*, 2001). Together, these data suggest that thyroid hormone

signaling plays an important role in regulating mammary gland development and appears as a prime target of BFR. Nevertheless, further studies are needed to better define the specific mechanisms involved.

3.5 Conclusion

Overall, our findings suggest that *in utero* and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of BFR induces premature development of the mammary gland in prepubertal animals. Such precocious development has been associated with increased breast cancer risks later in life (Eshre Capri Workshop Group, 2004; Fenton, 2006; Henderson & Feigelson, 2000). Disruption of thyroid hormone signaling, intercellular junction protein and the proliferation-apoptosis balance appear as prime mechanisms for the effects of BFR on the mammary gland in both PND 21 and PND 46 pups (Gouesse *et al.*, 2019). Effects of BFR that are manifested at specific ages may be due to the substantial differences in architecture and in hormonal regulation between the “quiescent” prepubertal gland and the highly dynamic pubertal stage of mammary development (Briskin & O'Malley, 2010; Medina, 1996). Most of the mammary gland effects of BFR resulted from low dose exposure, in prepubertal animals (current study), in older pups on PND 46 (Gouesse *et al.*, 2019), and in dams (Dianati *et al.*, 2017). Low-dose effects and non-monotonic response have been reported for BFR mixture (Berger *et al.*, 2014; Dianati *et al.*, 2017; Lefevre *et al.*, 2016a; Tung *et al.*, 2017), and other technical PBDEs mixtures (Chen *et al.*, 2018a; Lilienthal *et al.*, 2006; Talsness *et al.*, 2008). These nonlinear response curves are common for hormones and EDs, and suggest that BFR may induce opposite effects on independent processes that converge in a common quantifiable endpoint (Vandenberg, 2014; Vandenberg *et al.*, 2012). However, BFR also triggers linear dose-response curves (Allais *et al.*, 2020; Berger *et al.*, 2014; Lefevre *et al.*, 2016a; Tung *et al.*, 2016; Tung *et al.*, 2017) that may result from tissue-specific hormone responsiveness. (Vandenberg *et al.*, 2012). Taken together, these data suggest that our BFR mixture may involve intricate mechanisms given their diverse potencies of EDs.

3.6 Acknowledgements

Martine Caplette, Eva Chartier and Laurine Mattia are thanked for their technical assistance. This study was supported by NSERC (IP), MESRSCI, RQR-CIRD, FAF (RJG), CIHR (BH) and the Chemicals Management Research Initiative Fund of Health Canada (MGW)

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare

3.7 Supplementary Data

Tableau 3-1 : Supplementary table 1 - Antibodies used for western blot analysis

| Target protein | Description /Host | Dilution | Catalogue number | Manufacturer |
|-------------------------------------|-------------------|----------|------------------|--------------------------|
| Primary antibodies | | | | |
| PCNA | Mouse | 1/2000 | 2586S | Cell signaling |
| Caspase-9 | (C9) Mouse | 1/1000 | 9508 | Cell signaling |
| PR A/B | Rabbit | 1/1000 | Ab16661 | Abcam |
| Thyroid Hormone Receptor α 1 | Rabbit | 1/500 | Ab53729 | Abcam |
| ER α | (D12) Mouse | 1/1000 | SC-8005 | Santa Cruz biotechnology |
| Secondary antibodies | | | | |
| anti-mouse IgG HRP-linked antibody | Horse | 1/10 000 | 7076s | Cell signaling |
| Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody | Goat | 1/10 000 | 7074s | Cell signaling |

Tableau 3-2 : Supplementary table 2 - Antibodies used for immunofluorescence analysis

| Target protein | Description/Host | Dilution | Catalogue number | Manufacturer |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| Primary antibodies | | | | |
| Ki67 | (D3B5) Rabbit | 1/100 | 9129 | Cell signaling |
| PR A/B | Rabbit | 1/100 | Ab16661 | Abcam |
| ER α | (D12) Mouse | 1/100 | SC-8005 | Santa Cruz biotechnology |
| Secondary antibodies | | | | |
| anti-rabbit DyLight™ 488-conjugated | Goat | 1/1000 | 35552 | Thermo Fisher Scientific |
| anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor 555 | Goat | 1/1000 | 4409s | Cell signaling |

4 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les BFR ont été majoritairement utilisés dans les années 1990-2000, ce qui implique que le pic d'exposition des femmes ainsi que de leurs filles exposées pendant le développement précoce, *in utero* et par l'allaitement, a eu lieu à cette période. Deux études épidémiologiques ont suggéré une association entre des concentrations plasmatiques de PBDE et une dérégulation du développement des glandes mammaires chez les filles (Deodati *et al.*, 2016; Windham *et al.*, 2015). *In vivo*, il a été montré que l'exposition périnatale à une mixture commerciale de BFR, le DE-71 induit une altération du développement mammaire des rats (Kodavanti *et al.*, 2010b). Récemment, nous avons montré qu'une exposition à un mélange de BFR représentatif de l'exposition humaine durant la gestation et la lactation, perturbe l'adhésion cellulaire dans les glandes mammaires des mères rats (Dianati *et al.*, 2017). Sachant que les BFR sont des PE qui sont transférés de la mère au fœtus *via* le placenta, et à l'enfant par le lait maternel (Chen *et al.*, 2014; Frederiksen *et al.*, 2010b; Herbstman *et al.*, 2007; Leonetti *et al.*, 2016; Mazdai *et al.*, 2003; Schecter *et al.*, 2010; Schecter *et al.*, 2003; Toms *et al.*, 2009b; Zhao *et al.*, 2013), mon projet de thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois, les effets d'une exposition *in utero* et lactationnelle à un mélange de BFR, représentatif de l'exposition humaine environnementale, sur le développement postnatal des glandes mammaires chez la descendance femelle. Nos contributions majeures sont résumées ci-après.

4.1 Les jonctions intercellulaires et l'équilibre prolifération-apoptose sont des cibles privilégiées par les BFR et ces effets impliqueraient une perturbation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Nous avons observé que l'exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR a induit à PND 21 une augmentation de la quantité de p-Cx43, la forme généralement présente dans les jonctions communicantes membranaires (Musil *et al.*, 1990; Musil & Goodenough, 1991b; Solan & Lampe, 2009), ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67. En revanche à PND 46, l'exposition aux BFR a entraîné une réduction de la quantité de p-Cx43, de l'expression des protéines des jonctions adhérentes E-cadhérine et β -caténine, ainsi que du marqueur d'apoptose capase-3 clivée. Une dérégulation de l'expression des Cxs, de la *GJIC* ainsi que de la prolifération cellulaire a également été observée dans plusieurs tissus à la suite de l'exposition aux PE tels que le BPA (Murray *et al.*, 2007; Oh, 2015; Salian *et al.*, 2009; Vandenberg *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2019) l'octylphénol (Oh 2014), les PAH

(Kubincova *et al.*, 2019) et l'HCB (Delisle *et al.*, 2015; Plante *et al.*, 2002). Il en est de même pour les protéines des jonctions adhérentes qui semblent également être ciblées par le BPA (Chen *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018; Mlynarcikova *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015) et l'HCB (Plante *et al.*, 2002) dans divers tissus.

Dans la glande mammaire de souris sauvages, la diminution de l'expression de Cx43 et de la quantité de p-Cx43 a été associée à plusieurs anomalies dont un retard de développement des canaux à la prépuberté (Plante & Laird, 2008), suggérant un rôle de Cx43/p-Cx43 en faveur du développement canalaire à ce stade. De plus, bien que les données de la littérature restent controversées, elles indiquent que les jonctions communicantes peuvent contrôler la prolifération (Aasen, 2015) et la mort cellulaire (Gilleron *et al.*, 2018) *via* l'échange de facteurs de survie, de molécules de signalisation cellulaire ou de facteurs pro-apoptotiques (Aasen *et al.*, 2016; Kameritsch *et al.*, 2013; Krutovskikh *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Quant à la perte d'E-cadhérine, elle ne serait pas associée à la formation d'anomalies de la glande mammaire chez les souris vierges (Derksen *et al.*, 2011; Derksen *et al.*, 2006) mais pourrait se répercuter sur l'homéostasie cellulaire en raison du rôle du complexe E-cadhérine/ β -caténine dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle de β -caténine (Gottardi *et al.*, 2001; Stockinger *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été proposé que la présence de jonctions adhérentes à la membrane plasmique est un prérequis à l'assemblage et à la fonction des jonctions communicantes (Jongen *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1992), et notre laboratoire a récemment montré que les protéines des jonctions adhérentes et communicantes interagissent tout au long du développement de la glande mammaire murine (Dianati *et al.*, 2016).

Nous avons également observé que la dérégulation des protéines jonctionnelles et de l'homéostasie cellulaire était associée à une diminution significative de l'expression du récepteur THR α 1 à PND 46. T3 induit l'expression génique et protéique de Cx43 ainsi que la *GJC* dans les cellules hépatiques de rat (Stock *et al.*, 1998) en se liant de façon directe à un élément de régulation dans le promoteur de *Gja1* (Stock & Sies, 2000). Elle promeut également l'expression d'E-cadhérine et de β -caténine chez le têtard (Izaguirre & Casco, 2010) et régule l'activité transcriptionnelle mitogène de β -caténine aussi bien dans l'intestin de souris (Kress *et al.*, 2009; Plateroti *et al.*, 2006) que dans le foie de rongeurs (Fanti *et al.*, 2014).

Au regard de ces données, une hypothèse serait que les dérégulations induites par les BFR sur les protéines jonctionnelles seraient en partie dues à leurs effets sur les niveaux d'expression de THR α 1 et donc sur la voie signalisation des TH. Si tel est le cas, la diminution de l'expression des protéines jonctionnelles à PND 46 pourrait en partie résulter de la réduction de

l'expression de THR α 1 à PND 46. De plus, la perturbation de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose à PND 46 pourrait être une conséquence indirecte des effets de la dérégulation de la signalisation TH/THR α 1 sur l'adhésion et/ou la communication cellulaire (Figure 4-1).

Cette hypothèse pourrait être cohérente avec l'augmentation de p-Cx43 et de Ki67 à PND 21. Cependant, nous n'avons pas observé de changement significatif de l'expression protéique de THR α 1, ni du nombre de cellules THR α 1-positives au niveau tissulaire, bien que leur pourcentage tendait à augmenter. Une telle incohérence pourrait être due aux limites de nos méthodes d'analyse. En effet, à PND 21 les glandes mammaires sont constituées d'un épithélium rudimentaire alors que le volume stromal est plus important (Masso-Welch *et al.*, 2000). Nos immunobuvardages de type western blot étant réalisés sur des protéines totales extraites de la glande mammaire entière, il est difficile de mesurer adéquatement le niveau d'expression d'une protéine telle que THR α 1 qui serait plausiblement majoritairement exprimée dans l'épithélium (Alyusuf *et al.*, 2014; Anguiano *et al.*, 2004), bien que son expression tissulaire dans la glande mammaire n'ait pas été suffisamment caractérisée à ce jour. Nos analyses par immunofluorescence avaient pour but de s'affranchir de ces limitations. Cependant, nous avons un nombre limité de coupes tissulaires utilisables ($n \leq 6$ pour toutes les conditions) en raison de problèmes techniques dont la perte des tissus inclus en paraffine, mais aussi à cause du faible volume de la glande mammaire à PND 21. Il sera donc nécessaire de (1) réaliser des études avec un plus grand nombre d'échantillons, (2) de quantifier l'expression protéique de THR α 1 uniquement dans l'épithélium et le stroma, (3) d'analyser la localisation tissulaire et subcellulaire de THR α 1 (noyau et cytoplasme) et (4) d'analyser son activation par exemple en quantifiant l'expression de gènes dont la transcription est positivement régulée par THR α 1 tels que ceux du transporteur de glucose GLUT4 (Torrance *et al.*, 1997) ou Cx43 (de Montgolfier *et al.*, 2011; Stock & Sies, 2000; Stock *et al.*, 1998). Ces expériences permettront de mieux évaluer la potentielle implication de la signalisation thyroïdienne dans l'effet des BFR sur le développement prématuré des glandes à PND 21.

Au regard de ces données, nos résultats indiquent, pour la première fois, que la glande mammaire est un organe sensible à une exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR et que les interactions cellulaires directes *via* les jonctions adhérentes et communicantes, ainsi que la prolifération cellulaire, l'apoptose et THR α 1 en seraient des cibles importantes. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre/déterminer la relation entre la signalisation des hormones thyroïdiennes et en particulier du récepteur THR α 1 dans la glande

mammaire, et la régulation de l'expression et/ou des modifications post-traductionnelles des protéines jonctionnelles (E-cadhérine, β -caténine et Cx43).

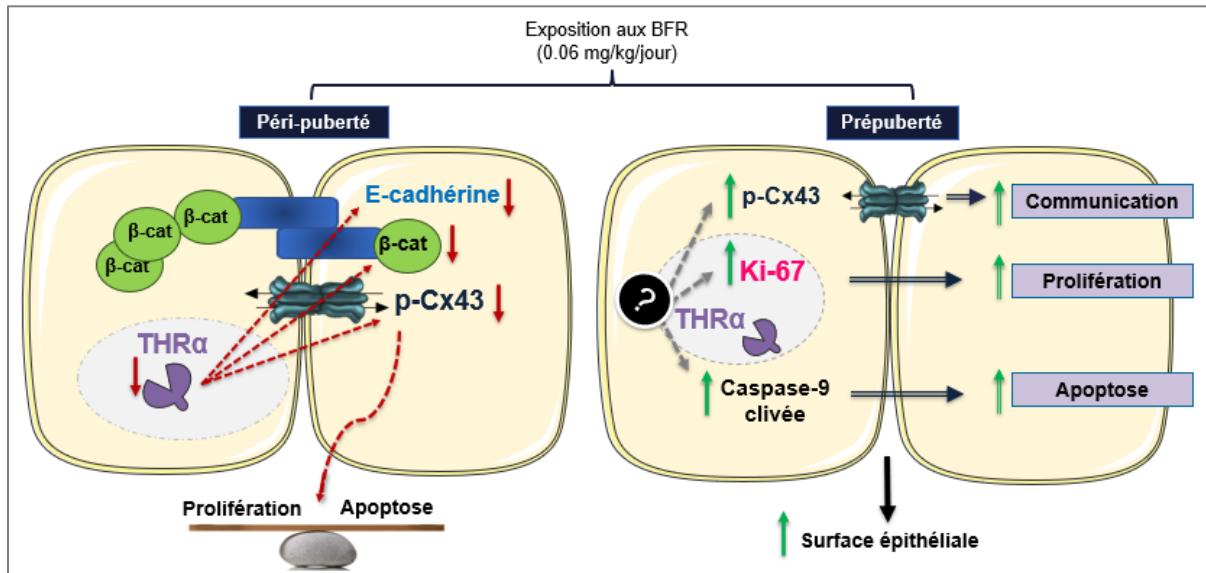


Figure 4-1 : Modèle hypothétique des mécanismes impliqués dans les effets des BFR sur les glandes mammaires chez les rats prépubères et pubères

Chez les rats pubères, la réduction de l'expression de $THR\alpha$ suggère une diminution de la signalisation thyroïdienne qui en retour pourrait affecter négativement les niveaux d'expression d'E-cadhérine, de β -caténine et la quantité de p-Cx43. Une telle perturbation des jonctions pourrait contribuer à la dérégulation de l'équilibre prolifération-apoptose. À la prépuberté, cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de la quantité de p-Cx43 et de l'expression de Ki67 ce qui suggérerait une augmentation de la communication et de la prolifération cellulaire. Tout cela contribuerait *in fine* à l'augmentation de la surface épithéliale. Toutefois une meilleure caractérisation de l'expression, de la localisation et de l'activation de $THR\alpha$ permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets observés à PND 21. De même, l'augmentation de l'expression de caspase-9 reste à élucider. Vert : augmentation; Rouge : inhibition; Trait plein : effet observé; Trait pointillé : effet ou conséquence suggérée; double trait : causalité suggérée.

4.2 Les effets des BFR dépendent de la fenêtre de développement de la glande mammaire

L'un des paramètres majeurs pouvant expliquer les dissemblances d'effets observés entre les animaux à PND 21, PND 46 et PND 208 est la différence majeure d'organisation, de différenciation cellulaire et tissulaire, et de sensibilité hormonale de la glande mammaire à ces différents stades de développement (Brisken & Ataca, 2015; Fenton, 2009; Hovey *et al.*, 2002; Masso-Welch *et al.*, 2000; Rudel *et al.*, 2011).

Nos résultats à PND 21 suggèrent que les BFR induisent un développement prématuré des glandes mammaires caractérisé par une augmentation de la surface épithéliale. À PND 21 les glandes sont immatures et se développent de façon minime avec un remodelage canalaire de faible intensité (Macias & Hinck, 2012; Masso-Welch *et al.*, 2000). Les niveaux d'hormones sexuelles circulant sont relativement bas; cependant, les glandes expriment déjà des récepteurs

hormonaux dont ER (Haslam & Nummy, 1992; Saji *et al.*, 2000), le récepteur aux androgènes (AR) (Heuberger *et al.*, 1982; Robinson *et al.*, 1999a) et PRLR (Hovey *et al.*, 2001). L'exposition précoce durant la vie *in utero* ou pendant la période péri/néonatale à d'autres PE, tels que le BPA (Markey *et al.*, 2001; Munoz-de-Toro *et al.*, 2005; Vandenberg *et al.*, 2007b), le nonylphenol (Moon *et al.*, 2007) et le DES (Boylan, 1978; Rothschild *et al.*, 1987) a également été associée à un développement prématuré et/ou a perturbé le développement des glandes mammaires chez les rongeurs. De plus, le fait que les androgènes agissent sur les glandes mammaires fœtales afin d'établir un dimorphisme sexuel entre les femelles et les mâles chez les rongeurs (Goldman *et al.*, 1976; Greene & Ivy, 1937; Imagawa *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1999b) suggère la présence de récepteurs et/ou de voies de signalisations fonctionnels à ce stade. Dans notre présente étude, la faible dose d'exposition aux BFR induisant un développement mammaire prématuré n'était pas associée avec une dérégulation significative de la signalisation hormonale à PND 21. Par ailleurs, nous avons observé une diminution significative de l'expression d'ER α à la moyenne dose, laquelle n'induisait pas d'effets, du moins quantifiés, sur la glande mammaire. D'une part, il est probable que ces incohérences résultent de différences d'exposition et d'absorption des BFR dans les tissus. En effet, notre exposition ayant été faite par la nourriture et *via* la mère, la modification de la physiologie de la mère durant la gestation (Costantine, 2014) est un facteur pouvant affecter ces deux paramètres. D'autre part, il a été montré qu'une augmentation des niveaux circulants de TH résulte en un développement canalaire et lobuloalvéolaire prématuré chez la souris (Vonderhaar & Greco, 1979). T3 stimule également la prolifération des cellules épithéliales mammaires humaines cancéreuses T47D *in vitro* et celle-ci est inhibée en présence d'anti-œstrogènes (Dinda *et al.*, 2002). Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes, et plus particulièrement les processus hormonaux potentiellement impliqués dans le développement prématuré induit par les BFR à PND 21.

À PND 46, nous avons observé une diminution de l'expression de protéines des jonctions adhérentes et communicantes et de THR α 1, ainsi qu'une perturbation de l'équilibre prolifération-apoptose. À cet âge, les rats ont déjà entamé leur progression pubertaire à la suite de l'activation de l'axe HPG (Masso-Welch *et al.*, 2000; Peper *et al.*, 2010). Les glandes mammaires subissent un remodelage caractérisé par une prolifération et une apoptose continue, et par la migration et l'invasion du TEB dans le stroma (Humphreys *et al.*, 1996; Masso-Welch *et al.*, 2000; Paine & Lewis, 2017). Ce processus est associé à une différenciation progressive des cellules immatures du TEB en cellules luminales et myoépithéliales dans les canaux naissants (Paine & Lewis, 2017; Sternlicht *et al.*, 2006a). Ces cellules vont alors établir des jonctions adhérentes et

communicantes stables, tel que suggéré par une augmentation de l'expression des cadhérines et de β -caténine, et par des niveaux élevés de Cx43 dans les glandes mammaires murines à ce stade (Dianati *et al.*, 2016). Dans une étude récapitulant la morphogenèse mammaire en culture organotypique en 3D *in vitro*, il a été montré que la multicouche de cellules internes qui migrent collectivement pour assurer la morphogenèse expriment E-cadhérine et β -caténine, mais n'établissent pas de jonctions serrées et ne sont pas polarisées (Ewald *et al.*, 2008; Ewald *et al.*, 2012). Cependant, lorsque l'épithélium bicouche est formé, les cellules retrouvent leur polarité (Ewald *et al.*, 2008). Une telle morphologie caractéristique de cellules non polarisées a été observée dans la multicouche des cellules du corps du TEB *in vivo* (Ewald *et al.*, 2012). Ainsi, au cours de la morphogenèse de la glande mammaire à la puberté, il y aurait un équilibre entre la perte et la conservation de certaines jonctions dans les cellules du TEB qui migrent collectivement, alors que ces jonctions sont rétablies lorsque les canaux sont formés (Ewald *et al.*, 2008; Ewald *et al.*, 2012). De plus, il a été suggéré que Cx43 *via* les canaux jonctionnels joue un rôle important dans la régulation de la migration collective des cellules du cancer du sein (Khalil *et al.*, 2020). Elle contrôle également l'expression de N-cadhérine qui est essentielle à la migration collective des cellules de la crête neurale chez *Xenopus* (Kotini *et al.*, 2018). Notons que T3 régule l'expression d'E-cadhérine (Izaguirre & Casco, 2010), de β -caténine (Fanti *et al.*, 2014; Kress *et al.*, 2009; Plateroti *et al.*, 2006) et de Cx43 (Bacova *et al.*, 2016; de Montgolfier *et al.*, 2011; St-Pierre *et al.*, 2003; Stock & Sies, 2000; Stock *et al.*, 1998). Elle stimule également la migration des cellules épithéliales cancéreuses mammaires T47D *in vitro* (Flamini *et al.*, 2017). Ainsi, nous pouvons supposer que les dérégulations induites par les BFR à PND 46 pourraient résulter de la diminution de l'expression de $\text{THR}\alpha 1$ observée à ce stade, et seraient donc liées à une diminution de la signalisation des TH.

Contrairement à ce qui a été observé à un plus jeune âge, nous n'avons pas observé de changements quantifiables sur la morphologie des glandes mammaires (Figure 14; Annexe I. 10.2.2) ainsi que sur les jonctions cellulaires à PND 208 (Figure 15;16; Annexe I. 10.2.3-4). D'un point de vue physiologique, une hypothèse serait que les altérations observées aux stades précédents, et en particulier à PND 46, ne semblent pas persister chez l'adulte. Cette hypothèse est supportée par l'étude de Shamir et collaborateurs, mettant en évidence que la perte d'E-cadhérine dans l'épithélium mammaire conduit à une exclusion des cellules de l'épithélium *in vivo* (Shamir *et al.*, 2014). L'exclusion des cellules E-cad' serait due à l'absence de redondance fonctionnelle entre E-cadhérine et d'autres cadhérines exprimées dans la glande mammaire. En effet, dans l'épithélium de la peau, la perte d'expression d'E-cadhérine entraîne certes une diminution de l'expression protéique de β -caténine, mais conduit à une hyperplasie qui serait

conséquence à un mécanisme de compensation caractérisé par une surexpression de P-cadhérine et une augmentation de la prolifération des cellules basales (Tinkle *et al.*, 2004). Une autre hypothèse serait que les BFR induisent des effets qui ne seraient pas visibles en raison du fait qu'à cet âge l'épithélium mammaire ramifié est formé, différencié et relativement quiescent (Hovey *et al.*, 2002; Masso-Welch *et al.*, 2000). Cependant ces effets pourraient être observables à un stade de développement plus dynamique tel que la grossesse et la lactation. En effet, la perte d'E-cadhérine dans les cellules luminales alvéolaires à partir de la mi-gestation et durant la lactation conduit à une altération importante de la différenciation de l'épithélium alvéolaire et à une régression massive des alvéoles au moment de la lactation chez la souris (Boussadia *et al.*, 2002). Si tel est le cas, ces effets pourraient être une conséquence des dérégulations des protéines jonctionnelles, de l'homéostasie cellulaire ainsi que de la signalisation thyroïdienne qui ont été induites par les BFR aux stades de développements précédents. Ils pourraient aussi résulter de modifications indépendantes découlant de modifications épigénétiques puisqu'il a été montré que les PBDE et leurs métabolites peuvent induire des changements dans la méthylation de l'ADN, la compaction de la chromatine ou encore des modifications des histones (Dao *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018; Kamstra *et al.*, 2014; Poston & Saha, 2019; Robinson *et al.*, 2019; Suvorov *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016). Enfin, nous ne pouvons exclure la présence d'altérations histologiques et/ou moléculaires non quantifiées. D'autres études évaluant ces différents paramètres pourraient contribuer à une meilleure compréhension de l'absence des BFR à ce stade.

4.3 Impact des BFR sur les glandes mammaires : effets maternels, développementaux, persistants et/ou latents ?

L'exposition *in utero* et lactationnelle est un protocole utilisé en toxicologie de la reproduction afin de déterminer comment l'exposition à un toxique durant les périodes critiques que sont la vie *in utero* et infantile (néonatale et périnatale) pourrait se répercuter sur le développement et la fonction reproductive du descendant au cours de la vie postnatale (United States Environmental Protection Agency). Dans notre protocole, il est important de noter que la présence de différentes fenêtres d'analyse des glandes mammaires des rats permet de distinguer les effets à court terme, qui sont induits par l'exposition indirecte, mais « active » aux BFR *via* la mère (PND 21), des effets à moyen (PND 46) et long terme (PND 208) qui eux découlent de modifications induites par cette exposition au cours des périodes de développement précédentes et/ou de la persistance des BFR dans les tissus (Figure 4-2).

Le développement prématuré observé à court terme chez les ratons à PND 21 pourrait résulter de modifications qui ont eu lieu soit *in utero* en raison de l'exposition transplacentaire, soit durant le développement postnatal précoce à la suite de l'exposition lactationnelle, ou des deux. Sachant que l'exposition a eu lieu *via* la mère, on pourrait supposer que les effets observés à PND 21 découlent également de la toxicité induite par les BFR chez la mère. Dans une étude précédente, nos collaborateurs ont montré que l'exposition péri-conceptionnelle et gestationnelle au même mélange de BFR entraîne une altération de la folliculogénèse et de la stéroïdogénèse chez les mères exposées à la faible dose et que cela serait potentiellement dû à une perturbation de la fonction endocrine du placenta (Lefevre *et al.*, 2016a). Cependant, aucune modification de la physiologie (poids total, poids du foie et activité métabolique) et du taux d'hormones circulant n'a été observée chez les mères exposées à la faible dose de BFR dans notre présente étude (Tung *et al.*, 2016). De même, la faible dose de BFR n'a pas eu d'impacts sur la taille de la portée ainsi que sur le poids des ratons aussi bien à la naissance, qu'à la fin de la lactation, suggérant une absence d'effets physiologiques sur la fonction placentaire ainsi que sur la capacité des mères à nourrir leurs petits. Toutefois, les BFR, notamment les moins bromés (Zhao *et al.*, 2013) (Frederiksen *et al.*, 2010a) peuvent traverser la barrière placentaire et se retrouver du côté fœtal de l'interface fœto-maternelle (Ruis *et al.*, 2019) et nous ne pouvons exclure le fait qu'ils puissent induire des modifications de l'environnement *in utero* que nous n'aurions pas détectées. Ainsi, nos données suggèrent que les effets induits par les BFR à court terme à PND 21 surviennent de façon indépendante d'une toxicité maternelle. Néanmoins, notre protocole expérimental ne permet pas de distinguer les effets qui découlent uniquement (1) de l'exposition *in utero* (altérations induites au cours du développement prénatal), (2) de l'exposition lactationnelle (altérations induites au cours du développement périnatal) ou (3) de l'exposition conjointe *in utero* et par l'allaitement. Pour cela, il faudrait entre autres, évaluer la présence, et les effets des BFR, sur l'expression des récepteurs et des transporteurs des hormones thyroïdiennes tel que le transporteur monocarboxylate 8 (MCT8) (Groeneweg *et al.*, 2020) dans le placenta, ainsi que leur présence et leurs effets sur la glande mammaire fœtale et celle des nouveaux nés. Il sera également important de quantifier les niveaux de BFR présents dans le lait maternel et d'évaluer leur relation avec le niveau d'expression des THR dans la glande mammaire.

À PND 46, la perturbation des jonctions intercellulaires et de l'homéostasie cellulaire découle d'une exposition qui a eu lieu durant le développement *in utero* et infantile, et qui s'est arrêtée au jour 21, soit 25 jours avant l'analyse. Il s'agirait donc d'effets latents qui résultent de modifications induites durant le développement précoce et qui ne se reflètent qu'à PND 46 lorsque la dynamique cellulaire est plus importante et où que le milieu physiologique/hormonal est adapté

(Figure 4-2). Des évidences montrant qu'une exposition précoce au BPA (Munoz-de-Toro *et al.*, 2005; Vandenberg *et al.*, 2007b) ou au BPS (Kolla *et al.*, 2018) induit des altérations dans la glande mammaire plus tard au cours du développement postnatal supportent notre hypothèse. Une autre hypothèse serait qu'en raison de la persistance des BFR, ceux-ci représentent un stimulus ininterrompu et cela même lorsque l'exposition s'est arrêtée. En effet, nous avons observé des niveaux quantifiables de BFR dans le foie des ratons à PND 46, bien que ceux-ci étaient inférieurs aux niveaux mesurés à PND 21 en fin de lactation (Tung *et al.*, 2016). De plus, il a été montré que les métabolites de BFR possèdent des propriétés de PE plus accrues que les molécules parents (Hamers *et al.*, 2008; Meerts *et al.*, 2001b). Enfin, les effets observés à PND 46 pourrait résulter d'une « adaptation » de l'organisme face au développement précoce observé à PND 21 afin de pouvoir restaurer une homéostasie interne, pour le moins d'un point de vue morphologique. Enfin, l'absence d'altérations morphologiques visibles aussi bien à PND 46 qu'à PND 208 est cohérente avec l'hypothèse d'exclusion des cellules E-cad⁺ de l'épithélium (Figure 4-2). Notons qu'il a été démontré que ces cellules exclues restent viables (Shamir *et al.*, 2014) alors que dans notre présente étude nous avons observé une diminution de l'expression de caspase-3 clivée à PND 46. Une telle incohérence pourrait être expliquée par le fait que l'apoptose serait induite dans des cellules autres que les cellules E-cad⁺ et/ou due au fait que notre méthode de quantification basée sur les protéines extraites de la glande mammaire entière n'est pas suffisamment ciblée pour permettre caractériser la population spécifique de cellules qui sont marquées par caspase-3. Pour une meilleure caractérisation de ces mécanismes, il faudrait d'une part évaluer au niveau histologique, par exemple par immunofluorescence, la présence d'amas de cellules épithéliales (positives pour K8/K18) et apoptotiques (positives pour caspase-3 clivée) mais négatives pour E-cadhérine chez les animaux entre PND 46 et PND 208. D'autres part il serait intéressant d'évaluer l'apoptose de façon spécifique dans l'épithélium et dans le stroma à l'aide d'anticorps spécifiques. Toutefois, l'absence d'effets quantifiés à PND 208 pourrait également être dû au fait que contrairement à PND 46, les BFR ne persistent pas dans les tissus à PND 208. En effet, une limite dans notre analyse vient du fait que nous n'avons pas quantifié la présence des BFR dans certains tissus dont la glande mammaire, à PND 208.

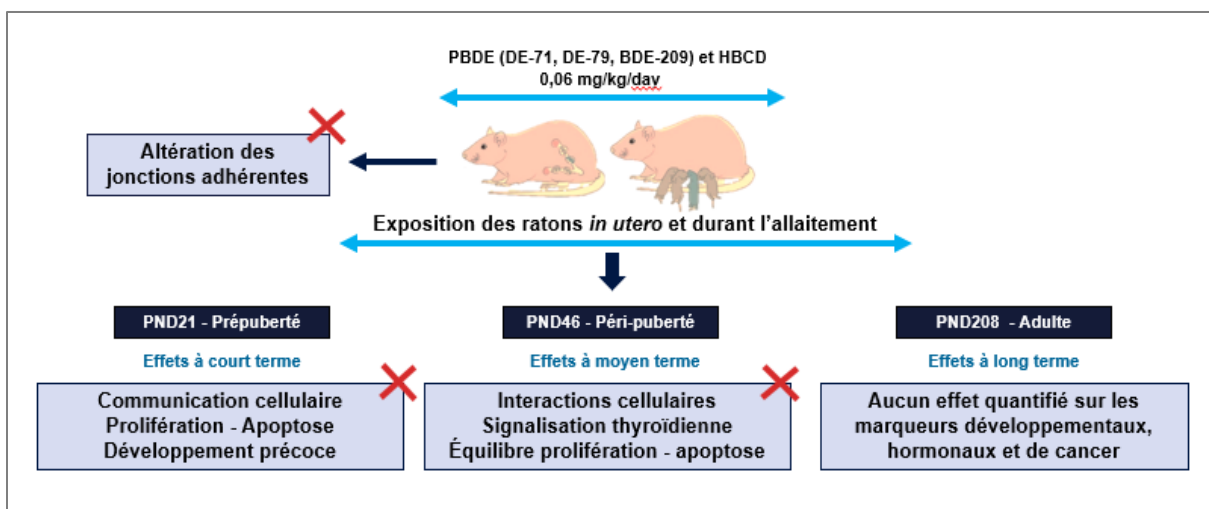


Figure 4-2 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur le développement postnatal des glandes mammaires

L'exposition aux BFR cible les jonctions intercellulaires et l'homéostasie cellulaire aussi bien chez les mères exposées directement que chez leurs rats exposés indirectement. Les effets de l'exposition *in utero* et lactationnelle diffèrent en fonction de l'âge des rats, suggérant l'implication de mécanismes différents. À court-terme les effets des BFR pourraient être dus à une exposition active et/ou à des effets maternels non détectés. À moyen-terme les effets observés pourraient résulter d'une latence et/ou une persistance de l'exposition. À l'âge adulte l'absence d'effets pourrait être conséquente à des mécanismes de restauration de l'homéostasie des glandes mammaires, cependant des modifications subtiles, épigénétiques ou non, pourraient induire des effets substantiels plus tard dans la vie ou durant le cycle gestation-lactation lorsque la dynamique cellulaire et jonctionnelle est élevée.

