

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Étude toxicologique du DEHP et de la nouvelle génération de plastifiants sur le développement et la cancérogénèse de la glande mammaire

Par

Bélinda Crobeddu

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

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Pre Cathy Vaillancourt
INRS - Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Pr Étienne Audet-Walsh
Faculté de médecine, Université Laval
Département de médecine moléculaire

Examinatrice externe

Pre Élyse Caron-Beaudoin
University of Toronto - Scarborough
Department of Health and Society
Department of Physical and
Environmental Sciences

Directrice de recherche

Pre Isabelle Plante
INRS - Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je remercie mes examinatrices Élyse Caron-Beaudoin et Cathy Vaillancourt, ainsi que mon examinateur Étienne Audet-Walsh, qui ont accepté la dure tâche d'évaluer mon travail de thèse, aussi bien par la lecture de ce long manuscrit, qu'à travers ma défense de thèse. Je vous remercie donc pour ces heures de travail. Je souhaite remercier tout particulièrement Cathy Vaillancourt pour m'avoir suivi tout au long de ce doctorat en étant l'examinatrice interne à tous mes examens de thèse.

Pour faire un doctorat, il faut tout un village, et c'est ce que j'ai trouvé à l'INRS. Les années de doctorat sont une épreuve en soi, la plus longue et la plus éprouvante que j'ai eu à vivre. Cependant, mise à part les derniers mois de rédaction qui ont été d'une difficulté bien supérieure à mes attentes, mon doctorat s'est réalisé dans des conditions idéales.

Pour cela, je tiens à remercier l'INRS pour m'avoir permis de réaliser un doctorat dans une université dont je partage les valeurs humaines. Je tiens à remercier tout particulièrement le Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie dont la direction et la gestion permettent l'effervescence des initiatives étudiantes. Je tiens à remercier personnellement Josette Bourdages et Florian Gimenes, qui m'ont apporté beaucoup de réconfort dans mon quotidien ; mais aussi Louise Savard et Stéphanie Thibault pour leurs conseils et leur encadrement, qui nous ont permis de créer le journal de vulgarisation [La Synthèse](#). Je remercie aussi les professeur·es du centre AFSB qui ont fait partie de près ou de loin à la réalisation de mon doctorat. Je remercie ainsi le Pr Jacques Bernier pour, entre autres, son humour sans limite et ses talents de dessin, la Pre Maritza Jaramillo, pour avoir toujours eu beaucoup de gentillesse envers moi, et le Pre Kessen Patten pour avoir participé à habiller mon garçon toutes ces années. Je tiens à faire un remerciement particulier pour la Pre Géraldine Delbès qui a été d'un grand soutien au cours de ces années et pour tous ses conseils précieux !

Ce doctorat n'aurait jamais eu lieu sans la Pre Isabelle Plante. Il y a tellement à dire que je vais me contenter de la simplicité. La Pre Isabelle Plante, par sa confiance, son respect, sa gentillesse, son écoute et son humanisme m'a permis de réaliser un doctorat enrichissant et à mon rythme ; de voyager pour des congrès, entre autres, jusqu'à Hawaï ; et d'explorer le monde de la vulgarisation scientifique. Je serai éternellement reconnaissante pour les sacrifices qu'elle a faits pour moi, pour ces temps en famille passés à corriger mes résumés, et encore plus dans les dernières semaines avant le dépôt final où la correction de mes documents arrivait en moins

de 24 h. Je peux donc assurer en toute honnêteté que le laboratoire Plante est le meilleur endroit pour faire un doctorat, et que je suis fière d'avoir pu être une enfant Plante toutes ces années.

La Pre Plante est aussi une gestionnaire d'équipe fantastique qui a permis à plusieurs bébés Plante de se rencontrer. Ainsi, au cours de mon voyage de 6 ans dans son laboratoire, plusieurs belles relations d'amitié se sont créées au cœur du local L-109. Je tiens tout d'abord à remercier Anne Weber-Ouellette pour être le plus beau duo qu'ait connu l'INRS. Notre amitié a très vite dépassé le cadre universitaire, pour devenir la demoiselle d'honneur lors de nos mariages respectifs. Je tiens à remercier Rita Gouesse, ma partenaire de doctorat avec qui j'ai partagé les épreuves, les unes après les autres, nous soudant de façon irréversible. Je remercie mon petit frère du laboratoire, Alexandre Petit, pour avoir été un si détestable et adorable coéquipier. Je remercie Melany Juarez pour être une si rafraîchissante, généreuse et aimante licorne. Je remercie Jysiane Cardot pour m'avoir donné aussi rapidement autant d'amour. Finalement, je remercie toutes les membranes passées et actuelles de la Team Plante, Mélanie Busby, Elham Dianati, Alec McDermott, Cameron Confuorti et Madeleine Lépine pour avoir été des exemples, des soutiens, des partenaires et des collègues formidables.

Mon village se compose aussi des étudiants et étudiantes de l'INRS que j'ai côtoyés depuis ces 6 années et qui sont devenus ma famille québécoise. En espérant n'oublier personne, je tiens à remercier Josianne Bienvenue-Pariseault, Laurie Pinel, Clément Mazeaud, Wesley Freppel, Guillaume Ricaud, Mustapha Iddir, Vincent Hervé, Richard Boulon, Léna Angelo, Claudia Gilbert, Adeline Paimboeuf, Anaïs Anton, Cécile Adam et Sarah Martinez.

Je voulais aussi remercier mon village de l'UQAM, où j'ai fait une brève expédition de 1 an, mais dont les membres ont toujours été un soutien inestimable. Merci à Audrey Glory, Mélanie Chow Shi Yee, Clara Lafortune, Sarah Kassi et Maureen Dutordoir.

Je souhaite remercier ma famille et ma belle-famille dont les membres m'ont toujours soutenue dans mon aventure de doctorat, même si cela signifiait m'éloigner d'eux. Je remercie tout particulièrement mes parents et ma sœur pour leur amour et la confiance qu'ils portent en moi, surtout quand mon syndrome de l'imposteur est au plus fort.

Je tiens à remercier mon mari, Francis Le Roy, même si ces mots sont bien trop faibles pour exprimer la gratitude que je ressens. Francis a été, en plus de mon partenaire de vie, mon partenaire de doctorat. Il m'a aidé dans mes réflexions concernant mes expériences de laboratoire, il était mon public pour répéter mes présentations et examens, le gestionnaire de notre foyer, quand un équilibre des tâches n'était plus faisable pour moi, surtout au cours des

derniers mois de rédaction. Francis a aussi été les bras qui me relevaient quand je n'avais plus l'énergie, quand je vivais des échecs, quand j'avais besoin d'aide pour avancer. Sans Francis il n'y aurait pas de manuscrit de thèse sous vos yeux en cet instant. Merci, Francis pour ta générosité et ton amour sans limites.

Pour finir, je voulais remercier mon petit Liam. Du haut de ses 2 ans et 5 mois, il a créé beaucoup de turbulence dans ma vie de doctorante, mais enrobée dans une montagne d'amour inconditionnel. Beaucoup des pages de ce manuscrit ont été écrites en écoutant des comptines avec Liam sur mes genoux. Il m'a donné la force de continuer, toujours plus fort dans mon acharnement et d'aller au-delà de mes limites. J'espère que tu seras fier de ta maman quand tu seras grand.

ABSTRACT

From our toothbrushes, appliances, food containers, cars, phones, children's toys and their baby bottles; plastic is an integral part of our lives. To give all of these products their necessary flexibility, plasticizers are added during their manufacture. Among these plasticizers, the most commonly used diethylhexyl phthalate (DEHP) has been linked to the progression of hormone-dependent cancers through its endocrine disruptive properties. Since, DEHP is not covalently bound to plastics, it is gradually released into our environment, resulting in a human chronic exposure, detectable in blood, urine, and breast milk. There is evidence that DEHP may influence mammary gland carcinogenesis, but the full mechanisms are not currently understood. An alternative plasticizer, the diisononyl 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid (DINCH), has also been detected in human fluids such as breast milk since it was introduced in 2002. Some endocrine disruptive properties have been identified in this plasticizer, nevertheless, its effects on the mammary gland remain to be elucidated.

Thus, our hypothesis was that DEHP could have an impact in breast cancer's progression, but also in the development of the mammary gland, particularly if exposure occurs during the sensitivity windows. DINCH, on the other hand, would present deleterious effects, which may or may not be similar to the alterations of DEHP. In order to answer our hypotheses, and in the process of understanding the impact of these compounds on the health of the mammary gland, *in vitro* and *in vivo* experiments have been performed.

Through this PhD, we have shown that DEHP and its primary metabolite induce an increase in the proliferation of mammary gland cancer cells, through the modulation of progesterone receptor signaling. In addition, gestational and lactational exposure to DEHP altered the physiology of the mammary gland stroma and its lipid component in adulthood, although the mechanism remains to be elucidated. A similar alteration of the stroma was observed for DINCH, associated with a modulation of PPAR γ signaling, key element of adipogenesis, lipid metabolism and inflammation regulation. More experiments will be needed to identify all the actors of this signaling. Finally, our results suggest that DINCH is not an ideal alternative to DEHP, concerning the mammary gland health.

Keywords: Plasticizers, DEHP, DINCH, Endocrine disruptors, sensitivity windows, mammary gland, development, hormone-dependent, breast cancer, PPAR.

RÉSUMÉ

Depuis notre brosse à dents, nos lunettes, nos électroménagers, nos contenants alimentaires, notre voiture, notre téléphone, mais aussi les jeux et les biberons de nos enfants, le plastique fait partie intégrante de notre vie. Pour leur donner la souplesse nécessaire à leur fonction, des plastifiants sont ajoutés lors de leur fabrication. Parmi ces plastifiants, le phtalate de diéthylhexyle (DEHP), couramment utilisé, a été associé à la progression des cancers hormono-dépendants *via* ses propriétés de perturbateurs endocriniens (PEs). Comme le DEHP n'est pas lié de façon covalente aux plastiques, il se relargue graduellement dans notre environnement, entraînant une exposition chronique, détectable dans le sang, les urines, et le lait maternel. Plusieurs évidences ont montré que le DEHP pourrait influencer la cancérogenèse de la glande mammaire, sans en comprendre actuellement tous les mécanismes. Un plastifiant de remplacement, l'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle (DINCH), a aussi été détecté dans les fluides humains comme le lait maternel depuis sa mise sur le marché en 2002. Certaines propriétés de PEs ont été identifiées pour ce plastifiant, sans toutefois connaître son influence sur la glande mammaire.

Ainsi notre hypothèse était que le DEHP pourrait avoir un impact sur la progression du cancer du sein, mais aussi sur le développement de la glande mammaire, particulièrement si l'exposition a lieu pendant une fenêtre de sensibilité. Le DINCH, quant à lui, présenterait des effets délétères, pouvant être similaire ou non aux altérations du DEHP. Ainsi, afin de répondre à nos hypothèses, et dans une démarche de compréhension de l'impact de ces composés sur la santé de la glande mammaire, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées.

À travers ce doctorat, nous avons montré que le DEHP, et son métabolite primaire, induisaient une augmentation de la prolifération de cellules du cancer du sein, *via* une modulation de la signalisation du récepteur à la progestérone. De plus, une exposition gestationnelle et lactationnelle au DEHP altérait, à l'âge adulte, la physiologie du stroma de la glande mammaire ainsi que sa composante lipidique, sans toutefois en avoir élucidé le mécanisme. Une même altération du stroma a été observée pour le DINCH, associée à une modulation de la signalisation de PPAR γ , éléments régulateurs de l'adipogenèse, du métabolisme des lipides et de l'inflammation. Des expériences seront nécessaires pour identifier l'ensemble des acteurs de cette signalisation. Finalement, nos résultats suggèrent que le DINCH n'est pas une alternative idéale pour la santé de la glande mammaire.

Mots-clés : Plastifiants, DEHP, DINCH, Perturbateurs endocriniens, Fenêtre de sensibilité, glande mammaire, développement, hormono-dépendant, cancer du sein, PPAR γ .

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
ABSTRACT	VII
RÉSUMÉ	IX
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
1 INTRODUCTION	23
1.1 LA PHYSIOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE	23
1.1.1 <i>De la structure à la fonction</i>	23
1.1.2 <i>Le développement</i>	28
1.2 LE CANCER DU SEIN	41
1.2.1 <i>Le cancer : définition et mécanismes généraux</i>	41
1.2.2 <i>La progression tumorale du cancer du sein</i>	42
1.2.3 <i>Les statistiques</i>	43
1.2.4 <i>Les sous-types de cancer du sein</i>	43
1.2.5 <i>L'influence du micro-environnement sur la santé de la glande mammaire</i>	44
1.2.6 <i>L'influence de l'environnement</i>	46
1.3 LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET LEURS EFFETS SUR LA SANTE HUMAINE	46
1.3.1 <i>Généralités</i>	46
1.3.2 <i>Les réglementations</i>	47
1.3.3 <i>Les interférences sur la santé</i>	48
1.4 LES PLASTIFIANTS	51
1.4.1 <i>Généralités</i>	51
1.4.2 <i>Le phtalate de diéthylhexyle, le DEHP</i>	52
1.4.3 <i>L'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle, le DINCH</i>	60
1.5 LE CONTEXTE DE RECHERCHE	67
1.7 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	68
2 ARTICLE 1 : ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DE L'IMPACT DU DEHP SUR LES CELLULES CANCEROGENESES DE LA GLANDE MAMMAIRE	70
2.1 INTRODUCTION	73
2.2 MATERIALS AND METHODS	75
2.2.1 <i>Compounds</i>	75
2.2.2 <i>Cell culture</i>	75

2.2.3	<i>DEHP/MEHP exposures</i>	75
2.2.4	<i>Progesterone and mifepristone exposure</i>	75
2.2.5	<i>Analysis of apoptosis by annexin V/PI in flow cytometry</i>	76
2.2.6	<i>Assessment of cell attachment and proliferation in real-time using xCELLigence technology</i>	76
2.2.7	<i>Western blot analysis</i>	76
2.2.8	<i>Immunofluorescence</i>	77
2.2.9	<i>Statistical analysis and n-values</i>	78
2.3	RESULTS.....	78
2.3.1	<i>An exposure to DEHP and MEHP does not induce apoptosis in T-47D cells</i>	78
2.3.2	<i>A four-day exposure to DEHP and MEHP increases cell proliferation of T-47D</i>	80
2.3.3	<i>Junctional proteins and markers of EMT are not affected in DEHP- and MEHP-treated T-47D cells</i>	81
2.3.4	<i>The progesterone receptor A (PR-A) protein levels are increased by DEHP exposure in T-47D cells</i>	82
2.3.5	<i>The nuclear levels of the progesterone receptor are increased in T-47D cells exposed to MEHP and to DEHP</i>	84
2.3.6	<i>The DEHP- and MEHP-induced increased in nuclear PR levels is inhibited by an antagonist of PR signaling in T-47D cells</i>	85
2.3.7	<i>DEHP- and MEHP-induced T-47D cells proliferation is dependent of PR signaling ..</i>	86
2.4	DISCUSSION.....	86
2.4.1	<i>DEHP exposure increases levels and nuclear localization of PR-A in T-47D cells</i> 87	
2.4.2	<i>MEHP affects T-47D cells proliferation at lower, environmentally relevant, doses compared to DEHP</i>	88
2.5	CONCLUSION.....	89

3 ARTICLE 2 : ÉTUDE *IN VIVO* DE L'IMPACT D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE ET LACTATIONNELLE AU DEHP ET AU DINCH SUR LE DEVELOPPEMENT POST-NATAL DE LA GLANDE MAMMAIRE90

3.1	INTRODUCTION	94
3.2	MATERIAL AND METHOD	97
3.2.1	<i>Animal Treatments</i>	97
3.2.2	<i>Weight measurements</i>	99
3.2.3	<i>Whole mount</i>	99
3.2.4	<i>Cryosection and Masson's trichrome</i>	100
3.2.5	<i>Lipid extraction and Thin Layer Chromatography (TLC)</i>	100
3.2.6	<i>RNA extraction</i>	101
3.2.7	<i>Protein extraction and western blot</i>	101

3.2.8	<i>RT-qPCR</i>	102
3.2.9	<i>Statistical analysis</i>	104
3.3	RESULTS.....	104
3.3.1	<i>Morphological characteristics</i>	104
3.3.2	<i>Lipid profile of the Mammary Gland</i>	106
3.3.3	<i>PPARs/RXRalpha pathway</i>	107
3.3.4	<i>mRNA expression of genes implicated in adipogenesis and lipid metabolism</i>	109
3.4	DISCUSSION.....	115
3.4.1	<i>DEHP treatments</i>	115
3.4.2	<i>DINCH treatments</i>	117
3.4.3	<i>Gestational and lactational exposure to DEHP or DINCH impact the mammary gland health at adulthood</i>	121
3.5	CONCLUSION.....	121
4	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	122
4.1	ALTERATIONS DE LA SIGNALISATION HORMONALE : LE CAS PARTICULIER DE LA PROGESTERONE.....	122
4.1.1	<i>Les propriétés de PEs du DEHP</i>	122
4.1.2	<i>La signalisation de la progestérone et le cancer du sein</i>	126
4.2	LE METABOLISME DES LIPIDES AU CŒUR DE LA SIGNALISATION CROISEE ENTRE L'EPITHELIUM ET LE STROMA.....	127
4.2.1	<i>Le DEHP et le DINCH altèrent la physiologie des adipocytes</i>	127
4.2.2	<i>Potentielles implications sur le développement de la glande mammaire</i>	128
4.2.3	<i>Altérations du métabolisme des lipides par le DINCH</i>	129
4.3	LE DEHP ET LA RESISTANCE AUX TRAITEMENTS CONTRE LE CANCER DU SEIN	131
5	CONTRIBUTIONS GENERALES.....	133
6	LIMITES DE NOS ETUDES.....	134
6.1	LES TRAITEMENTS AU DEHP ET AU DINCH, UNE QUESTION DE DOSE ET D'EXPOSITION	134
6.2	UN PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL CENTRÉ SUR LA REPRODUCTION MASCULINE.....	135
6.3	LES ADIPOCYTES ET LEURS CONSERVATIONS	135
7	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	137
7.1	QUELLE EST L'INFLUENCE DU DEHP OU DU DINCH SUR LES MALADIES MÉTABOLIQUES?.....	137
7.2	QUELLE EST L'INFLUENCE DU DEHP OU DU DINCH SUR LE DÉVELOPPEMENT DU CANCER DU SEIN?.....	138
7.3	UTILISATION DE MODÈLES REPRÉSENTATIFS DE LA COMPLEXITÉ DE LA GLANDE MAMMAIRE	139
8	PERPECTIVES DE SANTÉ PUBLIQUE.....	140
8.1	QUELLE EST LA REELLE EXPOSITION HUMAINE AU DEHP ET AU DINCH ?.....	140
8.1.1	<i>Un meilleur biomarqueur</i>	140

8.1.2	<i>Une matrice de dosage plus représentative</i>	140
8.1.3	<i>Une prise en compte d'une potentielle bioaccumulation d'une partie du DEHP ..</i>	141
8.2	LA SANTÉ PUBLIQUE ET L'INFLUENCE DES LOBBIES	142
9	CONCLUSION.....	144
10	BIBLIOGRAPHIE	145
11	ANNEXE.....	192
11.1	PROPOSITION D'ALTERNATIVES PLUS SAINES PAR LES ACADÉMICIENS, UNE BELLE INITIATIVE À POURSUIVRE	192

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1 SCHEMA DESCRIPTIF DES GLANDES MAMMAIRES MATURES HUMAINES ET DE RATS.	23
FIGURE 1-2 : SCHEMA DU STROMA DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	25
FIGURE 1-3 : LE DEVELOPPEMENT FŒTAL DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	30
FIGURE 1-4 : LE DEVELOPPEMENT HORMONO-DEPENDANT DE LA GLANDE MAMMAIRE CHEZ LA FEMELLE.....	34
FIGURE 1-5 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA PROGRESSION TUMORALE DU CANCER DU SEIN.....	42
FIGURE 1-6 : PROFIL DE METABOLISATION DU DEHP	58
FIGURE 1-7 : LE PROFIL DE METABOLISATION DU DINCH.....	63
FIGURE 2-1: ENVIRONMENTALLY RELEVANT AND HIGHER EXPOSURES TO DEHP AND MEHP DOES NOT TRIGGER APOPTOSIS IN T-47D CELLS.	79
FIGURE 2-2 : A FOUR-DAY EXPOSURE TO DEHP AND MEHP INCREASES CELL PROLIFERATION OF T-47D.	81
FIGURE 2-3 : PR-A PROTEIN EXPRESSION IS INCREASED BY DEHP EXPOSURE IN T-47D CELLS.....	83
FIGURE 2-4: THE NUCLEAR LEVELS OF THE PROGESTERONE RECEPTOR ARE INCREASED IN T-47D CELLS EXPOSED TO DEHP AND MEHP.	84
FIGURE 2-5 : THE DEHP- AND MEHP-INDUCED CELLS PROLIFERATION IS INHIBITED BY AN ANTAGONIST OF PROGESTERONE.....	86
FIGURE 3-1 : MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PUPS' MAMMARY GLANDS AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT.	105
FIGURE 3-2: ADIPOCYTE SIZE ANALYSIS IN MAMMARY GLANDS OF PUPS SAMPLED AT PND90.	106
FIGURE 3-3: LIPID PROFILE OF MAMMARY GLANDS OF PUPS SAMPLED AT PND90.....	107
FIGURE 3-4: TRANSCRIPTOMIC EXPRESSION OF PPARS AND RXR α IN MAMMARY GLANDS OF PUPS SAMPLED AT PND90.....	108
FIGURE 3-5: PPAR γ PROTEIN EXPRESSION IN MAMMARY GLANDS OF PUPS SAMPLED AT PND90.....	109
FIGURE 3-6: MRNA LEVELS OF GENES IMPLICATED IN LIPID METABOLISM, DOWNSTREAM GENES OF PPARS PATHWAYS OF THE MAMMARY GLAND OF PUPS SAMPLED AT PND90.....	111
FIGURE 3-7 : MRNA LEVELS OF GENES IMPLICATED IN ADIPOGENESIS OR LIPID METABOLISM OF THE MAMMARY GLAND OF PUPS SAMPLED AT PND90.	112
FIGURE 3-8: MRNA LEVEL OF GENES IMPLICATED IN LIPID METABOLISM OF THE MAMMARY GLAND OF PUPS SAMPLED AT PND46.	113
FIGURE 3-9: MRNA LEVELS OF INFLAMMATORY GENES IN MAMMARY GLANDS OF PUPS SAMPLED AT PND90. ...	114
FIGURE 4-1 : EXPRESSION PROTEIQUE DE PR DANS LES GLANDES MAMMAIRES DES RATS FEMELLES A PND90	124
FIGURE 4-2 : UNE EXPOSITION DE QUATRE JOURS AU DINCH SEMBLE AUGMENTER LA PROLIFERATION CELLULAIRE DES T-47D.	131

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1 : PRESENCE DE PHTALATES EN FONCTION DU TYPE DE PLASTIQUES	53
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP : adénosine triphosphate

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

AMPK : *adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ANSES : agence nationale française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AR : récepteur androgénique

BBP : phtalate de benzyle et de butyle

BDB : 1,4-butanediol benzoate

BPA : bisphenol A

BPS : bisphenol S

BRAC1 : *BReast CAncer gene 1*

CIAPE : Centre intersectoriel d'Analyse des Perturbateurs Endocriniens

DAG : diacylglycérols

DBP : phtalate de di-n-butyle

DEHP : phtalate de diéthylhexyle

DEP : phtalate de diéthyle

DGAT : diacylglycérol O-acyltransférase

DiBP : phtalate de diisobutyle

DINCH : acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle

DMP : phtalate de diméthyle

DOHaD : *Developmental Origin of Health and Diseases*

DOS : di-octyle succinate

E : jour post-conception

ECHA : European chemicals agency

EMT : transition épithelio-mésenchymateuse

ER : récepteur à l'oestrogène

FAS : acide gras synthétase

FSH : hormone de stimulation folliculaire

GD : jour de gestation

GH : hormone de croissance

HER2 : *human epidermal growth factor 2*

HFD : diète riche en gras

IGF : facteur de croissance analogue à l'insuline

IPA : *Ingenuity Pathway Analysis*

LH : hormone lutéinisante

LOAEL : dose la plus faible pour laquelle des effets néfastes ont été observés

LPL : lipoprotéine lipase

MCMHP (ou 2cx-MMHP) : phtalate de mono-(2-carboxyméthyle-hexyle)

MECPP (ou 5cx-MEPP) : phtalate de mono-(2-éthyle-5-carboxy-pentyle)

MEHP : phtalate de mono-éthylhexyle

MEHHP (ou 5OH-mEHP) : phtalate de mono-(2-éthyle-5-hydroxy-hexyle)

MEOHP (ou 5oxo-MEHP) : phtalate de mono-(2-éthyle-5-oxy-hexyle)

MMP : Métalloprotéinase matricielle

NOAEL : dose maximale sans effet nocif observé

ONG : organisations à but non lucratif

PC : poids corporel

PEBD : polyéthylène basse densité

PEHD : polyéthylène haute densité

PEs : perturbateurs endocriniens

PET : polyéthylène téréphtalate

PL : placentaire lactogène

PND : jours après la naissance

PP : polypropylène

PPAR : récepteur activé par le proliférateur de peroxydome

PR : récepteur à la progestérone

PRL : prolactine

PRLR : récepteur à la prolactine

PS : polystyrène

PTFE : résine époxydes

PTGER3 : récepteur EP3 à la prostaglandine E2

PVC : chlorure de polyvinyle

RfD : valeur de référence

SCD : stéaroyl-CoA désaturase

SCENHR : *Scientific Committee on Emerging and Newly-identified Health Risks*

SNPE : stratégie nationale sur les PEs

TAG : triacylglycérides

TDI : dose journalière acceptable

TEB : bourgeons terminaux

TNBC : cancer du sein triple négatif

TSH : *Thyroid-stimulating hormone*

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VDR : récepteur à la vitamine D

Avant-propos :

Nous devons le prendre comme un fait : nous sommes quotidiennement exposés à un cocktail de composés toxiques dont nous n'avons qu'une faible compréhension de l'impact sur les écosystèmes et notre corps. C'est en 1962 avec la parution de « Silent Spring » de Rachel Carson (Carson, 1962) que la prise de conscience collective de cette pollution a débuté. À quoi sommes-nous exposés ? Sommes-nous plus sensibles à certains moments de notre vie ? Et quelles sont les conséquences de cette exposition sur l'apparition des pathologies comme le cancer ? Ce sont les trois questions clés auxquelles les scientifiques, et tout particulièrement les toxicologues, cherchent à répondre. Mais pour comprendre l'impact d'un polluant sur le corps, son développement et sa cancérogenèse, nous devons étudier précisément chaque organe, un polluant à la fois, avant de pouvoir comprendre l'effet « cocktail ». Mon doctorat s'inscrit dans ce plan global, afin de comprendre l'effet du phtalate de diéthylhexyle (DEHP) et de son alternative, l'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle (DINCH), sur le développement et la cancérogenèse de la glande mammaire.

1 INTRODUCTION

1.1 La physiologie de la glande mammaire

1.1.1 De la structure à la fonction

1.1.1.1 L'épithélium ramifié

La glande mammaire est un organe indispensable à la survie des espèces du règne des mammifères par sa fonction nutritive pour le nourrisson *via* la production de lait. À son stade de maturité maximal, lors de la lactation, la glande mammaire possède une organisation semblable à un brocoli, dont chaque fleur représente une unité fonctionnelle, l'*acinus* (Figure 1-1). Ces *acini* sont regroupés en lobules eux-mêmes regroupés en lobes, autour de canaux secondaires, se rattachant à un canal principal, permettant le cheminement du lait jusqu'au mamelon. Dans le cas

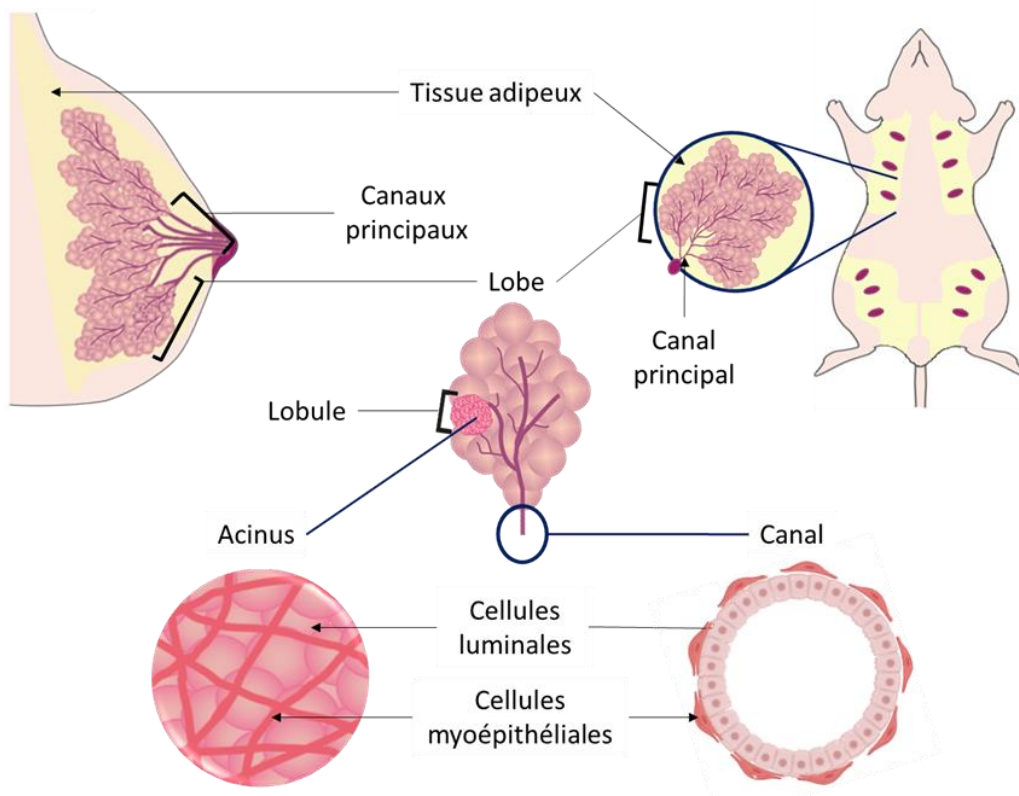


Figure 1-1 Schéma descriptif des glandes mammaires matures humaines et de rats.

A) Coupe sagittale de la glande mammaire humaine. B) Localisation des glandes mammaires des rats et coupe frontale d'une glande mammaire de rat. C) Schéma d'un lobe de la glande mammaire. À gauche, représentation du feuillet cellulaire de l'acinus, composé d'une monocouche de cellules épithéliales recouverte d'un filet de cellules myoépithéliales. À droite, représentation d'une coupe transversale d'un canal, composé d'une couche de cellules luminales entourée d'une couche de cellules myoépithéliales. Adaptée de Isabelle Plante ©.

de l'humain, chacune des deux glandes mammaires est composée d'une vingtaine de canaux principaux, débouchant au niveau du mamelon par des orifices indépendants (Medina, 1996) (**Figure 1-1.a**). Le rat, quant à lui, possède six paires de glandes mammaires, soit une paire cervicale, deux thoraciques, une paire abdominale et deux paires inguinales, dont chacune est formée d'un seul canal primaire (Masso-Welch *et al.*, 2000) (**Figure 1-1.b**). D'un point de vue cellulaire, ce réseau ramifié est composé de deux types cellulaires majoritaires : les cellules épithéliales luminales, permettant la production du lait, et les cellules myoépithéliales, permettant, par leur contraction, l'éjection du lait jusqu'au mamelon (Hassiotou & Geddes, 2013; Tobon & Salazar, 1974) (**Figure 1-1.c**). Le lait maternel est composé d'une multitude de protéine telle que les caséines, de lipides comme les triglycérides et des carbohydrates, mais aussi d'anticorps, dont les proportions varient en fonction des individus (Andreas *et al.*, 2015) et au cours de l'allaitement (Chappell *et al.*, 1985).

1.1.1.2 Le stroma

a. Généralité

Le stroma (coussin adipeux - *fat pad*) est une autre composante principale de la glande mammaire (**Figure 1-1**). Il est séparé physiquement de l'épithélium par la membrane basale, une matrice extracellulaire (ECM – *extracellular matrix*) spécialisée (Inman *et al.*, 2015). Cette membrane est majoritairement formée de laminine et de collagène IV sécrétés principalement par les cellules myoépithéliales (Inman *et al.*, 2015; Neger & Nelson, 2019). L'ECM du stroma est, quant à elle, composée de collagène produit, entre autres, par les adipocytes (**Figure 1-2**) (Iyengar *et al.*, 2003; Landskroner-Eiger *et al.*, 2010) et les fibroblastes, qui sécrètent également de la fibronectine, ainsi que des enzymes métalloprotéinases matricielles (MMP) (Inman *et al.*, 2015). La fibronectine permet dans la glande mammaire un microenvironnement propice à la prolifération des cellules luminales (Williams *et al.*, 2008), mais aussi à la différenciation alvéolaire pendant la gestation (Liu *et al.*, 2010). Les MMPs, pour leurs parts, participent à l'organisation de l'ECM et l'homéostasie du stroma mammaire (Albregues *et al.*, 2014). De façon intéressante, au cours de l'involution, la fibronectine induira l'activation des MMPs afin de dégrader le tissu alvéolaire (Schedin *et al.*, 2000).

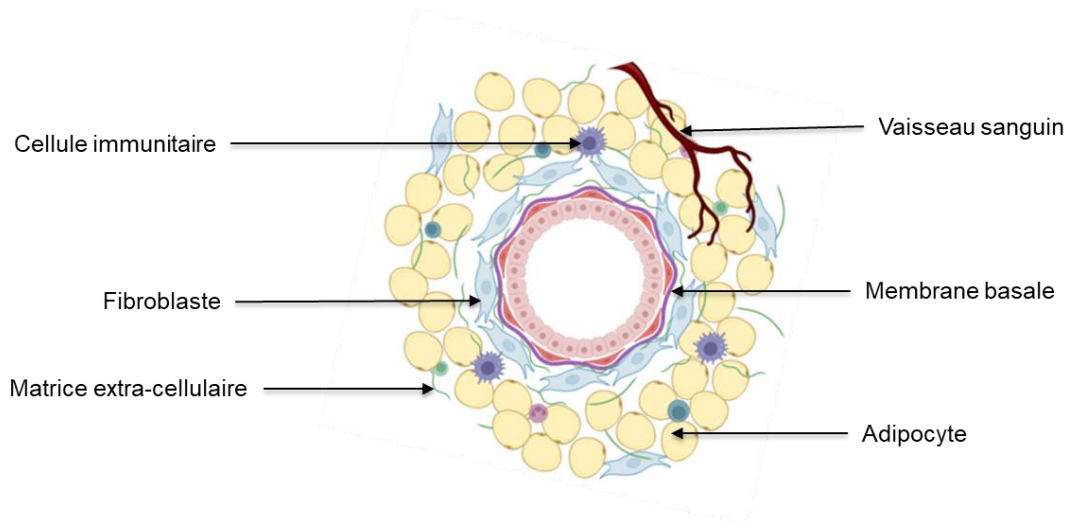


Figure 1-2 : Schéma du stroma de la glande mammaire

Représentation d'une coupe transversale d'un canal entouré de la membrane basale et du stroma, composé de matrice extra-cellulaire, d'adipocytes, de fibroblaste, de cellule immunitaire et de vaisseau sanguin. Inspiré de Jysiane Cardot ®.

Issu du mésenchyme, le stroma est constitué majoritairement d'adipocytes, mais aussi de fibroblastes, de cellules immunitaires comme les macrophages, de cellules endothéliales et de cellules nerveuses (Neville *et al.*, 1998). Les proportions de chacun de ces éléments varient en fonction des espèces, avec une forte proportion de fibroblastes pour les femmes, comparativement aux femelles rongeurs (Neville *et al.*, 1998). La présence des adipocytes est cruciale lors du développement de la glande mammaire, durant la grossesse et lactation, mais aussi au maintien de son intégrité à l'âge adulte (Landskroner-Eiger *et al.*, 2010; Zwick *et al.*, 2018). En effet, en plus d'être un support structural pour l'épithélium, les adipocytes génèrent un micro-environnement hormonal indispensable au développement et au maintiens de la glande mammaire par, entre autres, la production du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) (Walden *et al.*, 1998) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Hovey & Aimo, 2010). Les adipocytes sont aussi une source d'œstrogène par la production de l' (Ailhaud, 1987). De plus, il a été montré que la leptine, cytokine produite par les adipocytes, ainsi que son récepteur, sont nécessaires à la prolifération des cellules épithéliales (Hu *et al.*, 2002). Les adipocytes sont aussi des acteurs clés de l'homéostasie énergétique à travers leur fonction de réservoir lipidique, qui est fortement mobilisée au cours de la lactation (Zwick *et al.*, 2018).

b. L'adipogenèse

Les adipocytes représentant l'unité fonctionnelle du tissu adipeux, permettant la biosynthèse *de novo* des lipides, leur captation et leur stockage sous forme de lipides neutres. Ils sont formés par le processus d'adipogenèse qui a été largement caractérisée. Dans un premier temps, les cellules souches mésenchymateuses vont adopter un phénotype de préadipocytes, perdant ainsi leur capacité à se différencier en d'autres types cellulaires comme les ostéocytes (Ambele *et al.*, 2020). Ces préadipocytes, présentant une forme de fibroblaste, vont alors proliférer par expansion clonale *via*, entre autres, l'intervention de *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP) *beta* (C/EBP β) et C/EBP δ (Ailhaud, 1987; Sarjeant & Stephens, 2012). Dans un second temps, ces préadipocytes vont se différencier en adipocytes par l'intervention de plusieurs facteurs de transcription comme le récepteur activé par le proliférateur de peroxydase gamma (PPAR γ), le *retinoic X receptor* (RXR) et C/EBP α , mais aussi le transducteur de signal et activateur de transcription 5a (STAT5a) (Fève *et al.*, 1998; Sarjeant & Stephens, 2012; Siersbaek *et al.*, 2012).

D'un point de vue de la régulation endocrinienne, il a été démontré que les hormones thyroïdiennes sont liées à cette maturation cellulaire caractérisée par une hyperplasie des adipocytes lors d'une hyperthyroïdie, et ce, par des mécanismes différents de l'obésité (Levacher *et al.*, 1984). De plus, il a été suggéré par les auteurs de la revue, que l'œstrogène et les androgènes atténueraient le développement des adipocytes (Sarjeant & Stephens, 2012). Cependant, les effets de l'œstrogène sur les adipocytes de la glande mammaire sont différents des autres tissus adipeux (Saunier *et al.*, 2011). En effet, il a été montré qu'une exposition aux œstrogènes induisait une hyperplasie des adipocytes de glande mammaire de souris, qui serait potentialisée si cette exposition était suivie d'un traitement à la relaxine (Bianchi *et al.*, 1986). L'implication de l'hormone de croissance (GH) a été identifiée dans l'adipogenèse par activation de STAT5a/b stimulant C/EBP β/δ et PPAR γ dans les lignées adipocytaires 3T3-L1 (Kawai *et al.*, 2007).

Cependant, dans le cas du développement de la glande mammaire, les étapes de l'adipogenèse permettant la formation du stroma n'ont pas été clairement identifiées. En effet, l'étape de différenciation des adipocytes, dans des conditions physiologiques, a été étudiée, à notre connaissance, uniquement au cours de l'involution (Wang *et al.*, 2018; Watson & Kreuzaler, 2011).

c. Le métabolisme des lipides

Le métabolisme des lipides est l'ensemble des processus dynamiques autour des lipides comprenant leur synthèse, leur transport, leur transformation, leur stockage et leur dégradation (Gyamfi *et al.*, 2019). Brièvement, au cours de l'anabolisme des lipides, il y a tout d'abord assimilation des acides gras libres par l'alimentation, impliquant l'intervention de la lipoprotéine lipase (LPL) et de transporteurs membranaires tels que CD36 (Doerge & Stahl, 2005; Goldberg *et al.*, 2009). Ensuite, le processus de la lipogenèse *de novo*, permet la transformation des acides gras libres en acétyl-CoA à la suite d'un enchaînement de transformations enzymatiques telles que l'action de l'acétyl-CoA-synthase (Ameer *et al.*, 2014; Gyamfi *et al.*, 2019). La lipogenèse se termine par la formation de palmitate sous l'action de l'acide gras synthétase (*fatty acid synthétase* – FAS) (Postic & Girard, 2008). S'en suit des étapes de désaturation, d'élongation et d'estérification contrôlées, entre autres, par la stéaroyl-CoA désaturase (SCD1) et la diacylglycérol O-acyltransférase (DGAT), elles-mêmes sous le contrôle de facteurs de transcription tels que PPAR γ et C/EBP, permettant la formation des diacylglycérols (DAG) et des triacylglycérides (TAG) (Postic & Girard, 2008; Roberts *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017a). Les TAG seront ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques (*lipids droplets*) dans les cellules métaboliques comme les adipocytes et les hépatocytes (Welte & Gould, 2017).

Lorsque les cellules nécessitent de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), la voie catabolique des lipides se met en place *via* l'activation de l'*adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) (Hardie, 2014). Ainsi, les adipocytes vont subir une lipolyse afin d'hydrolyser des DAG et des TAG en molécules libres de glycérol et des acides gras. La lipolyse peut, entre autres, résulter de l'activation des récepteurs β -adrénergiques ou encore de l'activation du récepteur EP3 à la prostaglandine E2 (PTGER3) (Townsend *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2016). Ces acides gras pourront, par la suite, subir la β -oxydation mitochondriale, impliquant entre autres l'acyl-CoA déshydrogénase (ACADM) (Yamada & Taketani, 2019), l'acyl-CoA oxydase peroxysomal (ACOX), PPAR δ (Roberts *et al.*, 2011) et PPAR α (Hashimoto *et al.*, 1999), afin de produire de l'acétyl-CoA qui permettra la formation d'ATP, et donc d'énergie, *via* le cycle de Krebs (Nakagawa *et al.*, 2018).

Dans le cas de la glande mammaire, trois phases du métabolisme des lipides peuvent être distinguées : 1) la synthèse de lipides pour le fonctionnement cellulaire, comme les bicouches de phospholipides ; 2) la synthèse de lipides pour la production du lait, mais aussi de

vésicules lipidiques pour sa sécrétion ; et 3) le catabolisme lipidique comme source énergétique (Patton & Jensen, 1975).

Le besoin d'un apport lipidique constant au cours de la lactation nécessite la formation de phospholipides et d'acides gras, ainsi qu'un trafic cellulaire dynamique (McManaman, 2014). En effet, le transport lipidique est très important dans la production de lait, car il y a une nécessité de traverser au moins quatre membranes cellulaires entre les vaisseaux sanguins et les cellules épithéliales de la glande mammaire (Patton & Jensen, 1975).

Il a été montré que PPAR γ était impliqué dans le métabolisme des lipides dans les cellules épithéliales de la glande mammaire de ruminants isolées au cours de la lactation, entraînant l'augmentation du niveau d'ARNm de la SCD (Shi *et al.*, 2013). PPAR γ est aussi impliqué dans le stockage des triglycérides (Kang *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2017). De plus, chez les ruminants, la prolactine (PRL) est impliquée dans la synthèse d'acide gras et de triglycérides du lait (Patton & Jensen, 1975). Le métabolisme des lipides des autres phases du développement de la glande mammaire n'a, à notre connaissance, pas été étudié.

1.1.2 Le développement

La glande mammaire est un des seuls organes à ne pas être fonctionnel à la naissance, devant se transformer tout au long de la vie des femelles afin d'atteindre leur maturité pendant la lactation. Après un développement hormono-indépendant minimal durant la vie embryonnaire et les premiers stades de vie, un développement dynamique débute à la puberté pour produire un épithélium ramifié entouré d'un stroma dense. À la vie adulte, des phases de développement/apoptose se succèdent lors des cycles ovariens, jusqu'au moment de la fécondation, où l'épithélium va proliférer et se différencier, afin de produire du lait lors de la lactation, parallèlement à la régression des adipocytes. Toutes ces étapes sont contrôlées, en majeure partie, par des hormones, telles que les œstrogènes, la progestérone, la PRL et l'ocytocine, mais aussi par des signaux paracrines entre l'épithélium et le stroma. Toutes les étapes du développement ont été bien documentées depuis le début du XX^{ème} siècle, en se focalisant en grande majorité sur le réseau épithélial mammaire. Malheureusement, malgré le rôle crucial du stroma et de sa composante adipocytaire au cours du développement de la glande mammaire, les étapes de prolifération et de différenciation ont été moins étudiées pour les adipocytes (Brenot *et al.*, 2020; Couldrey *et al.*, 2002; Hovey & Aimo, 2010; McNally & Stein, 2017).

1.1.2.1 Le développement hormono-indépendant

Malgré l'abondance d'hormones placentaires et maternelles durant la gestation et la lactation, le développement embryonnaire de la glande mammaire n'est pas modulé par des hormones (Briskin & Ataca, 2015b; Briskin & O'Malley, 2010; Rahman & Brazel, 2004).

a. Le développement fœtal

De façon intéressante, la majorité des études prénatales du développement de la glande mammaire ont utilisé la souris comme modèle (Cowin & Wysolmerski, 2010; Neville *et al.*, 1998; Propper *et al.*, 2013; Sakakura *et al.*, 1987; Sakakura *et al.*, 1982), à l'exception de certaines études comme celle de J. A. Myers ayant utilisé le rat (Myers, 1917). L'embryogenèse de la glande mammaire est un processus très conservé entre les espèces du règne mammifère et particulièrement entre les rongeurs et les humains (Hovey *et al.*, 2002), malgré des variations hormonales entre les espèces.

D'un point de vue des feuilletts embryonnaires, le réseau épithélial de la glande mammaire est formé à partir de l'ectoderme, alors que le stroma est composé d'adipocytes dérivés du mésoderme et tout particulièrement du mésenchyme (Propper *et al.*, 2013), tout comme le tissu conjonctif entourant l'épithélium mammaire (Sakakura *et al.*, 1982).

Les premières structures de la glande mammaire apparaissent à des stades précoces du développement, sous la forme de deux lignes de « lait » (Hovey *et al.*, 2002), issues de l'épaississement du tissu ectodermique, formant une ligne de l'aisselle jusqu'à l'aine de la région pectorale, à 10-11 jours du développement fœtal (E10.5) pour les rongeurs (Cowin & Wysolmerski, 2010; Myers, 1917), et à 5-6 semaines pour l'humain (Hassiotou & Geddes, 2013; Hovey *et al.*, 2002) (**Figure 1-3**). Les portions non nécessaires de la ligne mammaire s'atrophient pour ne laisser visibles que 6 paires de placodes autour de E11.5 pour le rongeur (Propper *et al.*, 2013) et 2 paires pour l'humain, au bout de 7 à 8 semaines (Medina, 1996). Une anomalie à cette période du développement peut créer des mamelons surnuméraires chez l'humain (Javed & Lteif, 2013) par manque d'apoptose, ou une absence de mamelon.

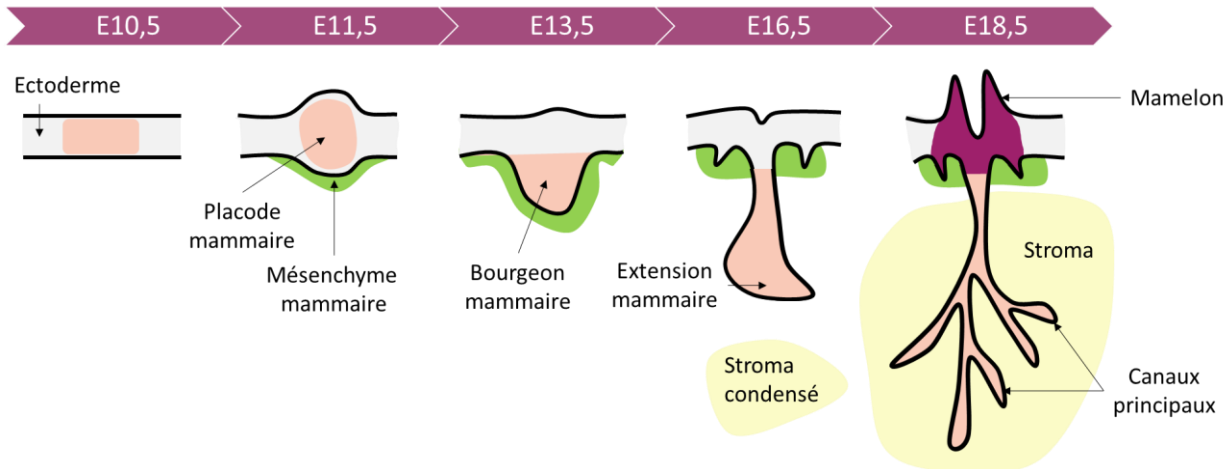


Figure 1-3 : Le développement fœtal de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire commence au 10,5^{ème} jours post-conception (E10,5) chez le rongeur (rats et souris) puis se poursuit par le bourgeonnement et l'extension de l'épithélium mammaire, jusqu'à la mise en place des canaux principaux au sein du stroma et la formation de leur lumière, qui se finalise autour d'E.18,5. Adaptée de (Cowin & Wysolmerski, 2010; Macias & Hinck, 2012; Spina & Cowin, 2021b).

Le bourgeonnement de l'épithélium mammaire, dérivant de l'ectoderme, est initié par des signaux paracrines entre l'épithélium et le mésenchyme mammaire (Macias & Hinck, 2012; McNally & Stein, 2017). Ce bourgeonnement résulte de la prolifération (McNally & Stein, 2017), la migration et la modification morphologique des cellules épithéliales (Cunha & Hom, 1996). Le bourgeon va ensuite s'invaginer dans le mésenchyme mammaire pour être visible à E13.5 (Hovey *et al.*, 2002; Propper *et al.*, 2013) et être totalement formé autour de E14 et E15 chez les rongeurs (Cowin & Wysolmerski, 2010; Myers, 1917) et entre la 10^e et 12^e semaine chez l'humain (Hovey *et al.*, 2002; Medina, 1996). Par la suite, le mésenchyme composé de pré-adipocytes va commencer à proliférer (Hovey *et al.*, 2002), puis va se condenser pour former le stroma (Cowin & Wysolmerski, 2010; Neville *et al.*, 1998), qui est vascularisé et entouré par de collagène-IV dès la période prénatale, autant chez l'humain que chez les rongeurs (Hovey & Aimo, 2010). Ce stroma embryonnaire est indispensable à l'extension de l'épithélium mammaire (Cowin & Wysolmerski, 2010; Cunha & Hom, 1996; Hovey & Aimo, 2010), dépendamment de l'état de différenciation des adipocytes (Sakakura *et al.*, 1987). En effet, la maturation postnatale des adipocytes empêchera l'initiation de la formation des canaux primaires (Sakakura *et al.*, 1982), tout comme l'absence de stroma (Couldrey *et al.*, 2002). Une fois que l'extension épithéliale a atteint le stroma à E16, il y a initiation de l'élongation dichotomique des branches épithéliales, formant un arbre primaire composé de 10 à 20 branches et d'un seul canal lactifère rejoignant le mamelon chez le rongeur (Cowin & Wysolmerski, 2010; Hovey *et al.*, 2002; McNally & Stein, 2017). Dans le cas de l'humain, 15 à 25 arbres primaires seront formés, sans interconnexions,

possédant chacun un canal lactifère qui s'ouvrira à la surface du sein à travers la fosse mammaire (Hovey *et al.*, 2002; Javed & Lteif, 2013; Macias & Hinck, 2012). Parallèlement, la lumière se forme au centre des canaux (Cowin & Wysolmerski, 2010) par apoptose, autophagie et remodelage des cellules épithéliales autour de E18 chez les rongeurs (Macias & Hinck, 2012) et à partir de la 32^e semaine de vie embryonnaire chez l'humain (Hovey *et al.*, 2002). Le remodelage de l'ectoderme permet l'apparition des prémices de mamelons, sous la forme d'une fosse à la surface de l'épithélium, à E18 chez le rat (Myers, 1917) et entre la 12^e et la 16^e semaine chez l'humain (Medina, 1996). L'ouverture du mamelon se fait à la 32^e semaine chez l'humain. Finalement, le mésenchyme mammaire se différencie en tissu conjonctif longeant la partie interne du mamelon (Cowin & Wysolmerski, 2010).

Un dimorphisme sexuel est observé chez les rongeurs à partir de E16. En effet, dès la formation du bourgeon mammaire, les cellules du mésenchyme l'entourant commencent à exprimer certains récepteurs androgéniques (Cunha & Hom, 1996). Par l'action de la testostérone sécrétée par les testicules fœtaux, le mésenchyme mammaire entourant le bourgeon va se condenser, entraînant l'apoptose des cellules épithéliales, amenant ainsi une absence d'ouverture au niveau du mamelon et la réduction de l'arbre mammaire chez les mâles (Astwood *et al.*, 1936; Cowin & Wysolmerski, 2010; Cunha & Hom, 1996; Hovey *et al.*, 2002). Aucun dimorphisme sexuel n'a été identifié chez l'humain à ce stade de développement (Hovey *et al.*, 2002; McNally & Stein, 2017).

Malgré l'absence d'hormone endogène, la présence de récepteurs hormonaux a été démontrée au niveau de la glande mammaire au stade fœtal. Les récepteurs aux œstrogènes (ER) a été détecté dans l'épithélium mammaire dès le 3^e trimestre chez l'humain (Howard & Gusterson, 2000), tandis que ER α et le récepteur aux androgènes sont exprimés dans le stroma de glandes mammaires de souris à E19 (Cunha & Hom, 1996; Wadia *et al.*, 2013).

b. De la naissance à la puberté

La période postnatale

Chez l'humain, il est courant d'observer une sécrétion de lait par les nouveau-nés. La composition de ce lait est similaire au lait maternel (Yap *et al.*, 1980). Anciennement appelée « Witch's milk », cette production est liée aux hormones exogènes maternelles et placentaires, capables de se fixer au récepteur à la PRL (PRLR) présent chez le nouveau-né, aussi bien dans le stroma que l'épithélium mammaire (Hovey *et al.*, 2002). Cette production est transitoire et sexe-indépendant chez la souris (Howard & Gusterson, 2000). Chez l'humain, lorsque le nourrisson ne

sera plus en contact avec les hormones maternelles, présentes dans le lait maternel (Demmelair & Koletzko, 2017), l'épithélium mammaire subira une involution par des signaux semblables à ceux de la ménopause (Sternlicht *et al.*, 2006), ne laissant qu'un réseau épithélial rudimentaire, entouré d'un large stroma fibroblastique de façon similaire pour les deux sexes (Cowin & Wysolmerski, 2010; Howard & Gusterson, 2000).

D'autres récepteurs hormonaux sont déjà présents à ce stade précoce, malgré l'absence de production d'hormones sexuelles avant la puberté. Ainsi, ER et le récepteur à la progestérone (PR) ont été détectés dans l'épithélium mammaire chez l'humain (Howard & Gusterson, 2000). ER a aussi été décelé dans la glande mammaire de souris naissantes, aussi bien au niveau de l'épithélium que du stroma (Hovey *et al.*, 2002).

Lors de la période postnatale, on observe un allongement lent des canaux de façon isométrique à la croissance générale chez l'humain comme chez les rongeurs, sans implication des hormones sexuelles et sans différence entre les sexes (Anbazhagan *et al.*, 1991; Cowin & Wysolmerski, 2010; Hassiotou & Geddes, 2013; Knight & Peaker, 1982). Plus particulièrement chez l'humain, les deux premières années de vie se distinguent du reste de la période entre la naissance et la puberté par un développement et une différenciation plus intense de la glande mammaire (Howard & Gusterson, 2000). Les canaux vont s'ouvrir au niveau de petits renforcements dermiques situés à la surface du mamelon, qui lui va s'invaginer sous l'influence de la prolifération du mésenchyme (Howard & Gusterson, 2000; Javed & Lteif, 2013). Par la suite, les cellules entourant le mamelon vont proliférer, formant l'aréole (Howard & Gusterson, 2000) qui va graduellement se pigmenter (Javed & Lteif, 2013). Il est à noter qu'à ce stade, aucune différence morphologique n'a été observée dans le développement de la glande mammaire entre les garçons et les filles (Hassiotou & Geddes, 2013; Howard & Gusterson, 2000). À notre connaissance, cette période de développement plus active n'a pas été identifiée chez les rongeurs.

La différence la plus marquée entre l'humain et le rongeur dans cette période de développement de la glande mammaire est la présence de tissu fibro-collagèneux autour de l'épithélium (Anbazhagan *et al.*, 1991; Hovey & Aimò, 2010), ainsi qu'une augmentation de la densité du stroma par la poursuite de l'angiogenèse chez l'humain (Javed & Lteif, 2013). Cependant une grande variabilité interindividuelle est également observée chez les humains (Howard & Gusterson, 2000).

De l'enfant en bas âge à la puberté

Tout comme pour le rongeur, le développement de l'épithélium mammaire humaine reste assez quiescent entre 2 ans et le début de la puberté (Javed & Lteif, 2013), suivant simplement le rythme de croissance globale du corps (McNally & Stein, 2017). De plus, dans le stroma, les préadipocytes vont se différencier en adipocytes blancs pendant cette période (Hovey & Aimo, 2010; Inman *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Le développement hormono-dépendant

C'est à partir de la puberté que le dimorphisme sexuel apparaît chez tous les mammifères (Hovey *et al.*, 2002; Howard & Gusterson, 2000). Chez les femelles, les glandes mammaires sont en perpétuel remodelage tout au long de la vie sexuelle en fonction des besoins de l'organisme, et ce, en réponse à des changements des niveaux d'hormones et de facteurs de croissance. Quatre étapes clés ont été identifiées, soit : la péri-puberté, la grossesse, la lactation et l'involution.

L'implication des hormones sexuelles dans le développement de la glande mammaire a été définie en grande majorité dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle, par des expériences d'ablation d'organes endocrines ou de *knockout*, mais aussi de transplantations des glandes mammaires (Brisken *et al.*, 1999; Brisken & O'Malley, 2010; Brisken *et al.*, 1998; Haslam & Shyamala, 1981; Lyons, 1958). Ces études ont permis de déterminer l'importance de l'œstrogène et de la progestérone, sécrétés par les ovaires, de la PRL et de l'hormones de croissance, sécrétés par l'hypophyse, et du cortisol ainsi que des précurseurs stéroïdiens, sécrétés par la glande surrénale, dans le développement de la glande mammaire (Brisken *et al.*, 1999; Brisken & O'Malley, 2010). Leur ablation entraîne un retard ou une absence de développement de la glande mammaire, alors que le développement est rétabli par l'ajout exogène de ces hormones déplétées, confirmant ainsi le statut hormono-dépendant de ce développement (**Figure 1-4**).

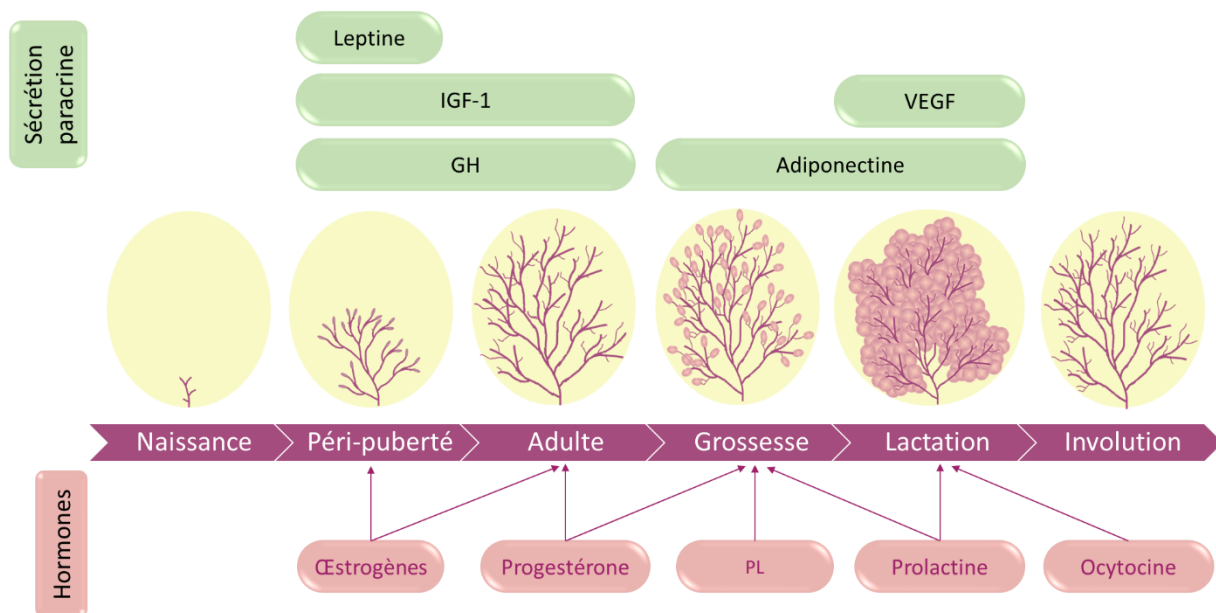


Figure 1-4 : Le développement hormono-dépendant de la glande mammaire chez la femelle.

Description des modifications morphologiques et structurelles aux différents stades de développement sous l'influence des hormones et de la signalisation paracrine. PL (placentaire lactogène), GH (hormone de croissance), IGF-1 (facteur de croissance analogue à l'insuline) et VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire).

a. La péri-puberté et les cycles menstruels

Définition

Le développement péri-pubertaire débute à la mise en place de l'axe hypothalamique-hypophyse-gonadique induisant la sécrétion des hormones ovariennes (Bell, 2018). Chez la femme, la gonadarche (développements des gonades) et l'adrenache (développement de la pilosité pubienne et axillaire) résultent de la maturation des gonades et du cortex surrénalien, respectivement (Bell, 2018). Lorsque le système reproducteur ainsi que les organes sexuelles secondaires, comme la glande mammaire, sont matures (cycles menstruels réguliers), la puberté est atteinte, ce qui se situe entre 30 jours après la naissance (PND30) et PND42 chez les femelles rats, ou entre 10 et 15 ans chez les jeunes filles (Bell, 2018).

Les changements macroscopiques et cellulaires

La glande mammaire est le premier organe sexuel secondaire à se développer, pour atteindre une maturité nullipare aux alentours de 18 ans pour une femme (Howard & Gusterson, 2000; Javed & Lteif, 2013) et vers PND55 chez le rat (Masso-Welch *et al.*, 2000).

Le développement péri-pubertaire de la glande mammaire implique de fortes modulations morphologiques. Dans un premier temps, sous l'influence de l'œstrogène, de l'IGF-1 et de la GH, la croissance isométrique des glandes devient allométrique (Macias & Hinck, 2012), entre PND35 et PND42 chez le rat (Masso-Welch *et al.*, 2000), et entre 8 à 12 ans chez les jeunes filles (Hassiotou & Geddes, 2013; Javed & Lteif, 2013). L'implication du stroma est cruciale pour cette croissance, *via* la formation de fibres de collagène-I axialement organisés, semblant servir de guide à la ramification épithéliale (Brownfield *et al.*, 2013). À la péri-puberté, on observe des structures à l'extrémité des canaux, appelées bourgeons terminaux (TEB - *Terminal End Bud*), semblable à un bouton de rose (Javed & Lteif, 2013). Les cellules des TEB vont subir une mitose, puis migrer à travers le stroma permettant l'élongation des canaux principaux et la ramification des canaux tertiaires (Briskin & O'Malley, 2010; Macias & Hinck, 2012; Masso-Welch *et al.*, 2000). Cette invasion épithéliale dans le stroma (Howard & Gusterson, 2000) nécessite la mise en place d'une fine couche de fibroblastes, décrite chez la femme (Howard & Gusterson, 2000), sans tout de fois avoir été identifiée chez les rongeurs. Lorsque les TEB ont atteint la lisière du stroma, ceux-ci vont régresser pour redevenir de simples extrémités canalaire composées de cellules luminales épithéliales et de cellules myoépithéliales (Masso-Welch *et al.*, 2000; Paine & Lewis, 2017). Finalement, à l'âge adulte, les extrémités des canaux forment des bourgeons alvéolaires (McNally & Stein, 2017), prêts à se transformer en alvéoles productrices de lait en cas de fécondation. Il a été démontré que des cellules souches sont également présentes au niveau de la couche basale des canaux de la glande mammaire chez l'adulte, permettant la régénération des cellules nécessaires au remodelage de la glande (Hassiotou & Geddes, 2013). Des branchements tertiaires continueront de se mettre en place à travers les cycles menstruels pendant la vie adulte (Macias & Hinck, 2012).

Pour finir, en cas d'absence de fécondation au sein d'un cycle menstruel, le développement temporaire de la glande mammaire va régresser par apoptose dépendamment, entre autres, du niveau de progestérone (Navarrete *et al.*, 2005).

Les changements hormonaux

Au cours de la péri-puberté, la concentration des hormones féminines ne fait qu'augmenter (Bell, 2018), participant au développement des organes possédant leurs récepteurs, et étant ainsi sensibles à leur sécrétion. Brièvement, les hormones stéroïdiennes comme la progestérone et l'œstrogène vont se fixer à leurs récepteurs respectifs (PR et ER) permettant après dimérisation, la fixation du complexe sur leur élément de réponse dans l'ADN induisant l'expression de leurs gènes cibles (Fuentes & Silveyra, 2019; Grimm *et al.*, 2016).

L'œstrogène est une hormone stéroïdienne produite majoritairement par les ovaires et impliquée dans le développement, ainsi que le maintien des fonctions sexuelles et de la reproduction, agissant *via* ER. L'œstrogène peut aussi être produite localement par l'enzyme aromatasase dans la peau, le cerveau mais aussi le tissu adipeux (Nelson & Bulun, 2001).

L'activation du récepteur ER α par l'augmentation des niveaux d'estrogènes est requise pour l'élongation des canaux, qui est inhibée chez les souris déficientes en ER α natif (Mallepell *et al.*, 2006). L'œstrogène est aussi important dans le stockage des graisses, l'adipogenèse et la différenciation des adipocytes (Burks *et al.*, 2017). La progestérone, une autre hormone stéroïdienne produite par les ovaires, est aussi impliquée dans le développement de la glande mammaire à la péri-puberté, au moment des cycles menstruels (Brisken *et al.*, 2015; Macias & Hinck, 2012). Elle est impliquée dans la prolifération de l'épithélium de la glande mammaire lors des cycles menstruels (Graham & Clarke, 1997) et tout particulièrement au niveau de sa ramification (Javed & Lteif, 2013).

L'IGF-1, sécrété entre autres par les adipocytes du stroma, est aussi nécessaire au développement de la glande mammaire (Javed & Lteif, 2013; Sternlicht *et al.*, 2006; Walden *et al.*, 1998), et particulièrement au niveau de la prolifération cellulaire des TEB (Bonnette & Hadsell, 2001). En effet, la transplantation de l'épithélium mammaire IGF-1R $^{-/-}$ dans un stroma IGF-1R $^{+/+}$ résulte en un retard de croissance au cours de la période péri-pubère (Bonnette & Hadsell, 2001). De plus, il a été suggéré que la présence de facteur de croissance (GH) permettrait la production d'IGF-1 par le stroma, et tout particulièrement par les fibroblastes (Paine & Lewis, 2017), stimulant de façon paracrine la formation des TEB (Walden *et al.*, 1998). Finalement, l'IGF-1 et l'œstrogène agissent de façon synergique dans la prolifération des cellules du TEB (Paine & Lewis, 2017). Ainsi, par la présence de récepteurs au IGF-1 et à la GH au niveau de l'épithélium ou des adipocytes, la signalisation paracrine et autocrine en provenance du stroma participe au bon développement du réseau épithélial au cours de la péri-puberté et de la vie adulte (Cowin & Wysolmerski, 2010; Sternlicht *et al.*, 2006).

b. La grossesse

Les changements macroscopiques et cellulaires

Il y a peu d'études portant sur le développement des glandes mammaires de la femme lors des périodes de transitoire de la grossesse et la lactation, car la majorité des échantillons adultes proviennent de prélèvements lors de traitement contre le cancer ou d'opération de réduction mammaire (Howard & Gusterson, 2000). Par contre, il est généralement admis que son

développement suit les mêmes étapes que chez les rougeurs, chez qui ce développement a été étudié en détail.

À chaque cycle menstruel, sous l'influence des hormones sexuelles, la glande mammaire se prépare à une potentielle grossesse. Une fois la femelle fécondée, ses glandes mammaires vont entrer dans une phase de fort remodelage appelé alvéologénèse, permettant la formation des premiers tissus alvéolaires matures (Knight & Peaker, 1982). Dans un premier temps, les cellules souches épithéliales vont proliférer de façon intensive afin de former les alvéoles mammaires (Inman *et al.*, 2015), suivis d'une maturation de ces cellules en lactocytes, qui auront la capacité de produire et sécréter le lait en fin de grossesse (Hassiotou & Geddes, 2013; Russo *et al.*, 1989). De plus, les cellules progénitrices génèrent de nouvelles cellules par mitose, permettant l'élongation des extrémités des canaux (Hassiotou & Geddes, 2013). Ces étapes sont contrôlées par des signaux paracrines provenant des cellules adjacentes, comme les cellules souches de la glande mammaire, sous l'influence de la PRL et de l'hormone placentaire lactogène (PL), mais aussi de l'œstrogène (Inman *et al.*, 2015; McNally & Stein, 2017; Neville *et al.*, 2002).

Les alvéoles croissent en nombre, mais aussi en taille, augmentant ainsi le ratio du nombre d'alvéoles par volume de glande mammaire de façon intensive dès le 5^e jour de grossesse chez le rat (Masso-Welch *et al.*, 2000). À la fin de la grossesse, la glande mammaire est composée d'une forte proportion d'alvéoles (Russo *et al.*, 1989), ce qui correspond à la 24^e semaine chez l'humain. Cette période peut aussi être associée à une accumulation de la première sécrétion mammaire, le colostrum (Hassiotou & Geddes, 2013). De plus, il est à noter que le développement des glandes mammaires n'est pas synchronisé dans toutes les paires de glandes mammaires chez le rat, les glandes thoraciques se développant plus rapidement que les glandes inguinales (Russo *et al.*, 1989).

La nécessité d'une interaction entre l'épithélium et le stroma est primordiale à ce stade de développement (Couldrey *et al.*, 2002). En effet, parallèlement à la croissance du réseau épithélial, un fort remodelage du stroma est opéré grâce à la plasticité des adipocytes (Zwick *et al.*, 2018). Il a été démontré que les adipocytes vont croître en taille et en capacité lipogénique au cours de la grossesse afin d'accumuler des lipides nécessaires à la formation du lait (Zwick *et al.*, 2018). De plus, dans le but de laisser la place au tissu épithélial qui subit une croissance importante dans le stroma, les adipocytes vont se différencier en pré-adipocytes et en cellules semblables à des fibroblastes pour la souris (Wang *et al.*, 2018), diminuant ainsi la réserve de lipides (Inman *et al.*, 2015).

Les changements hormonaux

Les deux principales hormones impliquées dans l'alvéologenèse sont la progestérone et la PRL. La progestérone permet le développement et la ramification des canaux nécessaires à la maturation de la glande mammaire. Une greffe de tissus mammaires PR-/- au niveau du stroma d'un individu PR+/+ ne présente pas l'alvéologenèse (Briskin *et al.*, 1998). La progestérone permet aussi de bloquer la production de lait avant l'accouchement en agissant comme un inhibiteur du récepteur à la PRL (Graham & Clarke, 1997).

La PRL, *via* son récepteur transmembranaire (PRLR- *prolactin receptor*), a également un rôle très important à jouer lors de l'alvéologenèse (Rezaei *et al.*, 2016). Briskin et collaborateurs ont montré que la greffe d'un épithélium mammaire d'une souris PRLR-/- , au niveau du stroma d'une souris PRLR+/+ entraînait une absence de formation de lobules alvéolaires, confirmant que la PRL est nécessaire à la maturation de l'épithélium mammaire (Briskin *et al.*, 1999), et tout particulièrement pour la formation des lactocytes (Hassiotou & Geddes, 2013).

PL est sécrétée par les trophoblastes placentaires lors de la lactogenèse (Faria *et al.*, 1991; Rezaei *et al.*, 2016). Son rôle n'a pas clairement été défini dans le développement de la glande mammaire (Neville *et al.*, 2002), mais il a été suggéré que la PL aurait des actions similaires à la PRL et la GH (Rezaei *et al.*, 2016), ainsi qu'un rôle clé dans l'inhibition de la lactation avant l'accouchement (Pang & Hartmann, 2007).

Le placenta permet aussi la production d'œstrogènes au cours de la gestation *via* l'aromatase CYP19A1 (Noyola-Martinez *et al.*, 2019).

c. La lactation

Les changements physiques

Durant la lactation, la glande mammaire est métaboliquement fortement active, avec une forte augmentation de la prolifération cellulaire dans les premiers jours de la lactation (Masso-Welch *et al.*, 2000). La taille des cellules alvéolaires augmente, entraînant un étirement des cellules myoépithéliales (Masso-Welch *et al.*, 2000), en parallèle de la dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases produites par les cellules du stroma (Rezaei *et al.*, 2016). Les cellules épithéliales alvéolaires se retrouvent morphologiquement modifiées donnant une texture spongieuse due à la présence de lipide intracellulaire et des micelles de lait produites lors de la lactogenèse (Masso-Welch *et al.*, 2000). Les vésicules de lait formées par les lactocytes sont

sécrétées au niveau de la partie apicale. Les cellules myoépithéliales permettent, par leur contraction, l'expulsion du lait ainsi formé, vers le mamelon (Masso-Welch *et al.*, 2000).

Les adipocytes restent différenciés pendant la lactation (Wang *et al.*, 2018). Cependant, une diminution de la taille des adipocytes et de la lipogenèse, en particulier pour les adipocytes proches du réseau épithélial, est associée à l'initiation de la lactation (Zwick *et al.*, 2018). D'un point de vue fonctionnel, les adipocytes du stroma sont indispensables à la lactation par leur capacité à fournir aux cellules épithéliales les lipides nécessaires à la formation du lait (Zwick *et al.*, 2018).

L'allaitement est un processus variable chez les femmes qui dure généralement entre 0 et 24 mois (Hassiotou & Geddes, 2013). Le niveau de développement de la glande mammaire pourra varier en fonction de l'intensité de la lactation (Rezaei *et al.*, 2016). Pour les rats, la lactation dure environ 21 jours (Masso-Welch *et al.*, 2000).

Les changements hormonaux

La progestérone et la PL agissent comme des inhibiteurs de la lactation (Pang & Hartmann, 2007). Ainsi l'arrêt de la sécrétion de progestérone (Neville *et al.*, 2002) et le retrait total du placenta après l'accouchement, lève cette inhibition (Pang & Hartmann, 2007).

L'ocytocine est la principale hormone impliquée dans la lactation (Neville *et al.*, 2002). Secrétée par l'hypophyse, elle permet la contraction des cellules myoépithéliales, entraînant l'écrasement des cellules épithéliales pour expulser le lait vers la lumière, permettant le transport du lait dans les canaux et son éjection par le mamelon (Masso-Welch *et al.*, 2000; Svennersten-Sjaunja & Olsson, 2005). Il a été démontré que l'ocytocine stimule la sécrétion de PRL chez le rat (Kennett & McKee, 2012). Cette association a aussi été observée chez la femme dans le cas d'un allaitement directement au sein et absente dans le cas d'un prélèvement mécanique (Uvnäs-Moberg *et al.*, 2020).

d. L'involution

La fin de la lactation est déclenchée par l'arrêt de la succion du nouveau-né au niveau du mamelon entraînant une rétention de lait dans la lumière, induisant une chute du taux de PRL (Neville *et al.*, 2002). Cette stagnation de lait induit plusieurs actions. D'une part, il va y avoir l'initiation de facteurs d'apoptose ainsi qu'un relâchement des cellules épithéliales, entraînant une accumulation de lipides et de fragments cellulaires dans le lumen (Masso-Welch *et al.*, 2000). D'autre part, il va avoir la réapparition des adipocytes, débutant dans les régions éloignées du

mamelon, ainsi qu'un remodelage de la membrane basale (Masso-Welch *et al.*, 2000), sous l'action de métalloprotéinases produites par les cellules adipocytaires (Watson, 2006). Les premiers signaux d'apoptose apparaissent dans les premières 24h d'arrêt de l'allaitement (McNally & Stein, 2017).

Les adipocytes prennent plus de place et se différencient, particulièrement autour des alvéoles, parallèlement à une diminution de la taille des lobules principalement suite à l'apoptose des cellules alvéolaires ; les mêmes phénomènes d'apoptose se déroulent autour des canaux principaux (Macias & Hinck, 2012). De façon intéressante, il semblerait que seules les cellules luminales subissent cette cascade apoptotique, alors que les cellules myoépithéliales seraient maintenues (Masso-Welch *et al.*, 2000). Cette involution implique également une réponse inflammatoire (Hassiotou & Geddes, 2013). En effet, les leucocytes, tels que les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les neutrophiles et les macrophages, sont recrutés aussi bien dans le stroma autour des alvéoles qu'au niveau des cellules épithéliales, pour participer à l'involution (Masso-Welch *et al.*, 2000; Reed & Schwertfeger, 2010). Il a aussi été suggéré que ces cellules pourraient empêcher de potentielle infection liée à la stagnation du lait dans la lumière (Reed & Schwertfeger, 2010).

Au cours des premières étapes d'involution, le retour à la production de lait est possible, mais lorsque le processus de dégradation tissulaire est trop avancé, l'involution devient irréversible. Cependant l'étape déclenchant cette irréversibilité n'a, à notre connaissance, pas encore été identifiée. Il a été proposé que le remodelage de la membrane basale et de la matrice extracellulaire correspondait à l'étape irréversible, atteinte 2 jours après le début de l'involution chez la souris (McNally & Stein, 2017). Chez le rat, il a été défini que la lactation peut reprendre jusqu'à un maximum de 5 jours après le début de l'involution (Masso-Welch *et al.*, 2000).

Par la suite, les alvéoles se désorganisent, potentiellement dû à la pression du stroma dont le volume continue d'augmenter (Masso-Welch *et al.*, 2000). Cette extension du stroma correspond à la re-différentiation des adipocytes, devenant ainsi plus volumineux, parallèlement au processus d'apoptose dans l'épithélium (Wang *et al.*, 2018; Zwick *et al.*, 2018). Les lobules sont tout de même toujours plus abondants que les adipocytes (Masso-Welch *et al.*, 2000).

L'involution se termine entre le 13^e et le 21^e jour chez le rongeur, lorsque les glandes mammaires ont retrouvé un état proche du stade pré-grossesse composées d'un épithélium simple dans un stroma contenant principalement des adipocytes, mais supplémenté de plusieurs structures lobulaires (Masso-Welch *et al.*, 2000; McNally & Stein, 2017). Pour la femme,

l'involution est un processus plus progressif, donnant une glande mammaire plus granulaire que le stade pré-grossesse (Hassiotou & Geddes, 2013; McNally & Stein, 2017). La glande mammaire est ainsi considérée comme non-fonctionnelle jusqu'à la prochaine grossesse (Hassiotou & Geddes, 2013).

Finalement, une seconde type d'involution se produit au cours de la ménopause par la diminution des hormones ovariennes (Hassiotou & Geddes, 2013). Elle est accompagnée d'une diminution du tissu granulaire mammaire et d'une augmentation du tissu adipeux (Hassiotou & Geddes, 2013).

Les glandes mammaires des femelles subissent un remodelage continu au cours de leur vie reproductive, enchaînant des phases cycliques de prolifération et d'apoptose, mais aussi de fortes transformations dans le cas de grossesses et d'allaitements, le tout étant régulé finement par les hormones sexuelles et des facteurs de croissance. Il a été récemment proposé que les variations hormonales au cours de la vie d'une femme depuis les cycles menstruelles jusqu'à la ménopause pourraient être considérées comme un facteur de risque du cancer du sein (Xiaohui *et al.*, 2020).

1.2 Le Cancer du sein

1.2.1 Le cancer : définition et mécanismes généraux

Selon l'Organisation mondiale de la Santé le terme cancer est « un terme générique désignant un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. On parle aussi de tumeurs malignes ou de néoplasmes » (OMS, 2022).

D'un point de vue général, le développement du cancer est divisé en trois grandes phases : initiation, promotion et progression (Ito *et al.*, 1995). L'initiation correspond à la modification d'une cellule unique par une mutation génomique stable et transmissible aux cellules filles (Klaunig, 2020). Dans le cas du cancer du sein, la cellule initiée peut-être une cellule souche mammaire, une cellule progénitrice ou une cellule luminale progénitrice (Polyak, 2007). La seconde étape est la promotion, consistant en une expansion clonale sélective par une forte prolifération cellulaire et une absence d'apoptose, entraînant la formation d'une lésion pré-néoplasique (Klaunig, 2020). La dernière étape est la progression, altérant les cellules par de multiples mutations, et entraînant ainsi l'acquisition de nouvelles compétences comme l'échappement au système immunitaire, aux signaux de mort cellulaire, ainsi qu'aux signaux

d'inhibition de croissance rendant la cellule immortelle (Hanahan & Weinberg, 2011). On parle alors de néoplasmes (Klaunig, 2020).

1.2.2 La progression tumorale du cancer du sein

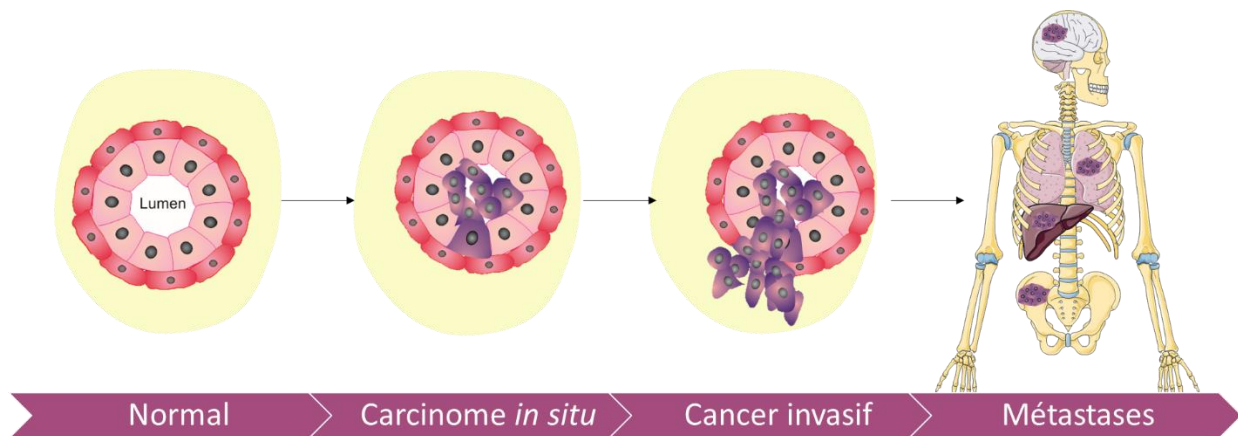


Figure 1-5 : Schéma simplifié de la progression tumorale du cancer du sein.

Dans le cas d'un développement de cancer au niveau d'une cellule épithéliale luminale (sous-type luminaux), plusieurs étapes vont s'enchaîner. Après le processus d'initiation et de promotion, le carcinome *in situ* va se former dans la lumière (*lumen*) du canal ou du bourgeon alvéolaire. Par le processus de transition épithelio-mésenchymateuse, les cellules cancéreuses vont pouvoir sortir de l'épithélium mammaire et ainsi envahir le stroma. L'étape finale est la colonisation de nouveaux organes par ces cellules cancéreuses du sein entraînant la formation de métastases. Adaptée de Isabelle Plante.

Les grandes étapes de la progression du cancer du sein peuvent mener d'une lésion pré-neoplasique à la formation de métastases dans des organes éloignés (Figure 1-5). Tout d'abord, on observe une multiplication anormale des cellules, qui vont envahir la lumière du canal ou du bourgeon alvéolaire ne laissant place qu'à des « microlumen », formant ainsi le carcinome *in situ* (Chatterjee & McCaffrey, 2014). Les cellules peuvent ensuite traverser la membrane basale pour envahir le stroma, devenant ainsi un cancer invasif (Chatterjee & McCaffrey, 2014). Il a été documenté que cette invasion nécessite une transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) des cellules cancéreuses, au cours de laquelle les cellules perdent leurs propriétés épithéliales et acquièrent des caractéristiques de cellules mésenchymateuses, comme la capacité de migration et d'invasion (Polyak, 2007). Cependant, les cellules peuvent aussi envahir le stroma de façon collective, sans EMT (Chatterjee & McCaffrey, 2014). Cette invasion est aussi facilitée par une modulation des cellules myoépithéliales, ainsi que par les signaux paracrines et autocrines issus du stroma (Polyak, 2007). Une fois dans le stroma, les cellules pourront atteindre la circulation sanguine après avoir traversé la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins, dont le nombre augmente par angiogenèse au cours du développement du cancer (Melzer *et al.*, 2017). Les cellules pourront sortir des vaisseaux sanguins afin de coloniser le nouveau tissu, ou organe,

formant ainsi des métastases, impliquant, dans certains cas, une transformation mesenchymo-épithéliale (Liu *et al.*, 2016; Melzer *et al.*, 2017). Il a été montré que le profil génétique des métastases est similaire aux cellules du cancer invasif (Polyak, 2007).

1.2.3 Les statistiques

Le cancer du sein correspond à 25% des nouveaux cas de cancers chez les canadiennes annuellement (Société canadienne du cancer, 2021). De plus, au cours de leur vie, 1 canadienne sur 8 sera diagnostiquée avec un cancer du sein, et 1 sur 34 en mourra (Société canadienne du cancer, 2021).

Même si l'incidence de ce cancer tend à se stabiliser depuis quelques années, en partie dû à un système de prévention plus performant, des campagnes de sensibilisation, des avancements dans les traitements, et la détection précoce dans les pays développés (Government of Canada & Canadian cancer society, 2016), le cancer du sein reste une maladie mortelle, ayant fait 685 000 morts dans le monde en 2020 (OMS, 2022).

1.2.4 Les sous-types de cancer du sein

On parle souvent « du » cancer du sein, mais il en existe une multitude de catégories complexifiant leur compréhension et ainsi que leur traitement. En clinique, les tumeurs mammaires sont caractérisées en grades et stades en fonction de la transformation cellulaire (grade), et du nombre, de la localisation, de la dimension des tumeurs, ainsi que de la présence de métastases (stade). En plus de ces caractéristiques morphologiques, une nouvelle classification a été adoptée, depuis un peu plus d'une 15^{aine} d'années, basée sur la signature moléculaire de ces tumeurs. Les sous-types principaux de cancer du sein sont présentés en ordre croissant de pronostic défavorable : Luminal A, Luminal B, enrichis en HER2 (Her2e), et les triples négatifs, comprenant les *claudin-low*, et les *basal-like* (Harbeck *et al.*, 2019). Connaître le sous-type de cancer permet d'avoir un pronostic plus spécifique et un traitement plus adapté.

1.2.4.1 Les sous-types luminaux : Luminal A et Luminal B

Ce sont des cancers dont les cellules expriment ER et PR, les rendant donc sensibles à ces hormones, et aux traitements hormonaux (Hon *et al.*, 2016). Les sous-types luminaux A et B se distinguent par leur taux de prolifération, mais aussi par l'expression du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2 - *human epiermal growth factor 2*) (Kumar & Aggarwal, 2016). Les

tumeurs du sous-type luminal B sont positives pour HER2, ce qui veut dire que ces cellules expriment la protéine HER2. Elles ont également une croissance plus rapide que les tumeurs du sous-type luminal A, considérées comme HER2 négatif (Harbeck *et al.*, 2019). Les cancers luminaux ont les pronostics les plus positifs (Hon *et al.*, 2016). Cependant, le sous-type luminal B correspond à des tumeurs plus agressives que le sous-type luminal A (Kumar & Aggarwal, 2016).

1.2.4.2 Le sous-type HER2

La caractéristique la plus importante de ce sous-type, comme son nom l'indique, est son grand nombre de copies du gène ERBB2 codant pour la protéine HER2 impliquant une croissance tumorale plus élevée que les cancers luminaux (Harbeck *et al.*, 2019). Les tumeurs de ce sous-type aussi sont négatives pour ER et PR (Hon *et al.*, 2016). Le pronostic de ce cancer est considéré comme intermédiaire, car malgré une croissance rapide, il existe des traitements efficaces ciblant le récepteur HER2 (Harbeck *et al.*, 2019).

1.2.4.3 Les cancers triples négatifs

Les cancers triple-négatifs (TNBC) regroupent plusieurs sous-types comme les *basal-like* et les *claudin-low* (Harbeck *et al.*, 2019; Kumar & Aggarwal, 2016). À la différence des autres sous-types de cancer, plusieurs modèles ont suggéré que les TNBC ne sont pas issus de cellules épithéliales, mais pouvaient provenir des cellules basales comprenant les myoépithéliales progénitrices et les cellules progénitrices ou des cellules bipotentes pour les *basal-like* ; et des cellules souches de la glande mammaire pour les *claudin-low* (Kumar & Aggarwal, 2016; Polyak, 2007; Prat & Perou, 2009). Les tumeurs de ce sous-type sont négatives pour ER, PR et HER2. Les patients atteints de cette forme du cancer du sein ont le pronostic le plus défavorable, car il n'existe pas de traitement ciblé pour ce sous-type (Harbeck *et al.*, 2019; Hon *et al.*, 2016).

1.2.5 L'influence du micro-environnement sur la santé de la glande mammaire

Le micro-environnement des cellules épithéliales de la glande mammaire est indispensable au développement du réseau mammaire. Cette communication bidirectionnelle est cependant dérégulée dans un contexte pathologique comme le cancer du sein (Hoy *et al.*, 2017), avec une composition cellulaire ainsi que des profils d'expression génique différents qu'en condition physiologique (Polyak, 2007).

1.2.5.1 Les adipocytes et les fibroblastes

Il a été démontré que le stroma mammaire pouvait favoriser l'initiation et la progression du cancer du sein (Polyak, 2007). Plus spécifiquement, il a été démontré que les adipocytes favorisent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Hoy *et al.*, 2017). Les fibroblastes jouent aussi un rôle central dans la progression tumorale à travers la réaction desmoplastique, consistant à un fort remodelage de l'ECM via l'activité des MMPs (Albregues *et al.*, 2014). De plus, une augmentation du niveau de fibronectine pendant le cancer du sein participerait à l'EMT (Park & Schwarzbauer, 2014). Le remodelage de l'ECM pendant l'EMT serait aussi médié par les MMPs (Wang *et al.*, 2017b).

De plus, il a été suggéré, chez les femmes obèses, qu'une production supérieure d'aromatase dans l'excès de tissu adipeux mammaire augmenterait la conversion locale de l'androgène en œstrogène par l'aromatase, stimulant la prolifération des cellules cancéreuses sensibles à cette hormone (Hoy *et al.*, 2017). Cette augmentation de l'aromatase est stimulée par la prostaglandine E₂ (PGE₂) qui est associée à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire (Wang *et al.*, 2015). Ainsi, une femme obèse aurait un risque plus élevé de développer un cancer du sein (Burks *et al.*, 2017).

Finalement, afin de permettre leur croissance rapide, les tumeurs nécessitent énormément d'énergie facilement accessible. Elles vont alors puiser dans leur micro-environnement par des mécanismes d'autophagie, de glycolyse et de lipolyse afin de générer des substrats tels que les acides gras (Hoy *et al.*, 2017). Les adipocytes jouent ainsi un rôle nutritif par transfert de substrats vers les cellules cancéreuses, mais pourraient aussi avoir un rôle de modulation du métabolisme tumoral, tout comme les fibroblastes (Hoy *et al.*, 2017).

1.2.5.2 Les cellules immunitaires

La réaction inflammatoire est une des premières réactions du stroma au développement de cancer (Polyak, 2007). Les macrophages participeraient à la promotion de l'angiogenèse et à l'invasion, mais aussi à la propagation des métastases (Hoy *et al.*, 2017; Polyak, 2007). De plus, l'élimination des macrophages du stroma amène une diminution de la progression du cancer du sein, pouvant être une cible thérapeutique intéressante selon les auteurs (Polyak, 2007). La présence des leucocytes dans le micro-environnement varie en fonction du sous-type de cancer. En effet, la réaction immunitaire est plus forte dans les TNBC et les cancers HER2 que pour les sous-types luminaux (Harbeck *et al.*, 2019; Lehmann *et al.*, 2016). De façon intéressante, dans

les phases précoces du cancer du sein, la réponse immunitaire est antitumorale alors qu'elle est pro-tumorale au cours des phases d'invasives (Harbeck *et al.*, 2019).

1.2.6 L'influence de l'environnement

Depuis de nombreuses années, l'influence de facteurs environnementaux externes sur l'initiation et le développement des cancers a été pointée du doigt, et a été récemment définie comme responsable de 80 à 90% des tumeurs malignes (Lewandowska *et al.*, 2019). Pour les cancers du sein, il a été démontré que les facteurs de risques héréditaires correspondaient à seulement 27% des cas (Lewandowska *et al.*, 2019).

Ainsi la majorité des cas de cancer du sein serait liée aux habitudes de vie, comme le tabac, l'alcool, l'absence d'activité physique et le régime alimentaire, mais aussi à l'exposition aux polluants environnementaux (Dumalaon-Canaria *et al.*, 2014). En effet, depuis des dizaines d'années, plusieurs composés de notre quotidien ont été décrits comme des facteurs de risques pour le développement du cancer du sein. Il s'agit, entre autres, des plastifiants (bisphénol A et phtalates), des agents de conservation (parabènes), des retardateurs de flammes, ainsi que certains pesticides (Gray *et al.*, 2017). Le point commun de tous ces composés est leur classification comme perturbateurs endocriniens (PEs).

1.3 Les perturbateurs endocriniens et leurs effets sur la santé humaine

Selon l'OMS : « Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur celui-ci ou sur ses descendants ».

1.3.1 Généralités

La toxicologie traditionnelle répond au dogme édicté par Paracelse « tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison » et dont la courbe dose-réponse est monotonique. À l'opposé, les PEs agissent souvent à faibles doses avec une courbe dose-réponse non-monotonique (ANSES, 2019; Del Pup *et al.*, 2015). En effet, ces composés peuvent avoir leurs effets maximaux à des concentrations très basses, similaires aux concentrations des hormones circulantes, alors que des concentrations supérieures pourront avoir des effets moindres ou différents (ANSES, 2019). Cet effet s'explique, entre autres, par un nombre de récepteurs limités, entraînant la saturation du signal, induisant une absence de réponse supplémentaire au niveau de ces récepteurs à de plus fortes doses (World Health Organization & United nations

environnement programme, 2012). De plus, de fortes doses engendreraient des mécanismes liés à la toxicité dans les cellules et organismes, alors que de faibles doses engendreraient des mécanismes liés aux réponses endocrines.

Plusieurs mécanismes d'action des PEs ont été identifiés (ANSES, 2019; Kabir *et al.*, 2015; La Merrill *et al.*, 2020), comprenant, entre autres :

- Des propriétés agonistes, induisant une réponse similaire à l'hormone naturelle par fixation sur ses récepteurs,
- Des propriétés antagonistes, en se fixant sur les récepteurs hormonaux empêchant ainsi la liaison avec l'hormone endogène,
- Interférence dans la production ou élimination de l'hormone endogène ou de ses récepteurs,
- Interférence avec le transport de l'hormone endogène.

Les mécanismes moléculaires des PEs au niveau des récepteurs nucléaires ont été étudiés au cours des dernières années et synthétisés dans une récente revue (Toporova & Balaguer, 2020). Les composés agonistes sont capables de se fixer sur les récepteurs telles que ER, PR et AR, induisant un changement de conformation de ceux-ci, libérant leurs protéines chaperonnes permettant leur dimérisation et leur fixation sur l'élément de réponse associé dans l'ADN dans le promoteur de leurs gènes cibles, induisant ainsi leur transcription (Toporova & Balaguer, 2020).

1.3.2 Les réglementations

Le mode d'action des PEs, diamétralement opposé aux toxiques conventionnels, force actuellement les organismes réglementaires à repenser leurs méthodes de détermination de seuil de tolérance et d'acceptabilité de ces composés, aussi bien sur les animaux que chez les humains (ANSES, 2019). L'Union européenne a mis en place le règlement REACH en 2006, permettant d'encadrer la commercialisation de substances ayant des effets cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques et ayant des capacités de bioaccumulation ou des propriétés de PEs (European Chemical Agency *et al.*, 2018). La France a été un des pays précurseurs en santé publique en appliquant, dès 2012, le principe de précaution concernant l'utilisation de plusieurs PEs, et en mettant en place la première stratégie nationale sur les PEs (SNPE1). En 2021, l'agence nationale française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a publié une liste de 906 substances à surveiller pour leurs potentielles propriétés de

PEs, tout en proposant une classification des PEs, soient avérés, présumés ou suspectés, dans le cadre d'une stratégie nationale sur les PEs appelée SNPE2. La France participe aussi à la stratégie européenne sur les produits chimiques afin de réglementer l'utilisation des substances à propriétés de PEs des produits du quotidien, ainsi que d'obliger l'identification de la présence de ces composés sur l'étiquette des produits, et ce, d'ici la fin 2022 (European Commission, 2020).

Au Canada, la seule législation actuellement en vigueur est la Loi canadienne sur la protection de l'environnement datant de 1999, dont la compréhension des PEs ne reflète pas les connaissances actuelles. Ainsi, le gouvernement a amorcé en 2018 un travail sur la prévention de la pollution et les substances chimiques (Environnement et Changement climatique Canada, 2018), mais c'est en 2021 que le projet de loi S-5 pour une meilleure protection face aux PEs a été initié (Environnement et Changement climatique Canada, 2021), et devrait être finalisé d'ici la fin 2022 (Environnement et Changement climatique Canada, 2022).

1.3.3 Les interférences sur la santé

L'exposition aux PEs est délétère pour le règne animal, incluant l'humain, pouvant entraîner des pathologies lourdes et mortelles comme le cancer (Yilmaz *et al.*, 2020). Parmi eux, les PEs lipophiles sont particulièrement dangereux pour la santé due à leur propriété de bioaccumulation (Yilmaz *et al.*, 2020), se stockant dans les tissus graisseux pour une certaine période et se libérant dans le cas d'une élimination du tissu par, entre autres, une perte de poids. Ces composés font partie de la catégorie des polluants organiques persistants dont font partie les dioxines (Del Pup *et al.*, 2015).

1.3.3.1 L'impact sur la reproduction

Par leur capacité à altérer le système endocrinien, une grande majorité des impacts des PEs sont observés au niveau des appareils reproducteurs femelle et mâle. C'est dans les années 1990 que les premières études ont associé les PEs à des anomalies chez la faune, comme un changement de sexe chez les vertébrés marins (Cooper & Kavlock, 1997). Depuis, le nombre d'études sur l'implication des PEs dans des anomalies de la reproduction n'a cessé d'augmenter pour se chiffrer autour de 450 articles par année sur le sujet depuis 2018. Cette toxicité reproductive comprend aussi bien des altérations et pathologies au niveau des organes reproducteurs primaires et secondaires, que du ratio mâle/femelle à la naissance (Yilmaz *et al.*, 2020).

La santé reproductive englobe aussi la santé des glandes mammaires qui sont très sensibles aux PEs, de par la présence de récepteurs hormonaux, tels que PR et ER, au cours du développement. Ainsi, il a été suggéré un lien de causalité entre une exposition aux PEs et la formation de lésions précancéreuses dans le cas de cancers hormono-dépendants (Rochefort, 2017). De plus, le micro-environnement tumoral, en particulier les cellules souches mésenchymateuses, peut aussi être la cible des PEs, influençant la tumorigénèse et la progression cancéreuse à travers de signaux paracrine (Burks *et al.*, 2017). Par exemple, il a été montré que le bisphénol A (BPA) augmentait le collagène entre les canaux mammaires, ce qui a été associé à une augmentation de la tumorigénèse (Burks *et al.*, 2017).

Les conséquences de ces PEs peuvent varier en fonction de la période de vie de l'exposition. Des risques élevés de pathologies, comme le cancer, sont associés à une exposition pendant la vie fœtale (Plante *et al.*, 2022).

1.3.3.2 L'origine développementale de la santé et des maladies

Il a maintenant été établi, après 30 années de recherches, qu'une exposition environnementale à des composés chimiques tels que les PEs, durant les stades précoces du développement d'un individu, peut impacter sa santé à long terme et participer au déclenchement de pathologies, comme le cancer, selon le concept de la DOHaD (*Developmental Origin of Health and Diseases*) (Haugen *et al.*, 2015; Lucaccioni *et al.*, 2021).