L'ensemble de nos données suggère que les effets de l'exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR sur les glandes mammaires relèvent de mécanismes complexes, spécifiques ou non à l'état de développement des glandes à la prépuberté, à la péri-puberté et à l'âge adulte. De plus, les mécanismes impliqués pourraient être liés à la fois (1) à l'exposition indirecte, mais « active » aux BFR *via* la mère *in utero* et pendant l'allaitement, (2) à des BFR persistants dans les tissus et entraînant une exposition continue, (3) à des effets latents, ou (4) à une combinaison de l'ensemble de ces facteurs. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser ces effets, et élucider les mécanismes impliqués dans ces effets des BFR aux différentes fenêtres de développement analysées.

4.4 L'exposition aux BFR influence-t-elle les risques de cancer du sein ?

Bien que nous n'ayons pas observé de modifications des marqueurs développementaux ou de l'homéostasie cellulaire à PND 208 (Figure 14-16;18; Annexe I. 10.2-3; 6), le développement précoce observé à PND 21 ainsi que la perte des protéines jonctionnelles et de l'homéostasie cellulaire à PND 46 représentent tous les deux des facteurs de risques associés au cancer du sein aussi bien *in vivo* que chez l'humain (Aasen, 2015; Fenton, 2006; Hazan *et al.*,

2000; Jamieson *et al.*, 1998; Macon & Fenton, 2013; Nagi *et al.*, 2005; Naus & Laird, 2010; Nieman *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2001).

Un développement prématuré des glandes mammaires tel qu'observé à PND 21 est généralement associé à une exposition précoce et plus étendue à des facteurs mammothrophiques, tels que les hormones endogènes (Eshre Capri Workshop Group, 2004; Henderson & Feigelson, 2000). Cette exposition inappropriée pourrait alors stimuler la prolifération cellulaire sur une période de vie plus longue et par extension favoriser l'accumulation de mutations qui pourraient initier et/ou promouvoir le cancer (Eshre Capri Workshop Group, 2004; Henderson & Feigelson, 2000; Soto *et al.*, 2013).

La perte d'E-cadhérine (Derksen *et al.*, 2011; Derksen *et al.*, 2006) ou de Cx43 uniquement (Plante *et al.*, 2011a), tel qu'observé à PND 46, n'est pas associée à la formation de tumeurs *in vivo*. En revanche, la perte d'E-cadhérine dans les cellules possédant également une mutation du gène suppresseur de tumeur *Tp53* contribue au développement de tumeurs mammaires invasives et métastatiques (Derksen *et al.*, 2011; Derksen *et al.*, 2006). De même, les souris ayant une expression réduite de Cx43 dans la glande mammaire sont plus susceptibles de former un grand nombre de métastases de cancer du sein au poumon lorsqu'elles sont exposées au 7,12-Dimethylbenz[a]anthracène (DMBA) (Plante *et al.*, 2011a). Ces données suggèrent que la perte d'E-cadhérine et de Cx43 ne semblent pas initier la cancérogenèse mais pourrait contribuer à la progression tumorale (Derksen *et al.*, 2011; Derksen *et al.*, 2006; Plante *et al.*, 2011a).

Ainsi, nos résultats suggèrent que les animaux exposés aux BFR lors de la vie *in utero* et par la lactation pourraient, dans le cas où ils seraient sujets à des mutations initiatrices de cancer, être plus susceptibles de développer des tumeurs mammaires.

4.5 Les BFR induisent des effets à la faible dose et des courbes non linéaires

La majeure partie de nos résultats montre des effets des BFR sur la glande mammaire chez les animaux exposés à la faible dose d'exposition. Les effets à faible dose ont été définis par le programme national de toxicologie de l'Agence Américaine de Protection de l'environnement (U.S EPA) comme « tout changement biologique survenant soit (1) dans la gamme d'expositions humaines typiques, soit (2) à des doses inférieures à celles généralement utilisées dans les protocoles traditionnels d'évaluations des risques toxicologiques (Melnick *et al.*, 2002). Ces effets ont également été décrits comme ceux qui sont observés à (3) une dose inférieure à la plus faible dose produisant un effet indésirable (*Lowest-observed-adverse-effect*

level (LOAEL)) (Welshons *et al.*, 2006) ou (4) à une dose administrée à un animal et qui produit des concentrations sanguines de ce produit chimique qui sont dans la gamme de ce qui a été mesuré dans la population humaine générale (Brucker-Davis *et al.*, 2001; Vandenberg *et al.*, 2007a). La plus faible dose de notre mélange rentre donc dans la première catégorie. En effet, afin d'avoir la dose d'exposition souhaitée, la concentration de BFR dans la nourriture a été formulée en prenant compte la quantité moyenne journalière d'aliments ingérée par les animaux. Notons que cette faible dose d'exposition « réelle » est représentative de l'exposition maximale (1.16 µg de BFR/kg p.c./jour) estimée chez les enfants en bas âge sur la base de l'ingestion de la poussière de maison (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). Toutefois, elle est inférieure aux valeurs critiques de PBDE (PBDE-99) et d'HBCDD estimées par Santé Canada, soit 2,6 µg/kg p.c./jour chez les nouveau-nés allaités âgés de 0 à 6 mois (Santé Canada, 2006) et 4,0 µg/kg p.c./jour chez les enfants âgés de 6 à 24 mois (Environment and Climate Change Canada, 2011), respectivement. Des effets de la faible dose d'exposition à notre mélange ont été également observés dans divers tissus par notre équipe ou nos collaborateurs (Berger *et al.*, 2014; Dianati *et al.*, 2017; Lefevre *et al.*, 2016a; Tung *et al.*, 2017), ainsi qu'à la suite d'expositions à des mixtures commerciales de PBDE (Chen *et al.*, 2018a; Lilienthal *et al.*, 2006; Talsness *et al.*, 2008). Tel que décrit précédemment, le système endocrinien est organisé de façon à répondre à de faibles doses de stimuli hormonaux (Brucker-Davis *et al.*, 2001; Vandenberg, 2014; Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003) et il est de plus en plus reconnu que les PE peuvent éliciter des effets à ces doses (Vandenberg, 2014; Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2006). Les mécanismes sous-jacents à ces effets de faibles doses des PE pourraient inclure une biodisponibilité et/ou une affinité pour le récepteur qui soit distincte de celle des hormones endogènes. Ceux-ci pourraient aussi recruter des cofacteurs différents et induire d'autres voies de signalisations plus efficaces (Vandenberg, 2014; Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003).

Nous avons également observé des courbes doses-réponses non linéaires pour certains paramètres tels que l'expression protéique d'ERα à PND 21 ou celle de caspase-3 clivée à PND 46. D'autres courbes non-linéaires ont également été observées par nos collaborateurs dans les ovaires de femelles exposées de façon péri-conceptionnelle et durant la gestation au mélange de BFR (Lefevre *et al.*, 2016a). Or, la même exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR a aussi induit des effets linéaires doses-dépendants dans d'autres tissus, tels que les ovaires (Allais *et al.*, 2020) et le squelette (Tung *et al.*, 2016). Bien que des PE tels que le BPA puissent induire des NMDRC (Vandenberg *et al.*, 2012), il nous aurait fallu tester un plus grand nombre de doses et si la tendance d'effets non-linéaires se maintenait, déterminer la monotonie ou non de la

courbe par exemple grâce à la corrélation de Spearman. D'une part, l'observation de ces courbes non linéaires pourrait être due à une distribution et une absorption différente des BFR dans les tissus. En effet, notre mélange de BFR administré par l'alimentation, a été formulé pour entraîner une exposition moyenne à 0,05, 17,4 et 47,5 mg de BFR/kg p.c./jour en supposant une consommation alimentaire quotidienne de 80 g de nourriture (Berger *et al.*, 2014). Toutefois, parce que la consommation alimentaire était constante durant la gestation, la prise de poids des mères a pu affecter la dose de BFR réellement délivrée (Berger *et al.*, 2014). De plus, bien que la présence de BFR ait été confirmée dans certains tissus dont le foie des rats à PND 21 et PND 46 (Tung *et al.*, 2016), il aurait également été important de pouvoir évaluer la présence des BFR dans le lait maternel ou dans le placenta. D'autre part, il faudrait prendre en compte une certaine variabilité dans la composition (épithélium et stroma) de la glande mammaire des animaux qui pourrait se refléter lors de nos analyses d'immunobuvardage de type western blot qui sont faits à partir de protéines extraites de la glande mammaire entière. Enfin, une partie de la variabilité pourrait être inhérente à cette méthode d'analyse. Cependant, le fait que nous ayons choisi de normaliser la densité des bandes de nos protéines d'intérêt par rapport aux protéines totales présentes dans le gel permet de minimiser la variation qui pourrait être due au chargement des protéines dans le gel ou à l'utilisation de gènes de références dont l'expression pourrait être affectée par notre traitement.

Nos résultats observés à PND 21 sont contraires à ceux précédemment rapportés au même stade chez les rats ayant été exposés à une seule mixture commerciale de PBDE, le DE-71 (Kodavanti *et al.*, 2010b). Bien que ces dissemblances d'effets observés à PND 21 pourraient être dues aux différences entre les protocoles expérimentaux et les souches de rats utilisés dans leur étude et dans la nôtre, il est également probable qu'elles soient dues aux mixtures utilisées. Le DE-71, utilisé dans l'étude de Kodavanti et collaborateurs a été caractérisé comme étant faiblement estrogénique dans les cellules de cancer du sein MCF-7 *in vitro* et dans l'utérus de souris *in vivo* (Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b). A l'opposé, notre mixture en plus de contenir du DE-71, comporte également d'autres PBDE ubiquitaires que sont le DE-79 et le BDE-209, ainsi qu'une mixture d'HBCDD (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). Ces BFR et/ou leurs métabolites, peuvent induire une activité agoniste ou antagoniste des THR-, ER-, PR- et AR, et/ou de leurs voies de signalisation (Dang *et al.*, 2007; Hamers *et al.*, 2006; Hamers *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Meerts *et al.*, 2001b; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b; Schriks *et al.*, 2007; Schriks *et al.*, 2006; Yamada-Okabe *et al.*, 2005). On parle alors d'effets combinés des composants de la mixture, même si ceux-ci peuvent induire des effets différents à l'échelle individuelle (Diamanti-Kandarakis *et al.*,

2009; Kortenkamp, 2007). Des différences similaires entre les effets de mélanges et de composés individuels ont été montrées aussi bien *in vitro* (Rajapakse *et al.*, 2002b; Silva *et al.*, 2002a) qu'*in vivo* (Brian *et al.*, 2005; Crofton *et al.*, 2005; Hass *et al.*, 2007; Tinwell & Ashby, 2004). Il aurait été intéressant de comprendre quel BFR présent dans notre mélange est associée aux effets observés, par exemple, grâce à l'utilisation de modèles prédictifs basés sur la relation entre la structure et l'activité et les modes d'action connus des BFR (Schneider *et al.*, 2019). Cependant, en ce qui concerne l'étude des effets des BFR *in vivo*, il est difficile d'établir telle une relation car les BFR sont entre autres métabolisés par débromation (Huwe & Smith, 2007) ce qui entraîne la production de congénères moins bromés qui peuvent posséder une activité endocrinienne différente de la molécule initiale (Hamers *et al.*, 2008; Meerts *et al.*, 2001b). Toutefois, bien que si la caractérisation des effets de mélanges reste un domaine complexe, plusieurs études sont encore nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels notre mélange de BFR affecte le développement des glandes mammaires.

Au regard de l'ensemble de ces données, nos résultats indiquent que (1) l'exposition aux BFR semble altérer le développement mammaire et éliciter des effets de faibles doses et (2) la glande mammaire pourrait répondre différemment à une exposition à des PE individuels ou à un mélange de différents PE. Bien que notre protocole présente des limites, nos données appuient l'importance d'étudier des faibles doses et des mélanges représentatifs de l'exposition humaine environnementale pour une meilleure caractérisation des dangers associés aux perturbateurs endocriniens et *in fine* une meilleure évaluation de leurs risques sur la santé.

4.6 Physiologie humaine vs rat : quelle est la pertinence de notre étude ?

Même s'il existe des différences relatives à la physiologie de chaque espèce, d'un point de vue général, les étapes du développement mammaire entre les rongeurs et les humains sont similaires (Masso-Welch *et al.*, 2000; Russo & Russo, 2004) et les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents sont conservés chez les mammifères (Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment, 2000). Autant chez l'humain que chez les rongeurs, le développement mammaire est initié durant la vie embryonnaire, puis la glande subit un remodelage important sous l'influence des hormones à partir de la puberté, avant d'atteindre sa différenciation fonctionnelle durant la lactation (Hassiotou & Geddes, 2013; Macias & Hinck, 2012; Masso-Welch *et al.*, 2000; Medina, 1996; Russo & Russo, 2004). En raison de ces analogies développementales, ces deux espèces possèdent des fenêtres similaires de susceptibilité aux PE (Fenton *et al.*, 2012; Rudel *et al.*, 2011) et semblent éliciter des réponses

proches d'un point de vue de la perturbation endocrinienne par exemple dans le cas du DES ou du TCDD (Blatt *et al.*, 2003; Brouwers *et al.*, 2006; Bruner-Tran *et al.*, 2017; McLachlan, 2006; Newbold, 2004). Cependant, il existe des différences au niveau de la physiologie endocrinienne (concentrations circulantes d'hormones, molécules de transport...), ainsi qu'au niveau des mécanismes de toxicocinétique et de toxicodynamique chez ces deux espèces (Tominaga *et al.*, 2006; Witorsch, 2002) qui nécessitent d'être considérées.

Concernant les BFR, les trois études rapportant un lien entre les concentrations sériques de PBDE et le développement des seins chez les filles ont montré une association entre de fortes concentrations sériques de PBDE et un développement des seins précoces (Deodati *et al.*, 2016), ou tardif (Wainman *et al.*, 2016) ou aucune association entre ces paramètres (Leijds *et al.*, 2008). Cependant, ces derniers résultats sont questionnables en raison du nombre limité de participantes dans la cohorte (n = 9 filles). Dans notre modèle animal, nous avons observé que l'exposition à un mélange de PBDE et d'HBCDD représentatif de l'exposition humaine environnementale induit une altération du développement postnatal des glandes mammaires. Les mécanismes sous-jacents semblent impliquer une perturbation des interactions cellulaires *via* les jonctions, de la signalisation des TH et de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose. Cependant, si nos résultats représentent un apport majeur à la compréhension des effets de l'exposition aux BFR sur les glandes mammaires et suggèrent qu'ils pourraient être impliqués dans la progression tumorale, les données de la littérature restent limitées. Des études supplémentaires, notamment dans des modèles complémentaires (*in vivo* et *in vitro* en deux, et trois dimensions) sont nécessaires afin de permettre une meilleure compréhension des effets des BFR sur le développement des glandes mammaires et leur potentielle implication dans le développement d'anomalies développementales et de pathologies telles que le cancer. Cela d'autant plus que les PBDE et l'HBCDD persisteront dans notre environnement pour plusieurs années encore.

6 Originalité et limites de l'étude

L'un des points forts de notre étude est qu'elle est la première à évaluer les effets d'une mixture de BFR représentative des congénères retrouvés dans la poussière de maison en Amérique du Nord (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). De plus, notre protocole expérimental possède deux points originaux. En effet, l'exposition des mères, à des concentrations de BFR plus élevées dans l'alimentation, entraîne des doses d'exposition inférieures, dont la plus faible est représentative de l'exposition humaine maximale. D'une part, ce protocole permet d'entraîner une exposition majoritaire par ingestion comme c'est le cas chez l'humain. D'autre part, le second point original vient du fait que la faible dose d'exposition réelle des mères après alimentation, est également représentative de la dose d'exposition humaine sur la base de l'ingestion d'un certain ratio de poussière de maison par les enfants en bas âge (Berger *et al.*, 2014).

Toutefois, l'absorption et la distribution des BFR et/ou de leurs métabolites dans la glande mammaire reste un paramètre important à déterminer pour une meilleure interprétation de nos résultats. De plus, l'exposition des ratons étant faite *in utero*, les adaptations de l'organisme de la mère lors de la gestation (métabolisme hépatique, digestion, volume sanguin, activité rénale etc) (Costantine, 2014) pourraient influencer la toxicité des BFR chez ceux-ci. Néanmoins, le fait d'observer majoritairement des effets de la faible dose aussi bien chez les mères que chez leurs ratons indique que, outre le fait que la concentration sanguine ou tissulaire des BFR puisse être influencée par les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et/ou d'excrétion, les taux internes de BFR semblent, *in fine*, altérer le développement de la glande mammaire. Cela supporte d'avantage notre hypothèse d'effets de faible dose des BFR dans la glande mammaire.

7 Atteinte des objectifs du projet et perspectives

En général la plupart des objectifs du projet, notamment ceux visant à évaluer les effets de l'exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR chez les ratons à la prépuberté et à la puberté ont majoritairement été atteints. D'un point de vue macroscopique nous avons pu évaluer les effets des BFR sur la morphologie des glandes mammaires à ces différents âges et lorsque des effets étaient observés, nous avons approfondi nos analyses par des analyses tissulaires et moléculaires. Cependant à l'âge adulte, l'absence d'effets visibles pourrait être dû au fait que, bien que nous ayons évalué plusieurs paramètres, nous n'ayons pas réalisé des analyses plus approfondies, ou pas analysé les bonnes cibles. Une étude transcriptomique pourrait, éventuellement, mettre en évidence des effets et/ou des nouvelles pistes à explorer. Par ailleurs, les problèmes techniques et contraintes biologiques de notre modèle ont limité l'étendue de nos analyses au niveau tissulaire. Cela explique entre autres, le faible nombre d'échantillons utilisés pour nos expériences d'immunofluorescence ou de coloration au trichrome de Masson, et pourrait contribuer à expliquer l'observation de tendances d'effets à PND 21, et non de valeurs significatives.

Pour une meilleure compréhension des effets des BFR sur la glande mammaire, plusieurs études, dont certaines sont actuellement en cours au laboratoire, seraient nécessaires aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

- 1- Éclaircir la potentielle relation entre les BFR, les hormones thyroïdiennes et les protéines jonctionnelles

Pour cela, les cellules de la lignée épithéliale luminale mammaire humaine T47D, qui expriment les récepteurs THR, ER, PR ainsi que la plupart des protéines jonctionnelles, pourraient représenter un modèle *in vitro* adéquat. Il serait intéressant d'évaluer les effets (1) des hormones thyroïdiennes, (2) des BFR, et (3) leurs effets conjoints, sur l'expression d'E-cadhérine, de β -caténine, de Cx43, et le niveau de p-Cx43. Par la suite, l'utilisation d'un inhibiteur de THR α 1 pourrait permettre d'évaluer l'implication de ce récepteur dans la toxicité des BFR. En plus de la culture en deux-dimension, des cellules non-tumorales telles que celles de la lignée MCF-12A pourraient être cultivées en trois-dimensions dans du Matrigel, conditions dans lesquelles elles forment spontanément des structures similaires aux alvéoles. Puis, il serait intéressant (1) d'évaluer l'effet des BFR (en présence ou non d'hormones thyroïdiennes et d'inhibiteur de THR α 1) sur la capacité des cellules à former ces structures *in vitro* et (2) sur la présence de jonctions intercellulaires par immunofluorescence.

2- Déterminer si les effets des BFR pourraient contribuer à la progression cancéreuse

- *In vivo*

Une étude visant à tester cette hypothèse est actuellement en cours au laboratoire. Dans celle-ci, les rats sont exposés *in utero* et durant la lactation au même mélange de BFR, puis ils seront ensuite exposés au carcinogène DMBA durant la puberté. En plus des paramètres évalués dans notre présente étude, la présence de tumeurs dans les glandes mammaires, de métastases aux poumons, des marqueurs typiques de cancer, les concentrations sériques d'œstrogènes, de progestérone et d'hormone thyroïdiennes seront également évaluées. Il sera également intéressant d'évaluer la quantité de BFR dans la glande mammaire. Cette étude permettra de vérifier les résultats de notre présente étude, et de confirmer ou d'infirmer notre postulat selon lequel l'exposition précoce aux BFR induit des altérations qui pourraient contribuer à la progression du cancer du sein.

- *In vitro*

Cet axe serait complémentaire à l'étude *in vivo* afin de permettre de mieux comprendre les mécanismes cellulaires des BFR en condition non-tumorigénique et pathologique. L'utilisation de trois modèles cellulaires dont un cancéreux et deux non-tumorigéniques (luminal et myoépithélial) permettrait d'évaluer l'effet des BFR en fonction du statut cellulaire, mais aussi du type cellulaire. Les cellules seraient exposées à des doses pertinentes de BFR, puis leurs effets sur (1) l'expression des jonctions et (2) les propriétés tumorigéniques (prolifération, apoptose, migration, invasion) seraient évalués.

8 Contributions générales

L'ensemble des données recueillies dans le cadre de ce projet de doctorat de contribuer à l'avancement des connaissances dans différents domaines de recherche :

❖ Implications pour la recherche fondamentale

- L'exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR induit une altération des jonctions intercellulaires, de l'expression protéique de THR α 1 et de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose au cours du développement postnatal des glandes mammaires. Nous suggérons pour la première fois l'existence d'une potentielle relation complexe entre la signalisation des hormones thyroïdiennes et les interactions cellulaires *via* les jonctions dans la glande mammaire.
- Les jonctions intercellulaires sont altérées par les BFR lorsque l'exposition a lieu durant la gestation et la lactation, tel que précédemment observé chez les mères (Dianati *et al.*, 2017). Nous avons mis en évidence que de telles dérégulations sont aussi observées chez la descendance femelle qui a été exposée durant la vie *in utero* et périnatale. Ces résultats indiquent que ces jonctions intercellulaires sont des cibles privilégiées par les BFR dans la glande mammaire et suggèrent que de tels mécanismes pourraient aussi être impliqués dans la toxicité d'autres PE dans la glande mammaire.

❖ Implication pour la santé des glandes mammaires

- L'exposition *in utero* et lactationnelle aux BFR induit des effets à court terme, mais aussi des effets latents qui sont caractéristiques de facteurs pouvant contribuer au développement d'anomalies développementales de la glande mammaire ou à la progression tumorale. De plus, l'observation d'effets latents suggère qu'une exposition précoce aux BFR pourrait contribuer au développement de pathologies adultes.
- En plus des effets spécifiques à la fenêtre de développement durant laquelle l'exposition a lieu, les effets des BFR varient selon l'état de différenciation de la glande mammaire, associé à une réceptivité différente aux hormones selon le moment de l'évaluation toxicologique. Ces résultats appuient l'importance de mener des études prenant en compte des populations plus sensibles que sont le fœtus en développement, l'enfant en bas âge, la jeune fille pubère et la femme enceinte, afin de mieux comprendre les effets de l'exposition aux PE environnementaux sur la santé mammaire.

❖ Implication pour la toxicologie

- Nos résultats indiquent qu'une mixture de BFR représentative de l'exposition humaine entraîne des effets différents de ceux observés à la suite de l'exposition à un seul composé, suggérant ainsi des mécanismes différents.
- Notre mélange de BFR induit des effets à la faible dose qui est représentative de l'exposition humaine environnementale et inférieure aux valeurs critiques d'exposition établies par les organismes de régulation. Nos données appuient l'importance d'évaluer des doses typiques de l'exposition humaine pour mieux caractériser les effets des toxiques et en particulier des perturbateurs endocriniens.

9 BIBLIOGRAPHIE

- Aasen T (2015) Connexins: junctional and non-junctional modulators of proliferation. *Cell and tissue research* 360(3):685-699.
- Aasen T, Johnstone S, Vidal-Brime L, Lynn KS & Koval M (2018) Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 19(5).
- Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD & Laird DW (2016) Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat Rev Cancer* 16(12):775-788.
- Abbasi G, Buser AM, Soehl A, Murray MW & Diamond ML (2015) Stocks and flows of PBDEs in products from use to waste in the U.S. and Canada from 1970 to 2020. *Environ Sci Technol* 49(3):1521-1528.
- Abdelouahab N, Langlois MF, Lavoie L, Corbin F, Pasquier JC & Takser L (2013) Maternal and cord-blood thyroid hormone levels and exposure to polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls during early pregnancy. *Am J Epidemiol* 178(5):701-713.
- Abel ED, Boers ME, Pazos-Moura C, Moura E, Kaulbach H, Zakaria M, Lowell B, Radovick S, Liberman MC & Wondisford F (1999) Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. *The Journal of clinical investigation* 104(3):291-300.
- Adan RA, Van Leeuwen FW, Sonnemans MA, Brouns M, Hoffman G, Verbalis JG & Burbach JP (1995) Rat oxytocin receptor in brain, pituitary, mammary gland, and uterus: partial sequence and immunocytochemical localization. *Endocrinology* 136(9):4022-4028.
- Ahmed OM, Abd El-Tawab SM & Ahmed RG (2010) Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 28(6):437-454.
- Ahmed OM, Ahmed RG, El-Gareib AW, El-Bakry AM & Abd El-Tawab SM (2012) Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: II-the developmental pattern of neurons in relation to oxidative stress and antioxidant defense system. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 30(6):517-537.
- Ahn NS, Hu H, Park JS, Park JS, Kim JS, An S, Kong G, Aruoma OI, Lee YS & Kang KS (2005) Molecular mechanisms of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced inverted U-shaped dose responsiveness in anchorage independent growth and cell proliferation of human breast epithelial cells with stem cell characteristics. *Mutation research* 579(1-2):189-199.
- Alaee M, Arias P, Sjodin A & Bergman A (2003) An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international* 29(6):683-689.
- Albrektsen G, Heuch I, Hansen S & Kvale G (2005) Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *British journal of cancer* 92(1):167-175.

- Ali R & Wendt MK (2017) The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression. *Signal transduction and targeted therapy* 2.
- Allais A, Albert O, Lefevre PLC, Wade MG, Hales BF & Robaire B (2020) In Utero and Lactational Exposure to Flame Retardants Disrupts Rat Ovarian Follicular Development and Advances Puberty. *Toxicol Sci* 175(2):197-209.
- Allen J, Mcclean M, Stapleton H, Nelson J, Sanchez G, Fraser A & Webster T (2006) PBDE levels in indoor air and dust collected from US urban residences. *Epidemiology* 17(6):S375-S375.
- Allen JG, Gale S, Zoeller RT, Spengler JD, Birnbaum L & McNeely E (2016) PBDE flame retardants, thyroid disease, and menopausal status in U.S. women. *Environmental health : a global access science source* 15(1):60.
- Allen JG, McClean MD, Stapleton HM & Webster TF (2008) Critical factors in assessing exposure to PBDEs via house dust. *Environment international* 34(8):1085-1091.
- Alm H, Scholz B, Kultima K, Nilsson A, Andren PE, Savitski MM, Bergman A, Stigson M, Fex-Svenningsen A & Dencker L (2010) In vitro neurotoxicity of PBDE-99: immediate and concentration-dependent effects on protein expression in cerebral cortex cells. *Journal of proteome research* 9(3):1226-1235.
- Alyusuf RH, Matouq JA, Taha S & Wazir JF (2014) The pattern of expression and role of triiodothyronine (T3) receptors and type I 5'-deiodinase in breast carcinomas, benign breast diseases, lactational change, and normal breast epithelium. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22(7):518-523.
- Andreeva V & Pokhrel P (2012) Breast cancer screening among Eastern European immigrant women worldwide: a call for action. *Eur J Public Health* 22:76-76.
- Andrews JL, Kim AC & Hens JR (2012) The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast cancer research : BCR* 14(1):203.
- Angelousi A, Diamanti-Kandarakis E, Zapanti E, Nonni A, Ktenas E, Mantzou A, Kontzoglou K & Kouraklis G (2017) Is there an association between thyroid function abnormalities and breast cancer? *Arch Endocrin Metab* 61(1):54-61.
- Anguiano B, Rojas-Huidobro R, Delgado G & Aceves C (2004) Has the mammary gland a protective mechanism against overexposure to triiodothyronine during the peripartum period? The prolactin pulse down-regulates mammary type I deiodinase responsiveness to norepinephrine. *Journal of Endocrinology* 183(2):267-277.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M & Skinner MK (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308(5727):1466-1469.
- Appert-Collin A, Hubert P, Cremel G & Bennisroune A (2015) Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in pharmacology* 6:283.
- Arendt LM, Rudnick JA, Keller PJ & Kuperwasser C (2010) Stroma in breast development and disease. *Seminars in cell & developmental biology* 21(1):11-18.
- Ataollahi MR, Sharifi J, Paknahad MR & Paknahad A (2015) Breast cancer and associated factors: a review. *J Med Life* 8(Spec Iss 4):6-11.
- Aupperlee MD, Smith KT, Kariagina A & Haslam SZ (2005) Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology* 146(8):3577-3588.

- Bachelot A & Binart N (2007) Reproductive role of prolactin. *Reproduction* 133(2):361-369.
- Bacova BS, Benova TE, Viczenczova C, Soukup T, Rauchova H, Pavelka S, Knezl V, Barancik M & Tribulova N (2016) Cardiac Connexin-43 and PKC Signaling in Rats With Altered Thyroid Status Without and With Omega-3 Fatty Acids Intake. *Physiological Research* 65:S77-S90.
- Badders NM, Goel S, Clark RJ, Klos KS, Kim S, Bafico A, Lindvall C, Williams BO & Alexander CM (2009) The Wnt Receptor, Lrp5, Is Expressed by Mouse Mammary Stem Cells and Is Required to Maintain the Basal Lineage. *PloS one* 4(8).
- Balda MS & Matter K (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1788(4):761-767.
- Balinsky BI (1950) On the prenatal growth of the mammary gland rudiment in the mouse. *J Anat* 84(3):227-235.
- Bao XY, Altenberg GA & Reuss L (2004) Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Am J Physiol-Cell Ph* 286(3):C647-C654.
- Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M & Heindel JJ (2012) Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source* 11:42.
- Baum MJ (1979) Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 3(4):265-284.
- Baumgartner HK, Rudolph MC, Ramanathan P, Burns V, Webb P, Bitler BG, Stein T, Kobayashi K & Neville MC (2017) Developmental Expression of Claudins in the Mammary Gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 22(2):141-157.
- Baxter E, Windloch K, Gannon F & Lee JS (2014) Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell & bioscience* 4:45.
- Bell MR (2018) Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology* 159(7):2596-2613.
- Berenbaum SA & Beltz AM (2011) Sexual differentiation of human behavior: effects of prenatal and pubertal organizational hormones. *Front Neuroendocrinol* 32(2):183-200.
- Berger RG, Lefevre PL, Ernest SR, Wade MG, Ma YQ, Rawn DF, Gaertner DW, Robaire B & Hales BF (2014) Exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants affects fetal development in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 320:56-66.
- Bern HA (1992) The Fragile Fetus. *Adv Mod Env* 21:9-15.
- Bernal J & Pekonen F (1984) Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology* 114(2):677-679.
- Berthoud VM, Beyer EC, Kurata WE, Lau AF & Lampe PD (1997) The gap-junction protein connexin 56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxy-terminal region. *Eur J Biochem* 244(1):89-97.
- Bertocchi C, Vaman Rao M & Zaidel-Bar R (2012) Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches. *J Signal Transduct* 2012:125295.
- Besis A & Samara C (2012) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor and outdoor environments--a review on occurrence and human exposure. *Environ Pollut* 169:217-229.

- Beyer EC, Paul DL & Goodenough DA (1990) Connexin family of gap junction proteins. *The Journal of membrane biology* 116(3):187-194.
- Bhattacharya A & Vonderhaar BK (1979) Thyroid hormone regulation of prolactin binding to mouse mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 88(4):1405-1411.
- Birchmeier W (1995) E-Cadherin as a Tumor (Invasion) Suppressor Gene. *Bioessays* 17(2):97-99.
- Birchmeier W & Behrens J (1994) Cadherin Expression in Carcinomas - Role in the Formation of Cell-Junctions and the Prevention of Invasiveness. *Bba-Rev Cancer* 1198(1):11-26.
- Birnbaum LS & Staskal DF (2004a) Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental health perspectives* 112(1):9-17.
- Birnbaum LS & Staskal DF (2004b) Brominated flame retardants: cause for concern? *Environmental health perspectives* 112(1):9-17.
- Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D & Neville MC (2005) Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast cancer research : BCR* 7(2):R248-255.
- Blanco J, Mulero M, Heredia L, Pujol A, Domingo JL & Sanchez DJ (2013) Perinatal exposure to BDE-99 causes learning disorders and decreases serum thyroid hormone levels and BDNF gene expression in hippocampus in rat offspring. *Toxicology* 308:122-128.
- Blatt J, Van Le L, Weiner T & Sailer S (2003) Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol Oncol* 25(8):635-636.
- Bocchinfuso WP & Korach KS (1997) Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2(4):323-334.
- Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixido A & Casas C (2003) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(10):3191-3195.
- Boffetta P & Nyberg F (2003) Contribution of environmental factors to cancer risk. *Br Med Bull* 68:71-94.
- Bondy GS, Gaertner D, Cherry W, MacLellan E, Coady L, Arnold DL, Doucet J & Rowsell PR (2011) Brominated diphenyl ether (BDE) levels in liver, adipose, and milk from adult and juvenile rats exposed by gavage to the DE-71 technical mixture. *Environmental toxicology* 26(6):677-690.
- Bondy GS, Lefebvre DE, Aziz S, Cherry W, Coady L, Maclellan E, Armstrong C, Barker M, Cooke G, Gaertner D, Arnold DL, Mehta R & Rowsell PR (2013) Toxicologic and immunologic effects of perinatal exposure to the brominated diphenyl ether (BDE) mixture DE-71 in the Sprague-Dawley rat. *Environmental toxicology* 28(4):215-228.
- Bouasker S, Inoubli W, Ben Yahia S & Diallo G (2020) Pregnancy Associated Breast Cancer gene expressions : new insights on their regulation based on Rare Correlated Patterns. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics* PP.
- Boussadia O, Kutsch S, Hierholzer A, Delmas V & Kemler R (2002) E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mechanisms of development* 115(1-2):53-62.