Plusieurs phases du développement ont été définies comme ayant une sensibilité accrue aux PEs, comme les périodes de la préconception, le développement fœtal et la période périnatale (Gomez-Roig *et al.*, 2021; Yilmaz *et al.*, 2020). La vulnérabilité chez le fœtus et le nouveau-né est explicable, entre autres, par l'immaturation du système de détoxification du foie des nourrissons (Ginsberg *et al.*, 2016; Lucaccioni *et al.*, 2021), la mise en place des organes (Gomez-Roig *et al.*, 2021) et en particulier des gonades (Jazwiec & Sloboda, 2019), mais aussi par la présence de nombreux récepteurs hormonaux avant la présence des hormones endogènes dans le cas de la glande mammaire (Hovey *et al.*, 2002; Howard & Gusterson, 2000). Il a été démontré qu'une grande partie des polluants environnementaux sont capables de traverser le placenta, exposant ainsi le fœtus, et sont détectables dans le lait maternel, exposant le nouveau-né (Gomez-Roig *et al.*, 2021).

Dans le cas de la glande mammaire, la gestation et la période périnatale ont été identifiées comme des fenêtres de sensibilité aux PEs (Fenton, 2006). Deux revues de la littérature ont,

entre autres, recensé plusieurs études démontrant qu'une exposition fœtale à des PEs peut induire une altération de l'épithélium mammaire et une maturation précoce du stroma, pouvant mener à une augmentation du risque de cancer du sein à l'âge adulte (Briskin & Ataca, 2015b; Burks *et al.*, 2017). L'une des premières crises sanitaires appuyant le principe de la DOHaD pour les glandes mammaires est le cas du diéthylstilbestrol (DES), un composé estrogénique. Entre les années 1940 et 1970, le DES a été prescrit massivement à des femmes enceintes pour diminuer le risque de fausses couches. Des années plus tard, cette exposition a été associée à une augmentation du risque de cancer du sein pour les mères, mais également pour leurs filles exposées *in utero*, lorsque celles-ci ont atteint l'âge de 40 ans (Burks *et al.*, 2017). De façon similaire, il a été démontré qu'une exposition fœtale ou périnatale au BPA, à la dioxine, aux pesticides organochlorés, aux retardateurs de flammes bromés, mais aussi aux phtalates pouvaient altérer le développement de la glande mammaire et/ou augmenter les risques de cancer du sein chez les rongeurs et/ou les femmes (Briskin & Ataca, 2015b; Burks *et al.*, 2017; Fenton *et al.*, 2012; Gouesse *et al.*, 2021; Plante *et al.*, 2022; Rodgers *et al.*, 2018).

1.3.3.3 La modulation du métabolisme des lipides

Il a aussi été montré que les PEs pouvaient avoir des effets obésogènes, se caractérisant par une augmentation de l'adipogenèse et l'accumulation lipidique, altérant ainsi l'homéostasie énergétique (Yilmaz *et al.*, 2020). Par exemple, il a été démontré que le BPA, le DES et la genistéine avaient des propriétés obésogènes, tel que démontrés par une augmentation du nombre d'adipocytes et de la capacité de stockage du gras (Burks *et al.*, 2017). De plus, il a été montré que le BPA était capable d'augmenter le poids des tissus adipeux en plus d'augmenter l'expression de marqueurs adipogéniques comme C/EBP α , LPL et PPAR γ (Burks *et al.*, 2017). Une exposition *in vitro* de préadipocytes au BPA, ou son plastifiant de remplacement, le bisphénol S (BPS), induisent une activité oestrogénique et une augmentation de marqueurs adipogéniques (Burks *et al.*, 2017; Plante *et al.*, 2022). Bien que, à notre connaissance, aucune étude n'a regardé les effets des PEs sur le stroma des glandes mammaires, ces études suggèrent qu'une exposition à des PEs pourrait déréguler son développement et/ou ses fonctions.

1.4 Les plastifiants

1.4.1 Généralités

Le premier composé plastique a été inventé au XIX^{ème} siècle, et depuis des décennies, l'industrie chimique n'a pas cessé d'élargir la diversité de ces polymères afin de répondre aux besoins du marché et de diminuer les coûts de production. Ils sont présents dans notre maison, dans les jeux de nos enfants, dans nos ordinateurs, dans notre réfrigérateur, nos vêtements, mais aussi dans le matériel médical. Les plastifiants sont des composés ajoutés aux plastiques pour réduire leur dureté et leur densité, tout en le rendant plus flexible. Ils représentaient un tiers des adjuvants consommés dans les années 2000 (Rahman & Brazel, 2004), mais jusqu'à 50% en 2013 aux États-Unis (Wypych, 2017).

De par leurs propriétés physico-chimiques et leurs liaisons secondaires avec les polymères de plastique, les plastifiants permettent de (Czogala *et al.*, 2021; Rahman & Brazel, 2004) :

- Réduire l'interaction des chaînes de polymère au sein du maillage tridimensionnel que forme le plastique ;
- Lubrifier les chaînes de polymères leur permettant de bouger ;
- Augmenter l'espace entre les chaînes de polymères facilitant leur déplacement.

Il existe deux catégories de plastifiants (Rahman & Brazel, 2004):

- Les internes : les plastifiants sont totalement intégrés aux plastiques par des liaisons covalentes. Cela entraîne des problèmes de stabilité du composé à fortes températures. Ils n'ont cependant pas les meilleures propriétés plastifiantes (Czogala *et al.*, 2021).
- Les externes : ces plastifiants ne sont pas liés de façon covalente aux polymères, entraînant leurs retraits du plastique par évaporation, migration ou extraction. Ils sont aussi altérés par la température, mais de façon moins sensible que les internes.

L'exposition humaine aux plastifiants externes est plus élevée puisqu'ils se libèrent plus facilement de la matrice, entraînant des expositions à ces plastifiants par plusieurs façons. Cela peut intervenir lors de la fabrication de celui-ci ou lors de leurs utilisations, par relargage (*leaching*), migration et évaporation (Rahman & Brazel, 2004). Dans la majorité des plastiques

actuels, tels que le chlorure de polyvinyle (PVC), il est courant de trouver plusieurs plastifiants dans le même plastique impliquant la présence de plastifiants externes en plus de la présence de plastifiants internes.

1.4.2 Le phtalate de diéthylhexyle, le DEHP

1.4.2.1 La famille des phtalates

Les phtalates représentaient 75% du marché des plastifiants en 2006 (Markarian, 2007). On les retrouve aussi bien dans les voitures, le matériel électronique, les produits d'étanchéité et les adhésifs, les planchers en PVC, les jeux pour enfants et les contenants alimentaires, que dans les produits médicaux comme les poches de sang et les cathéters (**Tableau 1-1**) (Del Pup *et al.*, 2016; Lagerberg *et al.*, 2015; Shu *et al.*, 2019; Wypych, 2017).

La courte chaîne des phtalates leur permet d'être mélangés rapidement lors de la fabrication des plastiques. Cependant, leurs liaisons non-covalentes vont induire leur relargage plus ou moins rapidement du plastique, dépendamment des contraintes que celui-ci va subir, par exemple lors d'une augmentation de la température (Zhang & Chen, 2014). En effet, il a été montré que plusieurs phtalates, dont le DEHP, pouvaient être détectés dans l'eau d'une bouteille en PET 44 jours après l'embouteillage, et que ce relargage augmentait majoritairement avec le temps, mais aussi avec la température de stockage (Keresztes *et al.*, 2013). De façon intéressante, la quantité de phtalates, dont le DEHP, relarguée par les bouteilles en PET est augmentée dans le cas de PET recyclé (Mukhopadhyay *et al.*, 2022). C'est aussi le cas pour les distributeurs d'aliments pour bébé (*baby feeder*), où le relargage de la plupart des phtalates est augmenté par les traitements thermiques (Surhio *et al.*, 2017).

Tableau 1-1 : Présence de phtalates en fonction du type de plastiques

Phtalate de diethylhexyle (DEHP), phtalate de diéthyle (DEP), phtalate de diisobutyle (DiBP), phtalate de di-n-butyle (DBP), phtalate de diméthyle (DMP) et phtalate de benzyle et de butyle (BBP).

N°	Types de plastique	Utilisations	Phtalates	Références
1	Polyéthylène téréphtalate (PET)	Bouteilles d'eau, de soda, d'huile de cuisson, de condiments (type ketchup), sacs de cuisson, barquettes alimentaires	DEP, DMP, DBP, DEHP DiBP, DBP, BBP, DEHP	(Montuori <i>et al.</i> , 2008) (Keresztes <i>et al.</i> , 2013)
2	Polyéthylène haute densité (PEHD)	Bouteilles de lait, jus, détergents, gels douche et sacs d'épicerie jetables		
3	Chlorure de polyvinyle (PVC)	Jeux pour enfants, planchers en vinyle, pellicules alimentaires, matériel médical	DEHP, DnBP, DMP, BBP, DnOP,	(Andjelkovic <i>et al.</i> , 2021)
4	Polyéthylène basse densité (PEBD)	Sacs de congélation, poubelles, sachets d'eau (Inde), poches zippées alimentaires, pellicules intérieures des contenants Tétrapak®	DEP, DEHP, BBP, DnOP	(Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2022)
5	Polypropylène (PP)	Biberons, gourdes souples pour le sport, pots de yogourt, planches à découper en plastique, masques de procédure, serviettes hygiéniques et tampons	DEHP, DEP, DiBP, BBP, DnOP DEP	(Vimalkumar <i>et al.</i> , 2022) (Paiva <i>et al.</i> , 2021)
6	Polystyrène (PS)	Vaisselle jetables en plastique, tasses et couvercles à café jetables, barquettes de viande et poisson		
7	Polycarbonate, résine époxydes, téflon (PTFE), mélanine, caoutchoucs	Surface plastique des boîtes de conserve, bombons d'eau, casseroles et moules de cuisson, tétines et sucres pour bébés	PTFE : DEHP, DiBP et DBP	(Bradley <i>et al.</i> , 2007)

1.4.2.2 Le DEHP, le principal phtalate

Le DEHP a été le plus médiatisé et le plus étudié des phtalates, étant le sujet principal de 3 962 articles sur *Pubmed* (recherche « DEHP [Title/Abstract] ») sur les 4 256 résultats obtenus pour la recherche « phthaltes [Title/Abstract] ». De plus, le DEHP est considéré comme le plus grand contaminant de la famille des phtalates avec des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 600 ppm dans les produits cosmétiques, comme les parfums (Kim *et al.*, 2020), jusqu'à 3 µg/L dans les bouteilles d'eau (Keresztes *et al.*, 2013), jusqu'à 7,7 µg/g dans les masques de procédures (Vimalkumar *et al.*, 2022) et dans les produits alimentaires, avec un maximum détecté de 19,8 mg/kg de DEHP dans de l'huile de noix (Garcia-Fabila *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2019). Cette présence entraîne une exposition universelle, dont les taux de phtalates maximum pour le DEHP ou ses métabolites sont retrouvés dans l'urine de femmes pendant la grossesse et après l'accouchement (Fisher *et al.*, 2019) et d'enfants de 6 à 11 ans (Schwedler *et al.*, 2017), mais aussi dans le lait maternel (Hogberg *et al.*, 2008).

1.4.2.3 Le relargage du DEHP

Le relargage du DEHP est d'autant plus fort lorsque la température est élevée et que le plastique est en contact avec des éléments lipophiles (Lawson-Wood, 2016). Ainsi ce phénomène est particulièrement problématique pour le DEHP, car il est contenu dans un grand nombre de plastiques à usage médical. La présence de DEHP a été mesurée dans des perfusions d'émulsion lipidique (20%) à des concentrations pouvant atteindre 592 µg/mL (Loff *et al.*, 2002). L'exposition au DEHP dans les services de néonatalogies comprend aussi un relargage de ces composés du plastique présent dans les systèmes de respiration artificiels (Jenkins *et al.*, 2021).

1.4.2.4 L'exposition environnementale

Le DEHP, ainsi que les autres phtalates sont des polluants organiques ubiquitaires représentant un risque pour l'environnement (Baloyi *et al.*, 2021). Le DEHP a été détecté dans les eaux stagnantes ou des rivières en France, en Iran, en Uganda, en Inde et en Chine (Baloyi *et al.*, 2021), ainsi que dans l'eau de pluie et/ou des sédiments au Japon, au Canada et aux États-Unis (Erythropel *et al.*, 2014). Le DEHP, ou son métabolite principal ont été retrouvés dans les animaux marins comme les poissons, les mollusques, et les crevettes (Hart *et al.*, 2020), ainsi que des mammifères marins tels que la baleine bleue et le rorqual commun (Routti *et al.*, 2021).

Malheureusement, il a aussi été montré que les phtalates, et en particulier le DEHP, pouvaient avoir une action de PEs sur ces organismes aquatiques (Baloyi *et al.*, 2021).

1.4.2.5 L'exposition humaine

Le DEHP et ses métabolites sont des grands contaminants de notre alimentation. Le pain est considéré comme la plus grande source alimentaire de DEHP pour les enfants et les adultes dans une étude belge (Sioen *et al.*, 2012a), mais il est aussi retrouvé dans le café en capsule (maximum de 13.12 µg/L) (Di Bella *et al.*, 2014), et les aliments riches en lipides (Kappenstein *et al.*, 2012), comme la margarine (moyenne de 32 µg/L) (Sidlovska *et al.*, 2017). L'humain est aussi exposé au DEHP par voie dermique *via* les vêtements en coton (Li *et al.*, 2019), les serviettes hygiéniques, protège-slips et tampons (Gao & Kannan, 2020), mais aussi les couches pour bébés (Park *et al.*, 2019).

Ainsi l'exposition générale moyenne a été estimée dans les pays développés à 2 mg/jour/individu, mais cette moyenne est augmentée lors d'un traitement en milieu hospitalier (Del Pup *et al.*, 2016). En effet, il a été montré qu'une transfusion sanguine d'un patient en service de traumatologie induisait à elle seule une exposition de 8.5 mg/kg/jour (U.S. Food and Drug Administration, 2001). Plusieurs études dans les années 80 ont mesuré en moyenne entre 50 et 200 µg de DEHP/ml dans les poches en PVC de plasma (U.S. Food and Drug Administration, 2001). Une étude récente a déterminé que 100% des 66 types de masques de procédures testés contenaient du DEHP avec une concentration maximale à 7.67 µg/g, augmentant ainsi l'exposition humaine mondiale depuis le début de la pandémie (Vimalkumar *et al.*, 2022).

La population la plus en contact avec le DEHP est les nourrissons prématurés par leur environnement de PVC : sonde gastrique, intubation respiratoire et perfusion sanguine (Rahman & Brazel, 2004). Il a été montré qu'un prématuré de 2 kg pouvait recevoir un peu plus de 16 mg de DEHP en 24h *via* sa perfusion nutritive (Rahman & Brazel, 2004), pour une estimation journalière maximale supérieure à 10 mg/kg de poids corporels (Loff *et al.*, 2002). Une étude plus récente définit la moyenne d'exposition des prématurés en néonatalogie à 2 mg/kg/jour (Jenkins *et al.*, 2021).

1.4.2.6 La toxicocinétique

a. L'absorption

L'absorption quotidienne du DEHP se fait majoritairement par voie orale par sa présence dans les aliments et l'eau et l'ingestion des poussières de maison. Pour les enfants en bas âge, l'absorption par voies respiratoires est 5 fois supérieure à celle des adultes, et leur exposition est augmentée par la mise à la bouche de leurs jouets (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022; Ginsberg *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2018). Dans une revue de la littérature, il a été reporté que 30% d'une dose orale est absorbée par l'organisme des rongeurs, tout comme certaines espèces de primates, et cette absorption peut augmenter chez un organisme immature (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022). Chez l'humain, il a été estimé que 70% d'une dose ingérée par voie orale sera absorbée dans l'organisme (Koch *et al.*, 2005). L'exposition dermique, entre autres par les cosmétiques (Kim *et al.*, 2020; Koniecki *et al.*, 2011), est également une source non négligeable de DEHP (Ginsberg *et al.*, 2016; Hopf *et al.*, 2014). Peu d'études se sont intéressées à la voie respiratoire, malgré une présence du DEHP dans l'air (Quintana-Belmares *et al.*, 2018). La quantité de DEHP absorbé peut être plus importante dans le cas d'expositions liées en milieu de travail tel que les ongleries (Frery *et al.*, 2020; Hines *et al.*, 2011).

b. La distribution

Chez l'humain, le DEHP a été détecté dans le sérum et l'urine (Pinguet *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019), mais aussi dans le gras abdominal (Jaeger & Rubin, 1970). Chez le rongeur, une revue de la littérature de l'ATSDR rapporte que le DEHP est détectable dans le foie, l'intestin, les reins, les muscles et le gras, mais aussi dans le poumon dans le cas d'une absorption respiratoire, 4h après une exposition orale, dermique ou respiratoire à du DEHP marqué (^{14}C)-DEHP (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022). Lors d'une exposition intraveineuse, le DEHP a été retrouvé une heure plus tard dans le foie, l'intestin, les muscles, le tissu adipeux et la vessie, par ordre décroissant de proportion (Tanaka *et al.*, 1975). Il a aussi démontré que l'élimination du DEHP dans le gras était un processus plus lent que pour les autres tissus, car après 168h, le DEHP est majoritairement détecté dans le tissu adipeux (Tanaka *et al.*, 1975). Cependant, cette distribution semble varier en fonction de l'âge de l'individu lors de l'exposition (Kurata *et al.*, 2012).

Une exposition au DEHP lors de la grossesse induit également une exposition du fœtus. En effet le DEHP a la capacité de traverser le placenta (Mose *et al.*, 2007) et a été détecté dans

le sang de cordon chez l'humain (Latini *et al.*, 2003). Une exposition orale de rats gestantes au DEHP a entraîné sa détection ou celle de son métabolite primaire dans le liquide amniotique et le placenta (Calafat *et al.*, 2006; Stroheker *et al.*, 2006), mais aussi dans le foie et les reins fœtaux, 24h après l'exposition, avec une concentration supérieure dans le sang du fœtus comparativement à celui de la mère (Kurata *et al.*, 2012). Pour finir, l'exposition maternelle au DEHP est transmise au nourrisson lors de l'allaitement. En effet, le DEHP a été détecté dans le lait maternel chez l'humain (Frederiksen *et al.*, 2007; Ginsberg *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2006).

c. Le métabolisme

Le DEHP a une demi-vie courte et sa présence concorde avec une exposition récente (Ginsberg *et al.*, 2016). Une fois dans l'organisme, le DEHP va subir sa première transformation pour former son métabolite primaire, soit une hydrolyse en phtalate de mono-ethylhexyle (MEHP; **Figure 1-6**), qui sera plus facilement absorbable par l'organisme, et tout particulièrement au niveau du petit intestin (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022). Cette transformation enzymatique a été observée dans le foie, le pancréas, l'intestin, les poumons, les testicules, la peau et le plasma (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022). Il a été démontré que le maximum de capacité enzymatique (V_{max}) de l'hydrolase dans les microsomes de foie était similaire entre l'humain et le rat, mais que la constante de Michaelis-Menten (K_m) était deux fois plus forte chez l'humain, indiquant une moins bonne affinité chez l'humain que chez le rat (Ito *et al.*, 2014; Ito *et al.*, 2005).

Le MEHP est ensuite métabolisé par une série d'oxydation entraînant la formation de phtalate de mono-(2-ethyle-5-hydroxy-hexyle) (MEHHP ou 5OH-mEHP), de phtalate de mono-(2-ethyle-5-carboxy-pentyle) (MECPP ou 5cx-MEPP), de phtalate de mono-(2-ethyle-5-oxo-hexyle) (MEOHP ou 5oxo-MEHP) (5cx-mEPP) ainsi que de phtalate de mono-(2-carboxymethyle-hexyle) (MCMHP ou 2cx-MMHP) (Frederiksen *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2021). Les proportions de ces métabolites peuvent varier au cours de la grossesse chez la femme (Zhao *et al.*, 2018).

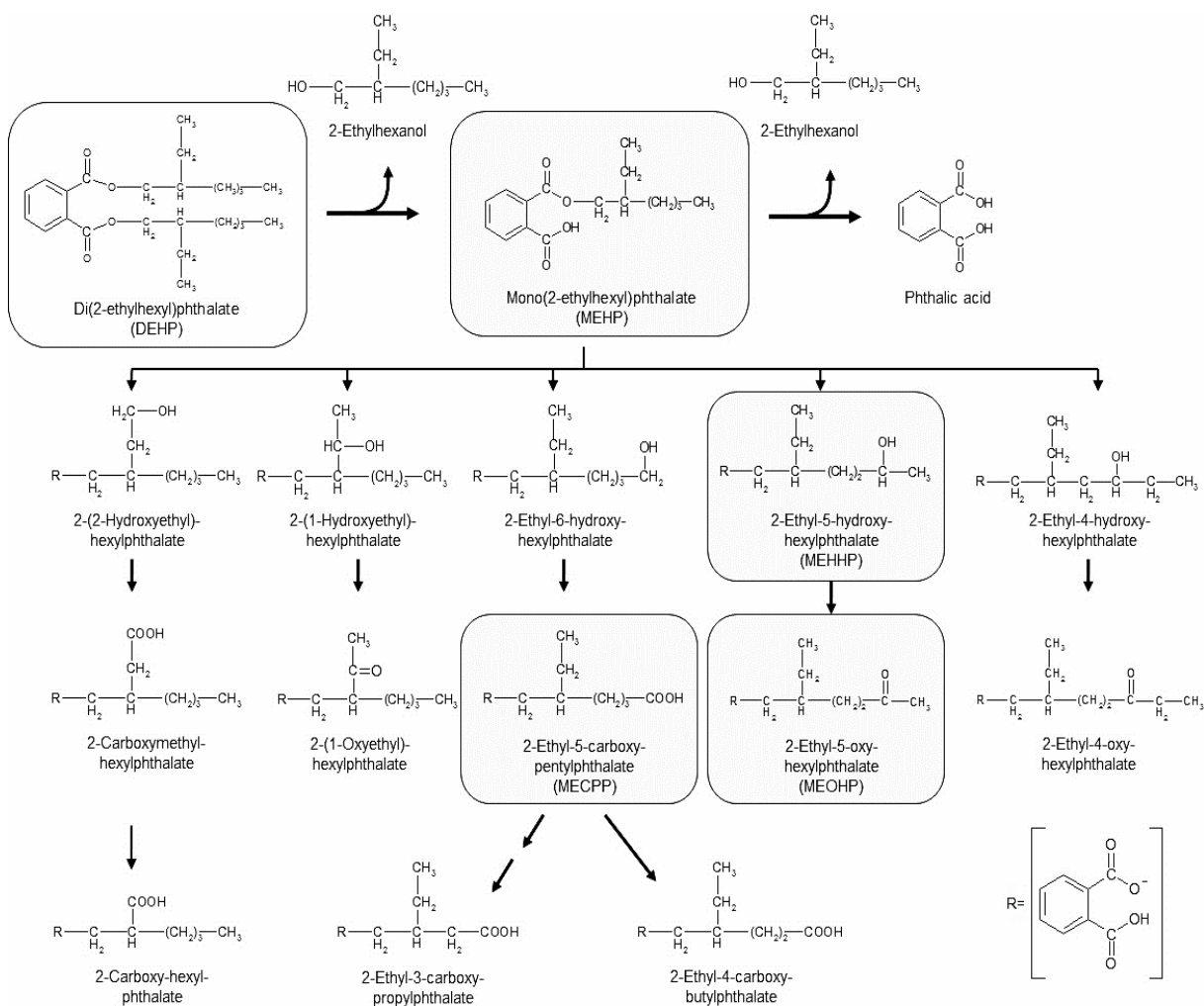


Figure 1-6 : Profil de métabolisation du DEHP

Issue de (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022).

d. L'élimination

La demi-vie d'élimination du DEHP et du MEHP varie en fonction du type d'exposition (oral/intraveineuse), l'espèce, et le fluide analysé, selon les données recueillies par l'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022).

Chez les rongeurs et les primates, suite à une exposition orale, les métabolites primaires ou secondaires du DEHP ont été retrouvés dans les urines et, dans une proportion plus importante, dans les selles chez le ouistiti (Daniel & Bratt, 1974; Kurata *et al.*, 2012). Chez l'humain, les métabolites du DEHP ont été détectés dans les urines de la population générale (Barr *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2019), et de façon plus importante pour les enfants en bas âge (Schwedler *et al.*, 2017), mais aussi dans l'urine de femmes enceintes (Lee *et al.*, 2020; Martinez

et al., 2020a). Le DEHP a été aussi détecté dans la transpiration humaine, et dans 60% des cas cette détection n'était pas observée dans le sérum des mêmes individus (Genuis *et al.*, 2012)

1.4.2.7 Les impacts sur la santé

L'exposition humaine chronique au DEHP est d'autant plus préoccupante que ce composé a été classé en 1980 comme potentiellement cancérigène pour l'humain (Rahman & Brazel, 2004), et a été défini comme un PE pour son impact sur les glandes endocrines des mâles et femelles, en particulier *via* des expositions *in utero* et périnatales (Delbes *et al.*, 2022; Hlisnikova *et al.*, 2020; Lucaccioni *et al.*, 2021; Marlatt *et al.*, 2022; Nardelli *et al.*, 2015b; Plante *et al.*, 2022; Radke *et al.*, 2019; Repouskou *et al.*, 2021; Sedha *et al.*, 2021).

Une revue de la littérature a rapporté qu'une exposition de rats femelles au DEHP pendant la gestation induisait une diminution du niveau de testostérone des ratons mâles et de l'estradiol chez les femelles à PND60 (Martinez-Arguelles *et al.*, 2013). De plus, une exposition au DEHP pendant la gestation et la lactation entraînerait une diminution de la distance anogénitale, ainsi qu'une augmentation de l'incidence des hémorragies testiculaires chez les ratons mâles (Nardelli *et al.*, 2017), alors qu'une exposition au DEHP ou au MEHP diminuerait les niveaux d'estradiol et de progestérone chez les femelles (Hlisnikova *et al.*, 2020). De plus, les altérations du système reproducteur femelle suite à l'exposition au DEHP ne se limitent pas uniquement à la génération exposée, mais peuvent affecter la génération F3, démontrant un impact transgénérationnel du DEHP (Pocar *et al.*, 2017a). Chez l'humain, la présence des métabolites du DEHP dans l'urine de femmes enceintes a été associée à des avortements spontanés (Radke *et al.*, 2019) et des naissances prématurées (Kahn *et al.*, 2020). Chez de jeunes filles, une exposition au DEHP pendant la vie *in utero*, mesuré par le dosage de MEHP dans l'urine maternelle, a été associée à une apparition précoce de poils pubiens (Watkins *et al.*, 2014).

Des effets ont aussi été observés au niveau de la glande mammaire. Il a été montré qu'un traitement *in vitro* au DEHP (10 et 100 μM) induisait une augmentation de la prolifération des cellules isolées de la glande mammaire de souris gestantes (Li *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré qu'une exposition au DEHP dans des lignées cancéreuses du sein entraînait leur prolifération cellulaire par augmentation de l'expression des récepteurs ER α (Chen & Chien, 2014) et favorisait le processus d'invasion (Zhang *et al.*, 2016). Une récente étude a montré une association entre la présence de métabolites primaires et secondaires du DEHP dans l'urine de

femme et le risque de cancer du sein de façon dépendante de l'ethnie et du statut hormonal (Wu *et al.*, 2021).

1.4.2.8 La réglementation

Au Canada, le DEHP (CAS 117-81-7) a été évalué en 1994 dans le « Programme d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire » ; le rapport a conclu qu'il représentait un risque pour la santé. La dose journalière acceptable (TDI) a été établie à 50 µg/kg/jour et la valeur de référence (RfD) à 20 µg/kg/jour (Giovanoulis *et al.*, 2018b), rendant l'exposition des prématurés, entre 2 et 10 mg/kg/jour (décrite dans la section 1.4.2.5), alarmante. En 2009, le DEHP a été ajouté à la liste des ingrédients interdits dans les produits cosmétiques, conformément à l'article 16 de la Loi sur les aliments et drogues. En 2011, la concentration de DEHP a été limitée à 0.1% du poids des produits de puériculture. Cependant, le Canada a conclu en 2008 que « les expositions par voie alimentaire ne représentent pas un risque pour la santé humaine ». Le DEHP, ainsi que 13 autres phtalates ont été inclus dans la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999), avec comme objectif de limiter la présence du DEHP à 0.1% de la masse du produit final (Santé Canada & Environnement et Changement climatique Canada, 2020). Ce projet n'a pas été appliqué au moment du dépôt final de cette thèse, car les commentaires du public sont ouverts jusqu'en décembre 2022. Actuellement les phtalates ne font pas parti de la liste des substances toxiques interdites au Canada (Gouvernement du Canada, 2012).

En comparaison, en Europe, la limitation de 0.1% du poids du produit pour le DEHP, le DBP, le BBP et le DIBP dans les objets de puériculture ont été mis en vigueur en 2000 (European Commission, 1999). En 2018, un nouvel amendement a été adopté, limitant la présence des quatre mêmes phtalates à 0.1% du poids du produit, individuellement ou en combinaison, dans tous les produits en plastiques (European Commission, 2018). La mise en place de cette réglementation a rapidement impacté l'industrie du matériel médical. En effet, en 2015 le pourcentage en masse de DEHP était de 28% dans les cathéters (Bernard *et al.*, 2015), alors qu'il était de 0.25% en 2018 (Bernard *et al.*, 2018a).

1.4.3 L'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle, le DINCH

Étant donné son risque pour la santé humaine et l'exposition quotidienne que nous subissons, le DEHP est un vrai enjeu de santé publique. Ainsi, afin de réduire notre exposition, mais surtout de se conformer aux nouvelles réglementations en vigueur, les industriels ont créé des plastifiants de remplacement du DEHP.

Une des alternatives, l'ester d'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle, connu sous l'appellation commerciale Hexamoll® DINCH, a été mis sur le marché par la compagnie BASF en 2002. Tout comme le DEHP, ce plastifiant est ajouté au PVC et utilisé dans le matériel médical, comme les poches de sang, les jeux pour enfants, ainsi que les contenants alimentaires (BASF, 2017). Cependant, même si le DINCH a subi des tests par BASF avant son utilisation industrielle, le niveau de connaissances en termes de toxicocinétique et de risque pour la santé et l'environnement est limitée. En effet, une recherche Pubmed ne résulte qu'en 142 articles sur le DINCH (recherche « DINCH [Title/Abstract] »).

1.4.3.1 Le relargage

Une des premières études s'intéressant au phénomène de relargage du DINCH a montré l'absence de DINCH dans de l'eau désionisée après 1 et 3 semaines de contact, alors que le DEHP est détectable dans les mêmes conditions dès la 1^{re} semaine (Kastner *et al.*, 2012). Cependant, le DINCH étant lipophile, sa proportion relarguée est augmentée si le produit en contact avec le PVC à une forte teneur en gras, comme l'huile de tournesol et les fromages gras (EFSA, 2006b). Il a été montré que le DINCH contenu dans du matériel médical en PVC migrerait dès les premières 24h de contact avec une solution d'éthanol 50% à 40°C ou à 25°C ; cette migration était similaire aux propriétés de relargage du DEHP dans la condition à 40°C (Bernard *et al.*, 2015; Bernard *et al.*, 2018a). Une autre étude a déterminé qu'un stockage de 24h à température ambiante suffisait au transfert DINCH et son métabolite primaire, l'ester d'acide monoisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylique (MINCH), dans le sang d'une poche de transfusion (Lagerberg *et al.*, 2015).

1.4.3.1 L'exposition humaine

Le DINCH et ses métabolites ont été retrouvés dans les planchers en PVC, la poussière de maison, le matériel médical, l'air et la nourriture (Bourdeaux *et al.*, 2016; EFSA, 2006b; Fromme *et al.*, 2016; Giovanoulis *et al.*, 2018b; Malarvannan *et al.*, 2019; Plichta *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2019). L'exposition humaine n'a fait qu'augmenter depuis les 20 dernières années, passant d'un niveau indétectable dans les urines en 1999, à 0.1 µg/L de la somme des métabolites du DINCH en 2009, à 0.9 µg/L en 2017 (Kasper-Sonnenberg *et al.*, 2019b; Schutze *et al.*, 2014).

1.4.3.2 La toxicocinétique

a. L'absorption

La voie d'absorption principale du DINCH est l'ingestion. Cependant il a aussi été montré que l'absorption peut se faire par les voies respiratoire et dermique (Giovanoulis *et al.*, 2018b; Weiss *et al.*, 2018).

b. La distribution

Très peu d'études se sont intéressées à la distribution du DINCH après une simple exposition, et encore moins pour une exposition chronique. Les études préliminaires de BASF ont montré que les tissus cibles suite à une exposition orale au DINCH chez le rat étaient le foie, les reins, et les glandes thyroïdes et mammaires (Bhat *et al.*, 2014). Une étude publiée par BASF a montré que le DINCH pouvait être retrouvé dans plusieurs fluides et tissus comme, entre autres, le sang, les poumons, le cerveau, le cœur, les ovaires, les testicules, la vessie et le tissu adipeux chez le rat 1 h après une exposition orale de 1000 mg/kg, et ce, jusqu'à minimalement 28 h (Langsch *et al.*, 2018). Malheureusement, les auteurs n'ont pas regardé la présence des différents métabolites dans ces tissus. Chez l'humain, les métabolites du DINCH ont été retrouvés dans l'urine (Frederiksen *et al.*, 2022; Gkrillas *et al.*, 2021), ainsi que dans les cheveux (Yin *et al.*, 2019). À notre connaissance, ces métabolites n'ont pas été étudiés dans d'autres fluides ou organes.

c. Le métabolisme

Le DINCH est rapidement métabolisé en MINCH (**Figure 1-7**). Les résultats de BASF estimaient sa demi-vie entre 4 et 12 h (Bhat *et al.*, 2014). Le DINCH lui-même n'a jamais été mesuré dans les études d'expositions de la population humaine (Correia-Sa *et al.*, 2017a; Fromme *et al.*, 2016; Giovanoulis *et al.*, 2016a; Plichta *et al.*, 2022; Volkel *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2021). Le MINCH peut ensuite subir une série d'oxydation (**Figure 1-7**) afin de former l'ester de 1,2-(cyclohexane-dicarboxylate) mono-(7-oxo-4-méthyle) octyle (oxo-MINCH), l'ester de 1,2-(cyclohexane-dicarboxylate)-mono-(7-hydroxy-4-méthyle) octyle (OH-MINCH), et l'ester de 1,2-(cyclohexane-dicarboxylate)-mono-(7-carboxylate-4-méthyle) heptyle (cx-MINCH), dont les demi-vies sont similaires (Plichta *et al.*, 2022; Volkel *et al.*, 2016). L'ensemble des métabolites du DINCH précédemment cités peuvent s'hydrolyser en un métabolite non spécifique, l'acide de cyclohexane-1,2-dicarboxylique (CHDA) (Koch *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2012). Le CHDA semble être le métabolite principal du DINCH (Volkel *et al.*, 2016), mais n'a cependant pas été mentionné

dans l'article de 2022 de la même équipe de recherche (Plichta *et al.*, 2022). Le MINCH est le métabolite le moins retrouvé dans les urines humaines, comparativement aux métabolites secondaires (Fromme *et al.*, 2016; Volkel *et al.*, 2016), et n'est pas systématiquement mesuré dans les urines humaines (Correia-Sa *et al.*, 2017a; Frederiksen *et al.*, 2022; Giovanoulis *et al.*, 2016a). En effet, le MINCH a une demi-vie relativement plus courte que les métabolites secondaires (Plichta *et al.*, 2022; Volkel *et al.*, 2016).

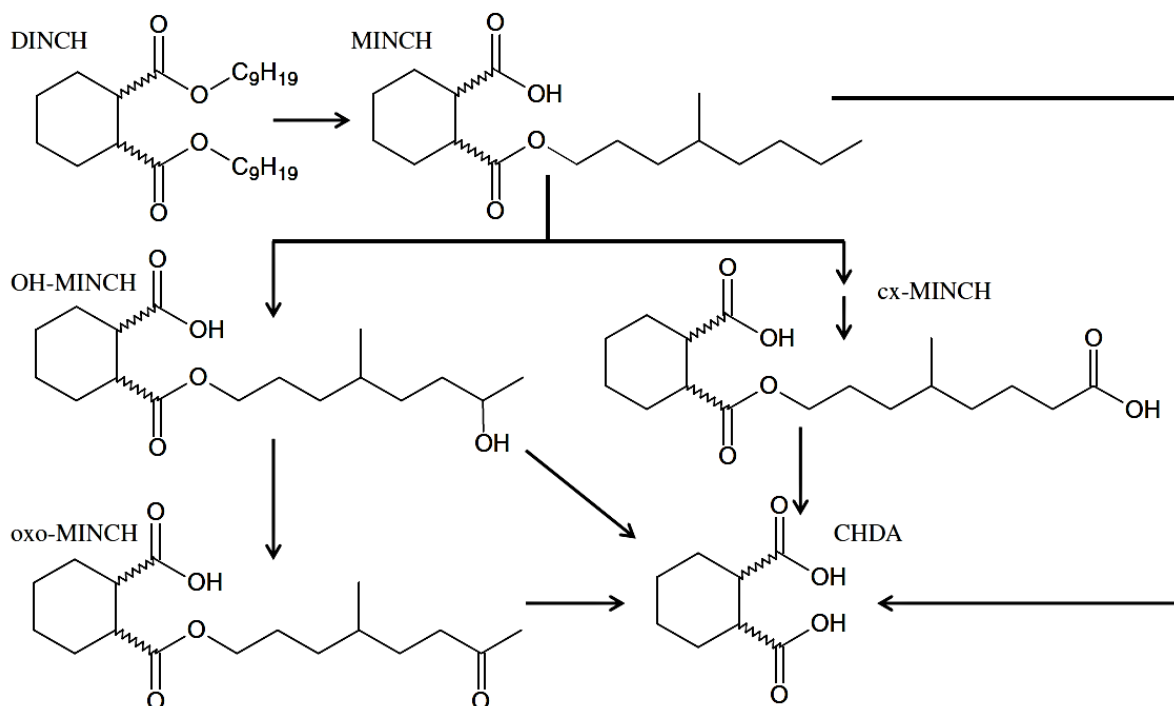


Figure 1-7 : Le profil de métabolisation du DINCH

L'ester d'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique de diisononyle (DINCH), l'acide monoisononylcyclohexane-1,2-dicarboxylique (MINCH), l'ester de 1,2-(cyclohexane-dicarboxylate)-mono-(7-oxo-4-méthyle) octyle (oxo-MINCH), l'ester de 1,2-(cyclohexane-dicarboxylate)-mono-(7-hydroxy-4-méthyle) octyle (OH-MINCH), l'ester de 1,2-(cyclohexane-dicarboxylate)-mono-(7-carboxylate-4-méthyle) heptyle (cx-MINCH) et l'acide de cyclohexane-1,2-dicarboxylique (CHDA). Issue de (Koch *et al.*, 2013)

d. L'élimination

Le DINCH est en partie éliminé par les urines, sous forme de métabolites (Gkrillas *et al.*, 2021). Il a été montré que 100% des femmes enceintes espagnoles (60 femmes) et françaises (479 femmes) présentaient du OH-MINCH et du oxo-MINCH dans leurs urines (Martinez *et al.*, 2020a; Philippat *et al.*, 2021), et que 98.6% des femmes enceintes suédoises (1674 femmes) présentaient du oxo-MINCH dans leurs urines (Shu *et al.*, 2019). Ces mêmes métabolites secondaires ont été mesurés dans l'urine de 30 à 74% de femmes enceintes israéliennes,

coréennes et thaïlandaises (Lee *et al.*, 2020; Machtinger *et al.*, 2018). Les métabolites du DINCH ont été détectés dans l'urine de nouveau-nés (Urbancova *et al.*, 2019), de nouveau-nés aux soins intensifs (Pinguet *et al.*, 2019), de nourrissons et de leur mère (Frederiksen *et al.*, 2022), ainsi que dans l'urine d'enfants de 3 à 11 ans (Lee *et al.*, 2021; Schwedler *et al.*, 2020a). Lors d'une exposition orale de porcelets, le DINCH commence à être éliminé dans les urines sous forme de métabolites, majoritairement sous forme de MINCH et OH-MINCH, 1 h après l'exposition, mais le pic d'élimination est atteint à 24 h post-exposition, alors que ce même pic est atteint à 3 h pour le DEHP (Plichta *et al.*, 2019). Pour les volontaires humaines, une grande variabilité interindividuelle est observée. Seulement 19% du DINCH ingéré était éliminé après 36 h d'exposition chez certains volontaires humains, avec un pic d'élimination à 3h pour le OH-MINCH, et à 30 h pour le MINCH, le cx-MINCH et l'oxo-MINCH (Plichta *et al.*, 2022). D'autres études d'exposition de volontaires humains ont montré que le pic d'élimination se trouvait dans les 10-12 premières heures suite à l'ingestion, mais surtout que les différents métabolites étaient toujours quantifiables au bout de 48 h, représentant une élimination d'environ 40% du DINCH ingéré (Koch *et al.*, 2013; Schutze *et al.*, 2015; Schutze *et al.*, 2017). Le DINCH est aussi éliminé *via* les selles chez les rats (Bhat *et al.*, 2014).

Au moment du dépôt final de ce manuscrit, aucune étude concernant le potentiel passage du DINCH à travers le placenta ni rapportant une quantification dans le lait maternel n'a été publiée. Cependant une étude a montré que les métabolites du DINCH pouvaient être retrouvés dans l'urine de nouveau-nés de 3-4 jours (Urbancova *et al.*, 2019) ainsi que de bébés uniquement nourris au sein (*FOOD study* dans l'article) (Frederiksen *et al.*, 2022), suggérant une potentielle exposition pendant la vie fœtale ou pendant la lactation. De plus, la similarité structurelle entre le DINCH et le DEHP et sa lipophilie laisse supposer un passage du DINCH et de ses métabolites jusqu'au fœtus pendant la gestation et dans le lait maternel pendant la lactation.

1.4.3.3 Les impacts sur la santé

Avant la production de masse et la vente de ce plastifiant, BASF a investi 7 millions € (10.7 millions CAD) pour la recherche en évaluation du risque toxicologie pour le Hexamoll® DINCH, afin de démontrer qu'il ne possède pas de propriétés de PEs, procancérogènes, tératogène, et n'affecte pas le développement et la reproduction (BASF, 2019). Cependant, les résultats non publiés obtenus par BASF ont été retranscrits par Bhat et collaborateurs, et ont montré des altérations au niveau des reins à partir de 300 mg/kg chez le rat mâle, ainsi que plusieurs anomalies au niveau de la thyroïde, comme une augmentation de l'hormone de

stimulation thyroïdienne (TSH - *Thyroid-stimulating hormone*), dès 30 jours d'exposition chez le rat femelle adulte. Ils ont aussi démontré une augmentation de l'hyperplasie et des adénomes folliculaires de la thyroïde pour les rats mâles et femelles ; le nombre de lésions augmente lorsque les femelles ont été exposées *in utero* (Bhat *et al.*, 2014).

D'autres études ont identifié que le DINCH semble avoir également des propriétés de PEs. En effet, ses métabolites sont capables d'activer ER α , PPAR α et PPAR γ , et d'amplifier l'activation du récepteur androgénique (AR) induite par la dihydrotestostérone, *in vitro* dans des cellules H295R (lignée corticosurrénale produisant des stéroïdes) (Engel *et al.*, 2018). Une étude *in silico* a montré une potentielle capacité du DINCH à se fixer sur la globuline humaine liant les hormones sexuelles (SHBG - *Human sex hormone-binding globulin*) (Sheikh *et al.*, 2016). Une exposition durant la vie fœtale et la lactation a induit, chez les rats à l'âge adulte, des altérations dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides activés par PPAR α , mais aussi des gènes impliqués dans l'inflammation (Campioli *et al.*, 2019a). Les mêmes auteurs ont montré une chute du niveau de testostérone circulante lorsque les rats exposés *in utero* à 1 et 100 mg/kg de DINCH atteignaient l'âge adulte, ainsi que plusieurs altérations morphologiques des testicules telles qu'une augmentation de l'apparition d'atrophie testiculaire à 100mg/kg de DINCH (Campioli *et al.*, 2017b). De plus, une modulation de la production stéroïdienne a été observée dans des cellules de Leydig *in vitro* et dans des cultures de testicule fœtale de rats suite à une exposition au DINCH (Boisvert *et al.*, 2016). Une augmentation du nombre des hémorragies testiculaires a été mesurée chez des rats à PND8 après une exposition gestationnelle et lactationnelle au DINCH (Nardelli *et al.*, 2017). Chez l'humain, la présence de métabolites du DINCH a été associée avec une diminution de la testostérone pour les hommes âgés de 40 ans et plus (Woodward *et al.*, 2020).

En ce qui concerne la santé reproductive féminine, les données produites par BASF et compilées par Bhat et collaborateurs ont démontré un impact de l'exposition au DINCH au niveau de la glande mammaire, par une tendance à l'augmentation du taux d'adénocarcinomes et une augmentation significative des fibroadénomes chez la femelle à partir de 200 mg/kg (Bhat *et al.*, 2014). *In vitro*, une exposition au DINCH augmentait la synthèse d'estradiol et de testostérone, mais dans une moindre mesure, dans les cellules H295R (Moche *et al.*, 2021). Une étude épidémiologique a montré une association négative entre la présence urinaire de OH-MINCH, appelé MHiNCH dans l'article, et le taux d'estradiol circulant, ainsi que le nombre d'ovocytes prélevés en clinique de fertilité (Minguez-Alarcon *et al.*, 2016). Une autre étude populationnelle a

montré une association entre le DINCH, de forts taux de testostérone et l'indice d'androgène libre chez les femmes postménopause (Long *et al.*, 2021).

1.4.3.4 La réglementation

La dose journalière acceptable (TDI) pour le DINCH (CAS # 474919-59-0) a été définie à 1000 µg/kg/jour et la valeur de référence (RfD) à 700 µg/kg/jour (EFSA, 2006b; Giovanoulis *et al.*, 2018b). Cependant, il n'y a actuellement pas de réglementation pour le DINCH dans les produits en plastique, que ce soit au Canada ou en Europe. En effet, en 2006, l'European chemicals agency (ECHA), a défini le DINCH comme sécuritaire pour l'utilisation en contact alimentaire et le *Scientific Committee on Emerging and Newly-identified Health Risks* (SCENHR) a publié en 2008 son avis sur l'absence de repro-toxicité, génotoxicité ou carcinogénicité du DINCH dans le matériel médical (ANSES, 2016). La révision du document par le SCENHR en 2016 pour le matériel médical, a conclu à une absence de toxicité systémique en dessous de 300 mg/kg/jr (European Commission, 2016). Le DINCH ne fait pas partie de la liste des restrictions sur les composés chimiques (Annexe XVII de REACH). L'équivalent australien de l'EFSA, le NICNAS, considérait en 2012 le DINCH sans risque pour les professionnels, pour la santé publique, mais aussi pour l'environnement, d'après le rapport de l'ANSES (ANSES, 2016).

Au Canada, le cas du DINCH est évoqué dans le rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques. Ce rapport se base sur les conclusions européennes de 2016 et l'article de Bhat et collaborateurs de 2014, tout en minimisant les effets reprotoxiques publiés par Campioli et collaborateurs (Santé Canada, 2021), et sans mentionner les études citées dans la section 1.4.3.3 datant d'avant 2020. Ce rapport conclut alors que la détection des métabolites du DINCH indique une exposition récente sans entraîner des effets néfastes sur la santé (Santé Canada, 2021).

La réglementation sur le DINCH n'étant pas aussi sévère que pour le DEHP, celui-ci est retrouvé dans le matériel médical à une hauteur de 44.27% pour le matériel de perfusion, alors que le DEHP est limité à 0.1% pour la même utilisation (Bernard *et al.*, 2018a). Il n'y a pas non plus de limitation du DINCH dans les jeux pour enfant. Ainsi, il a été retrouvé dans 13 jouets en PVC sur 38 analysés, avec des concentrations entre 3 et 25% (United States Consumer Product Safety Commission, 2010).

1.5 Le contexte de recherche

Par la présence ubiquitaire du plastique dans notre quotidien et les propriétés de relargage des plastifiants qu'il contient, comme le DEHP et le DINCH, nous sommes exposés de façon chronique à ces composés. Nous les buvons, les mangeons, les respirons, ils traversent notre peau, le placenta et ils sont même injectés directement dans notre sang. Cette exposition ne serait pas problématique si ces composés ne représentaient pas de risque pour notre santé. Malheureusement, le DEHP a été défini comme un PE ayant des impacts multiples, comme une altération des systèmes reproducteurs féminin et masculin, et ce de façon transgénérationnelle. Le DINCH, une des principales alternatives du DEHP, possède des priorités similaires aux PEs, sans avoir officiellement été classifié comme tel. Ainsi, les risques conférés par ces composés sur la santé humaine et leur présence constante dans l'environnement font du DEHP et du DINCH de réels enjeux de santé publique. Ce danger est d'autant plus grand que nous savons que les enfants en bas âge, et particulièrement les nourrissons en néonatalogie, sont les populations les plus exposées au DEHP, mais aussi au DINCH, alors qu'ils se trouvent dans des fenêtres de sensibilités des plus critiques. La glande mammaire, par son développement majoritairement post-natal et hormono-dépendant est un modèle clé pour l'étude des PEs. Cet organe est d'autant plus une cible potentielle du DEHP et du DINCH qu'il s'agit de deux composés lipophiles détectables dans le tissu adipeux, respectivement 168h et 28h après une exposition, ce qui est problématique pour des composés auxquels nous sommes chroniquement exposés.

1.7 Problématique, hypothèses et objectifs

Le DEHP a été mis sur le marché dans les années 1950, impliquant que nous sommes la 3^e génération à y être exposés chroniquement. Les nouveau-nés et les enfants en bas âges, par leur exposition particulière aux poussières de maison, mais aussi la mise à la bouche de leurs jouets, y sont le plus fortement exposés. En effet, même si les objets de puériculture sont maintenant assujettis à une limitation du pourcentage de DEHP (seuil de 0.1%) au Canada, l'économie circulaire continue d'exposer les plus jeunes aux objets produits ou importés avant la mise en vigueur de la réglementation de 2011. Contrairement à l'Europe, le DEHP n'est pas encore limité dans le matériel médical au Canada (projet de loi S-5), entraînant une exposition intense pour les nourrissons en néonatalogies. Des altérations transgénérationnelles sur la reproduction ont été reportées suite à une exposition chronique au DEHP, et particulièrement si cette exposition se produit pendant la fenêtre de sensibilité périnatale. En ce qui concerne le DINCH, nous sommes la 1^{re} génération à y être exposés, et ce, à des quantités toujours plus élevées. Même si ses effets sur la santé sont encore peu documentés, certaines propriétés de PEs ont été identifiées suite à l'exposition de ce composé sur les mammifères.

Cependant, aussi bien pour le DEHP que le DINCH, l'impact de leurs expositions sur la santé des glandes mammaires, et particulièrement chez les femmes, n'a pas, ou peu, été documenté. Il est donc nécessaire de comprendre l'influence de ces polluants environnementaux sur le développement et la cancérogenèse de la glande mammaire, aussi bien au niveau du réseau épithélial, que du stroma.

Ainsi, selon l'état des connaissances, mon hypothèse de doctorat était que le DEHP, par ses propriétés de PEs, pourrait entraîner une altération du développement de la glande mammaire à long terme lors d'une exposition à la fenêtre de sensibilité qu'est la vie *in utero* et la lactation. De plus, le DEHP, par sa capacité d'activation de certains récepteurs nucléaires telles que ER et PPAR, pourrait promouvoir la progression du cancer du sein. Le DINCH, par ses potentielles propriétés de PEs, pourrait induire des altérations de la glande mammaire, similaire ou non aux altérations du DEHP.

Les objectifs de mon doctorat ont donc été de :

1. Déterminer si le DEHP peut altérer la signalisation hormonale de l'œstrogène ou de la progestérone dans des cellules de la glande mammaire *in vitro*, pouvant ainsi avoir un impact sur la progression du cancer du sein.
2. Déterminer *in vivo* si une exposition au DEHP, pendant la fenêtre de sensibilité qu'est la vie *in utéro* et la lactation, peut altérer le développement de la glande mammaire des ratons femelles à l'âge adulte et participer à la progression du cancer du sein.
3. Déterminer *in vivo* si une exposition au DINCH pendant la fenêtre de sensibilité qu'est la vie *in utéro* et la lactation, pouvait induire des altérations du développement de la glande mammaire des ratons femelles similaires ou différents à celle du DEHP, ou encore une absence d'effet.

2 ARTICLE 1 : ÉTUDE *IN VITRO* DE L'IMPACT DU DEHP SUR LES CELLULES CANCEROGENESES DE LA GLANDE MAMMAIRE

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases proliferation of epithelial breast cancer cells through progesterone receptor dysregulation

Le phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP) augmente la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses de la glande mammaire *via* une dérégulation de récepteur à la progesterone.

Auteurs :

Bélinda Crobeddu, Emanuelle Ferraris, Elise Kolasa, Isabelle Plante *

INRS- Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada.

Titre de la revue : *Environmental Research*

Date de soumission : 13 octobre 2018

Date d'acceptation : 15 mars 2019

Date de publication en ligne : 19 mars 2019

DOI : [10.1016/j.envres.2019.03.037](https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.037)

Contribution des auteurs :

Bélinda Crobeddu : 75 % - Conception, expérimentation et analyses (figure 2-1, 2-3, 2-5 et sup figure 2-1, 2-2, 2-3) obtention de financement, rédaction – révision et édition.

Emanuelle Ferraris : 10 % - Conception, expérimentation et analyses (figure 2-2 et 2-4) obtention de financement, rédaction de certaine partie du matériel et méthode – révision et édition.

Elise Kolasa : 5 % Conception, obtention de financement, rédaction – révision et édition.

Isabelle Plante : 10 % Conception, analyses, obtention de financement, rédaction – révision et édition.

Conflit d'intérêt : Aucun à déclarer

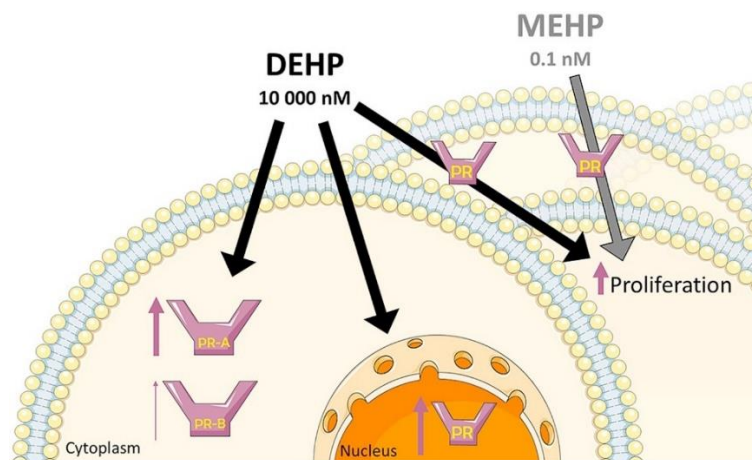
Résumé :

Le phtalate de di(2-éthylhexyle) (DEHP) est un plastifiant incorporé aux matrices plastiques d'une grande partie des produits consommations. Cependant, il est progressivement libéré de ces produits, entraînant une exposition humaine chronique. Bien que le DEHP, comme les autres membres de la famille des phtalates, soit généralement considéré comme un perturbateur endocrinien, les mécanismes impliqués dans sa toxicité sont encore mal compris. Notre objectif était de déterminer les effets d'une exposition au DEHP et à l'un de ses principaux métabolites, le mono(2-éthylhexyl) phtalate (MEHP), sur plusieurs marqueurs de la carcinogenèse mammaire. Les cellules T-47D ont été exposées à des doses représentatives de l'exposition humaine, ainsi qu'à des doses élevées de DEHP et de MEHP (0,1-10 000 nM) pendant 4 jours. Nos résultats ont montré qu'une exposition à 10 000 nM de DEHP et 0,1 nM de MEHP augmentait significativement la prolifération des cellules T-47D, sans induire d'apoptose. De plus, une augmentation significative des niveaux de protéines de l'isoforme A du récepteur de la progestérone (PR) et des niveaux nucléaires de PR a été observée dans les cellules T-47D exposées à 10 000 nM de DEHP. Il est important de noter que la prolifération accrue et les niveaux nucléaires de PR ont respectivement été totalement et partiellement inhibés, par la mifépristone, un antagoniste de PR. Ces résultats suggèrent qu'une exposition au DEHP ou au MEHP augmente la prolifération cellulaire en activant la signalisation du PR, ce qui pourrait augmenter les risques de développer un cancer du sein. Le mécanisme d'activation de la voie de la progestérone par le DEHP et les conséquences à long terme de cette activation restent à élucider.

Abstract:

The di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer incorporated to plastic matrices of widely used consumer products. However, it is gradually released from these products, resulting in a chronic exposure for humans. Although DEHP, similar to other members of the phthalates family, is generally considered as an endocrine disruptor, the mechanisms implicated in its toxicity are yet poorly understood. Our objective was to determine the effects of an exposure to DEHP and to one of its major metabolite, the mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on markers involved in breast carcinogenesis. T-47D cells were exposed to environmentally relevant and higher doses of DEHP and MEHP (0.1–10 000 nM) for 4 days. Our results showed that an exposure to 10 000 nM of DEHP and 0.1 nM of MEHP significantly increased the proliferation of T-47D cells, without inducing apoptosis. In addition, a significant increase in the protein levels of the isoform A of the progesterone receptor (PR) and of nuclear levels of PR were observed in T-47D cells exposed to 10 000 nM of DEHP. Importantly, the increased proliferation and nuclear levels of PR were totally and partially inhibited, respectively, by Mifepristone, a PR antagonist. These results suggest that an exposure to DEHP or MEHP increase cell proliferation by activating PR signaling, which could potentially increase the risks to develop breast cancer. The mechanism of activation of the progesterone pathway by DEHP and the long-term consequences of this activation remained to be elucidated.

Graphic abstract:



Key words: Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), Endocrine disruptors, Mammary gland, Proliferation, Progesterone receptor, Mifepristone.

2.1 Introduction

Despite advances in diagnosis and treatment, breast cancer is still an important public health problem and a major cause of death for women worldwide (Ferlay *et al.*, 2015). In 2015, more than half a million people died of breast cancer (World Health Organization, 2016). While the causes of breast cancer are pleomorphic and mostly unknown, it is admitted since almost four decades now that many cancers are linked to behavioral, dietary and environmental factors (Akhtar & Bansal, 2017; Doll & Peto, 1981; Dumalaon-Canaria *et al.*, 2014; Lichtenstein *et al.*, 2000). Over the years, studies have demonstrated that breast cancer rates are typically higher in industrialized countries compared to emergent or third world countries (DeSantis *et al.*, 2015; Pfeifer, 2015). Interestingly, women who move from countries with lower rates of risk to industrialized countries “acquire” the higher risk associated with their new country, especially if they migrate at a younger age (Maskarinec & Noh, 2004). These studies suggest that living in an industrialized environment increases the risk of breast cancer.

Breast cancer is a heterogeneous disease encompassing multiple subtypes with different molecular characteristics, prognoses and responses to therapies. Tumors are generally divided into, at least, four major molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2-overexpressing and triple-negative subtypes (Hon *et al.*, 2016), Luminal A and Luminal B subtypes being the most common tumors. This classification is based mainly on the presence/absence of molecular markers such as the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR) and the overexpression of human epidermal receptor 2 (HER2) (Komen, 2015). These receptors allow, among others, the activation of signaling pathways involved in cell proliferation, in the control of the cell cycle and in apoptosis (Brisken & O'Malley, 2010). Hormonal imbalances and over-activation of those receptors are associated with development and progression of breast cancer (Brisken & O'Malley, 2010; Fenton & Birnbaum, 2015).

Endocrine disruptors (EDs) are defined as chemicals that interfere with the endocrine system and produce adverse developmental, reproductive, neurological, and immune effects (Monneret, 2017). Studies have demonstrated that some phthalates are able to dysregulate the steroidogenesis, and are thus considered as EDs (Martinez-Arguelles *et al.*, 2013; Zoeller *et al.*, 2012) inducing modulation of, among other, the tanner score of young boy (Watkins *et al.*, 2017), and reproductive behavior of mouse (Wang *et al.*, 2016a). Phthalates are widely used plasticizers found in a lot of customer's products, such as food container, medical device and children toys (Del Pup *et al.*, 2016). These plasticizers are added to plastic, and especially to polyvinyl chloride (PVC) matrices, to make them more flexible and sustainable. Among the family, di(2-ethylhexyl)

phthalate (DEHP) is the most produced and thus more abundant in our environment (Ceresana, 2013; Markarian, 2007). Because DEHP is not covalently bonded to the PVC, it is released from the plastics, inducing chronic human exposure (Koch *et al.*, 2006a). Once ingested, DEHP is metabolized in different compounds; one of its major metabolites is the mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) (Kessler *et al.*, 2012). Phthalates and their metabolites have been found in a variety of human tissues and fluids, including breast (U.S. Food and Drug Administration, 2001) and breast milk at concentration around 1.8 nM for DEHP (Fromme *et al.*, 2011), although one study showed exceptionally high levels in a few women (up to 2.5 μ M (Zhu *et al.*, 2006)), and between 4.8 and 13.2 nM for MEHP (Kim *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2011). Exposure to DEHP have been linked with many health issues such as infertility, premature puberty and obesity (Kim *et al.*, 2016; Rozati *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016b; Wolff *et al.*, 2010). In addition, DEHP was defined as potentially carcinogenic for human (Rahman & Brazel, 2004; World Health Organization, 2013). A case-control study suggested that the highest urinary concentrations of MEHP observed in a group of women is associated with breast cancer mortality (Parada *et al.*, 2018). It has also been shown that an exposure to DEHP increased invasive properties of breast cells (Zhang *et al.*, 2016). However, the effects of DEHP and MEHP on mammary gland development and carcinogenicity are still remained poorly understood.

During cancer progression, a process called Epithelial-to-Mesenchymal-Transition (EMT) causes the epithelial cells to lose their polarity and gain motility (Eger *et al.*, 2000; Kalluri & Neilson, 2003). EMT is characterized by a dysregulation of some epithelial markers, including proteins involved in cell-cell interactions, such as E-cadherin and β -catenin, and increased expression of mesenchymal markers (Eger *et al.*, 2000). Interestingly, some environmental pollutant, including EDs, can disrupt cell-cell interactions, thus potentially promoting cancer (Chipman *et al.*, 2003; Delisle *et al.*, 2015; Dianati & Plante, 2017; Dianati *et al.*, 2017; Plante *et al.*, 2002). This study aimed to evaluate the impact of DEHP and MEHP exposures on epithelial breast cancer cells. More specifically, the goal was to assess the endocrine-disrupting effects of DEHP and MEHP in breast cancer progression by looking at cell proliferation, junctional proteins and hormonal receptors status.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Compounds

Plasticizers, progesterone and Mifepristone were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO) (di(2-ethylhexyl) phthalate, purity > 99.5%) and from Chromatographic Specialties Inc (Brockville, ON) (mono(2-ethylhexyl) phthalate, 100 µg/mL) and were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) as 10mM stock solutions. Progesterone (purity ≥99%) was also dissolved in DMSO, while Mifepristone (purity ≥98%) was dissolved in ethanol.

2.2.2 Cell culture

T-47D cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). T-47D cells is a commercial cell line immortalized from a human breast ductal carcinoma. These cells express receptors implicated in hormone-dependent breast cancer, ER and PR (Jiang *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2017), and the presence of many progesterone responsive elements was demonstrated (Yu *et al.*, 2017). T-47D cells were grown in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) without phenol red, supplemented with 10% of foetal bovine serum, 0.2 Units/ml of bovine insulin, 1mM of HEPES, 2.4 µg/mL of glucose and 1mM of sodium pyruvate (all from ThermoFisher Canada, Mississauga, ON). Cells were kept in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C and used for a maximum of 10 passages.

2.2.3 DEHP/MEHP exposures

T-47D cells were starved with 2% stripped-foetal bovine serum (ThermoFisher) 3 days before treatments. Treatments were initiated on subconfluent cell cultures by the addition of starving media containing 0.1% (v/v) DMSO as a vehicle, 0.01 to 10 000 nM of DEHP or MEHP. These concentration were selected based on concentrations found in human breast milk (Fromme *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2006). Cells were treated daily for 4 days, one treatment per day.

2.2.4 Progesterone and mifepristone exposure

All treatments were initiated on subconfluent cell cultures in starving media. To demonstrate the efficiency of the compounds, cells were first treated with 10 nM of Progesterone (Sigma-Aldrich, Oakville, On), as positive control of progesterone receptor activation, and/or 10 nM of Mifepristone, an inhibitor of progesterone receptor (Sigma-Aldrich). In a second series of

experiments, cells were treated with 0.1–10 000 nM of DEHP or MEHP, with or without Mifepristone. Vehicle controls used for treatment were starving media containing 0.1% (v/v) DMSO, 2×10⁻⁵% (v/v) ethanol, or 0.1% (v/v) DMSO plus 2×10⁻⁵% (v/v) ethanol.

2.2.5 Analysis of apoptosis by annexin V/PI in flow cytometry

Cells were treated with DEHP or MEHP for 4 days and then harvested with trypsin, centrifuged and stained with propidium iodide (PI) and annexin V-FITC following the manufacturer's recommendations (Dead Cells Apoptosis kit, Molecular probes, OR, USA). The percentage of cells in each quadrant was determined by Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) and analysed with Flow Jow software. Cells challenged with 1 µM of staurosporine for 24 h were used as a positive control.

2.2.6 Assessment of cell attachment and proliferation in real-time using xCELLigence technology

T-47D cells were seeded at 60 000 cells by well in 96 wells plate (ACEA Biosciences) and treated as described above. Cellular attachment and proliferation were measured quantitatively and in real-time using an xCELLigence™ RTCA DP instrument (ACEA Biosciences; <https://www.aceabio.com>). Cell index, which correlates to the number of cells in a specific well, is measured by the changes in impedance detected by gold electrode microarrays at the bottom of each well. The cell impedance was measured every 10 min during a 5 days period using the ACEA Biosciences RTCA software program (version 2.0), from the seeding to the end of the 4th day of treatment, thus generating proliferation curves for each treatment. Following the manufacturer's recommendations, the proliferation was measured by analysing the area under the proliferation curve, normalized to the vehicle control (set as baseline).

2.2.7 Western blot analysis

Cell monolayers were washed twice with PBS before the addition of lysis buffer (pH: 8) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with NaF 50 nM, NaVO₃ 10mM and Halt Protease and Phosphatase Cocktail Inhibitor (Fisher Scientific Canada). Cells were scraped, collected and incubated on ice for 5 min. Cells lysates were centrifuged for 10 min at 2500 rpm at 4 °C. The supernatants were aliquoted and stored at -80 °C until further processing. Lysate protein concentrations were measured using the Bicinchoninic acid protein assay reagent kit (Thermo scientific). To perform

semi-quantitative western blot analysis (Taylor & Posch, 2014), protein samples (20 µg) were resolved on Stain-Free™ acrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 10%, Bio-Rad, Mississauga, On) and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Laboratories). Total lane proteins were visualized using the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked with TBS-T (TBS containing 0.1% Tween 20) containing 5% of bovine serum albumin (BSA) or of dry milk, according to manufacturer instructions, for 1 h, and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: anti-PR 1/1000 (#16661, Abcam, Cambridge, MA), and anti-β-catenin 1/1000 (#8840), anti-Ecadherin 1/1000 (#3195), anti-HER2 1/1000 (#2165), anti-p-HER2 1/1000 (#2243) anti-ERα 1/1000 (#8644), anti-PARP 1/1000 (#9532) (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Bound primary antibody was detected using HRP-conjugated secondary antibodies (goat-anti-rabbit 1/10 000 (#7074) or horse-anti-mouse 1/10 000 (#7076) from Cell Signaling Technology). Chemiluminescent signals were detected using the Clarity or Clarity Max western ECL substrates (Bio-Rad Laboratories) and visualized using the Bio-Rad ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories). The density of each band was normalized on total lane proteins and normalized using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

2.2.8 Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips and fixed with ice-cold 80% methanol, 20% acetone for 10 min before being blocked with PBS containing 2% BSA and permeabilized with 0.1% Triton. Cells were then immunolabeled overnight with primary antibodies for 2 h: anti-PR 1/100 (or 1/200 for the Mifepristone assay) (#16661, Abcam, Cambridge, MA). After being washed, cells were exposed to appropriate secondary antibodies for 1 h: Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse 1/1000 (#4409, Cell Signaling Technology) and Alexa Fluor 568-conjugated anti-rabbit 1/1000 (#A10042, Life Technologies). DAPI staining was used to visualize nuclei prior to mounting with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, Al)(Delisle *et al.*, 2015). Immunofluorescence images were obtained with a Nikon A1R + confocal microscopic laser equipped with a spectral detector and analysed using NIS-elements software (version 4). Nuclear intensity of PR was measured post acquisition by quantifying the mean fluorescence of PR that overlap with DAPI (stained nucleus) using NIS-elements software (version 4).

2.2.9 Statistical analysis and n-values

All in vitro experiments were repeated 5 to 9 times with different cell passages and were independently processed. Values are presented as the mean \pm SEM. Data were analysed using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism version 6.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

2.3 Results

2.3.1 An exposure to DEHP and MEHP does not induce apoptosis in T-47D cells

Because we were expecting that DEHP and MEHP would have tumor promoting effects through endocrine-disrupting properties, we used T-47D cells epithelial cancer cells that express ER and PR (Jiang *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2017). To verify that DEHP and MEHP treatments were not toxic for the cells, apoptosis was assessed in cells exposed to phthalates (**Fig. 2-1**). Protein quantification by Western blot analysis showed an increase in the levels of cleaved-PARP in cells exposed to 1 μ M of staurosporine for 24 h as compared to DMSO-treated cells (**Fig. 2-1A**). A band for cleaved-PARP was observed in T-47D cells for all conditions, but was not significantly increased by DEHP and MEHP treatments (**Fig. 2-1A**). To further confirm that apoptosis was not affected by exposure to the phthalates, T-47D cells were stained with Annexin V and Propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry. A significant increase of cells positive for Annexin V and PI was observed in cell treated with staurosporine (**Supplementary Fig. 2-1**). Similar to the previous results, approximately 10% of T-47D cells were in apoptosis (positive for both Annexin V and PI) for all tested conditions. However, no difference was observed in the percentage of Annexin V or PI positive cells between the control cells and the cells exposed to DEHP and MEHP (**Fig. 2-1B**), confirming that the treatments did not induce apoptosis in T-47D cells.

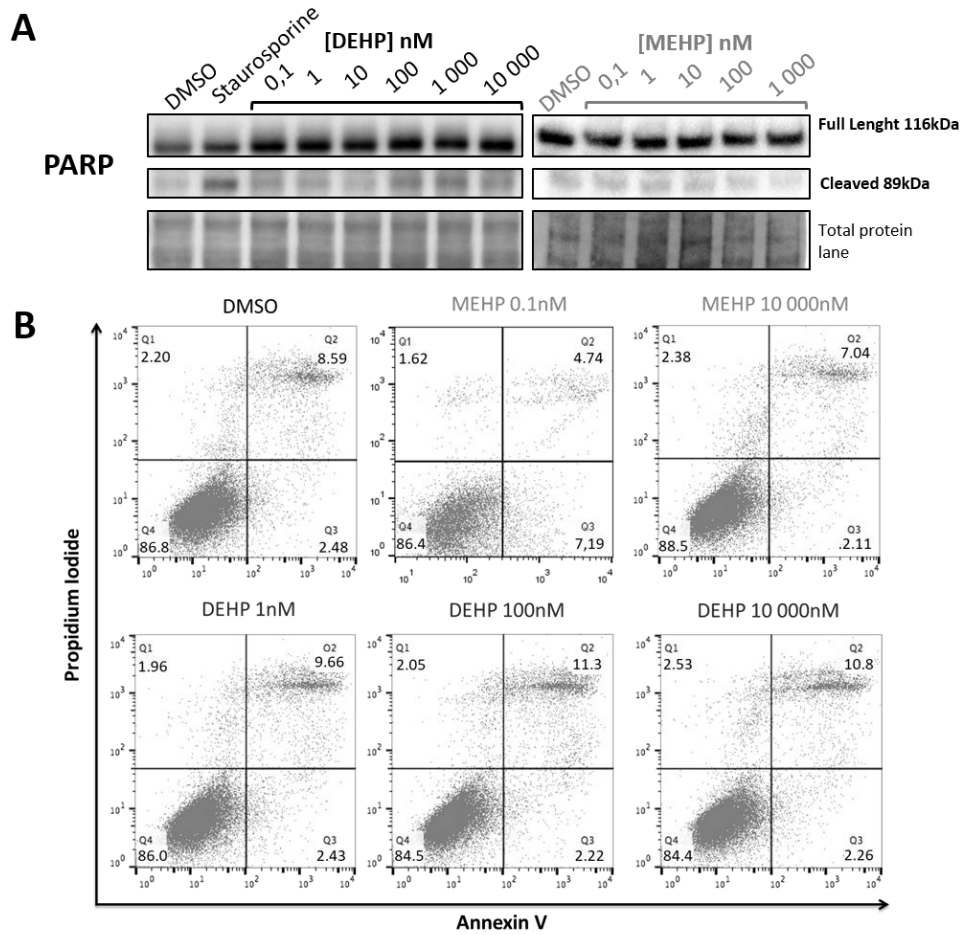
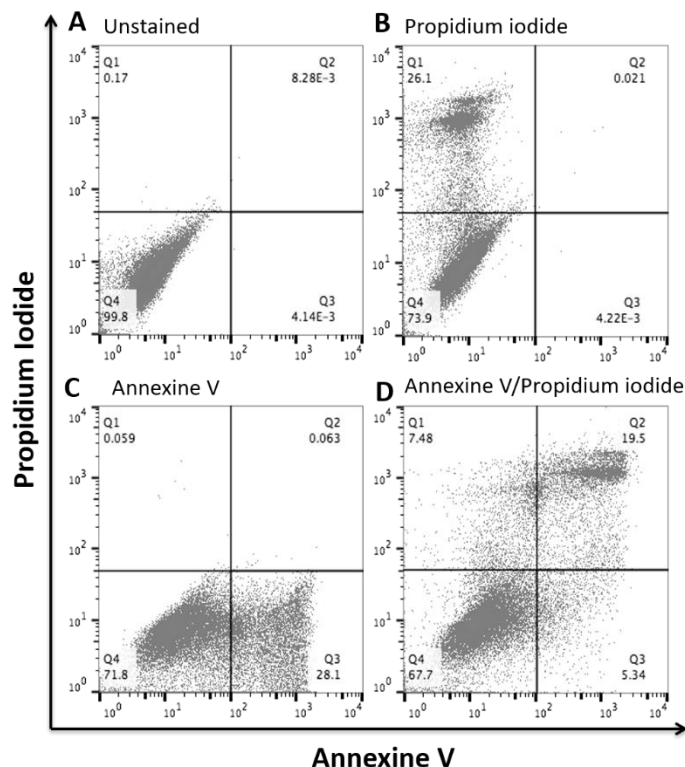


Figure 2-1: Environmentally relevant and higher exposures to DEHP and MEHP does not trigger apoptosis in T-47D cells.

T-47D cells were exposed to doses of DEHP and MEHP ranging from 0.1 to 10 000 nM for 4 days. **(A)** T-47D cells were lysed and total proteins were extracted. PARP (Full-length and cleaved) protein expression was determined by western blot analyses. **(B)** Apoptosis was evaluated using Annexin V/PI staining of T-47D cells and flow cytometric analysis. In each graph, the lower left quadrant (Q4) indicates viable cells, the upper left quadrant (Q1) represents necrotic cells (PI positive only), the lower right quadrant (Q3) shows early apoptotic cells (Annexin V positive only), and the upper right quadrant (Q2) represents late apoptotic cells (PI and Annexin V positive). **(A–B)** Representative results of $N \geq 3$ independent experiments are presented.



Supp. Figure 2-1 : Staurosporine exposure induces apoptosis in T-47D.

T-47D cells were exposed to 1 μ M of staurosporine for 24h. **(A)** Cells were analysed by flow cytometry without being stained. **(B)** Single staining with Propidium Iodide. **(C)** Single staining with Annexin V. **(D)** Double staining with Annexin V and Propidium Iodide.

2.3.2 A four-day exposure to DEHP and MEHP increases cell proliferation of T-47D

To assess proliferative effects of environmentally relevant and higher doses of DEHP and MEHP on mammary gland epithelial cells, T-47D cells were exposed daily for 4 days to different concentrations of phthalates (**Fig. 2-2**). The cell index was measured in real time using the xCELLigence RTCA technology and the E-plate system. While an increase in proliferation was observed for T-47D cells at all doses tested for both DEHP and MEHP, it reached significance only at 10 000 nM and 0.1 nM for DEHP and MEHP, respectively (**Fig. 2-2**).

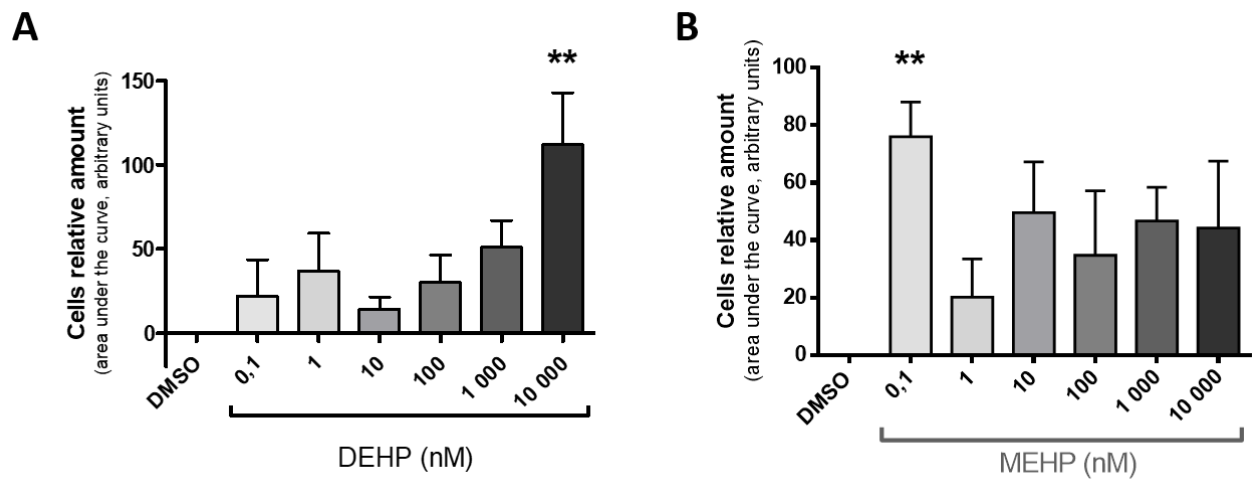
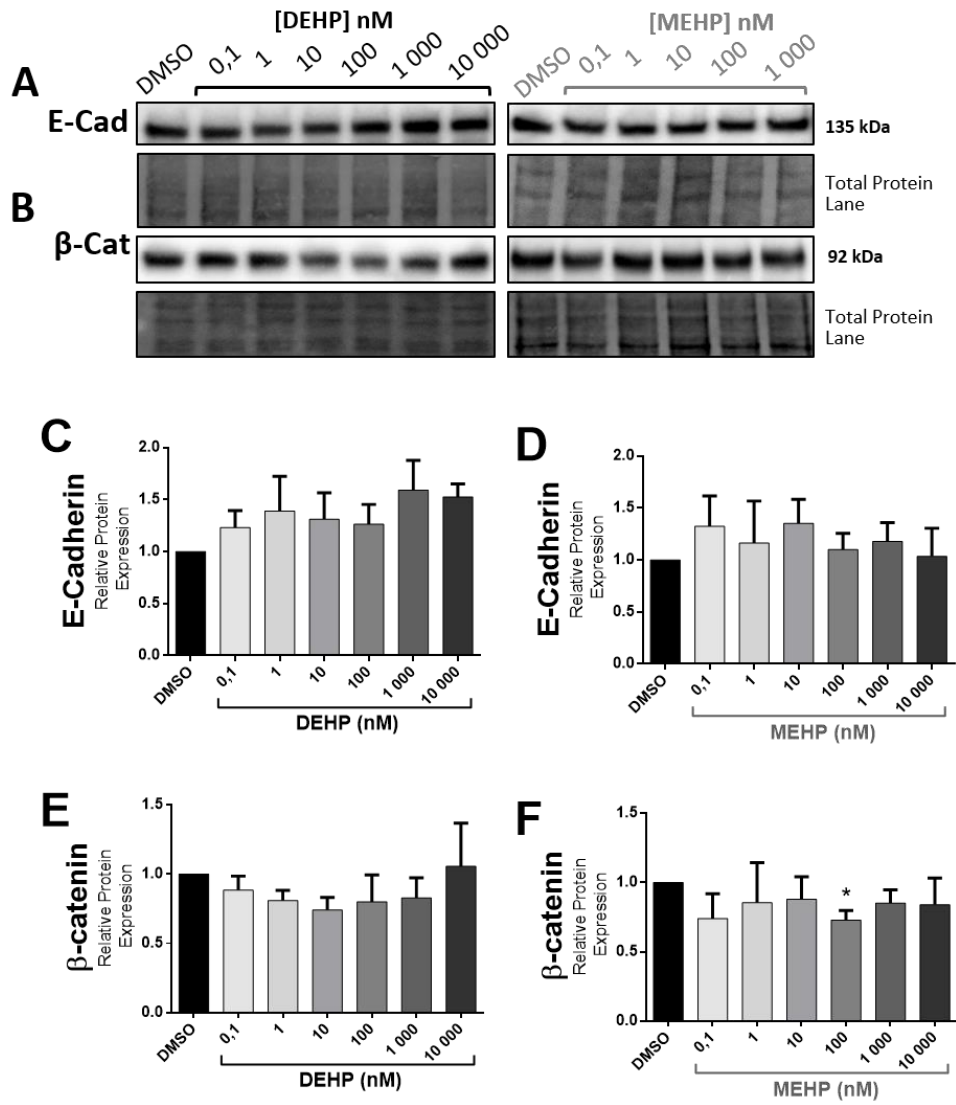


Figure 2-2 : A four-day exposure to DEHP and MEHP increases cell proliferation of T-47D.

T-47D cells were exposed to doses of DEHP or MEHP ranging from 0.1 to 10 000 nM daily for 4 days. T-47D cells proliferation was assessed in real-time using the xCELLigence system. The area under the curve of proliferation over 4 days was measured for each treatment and normalized to DMSO (set as the baseline) (A, B). Graphs represent means of at least 4 independent experiments for MEHP and DEHP (Means \pm SEM) **P < 0.01.

2.3.3 Junctional proteins and markers of EMT are not affected in DEHP- and MEHP-treated T-47D cells

It has been demonstrated that intercellular junctions are important in cells homeostasis and are commonly decreased during breast cancer and EMT. Therefore, we then looked at the effects of DEHP and/or MEHP exposures on the expression of junctional proteins and EMT markers. Our results showed that protein levels of the epithelial markers E-cadherin were not affected by the treatments (Supplementary Fig. 2-2). A small decrease in β -catenin levels was observed only at 100 nM of MEHP. Similarly, none of the treatments impacted the levels of the mesenchymal markers vimentin and N-cadherin (data not shown).



Supp. Figure 2-2: Junctional protein are not affected by exposure to DEHP and/or MEHP in T-47D cells.

T-47D cells were exposed to DEHP or MEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM daily for 4 days. Cells were lysed, and total protein was extracted. E-cadherin (A) and β -catenin (B) expression were determined by western blot analyses and are shown by representative immunoblots. Graphs represent means at least 5 different independent experiments for DEHP and MEHP exposure for T-47D cells (C-F) (Means \pm SEM). * $P < 0.05$.

2.3.4 The progesterone receptor A (PR-A) protein levels are increased by DEHP exposure in T-47D cells

The mammary gland being a hormone-dependant organ, a dysregulation of hormonal signaling can impact breast cancer or its progression. Furthermore, it has been shown that DEHP owns some endocrine-disrupting properties, which led us to study the expression of the hormonal

receptors involved in the classification of breast cancer subtypes. Our results showed that ER, HER2, and p-HER2 were not affected by DEHP or MEHP in T-47D cells (Fig. 2-3B–D, I–N). PR-A, but not PR-B, was significantly increased in T-47D cells exposed to 10 and 10 000 nM of DEHP (Fig. 2-3A, E–H). While the lowest concentrations of MEHP treatment also increase PR-A levels, these results were not statistically significant.

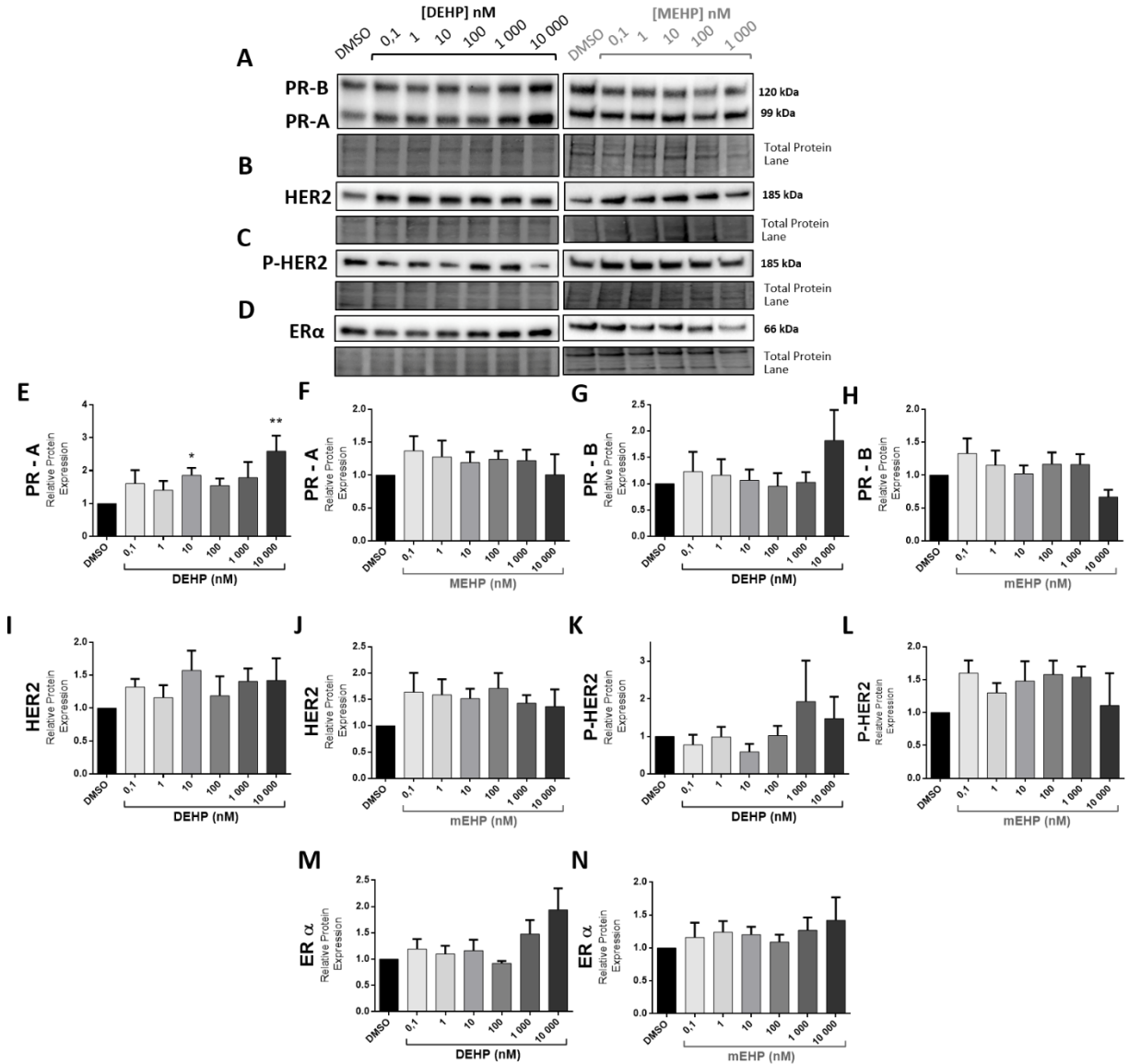


Figure 2-3 : PR-A protein expression is increased by DEHP exposure in T-47D cells.

T-47D cells were exposed to DEHP or MEHP at doses ranging from 0.1 to 10 000 nM daily for 4 days. Cells were lysed, and total proteins were extracted. PR-A and PR-B (A, E–H), HER2 (B, I, J), p-HER2 (C, K, L) and ERα (D, M, N) expression were determined by western blot analysis and are shown by representative immunoblots. Graphs represent means of at least 5 different independent experiments (Means ± SEM). Total protein lane signal was used for normalization. *P < 0.05, **P < 0.01.

2.3.5 The nuclear levels of the progesterone receptor are increased in T-47D cells exposed to MEHP and to DEHP

To determine whether the up-regulation of PR-A was associated with increased nuclear localization, typically associated with increased activity of PR, PR localization was assessed by immunofluorescence in cells exposed to 0.01, 10 and 10 000 nM of DEHP, and 0.1 and 10 000 nM of MEHP. These doses were chosen based on previous results on proliferation and changes in PR protein expression. In both control and treated cells, PR was localized in the nucleus, but the staining was more intense in DEHP- and MEHP-treated cells (Fig. 2-4A–F). These observations were confirmed by measuring the nuclear fluorescence intensity of PR overlapping the nucleus (Fig. 2-4G–H). While the signal seems to be increased for all doses tested, the nuclear intensity of PR was significantly increased only at 10 000 nM of DEHP (Fig. 2-3I).

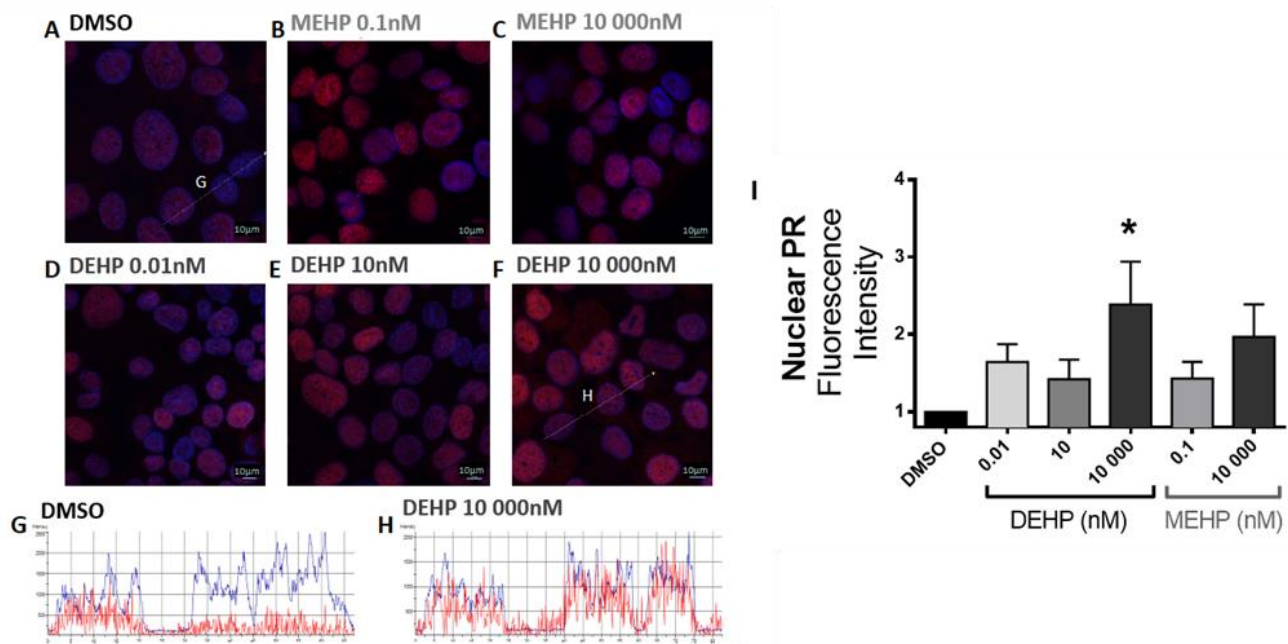
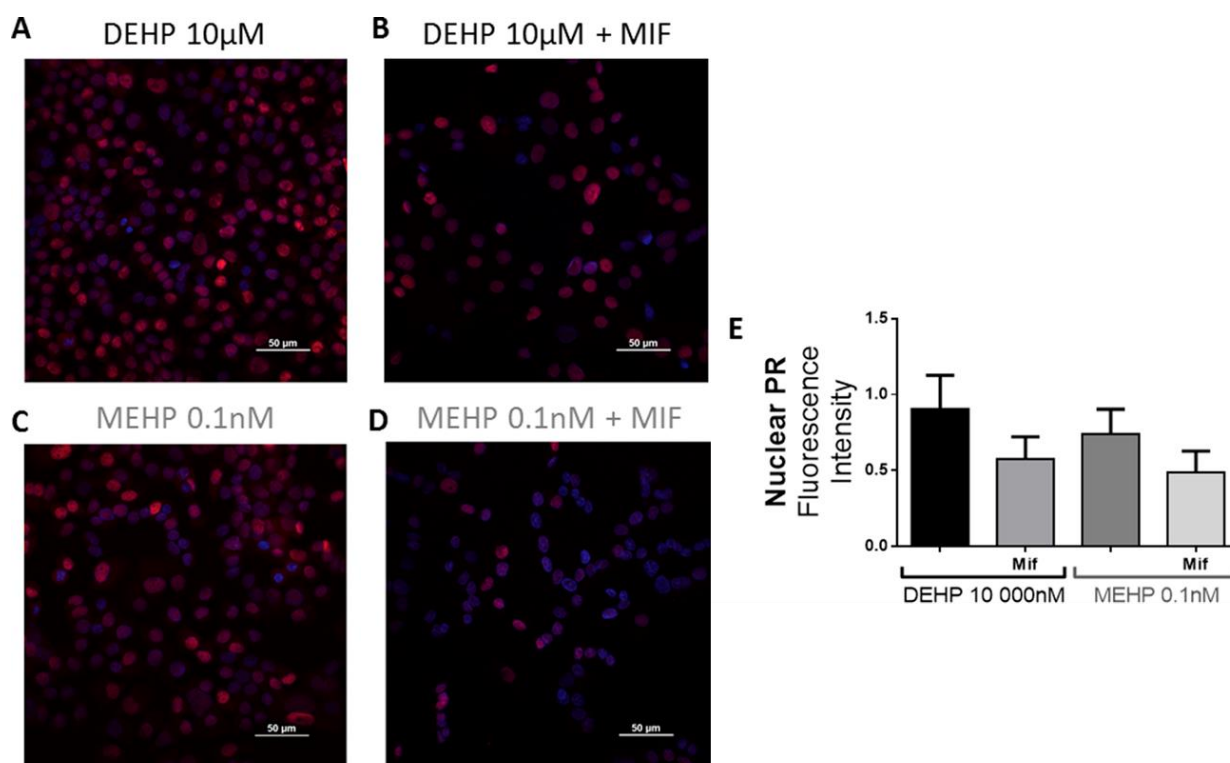


Figure 2-4: The nuclear levels of the progesterone receptor are increased in T-47D cells exposed to DEHP and MEHP.

T-47D cells were exposed to DEHP (D,E,F) or MEHP (B,C) at doses ranging from 0.01 to 10 000 nM daily for 4 days. Cells were fixed and processed for immunofluorescent staining. PR nuclear localization in cells was measured by superposition of the fluorescence intensity of PR (red signal) and DAPI (blue) signals (arrows on images A and F) for DMSO (A,G) and for 10 000 nM of DEHP (F,H). Graph represents means of 5 different independent experiments (I) (Means \pm SEM). *P < 0.05.

2.3.6 The DEHP- and MEHP-induced increased in nuclear PR levels is inhibited by an antagonist of PR signaling in T-47D cells

To confirm that the observed increased of PR nuclear levels following DEHP and MEHP treatments is dependent of its activation, we have inhibited PR signaling using Mifepristone, a pharmacologic antagonist competitor of PR. T-47D cells were treated with 10 000 nM of DEHP or 0.1 nM of MEHP daily for 4 days, with and without 10 nM of Mifepristone, and PR nuclear levels were measured. Mifepristone treatment reduced the fluorescence intensity of the nuclear PR for 10 000 nM of DEHP (Supplementary Fig. 2-3 A, B) and for 0.1 nM of MEHP (Supplementary Fig. 2-3 C, D). These observations were confirmed by measuring the nuclear fluorescence intensity of PR, showing a 30% reduction in nuclear levels of PR upon treatment with Mifepristone for both compound (Supplementary Fig. 2-3E).



Supp. Figure 2-3: The levels of nuclear PR in T-47D cells exposed to DEHP and MEHP were decreased with Mifepristone (MIF) treatment.

T-47D cells were exposed to 10 000 nM of DEHP (A,B) or 10 nM of MEHP (C,D) without and with 10 nM of Mifepristone daily for 4 days. Cells were fixed and processed for immunofluorescent staining. The localization of nuclear PR was determined by measurement of the superposition of the fluorescence intensity of PR (red signal) and DAPI (bleu) signals. Graph represents means of 6 different experiments (I) (Means ± SEM).

2.3.7 DEHP- and MEHP-induced T-47D cells proliferation is dependent of PR signaling

Progesterone signaling has been associated with increased epithelium proliferation and ramification during mammary gland development, and also cells proliferations in Luminal A and B breast tumors. To determine if PR is involved in the proliferation increment induce by DEHP and MEHP, we have inhibited PR signaling using Mifepristone. As expected, Mifepristone treatment reduced by 50% the cells proliferation induced by the progesterone in T-47D cells (Fig. 2-5). Ours results showed that Mifepristone also decreased DEHP- and MEHP-induced cells proliferation in T-47D cells at a significant manner for MEHP (Fig. 2-5).

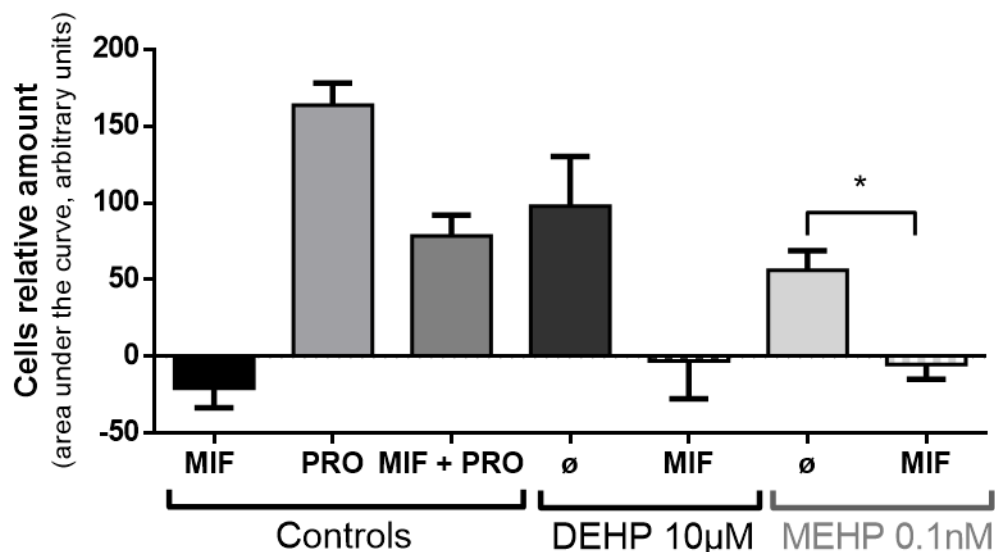


Figure 2-5 : The DEHP- and MEHP-induced cells proliferation is inhibited by an antagonist of progesterone.

T-47D cells were exposed to 10 nM Mifepristone (MIF) or/and to 10 nM of progesterone (PRO) (controls), or to 10 000 nM of DEHP or 0.1 nM of MEHP, with or without 10 nM of Mifepristone for 4 days. Proliferation was assessed in real-time using the xCELLigence system. Vehicle controls were set up as baseline, and area under the curve was determined for all treatments. The graphs represent the inhibition of DEHP- or MEHP-induced proliferation in presence of Mifepristone, for each dose of plasticizers. Graph represents means of at least 3 independent experiments (Means \pm SEM) *P < 0.05.

2.4 Discussion

Breast cancer remains an actual problem in our society, although its survival rate has increased in the last decades. There is an actual need for understanding the precise effects of endocrine disruptors on breast cancer promotion. Thus, our study aimed to evaluate the impact of DEHP and MEHP exposure on the promotion of breast cancer cells. Our results showed that

the exposure to DEHP and MEHP significantly increase the proliferation of T-47D cells at the highest and the lowest doses, respectively. This increase in proliferation is associated with increased nuclear levels of PR, which can be prevented by an antagonist of PR. Together, these results suggested that DEHP and MEHP can induce proliferation of breast cancer cells in a PR-dependent manner.