- Bowers WJ, Wall PM, Nakai JS, Yagminas A, Wade M & Li N (2015) Behavioral and thyroid effects of in utero and lactational exposure of Sprague-Dawley rats to the polybrominated diphenyl ether mixture DE71. *Neurotoxicol Teratol* 52(Pt B):127-142.
- Boylan ES (1978) Morphological and functional consequences of prenatal exposure to diethylstilbestrol in the rat. *Biology of reproduction* 19(4):854-863.
- Brenner DR, Weir HK, Demers AA, Ellison LF, Louzado C, Shaw A, Turner D, Woods RR & Smith LM (2020a) Estimations prévues du cancer au Canada en 2020.
- Brenner DR, Weir HK, Demers AA, Ellison LF, Louzado C, Shaw A, Turner D, Woods RR, Smith LM & Canadian Cancer Statistics Advisory C (2020b) Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ* 192(9):E199-E205.
- Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, Pojana G, Jonkers N, Runnalls T, Bonfa A, Marcomini A & Sumpter JP (2005) Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental health perspectives* 113(6):721-728.
- Briskin C (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):39-48.
- Briskin C (2008) Endocrine disruptors and breast cancer. *Chimia* 62(5):406-409.
- Briskin C & Ataca D (2015) Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wires Dev Biol* 4(3):181-195.
- Briskin C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA & Ormandy CJ (1999) Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Developmental biology* 210(1):96-106.
- Briskin C & O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(12):a003178.
- Brouwers MM, Feitz WF, Roelofs LA, Kiemeny LA, de Gier RP & Roeleveld N (2006) Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? *Hum Reprod* 21(3):666-669.
- Brown NM & Lamartiniere CA (1995) Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. *Environmental health perspectives* 103(7-8):708-713.
- Brown NM, Manzollilo PA, Zhang JX, Wang J & Lamartiniere CA (1998) Prenatal TCDD and predisposition to mammary cancer in the rat. *Carcinogenesis* 19(9):1623-1629.
- Brucker-Davis F, Thayer K & Colborn T (2001) Significant effects of mild endogenous hormonal changes in humans: Considerations for low-dose testing. *Environmental health perspectives* 109:21-26.
- Bruner-Tran KL, Gnecco J, Ding T, Glore DR, Pensabene V & Osteen KG (2017) Exposure to the environmental endocrine disruptor TCDD and human reproductive dysfunction: Translating lessons from murine models. *Reprod Toxicol* 68:59-71.
- Brust V, Schindler PM & Lewejohann L (2015) Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Front Zool* 12 Suppl 1:S17.
- Bry C, Maass K, Miyoshi K, Willecke K, Ott T, Robinson GW & Hennighausen L (2004) Loss of connexin 26 in mammary epithelium during early but not during late pregnancy results in unscheduled apoptosis and impaired development. *Developmental biology* 267(2):418-429.

- Buck Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, Sweeney AM, Lynch CD, Gore-Langton RE, Maisog J, Kim S, Chen Z & Barr DB (2013) Persistent environmental pollutants and couple fecundity: the LIFE study. *Environmental health perspectives* 121(2):231-236.
- Bunay J, Larriba E, Patino-Garcia D, Cruz-Fernandes L, Castaneda-Zegarra S, Rodriguez-Fernandez M, Del Mazo J & Moreno RD (2018) Editor's Highlight: Differential Effects of Exposure to Single Versus a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals on Steroidogenesis Pathway in Mouse Testes. *Toxicol Sci* 161(1):76-86.
- Burke RE & Mcguire WL (1978) Nuclear Thyroid-Hormone Receptors in a Human Breast-Cancer Cell Line. *Cancer research* 38(11):3769-3773.
- Busby M, Hallett MT & Plante I (2018) The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences* 19(3).
- Butt CM, Diamond ML, Truong J, Ikonomou MG & ter Schure AF (2004) Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers in southern Ontario as measured in indoor and outdoor window organic films. *Environ Sci Technol* 38(3):724-731.
- Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q & Wreford NG (2000) Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of reproduction* 62(3):664-669.
- Calaf GM, Ponce-Cusi R, Aguayo F, Munoz JP & Bleak TC (2020) Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer. *Oncology letters* 20(1):19-32.
- Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA & Rogatto SR (2006) CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC cancer* 6:48.
- Camarillo IG, Thordarson G, Moffat JG, Van Horn KM, Binart N, Kelly PA & Talamantes F (2001) Prolactin receptor expression in the epithelia and stroma of the rat mammary gland. *The Journal of endocrinology* 171(1):85-95.
- Capuco AV, Connor EE & Wood DL (2008) Regulation of mammary gland sensitivity to thyroid hormones during the transition from pregnancy to lactation. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(10):1309-1314.
- Capuco AV, Kahl S, Jack LJW, Bishop JO & Wallace H (1999) Prolactin and growth hormone stimulation of lactation in mice requires thyroid hormones. *P Soc Exp Biol Med* 221(4):345-351.
- Cavallaro U & Christofori G (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4(2):118-132.
- Ceccatelli R, Faass O, Schlumpf M & Lichtensteiger W (2006) Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenylether PBDE 99 and PCB. *Toxicology* 220(2-3):104-116.
- Center of Fire Statistics of CTIF (2016) World Fire Statistics, report.
- Chao HR, Shy CG, Wang SL, Chen SC, Koh TW, Chen FA, Chang-Chien GP & Tsou TC (2010) Impact of non-occupational exposure to polybrominated diphenyl ethers on menstruation characteristics of reproductive-age females. *Environment international* 36(7):728-735.
- Chappuis PO, Nethercot V & Foulkes WD (2000) Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2-related breast cancer. *Semin Surg Oncol* 18(4):287-295.
- Charlton SJ (2009) Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *Br J Pharmacol* 158(1):165-168.

- Chen AM, Chung E, DeFranco EA, Pinney SM & Dietrich KN (2011) Serum PBDEs and age at menarche in adolescent girls: Analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environmental research* 111(6):831-837.
- Chen J, Ma X, Tian L, Kong A, Wang N, Huang C & Yang D (2018a) Chronic co-exposure to low levels of brominated flame retardants and heavy metals induces reproductive toxicity in zebrafish. *Toxicology and industrial health* 34(9):631-639.
- Chen MW, Castillo BAA, Lin DY, Chao HR, Tayo LL, Gou YY, Chen FA & Huang KL (2018b) Levels of PCDD/Fs, PBDEs, and PBDD/Fs in Breast Milk from Southern Taiwan. *Bull Environ Contam Toxicol* 100(3):369-375.
- Chen ZJ, Liu HY, Cheng Z, Man YB, Zhang KS, Wei W, Du J, Wong MH & Wang HS (2014) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human samples of mother-newborn pairs in South China and their placental transfer characteristics. *Environment international* 73:77-84.
- Chen ZJ, Yang XL, Liu H, Wei W, Zhang KS, Huang HB, Giesy JP, Liu HL, Du J & Wang HS (2015) Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions. *Arch Toxicol* 89(8):1371-1381.
- Cheng G, Weihua Z, Makinen S, Makela S, Saji S, Warner M, Gustafsson JA & Hovatta O (2002) A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biology of reproduction* 66(1):77-84.
- Cheng J, Gu J, Ma J, Chen X, Zhang M & Wang W (2009) Neurobehavioural effects, redox responses and tissue distribution in rat offspring developmental exposure to BDE-99. *Chemosphere* 75(7):963-968.
- Chevrier J, Harley KG, Bradman A, Gharbi M, Sjodin A & Eskenazi B (2010) Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants and Thyroid Hormone during Pregnancy. *Environmental health perspectives* 118(10):1444-1449.
- Chevrier J, Harley KG, Bradman A, Sjodin A & Eskenazi B (2011) Prenatal Exposure to Polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants and Neonatal Thyroid-Stimulating Hormone Levels in the CHAMACOS Study. *Am J Epidemiol* 174(10):1166-1174.
- Chi Y, Xia H, Su M, Song P, Qi X, Cui Y, Cao Y, Chen T, Qiu Y, Zhao A, Ma X, Zheng X & Jia W (2011) Metabonomic phenotyping reveals an embryotoxicity of deca-brominated diphenyl ether in mice. *Chem Res Toxicol* 24(11):1976-1983.
- Choi HJ, Huber AH & Weis WI (2006) Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *The Journal of biological chemistry* 281(2):1027-1038.
- Chow L & Lye SJ (1994a) Expression of the Gap Junction Protein Connexin-43 Is Increased in the Human Myometrium toward Term and with the Onset of Labor. *American journal of obstetrics and gynecology* 170(3):788-795.
- Chow L & Lye SJ (1994b) Expression of the gap junction protein connexin-43 is increased in the human myometrium toward term and with the onset of labor. *American journal of obstetrics and gynecology* 170(3):788-795.
- Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrammli A & Fent K (2010) Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic activity in vitro. *Chemosphere* 81(10):1245-1252.

- Chu EY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, Brisken C, Glick A, Wysolmerski JJ & Millar SE (2004) Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131(19):4819-4829.
- Collins FL, Rios-Arce ND, Atkinson S, Bierhalter H, Schoenherr D, Bazil JN, McCabe LR & Parameswaran N (2017) Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency. *Physiol Rep* 5(9).
- Combarrous Y & Nguyen TMD (2019) Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics* 7(1).
- Conde I, Paniagua R, Zamora J, Blanquez MJ, Fraile B, Ruiz A & Arenas MI (2006) Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation. *Ann Oncol* 17(1):60-64.
- Conde SJ, Luvizotto Rde A, de Sibio MT & Nogueira CR (2014) Thyroid hormone status interferes with estrogen target gene expression in breast cancer samples in menopausal women. *ISRN Endocrinol* 2014:317398.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B & Lydon JP (2003) Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68(10-13):771-778.
- Contempre B, Jauniaux E, Calvo R, Jurkovic D, Campbell S & de Escobar GM (1993) Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77(6):1719-1722.
- Costa LG, de Laat R, Tagliaferri S & Pellacani C (2014) A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. *Toxicol Lett* 230(2):282-294.
- Costa LG & Giordano G (2007) Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 28(6):1047-1067.
- Costantine MM (2014) Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Frontiers in pharmacology* 5:65.
- Couse JF & Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20(3):358-417.
- Cowie AT (1974) Proceedings: Overview of the mammary gland. *The Journal of investigative dermatology* 63(1):2-9.
- Cowin P & Wysolmerski J (2010) Molecular Mechanisms Guiding Embryonic Mammary Gland Development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(6).
- Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, Bevers T, Strom S, Patangan M, Hsu LM, Krishnamurthy S, Theriault RL & Hortobagyi GN (2005) Thyroid hormone and breast carcinoma - Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer* 103(6):1122-1128.
- Crofton KM, Craft ES, Hedge JM, Gennings C, Simmons JE, Carchman RA, Carter WH, Jr. & DeVito MJ (2005) Thyroid-hormone-disrupting chemicals: evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environmental health perspectives* 113(11):1549-1554.
- Cyr DG (2011) Connexins and pannexins: Coordinating cellular communication in the testis and epididymis. *Spermatogenesis* 1(4):325-338.

- Dall GV, Hawthorne S, Seyed-Razavi Y, Vieusseux J, Wu W, Gustafsson JA, Byrne D, Murphy L, Risbridger GP & Britt KL (2018) Estrogen receptor subtypes dictate the proliferative nature of the mammary gland. *The Journal of endocrinology* 237(3):323-336.
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M & Comparative Risk Assessment collaborating g (2005) Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366(9499):1784-1793.
- Dang VH, Choi KC & Jeung EB (2007) Tetrabromodiphenyl ether (BDE 47) evokes estrogenicity and calbindin-D9k expression through an estrogen receptor-mediated pathway in the uterus of immature rats. *Toxicol Sci* 97(2):504-511.
- Daniel CW, Silberstein GB & Strickland P (1987) Direct Action of 17-Beta-Estradiol on Mouse Mammary Ducts Analyzed by Sustained-Release Implants and Steroid Autoradiography. *Cancer research* 47(22):6052-6057.
- Daniel CW & Smith GH (1999) The mammary gland: a model for development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4(1):3-8.
- Daniel CW, Strickland P & Friedmann Y (1995) Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Developmental biology* 169(2):511-519.
- Dao T, Hong X, Wang X & Tang WY (2015) Aberrant 5'-CpG Methylation of Cord Blood TNFalpha Associated with Maternal Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers. *PloS one* 10(9):e0138815.
- Darnerud PO (2003) Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment international* 29(6):841-853.
- Darnerud PO, Eriksen GS, Johannesson T, Larsen PB & Viluksela M (2001) Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental health perspectives* 109 Suppl 1:49-68.
- Darnerud PO & Risberg S (2006) Tissue localisation of tetra- and pentabromodiphenyl ether congeners (BDE-47, -85 and -99) in perinatal and adult C57BL mice. *Chemosphere* 62(3):485-493.
- Daugherty RL & Gottardi CJ (2007) Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 22:303-309.
- Davis NM, Sokolosky M, Stadelman K, Abrams SL, Libra M, Candido S, Nicoletti F, Polesel J, Maestro R, D'Assoro A, Drobot L, Rakus D, Gizak A, Laidler P, Dulinska-Litewka J, Basecke J, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Montalto G, Cervello M, Fitzgerald TL, Demidenko Z, Martelli AM, Cocco L, Steelman LS & McCubrey JA (2014) Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget* 5(13):4603-4650.
- de Freitas A, Ribeiro MA, Pinho CF, Peixoto AR, Domeniconi RF & Scarano WR (2016) Regulatory and junctional proteins of the blood-testis barrier in human Sertoli cells are modified by monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) exposure. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 34:1-7.
- de Launoit Y & Kiss R (1989) Influence of L-thyroxine, L-triiodothyronine, thyroid stimulating hormone, or estradiol on the cell kinetics of cultured mammary cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25(7):585-591.

- de Montgolfier B, Audet C & Cyr DG (2011) Regulation of the connexin 43 promoter in the brook trout testis: role of the thyroid hormones and cAMP. *General and comparative endocrinology* 170(1):110-118.
- de Wit CA (2002) An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46(5):583-624.
- DeBruin LS & Josephy PD (2002) Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environmental health perspectives* 110 Suppl 1:119-128.
- Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perriere AB & Pugeat M (1999) Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 64(5):328-334.
- Deescobar GM, Calvo R, Obregon MJ & Delrey FE (1990) Contribution of Maternal Thyroxine to Fetal Thyroxine Pools in Normal Rats near Term. *Endocrinology* 126(5):2765-2767.
- Delisle A, Ferraris E & Plante I (2015) Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast. *Environmental research* 143(Pt A):229-240.
- Delmas V, Pla P, Feracci H, Thiery JP, Kemler R & Larue L (1999) Expression of the cytoplasmic domain of E-cadherin induces precocious mammary epithelial alveolar formation and affects cell polarity and cell-matrix integrity. *Developmental biology* 216(2):491-506.
- Deng CX (2006) BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research* 34(5):1416-1426.
- Deodati A, Sallemi A, Maranghi F, Germani D, Puglianiello A, Baldari F, Busani L, Mancini FR, Tassinari R, Mantovani A & Cianfarani S (2016) Serum Levels of Polybrominated Diphenyl Ethers in Girls with Premature Thelarche. *Horm Res Paediatr* 86(4):233-239.
- Deome KB, Faulkin LJ, Jr., Bern HA & Blair PB (1959) Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer research* 19(5):515-520.
- Derksen PW, Braumuller TM, van der Burg E, Hornsveld M, Mesman E, Wesseling J, Krimpenfort P & Jonkers J (2011) Mammary-specific inactivation of E-cadherin and p53 impairs functional gland development and leads to pleomorphic invasive lobular carcinoma in mice. *Disease models & mechanisms* 4(3):347-358.
- Derksen PW, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, van Beijnum JR, Griffioen AW, Vink J, Krimpenfort P, Peterse JL, Cardiff RD, Berns A & Jonkers J (2006) Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer cell* 10(5):437-449.
- Deugnier MA, Teuliere J, Faraldo MM, Thiery JP & Glukhova MA (2002) The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Research* 4(6):224-230.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT & Gore AC (2009) Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 30(4):293-342.
- Dianati E, Poiraud J, Weber-Ouellette A & Plante I (2016) Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and beta-catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. *Developmental biology* 416(1):52-68.
- Dianati E, Wade MG, Hales BF, Robaire B & Plante I (2017) From the Cover: Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Decreased p-beta-

- Catenin⁶⁷⁵ Expression and Its Interaction With E-Cadherin in the Mammary Glands of Lactating Rats. *Toxicol Sci* 159(1):114-123.
- Dillekas H, Rogers MS & Straume O (2019) Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med* 8(12):5574-5576.
- Dinda S, Sanchez A & Moudgil V (2002) Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells. *Oncogene* 21(5):761-768.
- Ditsch N, Toth B, Himsl I, Lenhard M, Ochsenkuhn R, Friese K, Mayr D & Jeschke U (2013) Thyroid hormone receptor (TR) α and TR β expression in breast cancer. *Histology and histopathology* 28(2):227-237.
- Dolled-Filhart M, McCabe A, Giltneane J, Cregger M, Camp RL & Rimm DL (2006) Quantitative in situ analysis of beta-catenin expression in breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome. *Cancer research* 66(10):5487-5494.
- Dorosh A, Ded L, Elzeinova F & Peknicova J (2011) Assessing oestrogenic effects of brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on MCF-7 cells. *Folia Biol (Praha)* 57(1):35-39.
- Driscoll LL, Gibson AM & Hieb A (2009) Chronic postnatal DE-71 exposure: effects on learning, attention and thyroxine levels. *Neurotoxicol Teratol* 31(2):76-84.
- Du L, Sun W, Li XM, Li XY, Liu W & Chen D (2018) DNA methylation and copy number variation analyses of human embryonic stem cell-derived neuroprogenitors after low-dose decabromodiphenyl ether and/or bisphenol A exposure. *Human & experimental toxicology* 37(5):475-485.
- Duffy HS, Ashton AW, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M & Spray DC (2004) Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circulation research* 94(2):215-222.
- Duflot-Dancer A, Mesnil M & Yamasaki H (1997) Dominant-negative abrogation of connexin-mediated cell growth control by mutant connexin genes. *Oncogene* 15(18):2151-2158.
- Dunbar ME & Wysolmerski JJ (1999) Parathyroid hormone-related protein: a developmental regulatory molecule necessary for mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4(1):21-34.
- Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H & Foisner R (2000) Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol* 148(1):173-188.
- Eggesbo M, Thomsen C, Jorgensen JV, Becher G, Odland JO & Longnecker MP (2011) Associations between brominated flame retardants in human milk and thyroid-stimulating hormone (TSH) in neonates. *Environmental research* 111(6):737-743.
- Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD & Burt JM (2006) Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C- dependent phosphorylation. *Circulation research* 98(12):1498-1505.
- El-Hayek S & Clarke HJ (2015) Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis. *Biology of reproduction* 93(2):47.

- El-Saghir JA, El-Habre ET, El-Sabban ME & Talhouk RS (2011) Connexins: a junctional crossroad to breast cancer. *The International journal of developmental biology* 55(7-9):773-780.
- Elizalde PV, Cordo Russo RI, Chervo MF & Schillaci R (2016) ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. *Endocrine-related cancer* 23(12):T243-T257.
- Eljarrat E, Barceló D & SpringerLink (Service en ligne) (2011) *Brominated Flame Retardants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg,, Berlin, Heidelberg
<http://proxy.uqtr.ca/login.cgi?action=login&u=uqtr&db=springer-eb&url=http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink
- <https://erable.inrs.ca:2048/login?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink
- <http://proxy.cegepat.qc.ca/login?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink
- <http://proxy.uqar.ca/login?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink
- <http://sbiproxy.uqac.ca/login?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink
- <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink
- <https://apps.uqo.ca/LoginSigparb/LoginPourRessources.aspx?url=http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19269-2> Accès au texte intégral via SpringerLink (Consulté e Date Accessed)
- Ellis-Hutchings RG, Cherr GN, Hanna LA & Keen CL (2006) Polybrominated diphenyl ether (PBDE)-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone concentrations in the rat during lactation and early postnatal development. *Toxicology and applied pharmacology* 215(2):135-145.
- Ellis-Hutchings RG, Cherr GN, Hanna LA & Keen CL (2009) The effects of marginal maternal vitamin A status on penta-brominated diphenyl ether mixture-induced alterations in maternal and conceptual vitamin A and fetal development in the Sprague Dawley rat. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 86(1):48-57.
- Elsabban ME & Pauli BU (1991) Cytoplasmic Dye Transfer between Metastatic Tumor-Cells and Vascular Endothelium. *J Cell Biol* 115(5):1375-1382.
- Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M & Matsumoto M (2008) Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod Toxicol* 25(3):335-351.
- Enoch RR, Stanko JP, Greiner SN, Youngblood GL, Rayner JL & Fenton SE (2007a) Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female long-evans rats. *Environmental health perspectives* 115(4):541-547.
- Enoch RR, Stanko JP, Greiner SN, Youngblood GL, Rayner JL & Fenton SE (2007b) Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. *Environmental health perspectives* 115(4):541-547.

- Environment and Climate Change Canada (2011) Screening Assessment Report on Hexabromocyclododecane.
- Environment and Climate Change Canada (2013) Draft Screening Assessment of Hexabromocyclododecane (HBCD).
- Environment Canada (2008) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) regulation
- Environnement Canada (2013) Rapport d'évaluation préalable finale du Tétrabromobisphénol A (TBBPA) et deux de ses substances dérivées.
- Eriksson P, Fischer C & Fredriksson A (2006) Polybrominated diphenyl ethers, a group of brominated flame retardants, can interact with polychlorinated biphenyls in enhancing developmental neurobehavioral defects. *Toxicol Sci* 94(2):302-309.
- Eriksson P, Jakobsson E & Fredriksson A (2001) Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? *Environmental health perspectives* 109(9):903-908.
- Ernest SR, Wade MG, Lalancette C, Ma YQ, Berger RG, Robaire B & Hales BF (2012) Effects of chronic exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants on the reproductive and thyroid system in adult male rats. *Toxicol Sci* 127(2):496-507.
- Eshre Capri Workshop Group (2004) Hormones and breast cancer. *Hum Reprod Update* 10(4):281-293.
- Eskenazi B, Chevrier J, Rauch SA, Kogut K, Harley KG, Johnson C, Trujillo C, Sjodin A & Bradman A (2013) In utero and childhood polybrominated diphenyl ether (PBDE) exposures and neurodevelopment in the CHAMACOS study. *Environmental health perspectives* 121(2):257-262.
- Estus TL, Choudhary S & Pilbeam CC (2016) Prostaglandin-mediated inhibition of PTH-stimulated beta-catenin signaling in osteoblasts by bone marrow macrophages. *Bone* 85:123-130.
- Ewald AJ, Brenot A, Duong M, Chan BS & Werb Z (2008) Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Developmental cell* 14(4):570-581.
- Ewald AJ, Huebner RJ, Palsdottir H, Lee JK, Perez MJ, Jorgens DM, Tauscher AN, Cheung KJ, Werb Z & Auer M (2012) Mammary collective cell migration involves transient loss of epithelial features and individual cell migration within the epithelium. *Journal of cell science* 125(Pt 11):2638-2654.
- Fa S, Samardzija D, Odzic L, Pogrmic-Majkic K, Kaisarevic S, Kovacevic R & Andric N (2014) Hexabromocyclododecane facilitates FSH activation of ERK1/2 and AKT through epidermal growth factor receptor in rat granulosa cells. *Arch Toxicol* 88(2):345-354.
- Fan F, Wierda D & Rozman KK (1996) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on humoral and cell-mediated immunity in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 106(1-3):221-228.
- Fanti M, Singh S, Ledda-Columbano GM, Columbano A & Monga SP (2014) Tri-iodothyronine induces hepatocyte proliferation by protein kinase A-dependent beta-catenin activation in rodents. *Hepatology* 59(6):2309-2320.
- Fata JE, Chaudhary V & Khokha R (2001) Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biology of reproduction* 65(3):680-688.

- Fenton SE (2006) Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology* 147(6 Suppl):S18-24.
- Fenton SE (2009) The mammary gland: a tissue sensitive to environmental exposures. *Reviews on environmental health* 24(4):319-325.
- Fenton SE (2012) Early Life Environmental Exposures: Lifelong Impact on Mammary Gland Development and Function. *Birth Defects Res A* 94(5):306-306.
- Fenton SE, Hamm JT, Birnbaum LS & Youngblood GL (2002) Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol Sci* 67(1):63-74.
- Fenton SE, Reed C & Newbold RR (2012) Perinatal Environmental Exposures Affect Mammary Development, Function, and Cancer Risk in Adulthood. *Annu Rev Pharmacol* 52:455-479.
- Filgo AJ, Foley JF, Puvanesarajah S, Borde AR, Midkiff BR, Reed CE, Chappell VA, Alexander LB, Borde PR, Troester MA, Bouknight SA & Fenton SE (2016) Mammary Gland Evaluation in Juvenile Toxicity Studies: Temporal Developmental Patterns in the Male and Female Harlan Sprague-Dawley Rat. *Toxicol Pathol* 44(7):1034-1058.
- Firestone GL & Kapadia BJ (2014) Minireview: Steroid/nuclear receptor-regulated dynamics of occluding and anchoring junctions. *Mol Endocrinol* 28(11):1769-1784.
- Fischer A, Stuckas H, Gluth M, Russell TD, Rudolph MC, Beeman NE, Bachmann S, Umemura S, Ohashi Y, Neville MC & Theuring F (2007) Impaired tight junction sealing and precocious involution in mammary glands of PKN1 transgenic mice. *Journal of cell science* 120(Pt 13):2272-2283.
- Flamini MI, Uzair ID, Pennacchio GE, Neira FJ, Mondaca JM, Cuello-Carrion FD, Jahn GA, Simoncini T & Sanchez AM (2017) Thyroid Hormone Controls Breast Cancer Cell Movement via Integrin alphaV/beta3/SRC/FAK/PI3-Kinases. *Hormones & cancer* 8(1):16-27.
- Flenniken AM, Osborne LR, Anderson N, Ciliberti N, Fleming C, Gittens JE, Gong XQ, Kelsey LB, Lounsbury C, Moreno L, Nieman BJ, Peterson K, Qu D, Roscoe W, Shao Q, Tong D, Veitch GI, Voronina I, Vukobradovic I, Wood GA, Zhu Y, Zirngibl RA, Aubin JE, Bai D, Bruneau BG, Grynpas M, Henderson JE, Henkelman RM, McKerlie C, Sled JG, Stanford WL, Laird DW, Kidder GM, Adamson SL & Rossant J (2005) A Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development* 132(19):4375-4386.
- Foley J, Dann P, Hong J, Cosgrove J, Dreyer B, Rimm D, Dunbar M, Philbrick W & Wysolmerski J (2001) Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. *Development* 128(4):513-525.
- Forster C, Makela S, Warri A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M & Gustafsson JA (2002) Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(24):15578-15583.
- Fortner RT, Sisti J, Chai B, Collins LC, Rosner B, Hankinson SE, Tamimi RM & Eliassen AH (2019) Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Research* 21.
- Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, Hanna WM, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Olopade OI, Weber BL, McLennan J, Olivotto IA, Begin LR & Narod SA (2004) Estrogen receptor status in

- BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res* 10(6):2029-2034.
- Fowles JR, Fairbrother A, Baecher-Steppan L & Kerkvliet NI (1994) Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 86(1-2):49-61.
- Frederiksen M, Vorkamp K, Mathiesen L, Mose T & Knudsen LE (2010a) Placental transfer of the polybrominated diphenyl ethers BDE-47, BDE-99 and BDE-209 in a human placenta perfusion system: an experimental study. *Environmental health : a global access science source* 9:32.
- Frederiksen M, Vorkamp K, Mathiesen L, Mose T & Knudsen LE (2010b) Placental transfer of the polybrominated diphenyl ethers BDE-47, BDE-99 and BDE-209 in a human placenta perfusion system: an experimental study. *Environ Health-Glob* 9.
- Frederiksen M, Vorkamp K, Thomsen M & Knudsen LE (2009) Human internal and external exposure to PBDEs--a review of levels and sources. *International journal of hygiene and environmental health* 212(2):109-134.
- Gallego MI, Binart N, Robinson GW, Okagaki R, Coschigano KT, Perry J, Kopchick JJ, Oka T, Kelly PA & Hennighausen L (2001) Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Developmental biology* 229(1):163-175.
- Gamallo C, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Calero F, Hardisson D & Palacios J (2001) The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. *Modern Pathol* 14(7):650-654.
- Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M & Cano A (1993) Correlation of E-Cadherin Expression with Differentiation Grade and Histological Type in Breast-Carcinoma. *American Journal of Pathology* 142(4):987-993.
- Geck P, Maffini MV, Szelei J, Sonnenschein C & Soto AM (2000) Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: the role of AS3 as its mediator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(18):10185-10190.
- Geddes DT (2007) Inside the lactating breast: The latest anatomy research. *J Midwifery Wom Heal* 52(6):556-563.
- Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A, Natrajan R & Reis-Filho JS (2011) beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(2):209-231.
- Gilleron J, Carette D, Segretain D & Pointis G (2018) Multiple and complex influences of connexins and pannexins on cell death. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860(1):182-191.
- Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D & Pointis G (2006) A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 209(1):153-161.
- Gilula NB, Epstein ML & Beers WH (1978) Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 78(1):58-75.
- Gimpl G & Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81(2):629-683.

- Goldman AS, Shapiro B & Neumann F (1976) Role of testosterone and its metabolites in the differentiation of the mammary gland in rats. *Endocrinology* 99(6):1490-1495.
- Goldman JM, Murr AS & Cooper RL (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80(2):84-97.
- Gomara B, Herrero L, Ramos JJ, Mateo JR, Fernandez MA, Garcia JF & Gonzalez MJ (2007) Distribution of polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, paternal serum, maternal serum, placentas, and breast milk from Madrid population, Spain. *Environ Sci Technol* 41(20):6961-6968.
- Goodenough DA, Goliger JA & Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502.
- Gottardi CJ, Wong E & Gumbiner BM (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153(5):1049-1060.
- Gouesse RJ, Dianati E, McDermott A, Wade MG, Hales B, Robaire B & Plante I (2020) In Utero and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants induces a premature development of the mammary glands. *Toxicol Sci* 10.1093/toxsci/kfaa176.
- Gouesse RJ, Lavoie M, Dianati E, Wade M, Hales B, Robaire B & Plante I (2019) Gestational and Lactational Exposure to an Environmentally-relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Down-regulates Junctional Proteins, Thyroid Hormone Receptor alpha1 Expression and the Proliferation-Apoptosis Balance in Mammary Glands Post Puberty. *Toxicol Sci* 10.1093/toxsci/kfz147.
- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K & Chahoud I (2006) A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development. *Toxicol Sci* 91(1):247-254.
- Greaves M & Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381):306-313.
- Green AR, Aleskandarany MA, Agarwal D, Elsheikh S, Nolan CC, Diez-Rodriguez M, Macmillan RD, Ball GR, Caldas C, Madhusudan S, Ellis IO & Rakha EA (2016) MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *British journal of cancer* 114(8):917-928.
- Greene MH (1997) Genetics of breast cancer. *Mayo Clin Proc* 72(1):54-65.
- Greene RR & Ivy AC (1937) The Experimental Production of Intersexuality in the Female Rat with Testosterone. *Science* 86(2226):200-201.
- Gregoraszczyk EL, Milczarek K, Wojtowicz AK, Berg V, Skaare JU & Ropstad E (2008) Steroid secretion following exposure of ovarian follicular cells to three different natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs). *Reprod Toxicol* 25(1):58-66.
- Groeneweg S, van Geest FS, Peeters RP, Heuer H & Visser WE (2020) Thyroid Hormone Transporters. *Endocr Rev* 41(2).
- Groten T, Pierce AA, Huen AC & Schnaper HW (2005) 17 beta-estradiol transiently disrupts adherens junctions in endothelial cells. *Faseb J* 19(7):1368-+.
- Groten T & Schnaper HW (2003) 17-beta-estradiol transiently disrupts adherens junctions in human umbilical vein endothelial cells. *Faseb J* 17(5):A1195-A1195.

- Grummer R, Chwalisz K, Mulholland J, Traub O & Winterhager E (1994) Regulation of Connexin26 and Connexin43 Expression in Rat Endometrium by Ovarian-Steroid Hormones. *Biology of reproduction* 51(6):1109-1116.
- Grummer R, Traub O & Winterhager E (1999a) Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium. *Endocrinology* 140(6):2509-2516.
- Grummer R, Traub O & Winterhager E (1999b) Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium. *Endocrinology* 140(6):2509-2516.
- Gupta C (2000) Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 224(2):61-68.
- Gupta GP & Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4):679-695.
- Hahn WC & Weinberg RA (2002) Rules for making human tumor cells. *The New England journal of medicine* 347(20):1593-1603.
- Hale RC, Alaei M, Manchester-Neesvig JB, Stapleton HM & Ikonomou MG (2003) Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. *Environment international* 29(6):771-779.
- Hallgren S & Darnerud PO (2002) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 177(2-3):227-243.
- Hallgren S, Sinjari T, Hakansson H & Darnerud PO (2001) Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Toxicol* 75(4):200-208.
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, Legler J & Brouwer A (2006) In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci* 92(1):157-173.
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Visser TJ, Van Velzen MJ, Brouwer A & Bergman A (2008) Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). *Molecular nutrition & food research* 52(2):284-298.
- Hammond GL (2016) Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *The Journal of endocrinology* 230(1):R13-25.
- Han G, Ding G, Lou X, Wang X, Han J, Shen H, Zhou Y & Du L (2011) Correlations of PCBs, DIOXIN, and PBDE with TSH in children's blood in areas of computer E-waste recycling. *Biomedical and environmental sciences : BES* 24(2):112-116.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
- Harley KG, Marks AR, Chevrier J, Bradman A, Sjodin A & Eskenazi B (2010) PBDE concentrations in women's serum and fecundability. *Environmental health perspectives* 118(5):699-704.