2.4.1 DEHP exposure increases levels and nuclear localization of PR-A in T-47D cells

Progesterone is essential for the mammary gland development and has a proliferative effect on epithelial cells (Hilton *et al.*, 2015; Humphreys *et al.*, 1997; Obr & Edwards, 2012). Furthermore, a dysregulation in the progesterone pathway is known to be a risk factor for breast cancer (Anderson, 2002; Brisken *et al.*, 2015). Two isoforms of PR are expressed at similar levels in the mammary gland, PR-A and PR-B (Mote *et al.*, 2002). In our study, PR-A expression was significantly increased when T-47D cells were exposed to 10 and 10 000 nM of DEHP. Using immunofluorescence assays, we confirmed that PR nuclear levels were significantly higher upon exposure to 10 000 nM DEHP, the same dose that showed a significant increase in proliferation, thus suggesting higher PR activity. Consistently, inhibition of PR by Mifepristone reduced DEHP- and MEHP-induced proliferation. While Mifepristone is also an inhibitor of the glucocorticoid receptor (GR), T-47D cells only weakly express GR (Mikosz *et al.*, 2001). It is thus unlikely that this receptor is involved in the observed results, but it cannot be totally excluded. In addition, an *in silico* study recently showed that DEHP have the potential to compete with the endogenous ligand of PR (Sheikh & Beg, 2017; Sheikh *et al.*, 2016), thus supporting our results. Interestingly, while PR-B levels were also increased at the highest dose, they were not significantly affected. It has been suggested that the two PR isoforms are functionally distinct in mammary gland, PR-B acting mostly as a transcriptional activator, whereas PR-A can act as a trans-dominant inhibitor of PR-B in situations where PR-A has little or no transactivational activity (Vegeto *et al.*, 1993). Maintaining the balance between the two isoforms of PR is essential for the mammary gland homeostasis (Sampayo *et al.*, 2013). Dysregulation of the PR-A/PR-B ratio has been suggested as an early marker of breast cancer development and is observed in premalignant lesions (Mote *et al.*, 2002). In addition, an elevated PR-A/PR-B ratio is linked with more aggressive tumors and to higher resistance to endocrine treatments (Hopp *et al.*, 2004; Sampayo *et al.*, 2013). Consistently, an overexpression of PR-A can result in increased ductal elongation, hyperplasia, disorganization of the basement membrane and decreased cell-cell adhesion (Shyamala *et al.*, 1998). Similarly, overexpression of PR-A in T-47D genetically modified cell lines promoted the

acquisition of phenotypes associated with cancer, such as decreased cell adhesion, and increased angiogenesis and migration into bone marrow stroma (Graham *et al.*, 2009; Kougioumtzi *et al.*, 2014; McGowan & Clarke, 1999; McGowan *et al.*, 2004). Together, these data suggested that DEHP and MEHP can activate PR-A, resulting in enhanced tumorigenic activity in T-47D cells by an increment of cells proliferation.

Moreover, it has been shown that PR stability, localization, protein-protein interactions and transcriptional activity is regulated, among other, through post-translational modifications, such as phosphorylation, acetylation, ubiquitination and SUMOylation (Abdel-Hafiz & Horwitz, 2014; Knutson *et al.*, 2017). Whether or not DEHP and MEHP exposure can result in post-transcriptional modifications of PR remained to be elucidated. Finally, it is also possible that DEHP and MEHP dysregulate PR signaling via a non-genomic pathway. An increasing number of evidence demonstrated the existence of a nonclassical signaling, that could play a role in the proliferation of breast cancer cells (Garg *et al.*, 2017). More experimentations are needed to determine if the effects of DEHP and MEHP observed in T-47D cells involved signaling of PR through its classical and non-classical signaling.

2.4.2 MEHP affects T-47D cells proliferation at lower, environmentally relevant, doses compared to DEHP

Some of the DEHP effects on cells were found in high doses that were not necessarily representative of the human exposure (Chen *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010; Sims *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). In human breast tissues and milk samples, levels around 13.6 nM and 1.8 nM of MEHP and DEHP have been measured, respectively (Fromme *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015; Zimmermann *et al.*, 2012). Approximately the same concentrations have been found in serum and urine (Frederiksen *et al.*, 2010; Meeker *et al.*, 2009). Therefore, we used concentration ranging from 0.1 nM to 10 000 nM to get an environmentally relevant doses, as well as extreme human exposure, similar to what other studies have used. For MEHP, we found a statistically increases in proliferation at 0.1 nM. In contrast, DEHP treatment significantly affected cell proliferation and PR-A levels at 10 nM and 10 000 nM. In accordance, in MCF-7 cells, it has been showed that cell proliferation was significantly increased for DEHP treatments from 10 nM to 1000 nM (Chen & Chien, 2014), while Blom and collaborators (Blom *et al.*, 1998) found that 10 000 nM was the lowest concentration at which proliferation was increased. Similarly, while an exposure from 0.1 to 100 μ M of DEHP induced proliferation in both MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells in a study (Das *et al.*, 2014), 10 μ M of DEHP increased proliferation in MCF-7 cells, but not

in MDA-MB-231 cells in another study (Kim *et al.*, 2004). While there is some variation between the results, our results using T-47D cells, which express ER and PR similar to MCF-7 cells, are consistent with have been showed by others. In the past few years, some studies have been shown that DEHP and other phthalates could enhance proliferation on both normal and cancerous breast cells lines (Blom *et al.*, 1998; Chen & Chien, 2014; Chen *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2018), but to our knowledge, the effects of DEHP metabolites were never studied in breast cells. Interestingly, our results showed that MEHP also induced proliferation in T-47D cells, but it was significant only at the 0.1 nM dose. This non-monotonic dose-response relationship is consistent with an endocrine-disrupting effect (Monneret, 2017; Vandenberg *et al.*, 2013). Because humans are mainly exposed to DEHP by food and dust ingestion, and because DEHP is rapidly metabolized in MEHP, breast cells are more likely exposed to MEHP than DEHP in human, as reflected by the mean levels of both compounds found in breast tissues and milk (Fromme *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015; Zimmermann *et al.*, 2012). Moreover, it has been showed that breast cells, including T-47D cells, are capable of metabolizing some pollutants (Agarwal *et al.*, 1997; John *et al.*, 2010; Spink *et al.*, 2008). As a result, it is crucial and relevant to determine the effects of MEHP on cells. Although MEHP induced proliferation of T-47D cells and that this proliferation was significantly observed when comparing effects induced by the highest dose of DEHP and by the lowest dose of MEHP. Those data suggest that both DEHP and MEHP can induced PR signaling, resulting in increased cell proliferation, at an environmentally-relevant dose for MEHP.

2.5 Conclusion

Overall, our results have demonstrated that DEHP and MEHP can increase cell proliferation of T-47D cells at environmentally-relevant and higher doses, which are not toxic for the cells. We also demonstrated that PR-A levels, as well as PR nuclear levels, were increased upon DEHP exposure. Importantly, inhibition of PR activation decreased DEHP- and MEHP-induced cell proliferation and PR nuclear levels. Together, these data suggested that exposure to DEHP and MEHP can enhance tumorigenic characteristics of breast cells in a PR-dependent mechanism.

3 ARTICLE 2 : ÉTUDE *IN VIVO* DE L'IMPACT D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE ET LACTATIONNELLE AU DEHP ET AU DINCH SUR LE DEVELOPPEMENT POST-NATAL DE LA GLANDE MAMMAIRE

Gestational and lactational exposure to the emergent alternative plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH) impairs lipid metabolism to a greater extent than the commonly used Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in the adult rat mammary gland.

L'exposition gestationnelle et lactationnelle au plastifiant alternatif émergent, le 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH), altère le métabolisme des lipides dans une plus grande mesure que le Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), couramment utilisé dans la glande mammaire du rat adulte.

Auteurs :

Béline Crobeddu¹, Antoine Jutras-Carignan^{2#}, Élise Kolasa^{1#}, Catherine Mounier², Bernard Robaire^{3,4} and Isabelle Plante^{1*}

* : To whom correspondence should be addressed

#: Both authors contribute equally to this work.

1 : INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

2 : Laboratoire du métabolisme des lipides, CERMO-FC, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Case postale 8888, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

3 : Department of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec H3G 1Y6, Canada

4: Department of Obstetrics & Gynecology, McGill University, Montreal, Quebec H4A 3J1, Canada

Soumis dans la revue : *Toxicological Sciences*

Date de soumission : 28 mars 2022

Date d'envoi des corrections : 01 juin 2022

Date d'acceptation : 14 juillet 2022

Date de publication en ligne : 21 juillet 2022

DOI : [10.1093/toxsci/kfac076](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfac076)

Contribution des auteurs :

Béline Crobeddu : 75% Conception, expérimentation et analyses (Figures 3-2, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, supp figures 3-1, 3-2 et supp tableau 3-1), obtention de financement, rédaction – révision et édition.

Antoine Jutras-Carignan : 5% Conception, expérimentation et analyses (Figure 3-3), et édition.

Elise Kolasa : 5% Conception, expérimentation et analyses (Figure 3-1), obtention de financement et édition.

Catherine Mounier : 2.5% - Conception, analyses et édition.

Bernard Robaire : 2.5% - Conception, obtention de financement et édition.

Isabelle Plante : 10% - Conception, analyses, obtention de financement, rédaction – révision et édition.

Conflit d'intérêt : Aucun à déclarer

Résumé :

En raison de leurs propriétés de perturbation endocrinienne, les plastifiants tels que le phtalate de di(2-éthylhexyle) (DEHP) peuvent affecter le développement hormonal de la glande mammaire. Au cours des dernières années, le DEHP a été partiellement remplacé par l'ester diisononyle de l'acide 1,2-cyclohexane dicarboxylique (DINCH) qui présente également des potentielles propriétés de perturbateurs endocriniens. L'objectif de la présente étude est de comprendre l'impact d'une exposition gestationnelle et lactationnelle au DEHP et au DINCH sur le développement de la glande mammaire en utilisant des rats Sprague-Dawley. Les deux plastifiants ont altéré les adipocytes du stroma de la glande mammaire de la progéniture adulte, comme le démontre une diminution de leur taille, un repliment de leur membrane et des modulations des profils lipidiques. Les traitements au DEHP ont diminué respectivement l'expression de *Rxra* et *Scd1* à faible et forte dose, mais n'ont affecté aucun des autres gènes étudiés. La modulation du métabolisme lipidique par le DINCH a pu être observée à la puberté par une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides, le transport des lipides et la lipolyse, et par une augmentation de l'expression des gènes de la β -oxydation et des gènes impliqués dans le stockage des lipides et la synthèse des acides gras à l'âge adulte, par rapport aux rats témoins et aux rats traités au DEHP. Une forte augmentation de différents marqueurs inflammatoires a été observée uniquement après l'exposition au DINCH. Ensemble, nos résultats indiquent qu'une exposition gestationnelle et lactationnelle au DINCH a des effets plus précoces et plus significatifs sur l'homéostasie lipidique, l'adipogenèse et l'état inflammatoire de la glande mammaire adulte que l'exposition au DEHP. La conséquence à long terme de ces effets sur la santé de la glande mammaire reste à déterminer.

Abstract :

Due to their endocrine disruption properties, phthalate plasticizers such as di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) can affect the hormone-dependent development of the mammary gland. Over the past few years, DEHP has been partially replaced by 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH) which also have potential endocrine disrupting properties. The goal of the present study is to understand the impact of a gestational and lactational exposure to DEHP and DINCH on mammary gland development using Sprague-Dawley rats. Both plasticizers altered the adipocytes of the mammary gland fat pad of adult progeny, as demonstrated by a decrease in their size, folding of their membrane and modulations of the lipid profiles. DEHP treatments decreased the expression of *Rxra* and *Scd1* at the low and high dose, respectively, but did not affect any of the other genes studied. DINCH modulation of lipid metabolism could be observed at puberty by a decreased expression of genes implicated in triglyceride synthesis, lipid transport and lipolysis, but by an increased expression of genes of the β -oxidation pathway and of genes involved in lipid storage and fatty acid synthesis at adulthood, compared to control and DEHP-treated rats. A strong upregulation of different inflammatory markers was observed following DINCH exposure only. Together, our results indicate that a gestational and lactational exposure to DINCH has earlier and more significant effects on lipid homeostasis, adipogenesis and the inflammatory state of the adult mammary gland than DEHP exposure. The long-term consequence of these effects on mammary gland health remained to be determined.

3.1 Introduction

From fetal period to adulthood, humans are constantly exposed to various mixtures of endocrine disruptive chemicals (EDC). The phthalate family has been identified as EDCs having anti-estrogenic, anti-androgenic, anti-progestogenic, and thyroid disrupting properties, depending of the phthalate and the tissue or cells studied (Culty et al. 2008; Hannon et al. 2015; Huang et al. 2021; Johns et al. 2015; Parks et al. 2000; Wang and Qian 2021). Phthalates are plasticizers that are added to plastics to increase their flexibility and softness. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), one of the most common phthalates, is used in food containers, medical devices, PVC flooring, clothes, toys, diapers and tampons (Bornehag et al. 2004; Den Braver-Sewradj et al. 2020; Erythropel et al. 2014; Park et al. 2019; Zarean et al. 2016). DEHP is not linked by covalent bonds in these products, and hence it is gradually released in the food (Sidlovska et al. 2017; Sioen et al. 2012), liquids (Erythropel et al. 2014), air and house dust (Bornehag et al. 2004; Xu and Li 2021). This results in chronic exposure to humans not only by ingestion or inhalation (Ding et al. 2019a; Fong et al. 2014), but also by direct physical contact by mouthing of PVC toys or dermal genital exposure through diapers for infants and toddlers (Ginsberg et al. 2016). Once it enters the body, DEHP is rapidly metabolized to one of its primary metabolites, the mono-ethylhexyl phthalate (MEHP). Both DEHP and MEHP have been measured in different human fluids, such as urine, sweat, umbilical cord blood (Latini et al. 2009; Mose et al. 2007), and breast milk (Hogberg et al. 2008; Latini et al. 2009; Mortensen et al. 2005; Zhu et al. 2006). DEHP or its metabolites have been found in 100% of urine samples in worldwide studies, demonstrating a global exposure (Ding et al. 2019a; Hogberg et al. 2008; Koch et al. 2006; Koch et al. 2003; Sidlovska et al. 2017). Newborns, especially in neonatal intensive care units, are the most exposed population (Koch et al. 2006; Lucaccioni et al. 2021). Infants and toddlers are also highly exposed due to their close contact with house dust through behaviors such as crawling and mouthing of objects (Ginsberg et al. 2016; Xu and Li 2021).

The perinatal period is one of the most sensitive windows for EDC exposure, in part due to immature detoxification pathways in the liver of infants (Ginsberg et al. 2016). Furthermore, increased evidence demonstrates that exposure during this vulnerability window can have long-term impact on health (Haugen et al. 2015; Lucaccioni et al. 2021). Accordingly, correlations between gestational and/or lactational exposure to DEHP with short and long-term pathologies, as well as transgenerational effects, have been demonstrated by *in vivo* studies (Ambe et al. 2019; Brehm and Flaws 2021; Brehm et al. 2018; Chen et al. 2015; Hayashi et al. 2019; Pocar et al. 2017; Zarean et al. 2016), and by epidemiological studies (Swan et al. 2015). Furthermore,

fetal and postnatal exposure to DEHP has been associated with reproductive anomalies (Nardelli et al. 2017), with dysregulation of glucose (Martinelli et al. 2006) and of lipid metabolism (Zhang et al. 2020), as well as with obesity in mice (Hao et al. 2013) and humans (Harley et al. 2017). A delay of the estrous onset has been observed for mice exposed to MEHP *in utero* and hyperplasia of their mammary gland was detected at one-year-old (Moyer and Hixon 2012).

The increased evidence that DEHP can cause endocrine, reproductive, and metabolic issues have led to its replacement in certain products by newer non-phthalate plasticizers, such as the 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH). DINCH is an ester glycol commercialized since 2002. Once ingested, it is rapidly metabolized, mainly to cyclohexane-1,2-dicarboxylicmono hydroxyisononylester (OH-MINCH), cyclohexane-1,2-dicarboxylicmonooxoisononylester (oxo-MINCH) and cyclohexane-1,2-dicarboxylicmonocarboxyisooctyl ester (cx-MINCH) (ANSES 2016). DINCH is gradually replacing DEHP for PVC products such as food containers, toys and medical devices (Bernard et al. 2018; Den Braver-Sewradj et al. 2020). Similar to phthalates, DINCH can migrate out of the plastic matrix, especially into high-fat products (EFSA 2006), inducing a human exposure mainly through dietary intake (Giovanoulis et al. 2018). DINCH metabolites have been detected in 84% of urine from a Norwegian population (Giovanoulis et al. 2016), while OH-MINCH has been found in 100% of urine samples of young adults (Kasper-Sonnenberg et al. 2019), pregnant women (Martinez et al. 2020), and children (Schwedler et al. 2020). Similar to DEHP, children are five times more exposed to DINCH than adults (Correia-Sa et al. 2017). However, little is known about the toxicity of DINCH or its metabolites. Like DEHP, DINCH seems to affect the reproductive system, as an *in vitro* exposure to DINCH decreased steroid production of Leydig cells (MA-10 cells) and in neonatal testis organ culture (Boisvert et al. 2016). Another *in vitro* study using bioengineered HEK293 cells showed that DINCH metabolites modulate the estrogen receptor α (ER α), ER β and androgen receptor (AR) activities (Engel et al. 2018). There is thus a need to better understand the effects of DINCH on endocrine tissues and to determine whether it can act as an EDC.

The mammary gland is one of the most sensitive organs to EDCs. Its postnatal development is hormone-dependent, being mainly orchestrated by progesterone and estrogens during puberty, and by prolactin and oxytocin during gestation and lactation (Briskin and Ataca 2015). Importantly, although the *in utero* and early life stages of development are considered as hormone-independent, some hormonal receptors are expressed, rendering these stages sensitive to dysregulation by EDCs (Fenton 2012). Furthermore, the proper development of the mammary gland epithelium requires an indispensable crosstalk with the stroma (also known as

the fat pad) (Brenot et al. 2020; Paulose et al. 2015). This fat pad is mainly composed of white adipose tissue (WAT), which surrounds the epithelium, and represents the biggest proportion of the nulliparous mammary gland (Hovey and Aimo 2010). WAT of the mammary gland is known to act as a structural support, an energy source through its lipid storage, and to deliver lipids to adjacent epithelial cells during lactation (Zwick et al. 2018). Adipose tissues are also known to have endocrine properties (Booth et al. 2016), although this role during mammary gland development is less well understood, and all the actors of the interaction between epithelial cells and adipocytes are poorly identified (Brenot et al. 2020). Nevertheless, the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are thought to be key regulators of adipose tissues; they are involved in adipocyte differentiation, maturation, fat accumulation and lipid metabolism (Ambele et al. 2020; Desvergne and Wahli 1999; Lowe et al. 2011; Schoonjans et al. 1996). There are three isoforms of PPARs, PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ , all expressed in the nulliparous rat mammary gland (Gimble et al. 1998), as well as in human breast cells (Kilgore et al. 1997; Suchanek et al. 2002a; 2002b; Suchanek et al. 2002c). PPAR γ is the preponderant form in adipose tissues (Janani and Ranjitha Kumari 2015). PPARs heterodimerize with retinoid X receptor alpha (RXR α) in association with context specific cofactors to alter the expression of different downstream genes upon ligand activation (Grygiel-Górniak 2014). Using an *in silico* approach, DEHP has been shown to bind to PPAR γ and RXR α (Kambia et al. 2016; Sarath Josh et al. 2014), while docking studies demonstrated that MEHP, but not DEHP, could induce the activation of the receptor and modulate lipid metabolism (Kratochvil et al. 2019). Accordingly, many studies have reported a dysregulation of the PPARs pathway upon DEHP or MEHP exposure, in both *in vitro* and *in vivo* models (Hao et al. 2012; Nardelli et al. 2015; Shoaito et al. 2019; Venkata et al. 2006). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), a transcription factor known to work in synergy with PPAR γ (Madsen et al. 2014b; Wagner et al. 2010), is also involved in adipocytes differentiation (Guru et al. 2021) and can be affected by DEHP (Campioli et al. 2014) or MEHP (Campioli et al. 2015; Chiang et al. 2016). Although less documented, it has been suggested that oxo-MINCH, but not DINCH, induces PPAR α and PPAR γ activation in HEK293 cells (Engel et al. 2018), while DINCH can dysregulate the PPAR pathway in the liver after *in utero* exposure in rats (Campioli et al. 2019).

In this study, we hypothesized that, similar to DEHP, DINCH can have endocrine disruptive properties. Therefore, we propose that an exposure to either DEHP or DINCH during the sensitive window of gestation and lactation can alter the mammary gland development. More specifically,

we postulated that exposure to DEHP and DINCH will result in the dysregulation of the PPAR pathways and lead to metabolic disorder which may result in developmental defects.

3.2 Material and Method

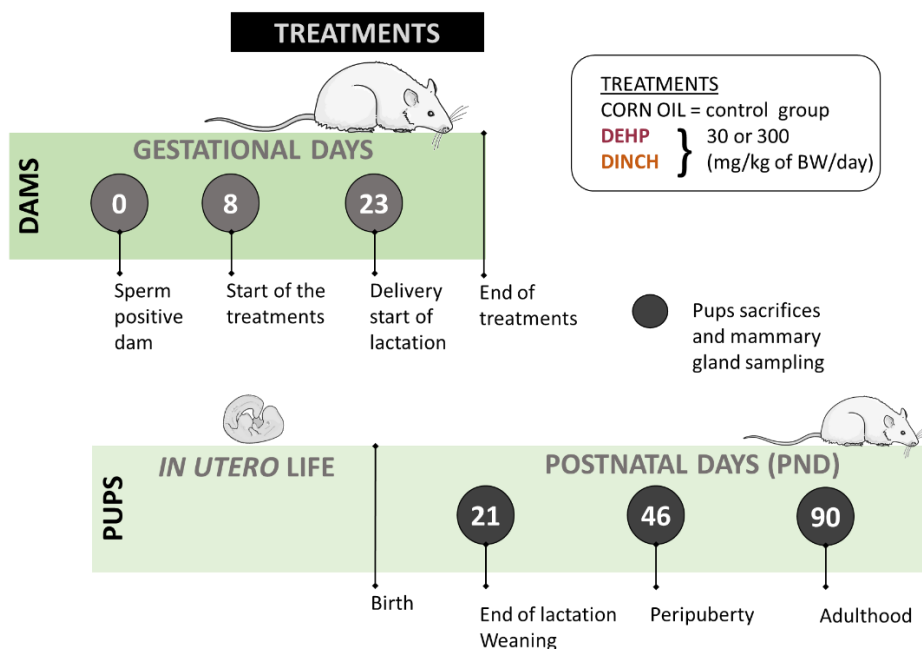
3.2.1 Animal Treatments

All animal care and handling were done in accordance with the guidelines outlined by the Canadian Council on Animal Care (McGill Animal Resources Centre protocol #7317). Detailed treatment method and animal procedures were described previously (Albert et al. 2018b; Nardelli et al. 2017). Briefly, nulliparous female and proven-breeder male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Quebec). Two females in proestrus were placed in mating cages with one male. The next morning, the presence of sperm in vaginal smears was considered as pregnancy day (PD) 0 in positive females. These females were placed in individual cages. At PD8, dams were randomly assigned to vehicles (corn oil, Sigma-Aldrich – ON, Canada) as the control group, DEHP or DINCH treatments. DEHP (purity $\geq 99.0\%$) was purchased from Sigma-Aldrich Corporation (CAS #117-81-7; Cat #80030, St. Louis, MO). DINCH (purity =99.5%) was purchased from BASF Canada (CAS #474919-59-0 USA and 166412-78-8 outside USA, Mississauga, ON). Animals were weighed and administered doses of 30 or 300 mg/kg of body weight daily by gavage during gestation and lactation, up to weaning (from PD8 to postnatal day (PND) 21), except on the day of birth where litters were left undisturbed. This period covers the murine mammary gland embryonic development which begins at embryonic day 10.5 (Filgo et al. 2016). In human, the most exposed populations are infants and toddlers, particularly premature infants, which can be exposed to 16 mg/kg/day of DEHP (Mallow and Fox 2014). The 30 mg/kg dose is thus representative of this high human exposure to DEHP (U.S Food and Drug Administration, 2002) with an adjustment for interspecies metabolism (Nair and Jacob, 2016), and considering that the exposure is indirect. The 300 mg/kg dose was selected based on previous literature that reported deleterious reproductive outcomes following exposure to DEHP during gestation and lactation (Gray et al. 2009).

For each litter, one female pup was sacrificed at each following stages: at weaning (PND21) to assess pre-pubertal development, around puberty (PND46) for the first hormone-dependent peak of proliferation, and during adulthood (after PND90) when the mammary gland ductal elongation is over, and animals have reached the full maturity of nulliparous rats. For this last group, females were sacrificed on their first day of estrous after they reached 90 days old to

limit variations in mammary gland structure linked with phases of the estrous cycle. A schema of the experimental design is present in supplementary figure 1. For each condition (treatments and age groups) between 11 and 15 animals were sacrificed; the size of each group vary due to the number of dams by condition, the size of the litter and the female/male ratio for each litter.

From all animals, four glands were dissected. The 4th right inguinal was used for the weight measurement; the right thoracic was used for cryosections to perform Masson's trichrome staining; the 4th left inguinal was used for RT-qPCR experiments; the abdominal glands were powdered on dry ice and used for Thin Layer Chromatography (TLC) and western blot experiments. For morphological experiments (weight, epithelium area and branching density), adipocytes histological experiments as well as RT-qPCR, evaluations were conducted blindly.



Supp – Figure 3-1: Experimental design of the gestational and lactational exposition.

Dams were treated from PD8 until weaning with one of five treatments (Corn oil; DEHP, 30 or 300 mg/kg/day; DINCH, 30 or 300 mg/kg/day). Pups were sacrificed at different key stages of development (postnatal day (PND)21, PND46 and PND90). Rats' illustrations come from Servier Medical Arts, and the schematic is inspired from (Albert et al., 2018).

3.2.2 Weight measurements

Each animal was weighed prior to sacrifice. After sacrifice, the 4th right inguinal mammary gland was excised and weighed. Results were expressed in mammary gland weight (g)/100 g of the total body weight.

3.2.3 Whole mount

3.2.3.1 Staining

As previously described (Gouesse et al. 2021), after being weighed, the 4th right inguinal mammary gland was excised, spread on glass slides and fixed in Carnoy's fixative solution (100% ethanol, chloroform, glacial acetic acid; 6:3:1). The mammary gland was washed in 70% ethanol, progressively rehydrated in water, and stained in carmine alum (2% carmine and 5% aluminum potassium sulfate in water). Tissues were then gradually dehydrated through serial ethanol baths and cleared in xylene. Finally, slides were mounted with Permount™ (FisherChemical™, ON, Canada - # SP15-500). Mammary gland images were captured with a digital camera (Sony DSC-HX50V) on a lightbox (Henning Graphics). To allow proper comparison of the size of the mammary glands, a ruler was placed beside every captured image.

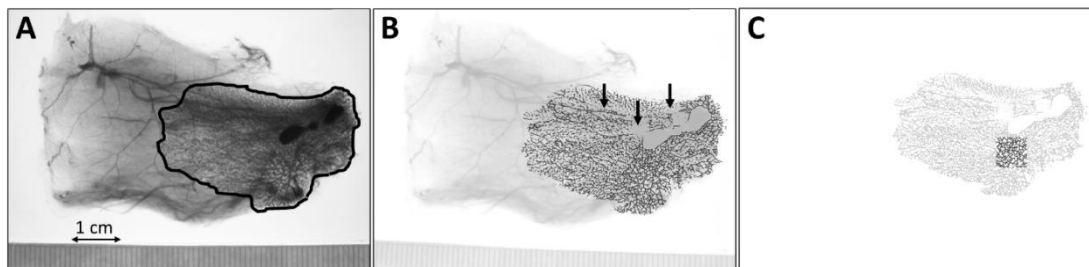
3.2.3.2 Epithelial area measurement

The epithelium area was quantified for all animals (n = 11-15 per group) from whole mounts images using Fiji, distributed by ImageJ software (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>). After setting the scale of the image, a line was drawn around the epithelium and this area was measured according to the procedure shown in supplementary figure 2A. Results were expressed in mm².

3.2.3.3 Assessment of epithelial branching density

The density of the mammary gland tree was measured using the skeletonize tool of Fiji software, accordingly to a method developed by the team of Dr. Fenton (Stanko and Fenton 2017). Using skeletonize tool, whole mount images were transformed into simplified images of the mammary gland network ([supplementary figure 3-2B](#)). To avoid variations due to impaired mammary gland excision and/or coloration, and because of the higher of complexity in adult mammary glands compared with young animal, a representative section of the whole skeleton

was chosen for every picture for further analysis (supplementary figure 2C). Within this section, the Sholl analysis of Fiji was applied to determine the number of interactions (N) by surface units. Results are expressed in N/mm^2 .



Supp Figure 3-2: Representative images of macroscopic analysis of the mammary gland using Fiji from ImageJ.

The inguinal mammary gland was processed for whole mount and imaged using a numeric camera. After setting the scale of the image with the ruler, a line was drawn around the epithelium and the area were measured in mm^2 (A). The epithelium was analyzed using skeletonize tool of Fiji software. Mammary gland excision or coloration issues can result in areas that are missing or cannot be skeletonized (black arrows) (B). Representative section of the skeletonized mammary gland epithelium used to analyze the mammary gland branching networks (C).

3.2.4 Cryosection and Masson's trichrome

The right thoracic mammary gland was dissected for each animal, immediately embedded in cryomatrix (Leica) and stored at $-80^{\circ}C$. Cryosections of $8\ \mu m$ were cut and fixed in Bouin's solution (FisherChemical) overnight. After being rinsed, sections were sequentially incubated in Weigert's iron hematoxylin, in Biebrich scarlet-acid fuchsin, in phosphomolybdic-phosphotungstic acid, and in aniline blue solution (all from FisherChemical), interspersed by rinsing with water. Sections were then rinsed once with 1% acetic acid before being dehydrated in serial alcohol 95% EtOH, absolute EtOH, and xylene. Sections were mounted with Permount (FisherChemical™ - # SP15100). Cryosections from randomly picked animals ($n = 5-9$ per group) were used for analysis. Images were obtained using a Nikon A1R+ confocal microscope equipped with a digital camera (Nikon). All the analyses were done using the NIS elements analysis software (Nikon, version 4). The size of each adipocyte with an intact structure within a field was measured using the drawing tool; for each animal, the mean size of 11-29 adipocytes per field ($85\ 500\ \mu m^2$) was used for statistical analysis.

3.2.5 Lipid extraction and Thin Layer Chromatography (TLC)

Lipids were extracted from abdominal snap-frozen PND90 mammary glands according to the standard technique (Bligh and Dyer 1959; Ralston et al. 2014). Mammary glands were

weighed, and equal quantities of tissues were pulverized on dry ice. The resulting powders were then sonicated in 2:1 methanol/chloroform (v/v); chloroform and water were added, and the samples were vortexed. After centrifugation at 700 G for 20 minutes, the bottom phase was collected, corresponding to the organic phase containing the lipids. The lipid extractions were dried under nitrogen and all samples were resuspended in equal volume of hexane. Lipids were separated by TLC on silica-coated plates (Sigma Aldrich - # 105748001) using a mixture of hexane/diethylether/acetic acid (80:20:1 v/v) as a developing solvent (Lounis et al. 2017). Lipids were visualized by exposure to iodine vapors. Spots were identified using lipid standards for triacylglycerides (TAG), free fatty acids (FFA), cholesterol esters (CE), free cholesterol (CHOL) and phospholipids for each treatment, and their density was analyzed using ImageJ software, and normalized to the control group, for each silica-coated plate.

3.2.6 RNA extraction

The 4th left inguinal mammary gland was excised and immersed in RNA Later solution (Qiagen, ON, Canada). After 24 hours of incubation at 4°C, samples were stored at -80°C. Total mRNAs were extracted from 20 to 100 mg of mammary gland tissues using the Aurum total RNA fatty and fibrous tissue kit (Biorad, ON, Canada - # 7326830) according to the manufacturer instructions. RNA integrity was verified using the Experion RNA StdSens analysis kit (Biorad) and the Experion™ bioanalyzer (Biorad). Samples were only used when the RNA quality indicator (RQI) was over 8. RNA concentration and purity were measured using a Nanodrop spectrophotometer (ThermoScientific). Extracted RNA samples were stored at -80°C until utilization for RT-qPCR.

3.2.7 Protein extraction and western blot

Detailed methodology for protein extraction and western blotting was described in a previous publication (Gouesse et al. 2021). Briefly, abdominal snap-frozen mammary glands were mechanically ground into a powder on dry ice and lysed with a triple detergent lysis buffer (50 mM tris-Base, 150 mM sodium chloride, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate – pH 8) supplemented with 1.25M Sodium Fluoride, 1M Sodium Orthovanadate and 1% Halt Protease and Phosphatase Cocktail Inhibitor (Thermo-scientific - #PI78430). Samples were sonicated and centrifuged to collect the supernatants which 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 - #

0023250). 25 mg of protein for each sample were separated by migration using SDS-PAGE gels, TGX Stain-Free™ FastCast™ 10% acrylamide, (Bio-Rad - # 1610183) and transferred onto PVDF membranes using the Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad - # 1704273). Total lane proteins of each well were visualized using the “Stain-free” technology and imaged using the ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% dry milk dissolved in TBS-Tween 0.1% and incubated with PPAR γ antibody (Santa Cruz - # sc-7273) diluted (1/1000) in the blocking solution, overnight at 4°C in a shaker. Following 3 washes (5 minutes each) with TBS-Tween 0.1%, membranes were incubated with anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (CellSignaling – NEB – ON, Canada - # 7074) diluted in the blocking solution (1/10 000). The chemiluminescent signals were obtained using Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad, # 1705061) or Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad, # 1705062) and measured using the ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad). Density of each protein band was quantified and normalized to the total lane proteins using ImageLab 6.0 software (Bio-Rad).

3.2.8 RT-qPCR

The reverse transcription was done using the iScript™ cDNA synthesis kit (Biorad- # 1708891) and the Mastercycler Gradient (Eppendorf- # 5331). qPCR assays were next performed with the SsoAdvanced™ SYBR®green Supermix (Biorad-# 1725274) using a C1000™ thermal cycler (Biorad) and results were analyzed using the CFX Manager Software (Biorad). Primers (**Supplementary Table 3-1**) were designed using Primer 3 website (<http://primer3.ut.ee/>) and Primer blast, a tool from NCBI website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). For each pair of primers, the efficiency and the specificity of qPCR reactions were verified by the standard curve and analysis of dissociation curves of the PCR products, respectively (Lanoix *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2019). The size of the amplicon was also verified using agarose gel electrophoresis. mRNA level for each gene was normalized using four different reference genes, selected for each developmental stage based on their stability between the different treatments using the geNorm algorithm (Gaston *et al.*, 2020; Lanoix *et al.*, 2012). *Rpl13a*, *Actb*, *Hprt1* and *Uxt* were used to normalize PND46, and *Eef1a1*, *Hprt1*, *Sdha* and *Atp5b* were used for PND90. Amplification curves were next analyzed using the comparative cycle threshold method ($\Delta\Delta C_t$ method).

Supp Table 3-1: Representative images of macroscopic analysis of the mammary gland using Fiji from ImageJ.

For each gene (target or used as reference), the nucleotide sequences of the primers (forward (F) or reverse (R)) are presented.

Abreviation	Full name	Type of genes	Reference genes for	Direction	PRIMERS SEQUENCE
<i>RPL13A</i>	ribosomal protein L13a	Reference	PND46	F	ATGAACACCAACCCGCTCTCG
				R	GACCACCATCCGCTTTTCTTG
<i>Eef1a1</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Reference	PND90	F	GGAGCCAAGTGCTAATATGCC
				R	GGCTTGTCAGTTGGACGAGT
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Reference	PND90	F	AGCCTCAAGTTCGGGAAAGG
				R	CCGCAGAGATCGTCCATACA
<i>ATP5B</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Reference	PND90	F	CAGGCTGGCTCAGAGGTATC
				R	GCAGGGTCAGTCAGGTCATC
<i>Hprt</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Reference	PND46, PND90	F	CAGTCCAGCGCTCGTGATTA
				R	TGGCTCCCATCTCCTTCAT
<i>Actb</i>	actin, beta	Reference	PND46	F	CCTTCTTGGGTATGGAATCCTG
				R	GGTCTTACGGATGCAACG
<i>Uxt</i>	ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone	Reference	PND46	F	ACTGCAGCGAGACTTGCAAAG
				R	GGCCACATAGATGCGTGAA
<i>PPARα</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alfa	Target		F	GGCAGAGGTCGGATTTCTCC
				R	CCTGGATAGCCTTGGCAAA
<i>PPARδ</i>	peroxisome proliferator activated receptor delta	Target		F	GGCCTTCCCAAGCACATCT
				R	TCGTGGATGATGAAGGGTGC
<i>PPARγ</i>	peroxisome proliferator activated receptor gamma	Target		F	GCTCCAAGAATACCAAAGTGGC
				R	CGATGGCCATGAGGGAGTTT
<i>PTGER3</i>	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	Target		F	CTGCCAGATGATGAACAACCTG
				R	CTCGGTGTGTTAATGGCAAGG
<i>LPL</i>	lipoprotein lipase	Target		F	GGATGGACGGTGACAGGAAT
				R	GTATAGCCGGCAGACACTGG
<i>ADIPOQ</i>	adiponectin	Target		F	GGATTACTGCAACCGAAGGG
				R	CTTAGGACCAAGAACACTGTC
<i>ACOX1</i>	acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	Target		F	GTGGAACCTGTTGCTCAAT
				R	AAGCCTCGAAGATGAGTCCGTG
<i>DGAT1</i>	diacylglycerol O-acyltransferase 1	Target		F	GCAATGATGGCTCAGGTCCC
				R	GCACGTAGTAGCTGGGACA
<i>SCD1</i>	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Target		F	TGGGAAAGTGAAGCGAGCAAC
				R	GTAGGAACTGGAGATCTCTGGAGC
<i>PLIN1</i>	perilipin 1	Target		F	TCCGGAAAAGATCGCCTCTG
				R	TATCCGCTGTCTCTGGC
<i>PLIN4</i>	perilipin 4	Target		F	GCTGCCACACACTTTGCTAC
				R	CCAGCTGAGCTTGTCTCA
<i>FABP4</i>	fatty acid binding protein 4	Target		F	AAGTGGTGGTGAATGTGC
				R	AAATTCAGTCCAGGGCCTGCT
<i>FASN</i>	fatty acid synthase	Target		F	TCTCAGGCGTGATAAGTGC
				R	CAGGGTCCAGCTAGAGGGTA
<i>Leptin</i>	Leptin	Target		F	TTCACACCGCAGTCGGTATC
				R	GCACGTTTTGGGAAGGCAAG
<i>AQP7</i>	aquaporin 7	Target		F	GTTTGGCTTTGGGGTGTCT
				R	TTCCGGCAGCTGAACACTTT
<i>ACADM</i>	acyl-CoA dehydrogenase medium chain	Target		F	TCAAGATTGCAATGGGGGCT
				R	CTCCTTGGTGCTCCACTAGC
<i>OLR1</i>	oxidized low density lipoprotein receptor 1	Target		F	CCCATCCACCTCCCAATTT
				R	GCCCCTGGTCTAAAGAATTGA
<i>STAT5a</i>	Signal Transducers and Activators of Transcription 5a	Target		F	AACATGTACCCACCGAACCC
				R	AAGTTCTCCACATGCCTGG
<i>STAT5b</i>	Signal Transducers and Activators of Transcription 5b	Target		F	ACATGTACCCACAGAATCCCG
				R	GAGGGATCCACTGACTGTCC
<i>RXRα</i>	Retinoid X receptor alpha	Target		F	AACCCCTCTAGGCCTCAAT
				R	TAGTGTGGCTGAGGAGCG
<i>APOA2</i>	apolipoprotein A2	Target		F	TGTCAGGACTCGTCTTCC
				R	ACAAGCAGAAAGTCGGGAGA
<i>CCL19</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 19	Target		F	ACCAGAAGAGAGGACCAAGC
				R	CTGTATGCTCACACTCAG
<i>CCL2</i>	C-C Motif Chemokine Ligand 2	Target		F	TGTCTCAGCCAGATGCAGTT
				R	CAGCCGACTCATTGGGATCA
<i>C/EBPα</i>	CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha	Target		F	AAGTGTCCCAACCCCTAGTT
				R	CCCTTCTCCACGAACCTACC
<i>ADGRE1 (F4/80 antigen)</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1	Target		F	CGACCTGGTTGAGTTCAGC
				R	CAGAGGGTGTGAGAGAGCA
<i>NLRP3</i>	NLR Family Pyrin Domain Containing 3	Target		F	TGTAGGGTCTGGAGCAAAGG
				R	CTTGTGCTGACTGAGGACCTGA
<i>CD68</i>	CD68 Molecule	Target		F	ACGGACAGCTTACCTTTGGA
				R	AATGTCCACTGTGCTGCTTG
<i>NFκB-1</i>	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	Target		F	TTCACTCGGAGACTGGAAACC
				R	GAITTCCTCCCTCCGCTCA

3.2.9 Statistical analysis

All statistical analyses were done using GraphPad Prism 8. For all experiments, outliers were removed, when applicable, with the “identify outliers” tool of Prism, using ROUT method for which the false discovery rate was set at 1%. The normality of the distribution was verified using d’Agostino-Pearson omnibus normality test. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by a Dunn’s multiple comparison test or using One way ANOVA test followed by Tukey’s test. For TLC experiments, p-values were calculated for each treatment individually as results had to be normalized to the control (value of 1) for each silica-coated plate. Statistics were thus realized using the one sample t-test compared to a hypothetical value of 1.

3.3 Results

3.3.1 Morphological characteristics

No change of the body weight was observed with either the DEHP or DINCH treatments when compared to the control group (data not shown). Although it was not significant using an ANOVA analysis, the relative mammary gland weight (normalized to body weight) tended to increase at PND90 for pups treated with 300 mg/kg DEHP and 30 mg/kg DINCH compared to the control group (**Figure 3-1G**). No modulation of the mammary gland weight was observed at PND46 (**Figure 3-1D**) nor PND21 (**Figure 3-1A**). No differences were observed in the mammary gland’s epithelium ductal network, as assessed by the epithelial area (**Figure 3-1B, E, H**) and branching density (**Figure 3-1C, F, I**), upon DEHP or DINCH treatments for all ages. These results suggested that the small increase in the mammary gland’s weight was not associated with epithelial expansion. Therefore, the focus was turned to the mammary gland fat pad at PND90. Using histology, a significant decrease of the adipocytes size was measured for 30 mg/kg DEHP and both doses of DINCH (**Figure 3-2F**). In addition, we observed more adipocytes with membrane folding and features similar to crown-like structures (CLS) for the four treatments compared to the control group (**Figure 3-2A-E**).

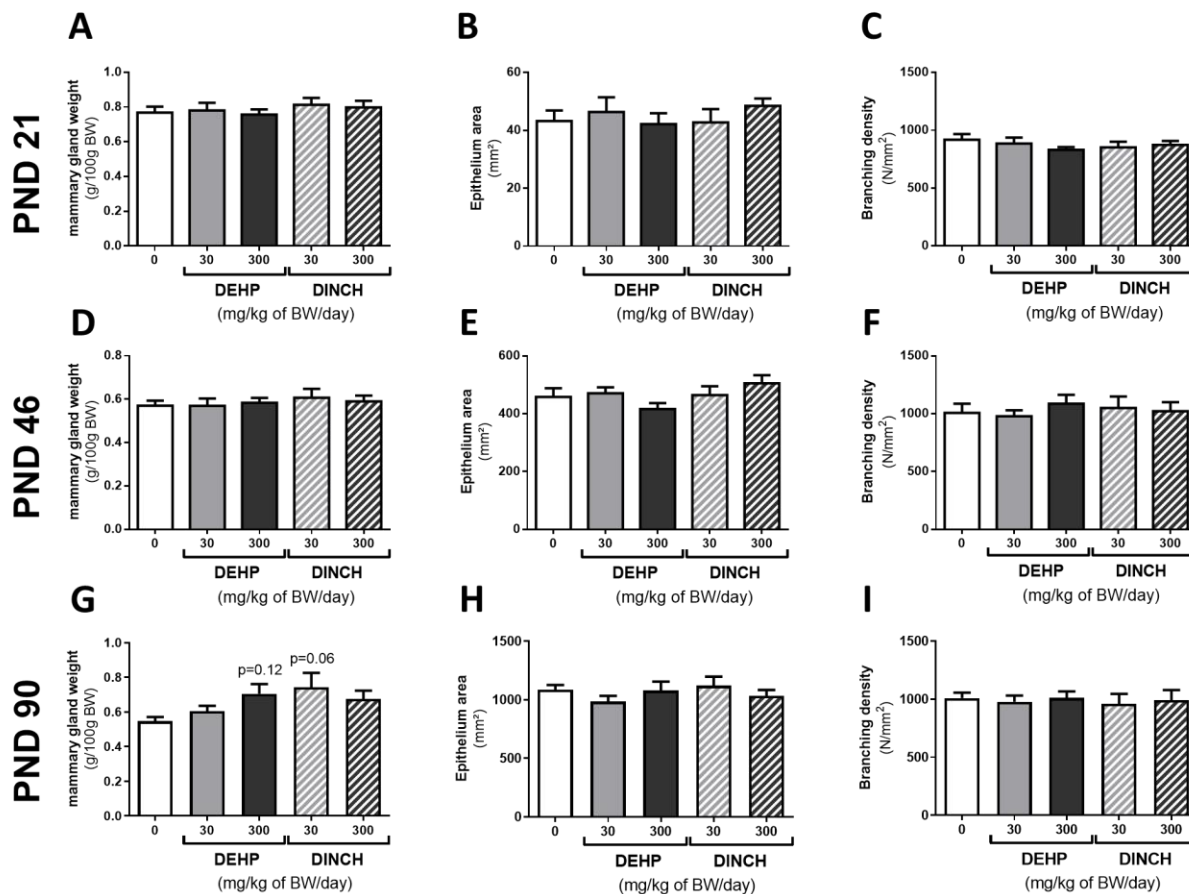


Figure 3-1 : Morphological characteristics of the pups' mammary glands at different stages of development.

Pups were exposed during gestation and lactation by gavage to corn oil (0, control diet), DEHP or DINCH (30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day)) and sampled at postnatal day (PND) 21 (A, B, C), 46 (D, E, F) and 90 (G, H, I). Mammary glands weight was normalized on total body weight (g/100 g of body weight) (A, D, G). Epithelium area (mm²) (B, E, H) and branching density (N/ mm²) (C, F, I) were measured using whole mount images. Histograms represent the means \pm SEM (n = 11-15 pups) for each condition. P-values were calculated between each group with Kruskal-Wallis test with Dunn's test or One way ANOVA with Tukey's test.

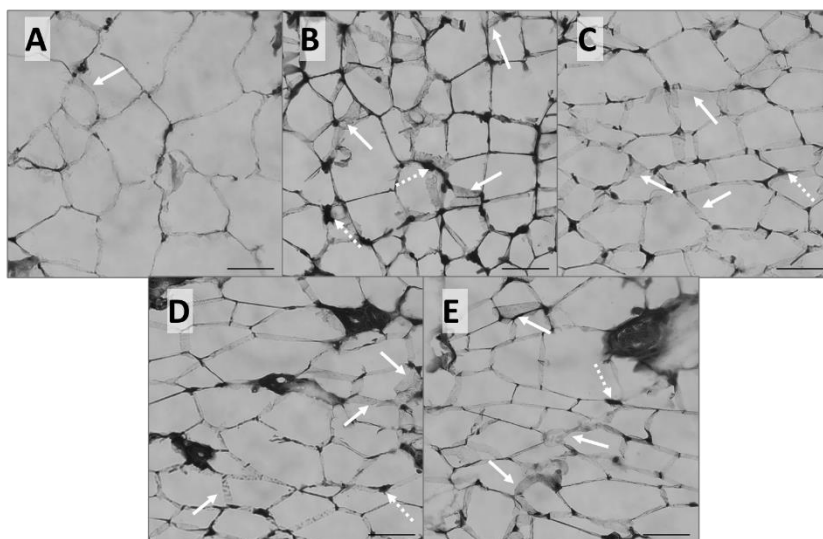
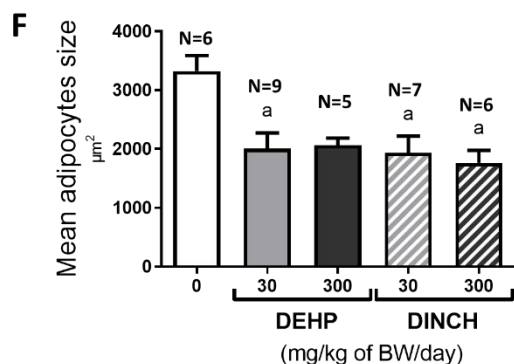


Figure 3-2: Adipocyte size analysis in mammary glands of pups sampled at PND90.

Mammary gland cryosections from the control diet (A) or animals treated with 30 (B) or 300 (C) mg/kg of BW/day of DEHP, or with 30 (D) or 300 (E) mg/kg of BW/day of DINCH were processed for Masson's trichrome staining. Size and number of each complete adipocyte were measured using NIS analysis. Scale represents 50 μ m. Plain arrows show membrane folding. Dotted arrows show feature similar to crown-like structure. Histograms represent the means adipocyte size \pm SEM (n = 5-9 pups) for each diet (F). p-values were calculated between the control group and each treatment with Kruskal-Wallis test with Dunn's test. ^a different from controls (P < 0.05).



3.3.2 Lipid profile of the Mammary Gland

In order to understand better the functional impact of the adipocyte's modification, the quantification of the lipid profile of the mammary gland was done for the PND90 samples using thin-layer chromatography. Relative levels of phospholipids, free cholesterol, and cholesterol ester (Figure 3-3C-E) were modulated neither by DEHP nor by DINCH at PND90. Interestingly, free fatty acid levels (FFA) (Figure 3-3B) were decreased by DEHP and DINCH exposures, while TAG levels were significantly decreased (Figure 3-3A) only by the higher dose of DEHP and DINCH.

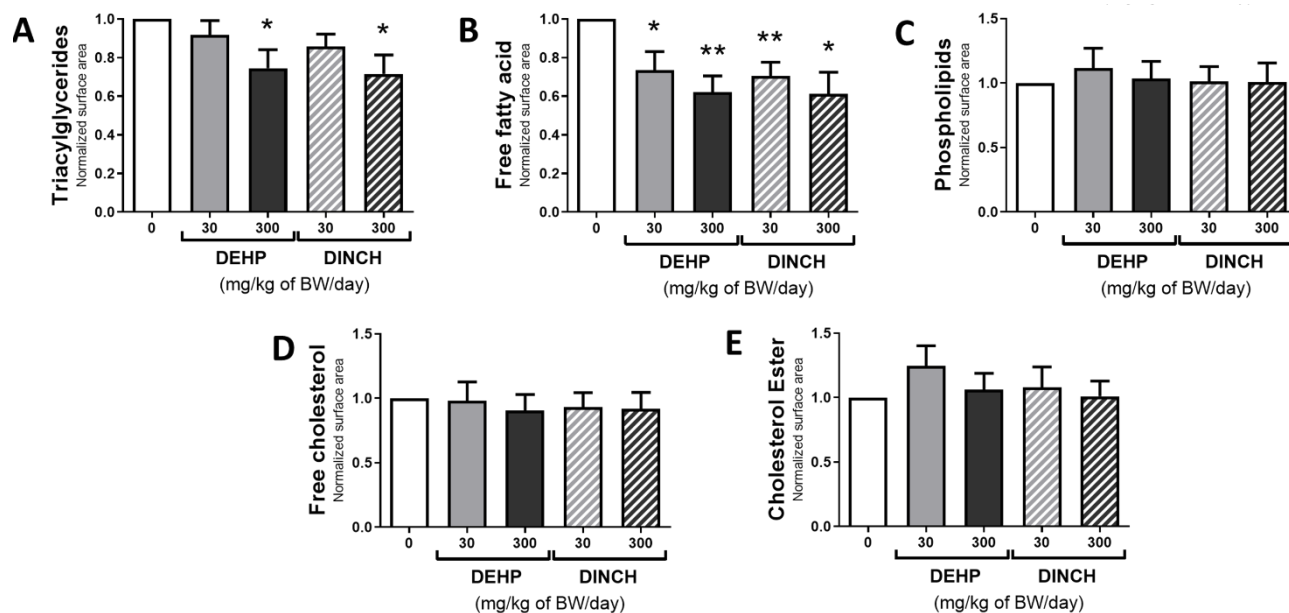


Figure 3-3: Lipid profile of mammary glands of pups sampled at PND90.

Lipids were extracted from mammary glands of pups exposed during gestation and lactation by gavage of corn oil, DEHP or DINCH at 30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day) at PND90. Lipids were separated by thin-layer chromatography on silica-coated plates. After an exposure of iodine vapors, lipids were visualized as yellow dots and their density were analyzed using ImageJ software. Results for each lipid as triacylglycerides (A), free fatty acids (B), phospholipids (C), free cholesterol (D) and cholesterol esters (E), were normalized on the control diet. Histograms represent the means \pm SEM (n=7 pups) for each Diet. p-values were calculated for each treatment individually comparing of a hypothetical value of 1 (as control diet) using the one sample t test, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01.

3.3.3 PPARs/RXRalpha pathway

The PPAR pathways have been implicated in lipids metabolism. We thus next wanted to evaluate if these pathways could be dysregulated by DEHP and DINCH treatments. mRNA levels of *Ppars*, as well as their partners *C/Ebpa* and *Rxr α* , were thus measured at PND90 (Figure 3-4). For all three isoforms of PPAR (*Ppara*, *Ppar δ* and *Ppar γ*), no effects were observed upon DEHP treatments while mRNA levels were downregulated by DINCH treatments compared to the control group and DEHP treatments (Figure 3-4A-C). *C/ebpa* mRNA levels were drastically increased by DINCH treatments compared to both control and DEHP treatments (Figure 3-4E). *Rxr α* mRNA levels were significantly downregulated for the 30 mg/kg DEHP and 300 mg/kg DINCH treatments at PND90 compared to controls (Figure 3-4D).

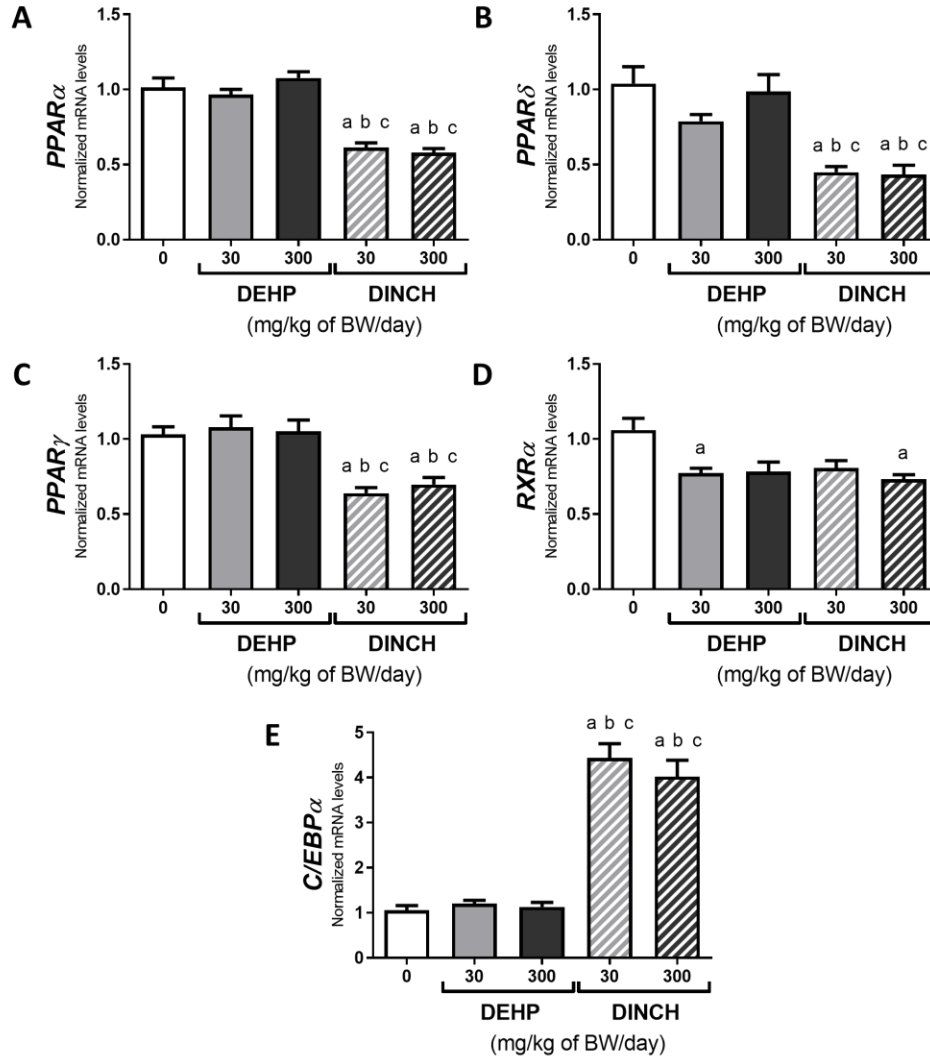


Figure 3-4: Transcriptomic expression of PPARs and RXR α in mammary glands of pups sampled at PND90.

RNA was extracted and reverse transcript from mammary glands of pups exposed during gestation and lactation by gavage of corn oil, DEHP or DINCH at 30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day) at PND90. mRNA levels of *PPAR α* (A), *PPAR δ* (B), *PPAR γ* (C), *Rxr α* (D) and *C/EBP α* (E) have been measured by qPCR and normalized using 4 reference genes (*Eef1a1*, *Hprt1*, *Sdha* and *Atp5b*). Histograms represent the means \pm SEM (n=11-14 pups) for each diet. p-values were calculated between each group with Kruskal-Wallis test with Dunn's Test or One way ANOVA with Tukey's test. ^a different from controls (P < 0.05); ^b different from the 30 mg/kg DEHP (P < 0.05); ^c different from the 300 mg/kg DEHP (P < 0.05).

As PPAR γ is the main isoform in adipose tissue (Cristancho and Lazar 2011; Grygiel-Górniak 2014; Lowe et al. 2011) and has been shown to be activated by MEHP in human breast cells (Venkata et al. 2006) and by DINCH metabolites in HEK293 cells (Engel et al. 2018), we decided to further study this isoform. Interestingly, while no changes were observed at the protein levels upon DEHP treatments, western blot analysis showed a tendency of increase of PPAR γ protein levels for the DINCH treatments (**Figure 3-5**).

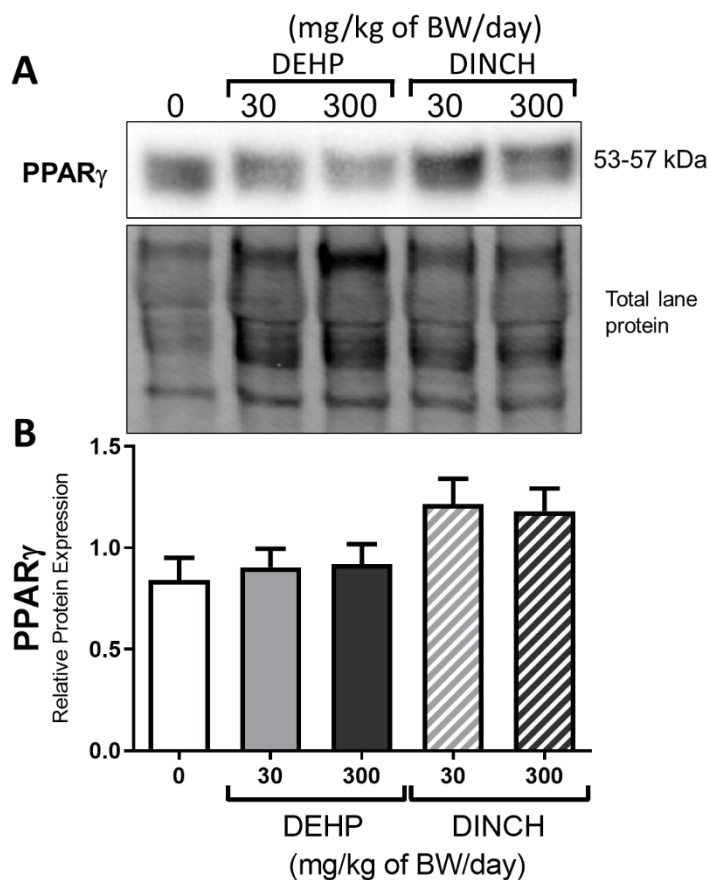


Figure 3-5: PPAR γ protein expression in mammary glands of pups sampled at PND90

Proteins were extracted from mammary glands of pups exposed during gestation and lactation by gavage of corn oil, DEHP or DINCH at 30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day) at PND90. A representative blot showing PPAR γ protein expression and the total lane protein used for normalization is shown (**A**). Histograms represent the means \pm SEM (n=11-14 pups) of PPAR γ relative protein expression at PND90 normalized to the total protein level of the same well (**B**). p-values were calculated between the control group and each treatment with One way ANOVA with Tukey's test.

3.3.4 mRNA expression of genes implicated in adipogenesis and lipid metabolism

To further characterize the effects of DEHP and DINCH, mRNA levels of downstream targets of PPARs as well as of other genes implicated in adipogenesis and lipid metabolism were analyzed by RT-qPCR. For DEHP treatments, a decrease in the levels of *Olr1* and *Scd1* (**Figure 3-6A, F**), implicated in the lipid transport and TAG synthesis respectively, was observed, but was only significant for *Scd1* mRNA level for the 300 mg/kg dose. A small non-significant decrease of *Stat5a* and *Stat5b* (**Figure 3-7G-H**), implicated in adipocytes development and differentiation,

was also observed. For DINCH treatments, mRNA levels of *Olr1*, *Lpl* and *Apoa2* (Figure 3-6A-C), implicated in lipid transport, were decreased at PND90, although it was not statistically significant for *Lpl*. DINCH treatments also decreased *Ptger3* and *Dgat1* mRNA levels (Figure 3-7D, F), implicated in the regulation of lipolysis and TAG synthesis, compared to control and DEHP-treated groups. In contrast, mRNA levels of *Acadm*, *Acox1*, *Scd1*, *Plin4* and *Fasn* (Figure 3-6D, E, F; Figure 3-7B, E) involved in the β -oxidation, TAG synthesis, lipid storage and fatty acid synthesis, respectively, were increased upon DINCH treatments at PND90 compared to either the control group, DEHP treatments or both. The mRNA levels of other downstream targets of PPARs implicated in gluconeogenesis (*Aqp7*), lipid storage (*Leptin*) and adipocyte differentiation (*Adipoq*, *FabP4* and *Plin1*) were modulated neither by DEHP nor DINCH at PND90 (Figure 3-6G-I and Figure 3-7A, C).

To determine whether the effects of the treatments on adipogenesis and lipid metabolism can be observed earlier, mRNA levels of the studied target genes were analyzed at PND46 (Figure 3-8). Treatments with DEHP showed no effects for any of the transcripts examined. However, *Ppar δ* , *Rxra*, *Plin4*, and *Acox1* were downregulated by DINCH treatments (Figure 3-8B-D, and H), compared to the control group or DEHP treatments, while no effect was observed for the other genes examined (Figure 3-8A, E-G and I-L).

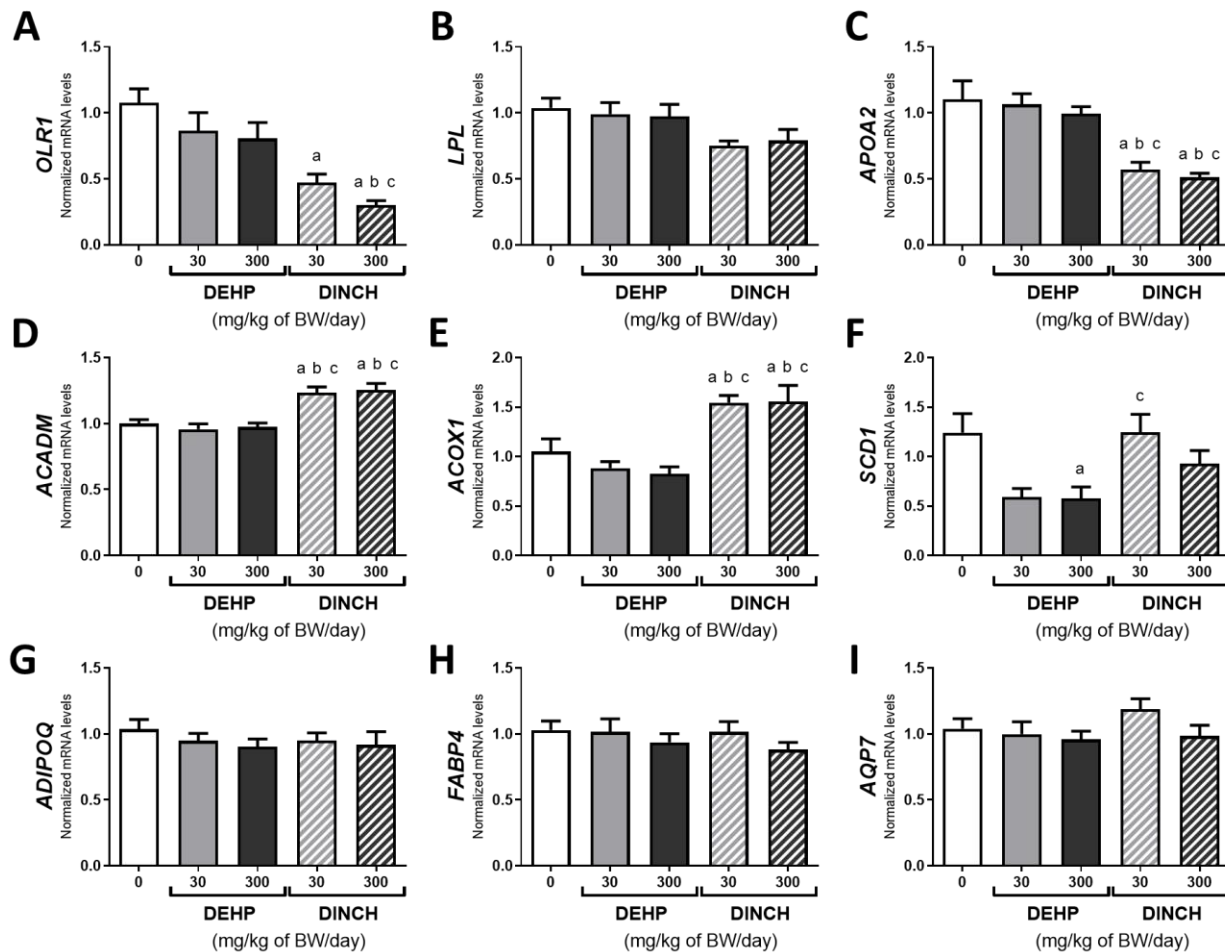


Figure 3-6: mRNA levels of genes implicated in lipid metabolism, downstream genes of PPARs pathways of the mammary gland of pups sampled at PND90.

RNA was extracted and reverse transcript from mammary glands of pups exposed during gestation and lactation by gavage of corn oil, DEHP or DINCH at 30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day) at PND90. mRNA levels of *OLR1* (A), *LPL* (B), *APOA2* (C), *ACADM* (D), *ACOX1* (E), *SCD1* (F), *ADIPOQ* (G), *FABP4* (H), and *AQP7* (I) have been measured by qPCR and normalized using 4 reference genes (*Eef1a1*, *Hprt1*, *Sdha* and *Atp5b*). Histograms represent the means \pm SEM (n = 11-14 pups) for each diet. p-values were calculated between each group with Kruskal-Wallis test with Dunn's Test or One way ANOVA with Tukey's test. ^a different from controls (P < 0.05); ^b different from the 30 mg/kg DEHP (P < 0.05); ^c different from the 300 mg/kg DEHP (P < 0.05).

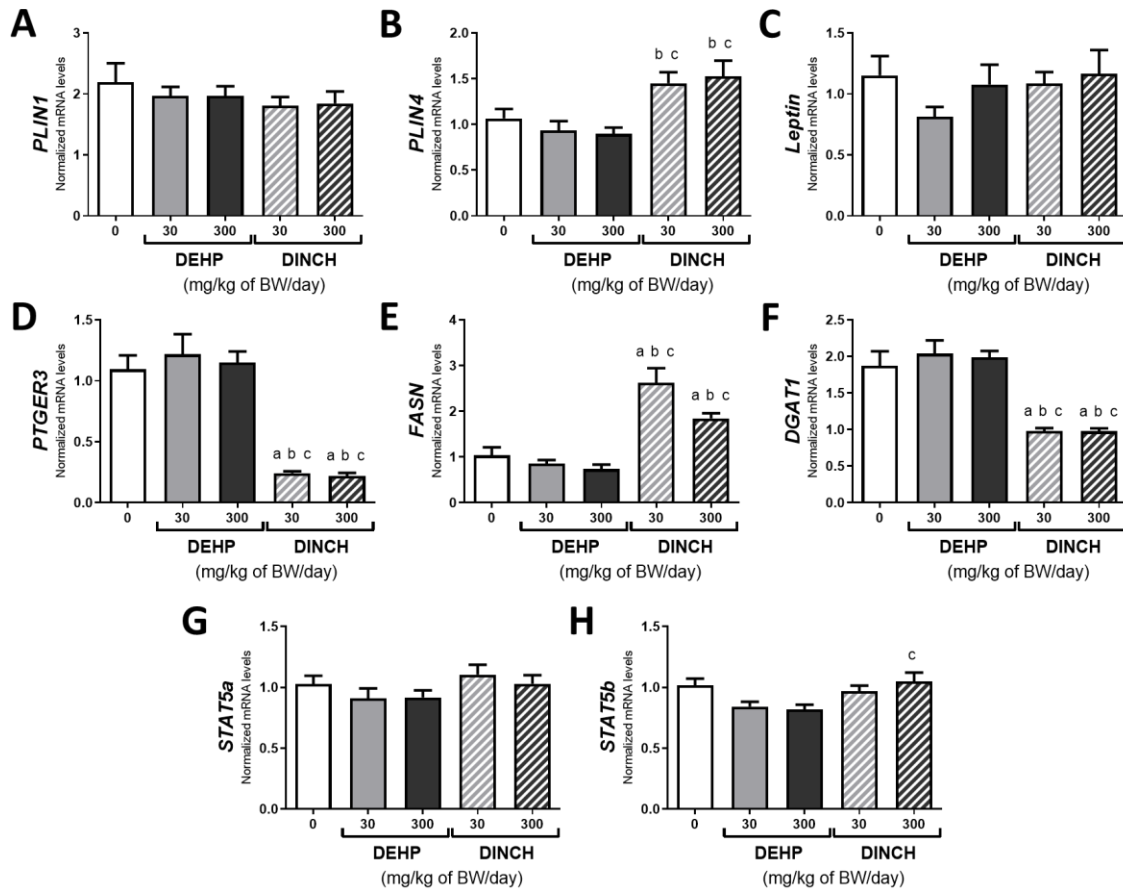


Figure 3-7 : mRNA levels of genes implicated in adipogenesis or lipid metabolism of the mammary gland of pups sampled at PND90.

RNA was extracted and reverse transcript from mammary glands of pups exposed during gestation and lactation by gavage of corn oil, DEHP or DINCH at 30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day) at PND90. mRNA levels of *PLIN1* (A), *PLIN4* (B), *Leptin* (C), *PTGER3* (D), *FASN* (E), *DGAT1* (F), *STAT5a* (G) and *STAT5b* (H). All genes have been measured by qPCR and using 4 reference genes (*Eef1a1*, *Hprt1*, *Sdha* and *Atp5b*). Histograms represent the means \pm SEM (n= 11-14 pups) for each diet. p-values were calculated between each group with Kruskal-Wallis test with Dunn's Test or One way ANOVA with Tukey's test. ^a different from controls (P < 0.05); ^b different from the 30 mg/kg DEHP (P < 0.05); ^c different from the 300 mg/kg DEHP (P < 0.05).

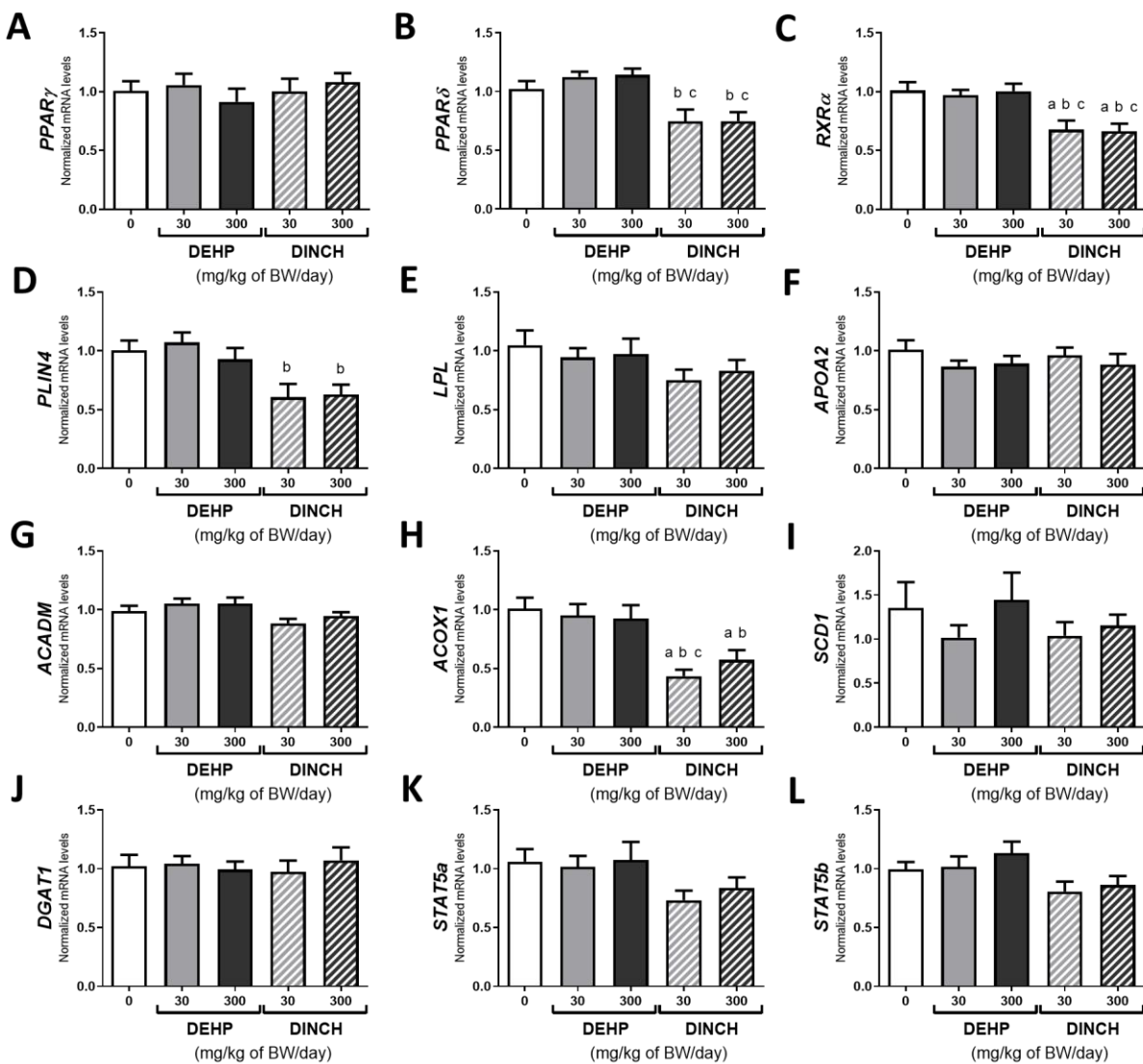


Figure 3-8: mRNA level of genes implicated in lipid metabolism of the mammary gland of pups sampled at PND46.

mRNA levels of PPAR γ (A), PPAR δ (B), Rxra (C), PLIN4 (D), LPL (E), APOA2 (F), ACADM (G), ACOX1 (H), SCD1 (I), DGAT1 (J), STAT5a (K) and STAT5b (L) have been measured by qPCR and normalized using 4 reference genes (RPL13A, ACTB, HPRT1 and UXT). Histograms represent the means \pm SEM ($n = 11-15$ pups) for each diet. p-values were calculated between each group with Kruskal-Wallis test with Dunn's Test or One way ANOVA with Tukey's test. a different from controls ($P < 0.05$); b different from the 30 mg/kg DEHP ($P < 0.05$); c different from the 300 mg/kg DEHP ($P < 0.05$).

mRNA expression of genes implicated in inflammation

To further understand the slight increase of mammary gland weight at PND90 while TAG levels were lower, and given the appearance of features similar to CLS, as well as the known link between metabolic disorders, obesity and inflammation (Hotamisligil 2006), we then assessed the mRNA levels of genes involved in inflammation (Figure 3-9). Only trends toward decrease were observed for DEHP treatments for *Nlrp3*, *Ccl2*, *Ccl19*, *F4/80* and *Cd68* (Figure 3-9). In contrast, significant increases were observed for *Nlrp3*, *Ccl19* and *F4/80* mRNA levels compared to the control group or DEHP treatments for both treatments of DINCH (Figure 3-9B, D, E), and for *Cd68* and *Ccl2* mRNA levels only at 30 mg/kg of DINCH (Figure 3-9C, F), compared to 30mg/kg DEHP. A non-significant increase was observed for *NFkB* rats exposed to DINCH-treatments.

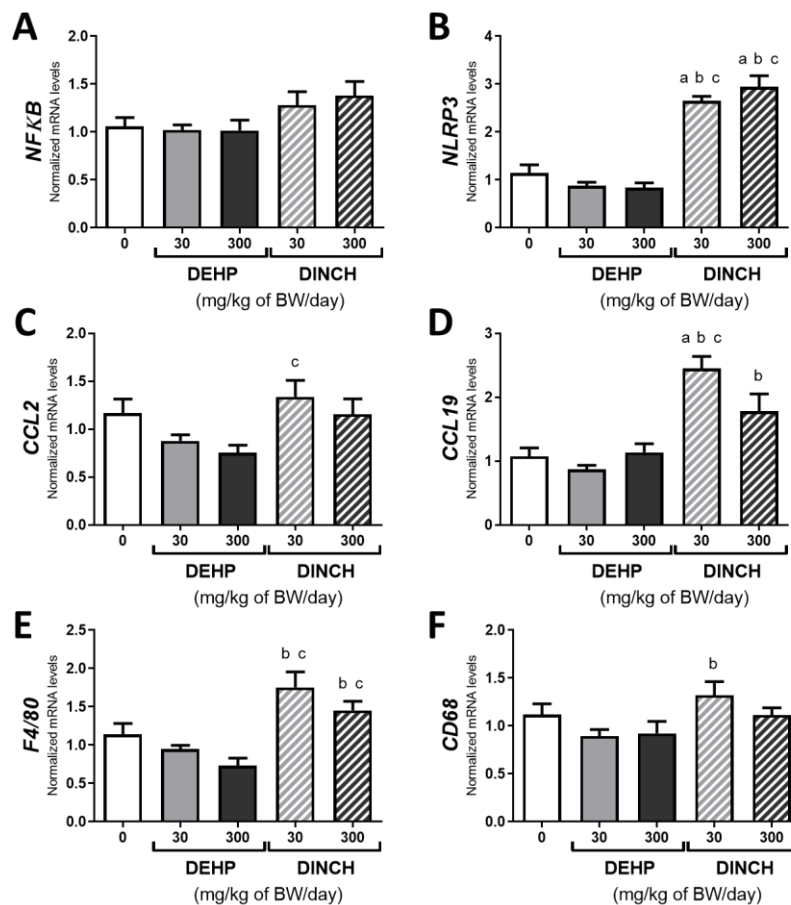


Figure 3-9: mRNA levels of inflammatory genes in mammary glands of pups sampled at PND90.

RNA was extracted and reverse transcript from mammary glands of pups exposed during gestation and lactation by gavage of corn oil, DEHP or DINCH at 30 or 300 mg/kg of body weight/day (mg/kg of BW/day) at PND90. mRNA levels of *NFkB* (A), *NLRP3* (B), *CCL2* (C), *CCL19* (D), *F4/80* (E) and *CD68* (F) have been measured by qPCR and normalized using 4 reference genes (*Eef1a1*, *Hprt1*, *Sdha* and *Atp5b*). Histograms represent the means \pm SEM (n = 11-14 pups) for each diet. ^a different from controls (P < 0.05); ^b different from the 30 mg/kg DEHP (P < 0.05); ^c different from the 300 mg/kg DEHP (P < 0.05).

3.4 Discussion

In this study, we have observed a dysregulation of key metabolic features in the mammary fat pad: (1) a decrease in adipocyte size, (2) the appearance of membrane folding, (3) the presence of features similar to CLS, and (4) a decrease of TAG and FFA levels in adult female rats following a gestational and lactational exposures to DEHP and DINCH. For DINCH, but not for DEHP, a dysregulation of PPARs signaling, its target genes and other genes involved in the regulation of lipid metabolism were also observed. Significant modulations of the transcript levels of genes implicated in β -oxidation, lipolysis, lipid transport, TAG synthesis and lipid storage were measured, concomitantly with a modulation of *Ppars*, *Rxr α* , and *C/ebp α* , and an increase in inflammation markers. Most of those modulations were observed in adult animals (PND90), but lipid metabolism variations were also observable at puberty (PND46). Together, our results suggest that DINCH has more effects on the mammary gland than DEHP, and that these effects are observable earlier in life.

3.4.1 DEHP treatments

3.4.1.1 DEHP have no visible impact in the mammary gland epithelium

Some EDCs have been shown to impact the mammary gland epithelium proliferation, differentiation, and ramifications, which could lead to breast cancer (Fenton 2012; Rodgers et al. 2018; Rudel et al. 2011; Teitelbaum et al. 2015). Only a few studies have looked at the effects of DEHP on mammary epithelial cells and showed an increase of epithelial proliferation after DEHP or MEHP exposure (Chen and Chien 2014; Crobeddu et al. 2019; Moyer and Hixon 2012). Interestingly, in the present study, exposure to DEHP resulted in a small increase of the mammary gland weight, but had no observable effects on the epithelial development, as measured by whole mount (**Figure 3-1**), which suggest a potential effect on the fat pad. This was supported by another study that showed an increased weights of the perirenal, parametrial and epididymal fat pads of mice upon a perinatal exposure to DEHP and MEHP (Hao et al. 2013; Hao et al. 2012).

3.4.1.2 DEHP affects the biology of adipocytes within the mammary gland fat pad

DEHP treatments induced an important decrease of the size of the adipocyte in the mammary fat pad (**Figure 3-2**). To our knowledge, adipocytes from the mammary gland have

never been studied following DEHP exposures; however, some studies reported effects in adipose tissues of other origins. Indeed, a similar decrease from abdominal, lumbar and epididymal adipose tissues or a mix of different adipose tissues (under peritoneum and mesenteric, around the kidneys and epididymis) was reported upon exposures to DEHP in both female and male rats (Martinelli et al. 2010; Zhang et al. 2020; Zhang et al. 2019; Zhou et al. 2019), while another study reported that DEHP exposure was associated with an increase of visceral adipocyte size in female mice (Schmidt et al. 2012). Discrepancies between these results could potentially be due to the type of adipocytes analyzed, the protocol of exposure, as well as the difference between species. We also observed the presence of membrane folding in the adipocyte in the four treated groups (Figure 3-2). The folding seems to be more extensive upon DEHP treatments than DINCH, although no quantification was realized (Figure 3-2B and C). Supporting our results, a similar membrane folding can be observed in adipocytes from various adipose tissue of rats exposed to 500 mg/kg of DEHP, although it was not reported as such by the authors (Zhang et al. 2020; Zhang et al. 2019; Zhou et al. 2019). Decreased size of the adipocytes and increased membrane folding have been associated with lipolysis of epididymal adipocytes (Carpentier et al. 1977) and observed in the lactating mammary gland to support milk production (McCready et al. 2014). Exposure to MEHP treatment has been shown to increase the lipolysis activity of adipocytes *in vitro* (Chiang et al. 2016). However, no strong evidence of lipolysis or activation of lactation (data not shown) was observed in our study after DEHP treatments. We also observed a decrease of TAG content in animals treated with 300 mg/kg of DEHP, and of FFA for both doses of DEHP, compared to the control group (Figure 3-3A and B). Decrease of TAG serum levels or content in lumbar and epididymal adipose tissue has been reported following a perinatal or a direct DEHP exposure, respectively (Hao et al. 2013; Martinelli et al. 2010). Decreased size of adipocytes and modulation of TAG or FFA following DEHP and MEHP exposure have been associated with the proliferation of adipocytes *in vitro* (Engin 2017; Kloting et al. 2015; Qi et al. 2019). Unfortunately, the number of adipocytes in the fat pad could not be measured in our conditions of embedding, as our study was not initially designed to study the fat pad. Whether or not DEHP induced the proliferation of adipocytes in our samples remained to be determined.

3.4.1.3 DEHP downregulates RXR α /PPARs

To further understand the mechanisms involved in the effects of DEHP on adipocytes within the fat pad, we analyzed the mRNA levels of genes involved in adipogenesis. A few studies

have demonstrated that DEHP or MEHP can dysregulate PPAR/RXR signaling in different adipose tissues by decreasing PPAR γ protein expression (Kloting et al. 2015), increasing *Lpl* (Martinelli et al. 2010), as well as *Ppar γ* , *Fas* (*Fasn*) and *Ap2* (*Fabp4*) mRNA (Hao et al. 2013; Hao et al. 2012). In other studies, MEHP exposure increased *PPAR γ* and *C/EBP α* mRNA level in 3T3-L1 cells line (Chiang et al. 2016; Manteiga and Lee 2017) and in Leydig stem cells (Hao et al. 2021). In our study, although DEHP did not affect *Ppar γ* mRNA (**Figure 3-4C**) or protein levels (**Figure 3-5**), nor the levels of *C/ebp α* (**Figure 3-4E**) *Rxra* mRNA levels were significantly decreased in the animals treated with the 30 mg/kg dose (Figure 4D), suggesting that *Rxra* can be a potential target for DEHP. This finding is supported by an *in silico* study that shows a higher affinity of DEHP for RXRs compared with PPARs (Sarath Josh et al. 2014). In our study, a significant decrease of *Scd1*, which are implicated in the fatty acid transport and TAG synthesis, respectively, was also observed, but for the highest dose only. No changes were observed in other genes implicated in the fatty acid transport (*Lpl*, *Apoa2*), adipocytes differentiation (*Adipoq*, *Fabp4*, *Plin1*) or fatty acid synthesis (*Fasn*) mRNA level (**Figures 3-6 – 7**). Thus, DEHP exposure seemed to impact only a small part of the downstream genes of PPARs pathways that we have studied.

Overall, these results indicate that DEHP treatments could lead to a decrease of *Scd1* transcripts levels, a key lipogenic gene resulting in a decrease of TAG proportion, which is consistent with the decrease of adipocyte size, as well as the decrease of FFA. As *Ppars*, *C/ebp α* and *Stat5* have not been upregulated, the small increase of the mammary gland weight is likely not linked with increased adipogenesis.

3.4.2 DINCH treatments

As was the case for DEHP treatments, DINCH treatments induced a slight increase of the mammary gland weight, without affecting the total body weight (data not shown) and the mammary gland epithelium (**Figure 3-1**). This result is important as it demonstrates that the emergent plasticizer DINCH can affect the fat pad of the mammary gland, similarly to the commonly used DEHP. In fact, our study showed that the effects of DINCH on the mammary gland were more numerous and appeared at an earlier stage of development than DEHP.

3.4.2.1 DINCH exposure affects the PPARs pathways

In our study, we observed that in addition to the reduced *Rxra* mRNA levels that we observed for DEHP, DINCH also reduced the expression of *Ppara*, *Ppar δ* and *Ppray* mRNA

levels, compared to the control group as well as DEHP treatments, showing that key regulators of lipid metabolism are more impacted by DINCH compared to DEHP. Surprisingly, we observed an important upregulation of *C/ebpα* following DINCH exposure compared to control group and DEHP treatments. Indeed, *Pparγ* and *C/ebpα* mRNA are typically modulated in the same way as it is thought that C/EBPα cooperates with PPARγ to regulate gene transcription by binding to adjacent sites, leading to increase lipid metabolism (Lefterova et al. 2008; Schmidt et al. 2011), particularly in case of metabolic disorder (Engin 2017). In addition, PPARγ and C/EBPα can mutually induce the expression of each other (Madsen et al. 2014a). It has been suggested that an upregulation of *C/ebpα* RNA levels is not sufficient to induce transcriptional activity without a concomitant upregulation of *Pparγ* (Rosen et al. 2002). However, other studies have suggested that C/EBPα can activate some adipogenesis genes without the binding of PPARγ (Madsen et al. 2014a) and can be implicated in early adipogenesis before the activation of PPARγ (Rosen et al. 2002; Zuo et al. 2006). Whether or not this is the case here remains to be determined. While in our study *C/ebpα* mRNA levels were increased, but not *Pparγ*, in the mammary gland of DINCH-treated animals, Campioli and co-workers observed an increase of both *C/ebpα* and *Pparγ* mRNA levels in an *ex vivo* culture of epididymal adipose tissue exposed to MINCH, whereas DINCH did not modulate *C/ebpα* mRNA levels, and induced a smaller increase of *Pparγ* mRNA levels, only at the higher doses (Campioli et al. 2015). Furthermore, an *in vitro* study using embryonic kidney cells showed that DINCH metabolites (M2NCH, MINCH, OH-MINCH and oxo-MINCH), but not DINCH, could activate PPARγ in a dose-dependent way (Engel et al. 2018). Those articles highlighted the implication of DINCH metabolites in its toxicity. Furthermore, discrepancies between these results and ours could be explained by our used of rats exposed *in utero* and through lactation, thus providing for the possibility of metabolism of the compound, whereas other studies were done *in vitro* using cell or organ culture. Additional studies are needed to understand the interconnection between DINCH, C/EBPα and PPARγ, and the implication of DINCH, or its metabolites, in the downstream regulation of lipid metabolism and adipogenesis pathways. Interestingly, *Ptger3*, *Cebpa* and *Pparγ*, which are all dysregulated by DINCH, are known to be involved in insulin sensitivity (Wu et al. 1999). A few studies have demonstrated that DEHP and DINCH can affect insulin sensitivity or pathways related to this process (Ding et al. 2019b; James-Todd et al. 2022; Rajesh et al. 2013; Schaffert et al. 2021). Our study suggests that an effect of DINCH on insulin sensitivity is likely and could therefore be further investigated in future studies.

3.4.2.2 DINCH activates lipid metabolism pathways

In our study, we observed a decrease of TAG and FFA content (**Figure 3-3A-B**), which is supported by the results of Campioli and collaborators who have shown a decrease of serum TAG at PND60 in rats exposed *in utero* exposure to 1 mg/kg DINCH (Campioli et al. 2017). However, they also showed that MINCH increased lipid accumulation in epididymal adipose tissue culture *ex vivo* (Campioli et al. 2015). The discrepancies between these results and ours could be linked with the time/type of exposure, as well as the target tissue. Parallel to the TAG decrease (**Figure 3-3A**), DINCH treatments induced an important decrease of the adipocyte size as well as the apparition of membrane folding (**Figure 3-2**) and a drastic decrease of *Ptger3*, which activation is inversely correlated with lipolysis, compared to the control and DEHP-treated groups (Strong et al. 1992; Xu et al. 2016). Those results suggest that DINCH could increase lipolysis in our condition, although *Lpl*, is slightly downregulated. Furthermore, the downregulation observed for *Dgat1* (**Figure 3-7F**), implicated in the synthesis of TAG, was confirmed by the decrease of TAG proportion (**Figure 3-3A**), which is a marker of a decrease of lipid storage. In the other hand, the decrease of FFA levels, as well as the upregulation of *Acadm* (**Figure 3-6D**), *Acox1* (**Figure 3-6E**) and downstream genes of PPARs pathway, correlated with an activation of FFA's β -oxidation, which produced energy for the cells.

All our results suggested that following DINCH treatments, the mammary gland turn into a more catabolic process than control or DEHP-treated animals, likely linked with a dysregulation of the PPAR γ , RXR α and C/EBP α balance, that could lead to increase energy production. Interestingly, we observed a non-significant downregulation of *Lpl*, a lipase implicated in lipid transport and in lipolysis (**Figure 3-6B**), an upregulation of *Plin4* (compared to DEHP treatment), involved in lipid storage (**Figure 3-7B**), and an upregulation of *Fasn*, involved in fatty acid synthesis (**Figure 3-7E**), highlighting the complexity of the lipid metabolism in the mammary gland.

A gestational-lactational exposure to DINCH affects the mammary gland at puberty

Although we focused most of our experiments on adult animals (PND90), we also observed that some genes were already modulated at PND46 upon DINCH, but not DEHP, treatments. While at PND46 some effects were similar to PND90 (*Ppar δ* and *Rxra*), others showed different patterns. Interestingly, we observed a downregulation of *Plin4* and *Acox1* at PND46 (**Figure 3-8D and H**), while these genes were upregulated at PND90. These results suggest that adipogenesis and lipid metabolism, especially β -oxidation, were downregulated at

PND46, but up-regulated at PND90. Contrary to DEHP exposure, dysregulation of lipid metabolism in the mammary gland is visible from puberty after DINCH exposure; how this earlier dysregulation impacts long-term health remains to be determined.

3.4.2.3 DINCH increases inflammation of the mammary gland

Crosstalk between lipid metabolism disorder and inflammation is well documented (Hotamisligil 2006), especially for obesity where the link between lipolysis and macrophage infiltration in the WAT and the presence of CLS have been described (Tong et al. 2021). Recent studies have shown that an exposure to DINCH and its metabolite enhances the inflammatory responses of macrophages (Schaffert et al. 2021) and is associated with inflammation in pregnant women (van 't Erve et al. 2019). In addition, a perinatal exposure to 100 mg/kg DINCH led to an increase of CD68 in the interstitial areas of the testis of adult rats (Campioli et al. 2017). In our study, we observed the formation of features similar to CLS in the mammary gland fat pad, a significant increase in mRNA levels of *Nlrp3*, *Ccl19*, and *F4/80*, and a significant increase in *Cd68* mRNA levels (30 mg/kg) upon DINCH treatment compared to the control group or/and DEHP treatments. These markers have all been associated with inflammation and/or macrophages (Andrysik et al. 2013; Martinez-Pomares et al. 1996), suggesting that DINCH can also lead to inflammation within the mammary gland. Interestingly, the chemokine CCL19 is linked with disruption of lipid metabolism (Hayashi et al. 2021) and is implicated in the chemotaxis of pro-inflammatory macrophages (Xuan et al. 2015) as well as modulates the induction of T cell activation (Yan et al. 2019). NLRP3 is part of the inflammasome, which is implicated in polarization of the pro-inflammatory macrophages; its abnormal activation could lead to metabolic disorder such as type 2 diabetes (Kelley et al. 2019; Lee et al. 2013). All those results suggest that DINCH exposure may lead to the recruitment of macrophages and inflammation in the mammary gland. Interestingly, clustering of macrophages within the mammary gland has been strongly associated with obesity and breast cancer in humans (Chang et al. 2021; Maliniak et al. 2021). In addition, an *in vivo* study showed an increase in mammary gland adenocarcinoma and fibroadenoma after 200 mg/kg DINCH exposure (Bhat et al. 2014). Whether or not the DINCH-induced inflammation within the mammary gland is linked to increased risk for breast cancer remains to be evaluated.

3.4.3 Gestational and lactational exposure to DEHP or DINCH impact the mammary gland health at adulthood

Finally, it is important to highlight that most of the results presented in this study are obtained from adult animals, more than 69 days after the last exposure to DEHP or DINCH through lactation. The half-life of both DEHP and DINCH, as well as their metabolites, are thought to be lower than 24h (Dominguez-Romero and Scheringer 2019). A half-life of 19h was calculated after an oral exposure of 40 mg/kg of DEHP (Koo and Lee 2007), while it was around 4.5h for an oral exposure of 50mg/kg of DINCH (Bhat et al. 2014). Interestingly, a recent study with human volunteers showed that the majority of DINCH's metabolites are secreted around 30h after the exposure while those for DEHP metabolites were secreted between 2 to 6 h (Plichta et al. 2022). These results suggest that the observed effects are “imprinted” during early life. Although long-term effects of DEHP have been observed in different perinatal or transgenerational studies (Brehm and Flaws 2021; Brehm et al. 2018; Lopez-Rodriguez et al. 2021; Schmidt et al. 2012), to our knowledge, only a few animal studies have evaluated the effect of a perinatal exposure to DINCH, by looking at body weight of the pups from PND1 to PND21 (Langsch et al. 2018), showing reproductive alteration of male rats (Albert et al. 2018b; Nardelli et al. 2017) and demonstrating metabolic disorder of the PND60 pups (Albert et al. 2018a; Campioli et al. 2017). In human, high levels of OH-MINCH in pregnant women's urine was associated with low birth weight of their babies (Martinez et al. 2020). Together, these results suggested that early exposure to both DEHP and DINCH can have long-term health issues, particularly affecting lipid metabolism. Transgenerational experiments are needed to determine if DINCH exposure can impact more than one generation.

3.5 Conclusion

Our results suggest, for the first time, that a gestational and lactational exposure to the commonly used plasticizer DEHP and in a stronger way to its alternative, DINCH, can dysregulate lipid metabolism in the mammary gland at adulthood. The crucial role of the crosstalk between the epithelium and the fat pad, an imbalance in adipocyte function, and the presence of inflammation all may have important deleterious impact on mammary gland development and function. Finally, results from our studies suggest that the exposure to DINCH leads to a greater and earlier dysregulation of the mammary gland fat pad compared to DEHP. More research is needed to better evaluate DINCH impact on the mammary gland and general risk for health.

4 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le DEHP et le MEHP sont des composés reprotoxiques par leurs capacités à altérer la fonction des organes reproducteurs, pouvant également participer à la promotion et la progression des cancers hormono-dépendant, *in vitro* et *in vivo*, tels que le cancer de la prostate, des ovaires, du col de l'utérus et le cancer du sein (Blom *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2010; Lacouture *et al.*, 2022; Leng *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019a; Zhang *et al.*, 2013). Ces résultats ont été confirmés par des études épidémiologiques, ayant associé une exposition au DEHP, ou ses métabolites, avec l'augmentation de l'incidence ou le caractère invasif des cancers hormono-dépendants (Fu *et al.*, 2017; Hsieh *et al.*, 2022; Lopez-Carrillo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021). De façon intéressante, cette association était plus forte chez les personnes souffrant d'obésité dans le cas du cancer de la prostate (Chuang *et al.*, 2020). La signalisation de la perturbation endocrinienne par le DEHP a été très documentée au cours des dernières décennies, et notre étude a permis d'amener des éléments supplémentaires au niveau de la glande mammaire. Concernant le DINCH, nous avons, à l'heure actuelle, qu'une faible compréhension de ces mécanismes d'action, et une quasi-absence de connaissance de son implication dans le développement des cancers hormono-dépendants. Seule l'étude de Bhat et collaborateurs a montré une augmentation des fibroadénomes mammaires, et une tendance à l'augmentation des adénocarcinome (5 rats sur 50 exposés au DINCH, contre 1/50 pour le groupe témoin) (Bhat *et al.*, 2014).

Le DEHP et le DINCH sont respectivement considérés comme des PE avérés ou potentiels, impliquant que leurs mécanismes d'action, comme l'altération de la signalisation des hormones ou de leurs récepteurs associés, pourraient promouvoir le développement des cancers hormono-dépendants. Il est donc indispensable de comprendre plus finement les interactions du DEHP et du DINCH avec les acteurs moléculaires de ces signalisations hormonales.

4.1 Altérations de la signalisation hormonale : le cas particulier de la progestérone

4.1.1 Les propriétés de PE du DEHP

4.1.1.1 L'altération de l'expression de PR et ER

Nous avons montré que le DEHP, et le MEHP, induisaient l'augmentation de la prolifération *via* l'activation du récepteur à la progestérone des cellules de la lignée cancéreuse

de la glande mammaire T47-D (Crobeddu *et al.*, 2019). Depuis la publication de cet article en 2019, une nouvelle étude a montré que le DEHP augmentait la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse de la glande mammaire MCF-7, et que cette prolifération pouvait être inhibée lors de l'utilisation d'un anti-oestrogénique (Moche *et al.*, 2021). Les deux lignées MCF-7 et T47-D sont connues pour posséder les récepteurs hormonaux ER et PR, car elles sont issues de cancers luminaux, donc hormono-dépendants (Holliday & Speirs, 2011). De façon intéressante, dans notre étude, l'inhibition de prolifération en présence de l'antagoniste de PR est totale, suggérant que le DEHP pourrait influencer la prolifération des cellules cancéreuses principalement *via* la modulation de PR. D'autres part, l'inhibition de prolifération induite par l'anti-oestrogénique, observée par Moche et collaborateurs, en présence d'oestrogène ou de DEHP, n'est pas totale, suggérant un autre système de stimulation, comme potentiellement PR. De plus, il a été montré qu'une exposition au DEHP induisait l'augmentation des capacités d'invasion des cellules de la lignée de cancer triple négatif MDA-MB-231 (ER- et PR-), dans une matrice extracellulaire (matrigel), par des mécanismes impliquant les métalloprotéinases (Zhang *et al.*, 2016). Ainsi l'impact du DEHP dans la progression cancéreuse ne se limite pas aux récepteurs hormonaux, mais implique aussi des mécanismes plus complexes comme l'interaction avec une matrice extracellulaire, supportant l'importance de regarder également le stroma lorsqu'on évalue les effets d'un PEs sur le cancer du sein.