- Harley KG, Rauch SA, Chevrier J, Kogut K, Parra KL, Trujillo C, Lustig RH, Greenspan LC, Sjodin A, Bradman A & Eskenazi B (2017) Association of prenatal and childhood PBDE exposure with timing of puberty in boys and girls. *Environment international* 100:132-138.
- Hartsock A & Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778(3):660-669.
- Haslam SZ (1988) Progesterone effects on deoxyribonucleic acid synthesis in normal mouse mammary glands. *Endocrinology* 122(2):464-470.
- Haslam SZ & Nummy KA (1992) The ontogeny and cellular distribution of estrogen receptors in normal mouse mammary gland. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 42(6):589-595.
- Haslam SZ & Shyamala G (1979) Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship with lactation. *The Biochemical journal* 182(1):127-131.
- Haslam SZ & Shyamala G (1981) Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. *Endocrinology* 108(3):825-830.
- Hass U, Scholze M, Christiansen S, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Metzdorff SB & Kortenkamp A (2007) Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environmental health perspectives* 115 Suppl 1:122-128.
- Hassiotou F & Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26(1):29-48.
- Hatch EE, Herbst AL, Hoover RN, Noller KL, Adam E, Kaufman RH, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, Hyer M, Hartge P & Robboy SJ (2001) Incidence of squamous neoplasia of the cervix and vagina in women exposed prenatally to diethylstilbestrol (United States). *Cancer Cause Control* 12(9):837-845.
- Hayflick L (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62(11):1180-1190.
- Hazan RB, Kang L, Whooley BP & Borgen PI (1997) N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 4(6):399-411.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L & Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148(4):779-790.
- Heindel JJ (2005) The fetal basis of adult disease: Role of environmental exposures--introduction. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 73(3):131-132.
- Heindel JJ (2008) Animal models for probing the developmental basis of disease and dysfunction paradigm. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102(2):76-81.
- Heinrich CA, Lail-Trecker MR, Peluso JJ & White BA (1999) Negative regulation of N-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the estrogen receptor signaling pathway in rat pituitary GH3 cells. *Endocrine* 10(1):67-76.
- Henderson BE & Feigelson HS (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21(3):427-433.
- Hens J, Dann P, Hiremath M, Pan TC, Chodosh L & Wysolmerski J (2009) Analysis of gene expression in PTHrP-/- mammary buds supports a role for BMP signaling and MMP2 in

- the initiation of ductal morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238(11):2713-2724.
- Hens JR, Dann P, Zhang JP, Harris S, Robinson GW & Wysolmerski J (2007) BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development* 134(6):1221-1230.
- Hens JR & Wysolmerski JJ (2005) Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast cancer research : BCR* 7(5):220-224.
- Herbstman J, Sjodin A, Kurzon M, Needham L, Patterson JD & Wang R (2007) PBDE exposure, placental transfer, and birth outcomes. *Epidemiology* 18(5):S159-S159.
- Herbstman JB, Sjodin A, Kurzon M, Lederman SA, Jones RS, Rauh V, Needham LL, Tang D, Niedzwiecki M, Wang RY & Perera F (2010) Prenatal exposure to PBDEs and neurodevelopment. *Environmental health perspectives* 118(5):712-719.
- Heuberger B, Fitzka I, Wasner G & Kratochwil K (1982) Induction of androgen receptor formation by epithelium-mesenchyme interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(9):2957-2961.
- Hewitt SC & Korach KS (2003) Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 125(2):143-149.
- Hiller-Sturmhofel S & Bartke A (1998) The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res World* 22(3):153-164.
- Hinck L & Silberstein GB (2005) Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast cancer research : BCR* 7(6):245-251.
- Hino S, Tanji C, Nakayama KI & Kikuchi A (2005) Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Molecular and cellular biology* 25(20):9063-9072.
- Hiremath M & Wysolmerski J (2013) Parathyroid hormone-related protein specifies the mammary mesenchyme and regulates embryonic mammary development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 18(2):171-177.
- Hirschi KK, Xu CE, Tsukamoto T & Sager R (1996) Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ* 7(7):861-870.
- Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA & Schwager SJ (2004) Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 303(5655):226-229.
- Hogg NA, Harrison CJ & Tickle C (1983) Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *J Embryol Exp Morphol* 73:39-57.
- Holst BD, Hurley WL & Nelson DR (1987) Involution of the bovine mammary gland: histological and ultrastructural changes. *J Dairy Sci* 70(5):935-944.
- Hoover KB, Liao SY & Bryant PJ (1998) Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer - Relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *American Journal of Pathology* 153(6):1767-1773.
- Hoppe AA & Carey GB (2007) Polybrominated diphenyl ethers as endocrine disruptors of adipocyte metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 15(12):2942-2950.

- Hormones E, Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, Berrino F, Krogh V, Sieri S, Brinton LA, Dorgan JF, Dossus L, Dowsett M, Eliassen AH, Fortner RT, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Comstock GW, Kaaks R, Kahle LL, Muti P, Overvad K, Peeters PH, Riboli E, Rinaldi S, Rollison DE, Stanczyk FZ, Trichopoulos D, Tworoger SS & Vineis P (2013) Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol* 14(10):1009-1019.
- Hovey RC & Aimo L (2010) Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15(3):279-290.
- Hovey RC, Asai-Sato M, Warri A, Terry-Koroma B, Colyn N, Ginsburg E & Vonderhaar BK (2005) Effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol, tamoxifen, and toremifene on the BALB/c mouse mammary gland. *Biology of reproduction* 72(2):423-435.
- Hovey RC, MacKenzie DD & McFadden TB (1998) The proliferation of mouse mammary epithelial cells in response to specific mitogens is modulated by the mammary fat pad in vitro. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 34(5):385-392.
- Hovey RC, McFadden TB & Akers RM (1999) Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: A species comparison. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4(1):53-68.
- Hovey RC, Trott JF, Ginsburg E, Goldhar A, Sasaki MM, Fountain SJ, Sundararajan K & Vonderhaar BK (2001) Transcriptional and spatiotemporal regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 222(2):192-205.
- Hovey RC, Trott JF & Vonderhaar BK (2002) Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):17-38.
- Howlin J, McBryan J & Martin F (2006) Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 11(3-4):283-297.
- Hsu W, Shakya R & Costantini F (2001) Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *J Cell Biol* 155(6):1055-1064.
- Huang DY, Zheng CC, Pan Q, Wu SS, Su X, Li L, Wu JH & Sun ZY (2018) Oral exposure of low-dose bisphenol A promotes proliferation of dorsolateral prostate and induces epithelial-mesenchymal transition in aged rats. *Scientific reports* 8(1):490.
- Huang RC, Lin Y, Wang CC, Gano J, Lin BY, Shi QA, Boynton A, Burke J & Huang RP (2002) Connexin 43 suppresses human glioblastoma cell growth by down-regulation of monocyte chemoattractant protein 1, as discovered using protein array technology. *Cancer research* 62(10):2806-2812.
- Huber AH & Weis WI (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105(3):391-402.
- Humphreys RC, Krajewska M, Krnacik S, Jaeger R, Weiher H, Krajewski S, Reed JC & Rosen JM (1996) Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: A mechanism of ductal morphogenesis. *Development* 122(12):4013-4022.
- Humphreys RC, Lydon J, O'Malley BW & Rosen JM (1997a) Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 11(6):801-811.

- Humphreys RC, Lydon JP, O'Malley BW & Rosen JM (1997b) Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2(4):343-354.
- Hurley WL (1989a) Mammary-Gland Function during Involution. *J Dairy Sci* 72(6):1637-1646.
- Hurley WL (1989b) Mammary gland function during involution. *J Dairy Sci* 72(6):1637-1646.
- Huwe JK & Smith DJ (2007) Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male sprague-dawley rats following dietary exposure. *Environ Sci Technol* 41(7):2371-2377.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S & Kikuchi A (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17(5):1371-1384.
- Imagawa W, Bandyopadhyay GK & Nandi S (1990) Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. *Endocr Rev* 11(4):494-523.
- Imbert A, Eelkema R, Jordan S, Feiner H & Cowin P (2001) Delta N89 beta-catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J Cell Biol* 153(3):555-568.
- Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R & Cowin P (2010a) Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin. *Breast cancer research : BCR* 12(6):213.
- Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R & Cowin P (2010b) Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: beta-catenin. *Breast Cancer Research* 12(6).
- International Bromine Council (
- Ionas AC, Ulevicus J, Gomez AB, Brandsma SH, Leonards PE, van de Bor M & Covaci A (2016) Children's exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through mouthing toys. *Environment international* 87:101-107.
- Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, Asamoto M & Shirai T (1995) Concepts in multistage carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 21(1-3):105-133.
- Itoh M & Bissell MJ (2003) The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8(4):449-462.
- Izaguirre MF & Casco VH (2010) T3 regulates E-cadherin, and beta- and alpha-catenin expression in the stomach during the metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum*. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 85(5):305-323.
- Jacobson MH, Barr DB, Marcus M, Muir AB, Lyles RH, Howards PP, Pardo L & Darrow LA (2016) Serum polybrominated diphenyl ether concentrations and thyroid function in young children. *Environmental research* 149:222-230.
- Jakobsson K, Fang J, Athanasiadou M, Rignell-Hydbom A & Bergman A (2012) Polybrominated diphenyl ethers in maternal serum, umbilical cord serum, colostrum and mature breast milk. Insights from a pilot study and the literature. *Environment international* 47:121-130.
- Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R & George WD (1998) Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *The Journal of pathology* 184(1):37-43.

- Janssen S (2005) Brominated Flame Retardants: Rising Levels of Concern. *Health care without harm*.
- Javed A & Lteif A (2013) Development of the human breast. *Semin Plast Surg* 27(1):5-12.
- Jerzak KJ, Cockburn J, Pond GR, Pritchard KI, Narod SA, Dhesy-Thind SK & Bane A (2015) Thyroid hormone receptor alpha in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast cancer research and treatment* 149(1):293-301.
- Jerzak KJ, Cockburn JG, Dhesy-Thind SK, Pond GR, Pritchard KI, Nofech-Mozes S, Sun P, Narod SA & Bane A (2018) Thyroid hormone receptor beta-1 expression in early breast cancer: a validation study. *Breast cancer research and treatment* 171(3):709-717.
- Jiang XY, Feng XH, Li GY, Zhao Q & Yin HQ (2010) Differential expression of connexin 43 in human autoimmune thyroid disease. *Acta histochemica* 112(3):278-283.
- Johnson-Restrepo B, Kannan K, Rapaport DP & Rodan BD (2005) Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from New York. *Environ Sci Technol* 39(14):5177-5182.
- Johnson KE, Mitra S, Katoch P, Kelsey LS, Johnson KR & Mehta PP (2013) Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic cancer cells. *Mol Biol Cell* 24(6):715-733.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Bilski JJ & Grazul-Bilska AT (2002) Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 18(3):261-270.
- Johnson PI, Altshul L, Cramer DW, Missmer SA, Hauser R & Meeker JD (2012) Serum and follicular fluid concentrations of polybrominated diphenyl ethers and in-vitro fertilization outcome. *Environment international* 45:9-14.
- Johnston RF & Smithcors JF (1948) The effects of estrogen on mammary structure of adrenalectomized and thiouracil treated castrate rats. *Endocrinology* 43(4):193-201.
- Jones-Otazo HA, Clarke JP, Diamond ML, Archbold JA, Ferguson G, Harner T, Richardson GM, Ryan JJ & Wilford B (2005a) Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. *Environ Sci Technol* 39(14):5121-5130.
- Jones-Otazo HA, Clarke JP, Diamond ML, Archbold JA, Ferguson G, Harner T, Richardson GM, Ryan JJ & Wilford B (2005b) Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. *Environ Sci Technol* 39(14):5121-5130.
- Jones BA, Shimell JJ & Watson NV (2011) Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Hormones and behavior* 59(2):246-251.
- Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M & Yamasaki H (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 114(3):545-555.
- Joshi K, Ellis JT, Hughes CM, Monaghan P & Neville AM (1986) Cellular proliferation in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 54(1):52-61.
- Kabir ER, Rahman MS & Rahman I (2015) A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental toxicology and pharmacology* 40(1):241-258.

- Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112(12):1776-1784.
- Kalluri R & Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119(6):1420-1428.
- Kalma Y, Granot I, Galiani D, Barash A & Dekel N (2004) Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology* 145(4):1617-1624.
- Kameritsch P, Khandoga N, Pohl U & Pogoda K (2013) Gap junctional communication promotes apoptosis in a connexin-type-dependent manner. *Cell death & disease* 4:e584.
- Kamstra JH, Hruha E, Blumberg B, Janesick A, Mandrup S, Hamers T & Legler J (2014) Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying enhanced in vitro adipocyte differentiation by the brominated flame retardant BDE-47. *Environ Sci Technol* 48(7):4110-4119.
- Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Tomaszewski J, Koda M, Sulkowska M, Przystupa W, Golaszewska J & Baltaziak M (2005) Connexins 26 and 43 correlate with Bak, but not with Bcl-2 protein in breast cancer. *Oncology reports* 14(2):325-329.
- Kanno Y, Sasaki Y, Shiba Y, Yoshida-Noro C & Takeichi M (1984) Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. *Experimental cell research* 152(1):270-274.
- Kanwal R & Gupta S (2012) Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 81(4):303-311.
- Kardami E, Dang XT, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S & Spray DC (2007) The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Bio* 94(1-2):245-264.
- Kariagina A, Aupperlee MD & Haslam SZ (2007) Progesterone receptor isoforms and proliferation in the rat mammary gland during development. *Endocrinology* 148(6):2723-2736.
- Karimova SF, Turakulov YK, Salakhova NS & Gulamova FY (1983) Content of thyroid hormones in human and animal milk and in cow milk based infant formulas. *Endocrinologia experimentalis* 17(3-4):237-242.
- Karmaus W, Osuch JR, Landgraf J, Taffe B, Mikucki D & Haan P (2011) Prenatal and concurrent exposure to halogenated organic compounds and gene expression of CYP17A1, CYP19A1, and oestrogen receptor alpha and beta genes. *Occup Environ Med* 68(6):430-437.
- Karpeta A, Barc J, Ptak A & Gregoraszczyk EL (2013) The 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether hydroxylated metabolites 5-OH-BDE-47 and 6-OH-BDE-47 stimulate estradiol secretion in the ovary by activating aromatase expression. *Toxicology* 305:65-70.
- Karpeta A & Gregoraszczyk E (2010) Mixture of dominant PBDE congeners (BDE-47, -99, -100 and -209) at levels noted in human blood dramatically enhances progesterone secretion by ovarian follicles. *Endocrine regulations* 44(2):49-55.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T & Tilson HA (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental health perspectives* 104 Suppl 4:715-740.

- Keane RW, Mehta PP, Rose B, Honig LS, Loewenstein WR & Rutishauser U (1988) Neural differentiation, NCAM-mediated adhesion, and gap junctional communication in neuroectoderm. A study in vitro. *J Cell Biol* 106(4):1307-1319.
- Keeling JW, Ozer E, King G & Walker F (2000) Oestrogen receptor alpha in female fetal, infant, and child mammary tissue. *The Journal of pathology* 191(4):449-451.
- Kelsey JL, Gammon MD & John EM (1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15(1):36-47.
- Kessenbrock K, Smith P, Steenbeek SC, Pervolarakis N, Kumar R, Minami Y, Goga A, Hinck L & Werb Z (2017) Diverse regulation of mammary epithelial growth and branching morphogenesis through noncanonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(12):3121-3126.
- Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, Berrino F, Krogh V, Sieri S, Brinton LA, Dorgan JF, Dossus L, Dowsett M, Eliassen AH, Fortner RT, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Comstock GW, Kaaks R, Kahle LL, Koenig K, Zeleniuch-Jacquotte A, Muti P, Overvad K, Peeters PHM, Riboli E, Rinaldi S, Rollison DE, Stanczyk FZ, Trichopoulos D, Tworoger SS, Tworoger SS & Vineis P (2013) Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol* 14(10):1009-1019.
- Khalil AA, Iliina O, Vasaturo A, Venhuizen JH, Vullings M, Venhuizen V, Bilos A, Figdor CG, Span PN & Friedl P (2020) Collective invasion induced by an autocrine purinergic loop through connexin-43 hemichannels. *J Cell Biol* 219(10).
- Kibakaya EC, Stephen K & Whalen MM (2009) Tetrabromobisphenol A has immunosuppressive effects on human natural killer cells. *J Immunotoxicol* 6(4):285-292.
- Kicinski M, Viaene MK, Den Hond E, Schoeters G, Covaci A, Dirtu AC, Nelen V, Bruckers L, Croes K, Sioen I, Baeyens W, Van Larebeke N & Nawrot TS (2012) Neurobehavioral function and low-level exposure to brominated flame retardants in adolescents: a cross-sectional study. *Environmental health : a global access science source* 11:86.
- Kim A, Jang MH, Lee SJ & Bae YK (2017) Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of breast cancer* 20(2):150-159.
- Kim K, Lu Z & Hay ED (2002) Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell biology international* 26(5):463-476.
- Kim S, Park J, Kim HJ, Lee JJ, Choi G, Choi S, Kim S, Kim SY, Moon HB, Kim S & Choi K (2013) Association between several persistent organic pollutants and thyroid hormone levels in serum among the pregnant women of Korea. *Environment international* 59:442-448.
- Kim S, Park J, Kim HJ, Lee JJ, Choi G, Choi S, Kim S, Kim SY, Moon HB, Kim S & Choi K (2015) Association between Several Persistent Organic Pollutants and Thyroid Hormone Levels in Cord Blood Serum and Bloodspot of the Newborn Infants of Korea. *PLoS one* 10(5):e0125213.
- Kim UJ, Kim MY, Hong YH, Lee DH & Oh JE (2012) Assessment of Impact of Internal Exposure to PBDEs on Human Thyroid Function-Comparison between Congenital Hypothyroidism and Normal Paired Blood. *Environ Sci Technol* 46(11):6261-6268.
- Kim UJ, Lee IS, Kim HS & Oh JE (2011) Monitoring of PBDEs concentration in umbilical cord blood and breast milk from Korean population and estimating the effects of various parameters on accumulation in humans. *Chemosphere* 85(3):487-493.

- Kim UJ & Oh JE (2014) Tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane flame retardants in infant-mother paired serum samples, and their relationships with thyroid hormones and environmental factors. *Environ Pollut* 184:193-200.
- Kim YR, Harden FA, Toms LML & Norman RE (2014) Health consequences of exposure to brominated flame retardants: A systematic review. *Chemosphere* 106:1-19.
- Kimura T, Ito Y, Einspanier A, Tohya K, Nobunaga T, Tokugawa Y, Takemura M, Kubota Y, Ivell R, Matsuura N, Saji F & Murata Y (1998) Expression and immunolocalization of the oxytocin receptor in human lactating and non-lactating mammary glands. *Hum Reprod* 13(9):2645-2653.
- Kinzler KW & Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280(5366):1036-1037.
- Klein CA (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9(4):302-312.
- Knights AJ, Funnell AP, Crossley M & Pearson RC (2012) Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends in cancer research* 8:61-69.
- Knower KC, To SQ, Leung YK, Ho SM & Clyne CD (2014) Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. *Endocrine-related cancer* 21(2):T33-T55.
- Kodavanti PR, Coburn CG, Moser VC, MacPhail RC, Fenton SE, Stoker TE, Rayner JL, Kannan K & Birnbaum LS (2010a) Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71: neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects. *Toxicol Sci* 116(1):297-312.
- Kodavanti PRS, Coburn CG, Moser VC, MacPhail RC, Fenton SE, Stoker TE, Rayner JL, Kannan K & Birnbaum LS (2010b) Developmental Exposure to a Commercial PBDE Mixture, DE-71: Neurobehavioral, Hormonal, and Reproductive Effects. *Toxicol Sci* 116(1):297-312.
- Koenig CM, Lango J, Pessah IN & Berman RF (2012) Maternal transfer of BDE-47 to offspring and neurobehavioral development in C57BL/6J mice. *Neurotoxicol Teratol* 34(6):571-580.
- Kohn MC & Melnick RL (2002) Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *Journal of molecular endocrinology* 29(1).
- Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sugihara K, Yoshida T & Kitamura S (2009) Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental health perspectives* 117(8):1210-1218.
- Kolla S, Morcos M, Martin B & Vandenberg LN (2018) Low dose bisphenol S or ethinyl estradiol exposures during the perinatal period alter female mouse mammary gland development. *Reprod Toxicol* 78:50-59.
- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP & Sukumar S (2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22(13):2021-2033.
- Kortenkamp A (2006) Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective. *Int J Androl* 29(1):193-198.
- Kortenkamp A (2007) Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental health perspectives* 115 Suppl 1:98-105.
- Kortenkamp A (2008) Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl* 31(2):233-240.

- Kortenkamp A, Faust M, Scholze M & Backhaus T (2007) Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environmental health perspectives* 115 Suppl 1:106-114.
- Kotini M, Barriga EH, Leslie J, Gentzel M, Rauschenberger V, Schambony A & Mayor R (2018) Author Correction: Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. *Nat Commun* 9(1):4633.
- Kovacs A, Dhillon J & Walker RA (2003) Expression of P-cadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. *J Clin Pathol-Mol Pa* 56(6):318-322.
- Kovacs A & Walker RA (2003) P-cadherin as a marker in the differential diagnosis of breast lesions. *Journal of clinical pathology* 56(2):139-141.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA & Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15677-15682.
- Kress E, Samarut J & Plateroti M (2009) Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol Cell Endocrinol* 313(1-2):36-49.
- Krutovskikh VA, Piccoli C & Yamasaki H (2002) Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene* 21(13):1989-1999.
- Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M & Yamasaki H (2000) Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 19(4):505-513.
- Kubincova P, Sychrova E, Raska J, Basu A, Yawer A, Dydowiczova A, Babica P & Sovadinova I (2019) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Endocrine Disruption: Role of Testicular Gap Junctional Intercellular Communication and Connexins. *Toxicol Sci* 169(1):70-83.
- Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, Goldgar DE, Terry MB, Rookus MA, Easton DF, Antoniou AC, Brca, Consortium BC, McGuffog L, Evans DG, Barrowdale D, Frost D, Adlard J, Ong KR, Izatt L, Tischkowitz M, Eeles R, Davidson R, Hodgson S, Ellis S, Nogues C, Lasset C, Stoppa-Lyonnet D, Fricker JP, Faivre L, Berthet P, Hooning MJ, van der Kolk LE, Kets CM, Adank MA, John EM, Chung WK, Andrulis IL, Southey M, Daly MB, Buys SS, Osorio A, Engel C, Kast K, Schmutzler RK, Caldes T, Jakubowska A, Simard J, Friedlander ML, McLachlan SA, Machackova E, Foretova L, Tan YY, Singer CF, Olah E, Gerdes AM, Arver B & Olsson H (2017) Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Jama* 317(23):2402-2416.
- Kuriyama SN, Wanner A, Fidalgo-Neto AA, Talsness CE, Koerner W & Chahoud I (2007) Developmental exposure to low-dose PBDE-99: tissue distribution and thyroid hormone levels. *Toxicology* 242(1-3):80-90.
- Kurley SJ, Bierie B, Carnahan RH, Lobdell NA, Davis MA, Hofmann I, Moses HL, Muller WJ & Reynolds AB (2012) p120-catenin is essential for terminal end bud function and mammary morphogenesis. *Development* 139(10):1754-1764.
- Kwak BR & Jongsma HJ (1996) Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Molecular and cellular biochemistry* 157(1-2):93-99.

- Kwiecinska P, Wrobel A & Gregoraszczyk EL (2011) Combinatory effects of PBDEs and 17 beta-estradiol on MCF-7 cell proliferation and apoptosis. *Pharmacol Rep* 63(1):189-194.
- Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M & Rousselle C (2015) Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health-Glob* 14.
- Laird DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical journal* 394(Pt 3):527-543.
- Laird DW, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh HT, Carystinos GD & Alaoui-Jamali MA (1999) Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer research* 59(16):4104-4110.
- Lampe PD & Lau AF (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(7):1171-1186.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG & Lau AF (2000) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 149(7):1503-1512.
- Landrigan P, Garg A & Droller DB (2003) Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. *Environmental health perspectives* 111(13):1678-1682.
- Larsen WJ, Tung HN & Polking C (1981) Response of granulosa cell gap junctions to human chorionic gonadotropin (hCG) at ovulation. *Biology of reproduction* 25(5):1119-1134.
- Lee B, Moon KM & Kim CY (2018) Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res* 2018:2645465.
- Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K & Sager R (1992) Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol* 118(5):1213-1221.
- Lee SW, Tomasetto C & Sager R (1991) Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(7):2825-2829.
- Lees P, Cunningham FM & Elliott J (2004) Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *J Vet Pharmacol Ther* 27(6):397-414.
- Lefevre PL, Berger RG, Ernest SR, Gaertner DW, Rawn DF, Wade MG, Robaire B & Hales BF (2016a) Exposure of Female Rats to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Targets the Ovary, Affecting Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Biology of reproduction* 94(1):9.
- Lefevre PLC, Wade M, Goodyer C, Hales BF & Robaire B (2016b) A Mixture Reflecting Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Profiles Detected in Human Follicular Fluid Significantly Affects Steroidogenesis and Induces Oxidative Stress in a Female Human Granulosa Cell Line. *Endocrinology* 157(7):2698-2711.
- Leijds MM, Koppe JG, Olie K, van Aalderen WM, Voogt P, Vulsma T, Westra M & ten Tusscher GW (2008) Delayed initiation of breast development in girls with higher prenatal dioxin exposure; a longitudinal cohort study. *Chemosphere* 73(6):999-1004.
- Leithe E, Kjenseth A, Bruun J, Sirnes S & Rivedal E (2010) Inhibition of connexin43 gap junction channels by the endocrine disruptor ioxynil. *Toxicology and applied pharmacology* 247(1):10-17.

- Leonetti C, Butt CM, Hoffman K, Hammel SC, Miranda ML & Stapleton HM (2016) Brominated flame retardants in placental tissues: associations with infant sex and thyroid hormone endpoints. *Environ Health-Glob* 15.
- Li CI, Malone KE, Daling JR, Potter JD, Bernstein L, Marchbanks PA, Strom BL, Simon MS, Press MF, Ursin G, Burkman RT, Folger SG, Norman S, McDonald JA & Spirtas R (2008) Timing of menarche and first full-term birth in relation to breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 167(2):230-239.
- Li F, Xie Q, Li X, Li N, Chi P, Chen J, Wang Z & Hao C (2010) Hormone activity of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on human thyroid receptor-beta: in vitro and in silico investigations. *Environmental health perspectives* 118(5):602-606.
- Li M, Liu X, Robinson G, Bar-Peled U, Wagner KU, Young WS, Hennighausen L & Furth PA (1997) Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(7):3425-3430.
- Li P, Yang CQ, Jin J, Wang Y, Liu WZ & Ding WW (2014) [Correlations between HBCD and thyroid hormone concentrations in human serum from production source area]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue* 35(10):3970-3976.
- Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W & Chen B (2017) Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8(10):16445-16455.
- Li ZH, Liu XY, Wang N, Chen JS, Chen YH, Huang JT, Su CH, Xie F, Yu B & Chen DJ (2012) Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environmental health perspectives* 120(4):541-546.
- Lien WH, Klezovitch O & Vasioukhin V (2006) Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr Opin Cell Biol* 18(5):499-506.
- Lignell S, Aune M, Darnerud PO, Stridsberg M, Hanberg A, Larsson SC & Glynn A (2016) Maternal body burdens of PCDD/Fs and PBDEs are associated with maternal serum levels of thyroid hormones in early pregnancy: a cross-sectional study. *Environmental health : a global access science source* 15:55.
- Lilienthal H, Hack A, Roth-Harer A, Grande SW & Talsness CE (2006) Effects of developmental exposure to 2,2 ,4,4 ,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environmental health perspectives* 114(2):194-201.
- Lilienthal H, Roth-Harer A, Hack A, Altmann L & Winneke G (2005) Developmental neurotoxicity of PHAHs: Endocrine-mediated and general behavioral endpoints in adult male rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 19(3):757-759.
- Lim JS, Lee DH & Jacobs DR, Jr. (2008) Association of brominated flame retardants with diabetes and metabolic syndrome in the U.S. population, 2003-2004. *Diabetes care* 31(9):1802-1807.
- Lin Q, Balasubramanian K, Fan D, Kim SJ, Guo L, Wang H, Bar-Eli M, Aldape KD & Fidler IJ (2010) Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels. *Neoplasia* 12(9):748-754.
- Lin R, Warn-Cramer BJ, Kurata WE & Lau AF (2001) v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J Cell Biol* 154(4):815-827.

- Lin SM, Chen FA, Huang YF, Hsing LL, Chen LL, Wu LS, Liu TS, Chang-Chien GP, Chen KC & Cho HR (2011) Negative associations between PBDE levels and thyroid hormones in cord blood. *International journal of hygiene and environmental health* 214(2):115-120.
- Lin SY, Xia WY, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG & Hung MC (2000) beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(8):4262-4266.
- Linares V, Belles M & Domingo JL (2015) Human exposure to PBDE and critical evaluation of health hazards. *Arch Toxicol* 89(3):335-356.
- Lind PM & Lind L (2011) Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly. *Atherosclerosis* 218(1):207-213.
- Lindvall C, Evans NC, Zylstra CR, Li Y, Alexander CM & Williams BO (2006) The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry* 281(46):35081-35087.
- Lindvall C, Zylstra CR, Evans N, West RA, Dykema K, Furge KA & Williams BO (2009) The Wnt Co-Receptor Lrp6 Is Required for Normal Mouse Mammary Gland Development. *PLoS one* 4(6).
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X & He X (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108(6):837-847.
- Locke D, Jamieson S, Stein T, Liu J, Hodgins MB, Harris AL & Gusterson B (2007) Nature of Cx30-containing channels in the adult mouse mammary gland. *Cell and tissue research* 328(1):97-107.
- Locke D, Perusinghe N, Newman T, Jayatilake H, Evans WH & Monaghan P (2000) Developmental expression and assembly of connexins into homomeric and heteromeric gap junction hemichannels in the mouse mammary gland. *J Cell Physiol* 183(2):228-237.
- Locke D, Stein T, Davies C, Morris J, Harris AL, Evans WH, Monaghan P & Gusterson B (2004) Altered permeability and modulatory character of connexin channels during mammary gland development. *Experimental cell research* 298(2):643-660.
- Lollivier V, Marnet PG, Delpal S, Rainteau D, Achard C, Rabot A & Ollivier-Bousquet M (2006) Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *The Journal of physiology* 570(Pt 1):125-140.
- Love OP, Shutt LJ, Silfies JS, Bortolotti GR, Smits JE & Bird DM (2003) Effects of dietary PCB exposure on adrenocortical function in captive American kestrels (*Falco sparverius*). *Ecotoxicology* 12(1-4):199-208.
- Lucas D, Petty SM, Keen O, Luedeka B, Schlummer M, Weber R, Barlaz M, Yazdani R, Riise B, Rhodes J, Nightingale D, Diamond ML, Vijgen J, Lindeman A, Blum A & Koshland CP (2018) Methods of Responsibly Managing End-of-Life Foams and Plastics Containing Flame Retardants: Part I. *Environ Eng Sci* 35(6):573-587.
- Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Dano K & Werb Z (1996) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122(1):181-193.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM & O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & development* 9(18):2266-2278.

- Lye SJ, Nicholson BJ, Mascarenhas M, Mackenzie L & Petrocelli T (1993a) Increased Expression of Connexin-43 in the Rat Myometrium during Labor Is Associated with an Increase in the Plasma Estrogen Progesterone Ratio. *Endocrinology* 132(6):2380-2386.
- Lye SJ, Nicholson BJ, Mascarenhas M, MacKenzie L & Petrocelli T (1993b) Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. *Endocrinology* 132(6):2380-2386.
- Macias H & Hinck L (2012) Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 1(4):533-557.
- Mackenzie LW & Garfield RE (1986) Effects of 17 beta-estradiol on myometrial gap junctions and pregnancy in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 64(4):462-466.
- Macon MB & Fenton SE (2013) Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 18(1):43-61.
- Mallepell S, Krust A, Chambon P & Briskin C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2196-2201.
- Mandrup K, Boberg J, Isling LK, Christiansen S & Hass U (2016) Low-dose effects of bisphenol A on mammary gland development in rats. *Andrology* 4(4):673-683.
- Mangoni AA & Jackson SH (2004) Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol* 57(1):6-14.
- Maranghi F, Tassinari R, Moracci G, Altieri I, Rasinger JD, Carroll TS, Hogstrand C, Lundebye AK & Mantovani A (2013) Dietary exposure of juvenile female mice to polyhalogenated seafood contaminants (HBCD, BDE-47, PCB-153, TCDD): comparative assessment of effects in potential target tissues. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 56:443-449.
- Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C & Soto AM (2001) In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biology of reproduction* 65(4):1215-1223.
- Markham E, Brault EK, Khairy M, Robuck AR, Goebel ME, Cantwell MG, Dickhut RM & Lohmann R (2018) Time Trends of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Antarctic Biota. *ACS Omega* 3(6):6595-6604.
- Marti A, Feng Z, Altermatt HJ & Jaggi R (1997) Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells. *European journal of cell biology* 73(2):158-165.
- Martinez-Pena AA, Rivera-Banos J, Mendez-Carrillo LL, Ramirez-Solano MI, Galindo-Bustamante A, Paez-Franco JC, Morimoto S, Gonzalez-Mariscal L, Cruz ME & Mendoza-Rodriguez CA (2017) Perinatal administration of bisphenol A alters the expression of tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate. *Reprod Toxicol* 69:106-120.
- Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC & Ip MM (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5(2):165-185.
- Matty AJ & Green K (1964) Effect of Thyroxine on Ion Movement in Isolated Toad Bladder. *General and comparative endocrinology* 4:331-338.

- Mazdai A, Dodder NG, Abernathy MP, Hites RA & Bigsby RM (2003) Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environmental health perspectives* 111(9):1249-1252.
- McEwen AE, Escobar DE & Gottardi CJ (2012) Signaling from the adherens junction. *Subcell Biochem* 60:171-196.
- McGuinn LA, Ghazarian AA, Ellison GL, Harvey CE, Kaefer CM & Reid BC (2012) Cancer and environment: definitions and misconceptions. *Environmental research* 112:230-234.
- McLachlan E, Shao Q & Laird DW (2007) Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *The Journal of membrane biology* 218(1-3):107-121.
- McLachlan JA (2006) Commentary: prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES): a continuing story. *International journal of epidemiology* 35(4):868-870.
- Medina D (1996) The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1(1):5-19.
- Medina D, Sivaraman L, Hilsenbeck SG, Conneely O, Ginger M, Rosen J & O'Malley BW (2001) Mechanisms of hormonal prevention of breast cancer. *Ann Ny Acad Sci* 952:23-35.
- Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der Burg B & Brouwer A (2001a) In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives* 109(4):399-407.
- Meerts IA, van Zanden JJ, Luijckx EA, van Leeuwen-Bol I, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A & Brouwer A (2000) Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci* 56(1):95-104.
- Meerts IATM, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der Burg B & Brouwer A (2001b) In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives* 109(4):399-407.
- Mege RM, Matsuzaki F, Gallin WJ, Goldberg JI, Cunningham BA & Edelman GM (1988) Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(19):7274-7278.
- Meijer L, Weiss J, Van Velzen M, Brouwer A, Bergman A & Sauer PJ (2008) Serum concentrations of neutral and phenolic organohalogenes in pregnant women and some of their infants in The Netherlands. *Environ Sci Technol* 42(9):3428-3433.
- Meites J & Kragt CL (1964) Effects of a Pituitary Homotransplant and Thyroxine on Body and Mammary Growth in Immature Hypophysectomized Rats. *Endocrinology* 75:565-570.
- Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, Gallo M, Reuhl K, Ho SM, Brown T, Moore J, Leakey J, Haseman J & Kohn M (2002) Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environmental health perspectives* 110(4):427-431.
- Melzer D, Rice N, Depledge MH, Henley WE & Galloway TS (2010) Association between Serum Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Thyroid Disease in the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental health perspectives* 118(5):686-692.

- Mendoza A & Hollenberg AN (2017) New insights into thyroid hormone action. *Pharmacol Ther* 173:135-145.
- Meng W & Takeichi M (2009) Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(6):a002899.
- Mercado-Feliciano M & Bigsby RM (2008a) Hydroxylated metabolites of the polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 are weak estrogen receptor-alpha ligands. *Environmental health perspectives* 116(10):1315-1321.
- Mercado-Feliciano M & Bigsby RM (2008b) The polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 is mildly estrogenic. *Environmental health perspectives* 116(5):605-611.
- Meyer RA, Laird DW, Revel JP & Johnson RG (1992) Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* 119(1):179-189.
- Michaelson JS & Leder P (2001) beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* 20(37):5093-5099.
- Miller VM, Sanchez-Morrissey S, Brosch KO & Seegal RF (2012) Developmental Coexposure to Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers Has Additive Effects on Circulating Thyroxine Levels in Rats. *Toxicol Sci* 127(1):76-83.
- Milligan SR, Khan O & Nash M (1998) Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *General and comparative endocrinology* 112(1):89-95.
- Mitchell JA, Ou C, Chen Z, Nishimura T & Lye SJ (2001) Parathyroid hormone-induced up-regulation of connexin-43 messenger ribonucleic acid (mRNA) is mediated by sequences within both the promoter and the 3'untranslated region of the mRNA. *Endocrinology* 142(2):907-915.
- Mittendorf R (1995) Teratogen Update - Carcinogenesis and Teratogenesis Associated with Exposure to Diethylstilbestrol (Des) in-Utero. *Teratology* 51(6):435-445.
- Mlynarcikova A, Macho L & Fickova M (2013) Bisphenol A alone or in combination with estradiol modulates cell cycle- and apoptosis-related proteins and genes in MCF7 cells. *Endocrine regulations* 47(4):189-199.
- Moll R, Mitze M, Frixen UH & Birchmeier W (1993) Differential Loss of E-Cadherin Expression in Infiltrating Ductal and Lobular Breast Carcinomas. *American Journal of Pathology* 143(6):1731-1742.
- Momiyama M, Omori Y, Ishizaki Y, Nishikawa Y, Tokairin T, Ogawa J & Enomoto K (2003) Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer science* 94(6):501-507.
- Monaghan P, Clarke C, Perusinghe NP, Moss DW, Chen XY & Evans WH (1996) Gap junction distribution and connexin expression in human breast. *Experimental cell research* 223(1):29-38.
- Monaghan P, Perusinghe N, Carlile G & Evans WH (1994) Rapid Modulation of Gap Junction Expression in Mouse Mammary-Gland during Pregnancy, Lactation, and Involution. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 42(7):931-938.
- Moon HJ, Han SY, Shin JH, Kang IH, Kim TS, Hong JH, Kim SH & Fenton SE (2007) Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring. *The Journal of reproduction and development* 53(2):333-344.

- Moorby C & Patel M (2001) Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Experimental cell research* 271(2):238-248.
- Moreno AP & Lau AF (2007) Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Prog Biophys Mol Biol* 94(1-2):107-119.
- Morland KB, Landrigan PJ, Sjodin A, Gobeille AK, Jones RS, McGahee EE, Needham LL & Patterson DG (2005) Body burdens of polybrominated diphenyl ethers among urban anglers. *Environmental health perspectives* 113(12):1689-1692.
- Mote PA, Johnston JF, Manninen T, Tuohimaa P & Clarke CL (2001) Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. *Journal of clinical pathology* 54(8):624-630.
- Mueller SO, Clark JA, Myers PH & Korach KS (2002) Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 143(6):2357-2365.
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ & Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(17):9744-9749.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP & Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289(5485):1751-1754.
- Munford RE (1963a) Changes in the Mammary Glands of Rats and Mice during Pregnancy, Lactation and Involution. 1. Histological Structure. *The Journal of endocrinology* 28:1-15.
- Munford RE (1963b) Changes in the Mammary Glands of Rats and Mice during Pregnancy, Lactation and Involution. 3. Relation of Structural and Biochemical Changes. *The Journal of endocrinology* 28:35-44.
- Munoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C & Soto AM (2005) Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146(9):4138-4147.
- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C & Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23(3):383-390.
- Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM & Goodenough DA (1990) Differential Phosphorylation of the Gap Junction Protein Connexin-43 in Junctional Communication-Competent and Communication-Deficient Cell-Lines. *J Cell Biol* 111(5):2077-2088.
- Musil LS & Goodenough DA (1991a) Biochemical-Analysis of Connexin43 Intracellular-Transport, Phosphorylation, and Assembly into Gap Junctional Plaques. *J Cell Biol* 115(5):1357-1374.
- Musil LS & Goodenough DA (1991b) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115(5):1357-1374.
- Myers JP, Zoeller RT & vom Saal FS (2009) A Clash of Old and New Scientific Concepts in Toxicity, with Important Implications for Public Health. *Environmental health perspectives* 117(11):1652-1655.
- Naccarato AG, Viacava P, Vignati S, Fanelli G, Bonadio AG, Montruccoli G & Bevilacqua G (2000) Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 436(5):431-438.

- Nagel SC, vom Saal FS & Welshons WV (1999) Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 69(1-6):343-357.
- Nagel SC, vomSaal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M & Welshons WV (1997) Relative binding affinity serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environmental health perspectives* 105(1):70-76.
- Nagi C, Guttman M, Jaffer S, Qiao R, Keren R, Triana A, Li M, Godbold J, Bleiweiss IJ & Hazan RB (2005) N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. *Breast cancer research and treatment* 94(3):225-235.
- Naus CC & Laird DW (2010) Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(6):435-441.
- Neville MC, McFadden TB & Forsyth I (2002) Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):49-66.
- Newbold RR (2004) Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicology and applied pharmacology* 199(2):142-150.
- Nguyen DA & Neville MC (1998) Tight junction regulation in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 3(3):233-246.
- Nguyen DA, Parlow AF & Neville MC (2001) Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *The Journal of endocrinology* 170(2):347-356.
- Nicholson MDO, Lindsay LA & Murphy CR (2010) Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy. *Acta histochemica* 112(1):42-52.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR & Wheelock MJ (1999) N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147(3):631-644.
- Nose A & Takeichi M (1986) A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 103(6 Pt 2):2649-2658.
- Oftedal OT (2002) The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(3):225-252.
- Oh S (2015) Bisphenol A and 4-tert-Octylphenol Inhibit Cx46 Hemichannel Currents. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19(1):73-79.
- Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M & et al. (1993) Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer research* 53(7):1696-1701.
- Ormandy CJ, Binart N & Kelly PA (1997) Mammary gland development in prolactin receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2(4):355-364.

- Oulhote Y, Chevrier J & Bouchard MF (2016) Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hypothyroidism in Canadian Women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101(2):590-598.
- Oyamada M, Oyamada Y & Takamatsu T (2005) Regulation of connexin expression. *Biochimica et biophysica acta* 1719(1-2):6-23.
- Ozaki S, Ikeda S, Ishizaki Y, Kurihara T, Tokumoto N, Iseki M, Arihiro K, Kataoka T, Okajima M & Asahara T (2005) Alterations and correlations of the components in the Wnt signaling pathway and its target genes in breast cancer. *Oncology reports* 14(6):1437-1443.
- Padilla-Banks E, Jefferson WN & Newbold RR (2006) Neonatal exposure to the phytoestrogen genistein alters mammary gland growth and developmental programming of hormone receptor levels. *Endocrinology* 147(10):4871-4882.
- Paduch R (2015) Theories of cancer origin. *European Journal of Cancer Prevention* 24(1):57-67.
- Paine IS & Lewis MT (2017) The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 22(2):93-108.
- Palace V, Park B, Pleskach K, Gemmill B & Tomy G (2010) Altered thyroxine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane (HBCD). *Chemosphere* 80(2):165-169.
- Palace VP, Pleskach K, Halldorson T, Danell R, Wautier K, Evans B, Alaei M, Marvin C & Tomy GT (2008) Biotransformation enzymes and thyroid axis disruption in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane diastereoisomers. *Environ Sci Technol* 42(6):1967-1972.
- Palacios J, Benito N, Pizarro A, Suarez A, Espada J, Cano A & Gamallo C (1995) Anomalous Expression of P-Cadherin in Breast-Carcinoma - Correlation with E-Cadherin Expression and Pathological Features. *American Journal of Pathology* 146(3):605-612.
- Palanza P, Parmigiani S & vom Saal FS (2001) Effects of prenatal exposure to low doses of diethylstilbestrol, o,p'DDT, and methoxychlor on postnatal growth and neurobehavioral development in male and female mice. *Hormones and behavior* 40(2):252-265.
- Pang WW & Hartmann PE (2007) Initiation of human lactation: Secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 12(4):211-221.
- Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F & Schmitt FC (2005) P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* 11(16):5869-5877.
- Paredes J, Milanezi F, Reis JS, Leitao D, Athanzio D & Schmitt F (2002) Aberrant P-cadherin expression: Is it associated with estrogen-independent growth in breast cancer? *Pathology Research and Practice* 198(12):795-801.
- Park DJ, Wallick CJ, Martyn KD, Lau AF, Jin C & Warn-Cramer BJ (2007) Akt phosphorylates connexin43 on Ser373, a "Mode-1" binding site for 14-3-3. *Cell Commun Adhes* 14(5):211-226.
- Peper JS, Brouwer RM, van Leeuwen M, Schnack HG, Boomsma DI, Kahn RS & Hulshoff Pol HE (2010) HPG-axis hormones during puberty: a study on the association with hypothalamic and pituitary volumes. *Psychoneuroendocrinology* 35(1):133-140.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-

- Dale AL, Brown PO & Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-752.
- Petrocelli T & Lye SJ (1993) Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133(1):284-290.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA & Young WC (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65:369-382.
- Picut CA, Remick AK, Asakawa MG, Simons ML & Parker GA (2014) Histologic features of prepubertal and pubertal reproductive development in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 42(2):403-413.
- Plante I, Charbonneau M & Cyr DG (2002) Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis* 23(7):1243-1249.
- Plante I, Charbonneau M & Cyr DG (2006) Activation of the integrin-linked kinase pathway downregulates hepatic connexin32 via nuclear Akt. *Carcinogenesis* 27(9):1923-1929.
- Plante I, Cyr DG & Charbonneau M (2005) Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci* 88(2):346-357.
- Plante I & Laird DW (2008) Decreased levels of connexin43 result in impaired development of the mammary gland in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Developmental biology* 318(2):312-322.
- Plante I, Stewart MK, Barr K, Allan AL & Laird DW (2011a) Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 30(14):1681-1692.
- Plante I, Stewart MK & Laird DW (2011b) Evaluation of mammary gland development and function in mouse models. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/2828(53).
- Plante I, Wallis A, Shao Q & Laird DW (2010) Milk secretion and ejection are impaired in the mammary gland of mice harboring a Cx43 mutant while expression and localization of tight and adherens junction proteins remain unchanged. *Biology of reproduction* 82(5):837-847.
- Plateroti M, Kress E, Mori JI & Samarut J (2006) Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 26(8):3204-3214.
- Polakis P (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Current opinion in genetics & development* 17(1):45-51.
- Pollmann MA, Shao Q, Laird DW & Sandig M (2005) Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast cancer research : BCR* 7(4):R522-534.
- Pompei LM & Fernandes CE (2020) Hormone Therapy, Breast Cancer Risk and the Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Article. *Rev Bras Ginecol Obstet* 42(5):233-234.
- Poon E, Powers BE, McAlonan RM, Ferguson DC & Schantz SL (2011) Effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls and/or polybrominated diphenyl ethers on cochlear function. *Toxicol Sci* 124(1):161-168.

- Poon S, Wade MG, Aleksa K, Rawn DF, Carnevale A, Gaertner DW, Sadler A, Breton F, Koren G, Ernest SR, Lalancette C, Robaire B, Hales BF & Goodyer CG (2014a) Hair as a biomarker of systemic exposure to polybrominated diphenyl ethers. *Environ Sci Technol* 48(24):14650-14658.
- Poon S, Wade MG, Aleksa K, Rawn DFK, Carnevale A, Gaertner DW, Sadler A, Breton F, Koren G, Ernest SR, Lalancette C, Robaire B, Hales BF & Goodyer CG (2014b) Hair as a Biomarker of Systemic Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers. *Environ Sci Technol* 48(24):14650-14658.
- Postma FR, Hengeveld T, Alblas J, Giepmans BNG, Zondag GCM, Jalink K & Moolenaar WH (1998) Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: A critical role for c-Src. *J Cell Biol* 140(5):1199-1209.
- Poston RG & Saha RN (2019) Epigenetic Effects of Polybrominated Diphenyl Ethers on Human Health. *International journal of environmental research and public health* 16(15).
- Potischman N & Troisi R (1999) In-utero and early life exposures in relation to risk of breast cancer. *Cancer Causes Control* 10(6):561-573.
- Pozzi A, Risek B, Kiang DT, Gilula NB & Kumar NM (1995) Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland. *Experimental cell research* 220(1):212-219.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He XP & Perou CM (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 12(5).
- Prat A & Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* 5(1):5-23.
- Puranam KL, Laird DW & Revel JP (1993) Trapping an intermediate form of connexin43 in the Golgi. *Experimental cell research* 206(1):85-92.
- Qin H, Shao Q, Curtis H, Galipeau J, Belliveau DJ, Wang T, Alaoui-Jamali MA & Laird DW (2002) Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *The Journal of biological chemistry* 277(32):29132-29138.
- Qin WP, Li CH, Guo LH, Ren XM & Zhang JQ (2019) Binding and activity of polybrominated diphenyl ether sulfates to thyroid hormone transport proteins and nuclear receptors. *Environ Sci Process Impacts* 21(6):950-956.
- Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M & Hynes RO (1997) Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 139(4):1025-1032.
- Radice GL, Sauer CL, Kostetskii I, Peralta Soler A & Knudsen KA (2003) Inappropriate P-cadherin expression in the mouse mammary epithelium is compatible with normal mammary gland function. *Differentiation; research in biological diversity* 71(6):361-373.
- Rahman F, Langford KH, Scrimshaw MD & Lester JN (2001) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Science of the Total Environment* 275(1-3):1-17.
- Rajapakse N, Silva E & Kortenkamp A (2002a) Combining xenoestrogens at levels below individual No-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental health perspectives* 110(9):917-921.

- Rajapakse N, Silva E & Kortenkamp A (2002b) Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental health perspectives* 110(9):917-921.
- Rasinger JD, Carroll TS, Maranghi F, Tassinari R, Moracci G, Altieri I, Mantovani A, Lundebye AK & Hogstrand C (2018) Low dose exposure to HBCD, CB-153 or TCDD induces histopathological and hormonal effects and changes in brain protein and gene expression in juvenile female BALB/c mice. *Reprod Toxicol* 80:105-116.
- Reed CE & Fenton SE (2013) Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res C Embryo Today* 99(2):134-146.
- Reistad T, Fonnum F & Mariussen E (2006) Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells in vitro. *Arch Toxicol* 80(11):785-796.
- Ren XM & Guo LH (2013) Molecular toxicology of polybrominated diphenyl ethers: nuclear hormone receptor mediated pathways. *Environ Sci Process Impacts* 15(4):702-708.
- Richardson VM, Staskal DF, Ross DG, Diliberto JJ, DeVito MJ & Birnbaum LS (2008) Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicology and applied pharmacology* 226(3):244-250.
- Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW & Anderson SM (2000) An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5(2):227-241.
- Ridgeway AG, McMenamin J & Leder P (2006) P53 levels determine outcome during beta-catenin tumor initiation and metastasis in the mammary gland and male germ cells. *Oncogene* 25(25):3518-3527.
- Rinaldi F, Hartfield EM, Crompton LA, Badger JL, Glover CP, Kelly CM, Rosser AE, Uney JB & Caldwell MA (2014) Cross-regulation of Connexin43 and beta-catenin influences differentiation of human neural progenitor cells. *Cell death & disease* 5:e1017.
- Robinson GW, Karpf AB & Kratochwil K (1999a) Regulation of mammary gland development by tissue interaction. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4(1):9-19.
- Robinson GW, Karpf ABC & Kratochwil K (1999b) Regulation of mammary gland development by tissue interaction. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4(1):9-19.
- Robinson JF, Kapidzic M, Hamilton EG, Chen H, Puckett KW, Zhou Y, Ona K, Parry E, Wang Y, Park JS, Costello JF & Fisher SJ (2019) Genomic Profiling of BDE-47 Effects on Human Placental Cytotrophoblasts. *Toxicol Sci* 167(1):211-226.
- Rodgers KM, Udesky JO, Rudel RA & Brody JG (2018) Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environmental research* 160:152-182.
- Rothschild TC, Boylan ES, Calhoon RE & Vonderhaar BK (1987) Transplacental effects of diethylstilbestrol on mammary development and tumorigenesis in female ACI rats. *Cancer research* 47(16):4508-4516.
- Rudel RA, Fenton SE, Ackerman JM, Euling SY & Makris SL (2011) Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environmental health perspectives* 119(8):1053-1061.
- Rudini N & Dejana E (2008) Adherens junctions. *Current biology : CB* 18(23):R1080-1082.

- Ruis MT, Rock KD, Hall SM, Horman B, Patisaul HB & Stapleton HM (2019) PBDEs Concentrate in the Fetal Portion of the Placenta: Implications for Thyroid Hormone Dysregulation. *Endocrinology* 160(11):2748-2758.
- Russo IH & Russo J (1978) Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Journal of the National Cancer Institute* 61(6):1439-1449.
- Russo J, Lynch H & Russo IH (2001) Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. *The breast journal* 7(5):278-291.
- Russo J & Russo IH (2004) Development of the human breast. *Maturitas* 49(1):2-15.
- Ryan JJ & Rawn DF (2014) The brominated flame retardants, PBDEs and HBCD, in Canadian human milk samples collected from 1992 to 2005; concentrations and trends. *Environment international* 70:1-8.
- Saez JC, Martinez AD, Branes MC & Gonzalez HE (1998) Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 31(5):593-600.
- Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC & Hertzberg EL (1997) Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* 29(8):2131-2145.
- Saito T, Oyamada M, Yamasaki H, Mori M & Kudo R (1997) Co-ordinated expression of connexins 26 and 32 in human endometrial glandular epithelium during the reproductive cycle and the influence of hormone replacement therapy. *International journal of cancer* 73(4):479-485.
- Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M & Gustafsson JA (2000) Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(1):337-342.
- Sakakura T, Nishizuka Y & Dawe CJ (1976) Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* 194(4272):1439-1441.
- Sakakura T, Sakagami Y & Nishizuka Y (1982) Dual origin of mesenchymal tissues participating in mouse mammary gland embryogenesis. *Developmental biology* 91(1):202-207.
- Salian S, Doshi T & Vanage G (2009) Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265(1-2):56-67.
- Samuelsen HPB (2014) *The effects of Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on the cell viability, gap junction intercellular communication and DNA damage in the epithelial liver cell line IAR20 in vitro*. Master (Norwegian University of Life Sciences).
- Sante Canada (2006) Rapport sur l'état des connaissances scientifiques - Polybromodiphényléthers (PBDE).
- Sarkar D & Singh SK (2017) Maternal exposure to polybrominated diphenyl ether (BDE-209) during lactation affects germ cell survival with altered testicular glucose homeostasis and oxidative status through down-regulation of Cx43 and p27Kip1 in prepubertal mice offspring. *Toxicology* 386:103-119.
- Satterfield MC, Dunlap KA, Hayashi K, Burghardt RC, Spencer TE & Bazer FW (2007) Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by pregnancy and progesterone. *Endocrinology* 148(8):3922-3931.

- Schechter A, Colacino J, Sjodin A, Needham L & Birnbaum L (2010) Partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in serum and milk from the same mothers. *Chemosphere* 78(10):1279-1284.
- Schechter A, Papke O, Joseph JE & Tung KC (2005) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. computers and domestic carpet vacuuming: possible sources of human exposure. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 68(7):501-513.
- Schechter A, Papke O, Tung KC, Staskal D & Birnbaum L (2004) Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *Environ Sci Technol* 38(20):5306-5311.
- Schechter A, Pavuk M, Papke O, Ryan JJ, Birnbaum L & Rosen R (2003) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. *Environmental health perspectives* 111(14):1723-1729.
- Schedin P (2006) Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nat Rev Cancer* 6(4):281-291.
- Schneider M, Pons JL, Labesse G & Bourguet W (2019) In Silico Predictions of Endocrine Disruptors Properties. *Endocrinology* 160(11):2709-2716.
- Schriks M, Roessig JM, Murk AJ & Furlow JD (2007) Thyroid hormone receptor isoform selectivity of thyroid hormone disrupting compounds quantified with an in vitro reporter gene assay. *Environmental toxicology and pharmacology* 23(3):302-307.
- Schriks M, Zvinavashe E, Furlow JD & Murk AJ (2006) Disruption of thyroid hormone-mediated *Xenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona brominated diphenyl ether (BDE206). *Chemosphere* 65(10):1904-1908.
- Schug TT, Janesick A, Blumberg B & Heindel JJ (2011) Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127(3-5):204-215.
- Schulz KM, Molenda-Figueira HA & Sisk CL (2009) Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Hormones and behavior* 55(5):597-604.
- Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment (2000) *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*, Washington (DC)10.17226/9871.
- Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS & Rosenfeld MG (1997) Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 11(6):674-681.
- Segev O, Kushmaro A & Brenner A (2009) Environmental impact of flame retardants (persistence and biodegradability). *International journal of environmental research and public health* 6(2):478-491.
- Shah MM, Martinez AM & Fletcher WH (2002) The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: In vivo and in vitro studies. *Molecular and cellular biochemistry* 238(1-2):57-68.
- Shamir ER & Ewald AJ (2015) Adhesion in mammary development: novel roles for E-cadherin in individual and collective cell migration. *Current topics in developmental biology* 112:353-382.
- Shamir ER, Pappalardo E, Jorgens DM, Coutinho K, Tsai WT, Aziz K, Auer M, Tran PT, Bader JS & Ewald AJ (2014) Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *J Cell Biol* 204(5):839-856.

- Shao W, Kuhn C, Mayr D, Ditsch N, Kailuweit M, Wolf V, Harbeck N, Mahner S, Jeschke U, Cavailles V & Sixou S (2020) Cytoplasmic and Nuclear Forms of Thyroid Hormone Receptor beta1 Are Inversely Associated with Survival in Primary Breast Cancer. *International journal of molecular sciences* 21(1).
- Shaw SD, Blum A, Weber R, Kannan K, Rich D, Lucas D, Koshland CP, Dobraca D, Hanson S & Birnbaum LS (2010) Halogenated flame retardants: do the fire safety benefits justify the risks? *Reviews on environmental health* 25(4):261-305.
- She JW, Petreas M, Winkler J, Visita P, McKinney M & Kopec D (2002) PBDEs in the San Francisco Bay Area: measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue. *Chemosphere* 46(5):697-707.
- Sheehan DM & Young M (1979) Diethylstilbestrol and Estradiol Binding to Serum-Albumin and Pregnancy Plasma of Rat and Human. *Endocrinology* 104(5):1442-1446.
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A (2017) Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67(1):7-30.
- Siewertsz van Reesema LL, Lee MP, Zheleva V, Winston JS, O'Connor CF, Perry RR, Hoefler RA & Tang AH (2016) RAS pathway biomarkers for breast cancer prognosis. *Clin Lab Int* 40:18-23.
- Silva E, Rajapakse N & Kortenkamp A (2002a) Something from "nothing"--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 36(8):1751-1756.
- Silva JM, Dominguez G, Gonzalez-Sancho JM, Garcia JM, Silva J, Garcia-Andrade C, Navarro A, Munoz A & Bonilla F (2002b) Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene* 21(27):4307-4316.
- Singal R, Tu ZJ, Vanwert JM, Ginder GD & Kiang DT (2000) Modulation of the connexin26 tumor suppressor gene expression through methylation in human mammary epithelial cell lines. *Anticancer research* 20(1a):59-64.
- Sjodin A, Jones RS, Focant JF, Lapeza C, Wang RY, McGahee EE, 3rd, Zhang Y, Turner WE, Slazyk B, Needham LL & Patterson DG, Jr. (2004) Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States. *Environmental health perspectives* 112(6):654-658.
- Sjodin A, Patterson DG, Jr. & Bergman A (2003) A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment international* 29(6):829-839.
- Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR & Stanton PG (2006) FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *The Journal of endocrinology* 189(2):381-395.
- Smallridge RC & Latham KR (1980) Nuclear Thyroid-Hormone Receptors in Human-Breast Tumors. *Clin Res* 28(2):A421-A421.
- Société canadienne du cancer (2020).
- Sogaard M, Farkas DK, Ehrenstein V, Jorgensen JOL, Dekkers OM & Sorensen HT (2016) Hypothyroidism and hyperthyroidism and breast cancer risk: a nationwide cohort study. *Eur J Endocrinol* 174(4):409-414.
- Sohl G & Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10(4-6):173-180.

- Sohl G & Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research* 62(2):228-232.
- Solan JL, Fry M, TenBroek EM & Lampe PD (2002) Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and is associated with reduced gap junction assembly. *Mol Biol Cell* 13:212a-212a.
- Solan JL, Fry MD, TenBroek EM & Lampe PD (2003) Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *Journal of cell science* 116(Pt 11):2203-2211.
- Solan JL & Lampe PD (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1711(2):154-163.
- Solan JL & Lampe PD (2009) Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *The Biochemical journal* 419(2):261-272.
- Soldin OP, Tractenberg RE, Hollowell JG, Jonklaas J, Janicic N & Soldin SJ (2004) Trimester-specific changes in maternal thyroid hormone, thyrotropin, and thyroglobulin concentrations during gestation: trends and associations across trimesters in iodine sufficiency. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 14(12):1084-1090.
- Soler AP, Knudsen KA, Salazar H, Han AC & Keshgegian AA (1999) P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival. *Cancer* 86(7):1263-1272.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE & Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19):10869-10874.
- Soto AM, Brisken C, Schaeberle C & Sonnenschein C (2013) Does Cancer Start in the Womb? Altered Mammary Gland Development and Predisposition to Breast Cancer due to in Utero Exposure to Endocrine Disruptors. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 18(2):199-208.
- Soto AM, Lin TM, Sakabe K, Olea N, Damassa DA & Sonnenschein C (1995) Variants of the human prostate LNCaP cell line as tools to study discrete components of the androgen-mediated proliferative response. *Oncology research* 7(10-11):545-558.
- Soto AM & Sonnenschein C (2010) Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol* 6(7):364-371.
- Soto AM, Vandenberg LN, Maffini MV & Sonnenschein C (2008) Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin Pharmacol* 102(2):125-133.
- Spirli C, Locatelli L, Morell CM, Fiorotto R, Morton SD, Cadamuro M, Fabris L & Strazzabosco M (2013) Protein kinase A-dependent pSer(675)-beta-catenin, a novel signaling defect in a mouse model of congenital hepatic fibrosis. *Hepatology* 58(5):1713-1723.
- Sporn MB (1996) The war on cancer. *Lancet* 347(9012):1377-1381.
- Sreekumar A, Toneff MJ, Toh E, Roarty K, Creighton CJ, Belka GK, Lee DK, Xu J, Chodosh LA, Richards JS & Rosen JM (2017) WNT-Mediated Regulation of FOXO1 Constitutes a Critical Axis Maintaining Pubertal Mammary Stem Cell Homeostasis. *Developmental cell* 43(4):436-448 e436.

- St-Pierre N, Dufresne J, Rooney AA & Cyr DG (2003) Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biology of reproduction* 68(4):1232-1240.
- Stapleton HM, Allen JG, Kelly SM, Konstantinov A, Klosterhaus S, Watkins D, McClean MD & Webster TF (2008) Alternate and new brominated flame retardants detected in U.S. house dust. *Environ Sci Technol* 42(18):6910-6916.
- Stapleton HM, Dodder NG, Offenbergh JH, Schantz MM & Wise SA (2005) Polybrominated diphenyl ethers in house dust and clothes dryer lint. *Environ Sci Technol* 39(4):925-931.
- Stapleton HM, Eagle S, Anthopolos R, Wolkin A & Miranda ML (2011) Associations between polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants, phenolic metabolites, and thyroid hormones during pregnancy. *Environmental health perspectives* 119(10):1454-1459.
- Statistics Canada (Fire-related deaths and persons injured, by type of structure.
- Stelwagen K & Singh K (2014) The role of tight junctions in mammary gland function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 19(1):131-138.
- Sternlicht MD (2006) Key stages in mammary gland development - The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research* 8(1).
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P & Werb Z (2006a) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 74(7):365-381.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu PF & Werb Z (2006b) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 74(7):365-381.
- Stewart MK, Plante I, Bechberger JF, Naus CC & Laird DW (2014) Mammary gland specific knockdown of the physiological surge in Cx26 during lactation retains normal mammary gland development and function. *PloS one* 9(7):e101546.
- Stewart MKG, Bechberger JF, Welch I, Naus CC & Laird DW (2015a) Cx26 knockout predisposes the mammary gland to primary mammary tumors in a DMBA-induced mouse model of breast cancer. *Oncotarget* 6(35):37185-37199.
- Stewart MKG, Simek J & Laird DW (2015b) Insights into the role of connexins in mammary gland morphogenesis and function. *Reproduction* 149(6):R279-R290.
- Stock A & Sies H (2000) Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter. *Biological chemistry* 381(9-10):973-979.
- Stock A, Sies H & Stahl W (1998) Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochemical pharmacology* 55(4):475-479.
- Stockholm Convention (POPs listed in the Stockholm Convention.
- Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H & Foisner R (2001) E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 154(6):1185-1196.
- Stoker TE, Laws SC, Crofton KM, Hedge JM, Ferrell JM & Cooper RL (2004) Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicol Sci* 78(1):144-155.
- Strbak V, Alexandrova M, Macho L & Ponec J (1980) Transport of 3H-TRH from plasma to rat milk: accumulation and slow degradation in milk and presence of unaltered hormone in gastric content of pups. *Biol Neonate* 37(5-6):313-321.

- Strbak V, Macho L, Alexandrova M & Ponec J (1983) TRH transport to rat milk. *Endocrinologia experimentalis* 17(3-4):343-350.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang JM, Yao PP & Zhu HP (2017) Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences* 13(11):1387-1397.
- Suvorov A, Shershebnev A, Wu H, Medvedeva Y, Sergeev O & Pilsner JR (2018) Perinatal exposure to low dose 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters sperm DNA methylation in adult rats. *Reprod Toxicol* 75:136-143.
- Szabo DT, Richardson VM, Ross DG, Diliberto JJ, Kodavanti PR & Birnbaum LS (2009) Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups. *Toxicol Sci* 107(1):27-39.
- Ta TA, Koenig CM, Golub MS, Pessah IN, Qi L, Aronov PA & Berman RF (2011) Bioaccumulation and behavioral effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in perinatally exposed mice. *Neurotoxicol Teratol* 33(3):393-404.
- Tabb MM & Blumberg B (2006) New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* 20(3):475-482.
- Talhok RS, Eible RC, Bassam R, Daher M, Sfeir A, Mosleh LA, El-Khoury H, Hamoui S, Pauli BU & El-Sabban ME (2005) Developmental expression patterns and regulation of connexins in the mouse mammary gland: expression of connexin30 in lactogenesis. *Cell and tissue research* 319(1):49-59.
- Talhok RS, Fares MB, Rahme GJ, Hariri HH, Rayess T, Dbouk HA, Bazzoun D, Al-Labban D & El-Sabban ME (2013) Context dependent reversion of tumor phenotype by connexin-43 expression in MDA-MB231 cells and MCF-7 cells: role of beta-catenin/connexin43 association. *Experimental cell research* 319(20):3065-3080.
- Talhok RS, Mroue R, Mokalled M, Abi-Mosleh L, Nehme R, Ismail A, Khalil A, Zaatari M & El-Sabban ME (2008) Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Experimental cell research* 314(18):3275-3291.
- Talsness CE, Kuriyama SN, Sterner-Kock A, Schnitker P, Grande SW, Shakibaei M, Andrade A, Grote K & Chahoud I (2008) In utero and lactational exposures to low doses of polybrominated diphenyl ether-47 alter the reproductive system and thyroid gland of female rat offspring. *Environmental health perspectives* 116(3):308-314.
- Tang J & Zhai JX (2017) Distribution of polybrominated diphenyl ethers in breast milk, cord blood and placentas: a systematic review. *Environmental science and pollution research international* 24(27):21548-21573.
- Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D & Dulin NO (2006) Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 281(15):9971-9976.
- Teissedre B, Pinderhughes A, Incassati A, Hatsell SJ, Hiremath M & Cowin P (2009) MMTV-Wnt1 and -Delta N89 beta-Catenin Induce Canonical Signaling in Distinct Progenitors and Differentially Activate Hedgehog Signaling within Mammary Tumors. *PLoS one* 4(2).
- Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A & Krenacs T (2014) Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26,

- Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PloS one* 9(11):e112541.
- Tepera SB, McCrea PD & Rosen JM (2003a) A beta-catenin survival signal is required for normal lobular development in the mammary gland. *Journal of cell science* 116(Pt 6):1137-1149.
- Tepera SB, McCrea PD & Rosen JM (2003b) A beta-catenin survival signal is required for normal lobular development in the mammary gland. *Journal of cell science* 116(6):1137-1149.
- Teuliere J, Faraldo MM, Deugnier MA, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Thiery JP & Glukhova MA (2005) Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* 132(2):267-277.
- Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA & Fuchs E (2004) Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2):552-557.
- Tinwell H & Ashby J (2004) Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environmental health perspectives* 112(5):575-582.
- Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K & Schaff Z (2005) Claudin-1,-3 and-4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Research* 7(2):R296-R305.
- Tominaga T, Negishi T, Hirooka H, Miyachi A, Inoue A, Hayasaka I & Yoshikawa Y (2006) Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology* 226(2-3):208-217.
- Toms LM, Hearn L, Kennedy K, Harden F, Bartkow M, Temme C & Mueller JF (2009a) Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in matched samples of human milk, dust and indoor air. *Environment international* 35(6):864-869.
- Toms LM, Sjodin A, Harden F, Hobson P, Jones R, Edenfield E & Mueller JF (2009b) Serum polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels are higher in children (2-5 years of age) than in infants and adults. *Environmental health perspectives* 117(9):1461-1465.
- Torrance CJ, Devente JE, Jones JP & Dohm GL (1997) Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrinology* 138(3):1204-1214.
- Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M & Hori M (2001) c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 276(3):1780-1788.
- Traub O, Look J, Dermietzel R, Brummer F, Hulser D & Willecke K (1989) Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* 108(3):1039-1051.
- Traurig HH (1967) A radioautographic study of cell proliferation in the mammary gland of the pregnant mouse. *Anat Rec* 159(2):239-247.
- Trichopoulos D (1990) Hypothesis - Does Breast-Cancer Originate Inutero. *Lancet* 335(8695):939-940.
- Troisi R, Bjorge T, Gissler M, Grotmol T, Kitahara CM, Myrtveit Saether SM, Ording AG, Skold C, Sorensen HT, Trabert B & Glimelius I (2018) The role of pregnancy, perinatal factors and hormones in maternal cancer risk: a review of the evidence. *J Intern Med* 283(5):430-445.