Nous nous sommes donc interrogés sur l'influence du DEHP sur la signalisation de PR dans des conditions *in vivo*, afin d'avoir une compréhension non seulement de l'interaction entre l'épithélium et le stroma, mais aussi dans un système endocrinien complet. Pour cela, nous avons utilisé les échantillons de glande mammaire étudiés dans notre deuxième article, soit les glandes mammaires de rats suite à une exposition gestationnelle et lactationnelle à de l'huile de maïs, 30 et 300 mg/kg DEHP (voir section 3.2.1 pages 91-92). Nous avons mesuré l'expression relative des isoformes de PR (**Figure 4-1**). Contrairement aux résultats *in vitro*, aucune modification de l'expression de PR-A, ni de PR-B, n'a été observée suite à l'exposition au DEHP pour les ratons femelles à PND90. Cela ne peut pas être dû à un faible taux physiologique de PR, car les rats femelles ont été sacrifiés en *estrus*, phase du cycle où PR-A et PR-B sont bien présents au niveau l'épithélium de la glande mammaire (Mote *et al.*, 2006). Cette discordance entre les résultats *in vitro* et *in vivo* pourrait être expliquée par la nature cancéreuse des cellules T47-D. En effet, dans une récente revue, Briskin et Scabia ont émis l'hypothèse que la signalisation de PR pourrait différer entre les cellules normales et les cellules cancéreuses de la glande mammaire (Briskin & Scabia, 2020). Afin de vérifier cette hypothèse, il pourrait être intéressant de regarder l'influence

d'une exposition au DEHP, au MEHP, mais aussi à ses métabolites secondaires, sur des lignées non-cancéreuses de la glande mammaire comme les les MCF10-A (PR+) (Juarez, en préparation), en utilisant le même protocole que nous avons utilisé pour le premier article (section 2.2.3 pages 64-65).

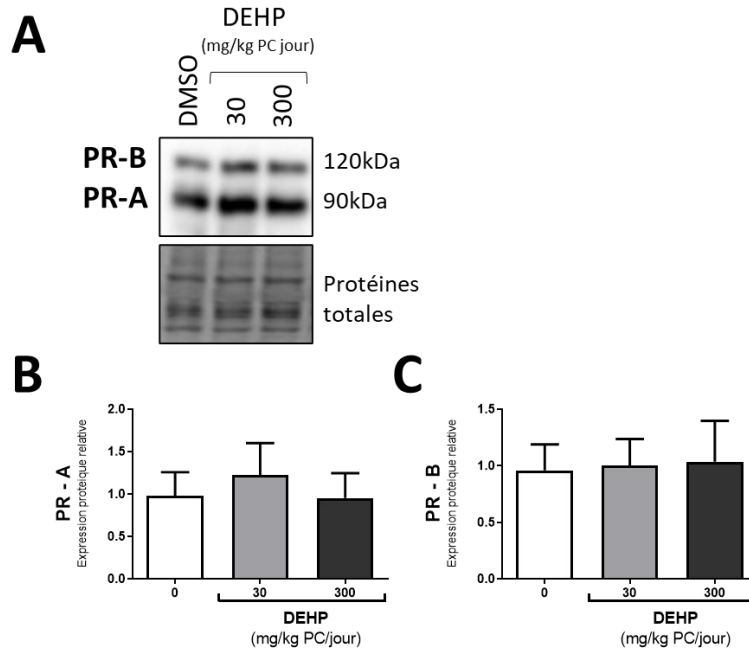


Figure 4-1 : Expression protéique de PR dans les glandes mammaires des rats femelles à PND90

Les protéines ont été extraites des glandes mammaires des rats femelles à PND90, ayant été exposés pendant la gestation et la lactation par gavage à d'huile de maïs (contrôle) et à 30 ou 300 mg/kg de poids corporel/jour (mg/kg PC/jour) de DEHP. Les expressions relatives des deux isoformes de la protéine PR ont été déterminés par immunobuvardage de type western blot (Anti-PR #16661, Abcam, Cambridge, MA). Une membrane représentative des répliques montre l'expression relative de PR-A et PR-B et les bandes de protéines totales ont été utilisés comme normalisateur (**A**). Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM (n=8 rats à PND 90) de l'expression relative de la protéine PR-A (**B**) et PR-B (**C**) normalisée par les protéines totales du même puits (**B**). Les données ne suivant pas la loi normale, un test de Kruskal-Wallis suivi du post-test de Dunn's ont été réalisés.

4.1.1.2 Altération de la signalisation des hormones

Une autre explication concernant la différence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* au niveau de l'expression de PR pourrait être l'implication d'un système endocrinien d'un organisme entier. En effet, il a été montré que le DEHP, par ses capacités de PE, était capable de modifier la signalisation de la progestérone directement au niveau des ovaires. Il a été rapporté qu'une exposition à 400 μ M de DEHP diminuait le niveau d'estradiol et de progestérone dans des

cultures de cellules granulaires isolés de follicules de rats (Tripathi *et al.*, 2019). À l'opposé, une exposition à 100 μ M de MEHP diminuait la présence du récepteur à l'hormone de stimulation folliculaire (FSHR), PR et ER, tout en augmentant la production de progestérone et d'œstradiol (Li *et al.*, 2018). De façon similaire, dans la lignée de trophoblaste placentaire JEG-3, il a été observé, sept jours après une exposition à 20 μ M de MEHP, qu'une augmentation de la production de progestérone induisait une diminution de la prolifération de ces cellules, suite à une diminution de l'expression protéique de PR par une boucle de rétrocontrôle (Zhang *et al.*, 2020a).

In vivo, il a été démontré qu'une exposition néonatale au DEHP diminue les concentrations d'œstrogène et de progestérone produite par les ovaires, mais aussi de l'hormone lutéinisante (LH), chez les souris prépubère (Lai *et al.*, 2017). Il a aussi été montré qu'une exposition à 50 et 200 mg/kg de DEHP entre GD0 et GD14 induisait, chez les femelles gestantes, une augmentation de la concentration de progestérone dans le sérum maternel à GD15, ce qui entrainerait une diminution de l'expression de PR dans l'extrait placentaire de ces souris, parallèlement à une diminution du marqueur de prolifération Ki-67 (Zhang *et al.*, 2020a). Une diminution du niveau d'aldostérone à différentes phases du cycle menstruel a aussi été rapportée après une exposition *in utero* à 50 et 300 mg/kg de DEHP chez les femelles rats adultes, parallèlement à une augmentation des gouttelettes de lipides dans les glandes surrénales (Martinez-Arguelles & Papadopoulos, 2016). Pour finir, des effets transgénérationnels ont été observés suite à une exposition *in utero* au DEHP. En effet, il a été montré qu'une exposition *in utero* à 300 mg/kg DEHP par gavage induisait une diminution de l'estradiol circulant et une augmentation de l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) pendant la phase *proestrus* du cycle estral chez les femelles ayant atteint l'âge adulte, mais était aussi associée à une diminution de la distance anogénitale à la 3^{ième} génération (Meltzer *et al.*, 2015).

Ces résultats suggèrent qu'une exposition au DEHP pourrait induire un changement de la signalisation des hormones hypothalamo-hypophysaires, mais aussi des hormones sexuelles, pouvant impacter la présence de PR au niveau des ovaires et du placenta, mais également au niveau des glandes mammaires. Dans le cas de notre étude, nos collaborateurs ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle au DEHP ne modulait pas le niveau sérique de la FSH, de la LH et de la progestérone à PND21 (Nardelli *et al.*, 2017). Cependant à cet âge juvénile, les cycles menstruels ne sont pas mis en place, induisant une faible présence de la progestérone (Bell, 2018) et le taux de FSH et LH est aussi au plus faible (Bhattacharya *et al.*, 2019), ce qui ne permettrait pas nécessairement de voir une diminution du taux hormonal circulant. L'influence du DEHP sur la signalisation de ces hormones aurait été mieux appréciée à l'âge adulte, à chaque

phase du cycle menstruel, et particulièrement en fin de proestrus avant l'ovulation, où les taux circulants de FSH, de LH et de progestérone sont au plus fort (Donner & Lowry, 2013). Cette expérience nous permettrait de déterminer si le DEHP module la signalisation des hormones circulantes.

De plus, peu de connaissance sont disponibles concernant la modulation des hormones stéroïdiennes, comme la progestérone ou l'œstrogène, suite à une exposition gestationnelle et/ou lactationnelle au DEHP, tout comme la modulation de leurs récepteurs respectifs au niveau de la glande mammaire, au cours du développement. Ainsi, il serait intéressant de déterminer la modulation des récepteurs aux hormones stéroïdiennes au niveau des différents tissus qui composent la glande mammaire (stroma *versus* épithélium), aux différents stades de développement disponible dans notre étude *in vivo*, soit PND90 et PND46 pour le développement hormono-dépendant, ainsi que PND 21 et PND 3 (échantillons non utilisés pour la publication, et reflétant le développement hormono-indépendant de la glande). Les contrastes entre les résultats *in vitro* et *in vivo* démontrent bien qu'un modèle cellulaire se limite à une exposition directe, sans intégrer les effets globaux sur l'organisme et le système endocrinien, qui pourraient affecter indirectement le tissu cible, et ce, tout particulièrement dans le cas d'une exposition à des PEs. Cependant, il est à noter que le système endocrinien des rongeurs présente des différences avec celui des humains, l'utilisation de souris génétiquement transformé permettrait d'obtenir un modèle plus représentatif.

4.1.2 La signalisation de la progestérone et le cancer du sein

La signalisation de la progestérone est aussi un élément central dans le développement du cancer du sein. En effet, Obr et Edwards ont synthétisé dans leur revue que la tumorigenèse de la glande mammaire était associé à une stimulation autocrine des cellules PR+ et ER+, entraînant leur prolifération (Obr & Edwards, 2012). De plus, une délétion de BRAC1 (*BReast CAncer gene*), gène central dans le développement du cancer du sein, induirait une surexpression de PR dans la glande mammaire et une intense prolifération en réponse à la progestérone (Ma *et al.*, 2006). Il a également été démontré qu'une augmentation du nombre de cycles menstruels (ménarche précoce, ménopause tardive, 1^{er} grossesse après 35 ans, un temps d'allaitement court) (Kelsey *et al.*, 1993), ainsi que l'utilisation de pilules contraceptives étaient des facteurs de risques de développement du cancer du sein par, entre autres, l'exposition de la glande mammaire à la progestérone (Brisken & Scabia, 2020; Obr & Edwards, 2012; Trabert *et al.*, 2020). Bien que l'implication des pilules contraceptives dans le cancer du sein soit sujet à

controverse, une récente étude à montrer une association entre l'utilisation de contraceptifs oraux, et particulièrement la présence de progestatif, avec les cancers du sein invasifs (Burchardt *et al.*, 2022). Le risque de cancer du sein associé aux thérapies de remplacement hormonale n'a pas atteint le consensus de la communauté scientifique. Cependant, même si une absence d'évidence conforte certains dans l'utilisation de ces thérapies (Deli *et al.*, 2020), plusieurs articles les ont définis comme des potentiels facteurs de risque. Il a ainsi été montré que l'utilisation récente et combiné d'œstrogène et de progestatif étaient associé à des cancers du sein invasif comparativement au placebo ou à l'œstrogène seul (Chlebowski *et al.*, 2020), et à de fort risque de cancer du sein, *odds ratio* pouvant monter à 2.05 pour les expositions supérieures à 10 ans (Vinogradova *et al.*, 2020). L'ensemble de ces données suggère que la signalisation de la progestérone et de son récepteur est impliquée dans le développement de cancer.

Connaissant l'implication de PR dans le développement de la glande mammaire et sa cancérogenèse, et les effets du DEHP sur les lignées cancéreuses de la glande mammaire, on peut se poser la question de l'impact du DEHP dans la progression des cancers du sein hormono-dépendants. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si une exposition gestationnelle ou lactationnelle au DEHP pourrait promouvoir la progression du cancer du sein hormono-dépendant *via* une modulation de PR. Pour se faire, le cancer du sein pourrait être induit chez des animaux exposés au DEHP à l'aide d'un initiateur de tumeurs, par exemple le DMBA, afin de caractériser les tumeurs résultant de cette double exposition (voir plus de détails dans la section 7-2 pages 142-143). L'implication de la signalisation de la progestérone dans les effets du DEHP pourrait être étudié par l'utilisation de rats PR^{-/-}, où nous devrions observer une absence de synergie entre l'action du DMBA et du DEHP, confirmant ainsi que l'effet du DEHP sur la progression du cancer du sein est PR-dépendant.

4.2 Le métabolisme des lipides au cœur de la signalisation croisée entre l'épithélium et le stroma

4.2.1 Le DEHP et le DINCH altèrent la physiologie des adipocytes

4.2.1.1 Des mécanismes différents pour une même altération du stroma

Des modifications de la physiologie des adipocytes et de la composante lipidique de la glande mammaire ont été observés suite à l'exposition au DEHP et au DINCH. Ces altérations semblent découler de la modulation de la voie des PPARs pour le DINCH, sans que ce ne soit le

cas pour le DEHP. Cependant, nous avons observé une diminution du niveau d'ARNm de *Rxrα* par le DEHP (**Figure 3-4**). *RXRα*, n'est pas uniquement un co-facteur de *PPARγ*, mais peut aussi s'hétérodimériser avec d'autres facteurs de transcriptions comme le récepteur à la vitamine D (VDR) (Abbas, 2017; Mangelsdorf & Evans, 1995). De façon intéressante, il a été synthétisé dans deux revues que la vitamine D, *via* l'implication de VDR, est associée à la régulation de gènes impliqués dans l'adipogenèse, en amont ou en aval de *PPARγ* (Abbas, 2017; Mutt *et al.*, 2014). Finalement, nos collaborateurs pour le projet *in vivo* ont déterminé, dans leurs données transcriptomiques supplémentaires, que 30 mg/kg de DEHP semblait impacter l'activation de VDR/RXR dans les testicules des rats à PND90 par une analyse de voies de signalisation (IPA) à partir d'un *microarray* (Albert *et al.*, 2018b). L'implication du DEHP dans le dimère VDR/RXR serait intéressant à étudier, surtout qu'il ne fait l'objet, à notre connaissance, d'aucun article scientifique.

4.2.2 Potentielles implications sur le développement de la glande mammaire

Nos travaux ont mis en évidence qu'une exposition gestationnelle et lactationnelle au DEHP ou au DINCH entraînait une diminution de la taille des adipocytes du stroma (**Figure 3-2**), mais aussi diminuait la proportion de triglycérides et d'acides gras libres (**Figure 3-3**) dans les glandes mammaires de rats femelles à PND90. La morphologie ainsi que l'état de différenciation des adipocytes sont finement régulées afin de permettre le développement de l'épithélium mammaire. En effet, depuis le développement embryonnaire jusqu'aux cycles de grossesse/allaitement/involution, la communication entre le réseau épithélial et le stroma mammaire est indispensable pour le maintien de l'intégrité et la santé de la glande mammaire. Ainsi les modifications de la physiologie des adipocytes que nous avons décrites pourraient altérer la dynamique d'interaction entre l'épithélium mammaire et le stroma, et particulièrement au cours du développement. Cependant, aucune altération de l'élongation ou de la complexité de l'arbre mammaire n'a été observé à PND21, PND46 et PND90 (**Figure 3-1**), laissant supposer que le développement de l'épithélium mammaire n'a pas été impacté à ces stades. On peut alors se demander si les altérations observées pourraient impacter la fonction de production de lait de la glande mammaire, que ce soit au niveau du développement même de la glande pendant la grossesse et lactation, voire la composition lipidique du lait produit. En effet, à la fin de gestation et au cours de la lactation, afin de laisser de la place aux alvéoles en cours de formation, les adipocytes vont se différencier en cellules semblables à des fibroblastes, induisant ainsi une diminution du dépôt lipidique (Cinti, 2007; Wang *et al.*, 2018; Watson & Kreuzaler, 2011). De plus,

les globules de lait produits au cœur des cellules épithéliales seront formés à partir des gouttelettes de lipides, dont la composition lipidique influencera la taille des vésicules sécrétés (Cohen *et al.*, 2015). Finalement, lors de l'involution, parallèlement à l'apoptose des alvéoles, des cellules de type fibroblastique prolifèrent et se redifférencient en adipocytes matures pour régénérer le stroma (Cinti, 2007; Wang *et al.*, 2018). Malheureusement, le protocole d'exposition (**Sup – Figure 3-1**) ne prévoyait pas de laisser les rats femelles, exposés au cours de la gestation et la lactation, subir elles-mêmes un cycle de grossesse / allaitement / involution. Il serait intéressant de réaliser ces expériences aux vues des altérations du stroma observé à PND90, aussi bien pour le DEHP, que pour le DINCH. À travers cette étude, il serait important de déterminer l'état de différenciation des adipocytes au cours du cycle de gestation, de déterminer l'état de maturation de l'épithélium mammaire, mais aussi d'analyser la composition du lait. En effet, il a été montré qu'une exposition à 500 mg/kg de DEHP au cours de la grossesse et l'allaitement, chez la souris, pouvait modifier la capacité à produire du lait ainsi que la composition de celui-ci (Hou *et al.*, 2022). On peut se demander si cet effet pourrait être transgénérationnelle et impacter la lactation des ratons. Ces expériences seraient d'autant plus pertinentes à ce jour, puisque les femmes ayant été exposées au cours de leur vie *in utero* et par la lactation dans les années 2000 au DINCH, sont en âge d'être mère à leur tour.

4.2.3 Altérations du métabolisme des lipides par le DINCH

4.2.3.1 Le développement de la glande mammaire

Grâce à nos travaux, nous avons mis en évidence qu'une exposition gestationnelle et lactationnelle au DINCH pouvait altérer le métabolisme des lipides, suggérant la mise en place d'un profil catabolique. En effet, nous avons montré une diminution de l'expression transcriptomique de la famille *Ppar*, gènes clés de l'adipogenèse et du métabolisme des lipides, mais aussi de leur co-facteur *Rxr α* . Cependant une augmentation du niveau d'ARNm de leur partenaire *C/ebp α* (**Figure 3-4**), et du niveau protéique de PPAR γ (**Figure 3-5**) a aussi été observée. PPAR γ est présent sous forme protéique dans les cellules épithéliales, et ses niveaux semblent diminuer au cours de la grossesse et la lactation (Gimble *et al.*, 1998), bien que les niveaux d'ARNm soient augmentés à la grossesse (Shi *et al.*, 2013). Ces études suggèrent qu'il existe des mécanismes différents régulant les niveaux de transcrits et protéiques. De plus, PPAR γ est considéré comme indispensable au développement de la glande mammaire. En effet, il a été montré que l'utilisation de souris Adipoq-Cre, inhibant PPAR γ uniquement au niveau du gras,

empêchait la formation du stroma de la glande mammaire, entraînant une inhibition quasi-totale du développement de son épithélium (Wang *et al.*, 2013). De façon intéressante, il a été défini que le niveau d'ARNm de *Pparγ* est 5 fois plus élevé dans le stroma que l'épithélium mammaire de souris au jour embryonnaire E19 (Wadia *et al.*, 2013). Cependant, il a aussi été montré qu'une délétion de PPAR γ uniquement dans les cellules épithéliales de la glande mammaire de souris WAP-Cre n'altérait pas l'arbre mammaire au cours de la puberté ou la lactation (Cui *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent donc que PPAR γ est nécessaire au niveau du stroma pour participer au développement de la glande mammaire. Il serait ainsi intéressant de déterminer la localisation de l'ARNm de *Pparγ*, ainsi que de sa forme protéique, dans les échantillons de glande mammaire exposé à l'huile de maïs et au DINCH à PND90, afin de déterminer si la diminution de l'ARNm de *Pparγ* est globale ou au niveau des adipocytes, dans le but de mieux comprendre la signalisation induite par le DINCH et ses potentiels conséquences.

4.2.3.2 La progression du cancer du sein

PPAR γ a été associé aux cancers hormono-dépendants tels que le cancer du sein et de la prostate, et même considéré comme un suppresseur de tumeur (Hernandez-Quiles *et al.*, 2021). En effet, depuis plus de 20 ans, l'utilisation de ligands synthétiques ciblant la signalisation de PPAR γ et RXR α , est testée comme potentiel traitement contre le cancer du sein (Bonofiglio *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 1998). La présence de PPAR γ a été associée à un bon pronostic de survie après traitement pour les femmes atteintes de cancer, et aussi associé avec les cancers ER β positif (Papadaki *et al.*, 2005). Cependant, le rôle de PPAR γ dans le cancer du sein reste assez controversé (Augimeri *et al.*, 2020).

Il a été déterminé que le MINCH, l'OH-MINCH et l'oxo-MINCH pourraient activer PPAR γ (Engel *et al.*, 2018). Un article récent a montré que le MINCH, et non le OH-MINCH, pouvait se fixer à PPAR γ sans en induire une activation, mais entraînant une accumulation des lipides dans des préadipocytes (Schaffert *et al.*, 2022). Il serait intéressant de poursuivre cette étude en vérifiant la capacité de fixation et d'activation des autres métabolites du DINCH, soit l'oxo-MINCH et le cx-MINCH sur PPAR γ .

Aucune étude n'a cependant significativement démontré le lien entre le DINCH et le cancer, mais les résultats obtenus dans notre étude, ainsi que la tendance à l'augmentation de la prolifération des T47-D par le DINCH (**Figure 4-2**), nous confirme qu'il s'agit d'un champ d'étude à explorer. Il serait intéressant de déterminer si une exposition gestationnelle ou

lactationnelle au DINCH pourrait promouvoir la progression du cancer du sein hormono-dépendant *via* une modulation de PPAR γ , suite à une exposition à un initiateur de tumeurs comme le DMBA (voir plus de détails dans la section 7-2 pages 142-143).

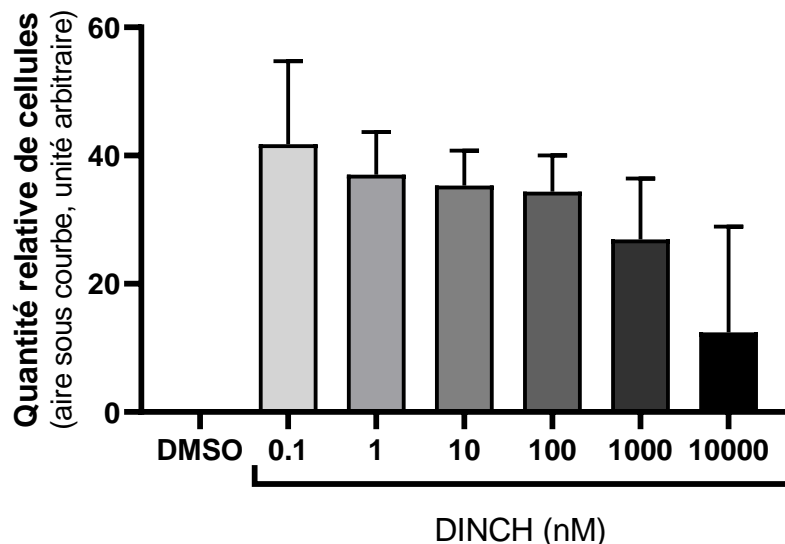


Figure 4-2 : Une exposition de quatre jours au DINCH semble augmenter la prolifération cellulaire des T-47D.

Les cellules T-47D ont été exposées à des doses de 0,1 à 10 000 nM de DINCH quotidiennement pendant 4 jours. La prolifération des cellules T-47D a été évaluée en temps réel à l'aide du système xCELLigence. L'aire sous la courbe de la prolifération sur 4 jours a été mesurée pour chaque traitement et normalisée par rapport au DMSO (défini comme ligne de base). Le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

4.3 Le DEHP et la résistance aux traitements contre le cancer du sein

À travers cette thèse, nous avons vu que le DEHP et ses métabolites pourraient avoir des effets sur la progression du cancer du sein, mais l'effet de ce composé ne s'arrête pas là. Il semblerait également que le DEHP pourrait interférer avec certaines chimiothérapies contre le cancer du sein et même entraîner une inhibition de leur effet. En effet, dès 2004, il a été montré que le DEHP, ainsi que d'autres phtalates, était capable de réduire l'apoptose induite par le Tamoxifen, un antagoniste à ER, dans la lignée MCF-7 (ER α +) (Kim *et al.*, 2004). Ce résultat a été confirmé par l'étude de Das et collaborateurs, qui ont aussi montré une certaine inhibition de l'effet du Tamoxifen dans les lignées MDA-MB-231 (ER α -) (Das *et al.*, 2014). De plus, le DEHP interférait avec la cytotoxicité de la camptothécine, un inhibiteur de la topoisomérase, dans la lignée MCF-7, mais pas dans la lignée MDA-MB-231, suggérant un mécanisme

hormonodépendant (Chou *et al.*, 2019). De plus, il a été identifié que le DEHP minimiserait l'effet de la vincristine, un antiméiotique, *via* les récepteurs à l'estrogène, dans la lignée MCF-7 (Uyar *et al.*, 2022). Pour finir, dans l'étude exhaustive de Hsieh et collaborateurs, le DEHP semblerait inhiber l'effet du paclitaxel et de la doxorubicine, respectivement un inhibiteur de prolifération/invasion et un inhibiteur de la topoisomérase II, *via* le récepteur AhR dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231, mais aussi dans un modèle de poisson zèbre et de souris transgénique AhR (Hsieh *et al.*, 2022). De plus, dans cette même étude, les auteurs ont montré que la présence des métabolites secondaires du MEHP dans les urines de femmes au moment de leur diagnostic de cancer du sein ont été associées au statut ER+ et Her2, à une augmentation du risque de récurrence, mais aussi de la taille des tumeurs, et à la présence de cellules cancéreuses dans les nœuds lymphatiques (Hsieh *et al.*, 2022).

D'autres expériences doivent être menées *in vivo*, afin de confirmer les résultats de Hsieh et collaborateurs, mais l'état des connaissances actuelles amène un nouveau regard sur un potentiel impact du DEHP, mais aussi d'autres PE, lors des traitements contre le cancer du sein. Ces études sont d'autant plus importantes que le DEHP est toujours très présent dans le matériel médical ; la limite de sa concentration à 0.1% du produit final est uniquement mise en vigueur en Europe au moment du dépôt final de ce manuscrit.

Concernant le DINCH, les résultats obtenus suggèrent une certaine préoccupation quant à sa potentielle implication dans le développement du cancer du sein. Cependant, sachant que la concentration du DINCH dans le matériel médical augmente chaque année, on peut se questionner quant à son impact sur la résistance des thérapies contre le cancer du sein.

5 CONTRIBUTIONS GENERALES

Le DEHP et ses métabolites sont des composés très étudiés, dont les impacts globaux sur la santé sont assez connus, sans toutefois que l'on comprenne encore tous les mécanismes et les signalisations associés. À l'inverse, peu d'études se sont concentrées sur l'impact du DINCH sur la santé des organes hormono-dépendants, et encore moins au niveau de la glande mammaire.

Ainsi mon projet de doctorat a permis :

- De clarifier l'impact du DEHP sur la santé de la glande mammaire :
 - En identifiant pour la première fois, l'influence du DEHP sur l'augmentation de la prolifération cellulaire *via* la signalisation du récepteur à la progestérone ;
 - En observant pour la première fois, une altération de la physiologie des adipocytes et de leur composition lipidique dans le stroma de la glande mammaire ;
 - En révélant un impact à long terme (âge adulte) sur la glande mammaire après une exposition gestationnelle et lactationnelle de rats.

- D'apporter de nouvelles connaissances quant à l'impact du DINCH sur la santé des glandes mammaires et ses propriétés de PEs :
 - En observant pour la première fois, une altération de la physiologie des adipocytes et de leur composition lipidique dans le stroma de la glande mammaire ;
 - En identifiant pour la première fois une perturbation de la signalisation de la voie des PPARs au niveau de la glande mammaire ;
 - En révélant pour la première fois une altération du métabolisme des lipides par la mise en place d'un profil catabolique ;
 - En identifiant une altération à long terme sur les glandes mammaires, après une exposition gestationnelle et lactationnelle ;
 - En démontrant que les effets du DINCH sont plus nombreux et observés plus tôt que ceux du DEHP.

6 LIMITES DE NOS ETUDES

Bien que notre étude ait apporté plusieurs contributions importantes pour la biologie des glandes mammaires et les impacts liés à une exposition au DEHP et au DINCH, elle comporte certaines limites liées, entre autres, aux protocoles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, mais aussi aux modèles d'études utilisés.

6.1 Les traitements au DEHP et au DINCH, une question de dose et d'exposition

Les concentrations utilisées dans notre étude *in vitro*, comme mentionné dans l'article 1, ont été estimées à partir de la concentration de DEHP et de ses métabolites retrouvés dans le lait maternel. Ainsi, sachant que la masse molaire du MEHP est de 278.34 g/mol, il a pu être estimé que la concentration médiane dans le lait maternel était de 5.17 nM (Kim *et al.*, 2021) et pourrait monter jusqu'à une concentration maximum de 5 µM (Main *et al.*, 2006). Pour le DEHP, dont la masse molaire est de 390.56 g/mol, il a pu être estimé que la concentration médiane dans le lait maternel était de 358 nM dans une étude canadienne (Cao *et al.*, 2021) et un maximum de 10 µM (Zhu *et al.*, 2006). Ainsi, notre gradient d'exposition entre 0.1 nM et 10 µM est représentatif de l'exposition des glandes mammaires humaines. Des concentrations similaires ont été utilisées dans d'autres études toxicologiques utilisant la lignée MCF-7 (Chen & Chien, 2014; Venkata *et al.*, 2006). De plus, le choix d'une exposition quotidienne sur 4 jours a été choisi, car elle permettait d'obtenir la plus grande différence de prolifération entre les traitements et le témoin. Il aurait cependant été intéressant de réaliser la même expérience avec les métabolites secondaires du DEHP, comme le MEHHP, le MEOHP, le MECPP et le MCMHP, qui ont été quantifiés dans le lait maternel (Hung *et al.*, 2021), mais dont les effets sur les cellules de la glande mammaire n'ont pas été identifiés.

Concernant les conditions expérimentales de l'étude *in vivo*, les doses d'expositions ont aussi été déterminées selon nos problématiques d'intérêts, soit la fenêtre de sensibilité périnatale et l'impact sur la reproduction. Il a été estimé qu'un prématuré pouvait être exposé jusqu'à 16mg/kg poids corporel/jour de DEHP (Mallow & Fox, 2014), ce qui correspond à 84.57 mg/kg/jour de DEHP pour le rat en tenant compte des différences entre espèces (ratio corporel et métabolisme) (Nair & Jacob, 2016). Les doses utilisées entre 30 et 300 mg/kg/jour de DEHP nous permettent de nous rapprocher de cette estimation d'exposition, sachant qu'il s'agit dans notre étude d'une exposition indirecte des rats. De plus, dans une revue de la littérature, il a été reporté que la LOAEL (dose la plus faible pour laquelle des effets néfastes ont été observés)

pour la santé reproductive était comprise entre 3 et 500 mg/kg de DEHP, pour une exposition gestationnelle et/ou lactationnelle (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022). Ainsi nos doses d'exposition sont représentatives d'une exposition maximale chez l'humain, afin d'en comprendre les mécanismes des potentielles altérations de la reproduction, et sont aussi similaires à d'autres études toxicologiques (Wang *et al.*, 2017c; Zhang *et al.*, 2020b). Cependant, il est maintenant admis que les PE ont souvent des courbes d'effets non-monotones (Kabir *et al.*, 2015; Lagarde *et al.*, 2015). Par conséquent, l'impact d'une concentration élevée ne permet pas obligatoirement de prédire l'effet de la concentration la plus faible, comme pourrait le faire la relation dose-réponse linéaire. Pour cela, de nombreux toxicologues commencent à effectuer leurs expériences à de très faibles concentrations (*low-dose experiments*), de l'ordre de celles auxquels les humains sont exposés au quotidien. Ainsi, il aurait été intéressant de tester d'autres concentrations plus faibles (0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 mg/kg/jour), à l'image des études toxicologiques sur le DEHP ou le DINCH (Brehm & Flaws, 2021; Campioli *et al.*, 2019a; Grande *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2017; Niermann *et al.*, 2015).

6.2 Un protocole expérimental centré sur la reproduction masculine

Notre étude *in vivo* est issue du grand projet des *Green plasticizers*, mis en place par une équipe multidisciplinaire de l'Université McGill dans le but de comprendre l'impact des plastifiants comme, entre autres, le DEHP et le DINCH, sur la santé reproductive masculine. Grâce à notre collaboration dans ce projet, nous avons pu récupérer les glandes mammaires des femelles rats exposées pendant la vie *in utero* et la lactation, à PND3, PND21, PND46 et PND90, ainsi que leurs mères au moment du sevrage. Cependant, nous n'étions pas en contrôle des analyses systémiques réalisées sur les rats. Ainsi, il aurait été intéressant de quantifier le taux sérique d'estradiol et de la progestérone en fonction des cycles œstraux, comme cela a été fait par Meltzer et collaborateurs (Meltzer *et al.*, 2015), mais aussi la durée de chaque phase du cycle (Brehm & Flaws, 2021). De plus, afin de comprendre le stockage et l'élimination du DEHP et du DINCH au cours du temps, il aurait été intéressant de doser les différents métabolites dans les différents tissus adipeux des rats, ainsi que de les quantifier dans les selles et les urines, ainsi que dans le lait.

6.3 Les adipocytes et leurs conservations

Au début de notre étude *in vivo*, nous nous attendions à voir une altération des récepteurs stéroïdiens et du développement de l'épithélium mammaire pour les rats femelles exposés

pendant la gestation et la lactation au DEHP, tel qu'il a été montré dans d'autres études d'expositions de PEs sur la glande mammaire (Fenton *et al.*, 2012; Gouesse *et al.*, 2021). Ainsi, lors du prélèvement des tissus mammaires, la priorité a été mise dans l'étude et la conservation de l'épithélium mammaire, soit des « whole mounts », une congélation rapide des tissus dans l'azote liquide pour effectuer les extractions d'ARN et de protéines, ainsi qu'un enrobage dans de la cryomatrice pour effectuer des colorations de Trichrome de Masson et en immunofluorescence sur les cryosections. Cependant, nos résultats ont démontré que nos traitements avaient peu d'impact sur l'épithélium, mais semblaient cibler le stroma. Plus spécifiquement, en observant l'impact du DINCH sur la voie des PPARs, nous avons voulu étudier la composante adipocytaire du stroma. Malheureusement, afin de mesurer de façon différentielle l'expression transcriptomique ou protéique dans le stroma *versus* l'épithélium, une extraction des adipocytes aurait dû être réalisée sur le tissu frais (Alexandersson *et al.*, 2020). De plus, les possibilités d'analyses des tissus enrobés, comme l'immunofluorescence et les analyses de proportions sur les colorations de Trichrome de Masson, ont été limitées, car l'enrobage en cryomatrice ne permet pas une aussi bonne conservation des tissus adipeux que la paraffine, entraînant beaucoup de déchirures des membranes d'adipocytes. Nous n'avons donc pas pu analyser plusieurs aspects du stroma, ce qui aurait pu nous apporter des réponses plus claires concernant les mécanismes impliqués dans nos effets.

7 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

7.1 Quelle est l'influence du DEHP ou du DINCH sur les maladies métaboliques?

Depuis plusieurs années il a été montré que le DEHP ou ses métabolites activaient la voie des PPARs, altérant le métabolisme des lipides (Hao *et al.*, 2012; Kratochvil *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2017; Nardelli *et al.*, 2015a; Shoaito *et al.*, 2019; Venkata *et al.*, 2006), et pourraient être impliqués dans les maladies métaboliques (Callaghan *et al.*, 2020). Une revue systématique a montré qu'une exposition au DEHP ou au MEHP durant la gestation et/ou la lactation chez les rongeurs, pourrait être associée avec une augmentation du tissu adipeux (Wassenaar & Legler, 2017). Ces effets semblent amplifiés dans le cas d'une diète riche en gras (HFD - *high fat diet*) (Zhang *et al.*, 2020b). Il a été montré qu'une exposition gestationnelle au DEHP est délétère au niveau du placenta uniquement si l'exposition était accompagnée d'une HFD, augmentant le pourcentage de mortalité fœtal à GD21 chez les souris (Kannan *et al.*, 2021). De plus, le DEHP, par sa forte lipophilie, contamine majoritairement les aliments à haute teneur en gras (Kappenstein *et al.*, 2012), entraînant une exposition simultanée de DEHP et de HFD. De façon intéressante, selon une étude épidémiologique, une exposition au DEHP *in utero*, estimée par la présence de ses métabolites dans les urines maternelles, a été associée à une augmentation du tour de taille des enfants à 5 ans (Harley *et al.*, 2017). Une association entre la présence de MEHHP dans les urines et le tour de taille a aussi été identifiée pour des femmes non diabétiques (Svensson *et al.*, 2011). De plus, il a été montré qu'une HFD, entraînant l'obésité de souris, induisait une altération le développement de la glande mammaire (Kamikawa *et al.*, 2009). Cependant, l'effet d'une exposition combinée de DEHP et d'une HFD, n'a jamais été étudié au niveau de la glande mammaire, à notre connaissance.

Pour le DINCH et ses métabolites, les impacts sur PPARs, le métabolisme des lipides et leurs propriétés obésogènes ont été assez controversés (Campioli *et al.*, 2015; Campioli *et al.*, 2019a; Campioli *et al.*, 2017b; Engel *et al.*, 2018; Langsch *et al.*, 2018; Otter, 2016). Cependant, un article très récent a montré que le MINCH pouvait se fixer sur PPAR γ , et entraîner des actions différentes en fonction de l'état de différenciation des adipocytes. Ainsi, les préadipocytes subiraient une accumulation de lipides, alors que les adipocytes matures présenteraient une altération du métabolisme des lipides avec une diminution du stockage lipidique (Schaffert *et al.*, 2022). Il a été récemment décrit, dans la revue de Hernandez-Quiles et collaborateurs, que PPAR γ était un facteur de transcription clé pour le cancer, l'immunité et l'obésité (Hernandez-Quiles *et al.*, 2021). De façon intéressante, nos résultats *in vivo* démontrent l'impact du DINCH

sur le métabolisme des lipides, mais aussi au niveau de l'inflammation dans la glande mammaire, corroborant ainsi cette hypothèse.

L'ensemble de ces données suggèrent que le DEHP, mais aussi le DINCH, pourraient induire une altération du développement de la glande mammaire, suite à une exposition gestationnelle et lactationnelle, en combinaison avec une HFD. De plus, les métabolites du DEHP et du DINCH étant présents simultanément dans les urines humaines, il serait intéressant de déterminer l'effet d'une exposition combinée des deux, avec ou sans HFD.

7.2 Quelle est l'influence du DEHP ou du DINCH sur le développement du cancer du sein?

Les évidences concernant l'influence du DEHP dans le développement du cancer du sein ont majoritairement été acquises par des études *in vitro*, ou des corrélations lors d'études épidémiologiques. À notre connaissance, seul l'étude de Zhang et collaborateurs s'est intéressée à l'influence d'une exposition au DEHP (150mg/kg), mais aussi au BPA (20mg/kg), après une initiation chimique du cancer du sein, *in vivo*. Ils ont montré une augmentation de la tumorigenèse, mais uniquement quand le DEHP était en co-traitement avec le BPA (Zhang *et al.*, 2021). Cette étude est pertinente dans le contexte de résistance aux chimiothérapies décrit dans la section 4.3 de ce manuscrit (pages 135-136), mais également en tenant compte du fait que les humains sont exposés à plusieurs PE de façon chronique et simultanée. Il aurait aussi pu être utile de tester des concentrations de DEHP plus représentatives de l'exposition d'une personne adulte en chimiothérapie, qui a été estimée à 0.09 mg/kg/jour de DEHP (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2022), soit un équivalent de 0.47 mg/kg/jour pour le rat.

Concernant le DINCH, à notre connaissance, seule l'étude de Bhat et collaborateurs a montré le potentiel impact sur le développement du cancer du sein (Bhat *et al.*, 2014). Cependant les connaissances actuelles concernant son impact, ainsi que celui de ses métabolites, sur la signalisation de PPAR γ , laissent imaginer un potentiel impact sur la progression du cancer du sein.

Dans un contexte de résistance aux chimiothérapies, il serait intéressant d'induire le cancer du sein dans des rats pubères à PND46, puis de les exposer chroniquement à 0.01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 mg/kg de DEHP ou de DINCH.

Cependant notre hypothèse principale est que les altérations induites par une exposition lors d'une fenêtre de sensibilité, comme lors de la gestation et la lactation, impacteraient le

développement du cancer du sein, selon le principe de la DOHaD. Ainsi un projet pertinent serait d'exposer des rats de façon similaire à notre étude, soit de GD8 à PND21, mais à plusieurs concentrations de DEHP ou de DINCH, de 0.01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 mg/kg, auxquelles serait ajouté un traitement à un inducteur de cancer du sein, telle que le DMBA, lorsque les rats auront atteint PND46.

7.3 Utilisation de modèles représentatifs de la complexité de la glande mammaire

La glande mammaire est un organe complexe dont la signalisation croisée entre l'épithélium et le stroma est nécessaire à son développement, à son maintien, mais est aussi impliquée dans sa cancérogenèse. Ainsi, les études *in vitro* monocouches, bien que présentant de nombreux avantages comme la facilité de culture et le faible coût, sont peu représentatives de l'organe auquel les cellules appartiennent.

Pour cela, d'autres modèles, comme la culture de deux lignées cellulaires sur insert pourrait être utilisée (culture en couche). Ce modèle, mis en place au laboratoire de la Pre Isabelle Plante, permet de faire pousser de façon individuelle deux lignées cellulaires des deux côtés de la membrane poreuse d'un insert, tout en maintenant une communication directe entre les deux couches *via* la mise en place de jonction gap (Juarez et al., 2022 – *en cours d'écriture*). Actuellement, le modèle mis en place au laboratoire est composé de cellules luminales et de cellules myoépithéliales. Cependant, il pourrait facilement être adapté pour une culture composée de cellules luminales et myoépithéliales, et d'adipocytes,ensemencés au fond du puit, permettant la communication paracrine. Aux vues de nos résultats obtenus après une exposition au DINCH sur la régulation de PPAR γ , ce modèle nous permettrait de décrypter la signalisation cellulaire croisée entre ces deux composants fondamentaux de la glande mammaire.

8 PERSPECTIVES DE SANTÉ PUBLIQUE

La problématique du DEHP et du DINCH relève des données générées par la recherche académique, mais implique surtout une gestion des risques par les organismes de santé publique.

8.1 Quelle est la réelle exposition humaine au DEHP et au DINCH ?

Afin de pouvoir contrôler et réguler la présence des plastifiants dans les objets de notre quotidien, selon la dose journalière acceptable (TDI) obtenue lors d'études *in vivo*, il faut savoir à quelle concentration l'humain est exposé. Cependant, la méthode actuelle, comprenant la mesure du DEHP et du DINCH ou de leurs métabolites primaires dans les urines (Huang *et al.*, 2021) ne sont pas représentatifs de l'exposition que nous subissons. De plus, ce biais impacte les expérimentations en laboratoire dont le but des expériences est d'être toujours plus représentatif de l'exposition réelle.

8.1.1 Un meilleur biomarqueur

Au Canada, pour mesurer l'exposition au DEHP, seuls le MEHP, le MEHHP et le MEOHP étaient contrôlés, jusqu'en 2016, date à laquelle la mesure du MECPP a été ajoutée dans les biosurveillances dans les analyses d'urine et de sang des Canadiens (Santé Canada, 2021). Dans le cas de la France, le programme de biosurveillance des phtalates n'implique pas la mesure du MECPP seul (Santé publique France, 2019). Cependant, il s'agit d'une mesure importante, car il a été montré que le MECPP était présent dans 100% des urines, contrairement au MEOHP et MEHP, (Hou *et al.*, 2015). De plus, le MECPP n'est pas un métabolite toujours évalué, mais quand c'est le cas, sa concentration est toujours supérieure à celle du MEHP, du MEHHP et du MEOHP (Chuang *et al.*, 2020; Harley *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2020; Sathyanarayana *et al.*, 2017; Swan *et al.*, 2015). Ainsi, en mesurant uniquement ces trois métabolites, on sous-estime probablement l'exposition humaine.

8.1.2 Une matrice de dosage plus représentative

L'urine et le sérum sont les matrices les plus utilisées dans les études *in vivo* et épidémiologique. Cependant, dans le cas d'une exposition au DEHP, elle n'est pas la meilleure matrice. En effet, les études comparatives de l'élimination du ¹⁴C-DEHP dans les selles *versus* d'autres matrices ont montré que la concentration est au moins deux fois plus élevée dans les

selles (Chen *et al.*, 2022; Daniel & Bratt, 1974; Fu *et al.*, 2021; Kurata *et al.*, 2012; Martis *et al.*, 1987). Dans le cas du rat, la concentration de ¹⁴C-DEHP dans les selles peut être jusqu'à 12 fois supérieure que dans les urines (Martis *et al.*, 1987). De plus, dans une récente étude, les taux de DEHP et de MEHP ont été quantifiés à des concentrations entre 30 et 300 fois supérieure dans les selles que dans le sérum (Chen *et al.*, 2022). Les selles semblent ainsi plus représentatives de l'élimination du DEHP et de ses métabolites. Cependant, dans le cas d'étude épidémiologique, l'urine reste une matrice facile d'accès et de conservation. Ainsi, connaître l'élimination du DEHP dans les autres matrices, dépendamment des espèces et du type d'exposition permettrait d'affiner l'estimation d'exposition à partir des taux urinaires.

8.1.3 Une prise en compte d'une potentielle bioaccumulation d'une partie du DEHP

Le stockage du DEHP et de ces métabolites a été étudié dans des études de distribution dans l'organisme à la fin du XXe siècle. Ainsi, il a été montré que le ¹⁴C-DEHP est toujours détectable dans les adipocytes de rats 7 jours après une injection unique, et au moins 24h après une exposition orale, mais aucune analyse n'a été faite à des temps plus longs (Tanaka *et al.*, 1975). De plus, ces analyses ont été réalisées avec la limitation technique de l'époque et, à notre connaissance, aucune autre analyse de bioaccumulation dans le tissu adipeux n'a pas été effectuée. Il est donc possible que les capacités de bioaccumulation du DEHP soient sous-estimées.

Dans le cas du DINCH, il a été montré que le ¹⁴C-DINCH était détecté dans le tissu adipeux jusqu'à 28h après une exposition unique ; cependant aucune analyse n'a été faite à des temps plus longs (Langsch *et al.*, 2018). De façon intéressante, des études sur l'élimination du DEHP ont montré que seulement 40 à 45% du DEHP était éliminé au bout de 48h post-exposition (Koch *et al.*, 2013; Schutze *et al.*, 2017), sans que les auteurs ne mentionnent la potentielle accumulation des 55 à 60 % restant. Ces résultats suggèrent que les capacités de bioaccumulation du DINCH sont probablement plus élevées.

Malheureusement, le stockage n'est pas un élément pris en compte dans l'estimation d'exposition, alors qu'il devrait en être un élément central, surtout dans le cas d'expositions chroniques.

8.2 La santé publique et l'influence des lobbies

Malgré les données scientifiques prouvant sa toxicité depuis les 50 dernières années, le DEHP est encore autorisé à grandes échelles dans les objets de notre quotidien, même si sa concentration est limitée à 0.1% dans objets de puériculture dans l'Union européenne et au Canada. Les organismes réglementaires prennent plusieurs paramètres en compte dans leur prise de décision comme la balance du bénéfices/risques des produits contenant le DEHP. Cependant quelques aberrations sont observables entre les réglementations des différents pays. Par exemple, l'Union européenne a limité à une combinaison maximale de 0.1% de DEHP, de DBP, de BBP et de DIBP dans le matériel médical (European Commission, 2018). Dans le même temps, au Canada, la réglementation stipule qu'une présence supérieure à 0.1% de DEHP doit simplement être mentionnée sur le produit, sans toutefois le limiter (Gouvernement du Canada, 2021). Cette différence de réglementation entre les deux institutions sont difficiles à comprendre, sachant que les données scientifiques utilisées dans leurs prises de décisions sont les mêmes. Une des explications possibles est l'implication de lobbies ayant un intérêt à maintenir la présence du DEHP dans les produits plastiques. Le Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales définit le terme lobby comme « Groupement, organisation ou association défendant des intérêts financiers, politiques ou professionnels, en exerçant des pressions sur les milieux parlementaires ou des milieux influents, notamment les organes de presse ». Cette pression n'est pas restreinte au Canada, mais est présente dans le monde entier. En effet, l'*European Plasticisers*, association regroupant des fabricants de plastifiants, n'était pas en faveur de l'appellation de perturbateurs endocriniens pour le DEHP, le BBP, le DBP et le DIBP, entraînant des complications dans leur processus de commercialisation. En effet, cette association a publié sur leur site internet : « Si ces changements sont apportés, certaines utilisations précédemment exemptées d'autorisation devront être autorisées. Il s'agit notamment de l'utilisation du DEHP dans les matériaux en contact avec les aliments ou les dispositifs médicaux » (*If these changes are brought about, some previously exempted uses will require authorisation. These include the use of DEHP in food contact materials or medical devices*). Ils ont ainsi justifié que « dans le cadre d'une meilleure réglementation et dans l'intérêt de l'économie circulaire, *European Plasticisers* demande à la Commission européenne de ne pas adopter cette recommandation de l'ECHA. » (*Consistent with better regulation, and in the interests of the circular economy, European Plasticisers calls on the European Commission not to adopt this recommendation from ECHA*) (European Plasticisers, 2019).