- Tsang H, Cheung TY, Kodithuwakku SP, Chai J, Yeung WS, Wong CK & Lee KF (2013) Perfluorooctanoate suppresses spheroid attachment on endometrial epithelial cells through peroxisome proliferator-activated receptor alpha and down-regulation of Wnt signaling. *Reprod Toxicol* 42:164-171.
- Tung EW, Yan H, Lefevre PL, Berger RG, Rawn DF, Gaertner DW, Kawata A, Rigden M, Robaire B, Hales BF & Wade MG (2016) Gestational and Early Postnatal Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants: General Toxicity and Skeletal Variations. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 107(3):157-168.
- Tung EWY, Kawata A, Rigden M, Bowers WJ, Caldwell D, Holloway AC, Robaire B, Hales BF & Wade MG (2017) Gestational and Lactational Exposure to an Environmentally-Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants: Effects on Neurodevelopment and Metabolism. *Birth defects research* 109(7):497-512.
- United States Environmental Protection Agency (Overview of In Utero through Lactational Assay as an Alternative Screening Assay in the EDSP Tier-1 Battery)
- United States Fire Administration (U.S. fire statistics.)
- Vagi SJ, Azziz-Baumgartner E, Sjodin A, Calafat AM, Dumesic D, Gonzalez L, Kato K, Silva MJ, Ye X & Azziz R (2014) Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol A in polycystic ovary syndrome: a case-control study. *BMC Endocr Disord* 14:86.
- Van der Ven LT, van de Kuil T, Leonards PE, Slob W, Canton RF, Germer S, Visser TJ, Litens S, Hakansson H, Schrenk D, van den Berg M, Piersma AH, Vos JG & Opperhuizen A (2008) A 28-day oral dose toxicity study in Wistar rats enhanced to detect endocrine effects of decabromodiphenyl ether (decaBDE). *Toxicol Lett* 179(1):6-14.
- van der Ven LT, van de Kuil T, Leonards PE, Slob W, Lilienthal H, Litens S, Herlin M, Hakansson H, Canton RF, van den Berg M, Visser TJ, van Loveren H, Vos JG & Piersma AH (2009) Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicol Lett* 185(1):51-62.
- van der Ven LT, Verhoef A, van de Kuil T, Slob W, Leonards PE, Visser TJ, Hamers T, Herlin M, Hakansson H, Olausson H, Piersma AH & Vos JG (2006) A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicol Sci* 94(2):281-292.
- Vandenberg LN (2014) Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm* 94:129-165.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT & Myers JP (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33(3):378-455.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N & Welshons WV (2007a) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24(2):139-177.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS & Soto AM (2008) Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 26(3-4):210-219.

- Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS & Soto AM (2007b) Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148(1):116-127.
- Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C & Soto AM (2006) The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 101(4-5):263-274.
- Vandenbergh JG (1976) Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. *J Reprod Fertil* 46(2):451-453.
- Varas SM, Munoz EM, Hapon MB, Aguilera Merlo CI, Gimenez MS & Jahn GA (2002) Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. *Reproduction* 124(5):691-702.
- Veltmaat JM, Mailleux AA, Thiery JP & Bellusci S (2003) Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation; research in biological diversity* 71(1):1-17.
- Viberg H & Eriksson P (2011) Differences in neonatal neurotoxicity of brominated flame retardants, PBDE 99 and TBBPA, in mice. *Toxicology* 289(1):59-65.
- Vigouroux E, Rostaqui N & Fenerole JM (1980) Estimation of hormonal and non-hormonal iodine uptake from maternal milk in suckling rats. *Acta endocrinologica* 93(3):332-338.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S & Welshons WV (1997) Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(5):2056-2061.
- Vonderhaar BK & Greco AE (1979) Lobulo-Alveolar Development of Mouse Mammary-Glands Is Regulated by Thyroid-Hormones. *Endocrinology* 104(2):409-418.
- Vonderhaar BK & Greco AE (1982) Effect of thyroid status on development of spontaneous mammary tumors in primiparous C3H mice. *Cancer research* 42(11):4553-4561.
- Vonderhaar BK, Tang E, Lyster RR & Nascimento MC (1986) Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands. *Endocrinology* 119(2):580-585.
- Vuong AM, Braun JM, Webster GM, Thomas Zoeller R, Hoofnagle AN, Sjodin A, Yolton K, Lanphear BP & Chen A (2018) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) exposures and thyroid hormones in children at age 3years. *Environment international* 117:339-347.
- Wagner MS, Wajner SM & Maia AL (2008) The role of thyroid hormone in testicular development and function. *The Journal of endocrinology* 199(3):351-365.
- Wainman BC, Kesner JS, Martin ID, Meadows JW, Krieg EF, Jr., Nieboer E & Tsuji LJ (2016) Menstrual cycle perturbation by organohalogenes and elements in the Cree of James Bay, Canada. *Chemosphere* 149:190-201.
- Wallen K (2009) The Organizational Hypothesis: Reflections on the 50th anniversary of the publication of Phoenix, Goy, Gerall, and Young (1959). *Hormones and behavior* 55(5):561-565.
- Wan Y, Choi K, Kim S, Ji K, Chang H, Wiseman S, Jones PD, Khim JS, Park S, Park J, Lam MH & Giesy JP (2010) Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in

- pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks. *Environ Sci Technol* 44(13):5233-5239.
- Wang F, Liu W, Jin Y, Dai J, Zhao H, Xie Q, Liu X, Yu W & Ma J (2011) Interaction of PFOS and BDE-47 co-exposure on thyroid hormone levels and TH-related gene and protein expression in developing rat brains. *Toxicol Sci* 121(2):279-291.
- Wang J, Li J & Shi Z (2020) Dietary exposure assessment of a nursing mother-infant cohort to legacy and novel brominated flame retardants: Results of a 3-day duplicate diet study in Beijing, China. *Chemosphere* 254:126843.
- Wang MH, Wu XJ, Chai F, Zhang Y & Jiang J (2016) Plasma prolactin and breast cancer risk: a meta-analysis. *Scientific reports* 6.
- Wang N, De Bock M, Decrock E, Bol M, Gadicherla A, Vinken M, Rogiers V, Bukauskas FF, Bultynck G & Leybaert L (2013) Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochimica et biophysica acta* 1828(1):35-50.
- Wang ZY, Lu J, Zhang YZ, Zhang M, Liu T & Qu XL (2015) Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo. *International journal of clinical and experimental pathology* 8(11):14355-14364.
- Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W & Lau AF (1996) Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *The Journal of biological chemistry* 271(7):3779-3786.
- Watson CJ (2006) Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast cancer research : BCR* 8(2):203.
- Watson CJ & Kreuzaler PA (2011) Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol* 55(7-9):757-762.
- Welshons WV, Nagel SC & vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147(6):S56-S69.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM & vom Saal FS (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental health perspectives* 111(8):994-1006.
- Wemken N, Drage DS, Cellarius C, Cleere K, Morrison JJ, Daly S, Abdallah MA, Tlustos C, Harrad S & Coggins MA (2020) Emerging and legacy brominated flame retardants in the breast milk of first time Irish mothers suggest positive response to restrictions on use of HBCDD and Penta- and Octa-BDE formulations. *Environmental research* 180:108805.
- Wideroff L, Vadaparampil ST, Greene MH, Taplin S, Olson L & Freedman AN (2005) Hereditary breast/ovarian and colorectal cancer genetics knowledge in a national sample of US physicians. *Journal of medical genetics* 42(10):749-755.
- Wilford BH, Shoeib M, Harner T, Zhu J & Jones KC (2005) Polybrominated diphenyl ethers in indoor dust in Ottawa, Canada: implications for sources and exposure. *Environ Sci Technol* 39(18):7027-7035.
- Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K & Traub O (1992) Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *International journal of cancer* 51(4):522-529.

- Williams JM & Daniel CW (1983) Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Developmental biology* 97(2):274-290.
- Windham GC, Pinney SM, Voss RW, Sjodin A, Biro FM, Greenspan LC, Stewart S, Hiatt RA & Kushi LH (2015) Brominated Flame Retardants and Other Persistent Organohalogenated Compounds in Relation to Timing of Puberty in a Longitudinal Study of Girls. *Environmental health perspectives* 123(10):1046-1052.
- Winterhager E, Stutenkemper R, Traub O, Beyer E & Willecke K (1991) Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term. *European journal of cell biology* 55(1):133-142.
- Witorsch RJ (2002) Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 40(7):905-912.
- Wu JC, Tsai RY & Chung TH (2003) Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 88(4):823-835.
- Wysolmerski JJ, Philbrick WM, Dunbar ME, Lanske B, Kronenberg H & Broadus AE (1998) Rescue of the parathyroid hormone-related protein knockout mouse demonstrates that parathyroid hormone-related protein is essential for mammary gland development. *Development* 125(7):1285-1294.
- Xin F, Susiarjo M & Bartolomei MS (2015) Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Seminars in cell & developmental biology* 43:66-75.
- Xu P, Lou X, Ding G, Shen H, Wu L, Chen Z, Han J, Han G & Wang X (2014) Association of PCB, PBDE and PCDD/F body burdens with hormone levels for children in an e-waste dismantling area of Zhejiang Province, China. *The Science of the total environment* 499:55-61.
- Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, Thomas MP, Radice GL & Lo CW (2001) Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J Cell Biol* 154(1):217-230.
- Yamada-Okabe T, Sakai H, Kashima Y & Yamada-Okabe H (2005) Modulation at a cellular level of the thyroid hormone receptor-mediated gene expression by 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD), 4,4'-diiodobiphenyl (DIB), and nitrofen (NIP). *Toxicology Letters* 155(1):127-133.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI & Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123(5):889-901.
- Yang L, Luo L, Ji W, Gong C, Wu D, Huang H, Liu Q, Xia B, Hu G, Zhang W, Zhang Q, Liu J, Zhang W & Zhuang Z (2013) Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. *Toxicol Lett* 218(3):187-193.
- Yang SZ, Kohno N, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H & Hiwada K (2001) Decreased E-cadherin augments beta-catenin nuclear localization: studies in breast cancer cell lines. *International journal of oncology* 18(3):541-548.
- Yoshida R, Kimura N, Harada Y & Ohuchi N (2001) The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *International journal of oncology* 18(3):513-520.

- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D & Moon RT (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & development* 10(12):1443-1454.
- Younis LK, El Sakka H & Haque I (2007) The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *Int J Health Sci (Qassim)* 1(1):43-51.
- Zhang H, Li X, Nie J & Niu Q (2013a) Lactation exposure to BDE-153 damages learning and memory, disrupts spontaneous behavior and induces hippocampus neuron death in adult rats. *Brain research* 1517:44-56.
- Zhang J, Chen L, Xiao L, Ouyang F, Zhang QY & Luo ZC (2017) Polybrominated Diphenyl Ether Concentrations in Human Breast Milk Specimens Worldwide. *Epidemiology* 28 Suppl 1:S89-S97.
- Zhang Q, Wu S, Liu L, Hou X, Jiang J, Wei X & Hao W (2019) Effects of bisphenol A on gap junctions in HaCaT cells as mediated by the estrogen receptor pathway. *J Appl Toxicol* 39(2):271-281.
- Zhang S, Bursian SJ, Martin PA, Chan HM, Tomy G, Palace VP, Mayne GJ & Martin JW (2009) Reproductive and developmental toxicity of a pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, to ranch mink (*Mustela vison*) and hazard assessment for wild mink in the Great Lakes region. *Toxicol Sci* 110(1):107-116.
- Zhang YH, Lin L, Liu ZW, Jiang XZ & Chen BH (2008) Disruption effects of monophthalate exposures on inter-Sertoli tight junction in a two-compartment culture model. *Environmental toxicology* 23(3):302-308.
- Zhang Z, Sun ZZ, Xiao X, Zhou S, Wang XC, Gu J, Qiu LL, Zhang XH, Xu Q, Zhen B, Wang X & Wang SL (2013b) Mechanism of BDE209-induced impaired glucose homeostasis based on gene microarray analysis of adult rat liver. *Arch Toxicol* 87(8):1557-1567.
- Zhao W, Cheng J, Gu J, Liu Y, Fujimura M & Wang W (2014) Assessment of neurotoxic effects and brain region distribution in rat offspring prenatally co-exposed to low doses of BDE-99 and methylmercury. *Chemosphere* 112:170-176.
- Zhao Y, Liu P, Wang J, Xiao X, Meng X & Zhang Y (2016) Umbilical cord blood PBDEs concentrations are associated with placental DNA methylation. *Environment international* 97:1-6.
- Zhao Y, Ruan X, Li Y, Yan M & Qin Z (2013) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in aborted human fetuses and placental transfer during the first trimester of pregnancy. *Environ Sci Technol* 47(11):5939-5946.
- Zheng Y, Zhou C, Yu XX, Wu C, Jia HL, Gao XM, Yang JM, Wang CQ, Luo Q, Zhu Y, Zhang Y, Wei JW, Sheng YY, Dong QZ & Qin LX (2018) Osteopontin promotes metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma through recruiting MAPK1 and mediating Ser675 phosphorylation of beta-Catenin. *Cell death & disease* 9(2):179.
- Zhou L, Kasperek EM & Nicholson BJ (1999) Dissection of the molecular basis of pp60(v-src) induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J Cell Biol* 144(5):1033-1045.
- Zhou T, Ross DG, DeVito MJ & Crofton KM (2001) Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicol Sci* 61(1):76-82.
- Zhou T, Taylor MM, DeVito MJ & Crofton KM (2002) Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol Sci* 66(1):105-116.

- Zhu G, Wang Y, Huang B, Liang J, Ding Y, Xu A & Wu W (2012) A Rac1/PAK1 cascade controls beta-catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* 31(8):1001-1012.
- Ziska SE, Bhattacharjee M, Herber RL, Qasba PK & Vonderhaar BK (1988) Thyroid hormone regulation of alpha-lactalbumin: differential glycosylation and messenger ribonucleic acid synthesis in mouse mammary glands. *Endocrinology* 123(5):2242-2248.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ & Vom Saal FS (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153(9):4097-4110.
- Zota AR, Linderholm L, Park JS, Petreas M, Guo T, Privalsky ML, Zoeller RT & Woodruff TJ (2013) Temporal comparison of PBDEs, OH-PBDEs, PCBs, and OH-PCBs in the serum of second trimester pregnant women recruited from San Francisco General Hospital, California. *Environ Sci Technol* 47(20):11776-11784.
- Zota AR, Park JS, Wang Y, Petreas M, Zoeller RT & Woodruff TJ (2011) Polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated polybrominated diphenyl ethers, and measures of thyroid function in second trimester pregnant women in California. *Environ Sci Technol* 45(18):7896-7905.
- Zuurbier M, Leijds M, Schoeters G, ten Tusscher G & Koppe JG (2006) Children's exposure to polybrominated diphenyl ethers. *Acta Paediatr Suppl* 95(453):65-70.

10 ANNEXE I

10.1 Principaux signaux locaux impliqués dans la morphogenèse des glandes mammaires *in utero* et chez les femelles vierges

Tableau 10-1 : Récapitulatif des principaux marqueurs impliqués dans la morphogenèse mammaire *in utero* et chez les femelles vierges

| Période développementale caractérisée | Signal local | Compartiment de sécrétion | Compartiment d'action | Effet sur le développement |
|---------------------------------------|--|---------------------------|-----------------------|--|
| <i>In utero</i> | Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrp) | Épithélium embryonnaire | Mésenchyme | Spécification des bourgeons mammaires en canaux Formation des mamelons |
| Puberté | Amphiréguline (Areg) | Épithélium | Stroma | Remodelage des glandes mammaires à la puberté Stimule la morphogenèse ER α -dépendante |
| Puberté | Facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) | Stroma | | Élongation des canaux Guidage et progression des TEB dans le stroma |
| Puberté | Facteurs de croissance transformant β (TGF β) | Matrice extracellulaire | Vérif | Régulation du développement des canaux et de la progression des TEB dans le stroma |

Chaque étape du développement mammaire nécessite l'implication de signaux locaux issus d'interactions au sein de l'épithélium, du stroma et entre ces deux compartiments (Sternlicht *et al.*, 2006b). D'après (Cowin & Wysolmerski, 2010; Dunbar & Wysolmerski, 1999; Foley *et al.*, 2001; Hiremath & Wysolmerski, 2013; Macias & Hinck, 2012; Paine & Lewis, 2017; Wysolmerski *et al.*, 1998).

10.2 Effets de l'exposition *in utero* et lactationnelle sur les marqueurs du développement, des jonctions et de l'homéostasie cellulaire chez les ratons à l'âge adulte

10.2.1 Toxicité générale

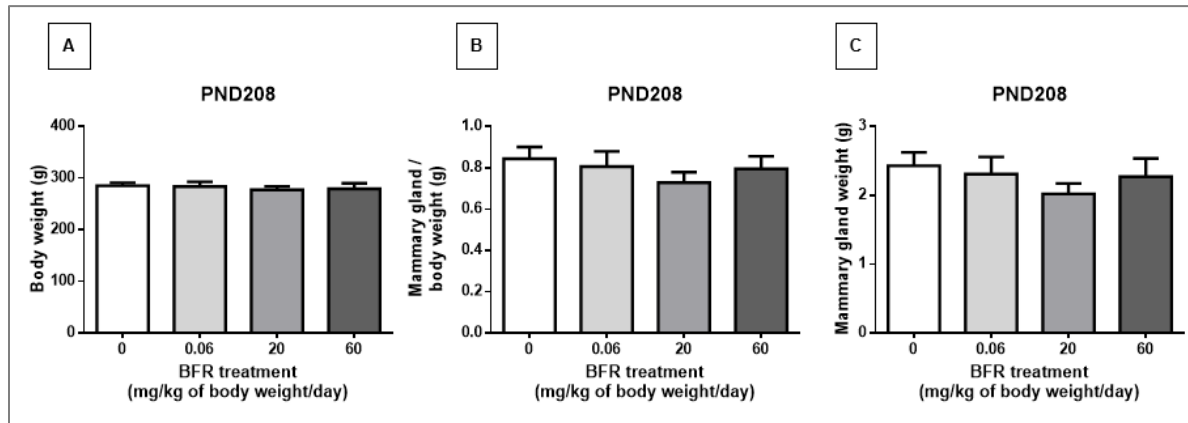


Figure 10-1 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur la toxicité générale à PND 208

Analyses from control pups or pups exposed during gestation and lactation with a diet formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Total body weight was measured at time of sacrifice (A). The mammary gland weight (C) was normalized to the total body weight (B). Histograms represent the mean \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter).

10.2.2 Développement macroscopique

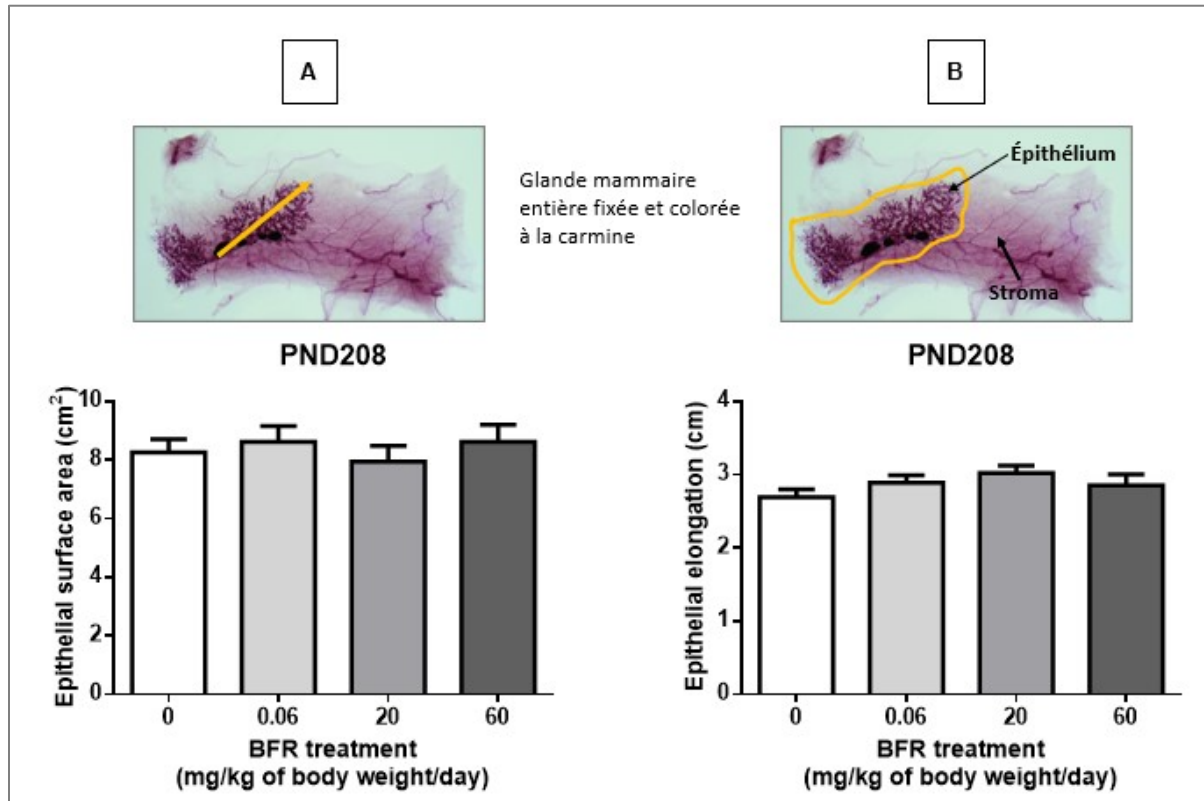


Figure 10-2 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur la surface et l'élongation épithéliale à PND 208

Whole mounts of mammary glands were analyzed with Image J software. Mammary epithelium elongation or surface area were quantified from control pups or pups exposed during gestation and lactation to a dietary BFR mixture intended to deliver nominal BFR mixture dose of 0.06, 20, or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Elongation was measured from the lowest lymph node to the end of the longest branch of the epithelium (A). Surface area was measured by tracing the best-adjusted contour of the mammary epithelium (B). Histograms represent the mean \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter).

10.2.3 Jonctions adhérentes

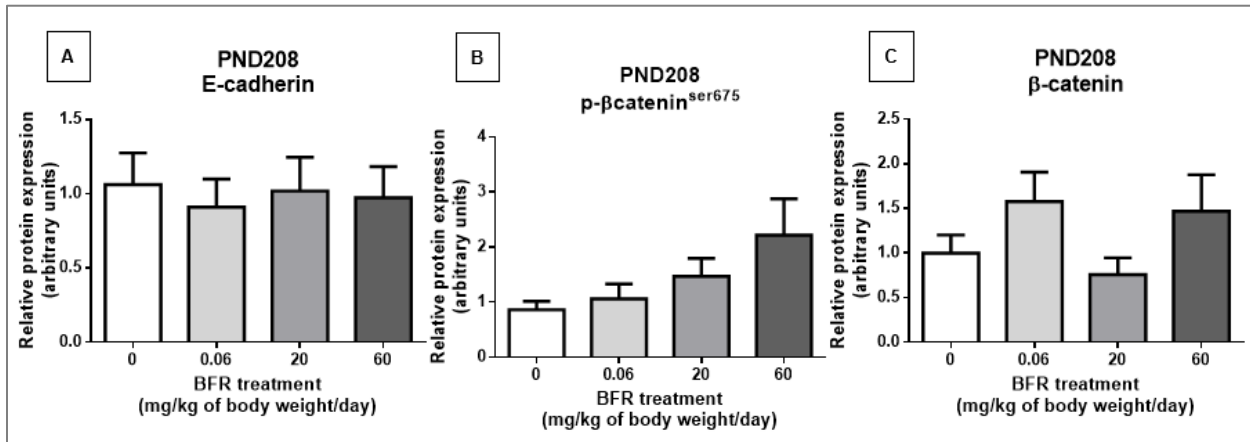


Figure 10-3 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur les protéines des jonctions adhérentes à PND 208

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation with a diet formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show E-cadherin (A), β-catenin (C) and p-β-cateninSer675 (B). Histograms represent the means ± SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level.

10.2.4 Jonctions communicantes

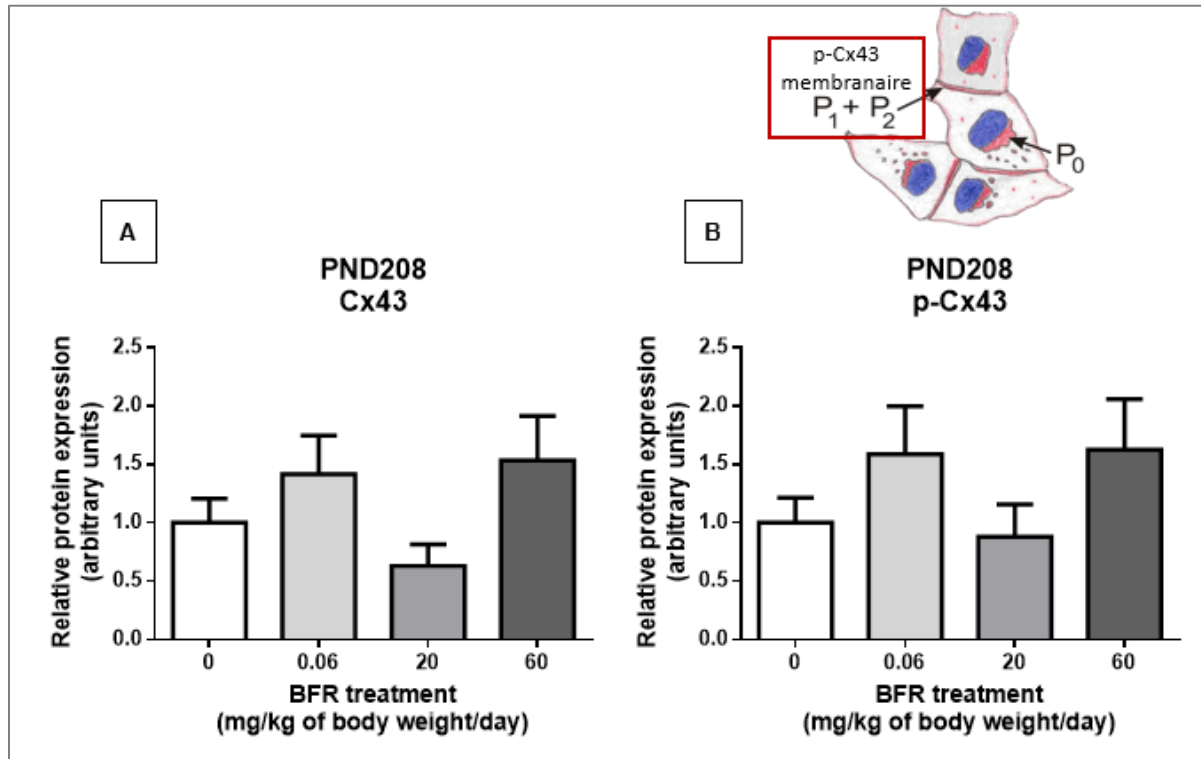


Figure 10-4 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur les protéines des jonctions gap à PND 208

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation with a diet formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show Cx43 (A) and p-Cx43 (B). Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level.

10.2.5 Récepteur aux hormones thyroïdiennes

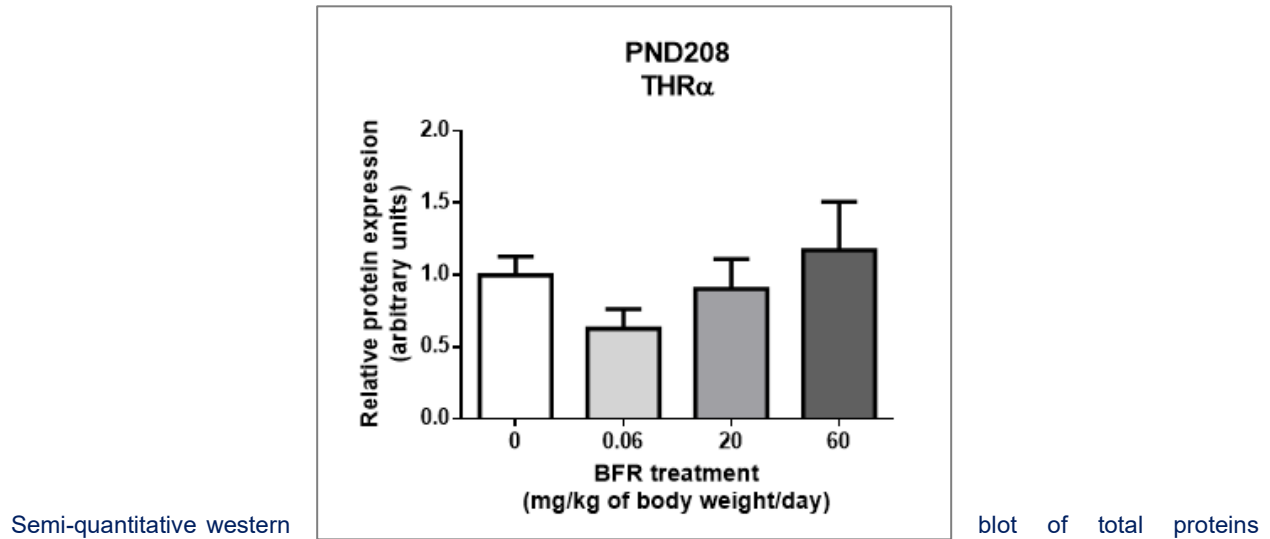


Figure 10-5 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur l'expression du récepteur alpha1 aux hormones thyroïdiennes à PND 208

extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation with a diet formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show THR α 1. Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level.

10.2.6 Prolifération et apoptose

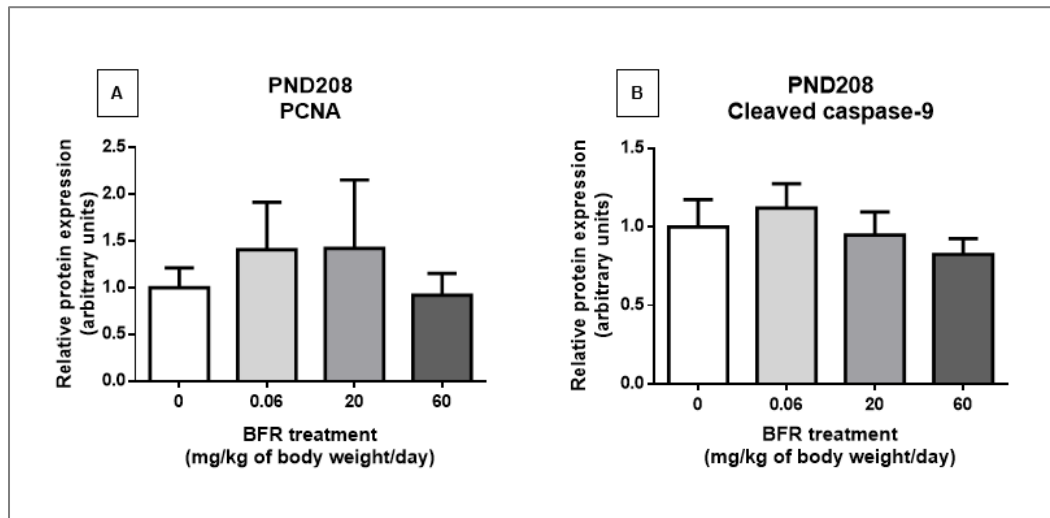


Figure 10-6 : Effets de l'exposition au mélange de BFR sur les marqueurs de la prolifération cellulaire et de l'apoptose à PND 208

Semi-quantitative western blot of total proteins extracted from the mammary glands of control pups or pups exposed during gestation and lactation with a diet formulated to deliver daily nominal BFR mixture doses of 0.06, 20 or 60 mg/kg of body weight/day (mg/kg/day). Graphs show PCNA (A) and Cleaved caspase-9 (B). Histograms represent the means \pm SEM (n=9-14 pups, one per litter) for each band normalized to the total protein level.

11 ANNEXE II : Revue

Environmental exposure to brominated flame retardants: unravelling intricate effects on mammary glands and potential concern for breast carcinogenesis

Exposition environnementale aux retardateurs de flammes bromés : Comprendre les effets complexes sur le développement des glandes mammaires et leur potentielle implication dans le cancer du sein

Auteurs :

Rita-Josiane Gouesse¹ and Isabelle Plante¹

1) INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada

Version préliminaire

Contribution des auteurs :

- Rita-Josiane Gouesse : 70%, recherche bibliographique et rédaction de la majeure partie du manuscrit.
- Isabelle Plante : 30%, Supervision, assistance à la conception et rédaction de quelques sections du manuscrit. Correction du manuscrit.

Lien entre l'article ou les articles précédents et le suivant :

Plusieurs indications de la littérature montrent que l'exposition aux BFR impacte le système endocrinien et reproductif chez l'humain et chez les modèles expérimentaux. Cependant, très peu d'études ont investigué les effets des BFR sur les glandes mammaires. Cette revue a pour but de rapporter les données de la littérature, incluant celles de notre laboratoire, portant sur les effets des BFR sur les glandes mammaires avec une attention particulière chez les femelles.

In fine, nous (1) proposons des mécanismes potentiellement impliqués dans les effets des BFR sur les glandes mammaires en intégrant leurs effets sur les systèmes endocriniens et reproductifs et (2) discutons des possibles effets de l'exposition aux BFR sur la santé mammaire et leur potentielle implication dans le cancer du sein.

Abstract

Brominated flame retardants (BFR) are molecules added to consumer products to reduce fire hazard. They were banned in North America and Europe because of their persistency and biomagnification. However, BFR are still released in the environment due to current use of existing products manufactured before restriction, and to waste stream processes.

BFR are well characterized endocrine disruptors. They have been associated to a wide range of alterations in endocrine and reproductive systems both in human and experimental models *in vivo* and *in vitro*. Paradoxically, the effects of BFR on mammary glands whose development and carcinogenesis are mainly under hormonal dependency are poorly known.

Thus, this review aimed to (1) report and discuss the studies investigating the effects of BFR on mammary gland development; (2) summarize the well-known evidences of BFR-induced disruption of endocrine and reproductive systems with a special focus in female; (3) propose potential mechanisms for the effects of BFR in the mammary gland with a holistic approach that integrates their adverse effects in endocrine and reproductive systems, and (4) discuss the potential concerns associated to BFR exposure on mammary gland proper development and carcinogenesis.

Key words: brominated flame retardants, endocrine disruptors, endocrine and reproductive systems, mammary gland development, breast cancer

11.1 Brominated flame retardants: the five W's

Fire retardants are molecules added to combustible materials such as foam, plastics, textiles, and woods, among others, to reduce fire hazard and meet safety standards (Alaee *et al.*, 2003). Brominated flame retardants (BFR) represent a varied group of fire retardants that have a bromine in their structure (Alaee *et al.*, 2003). The three major BFR are tetrabromobisphenol A (TBBPA), hexabromocyclododecane (HBCDD), and the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). PBDEs are a large family of 209 compounds that contains a common diphenyl ether core but differs in the degree of bromination (Rahman *et al.*, 2001). In the market, PBDEs are available in mixtures of several congeners that are blend in commercial formulations (Alaee *et al.*, 2003) Decabromodiphenyl ether (DecaBDE), octabromodiphenyl ether (OctaBDE), and pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) represent the major commercial mixtures of PBDEs (Birnbaum & Staskal, 2004a). They were mainly used in polyurethane furniture foams, carpet underlay and epoxy resins in electrical and electronic equipment (Janssen, 2005).

BFR are either bound to the matrix as reactive mixtures or dissolved in the polymer materials as additives. PBDEs and HBCDD are additive flame retardants while TBBPA is mostly used as reactive (Eljarrat *et al.*, 2011). Because they are non-covalently bound to the polymers, the additive PBDEs and HBCDD are easily susceptible to leach out from the products to the environment (Besis & Samara, 2012). BFR are lipophilic molecules that bioaccumulate and in most cases persist in the environment (Segev *et al.*, 2009). They are found in air, water, soil, sediment and accumulate in living organisms, both in industrial and isolated areas such as the arctic (Birnbaum & Staskal, 2004a; Darnerud, 2003). Accordingly, PBDEs and HBCDD have been classified as persistent organic pollutants, they have been restricted for use, sale, offer for sale, and import in Europe and North America (Environment and Climate Change Canada, 2013; Environment Canada, 2008) and they were identified for global removal by the Stockholm Convention. As TBBPA is nonpersistent and not biomagnified, screening assessment has concluded that it represents a low risk of harm to organisms and the environment (Environnement Canada, 2013). Although PBDEs and HBCDD have been legislated several years ago, uses of existing products and their recycling and waste stream processing remain current and future sources of chronic environmental release of BFR and of human exposure (Janssen, 2005; Shaw *et al.*, 2010; Sjodin *et al.*, 2003).

Non-occupationally related human exposure to BFR is more likely to occur in indoor areas (Butt *et al.*, 2004; Janssen, 2005; Wilford *et al.*, 2005), as demonstrated by greater concentration of PBDEs in indoor samples rather than outdoor ones (Butt *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2005;

Wilford *et al.*, 2005). Exposure to BFR occurs mostly through ingestion and inhalation of house dust but also through food consumption (Allen *et al.*, 2006; Bocio *et al.*, 2003; Schechter *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2005). BFR are detected in several human tissue such as serum, adipose tissue, placenta, umbilical cord, and breast milk (Jakobsson *et al.*, 2012; Johnson-Restrepo *et al.*, 2005; Mazdai *et al.*, 2003; Morland *et al.*, 2005; Schechter *et al.*, 2010; Schechter *et al.*, 2003; She *et al.*, 2002; Sjodin *et al.*, 2004; Toms *et al.*, 2009a; Toms *et al.*, 2009b; Zota *et al.*, 2013). Toddlers represent the most exposed population primarily due to indirect contamination *in utero* and through breast milk (Chen *et al.*, 2014; Frederiksen *et al.*, 2010b; Herbstman *et al.*, 2007; Leonetti *et al.*, 2016; Schechter *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2013), but also because of their closer proximity to the ground and because they are easily prone to hand-to-mouth contact (Jones-Otazo *et al.*, 2005b; Stapleton *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2005; Toms *et al.*, 2009b).

During the last decade, overall weight of evidence has raised concerns about the potential of PBDEs, TBBPA and HBCDD to be associated with, or to elicit, diverse adverse health effects in humans and in experimental models. Most of the studies focused on the effects of exposure to PBDEs and to a lesser extent to HBCDD and TBPPA, and have reported alteration in endocrine, neurodevelopmental, reproductive, and developmental systems, with data subjected to many good reviews (Alaee *et al.*, 2003; Darnerud *et al.*, 2001; Eljarrat *et al.*, 2011; Janssen, 2005; Shaw *et al.*, 2010; Sjodin *et al.*, 2003). However, only a limited number of studies have analyzed the potential of BFR to affect the mammary gland, whose function, development, and carcinogenesis is highly regulated by ovarian and other systemic hormones (Brisken & Ataca, 2015; Dianati *et al.*, 2017; Gouesse *et al.*, 2019; Kodavanti *et al.*, 2010b). Thus, this work aims to propose a comprehensive summary of data reporting the effects of persistent BFR, PBDEs and HBCDD exposure on female endocrine and reproductive system and mammary gland development and function. Furthermore, we aim to propose mechanisms for BFR's action and potential implication in breast developmental abnormalities and carcinogenesis.

11.2 Effects of exposure to PBDEs and HBCDD on female endocrine and reproductive systems: state-of-the-art

11.2.1 Effects on development and homeostasis of thyroid and ovarian hormones

1.1.1.23 Human

1.1.1.1.3 PBDEs

Though being more limited than research reporting the effects of BFR on males, several studies have analyzed the relationship between circulating hormones levels and concentrations of PBDEs in various tissues in women. In a population of women (n=1378-1413) from the National Health and Examination Survey (NHANES 2003-2004), higher serum concentrations of BDEs 47, 99, and 100 were associated to increased probabilities of having thyroid disease (Allen *et al.*, 2016). The risks were greater in post-menopausal women, thus suggesting that low estrogens levels during menopause could enhance the negative impact of PBDEs on thyroid hormone signaling (Allen *et al.*, 2016). Similarly, elevated plasma levels of BDE-100 and of all PBDEs were associated with an increased prevalence of hypothyroidism among Canadian women aged 30-50 years (Oulhote *et al.*, 2016).

Studies have demonstrated that pregnant women exposed to PBDEs showed dysregulation of thyroid hormone homeostasis. Different effects were observed, depending on the stage of gestation. For instance, exposure to PBDEs was associated with lower levels of thyroid stimulating hormone (TSH) during the 2nd trimester, while no association was observed when analysing free or total T4 in pregnant (Chevrier *et al.*, 2010). This study also found that women with highest levels of PBDEs had significantly increased odds of subclinical hyperthyroidism (low TSH and normal free T4) compared to women with lowest PBDEs levels (Chevrier *et al.*, 2010). On the opposite, a study on early 2nd trimester pregnant women reported a positive association between TSH and serum concentrations of lower-brominated PBDE congeners, individual hydroxylated PBDE metabolites (OH-PBDEs) and their sum, while finding a negative association with BDE-207 (Zota *et al.*, 2011). In late pregnancy, analysis showed that serum levels of BDE-47, -99, and -100 were significantly positively associated with both free and total T4 in a cohort of 137 North-Carolina women, predominantly during the 3rd trimester of pregnancy (Stapleton *et al.*, 2011). When analyzing maternal blood collected prior to delivery, studies have found either significant negative associations between PBDEs and free and total T3, and significant positive association with free T4 (Kim *et al.*, 2013), or no association between these endpoints (Mazdai

et al., 2003). Changes in thyroid homeostasis were also observed in a cohort of 260 women in Quebec, where maternal serum concentration of PBDEs, collected at <20 weeks of pregnancy, was significantly negatively associated with T3 and T4 but positively correlated with free T3 and free T4 (Abdelouahab *et al.*, 2013). However, when hormone measurements were undertaken on maternal blood collected at delivery, there was an inverse relationship between maternal free T3 and total T4 and the levels of PBDEs in the serum collected at <20 weeks (Abdelouahab *et al.*, 2013).

Direct exposure of mothers to PBDEs can also reflect on thyroid hormone disruption in the infants. For example, in neonates, lower cord blood levels of free and total T4, but not T3 and TSH was associated to higher PBDEs concentrations found in maternal serum (Abdelouahab *et al.*, 2013). Similar absence of association between serum TSH levels in neonates and concentration of PBDEs in maternal serum was also reported (Chevrier *et al.*, 2011). Other studies analyzing the relationship between PBDEs levels in cord blood and serum levels of thyroid hormones in infants also pointed out that *in utero* exposure to PBDEs can impact development of the endocrine system in offspring (Kim *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2011; Mazdai *et al.*, 2003). Levels of PBDEs in breastmilk, that represents one the main route of exposure to PBDEs for infants, was also found to be either negatively (Kim *et al.*, 2011), or not (Lignell *et al.*, 2016) associated to infants cord blood T4 levels.

In toddlers, a cross-sectional study of 80 young US children (35% females vs 45% males) aged 1-5 reported that serum PBDE congeners (BDE-47, BDE-99, BDE-100) were associated with higher TSH concentrations, a tendency toward decreases of total T4, increased levels of free T3 and subclinical (Low TSH and normal free T4) changes in thyroid hormone (Jacobson *et al.*, 2016). Similar positive relationship between serum total PBDEs levels (Han *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014) or BDE-47 (Kicinski *et al.*, 2012) and TSH were found in children (males and females) aged 4-8 years living in electronic waste area in China (Han *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014), and in Belgium teenagers (boys and girls), respectively. In contrast, repeated serum measurement of thyroid hormones and PBDEs levels in 162 mother-child pairs showed that prenatal exposure to PBDEs was associated with significant decrease in TSH levels in female offspring at 3 years (Vuong *et al.*, 2018).

Altogether, these results demonstrated that PBDEs can alter the thyroid homeostasis in pregnant women, thus affecting the neonates, and children. However, less information is available regarding other endocrine perturbations induced by PBDEs. To our knowledge, only two studies have investigated the relationship between PBDEs and the estrogenic signaling. In both studies,

serum PBDEs were not associated with markers of the estrogenic pathway analyzed by the authors (Karmaus *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2010).

1.1.1.1.4 HBCDD

A very limited number of studies have investigated the relationship between HBCDD concentrations in human tissues and the levels of thyroid hormones, and their results were contradictory. On one hand, no association was observed between HBCDD serum concentration and levels of free T4, T3 and TSH in teenagers in Belgium (Kicinski *et al.*, 2012). On the other hand, higher serum levels of HBCDD were associated with thyroid abnormalities in female and male residents living in a production source of HBCDD (Li *et al.*, 2014). The difference in the age or in levels of exposure between the studied populations could potentially explain this discrepancy.

HBCDD is present in the serum of pregnant women and their infants (Meijer *et al.*, 2008). It is also detected in human breast milk (Ryan & Rawn, 2014; Wemken *et al.*, 2020), resulting in higher daily intake of HBCDD in breastfeed babies (Wang *et al.*, 2020). Here again, there are limited studies analyzing the links between HBCDD and effects on the thyroid signaling in mothers and infants, and the results are contradictory. In a first study, no correlations were observed between levels of HBCDD found in mother's breast milk and the serum levels of TSH in the babies (Eggesbo *et al.*, 2011). In another study, levels of HBCDD were higher in serum of mothers of infants with congenital hypothyroidism, although no differences were observed between HBCDD serum levels in normal infants and the one suffering from hypothyroidism (Kim & Oh, 2014). Similarly, serum levels of TH were not associated with HBCDD concentrations in infants with congenital hypothyroidism (Kim & Oh, 2014), although the authors hypothesized that therapeutic injection of synthetic T4 medication could have interfered with their results (Kim *et al.*, 2012).

11.2.2 Experimental model: *in vivo* and *in vitro*

1.1.1.1.5 PBDEs

Studies in animal models have provided more compelling data on the effects of exposure to PBDEs on endocrine endpoints, especially on T4, T3 and TSH levels. A decrease in serum T4 levels was commonly reported in female rodents following exposure to penta- or Deca-BDE (Driscoll *et al.*, 2009; Fowles *et al.*, 1994; Hallgren *et al.*, 2001; Hoppe & Carey, 2007; Richardson

et al., 2008; Stoker *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002), as well as decreased (Zhou *et al.*, 2001) or increased (Van der Ven *et al.*, 2008) T3 serum levels.

Similarly, in a one-generation study, gestational and lactational exposure to PBDEs resulted in lower maternal levels of serum T4 (Bondy *et al.*, 2013; Chi *et al.*, 2011; Ellis-Hutchings *et al.*, 2006; Kodavanti *et al.*, 2010b; Kuriyama *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011), sometimes associated with decreased T3 levels (Bowers *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). Interestingly, thyroid hormones homeostasis was also impaired in pups exposed to PBDEs during *in utero* life and/or during lactation, as decreased levels of T4 and/or T3 has been found in several studies (Blanco *et al.*, 2013; Bondy *et al.*, 2013; Bowers *et al.*, 2015; Ellis-Hutchings *et al.*, 2006; Kodavanti *et al.*, 2010b; Miller *et al.*, 2012; Poon *et al.*, 2011; Tung *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2002). These studies suggest that the thyroid signaling is one of the main targets of PBDEs following a direct exposure, but also after a developmental exposure.

1.1.1.1.6 HBCDD

Although less studied, HBCDD seems to mainly affect the thyroid signaling. A 28-day exposure to HCBDD resulted in increased weight of the pituitary and thyroid glands, altered histology of the thyroid gland and increased TSH immunostaining in thyrotropic cells in virgin female Wistar rats (van der Ven *et al.*, 2006). The female rats also exhibited decreased levels of free T4, but levels of total T3 were not affected (van der Ven *et al.*, 2006). Altered histology of thyroid gland was also observed in juvenile mice exposed to dietary levels of HBCDD within the LOAEL range (Maranghi *et al.*, 2013).

Similar to PBDEs, the effects of HBCDD can be observed in both dams and pups when exposure occurred during pre-mating, gestational and lactational period. HBCDD triggered both decreases in size of thyroid follicle and increases in serum levels of TSH in F0 and F1 female; but serum T4 levels were decreased only in dams (Ema *et al.*, 2008).

Altogether, these studies demonstrated that for both PBDEs and HBCDD, thyroid homeostasis is a major target.

11.3 Effects on the reproductive system and developmental outcome

1.1.1.24 PBDEs and HBCDD in Human

Only a few studies have assessed the relationship between exposure to PBDEs and reproductive endpoints in women, and, to the best of our knowledge, no study has analyzed the effects of HBCDD in this context. Higher serum PBDEs concentrations were associated with an earlier age at menarche in a cohort of 271 adolescent in United states (Chen *et al.*, 2011). In adult women, disrupted menstrual cycle length was associated with BDE-74 and -153 plasma concentrations in a cohort of 42 Cree First Nations women in Canada (Wainman *et al.*, 2016). Similarly, Chao and collaborators found a positive association between longer menstrual cycle length and serum PBDEs concentration in breast milk. However these findings were questionable because of the small sample size of 46 women (Chao *et al.*, 2010). Greater levels of BDEs 47, 99, 100, 153 in maternal serum of women were associated to decreases in time before pregnancy in one study (Harley *et al.*, 2010), although no association was found in another study using a bigger cohort (Buck Louis *et al.*, 2013). Another study analyzing pathologic reproductive situation such as early pregnancy loss has shown that women exhibiting high levels of BDE-153 in the follicular fluid exhibited increased risks of implantation failure (Johnson *et al.*, 2012). However, no association was found between PBDE serum concentration in women and Polycystic Ovary Syndrome (Vagi *et al.*, 2014). Finally, a few studies have focussed on the effects of current or maternal exposure to PBDEs on reproductive development in offspring. While Leijs *et al.* collaborators did not find any association between current exposure to PBDEs and age at menarche in a small cohort of girls (Leijs *et al.*, 2008), prenatal exposure to high levels of PBDEs were correlated to later age at menarche in a larger population (Harley *et al.*, 2017).

Although more studies are required to confirm these findings and get a better portrait, these data suggest that direct or indirect exposure to PBDEs may impair reproductive development or capacities in the individual and its descendants.

1.1.1.25 Experimental model *in vivo* and *in vitro*

1.1.1.1.7 PBDEs

Most of the studies did not report changes in uterine weight, number of pregnancy, gestation length, successful delivery, litter size, number of alive pups and their sex ratio (Blanco *et al.*, 2013; Bondy *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2009; Koenig *et al.*, 2012; Ta *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014) upon exposure to PBDEs. However, associations between exposure to PBDEs and

altered weight and development of the ovaries, and disruption of steroidogenesis and folliculogenesis were reported in adult females (Lefevre *et al.*, 2016a).

In contrast, in the pups exposed to PBDEs *in utero* and/or through lactation or during early postnatal life (Lilienthal *et al.*, 2006; Stoker *et al.*, 2004; Talsness *et al.*, 2008), but also in those exposed to a dietary mixture of PBDEs and HBCDD (Allais *et al.*, 2020) *in utero* and during lactation, dysregulation of reproductive development was more frequently reported. Specifically, the BFR exposure reflects in either delayed (Lilienthal *et al.*, 2006; Stoker *et al.*, 2004) or advanced (Allais *et al.*, 2020) puberty. This impairment in the timing of puberty was associated with alteration of the number, maturation, and function of ovarian follicles (Allais *et al.*, 2020; Lilienthal *et al.*, 2006; Talsness *et al.*, 2008). Such disruption in ovarian development and function was confirmed *in vitro* with porcine antral follicles that exhibited an altered steroid hormone production and expression of steroidogenic enzymes following exposure to commercial PBDEs (Karmaus *et al.*, 2011), their metabolites (Karpeta *et al.*, 2013), as well as a mixture reflecting human follicular levels (Karpeta & Gregoraszczyk, 2010).

Discrepancies between precocious or delayed puberty can possibly be explained by the differences in BFR congeners and/or their levels, and in windows of exposure. Indeed, *in vivo* and *in vitro* studies showed the potency of PBDEs and their metabolites to exhibit ER-, PR, and AR-, agonistic and anti-agonistic activities (Hamers *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Meerts *et al.*, 2001a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b). This diversity of endocrine disruptive effects supports contradictory findings on endocrine and reproductive endpoints in human and animal mentioned above.

1.1.1.1.8 HBCDD

A few studies have also been published using *in vivo* and *in vitro* models exposed to HBCDD. In juvenile 22-day old mice, low doses of HBCDD, based on dietary human exposure, led to histopathological changes in the uterus and disruption of sex steroid hormones as demonstrated by decreased serum levels of 17 β -estradiol and increases of testosterone to 17 β -estradiol ratio (T/E2 - ratio) (Maranghi *et al.*, 2013; Rasinger *et al.*, 2018). In a two-generation study, exposure to HBCDD resulted in a significant reduction in the number of the primordial follicles in the ovary of F1 females (Ema *et al.*, 2008). Premating, gestational and lactational exposure to HBCDD also led to a delayed vaginal opening in rat female pups (van der Ven *et al.*, 2009).

These *in vivo* effects of HBCDD are supported by *in vitro* experiments demonstrating that HBCDD can disrupt sex steroid axis. HBCDD can act as an estrogen antagonist (Hamers *et al.*, 2006) but also enhance estrogenic (Dorosh *et al.*, 2011) and androgenic activity (Christen *et al.*, 2010). This ability of HBCDD to interfere with ovarian steroidogenesis was confirmed using an *in vitro* co-culture model of granulosa and theca porcine cells that exhibited increases in sex hormone secretion when exposed to a mixture containing high levels of HBCDD (Gregoraszczyk *et al.*, 2008). Moreover, HBCDD may alter ovulation as demonstrated by its ability to disrupt cell signaling in FSH-stimulated primary granulosa cells isolated from juvenile 21-24-day old female rats (Fa *et al.*, 2014). HBCDD seems to be able to dysregulate various endocrine pathways and can thus affect tissues that rely on this signaling for their development and functions.

Altogether, these findings showed the potency of BFR to disrupt endocrine and reproductive signaling in human and experimental models. The BFR-induced alterations were reported both in mothers directly exposed and their infants exposed indirectly during *in utero* life and/or lactation, but also those directly exposed during early postnatal development. Paradoxically, though mammary gland is one of the most hormone-dependent organs both in terms of development and carcinogenesis, only a few studies have evaluated how they could be affected by BFR exposure. Thus, while summarizing the current literature highlighting the impacts of BFR exposure on endocrine regulation and reproductive development in female, this review will focus on their effects on mammary gland development and potential implications in breast development abnormalities and carcinogenesis.

11.4 Overview of mammary gland development and hormone action

The rodent mammary gland development resembles that of humans and occurs in a multistage manner (Masso-Welch *et al.*, 2000; Richert *et al.*, 2000; Russo & Russo, 2004). Development starts during embryonic life, accelerates exponentially during puberty, and reaches maturity throughout the pregnancy-lactation cycle (Hassiotou & Geddes, 2013; Masso-Welch *et al.*, 2000; Russo & Russo, 2004).

11.4.1 Systemic hormone-independent development

In utero development of the mammary glands begins between 4-5 weeks post-conception in humans (Hassiotou & Geddes, 2013; Javed & Lteif, 2013; Russo & Russo, 2004) and around 10-11th day of gestation in rodents (Hens & Wysolmerski, 2005; Macias & Hinck, 2012). Development starts as epidermal cells aggregate and thicken on the ventral side of the embryo

along the encephalo-caudal axis to form symmetrical ridges or milk lines (Cowie, 1974). The mammary lines will resolve into pairs of placodes at the cervical, thoracic, abdominal, and inguinal regions in the rodents, and in one pair in the thoracic region in humans, where the future mammary glands will form (Hassiotou & Geddes, 2013; Hens & Wysolmerski, 2005; Macias & Hinck, 2012). Development progresses as the placodes expand to form mammary buds that invaginate in the dermis. The surrounding mesenchyme differentiates into the fat pad, fills with fibroblasts and supports epithelial growth and ductal branching (Cowin & Wysolmerski, 2010; Macias & Hinck, 2012; Richert *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 1999b; Sternlicht, 2006). At birth, the mammary gland is rudimentary and only consists of small ducts surrounded by the fat pad (Cowie, 1974; Cowin & Wysolmerski, 2010; Macias & Hinck, 2012; Russo & Russo, 2004). From birth through the prepubertal period, both human and rodent mammary glands growth isometrically with the overall body (Masso-Welch *et al.*, 2000; Russo & Russo, 2004) and circulating gonadal hormones progressively increase (Bell, 2018).

Studies have reported expression of receptors for a variety of hormones, such as estrogens (ER) and prolactin (PRLR) in the developing fetus and in neonates' humans (Keeling *et al.*, 2000; Naccarato *et al.*, 2000) and rodents (Heuberger *et al.*, 1982; Hovey *et al.*, 2002). Even though the fetuses are exposed to high levels of maternal hormones, it has been demonstrated that prenatal and prepubertal development of the mammary glands occurs independently of systemic hormones action (Couse & Korach, 1999). Maternal hormones are said to have organizational effects as they can induce permanent changes in the tissue during early development, that will enable further action of activational hormones later in life (Bell, 2018; Berenbaum & Beltz, 2011; Schulz *et al.*, 2009; Wallen, 2009).

11.4.2 Systemic hormone- dependent development

Puberty defines the period of maturity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG) axis and the reproductive systems (Bell, 2018). It is characterized by the onset of menstruations in female humans, and vaginal opening as well as regular oestrus cycles in rodents (Bell, 2018). It generally begins around 9-12 years of age in humans, between postnatal day (PND) 35 and 42 in rats (Masso-Welch *et al.*, 2000), and as early as PND 26 in mice (Brust *et al.*, 2015).

Pubertal development of rodent mammary gland has been mostly studied in mice. Increases of systemic estrogens concentrations promote extensive epithelial cell proliferation and leads to the formation of multilayered club-like structures called terminal end buds at the end of

the primary ducts (Daniel *et al.*, 1987; Sternlicht, 2006). TEBs are highly proliferative structures, specific to the peripubertal mammary gland and responsible for the major remodeling of the gland at puberty (Daniel *et al.*, 1987; Daniel & Smith, 1999; Paine & Lewis, 2017). TEBs are composed of an outer single layer of caps cells that are precursors of the myoepithelial lineage and express basal markers (Smooth Muscle Actin (SMA), P-cadherin, tumoral protein 63 (p63) and cytokeratin 14 (K14). These cells are surrounded by an inner multilayer of body cells expressing luminal markers (cytokeratin 18/8 (CK18/8), E-cadherin), as well as the estrogens and progesterone receptors (ER, PR); the inner layer will give rise to the luminal layer of the developing ducts (Daniel *et al.*, 1987; Daniel *et al.*, 1995; Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006). Concomitantly with proliferation and differentiation of TEBs into new ducts, major apoptosis occurs in the TEB body layer to contribute to lumen formation (Humphreys *et al.*, 1996; Sreekumar *et al.*, 2017). In addition to estrogens (Bocchinfuso & Korach, 1997; Daniel *et al.*, 1987; Sternlicht *et al.*, 2006a), ductal elongation is regulated by complex endocrine and paracrine signals such as growth hormone (GH), Insulin-like growth hormones (IGF-1) and epithelial growth factor (EGF), coming from both the epithelial and stromal compartments (Briskin & Ataca, 2015; Hovey & Aimo, 2010; Hovey *et al.*, 1998; Hovey *et al.*, 1999; Sakakura *et al.*, 1976). As ducts elongate, they bifurcate and undergo side branching, mainly under progesterone action (Haslam, 1988; Humphreys *et al.*, 1996; Humphreys *et al.*, 1997a; Humphreys *et al.*, 1997b; Lydon *et al.*, 1995; Paine & Lewis, 2017).

At adulthood, the ductal tree has reached the edges of the fat pad and TEB are no longer observable (Masso-Welch *et al.*, 2000; Medina, 1996; Richert *et al.*, 2000) Rhythmic ovarian cycles will sustain mammary development by inducing cycles of proliferation and regression throughout reproductive life (Hovey *et al.*, 2002). Progesterone and prolactin (Briskin, 2002) triggers additional development that leads to the formation of tertiary branches and alveolar buds during each ovarian cycle to prepare for a potential pregnancy (Fata *et al.*, 2001). Thyroid hormones also play an important role in regulating mammary postnatal development, specifically in tertiary branching and alveolar budding processes (Briskin & Ataca, 2015; Vonderhaar & Greco, 1979; Vonderhaar & Greco, 1982; Vonderhaar *et al.*, 1986).

During pregnancy, the mammary glands undergo the final stages of development in preparation for lactation. Combined action of progesterone, prolactin, thyroid hormones as well as local growth factors such as WNT, RANKL and EGFR stimulates cell proliferation and leads to the differentiation of bilayered milk-secreting structures called alveoli (Gallego *et al.*, 2001; Geddes, 2007; Joshi *et al.*, 1986; Macias & Hinck, 2012; Munford, 1963a; Munford, 1963b; Neville

et al., 2002; Traurig, 1967). During lactation, suction from the newborns stimulates contraction of the myoepithelial cells surrounding the alveoli and leads to milk ejection towards the lactiferous ducts to feed the newborn (Hassiotou & Geddes, 2013; Lollivier *et al.*, 2006). It will also stimulate prolactin and oxytocin release, thus contributing to maintain the milk production (Geddes, 2007; Pang & Hartmann, 2007). Lactation lasts about 3 weeks in rodents and varies between 3 and 24 months in women.

At weaning, major apoptosis of the alveoli results in regression of the glands to the pregestational stage (Holst *et al.*, 1987; Hurley, 1989b; Li *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 1996; Marti *et al.*, 1997). All these morphological and structural changes will be repeated during each pregnancy until the onset of menopause where decrease in circulating levels of estrogen and progesterone will cause an irreversible involution (Hassiotou & Geddes, 2013; Macias & Hinck, 2012; Russo & Russo, 2004).

Similar developmental patterns occur in humans except for differences in the histomorphological features and hormonal regulation (Hovey *et al.*, 2002; Russo & Russo, 2004).

11.4.3 Intercellular junctions in mammary gland development

Proper development and function of the mammary glands require complex and tightly regulated interactions between the different cells present within the tissue. Direct cell-cell interactions are provided by intercellular junctions, namely gap, adherens and tight junctions, whose function and expression are differentially regulated throughout development (Dianati *et al.*, 2016). We will focus on adherens and gap junctions whose dysregulation have been associated to various breast developmental defects and carcinogenesis.

1.1.1.26 Gap junctions

Gap junctions (GJ) are clusters of transmembrane channels ensuring direct communication between the cytoplasm of adjacent cells (Aasen *et al.*, 2016). They result from the assembling of small proteins named connexins (Cxs) (Laird, 2006). Cx43, Cx30, Cx32 and Cx26 form GJ in the mouse and rat mammary gland (Dianati *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2007; Locke *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2015b; Talhouk *et al.*, 2005). In humans, the expression of these Cxs was reported in the mammary gland (Jamieson *et al.*, 1998; Laird *et al.*, 1999; Monaghan *et al.*, 1996; Pozzi *et al.*, 1995; Teleki *et al.*, 2014; Wilgenbus *et al.*, 1992). However the effective presence of Cx30 and Cx32 is still controversial (Stewart *et al.*, 2015b; Teleki *et al.*, 2014). Cx43, expressed mainly in the myoepithelial layer but also in junctions between myoepithelial and

luminal and between luminal cells (Dianati *et al.*, 2016; Talhouk *et al.*, 2005). It is the main Cx expressed in the virgin mammary gland (Dianati *et al.*, 2016). Cx32, Cx30 and Cx26 are expressed between luminal epithelial cells and their expression varies according to the stage of development (Dianati *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2000; Monaghan *et al.*, 1994; Plante & Laird, 2008; Pozzi *et al.*, 1995). Cx26 and Cx30 are expressed from mid-gestation throughout lactation. Cx32 expression also persists throughout lactation but only starts after parturition (Dianati *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2007; Locke *et al.*, 2000; Locke *et al.*, 2004; McLachlan *et al.*, 2007; Monaghan *et al.*, 1994; Talhouk *et al.*, 2005). During all stages of mammary development, GJ function and selectivity is influenced by several factors including the type of Cxs composing the channels, phosphorylation status of the Cxs, Ca²⁺ concentration and pH (Laird, 2006; Musil & Goodenough, 1991b; Solan & Lampe, 2009).

The importance of Cx43 in mammary gland development has been demonstrated in mice harboring an autosomal dominant mutation of *Gja1*, the gene encoding for Cx43 (Plante & Laird, 2008). These mice exhibited decreased levels of the total and highly phosphorylated forms of Cx43, and the total number of Cx43 GJ, and a reduced gap junctional intercellular communication (GJIC) between myoepithelial cells (Plante & Laird, 2008). At the developmental levels, prepubertal and pubertal animals had smaller mammary glands with few TEBs and ducts. A delayed development was also observed in adults, and the lactating dams had an impaired milk ejection (Plante & Laird, 2008). In contrast, Cx26 role appears to be essential for proper development of the mammary gland during pregnancy, specifically before mid-gestation, as a conditional mutation in its encoding gene *Gjb2* only impaired alveologenesis and reduced the ability of breastfeeding when the mutation occurred before 12.5 days of gestation (Bry *et al.*, 2004). Finally, Cx30 and Cx32 seem not to be essential for normal development and function of the mammary glands as their loss does not induce any negative effects (Bry *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2014).

1.1.1.27 Adherens junctions

Adherens junctions allow cell-cell adhesion and contribute in both intracellular signaling and transcriptional regulation in epithelial cells (Cavallaro & Christofori, 2004; Hartsock & Nelson, 2008). They are composed of transmembrane cadherins and cytoplasmic anchor proteins called catenins (p-120 catenin, β -catenin, and α -catenin) that ensure the binding of adherens junctions to the cytoskeleton (Cavallaro & Christofori, 2004; Hartsock & Nelson, 2008). In the mammary

glands, E-cadherin and P-cadherin contribute to the formation of adherens junction in the luminal and myoepithelial layer, respectively (Andrews *et al.*, 2012; Daniel *et al.*, 1995).

In mice mammary gland, inhibition of E-cadherin function *via* its neutralization through specific antibodies causes disruption of cell adhesion in the luminal layer and reduction of DNA synthesis and cell division (Daniel *et al.*, 1995). Mice lacking the cytoplasmic domain of E-cadherin elicited premature alveolar development during pregnancy and had an impaired cell polarity and cell cohesiveness during lactation (Delmas *et al.*, 1999). Similar neutralization of P-cadherin disrupted the myoepithelial cell layer (Daniel *et al.*, 1995), and virgin P-cadherin deficient mice exhibited precocious pregnant-like differentiation of the mammary glands at adulthood, that resulted in hyperplasia and dysplasia later in life (Radice *et al.*, 1997).

Besides its role in anchoring adherens junctions to the cytoskeleton, β -catenin acts as a transcription factor of the canonical Wnt signaling by interacting with T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) to modulate the transcription of target genes, mainly involved in the regulation of cell proliferation, apoptosis, differentiation and migration (Incassati *et al.*, 2010b; Polakis, 2007). β -catenin function is regulated through differential phosphorylation that varies upon internal and external signals (Daugherty & Gottardi, 2007). In the absence of Wnt signals, cytoplasmic β -catenin undergoes a phosphorylation cascade on Ser45 by Casein Kinase α (CK1 α), Ser33, Ser37 and Thr41 by Glycogen synthase Kinase 3 β (GSK3 β) that ultimately leads to its degradation into the proteasome (Liu *et al.*, 2002; Yost *et al.*, 1996) (Daugherty and Gottardi 2007, Spirli, Locatelli *et al.* 2013). Upon activation of Wnt signaling, phosphorylation of β -catenin by PKA on Ser675 prevents its degradation and promotes its translocation and further transcriptional activity in the nucleus (Hino *et al.*, 2005; Spirli *et al.*, 2013; Taurin *et al.*, 2006).

Thus, a proper Wnt/ β -catenin signaling is crucial during all the steps of mammary morphogenesis from embryonic development up to pregnancy and lactation (Cowin & Wysolmerski, 2010; Incassati *et al.*, 2010b; Kurley *et al.*, 2012; Tepera *et al.*, 2003a).

1.1.1.28 Junctional interplay and hormone regulation

We recently showed that gap and adherens junction protein are expressed in a stage-dependent manner, and that the composition of the junctional nexuses varies throughout postnatal development of the mammary gland development (Dianati *et al.*, 2016). As mammary gland development is regulated by hormones, we assumed that these changes in intercellular

junctions' establishment and interaction may result from differential hormone regulation (Dianati *et al.*, 2016).

There is evidence suggesting that hormones act as key signals in regulating the formation and function of intercellular junctions. For instance, gonadotropins LH and FSH affects gap junction formation and function both *in vitro* and *in vivo* (El-Hayek & Clarke, 2015; Gilula *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 2002; Kalma *et al.*, 2004). In the rodent myometrium, Cx43 gap junction formation is decreased by high levels of progesterone during pregnancy to reduce contractility and avoid preterm labor (Petrocelli & Lye, 1993). At the end of pregnancy, concomitant with progesterone withdrawal, increasing levels of circulating estrogens stimulate *GJa1* expression and induces a significant upregulation of Cx43 GJ that ultimately leads to myometrium contraction and labor (Lye *et al.*, 1993a; Mackenzie & Garfield, 1986). Cx26 is stimulated by estradiol but decreased by progesterone treatment in the rat endometrium (Grummer *et al.*, 1994; Grummer *et al.*, 1999a) and E2 is involved in Cx32 regulation in rat liver (Plante, Cyr 2002). Such differential regulation of Cxs by steroid is also observed in human myometrium (Chow & Lye, 1994b) and endometrium (Saito *et al.*, 1997). Thyroid hormones also regulate Cxs expression in rats. It has been shown that Cx43 expression and GJ coupling is increased by triiodo-thyronine (T3) in liver (Stock *et al.*, 1998) and that T3 regulates Cx43 in Sertoli cells *in vivo* and *in vitro* (Gilleron *et al.*, 2006) and in the testis *in vivo* (Buzzard *et al.*, 2000).

Adherens junction protein expression are also influenced by hormones. E-cadherin and β -catenin gene expression is stimulated by T3 to allow remodeling of larval stomach during metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum* (Izaguirre & Casco, 2010). T3 also regulates β -catenin transcription factor activity as it induces its phosphorylation at Ser⁶⁷⁵, thus increasing β -catenin stabilization and promoting proliferation in rodent liver cells (Fanti *et al.*, 2014). Thyroid hormones signaling also plays an important role in murine intestinal morphogenesis *via* direct and simultaneous regulation of components of Wnt/ β -catenin signaling (Kress *et al.*, 2009; Plateroti *et al.*, 2006). In contrast to the positive regulation of thyroid hormones, E-cadherin and β -catenin protein expression are decreased by progesterone in ovine uterine epithelium likely to contribute to blastocyst implantation (Satterfield *et al.*, 2007).

11.5 Breast carcinogenesis: role of hormones and junctions

Breast cancer is the most common cancer among women, impacting more than 2 million women each year, and causing the greatest number of cancer-related deaths among women worldwide (WHO). In Canada, it is estimated that 27,400 women will be diagnosed with breast

cancer and that 5,100 women will die from it in 2020 (Brenner *et al.*, 2020a). Breast cancer is a heterogeneous disease with different molecular subtypes. Based on transcriptomic analysis, four major subtypes have been proposed: luminal A, luminal B, Her2-enriched (Her2e) and triple-negative, the latest comprising, among other, basal-like and claudin-low subtypes (Perou *et al.*, 2000; Prat & Perou, 2011; Sorlie *et al.*, 2001). Luminal subtypes (A/B) express ER and PR, Her2e are characterized by overexpression of Her2, while triple-negative are negative for ER, PR and Her2. Cancer progression is a result of progressive acquisition of genomic alterations resulting in phenotypic modifications, such as self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signal, evasion of apoptosis, limitless replicative potential, sustained angiogenesis, and tissue invasiveness and metastasis (Hanahan & Weinberg, 2011). Novel formation of distant tumors from the primary tumoral site represents around 70% of human cancer death (Dillekas *et al.*, 2019; Sporn, 1996).

Aberrant activation of epithelial to mesenchymal transition (EMT) is known to contribute to cancer cell metastasis (Kalluri & Weinberg, 2009). EMT is a biological process allowing a polarized epithelial cell to acquire a mesenchymal cell phenotype, improved migratory capacity, invasiveness, higher resistance to apoptosis, and amplified production of ECM components, which involves loss of cell polarity and intercellular junction integrity (Knights *et al.*, 2012). Although the role of Cxs in breast carcinogenesis remains controversial, some *in vitro*, *in vivo*, and epidemiological studies in humans suggest that Cxs acts in a stage-dependent manner in breast cancer. In the primary stages of cancer progression, Cx26 and Cx43 may contribute to inhibit tumor progression towards the metastatic stage (Hirschi *et al.*, 1996; Momiyama *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2002). However, in later stages, overexpression of Cx43 has been shown to promote trans-endothelial migration of tumor cells through formation of heterocellular gap junctions between cancer cells and endothelial cells (Pollmann *et al.*, 2005). We recently showed that Cx43 expression in breast carcinogenesis is complex and requires to take into consideration various factors such as the tumor subtype and the associated hormonal receptor status (Busby *et al.*, 2018).

Similar to Cxs, dysregulation of adherens junctions proteins are associated to breast carcinogenesis. It is well recognized that E-cadherin has tumor suppressive and anti-metastatic properties in most cancers, including breast cancer (Birchmeier, 1995; Birchmeier & Behrens, 1994; Gamallo *et al.*, 1993; Gottardi *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 1993; Palacios *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2001). Loss of E-cadherin has been associated to 86% of human breast cancer distant metastasis (Oka *et al.*, 1993) and in a great number of lobular breast carcinomas, as well as

infiltrating luminal and ductal carcinomas (Caldeira *et al.*, 2006). Disruption of adherens junctions' proteins is involved in breast cancer progression. For instance, switch from E- to mesenchymal N-cadherin expression is a hallmark of EMT during cancer progression (Knights *et al.*, 2012). As E-cadherin may play a role in sequestering β -catenin from entering in the nucleus (Gottardi *et al.*, 2001; Stockinger *et al.*, 2001), it has been shown that disruption of adherens junctions promotes ectopic stabilization of β -catenin and increases its transcriptional activity (Yang *et al.*, 2001). Moreover, stabilization of β -catenin is associated to precocious mammary gland development and cancer (Dolled-Filhart *et al.*, 2006; Imbert *et al.*, 2001; Incassati *et al.*, 2010b; Lin *et al.*, 2000; Michaelson & Leder, 2001; Ozaki *et al.*, 2005). Similarly, activation and/or stabilization of β -catenin signaling is frequent in breast cancer (Geyer *et al.*, 2011) and involved in EMT process (Kim *et al.*, 2002).

Carcinogenesis is a multistep process during which mutated cells undergo intensive proliferation (promotion) which in turn leads to genomic instability and acquisition of new properties (progression) (Gupta & Massague, 2006; Kalluri & Weinberg, 2009). Exogenous compounds can contribute to this process at different levels, through mutations (carcinogenic compounds) (DeBruin & Josephy, 2002; Russo & Russo, 1978) or during promotion (epigenetic compounds) (Baxter *et al.*, 2014; Kanwal & Gupta, 2012). Endogenous hormones, mainly estrogens but also progesterone, thyroid hormones, and prolactin, that influence growth of the mammary gland have been demonstrated to greatly influence breast cancer (Angelousi *et al.*, 2017; Conde *et al.*, 2014; Cristofanilli *et al.*, 2005; Eshre Capri Workshop Group, 2004; Henderson & Feigelson, 2000; Jerzak *et al.*, 2018; Shao *et al.*, 2020; Sogaard *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Exposure to high levels of estrogens from prenatal throughout pubertal, adult, and post-menopausal life represent one of the most important factors increasing the risks of breast cancer (Eshre Capri Workshop Group, 2004; Potischman & Troisi, 1999). As mentioned above, because adherens and gap junctions are regulated by hormones and involved in breast carcinogenesis, one can speculate that exposure to EDs such as BFR can impact mammary development and/or carcinogenesis through mechanisms that involve dysregulation of these junctions.

11.6 Exposure to PBDEs and HBCDD and the mammary glands: experimental models unravel intricate effects on endocrine, reproductive and intercellular junctions' endpoints

The above-mentioned studies illustrated that BFR can have endocrine disruptive effects on female reproductive system, acting on various hormonal pathways. Given that the

development of the mammary gland and progression of breast cancer are tightly related with the hormonal balance, one can easily suppose that exposure to BFR can interfere with these two processes. Yet, there are few studies on the effects of BFR on mammary gland development and cancer. In addition, the limited number of studies that evaluated the effects of PBDEs exposure on mammary gland development in human reported contradictory findings.

On one hand, higher serum PBDEs levels were associated to premature thelarche in a population of 124 girls (Deodati *et al.*, 2016), but to a delayed onset of Tanner stage 2 breast development in another population of 645 girls (Windham *et al.*, 2015). On the other hand, one study did not find any association between current PBDEs serum levels and thelarche. However this discrepancy may likely result from the low number of girls in the cohort (n=9) (Leijs *et al.*, 2008). To the best of our knowledge no study has analyzed the effects of exposure to a single mixture of HBCDD on mammary gland development or pathogenesis in human.

As their counterpart in human, experimental studies on the mammary gland effects of BFR remain extremely limited. However, the available data, including our work, allows to better characterize how environmental exposure to single or environmental BFR mixtures can reverberate on the main stages of mammary gland development across life.

11.6.1 Exposure to BFR: effects of in *utero* and lactational exposure to DE-71

Kodavanti and collaborators were the first to report adverse effects of BFR on mammary gland development in female. They used Long Evans rat dams and exposed them from gestational day (GD) 6 until pups' weaning (postnatal day (PND) 21), to three doses of DE-71, a widely used pentabrominated commercial mixture (Kodavanti *et al.*, 2010b). Analysis of mammary gland development, undertaken in pups aged 4 and 21, showed a significant delay in 21-day old pups exposed to the 10.2 and 30.6 mg/kg doses with the effect being more pronounced in the 10.2 mg/kg group, while no effect was observed at PND 4 (Kodavanti *et al.*, 2010b). The PND 21 pups had delayed ductal outgrowth, fewer lateral branches and reduced TEB development. This was associated to decreases in T4 serum levels from pups exposed to both doses. DE-71 exposure also induced a severe hypothyroxinemia in dams directly exposed through pregnancy and the lactational period to the 10.2 and 30.6 mg/kg DE-71 doses (Kodavanti *et al.*, 2010b). The authors hypothesized that decreases in thyroid hormones in offspring could be caused by the DE-71-induced hypothyroxinemia in the dams (Kodavanti *et al.*, 2010b).

Because humans are exposed to mixtures rather than single congeners of BFR, our group sought to understand the effects of an environmentally relevant exposure to BFR on female mammary gland development and function across development. Female Sprague-Dawley rats were exposed to a BFR mixture composed of three commercial mixtures of PBDEs (DE-71, DE-79, and BDE 209) and one HBCDD mixture prior to mating and during pregnancy and lactation. These compounds were combined to yield a ratio of PBDEs congeners and HBCDD comparable to the median levels of these compounds in Boston house dust (Allen *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2008). The low dose was estimated to be a close approximation of maximum human exposure, based on a dust ingestion rate of 100 mg/day in children (16.5 kg body weight) and the scaling of dose from humans to rodents (1:6.9, human to rat body surface area ratio).

Such assumption is supported by previous studies showing that the mother's thyroid state during pregnancy and lactation can influence the thyroid status of their offspring (Ahmed *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2012; Varas *et al.*, 2002). TH transfer from mother to fetus and the influence of maternal thyroid status on offspring development have been demonstrated in several species including human (Bernal & Pekonen, 1984; Contempre *et al.*, 1993) and rat (Deescoabar *et al.*, 1990). Moreover, it has been demonstrated that breastmilk is a source of TH and iodine uptake in human and animal including rat neonates (Karimova *et al.*, 1983; Strbak *et al.*, 1980; Strbak *et al.*, 1983; Vigouroux *et al.*, 1980). Further investigation in the male sibling of the cohort perinatally exposed to DE-71 revealed that disruption of TH levels in the pups could involve modulation of deiodination, active transport, sulfatation and glucuronidation (Szabo *et al.*, 2009).

The DE-71-induced decrease of T4 serum levels, associated to a delayed mammary gland development in PND 21 pups recalls a previous study in which chemical induction of hypothyroidism from weaning through adulthood also resulted in a delayed mammary gland development later in 3-month old mice (Vonderhaar & Greco, 1979). However, as DE-71 can exert potential anti-estrogenic and anti-androgenic effects *in vivo* and *in vitro* (Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b; Stoker *et al.*, 2004; Talsness *et al.*, 2008), the authors assumed that impairment of mammary development at PND 21 can result from disruption of estrogens and progesterone signaling that normally regulate TEB development and ductal outgrowth at this age (Briskin & Ataca, 2015).

11.6.2 Effects of exposure to an environmentally relevant mixture of PBDEs and HBCDD

1.1.1.29 Gestational and lactational window of sensitivity

The BFR mixture had no effects on dams exposed during the pregnancy and lactational period, on mammary gland structure, markers of milk synthesis, ER α , THRs and the epidermal growth factor receptor ERBB1/2 protein expression (Dianati *et al.*, 2017). Similarly, markers of gap junctions Cx32 and Cx43 that plays an important role in regulating mammary development and function during pregnancy and lactation were not affected. However, low dose exposure to BFR significantly decreased protein levels of p- β -catSer⁶⁷⁵ without affecting β -catenin, non-p- β -catSer⁴⁵ and p- β -catTyr⁶⁵⁴ levels. As stated above, β -catenin acts as an anchoring protein in cellular adherens junctions between luminal cells, but also plays an important role in regulating cell signaling, proliferation and differentiation through its transcription factor activity (Cavallaro & Christofori, 2004; Hartsock & Nelson, 2008). β -catenin phosphorylation at Ser⁶⁷⁵ prevents its degradation and promotes its transcriptional activity (Hino *et al.*, 2005; Spirli *et al.*, 2013; Taurin *et al.*, 2006)}, however, the BFR mixture had no effects on β -catenin/Lef1 immunoprecipitation and on TCF1, c-Jun, c-Myc or Met expression. Interestingly, downregulation of p- β -catSer⁶⁷⁵ protein levels was associated to a decrease in its localization between luminal cells of the alveoli and to a reduced interaction with E-cadherin at cellular adhesion sites in dams treated with the 0.06 and 20 mg/kg/d BFR doses, with the effects being more important at low dose.

Both E-cadherin and β -catenin are normally upregulated during pregnancy and/or lactation in mice mammary gland (Dianati *et al.*, 2016) and disruption of their expression and/or interaction is associated to an altered development and breast cancer (Dolled-Filhart *et al.*, 2006; Geyer *et al.*, 2011; Imbert *et al.*, 2001; Incassati *et al.*, 2010b; Kim *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2000; Michaelson & Leder, 2001; Ozaki *et al.*, 2005). Transgenic mice harboring a chimera β -catenin that lacks its C-term signaling domain had a critic inhibition of lobuloalveolar development during pregnancy and were not able to nurse their pups (Tepera *et al.*, 2003a). Similarly, lower E-cadherin and β -catenin interaction was correlated with poor clinical outcome in breast cancer (Dolled-Filhart *et al.*, 2006).

We showed that exposure to BFR did not affect lactation capacity of the dams because no change in weight of the pups was observed at the time of weaning (Tung *et al.*, 2016). Nevertheless, preantral and antral ovarian follicles structure, morphology and number was affected by the BFR treatment in the dams at gestational day 20 (Lefevre *et al.*, 2016a). This

disruption of folliculogenesis was accompanied with an altered steroidogenesis (Lefevre *et al.*, 2016a). Similarly, exposure to HBCDD also led to reduction of the number of ovarian follicles (Ema *et al.*, 2008) and disruption of sex hormone production in female mice (Maranghi *et al.*, 2013; Rasinger *et al.*, 2018).

Full term pregnancy is typically associated with a long-term protective effect against breast cancer, as complex changes (e.g increased DNA repair abilities and programmed cell death among others) lead to complete differentiation of the gland (Albrektsen *et al.*, 2005; Fortner *et al.*, 2019; Troisi *et al.*, 2018). Thus, one can assume that impairment of β -catenin signaling and decrease of its interaction with E-cadherin, accompanied with disruption of ovarian development and function could influence the risks for the dams to develop breast cancer later in life and/or during subsequent pregnancies. However, pregnancy is also associated with a short-term transient higher risk of breast cancer (i.e pregnancy-associated breast cancer) because changes in hormonal status promote the growth of cells, including that of initiated cells harboring protooncogenic mutation within the breast (Bouasker *et al.*, 2020; Schedin, 2006). Even though no changes were observed in EMT markers N-cadherin and Vimentin in the dams mammary gland after exposure to the BFR mixture (Dianati *et al.*, 2017), these findings encourage further research to better understand how BFR or EDs in general could play a role in the etiology of the very under-studied pregnancy-associated breast cancer.

Similar to the results found by Kodavanti *et al.*, dams exposed to 20 and 60 mg/kg/day dose of the environmentally-relevant mixture of BFR exhibited decreased serum T4 levels, potentially because BFR increased hepatic metabolism of T4 (Tung *et al.*, 2016). In contrast our results reported BFR-induced disruption of mammary gland development in the 0.06 and 20 but not in the 60 mg/kg/day group (Dianati *et al.*, 2017). On one hand, such observation suggests that the dose-response curves of BFR depend on the target organ, and thus on its hormone responsiveness (Vandenberg *et al.*, 2006). On the other hand, it has been reported that thyroid hormone through THR α 1 directly stimulates transcription of *Cttnb1*, the gene encoding for β -catenin in mice intestinal epithelium (Plateroti *et al.*, 2006), and T3 stimulates β -catenin phosphorylation at Ser⁶⁷⁵ potentially through induction of PKA in liver *in vivo* and *in vitro* (Fanti *et al.*, 2014). E-cadherin and β -catenin expression is also increased following T3 treatment in toad *Rhinella arenarum* (Izaguirre & Casco, 2010). Thus, these data suggest that disruption of adherens junction's formation and signaling in the dams exposed to our environmentally relevant mixture of BFR may involve complex mechanisms, including disruption of T4 signaling.

1.1.1.30 *In utero* and lactational window of sensitivity

Further investigations were undertaken to investigate how the pups that were exposed through their mothers, *in utero* and during lactation, could also be affected by the BFR treatment.

1.1.1.1.9 Short-term effects of BFR exposure at PND 21

In prepubertal pups at PND 21, *in utero* and lactational exposure to 0.06 mg/kg/day dose of BFR increased total epithelial surface, a phenomenon that is characteristic of the pubertal stage of mammary development (Gouesse *et al.*, 2020). In addition, the low dose treatment induced an increase in the percentage of cells expressing Ki67, in protein levels of the apoptotic marker cleaved-caspase-9 which were associated to trend towards increases in the average ductal area, lumen size and ductal thickness (Gouesse *et al.*, 2020). During puberty, epithelial cells undergo major apoptosis for TEB formation, and inner cells of the TEB as well as stromal cells die through apoptosis to allow lumen formation and invasion (Hovey & Aimo, 2010; Humphreys *et al.*, 1996; Sreekumar *et al.*, 2017; Sternlicht, 2006). However, the onset of vaginal opening, estrus cyclicity and ovarian maturation were not affected in these low dose treated pups (Allais *et al.*, 2020). Thus, these data suggested that exposure to low dose of an environmentally relevant mixture of BFR induces precocious mammary gland development without affecting the overall maturation of the reproductive system (Gouesse *et al.*, 2020).

Our data are contrary to the results found by Kodavanti *et al.*, in PND 21 pups which reported a delayed mammary development following exposure to DE-71 (Kodavanti *et al.*, 2010b). The discrepancies between our respective findings could be due the strains of the animals studied, the time of exposure, but more probably to the differences in the BFR mixtures. DE-71, although being widespread, only represent one the of BFR formulations commercially available. DE-71 exerts thyroid (Ellis-Hutchings *et al.*, 2006; Szabo *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002) and estrogenic disruptive activities (Meerts *et al.*, 2001b; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b) *in vitro* and *in vivo*. On the opposite, our BFR mixture is a blend of three technical commercial mixture of PBDE (DE-71, DE-79 and BDE 209) and one mixture of HBCDD that was formulated according to levels found in house dust. These BFR can elicit multiple endocrine disruptive activities such as THR-, ER-, PR-, and AR, agonistic, anti-agonistic and potentiating activities or signaling disruption Dang *et al.*, 2007; Hamers *et al.*, 2006; Hamers *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Meerts *et al.*, 2001; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008a; Mercado-Feliciano & Bigsby, 2008b; Schriks *et al.*, 2007; Schriks *et al.*, 2006; Yamada-Okabe *et al.*, 2005). Thus, it is possible that in our experiment, the different mixture act additively or even

synergistically when used in combination (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). In mice testes, similar differences between the effects of exposure to single ED versus a mixture of EDs have been reported (Bunay *et al.*, 2018).

Like their mothers, PND 21 pups treated with 20 and 60, but not 0.06 mg/kg/day dose of BFR exhibited decreased serum T4 levels (Tung *et al.*, 2016). Quantification of liver PBDEs and HBCDD levels in PND 21 pups revealed that these molecules were accumulated in a dose dependent manner, as higher levels were found with increasing doses (Tung *et al.*, 2016). Interestingly, PND 21 pups exposed to the 20 and 60, but not 0.06 mg/kg/day had an increased liver weight and higher metabolic activity (Tung *et al.*, 2016). Thus, changes in T4 levels may likely result from liver cytotoxicity driven by higher exposure to BFR (Tung *et al.*, 2016). We can therefore speculate that, like hormones that can be toxic at high doses (Welshons *et al.*, 2003) and yet influence biological endpoints at low, physiologically relevant doses (Brucker-Davis *et al.*, 2001; Vandenberg, 2014; Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003), BFR can still exert biological changes on thyroid signaling at the 0.06 mg/kg/day environmentally relevant dose.

Functional studies have highlighted the importance of thyroid hormone signaling in supporting growth and differentiation of mammary gland (Johnston & Smithcors, 1948; Vonderhaar & Greco, 1979). Interestingly, in low dose treated pups that had precocious mammary gland development, we observed a trend towards an increase of the number of cells positive for nuclear THR α 1 (Gouesse *et al.*, 2020). Thus, the slight increase in THR α 1-positive cells is coherent with enhancement of histological and morphological endpoints that ultimately lead to a premature mammary development (Gouesse *et al.*, 2020).

We also showed that BFR-induced premature mammary gland development at PND 21 was accompanied by an increased protein levels of the highly phosphorylated (p) form of Cx43 in the mammary glands (Gouesse *et al.*, 2019). As Cx43 phosphorylation is usually associated with its localization at the cell membrane, and with effective gap junctional intercommunication (Lampe & Lau, 2004), this observation suggested that the BFR treatment increases cell-cell communication in the prepubertal pups. Because collective migration of epithelial cells that retain their intercellular junctions may contribute to ductal morphogenesis and invasion of the TEB into the stroma during pubertal development of the mammary gland (Ewald *et al.*, 2008; Hinck & Silberstein, 2005; Paine & Lewis, 2017), such results suggest that increases in p-Cx43 at PND 21 could contribute to premature ductal development by regulating collective migration of TEB cells. Moreover, thyroid hormone signaling regulates gap junction establishment and function in several tissues such as testis (Wagner *et al.*, 2008), epididymis (Cyr, 2011; St-Pierre *et al.*, 2003),

liver (Stock & Sies, 2000), heart (Bacova *et al.*, 2016), and the thyroid gland (Jiang *et al.*, 2010). THRs can bind to Cx43 promoter in rat liver (Stock & Sies, 2000) and directly induce Cx43 gene expression in brook trout sertoli cells (de Montgolfier *et al.*, 2011). Thus, we can assume that our BFR mixture modulates mechanisms of proliferation, apoptosis, and cell-cell communication to ultimately lead to precocious mammary gland development, potentially through disruption of thyroid hormone signaling. Further, this supports our hypothesis that low dose exposure to BFR influence mammary gland development even when inducing subtle changes in thyroid hormone signaling.

1.1.1.1.10 Mid-term effects of BFR exposure at PND 46

Similar to the dams (Dianati *et al.*, 2017), low dose exposure to BFR targeted adherens junctions in PND 46 pups (Gouesse *et al.*, 2019). The 0.06 mg/kg/day dose induced a decrease in E-cadherin and β -catenin expression in the mammary glands of PND 46 pups. However, the absence of significant changes in p- β -cateninSer675 and p-CREB protein levels suggested that a different signaling pathway from PKA is modulated (Gouesse *et al.*, 2019).

We previously showed that E-cadherin and β -catenin interacts with Cx43 in rodent's mammary gland (Dianati *et al.*, 2016) and proper establishment of adherens junctions is a prerequisite for gap junction formation (Jongen *et al.*, 1991; Kanno *et al.*, 1984; Keane *et al.*, 1988; Mege *et al.*, 1988; Meyer *et al.*, 1992). Interestingly, PND 46 pups exposed to 0.06 mg/kg/day dose of BFR also exhibited decreased protein levels of p-Cx43, and this was accompanied with a trend towards decrease of the number of gap junctional plaques. This suggest that BFR-induced disruption of adherens junctions may reverberate on gap junction formation at the membrane of myoepithelial cells in PND 46 pups.

However, these results are contrary to what we observed in the PND 21 offspring, where increased p-Cx43 protein levels were associated with a precocious mammary development (Gouesse *et al.*, 2020). Even though these observations appear to be conflicting, they support the hypothesis that EDs can induce distinct effects according to the age and time of development of the individual, and thus on hormonal status (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Such differences can result from the many variations in mammary organization and in hormone regulation that differ between the immature prepubertal gland and the very dynamic pubertal mammary development (Briskin & O'Malley, 2010).

Changes in adherens and gap junctions in the low dose treated pups were also associated to decreases in both THR α 1 and cleaved caspase-3 protein levels at PND 46. This suggests a downregulation in thyroid hormone signaling and an imbalanced cellular homeostasis (Gouesse *et al.*, 2020). Such modulation of junctional proteins and proliferation-apoptosis balance are typically associated with increased breast cancer risks and an altered mammary development (Dolled-Filhart *et al.*, 2006; Kalluri & Weinberg, 2009; Naus & Laird, 2010). Thus, though we did not observe changes in EMT markers (vimentin and N-cadherin) and in the overall mammary gland morphology (Gouesse *et al.*, 2019), we can not rule out the possibility that all these changes could influence carcinogenesis later in life or during and/or after pregnancy.

Here again, *in utero* and lactational exposure to low dose of the BFR mixture downregulated adherens and gap junction's protein at PND 46, and this was associated to decreases in THR α 1 protein levels in the mammary gland. This supports our hypothesis that, like in several tissues (Bacova *et al.*, 2016; Cyr, 2011; de Montgolfier *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2010; St-Pierre *et al.*, 2003; Stock & Sies, 2000; Wagner *et al.*, 2008), thyroid hormones may regulate junctional protein expression and subcellular localization in the rat mammary gland, and the type of regulation may vary across development stage.

1.1.1.1.11 Long-term effects of BFR exposure at PND 208

Contrary to what we observed at a younger age, no significant changes were observed on junctional proteins, developmental markers as well as hormone receptors at PND 208. Markers of breast cancer and EMT also remained unchanged.

Previously, we showed that BFR-induced decreases of T4 serum levels was observed at PND 21 but returned to control levels at PND 46 and PND 210 (Tung *et al.*, 2016). Additionally, internal liver levels of PBDEs and HBCDD molecules were reduced in PND 46 pups when compared to PND21 (Tung *et al.*, 2016), but no measure was performed on PND 208 animals. Here, these data suggest that parent PBDE and HBCDD compounds are relatively rapidly metabolized and that may explain the relative absence of effects at PND 208. However, it has been well demonstrated that PBDEs are metabolized in lower brominated metabolites that preferentially accumulate and persist in fatty tissue (Darnerud & Risberg, 2006). Mammary gland development is multistage process during which phases of extensive and complex remodeling alternates with phases of relative quiescence (Masso-Welch *et al.*, 2000; Russo & Russo, 2004). Both pregnancy and puberty are periods of highly dynamic changes (Daniel *et al.*, 1987; Hassiotou & Geddes, 2013; Masso-Welch *et al.*, 2000; Paine & Lewis, 2017; Sternlicht, 2006); and though during

prepuberty the gland develops minimally, its immaturity renders it particularly vulnerable to external factors that can influence processes of growth and differentiation (Fenton, 2006; Rudel *et al.*, 2011). Thus, we can speculate that the absence of persistence of the BFR-induced alteration of mammary gland development at PND 21 and PND 46, later at PND 208 may be an adaptative response to restore mammary homeostasis and these changes may result in the many changes occurring in the mammary glands across life. Moreover, as the adult gland is relatively more differentiated than those of the younger pups, we might not be able to detect subtle changes that could be triggered by the BFR mixture. However, because BFR can elicit epigenetic responses (Dao *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018; Kamstra *et al.*, 2014; Poston & Saha, 2019; Robinson *et al.*, 2019; Suvorov *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2013a; Zhao *et al.*, 2016), we cannot exclude the hypothesis that the exposure could have induced epigenetic changes that may result in observable effects later in life, or during pregnancy.

11.7 Low dose and age-dependent' effects of BFR

In all the stages of postnatal mammary gland development that were studied, most of the effects of the environmentally relevant mixture of BFR resulted from low dose exposure (Dianati *et al.*, 2017; Gouesse *et al.*, 2020; Gouesse *et al.*, 2019). Low dose and non-monotonic response curves are common for EDs because they are thought to follow the same rules as hormones (Vandenberg, 2014; Vandenberg *et al.*, 2012). These nonlinear response curves suggest that BFR may affect a common endpoint through differential modulation of various independent pathways (Geck *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 1995; Vandenberg *et al.*, 2012; Welshons *et al.*, 2003). Such low dose effects and nonlinear response curves cannot be detected from standard toxicological tests using higher doses to assume the safest dose of exposure for humans. Thus, our work supports the importance of including low, environmentally relevant doses in toxicology studies that assess the risks associated to exposure to EDs in experimental models.

11.8 Proposed mechanisms for BFR actions in the mammary during postnatal development

Overall, both of our studies using environmentally relevant mixture of BFR as well as a previous study analysing the effects of a single PBDE congener DE-71 (Kodavanti *et al.*, 2010b) showed that mammary gland development is impaired in rat model. In our study, cell-cell interactions, proliferation/apoptosis balance and thyroid hormone signaling appear to be prime targets for our BFR mixture as they were affected in dams exposed during pregnancy and lactation as well as their pups both at PND 21 and PND 46. However, the specific modulation of

these processes seems to depend on the age on the animals, and thus varies according to the developmental period and hormonal status, and responsiveness. Based on the overall findings, and since the effects of BFR on mammary gland were observed at low dose, we were able to propose possible mechanisms involved in BFR effects in dams and their pups at PND 21, PND 46 and PND 208.

- 1- In dams, direct exposure to 0.06 mg/kg/day dose targets p- β -cateninser675 protein levels as well as E-cadherin and β -catenin interaction at cell adhesion sites and this was accompanied with decreased p-CREB levels. Thus, direct exposure to BFR during gestation and lactation alters adherens junctions of the lactating gland potentially through inhibition of PKA (Dianati *et al.*, 2017).
- 2- In the PND 21 pups exposed through *in utero* life and lactation, 0.06 mg/kg/day dose of BFR did not alter TH levels yet triggered a trend towards an increase in the number of cells positive for THR α 1. Such increase is suggestive of stimulation of TH signaling in the mammary gland and may contribute to enhancement of cell proliferation (Ki-67) and communication (p-Cx43). Upregulation of GJIC may also contribute to premature ductal development by contributing to TEB's cell collective migration. All these changes may result in greater total epithelium surface that is characteristic of a premature mammary gland development (Gouesse *et al.*, 2020).
- 3- At PND 46, decreases in THR α 1 protein levels may trigger changes in E-cadherin, β -catenin and p-Cx43 protein and lead to reduced cell-adhesion and cell-communication. Such changes in cell-cell interaction may reverberate on cellular homeostasis as showed by inhibition of apoptosis (cleaved caspase-3) and slight increase in proliferation (PCNA) (Gouesse *et al.*, 2019).

11.9 BFR-induced disruption of mammary gland development: cause for concern?

In an effort to summarize the current literature reporting the effects of BFR on endocrine, reproductive and mammary gland development, this review highlighted major points that can be summarized below:

- 1- BFR, especially PBDEs and HBCDD are endocrine disruptor that mainly target thyroid hormone homeostasis but also reproductive endpoints both in human and experimental models.

- 2- The effects of BFR on mammary gland differ upon the nature of the exposure. Exposure to single commercial mixture or environmentally relevant mixtures of BFR target mammary gland and reproductive endpoints but elicit different effects.
- 3- Mammary gland is a highly dynamic organ that undergoes substantial changes across life. Thus, changes induced by EDs such as BFR vary upon developmental stages probably according to hormonal status and hormone responsiveness of the individual.
- 4- Cell-cell interaction, proliferation, and apoptosis as well as THR α 1 appear to be prime target of BFR in mammary gland.
- 5- Most of the major changes triggered by BFR exposure were at the low, environmentally relevant dose of exposure both in dams and pups. Thus, this highlights the importance to take into consideration environmentally relevant doses when analyzing the effects of EDs such as BFR on animal models in order to better estimate their potential effects on humans.

Precocious development and disruption of hormonal signaling, cell-cell interactions and proliferation-apoptosis balance are factors involved in mammary abnormal development or carcinogenesis (Aasen, 2015; Fenton, 2006; Hazan *et al.*, 2000; Jamieson *et al.*, 1998; Macon & Fenton, 2013; Nagi *et al.*, 2005; Naus & Laird, 2010; Nieman *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2001). Our review shows that an environmentally relevant mixture of BFR can alter mammary gland development both after direct exposure of the dams but also their pups indirectly exposed through *in utero* life and lactation. These data raise concerns about the effects of BFR exposure on human mammary gland health because the greatest BFR exposure occurred in 1990-2000 (Eljarrat *et al.*, 2011). Thus, we question how BFR exposure could affect mammary glands of the female directly exposed or their infants that were indirectly exposed to BFR through their mother during the last 20-30 years. At the present time, these females are nearing menopause while their daughters are sexually mature and have already gone through and/or may undergo pregnancy. Both aging and pregnancy are associated to elevated risks of breast cancer. Thus, our findings further encourage studies that investigate the impacts of low, environmentally relevant doses of EDs on mammary gland development, to better define their involvement in the etiology of breast pathologies.