Concernant le DINCH, l'absence de consensus sur les effets sur le métabolisme des lipides est en réalité une opposition entre les articles des académiciens et ceux des employés de BASF, le fabricant du DINCH. En effet, à la suite de l'article de Campioli et collaborateurs (Campioli *et al.*, 2015), une lettre à l'éditeur a été écrite par Rainer Otter, vice-président et chargé des affaires réglementaires chez BASF SE, contre-argumentant les conclusions de l'article (Otter, 2016). Dans la même veine, l'article de David et collaborateurs a montré des altérations du poids, mais aussi l'apparition d'anomalies de certains organes vitaux dès 62 mg/kg. Cependant, les auteurs, des employés de BASF, concluent pourtant à une dose maximale sans effet nocif observé (NOAEL) de 300mg/kg/jour de DINCH (David *et al.*, 2015).

Il existe cependant des moyens d'interpeller les organismes réglementaires, à travers, entre autres, les centres de recherche spécialisés comme le Centre intersectoriel d'Analyse des Perturbateurs Endocriniens ([CIAPE](#)), mais aussi par l'investissement de nombreuses organisations à but non lucratif (ONG), afin que la voix des citoyens et des scientifiques soit plus pesante que celle des lobbies.

9 CONCLUSION

Dans une perspective de santé globale, il est indispensable de déterminer les risques associés à notre exposition chronique au DEHP et au DINCH, afin d'en comprendre les réels dangers pour la population, permettant *in fine* d'améliorer leurs régulations.

Dans ce contexte, notre étude a mis en évidence un mécanisme de progression du cancer du sein *via* l'exposition au DEHP et au MEHP, mais aussi identifié, pour la première fois, des altérations à long terme au niveau de la glande mammaire, suite à une exposition au DEHP, et de façon plus importante à la suite à une exposition au DINCH.

D'autres études prospectives sont nécessaires afin de comprendre l'influence de ces composés sur la progression du cancer du sein, voire leurs implications dans la résistance aux chimiothérapies, et d'en comprendre la signalisation.

Ces données scientifiques sont d'autant plus importants comptes tenus qu'au Canada, en cette année 2022, le projet de loi S-5, un amendement à la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (CEPA) qui est restée inchangée depuis 1999, est en cours de préparation, pour inclure la notion de PEs. Ainsi chercheurs et citoyens s'allient, pour faire pression auprès du gouvernement afin que le Canada permette une meilleure protection face aux PEs, et que notre environnement de plastique ne soit plus un risque pour notre santé ou celles de nos enfants.

10 BIBLIOGRAPHIE

- Abbas MA (2017) Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 165(Pt B):369-381.
- Abdel-Hafiz HA & Horwitz KB (2014) Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 140:80-89.
- Agarwal R, Coffing SL, Baird WM, Kiselyov AS, Harvey RG, Dipple A (1997) Metabolic Activation of Benzo[g]chrysene in the Human Mammary Carcinoma Cell Line MCF-7. *Cancer Research* 57:415-419.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2022) *Toxicological Profile for Di(2-Ethylhexyl)Phthalate (DEHP)*. U.S Department of Health and Human Services. 547 p
- Ailhaud G (1987) Multiplication et différenciation des cellules adipeuse. *Médecine/Sciences* 3(Synthèse):380-386.
- Akhtar N & Bansal JG (2017) Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current Problems in Cancer* 41(5):328-339.
- Albert O, Nardelli TC, Hales BF, Robaire B (2018a) Identifying Greener and Safer Plasticizers: A 4-Step Approach. *Toxicological Sciences* 161(2):266-275.
- Albert O, Nardelli TC, Lalancette C, Hales BF, Robaire B (2018b) Effects of In Utero and Lactational Exposure to New Generation Green Plasticizers on Adult Male Rats: A Comparative Study With Di(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Toxicological Sciences* 164(1):129-141.
- Albregues J, Meneguzzi G, Gaggioli C (2014) [Carcinoma-associated fibroblasts in cancer: the great escape]. *Médecine Sciences* 30(4):391-397.
- Alexandersson I, Harms MJ, Boucher J (2020) Isolation and Culture of Human Mature Adipocytes Using Membrane Mature Adipocyte Aggregate Cultures (MAAC). *JoVE* doi:10.3791/60485(156):e60485.
- Ambe K, Sakakibara Y, Sakabe A, Makino H, Ochibe T, Tohkin M (2019) Comparison of the developmental/reproductive toxicity and hepatotoxicity of phthalate esters in rats using an open toxicity data source. *Journal of Toxicological Sciences* 44(4):245-255.
- Ambele MA, Dhanraj P, Giles R, Pepper MS (2020) Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 21(12).

- Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N (2014) De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63(7):895-902.
- Anbazhagan R, Bartek J, Monaghan P, Gusterson BA (1991) Growth and Development of the Human Infant Breast. *The American journal of anatomy* 192:407-417.
- Anderson E (2002) The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 4(Progesterone receptors – animal models and cell signaling in breast cancer):197-201.
- Andjelkovic T, Bogdanovic D, Kostic I, Kocic G, Nikolic G, Pavlovic R (2021) Phthalates leaching from plastic food and pharmaceutical contact materials by FTIR and GC-MS. *Environmental Science and Pollution Research International* 28(24):31380-31390.
- Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* 91(11):629-635.
- Andrysik Z, Prochazkova J, Kabatkova M, Umannova L, Simeckova P, Kohoutek J, Kozubik A, Machala M, Vondracek J (2013) Aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of contact inhibition is associated with connexin43 downregulation and inhibition of gap junctional intercellular communication. *Arch Toxicol* 87(3):491-503.
- ANSES (2016) *Analysis of the most appropriate risk management option (RMOA) - DINCH®*. 322 p
- ANSES (2019) *Les perturbateurs endocriniens - Comprendre où en est la recherche*. p
- Astwood EB, Geschickter CF, Rausch EO (1936) Development of mammary gland of the rat. *The American journal of anatomy* 61(3):373-405.
- Augimeri G, Giordano C, Gelsomino L, Plastina P, Barone I, Catalano S, Ando S, Bonofiglio D (2020) The Role of PPARgamma Ligands in Breast Cancer: From Basic Research to Clinical Studies. *Cancers* 12(9).
- Baloyi ND, Tekere M, Maphangwa KW, Masindi V (2021) Insights Into the Prevalence and Impacts of Phthalate Esters in Aquatic Ecosystems. *Frontiers in Environmental Science* 9.
- Barr DB, Silva MJ, Kato K, Reidy JA, Malek NA, Hurtz D, Sadowski M, Needham LL, Calafat AM (2003) Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environmental Health Perspectives* 111(9):1148-1151.
- BASF (2017) Hexamoll® DINCH® The trusted non-phthalate plasticizer (Édit Basf).
- BASF (2019) Hexamoll® DINCH - The trusted non-phthalate plasticizer.).
- Bell MR (2018) Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology* 159(7):2596-2613.

- Bernard L, Cueff R, Breysse C, Decaudin B, Sautou V, Armed Study G (2015) Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. *Int J Pharm* 485(1-2):341-347.
- Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, Pereira B, Sautou V (2018a) Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. *PLoS One* 13(2):1-15.
- Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, Pereira B, Sautou V (2018b) Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. *PLoS ONE* 13(2):e0192369.
- Bhat VS, Durham JL, Ball GL, English JC (2014) Derivation of an oral reference dose (RfD) for the nonphthalate alternative plasticizer 1,2-cyclohexane dicarboxylic acid, di-isononyl ester (DINCH). *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B: Critical Reviews* 17(2):63-94.
- Bhattacharya I, Sen Sharma S, Majumdar SS (2019) Pubertal orchestration of hormones and testis in primates. *Mol Reprod Dev* 86(11):1505-1530.
- Bianchi S, Bani G, Bigazzi M (1986) Effects of relaxin on the mouse mammary gland. III. The fat pad. *Journal of Endocrinological Investigation* 9:153-160.
- Bligh EG & Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8):911-917.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of Xenoestrogenic Environmental Pollutants on the Proliferation of a Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7). *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 34:306-310.
- Boisvert A, Jones S, Issop L, Erythropel HC, Papadopoulos V, Culty M (2016) In vitro functional screening as a means to identify new plasticizers devoid of reproductive toxicity. *Environmental Research* 150:496-512.
- Bonnette SG & Hadsell DL (2001) Targeted Disruption of the IGF-I Receptor Gene Decreases Cellular Proliferation in Mammary Terminal End Buds. *Endocrinology* 142(11):4937-4945.
- Bonofiglio D, Cione E, Qi H, Pingitore A, Perri M, Catalano S, Vizza D, Panno ML, Genchi G, Fuqua SA, Ando S (2009) Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells. *American Journal of Pathology* 175(3):1270-1280.
- Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT (2016) Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 26(1):25-42.

- Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hagerhed-Engman L (2004) The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environmental Health Perspectives* 112(14):1393-1397.
- Bourdeaux D, Yessaad M, Chennell P, Larbre V, Eljezi T, Bernard L, Sautou V, group As (2016) Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. *J Pharm Biomed Anal* 118:206-213.
- Bradley EL, Read WA, Castle L (2007) Investigation into the migration potential of coating materials from cookware products. *Food Addit Contam* 24(3):326-335.
- Brehm E & Flaws JA (2021) Prenatal exposure to a mixture of phthalates accelerates the age-related decline in reproductive capacity but may not affect direct biomarkers of ovarian aging in the F1 generation of female mice. *Environ Epigenet* 7(1):dvab010.
- Brehm E, Rattan S, Gao L, Flaws JA (2018) Prenatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Causes Long-Term Transgenerational Effects on Female Reproduction in Mice. *Endocrinology* 159(2):795-809.
- Brenot A, Hutson I, Harris C (2020) Epithelial-adipocyte interactions are required for mammary gland development, but not for milk production or fertility. *Developmental Biology* 458(2):153-163.
- Brisken C & Ataca D (2015a) Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology* 4(3):181-195.
- Brisken C & Ataca D (2015b) Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(3):181-195.
- Brisken C, Hess K, Jeitziner R (2015) Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinology* 156(10):3442-3450.
- Brisken 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* 210:96-106.
- Brisken C & O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(12):a003178.
- Brisken C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'malley BW (1998) A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9):5076-5081.

- Briskin C & Scabia V (2020) 90 YEARS OF PROGESTERONE: Progesterone receptor signaling in the normal breast and its implications for cancer. *Journal of Molecular Endocrinology* 65(1):T81-T94.
- Brownfield DG, Venugopalan G, Lo A, Mori H, Tanner K, Fletcher DA, Bissell MJ (2013) Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules. *Current Biology* 23(8):703-709.
- Burchardt NA, Eliassen AH, Shafrir AL, Rosner B, Tamimi RM, Kaaks R, Tworoger SS, Fortner RT (2022) Oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk by subtype in the Nurses' Health Study II: a prospective cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 226(6):821 e821-821 e826.
- Burks H, Pashos N, Martin E, McLachlan J, Bunnell B, Burow M (2017) Endocrine disruptors and the tumor microenvironment: A new paradigm in breast cancer biology. *Mol Cell Endocrinol* 457:13-19.
- Calafat AM, Brock JW, Silva MJ, Gray LE, Jr., Reidy JA, Barr DB, Needham LL (2006) Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. *Toxicology* 217(1):22-30.
- Callaghan MA, Alatorre-Hinojosa S, Connors LT, Singh RD, Thompson JA (2020) Plasticizers and Cardiovascular Health: Role of Adipose Tissue Dysfunction. *Frontiers in Pharmacology* 11:626448.
- Campoli E, Duong TB, Deschamps F, Papadopoulos V (2015) Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue. *Environmental Research* 140:145-156.
- Campoli E, Lau M, Papadopoulos V (2019a) Effect of subacute and prenatal DINCH plasticizer exposure on rat dams and male offspring hepatic function: The role of PPAR-alpha. *Environmental Research* 179:1-14.
- Campoli E, Lau M, Papadopoulos V (2019b) Effect of subacute and prenatal DINCH plasticizer exposure on rat dams and male offspring hepatic function: The role of PPAR-alpha. *Environ Res* 179(Pt A):108773.
- Campoli E, Lee S, Lau M, Marques L, Papadopoulos V (2017a) Effect of prenatal DINCH plasticizer exposure on rat offspring testicular function and metabolism. *Sci Rep* 7(1):11072.
- Campoli E, Lee S, Lau M, Marques L, Papadopoulos V (2017b) Effect of prenatal DINCH plasticizer exposure on rat offspring testicular function and metabolism. *Scientific Reports* 7(1):1-10.

- Campioli E, Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V (2014) In utero exposure to the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate promotes local adipose and systemic inflammation in adult male offspring. *Nutr Diabetes* 4:e115.
- Cao XL, Sparling M, Zhao W, Arbuckle TE (2021) GC-MS Analysis of Phthalates and Di-(2-ethylhexyl) Adipate in Canadian Human Milk for Exposure Assessment of Infant Population. *Journal of AOAC International* 104(1):98-102.
- Carpentier J-L, Perrelet A, Orci L (1977) Morphological changes of the adipose cell plasma membrane during lipolysis. *the journal of cell biology* 72:14.
- Ceresana (2013) *Market Study: Plasticizers, third ed.* p
- Chang MC, Eslami Z, Ennis M, Goodwin PJ (2021) Crown-like structures in breast adipose tissue of breast cancer patients: associations with CD68 expression, obesity, metabolic factors and prognosis. *npj Breast Cancer* 7(1).
- Chappell JE, Clandinin MT, McVey MA, Chance GW (1985) Free fatty acid content of human milk: physiologic significance and artifactual determinants. *Lipids* 20(4):216-221.
- Chatterjee SJ & McCaffrey L (2014) Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 6:15-27.
- Chen FP & Chien MH (2014) Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. *Climacteric* 17(4):377-384.
- Chen FP, Chien MH, Chern IY (2016) Impact of low concentrations of phthalates on the effects of 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 55(6):826-834.
- Chen J, Wu S, Wen S, Shen L, Peng J, Yan C, Cao X, Zhou Y, Long C, Lin T, He D, Hua Y, Wei G (2015) The Mechanism of Environmental Endocrine Disruptors (DEHP) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Cryptorchidism. *PLoS ONE* 10(6):e0126403.
- Chen Q, Kong Q, Tian P, He Y, Zhao J, Zhang H, Wang G, Chen W (2022) Lactic acid bacteria alleviate di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced liver and testis toxicity via their bio-binding capacity, antioxidant capacity and regulation of the gut microbiota. *Environ Pollut* 305:119197.
- Chen X, Qin Q, Zhang W, Zhang Y, Zheng H, Liu C, Yang Y, Xiong W, Yuan J (2013) Activation of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway promotes DEHP-induced Hep3B cell proliferation. *Food Chem Toxicol* 59:325-333.
- Chiang HC, Kuo YT, Shen CC, Lin YH, Wang SL, Tsou TC (2016) Mono(2-ethylhexyl)phthalate accumulation disturbs energy metabolism of fat cells. *Archives of Toxicology* 90(3):589-601.

- Chipman KJ, Mally A, Edward GO (2003) Disruption of Gap Junctions in Toxicity and Carcinogenicity. *Toxicological Sciences* 71:146-153.
- Chlebowski RT, Anderson GL, Aragaki AK, Manson JE, Stefanick ML, Pan K, Barrington W, Kuller LH, Simon MS, Lane D, Johnson KC, Rohan TE, Gass MLS, Cauley JA, Paskett ED, Sattari M, Prentice RL (2020) Association of Menopausal Hormone Therapy With Breast Cancer Incidence and Mortality During Long-term Follow-up of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA* 324(4):369-380.
- Chou CK, Huang HW, Yang CF, Dahms HU, Liang SS, Wang TN, Kuo PL, Hsi E, Tsai EM, Chiu CC (2019) Reduced camptothecin sensitivity of estrogen receptor-positive human breast cancer cells following exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is associated with DNA methylation changes. *Environmental Toxicology* 34(4):401-414.
- Chou CK, Yang YT, Yang HC, Liang SS, Wang TN, Kuo PL, Wang HD, Tsai EM, Chiu CC (2018) The Impact of Di(2-ethylhexyl)phthalate on Cancer Progression. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 66(3):183-197.
- Chuang SC, Chen HC, Sun CW, Chen YA, Wang YH, Chiang CJ, Chen CC, Wang SL, Chen CJ, Hsiung CA (2020) Phthalate exposure and prostate cancer in a population-based nested case-control study. *Environmental Research* 181:108902.
- Cinti S (2007) The Adipose Organ. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, Fantuzzi G & Mazzone T (Édit.) Humana Press, Totowa, NJ 10.1007/978-1-59745-370-7_1. p 3-19.
- Cohen BC, Shamay A, Argov-Argaman N (2015) Regulation of lipid droplet size in mammary epithelial cells by remodeling of membrane lipid composition—a potential mechanism. *PLoS One* 10(3):e0121645.
- Cooper RL & Kavlock RJ (1997) Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *Journal of Endocrinology* 152:159-166.
- Correia-Sa L, Schutze A, Norberto S, Calhau C, Domingues VF, Koch HM (2017a) Exposure of Portuguese children to the novel non-phthalate plasticizer di-(iso-nonyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH). *Environment International* 102:79-89.
- Correia-Sa L, Schutze A, Norberto S, Calhau C, Domingues VF, Koch HM (2017b) Exposure of Portuguese children to the novel non-phthalate plasticizer di-(iso-nonyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH). *Environment International* 10.1016/j.envint.2017.02.001.
- Couldrey C, Moitra J, Vinson C, Anver M, Nagashima K, Green J (2002) Adipose tissue: a vital in vivo role in mammary gland development but not differentiation. *Developmental Dynamics* 223(4):459-468.

- Cowin P & Wysolmerski J (2010) Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(6):a003251.
- Cristancho AG & Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 12(11):722-734.
- Crobeddu B, Ferraris E, Kolasa E, Plante I (2019) Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases proliferation of epithelial breast cancer cells through progesterone receptor dysregulation. *Environmental Research* 173:165-173.
- Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L (2002) Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *Journal of Biological Chemistry* 277(20):17830-17835.
- Culty M, Thuillier R, Li W, Wang Y, Martinez-Arguelles DB, Benjamin CG, Triantafilou KM, Zirkin BR, Papadopoulos V (2008) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. *Biology of Reproduction* 78(6):1018-1028.
- Cunha GR & Hom YK (1996) Role of Mesenchymal-Epithelial Interactions in Mammary Gland Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1(1):21-35.
- Czogala J, Pankalla E, Turczyn R (2021) Recent Attempts in the Design of Efficient PVC Plasticizers with Reduced Migration. *Materials (Basel)* 14(4).
- Daniel JW & Bratt H (1974) The Absorption, Metabolism and Tissue Distribution of Di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology* 2:51-65.
- Das MT, Kumar M, Thakur S (2014) Differential toxicological endpoints of di(2-ethylhexyl)Phthalate (DEHP) exposure in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines: possible estrogen receptor alpha (ERalpha) independent modulations. *Indian Journal of Experimental Biology* 52(11):1052-1061.
- David RM, White RD, Larson MJ, Herman JK, Otter R (2015) Toxicity of Hexamoll((R)) DINCH((R)) following intravenous administration. *Toxicology Letters* 238(2):100-109.
- Del Pup L, Mantovani A, Cavaliere C, Facchini G, Luce A, Sperlongano P, Caraglia M, Berretta M (2016) Carcinogenetic mechanisms of endocrine disruptors in female cancers (Review). *Oncology Reports* 36(2):603-612.
- Del Pup L, Mantovani A, Luce A, Cavaliere C, Facchini G, Di Francia R, Caraglia M, Berretta M (2015) Endocrine disruptors and female cancer: Informing the patients (Review). *Oncology Reports* 34(1):3-11.

- Delbes G, Blazquez M, Fernandino JI, Grigorova P, Hales BF, Metcalfe C, Navarro-Martin L, Parent L, Robaire B, Rwigemera A, Van Der Kraak G, Wade M, Marlatt V (2022) Effects of endocrine disrupting chemicals on gonad development: Mechanistic insights from fish and mammals. *Environmental Research* 204(Pt B):112040.
- Deli T, Orosz M, Jakab A (2020) Hormone Replacement Therapy in Cancer Survivors - Review of the Literature. *Pathology Oncology Research* 26(1):63-78.
- 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.
- Demmelmair H & Koletzko B (2017) Variation of Metabolite and Hormone Contents in Human Milk. *Clinics in Perinatology* 44(1):151-164.
- Den Braver-Sewradj SP, Piersma A, Hessel EVS (2020) An update on the hazard of and exposure to diethyl hexyl phthalate (DEHP) alternatives used in medical devices. *Critical Reviews in Toxicology* 50(8):650-672.
- DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A (2015) International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24(10):1495-1506.
- Desvergne B & Wahli W (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* 20(5):649-688.
- Di Bella G, Potortì AG, Lo Turco V, Saitta M, Dugo G (2014) Plasticizer residues by HRGCeMS in espresso coffees from capsules, pods and moka pots. *Food Control* 41:185-192.
- Dianati E & Plante I (2017) Analysis of Protein-protein Interactions and Co-localization Between Components of Gap, Tight, and Adherens Junctions in Murine Mammary Glands. *Journal of Visualized Experiments* 123(e55772).
- Dianati E, Wade MG, Hales BF, Robaire B, Plante I (2017) Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Decreased p- β -Catenin^{S675} Expression and its Interaction with E-Cadherin in the Mammary Glands of Lactating Rats *Toxicological Sciences* In press.
- Ding S, Zhang Z, Chen Y, Qi W, Zhang Y, Xu Q, Liu H, Zhang T, Zhao Y, Han X, Song X, Zhao T, Ye L (2019a) Urinary levels of phthalate metabolites and their association with lifestyle behaviors in Chinese adolescents and young adults. *Ecotoxicol Environ Saf* 183:109541.
- Ding Y, Liu Y, Fei F, Yang L, Mao G, Zhao T, Zhang Z, Yan M, Feng W, Wu X (2019b) Study on the metabolism toxicity, susceptibility and mechanism of di-(2-ethylhexyl) phthalate on rat liver BRL cells with insulin resistance in vitro. *Toxicology* 422:102-120.

- Doege H & Stahl A (2005) Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models. *Physiology* 21:259-268.
- Doll R & Peto R (1981) The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. *Journal of the National Cancer Institute* 66(6):1192-1308.
- Dominguez-Romero E & Scheringer M (2019) A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat: what factors drive phthalate distribution and partitioning? *Drug Metab Rev* 51(3):314-329.
- Donner NC & Lowry CA (2013) Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* 465(5):601-626.
- Dumalaon-Canaria JA, Hutchinson AD, Prichard I, Wilson C (2014) What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. *Cancer Causes Control* 25(7):771-785.
- EFSA (2006a) *Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to the 12th list of substances for food contact materials*. European Food Safety Authority, EFSA Journal
- EFSA (2006b) *Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to the 12th list of substances for food contact materials*. (European Food Safety Authority, The EFSA Journal), p 1-21.
- 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. *the journal of cell biology* 171(1):173.
- Engel A, Buhrke T, Kasper S, Behr AC, Braeuning A, Jessel S, Seidel A, Volkel W, Lampen A (2018) The urinary metabolites of DINCH((R)) have an impact on the activities of the human nuclear receptors ERalpha, ERbeta, AR, PPARalpha and PPARgamma. *Toxicology Letters* 287:83-91.
- Engin A (2017) Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 960:135-160.
- Environnement et Changement climatique Canada (2018) Rapport de suivi à l'intention du Comité permanent de l'environnement et du développement durable de la Chambre des communes sur la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999).
- Environnement et Changement climatique Canada (2021) Le gouvernement du Canada respecte son engagement de renforcer la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) et propose de reconnaître un droit à un environnement sain.

- Environnement et Changement climatique Canada (2022) *Le gouvernement du Canada respecte son engagement de renforcer la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) et reconnaît le droit à un environnement sain.*
<https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/nouvelles/2022/02/le-gouvernement-du-canada-respecte-son-engagement-de-renforcer-la-loi-canadienne-sur-la-protection-de-lenvironnement-1999-et-reconnait-le-droit-a-u.html>
- Erythropel HC, Maric M, Cooper DG (2012) Designing green plasticizers: influence of molecular geometry on biodegradation and plasticization properties. *Chemosphere* 86(8):759-766.
- Erythropel HC, Maric M, Nicell JA, Leask RL, Yargeau V (2014) Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(24):9967-9981.
- European Chemical Agency, European Food Safety Authority with the technical support of the Joint Research C, Andersson N, Arena M, Auteri D, Barmaz S, Grignard E, Kienzler A, Lepper P, Lostia AM, Munn S, Parra Morte JM, Pellizzato F, Tarazona J, Terron A, Van der Linden S (2018) Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. *EFSA J* 16(6):e05311.
- European Commission (1999) Commission decision of 7 December 1999.).
- European Commission (2016) *The safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update)*. 170 p
- European Commission (2018) Commission Regulation (EU) 2018/2005 of 17 December 2018.).
- European Commission HCPD-G (2020) *The EU's chemicals strategy for sustainability towards a toxic-free environment.*
https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_revision_chemical_strategy_en.htm
- European Plasticisers (2019) European Plasticisers comments on ECHA's Recommendation to Amend Authorisation list for DEHP, BBP, DBP AND DIBP.
- Faria TN, Ogren L, Talamantes F, Linzer DIH, Soares MJ (1991) Localization of Placental Lactogen-I in Trophoblast Giant Cells of the Mouse Placenta. *Biology of Reproduction* 44:327-331.
- Fenton SE (2006) Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology* 147(6 Suppl):S18-24.
- Fenton SE (2012) Early Life Environmental Exposures: Lifelong Impact on Mammary Gland Development and Function. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology* 94(5):306-306.

- Fenton SE & Birnbaum LS (2015) Timing of Environmental Exposures as a Critical Element in Breast Cancer Risk. *J Clin Endocrinol Metab* 100(9):3245-3250.
- Fenton SE, Reed C, Newbold RR (2012) Perinatal environmental exposures affect mammary development, function, and cancer risk in adulthood. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:455-479.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5):E359-386.
- Fève B, Moldes M, El Hadri K, Lasnier F, Pairault J (1998) La différenciation adipocytaire : tout un programme... *Médecine/Sciences* 14(Synthèse):848-857.
- Fisher M, Arbuckle TE, MacPherson S, Braun JM, Feeley M, Gaudreau E (2019) Phthalate and BPA Exposure in Women and Newborns through Personal Care Product Use and Food Packaging. *Environ Sci Technol* 53(18):10813-10826.
- Fong JP, Lee FJ, Lu IS, Uang SN, Lee CC (2014) Estimating the contribution of inhalation exposure to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) for PVC production workers, using personal air sampling and urinary metabolite monitoring. *Int J Hyg Environ Health* 217(1):102-109.
- Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson A-M (2010) Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 34:401-410.
- Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(7):899-911.
- Frederiksen H, Upners EN, Ljubicic ML, Fischer MB, Busch AS, Hagen CP, Juul A, Andersson AM (2022) Exposure to 15 phthalates and two substitutes (DEHTP and DINCH) assessed in trios of infants and their parents as well as longitudinally in infants exclusively breastfed and after the introduction of a mixed diet. *Environ Int* 161:107107.
- Frery N, Santonen T, Porras SP, Fucic A, Leso V, Bousoumah R, Duca RC, El Yamani M, Kolossa-Gehring M, Ndaw S, Viegas S, Iavicoli I (2020) Biomonitoring of occupational exposure to phthalates: A systematic review. *Int J Hyg Environ Health* 229:113548.
- Fromme H, Gruber L, Seckin E, Raab U, Zimmermann S, Kiranoglu M, Schlummer M, Schwegler U, Smolic S, Volkel W (2011) Phthalates and their metabolites in breast milk--results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environ Int* 37(4):715-722.
- Fromme H, Schutze A, Lahrz T, Kraft M, Fembacher L, Siewering S, Burkardt R, Dietrich S, Koch HM, Volkel W (2016) Non-phthalate plasticizers in German daycare centers and human

- biomonitoring of DINCH metabolites in children attending the centers (LUPE 3). *Int J Hyg Environ Health* 219(1):33-39.
- Fu X, Han H, Li Y, Xu B, Dai W, Zhang Y, Zhou F, Ma H, Pei X (2021) Di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure induces female reproductive toxicity and alters the intestinal microbiota community structure and fecal metabolite profile in mice. *Environmental Toxicology* 36(6):1226-1242.
- Fu Z, Zhao F, Chen K, Xu J, Li P, Xia D, Wu Y (2017) Association between urinary phthalate metabolites and risk of breast cancer and uterine leiomyoma. *Reproductive Toxicology* 74:134-142.
- Fuentes N & Silveyra P (2019) Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 116:135-170.
- Gao CJ & Kannan K (2020) Phthalates, bisphenols, parabens, and triclocarban in feminine hygiene products from the United States and their implications for human exposure. *Environ Int* 136:105465.
- Garcia-Fabila MM, Chavez AA, Meza JCS, Montes LPB, Garcia AR (2020) Phthalates in the diet of Mexican children of school age. Risk analysis. *Toxicol Rep* 7:1487-1494.
- Garg D, Ng SSM, Baig KM, Driggers P, Segars J (2017) Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol Metab* 28(9):656-668.
- Gaston SA, James-Todd T, Harmon Q, Taylor KW, Baird D, Jackson CL (2020) Chemical/straightening and other hair product usage during childhood, adolescence, and adulthood among African-American women: potential implications for health. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 30(1):86-96.
- Genuis SJ, Beeson S, Lobo RA, Birkholz D (2012) Human elimination of phthalate compounds: blood, urine, and sweat (BUS) study. *ScientificWorldJournal* 2012:615068.
- Gimble JM, Pighetti GM, Lerner MR, Wu X, Lightfoot SA, Brackett DJ, Darcy K, Hollingsworth AB (1998) Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor mRNA in Normal and Tumorigenic Rodent Mammary Glands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253(3):813-817.
- Ginsberg G, Ginsberg J, Foos B (2016) Approaches to Children's Exposure Assessment: Case Study with Diethylhexylphthalate (DEHP). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13(7).
- Giovanoulis G, Alves A, Papadopoulou E, Cousins AP, Schutze A, Koch HM, Haug LS, Covaci A, Magner J, Voorspoels S (2016a) Evaluation of exposure to phthalate esters and DINCH

- in urine and nails from a Norwegian study population. *Environmental Research* 151:80-90.
- Giovanoulis G, Alves A, Papadopoulou E, Cousins AP, Schutze A, Koch HM, Haug LS, Covaci A, Magner J, Voorspoels S (2016b) Evaluation of exposure to phthalate esters and DINCH in urine and nails from a Norwegian study population. *Environ Res* 151:80-90.
- Giovanoulis G, Bui T, Xu F, Papadopoulou E, Padilla-Sanchez JA, Covaci A, Haug LS, Cousins AP, Magner J, Cousins IT, de Wit CA (2018a) Multi-pathway human exposure assessment of phthalate esters and DINCH. *Environment International* 112:115-126.
- Giovanoulis G, Bui T, Xu F, Papadopoulou E, Padilla-Sanchez JA, Covaci A, Haug LS, Cousins AP, Magner J, Cousins IT, de Wit CA (2018b) Multi-pathway human exposure assessment of phthalate esters and DINCH. *Environment International* 112:115-126.
- Gkrillas A, Dirven H, Papadopoulou E, Andreassen M, Hjertholm H, Husoy T (2021) Exposure estimates of phthalates and DINCH from foods and personal care products in comparison with biomonitoring data in 24-hour urine from the Norwegian EuroMix biomonitoring study. *Environ Int* 155:106598.
- Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA (2009) Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of Lipid Research* 50 Suppl:S86-90.
- Gomez-Roig MD, Pascal R, Cahuana MJ, Garcia-Algar O, Sebastiani G, Andreu-Fernandez V, Martinez L, Rodriguez G, Iglesia I, Ortiz-Arrabal O, Mesa MD, Cabero MJ, Guerra L, Llurba E, Dominguez C, Zanini MJ, Foraster M, Larque E, Cabanas F, Lopez-Azorin M, Perez A, Loureiro B, Pallas-Alonso CR, Escuder-Vieco D, Vento M (2021) Environmental Exposure during Pregnancy: Influence on Prenatal Development and Early Life: A Comprehensive Review. *Fetal Diagnosis and Therapy* 48(4):245-257.
- Gouesse RJ, Dianati E, McDermott A, Wade MG, Hales B, Robaire B, Plante I (2021) In Utero and lactational exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants induces a premature development of the mammary glands. *Toxicological Sciences* 179(2):206-219.
- Gouvernement du Canada (2012) Règlement sur certaines substances toxiques interdites.).
- Gouvernement du Canada (2021) Évaluation de la mesure de la performance pour la gestion des risques du phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP) – volet santé.).
- Gouvernement of Canada & Canadian cancer society (2016) *Canadian Cancer Statistics*. p
- Graham DJ & Clarke CL (1997) Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine Reviews* 18(4):502-519.

- Graham JD, Mote PA, Salagame U, van Dijk JH, Balleine RL, Huschtscha LI, Reddel RR, Clarke CL (2009) DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast. *Endocrinology* 150(7):3318-3326.
- Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, Chahoud I (2007) A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology* 229(1-2):114-122.
- Gray JM, Rasanayagam S, Engel C, Rizzo J (2017) State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ Health* 16(1):94.
- Gray LE, Jr., Barlow NJ, Howdeshell KL, Ostby JS, Furr JR, Gray CL (2009) Transgenerational effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in the male CRL:CD(SD) rat: added value of assessing multiple offspring per litter. *Toxicological Sciences* 110(2):411-425.
- Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP (2016) Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *Journal of Molecular Biology* 428(19):3831-3849.
- Grygiel-Górniak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal* 13(17):10.
- Guru A, Issac PK, Velayutham M, Saraswathi NT, Arshad A, Arockiaraj J (2021) Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds. *Molecular Biology Reports* 48(1):743-761.
- Gyamfi D, Ofori Awuah E, Owusu S (2019) Lipid Metabolism. *The Molecular Nutrition of Fats*, 10.1016/b978-0-12-811297-7.00002-0. p 17-32.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
- Hannon PR, Brannick KE, Wang W, Gupta RK, Flaws JA (2015) Di(2-ethylhexyl) phthalate inhibits antral follicle growth, induces atresia, and inhibits steroid hormone production in cultured mouse antral follicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 284(1):42-53.
- Hao C, Cheng X, Guo J, Xia H, Ma X (2013) Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice. *Frontiers in Bioscience, Elite*(5):725-733.
- Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X (2012) The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Bioscience Reports* 32(6):619-629.
- Hao X, Guan X, Zhao X, Ji M, Wen X, Chen P, Chen F, Yang J, Lian Q, Ye L, Chen H (2021) Phthalate inhibits Leydig cell differentiation and promotes adipocyte differentiation. *Chemosphere* 262:127855.

- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019) Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5(1):66.
- Hardie DG (2014) AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annual Review of Nutrition* 34:31-55.
- Harley KG, Berger K, Rauch S, Kogut K, Claus Henn B, Calafat AM, Huen K, Eskenazi B, Holland N (2017) Association of prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and childhood BMI and obesity. *Pediatric Research* 82(3):405-415.
- Hart LB, Dziobak MK, Pisarski EC, Wirth EF, Wells RS (2020) Sentinels of synthetics - a comparison of phthalate exposure between common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and human reference populations. *PloS One* 15(10):e0240506.
- Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Qi C, Peters JM, Gonzalez FJ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK (1999) Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 274(27):19228-19236.
- 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.
- Hassiotou F & Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy* 26(1):29-48.
- Haugen AC, Schug TT, Collman G, Heindel JJ (2015) Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 6(2):55-64.
- Hayashi M, Iwashita M, Nishimura Y, Shinjo T, Sano T, Yamashita A, Fukuda T, Sanui T, Asano T, Nishimura F (2021) Adipose-specific C-C motif chemokine ligand (CCL) 19 overexpression drives the mice to both insulin resistance and weight gain. *BMJ Open Diabetes Res Care* 9(1).
- Hayashi Y, Ito Y, Naito H, Tamada H, Yamagishi N, Kondo T, Ishikawa T, Gonzalez FJ, Nakajima T (2019) In utero exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate suppresses blood glucose and leptin levels in the offspring of wild-type mice. *Toxicology* 415:49-55.
- Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E (2021) PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Frontiers in Endocrinology* 12:624112.

- Hilton HN, Graham JD, Clarke CL (2015) Minireview: Progesterone Regulation of Proliferation in the Normal Human Breast and in Breast Cancer: A Tale of Two Scenarios? *Molecular Endocrinology* 29(9):1230-1242.
- Hines CJ, Hopf NB, Deddens JA, Silva MJ, Calafat AM (2011) Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 21(2):133-141.
- Hlisnikova H, Petrovicova I, Kolena B, Sidlovska M, Sirotkin A (2020) Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(18):1-37.
- Hogberg J, Hanberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, Filipsson AF, Jansson B, Johansson N, Appelgren M, Hakansson H (2008) Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environmental Health Perspectives* 116(3):334-339.
- Holliday DL & Speirs V (2011) Crossing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 13(4):215-221.
- Hon JDC, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, Deng F-m, Zhang DY, Monaco ME, Lee P (2016) Breast cancer molecular subtypes : from TNBC to QNBC. *American Journal of Cancer Research* 6(9):1864-1872.
- Hopf NB, Berthet A, Vernez D, Langard E, Spring P, Gaudin R (2014) Skin permeation and metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Toxicology Letters* 224(1):47-53.
- Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SAW (2004) Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-Rich Tumors Have Poorer Disease-Free Survival Rates. *Clinical Cancer Research* 10:2751-2760.
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444(7121):860-867.
- Hou JW, Lin CL, Tsai YA, Chang CH, Liao KW, Yu CJ, Yang W, Lee MJ, Huang PC, Sun CW, Wang YH, Lin FR, Wu WC, Lee MC, Pan WH, Chen BH, Wu MT, Chen CC, Wang SL, Lee CC, Hsiung CA, Chen ML (2015) The effects of phthalate and nonylphenol exposure on body size and secondary sexual characteristics during puberty. *Int J Hyg Environ Health* 218(7):603-615.
- 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, 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.

- Howard BA & Gusterson BA (2000) Human Breast Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5:119-137.
- Hoy AJ, Balaban S, Saunders DN (2017) Adipocyte-Tumor Cell Metabolic Crosstalk in Breast Cancer. *Trends in Molecular Medicine* 23(5):381-392.
- Hsieh TH, Hsu CY, Yang PJ, Chiu CC, Liang SS, Ou-Yang F, Kan JY, Hou MF, Wang TN, Tsai EM (2022) DEHP mediates drug resistance by directly targeting AhR in human breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 145:112400.
- Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP (2002) Leptin—A Growth Factor in Normal and Malignant Breast Cells and for Normal Mammary Gland Development. *Journal of the National Cancer Institute* 94(22):1704-1711.
- Huang S, Qi Z, Ma S, Li G, Long C, Yu Y (2021) A critical review on human internal exposure of phthalate metabolites and the associated health risks. *Environmental Pollution* 279:1-14.
- Humphreys RC, Lydon J, O'Malley BW, Rosen JM (1997) Mammary Gland Development Is Mediated by Both Stromal and Epithelial Progesterone Receptors. *Molecular Endocrinology* 11(6):801-811.
- Hung SC, Lin TI, Suen JL, Liu HK, Wu PL, Wu CY, Yang YSH, Yang SN, Yang YN (2021) Phthalate Exposure Pattern in Breast Milk within a Six-Month Postpartum Time in Southern Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(11).
- Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ (2015) Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142(6):1028-1042.
- Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, Asamoto M, Shirai T (1995) Concepts in multistage carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 21:105-133.
- Ito Y, Kamijima M, Hasegawa C, Tagawa M, Kawai T, Miyake M, Hayashi Y, Naito H, Nakajima T (2014) Species and inter-individual differences in metabolic capacity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) between human and mouse livers. *Environmental Health and Preventive Medicine* 19(2):117-125.
- Ito Y, Yokota H, Wang R, Yamanoshita O, Ichihara G, Wang H, Kurata Y, Takagi K, Nakajima T (2005) Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Archives of Toxicology* 79(3):147-154.
- Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, Pestell RG, Scherer PE (2003) Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-

- apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* 22(41):6408-6423.
- Jaeger RJ & Rubin RJ (1970) Plasticizers from Plastic Devices: Extraction, Metabolism, and Accumulation by Biological Systems. *Science* 170(3956).
- James-Todd T, Ponzano M, Bellavia A, Williams PL, Cantonwine DE, Calafat AM, Hauser R, Quinn MR, Seely EW, McElrath TF (2022) Urinary phthalate and DINCH metabolite concentrations and gradations of maternal glucose intolerance. *Environment International* 161:107099.
- Janani C & Ranjitha Kumari BD (2015) PPAR gamma gene--a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome* 9(1):46-50.
- Javed A & Lteif A (2013) Development of the human breast. *Seminars in Plastic Surgery* 27(1):5-12.
- Jazwiec PA & Sloboda DM (2019) Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *Journal of Endocrinology* 242(1):T51-T68.
- Jenkins R, Ondusko D, Montrose L, Forbush R, Rozansky D (2021) Phthalate Exposures in the Neonatal Intensive Care Unit. *Toxics* 9(5):1-16.
- Jiang G, Zhang S, Yazdanparast A, Li M, Pawar AV, Liu Y, Inavolu SM, Cheng L (2016) Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC Genomics* 17 Suppl 7:525.
- John K, Divi RL, Keshava C, Orozco CC, Schockley ME, Richardson DL, Poirier MC, Nath J, Weston A (2010) CYP1A1 and CYP1B1 gene expression and DNA adduct formation in normal human mammary epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene in the absence or presence of chlorophyllin. *Cancer Letters* 292(2):254-260.
- Johns LE, Ferguson KK, Soldin OP, Cantonwine DE, Rivera-Gonzalez LO, Del Toro LV, Calafat AM, Ye X, Alshawabkeh AN, Cordero JF, Meeker JD (2015) Urinary phthalate metabolites in relation to maternal serum thyroid and sex hormone levels during pregnancy: a longitudinal analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 13:4.
- 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.
- Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L (2020) Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8(8):703-718.
- Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 112(12):1776-1784.

- Kambia N, Farce A, Belarbi K, Gressier B, Luyckx M, Chavatte P, Dine T (2016) Docking study: PPARs interaction with the selected alternative plasticizers to di(2-ethylhexyl) phthalate. *J Enzyme Inhib Med Chem* 31(3):448-455.
- Kamikawa A, Ichii O, Yamaji D, Imao T, Suzuki C, Okamoto-Ogura Y, Terao A, Kon Y, Kimura K (2009) Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Developmental Dynamics* 238(5):1092-1099.
- Kang Y, Hengbo S, Jun L, Jun L, Wangsheng Z, Huibin T, Huaiping S (2015) PPARG modulated lipid accumulation in dairy GMEC via regulation of ADRP gene. *Journal of Cellular Biochemistry* 116(1):192-201.
- Kannan A, Davila J, Gao L, Rattan S, Flaws JA, Bagchi MK, Bagchi IC (2021) Maternal high-fat diet during pregnancy with concurrent phthalate exposure leads to abnormal placentation. *Scientific Reports* 11(1):16602.
- Kapfenstein O, Vieth B, Luch A, Pfaff K (2012) Toxicologically relevant phthalates in food. *Exp Suppl* 101:87-106.
- Kasper-Sonnenberg M, Koch HM, Apel P, Ruther M, Palmke C, Bruning T, Kolossa-Gehring M (2019a) Time trend of exposure to the phthalate plasticizer substitute DINCH in Germany from 1999 to 2017: Biomonitoring data on young adults from the Environmental Specimen Bank (ESB). *Int J Hyg Environ Health* 222(8):1084-1092.
- Kasper-Sonnenberg M, Koch HM, Apel P, Ruther M, Palmke C, Bruning T, Kolossa-Gehring M (2019b) Time trend of exposure to the phthalate plasticizer substitute DINCH in Germany from 1999 to 2017: Biomonitoring data on young adults from the Environmental Specimen Bank (ESB). *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222(8):1084-1092.
- Kastner J, Cooper DG, Maric M, Dodd P, Yargeau V (2012) Aqueous leaching of di-2-ethylhexyl phthalate and "green" plasticizers from poly(vinyl chloride). *Sci Total Environ* 432:357-364.
- Kawai M, Namba N, Mushiake S, Etani Y, Nishimura R, Makishima M, Ozono K (2007) Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *Journal of Molecular Endocrinology* 38(1-2):19-34.
- Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y (2019) The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 20(13).
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM (1993) Reproductive Factors and Breast Cancer. *Epidemiologic Reviews* 15(1):36-47.

- Kennett JE & McKee DT (2012) Oxytocin: an emerging regulator of prolactin secretion in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology* 24(3):403-412.
- Keresztes S, Tatar E, Czegeny Z, Zaray G, Mihucz VG (2013) Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water. *Sci Total Environ* 458-460:451-458.
- Kessler W, Numtip W, Volkel W, Seckin E, Csanady GA, Putz C, Klein D, Fromme H, Filser JG (2012) Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood and of DEHP metabolites in urine of male volunteers after single ingestion of ring-deuterated DEHP. *Toxicol Appl Pharmacol* 264(2):284-291.
- Kilgore MW, Tate PL, Rai S, Sengoku E, Price TM (1997) MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response. *Molecular and Cellular Endocrinology* 129:229-235.
- Kim IY, Han SY, Moon A (2004) Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 67(23-24):2025-2035.
- Kim JH, Park H, Lee J, Cho G, Choi S, Choi G, Kim SY, Eun SH, Suh E, Kim SK, Kim HJ, Kim GH, Lee JJ, Kim YD, Eom S, Kim S, Moon HB, Park J, Choi K, Kim S, Kim S (2016) Association of diethylhexyl phthalate with obesity-related markers and body mass change from birth to 3 months of age. *J Epidemiol Community Health* 70(5):466-472.
- Kim JH, Shin HS, Lee WH (2021) Impact of Endocrine-Disrupting Chemicals in Breast Milk on Postpartum Depression in Korean Mothers. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(9).
- Kim MK, Kim KB, Yoon S, Kim HS, Lee BM (2020) Risk assessment of unintentional phthalates contaminants in cosmetics. *Regul Toxicol Pharmacol* 115:104687.
- Kim S, Eom S, Kim HJ, Lee JJ, Choi G, Choi S, Kim S, Kim SY, Cho G, Kim YD, Suh E, Kim SK, Kim S, Kim GH, Moon HB, Park J, Kim S, Choi K, Eun SH (2018) Association between maternal exposure to major phthalates, heavy metals, and persistent organic pollutants, and the neurodevelopmental performances of their children at 1 to 2 years of age- CHECK cohort study. *Sci Total Environ* 624:377-384.
- Kim S, Lee J, Park J, Kim HJ, Cho G, Kim GH, Eun SH, Lee JJ, Choi G, Suh E, Choi S, Kim S, Kim YD, Kim SK, Kim SY, Kim S, Eom S, Moon HB, Kim S, Choi K (2015) Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. *Sci Total Environ* 508:13-19.

- Kim YH, Kim SH, Lee HW, Chae HD, Kim CH, Kang BM (2010) Increased viability of endometrial cells by in vitro treatment with di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Fertility and Sterility* 94(6):2413-2416.
- Klaunig JE (2020) *Chapter 8 - Carcinogenesis*. Elsevier, From Molecules to Man
- Kloting N, Hesselbarth N, Gericke M, Kunath A, Biemann R, Chakaroun R, Kosacka J, Kovacs P, Kern M, Stumvoll M, Fischer B, Rolle-Kampczyk U, Feltens R, Otto W, Wissenbach DK, von Bergen M, Bluher M (2015) Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) Causes Impaired Adipocyte Function and Alters Serum Metabolites. *PLoS ONE* 10(12):e0143190.
- Knight CH & Peaker M (1982) Development of the mammary gland. *Journal of Reproduction and Fertility* 65:521-536.
- Knutson TP, Truong TH, Ma S, Brady NJ, Sullivan ME, Raj G, Schwertfeger KL, Lange CA (2017) Posttranslationally modified progesterone receptors direct ligand-specific expression of breast cancer stem cell-associated gene programs. *Journal of Hematology & Oncology* 10(1):1-24.
- Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J (2005) New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Archives of Toxicology* 79(7):367-376.
- Koch HM, Preuss R, Angerer J (2006a) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *International Journal of Andrology* 29(1):155-165.
- Koch HM, Preuss R, Angerer J (2006b) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* 29(1):155-165; discussion 181-155.
- Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J (2003) Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environmental Research* 93(2):177-185.
- Koch HM, Schutze A, Palmke C, Angerer J, Bruning T (2013) Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH((R))) in humans after single oral doses. *Archives of Toxicology* 87(5):799-806.
- Komen SG (2015) *Molecular Subtypes of Breast Cancer*. <https://www.komen.org/breast-cancer/diagnosis/molecular-subtypes/>
- Koniecki D, Wang R, Moody RP, Zhu J (2011) Phthalates in cosmetic and personal care products: concentrations and possible dermal exposure. *Environmental Research* 111(3):329-336.

- Koo HJ & Lee BM (2007) Toxicokinetic relationship between di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 70(5):383-387.
- Kougioumtzi A, Tsaparas P, Magklara A (2014) Deep sequencing reveals new aspects of progesterone receptor signaling in breast cancer cells. *PLoS One* 9(6):e98404.
- Kratochvil I, Hofmann T, Rother S, Schlichting R, Moretti R, Scharnweber D, Hintze V, Escher BI, Meiler J, Kalkhof S, von Bergen M (2019) Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP) but not di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) bind productively to the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 33 Suppl 1:75-85.
- Kumar P & Aggarwal R (2016) An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 293(2):247-269.
- Kurata Y, Makinodon F, Shimamura N, Katoh M (2012) Metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): comparative study in juvenile and fetal marmosets and rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 37(1):33-49.
- La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, Guyton KZ, Kortenkamp A, Cogliano VJ, Woodruff TJ, Rieswijk L, Sone H, Korach KS, Gore AC, Zeise L, Zoeller RT (2020) Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews: Endocrinology* 16(1):45-57.
- Lacouture A, Lafront C, Peillex C, Pelletier M, Audet-Walsh E (2022) Impacts of endocrine-disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environmental Research* 204(Pt B):112085.
- 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* 14:13.
- Lagerberg JW, Gouwerok E, Vlaar R, Go M, de Korte D (2015) In vitro evaluation of the quality of blood products collected and stored in systems completely free of di(2-ethylhexyl)phthalate-plasticized materials. *Transfusion* 55(3):522-531.
- Lai FN, Liu JC, Li L, Ma JY, Liu XL, Liu YP, Zhang XF, Chen H, De Felici M, Dyce PW, Shen W (2017) Di (2-ethylhexyl) phthalate impairs steroidogenesis in ovarian follicular cells of prepuberal mice. *Archives of Toxicology* 91(3):1279-1292.

- Landskroner-Eiger S, Park J, Israel D, Pollard JW, Scherer PE (2010) Morphogenesis of the developing mammary gland: stage-dependent impact of adipocytes. *Developmental Biology* 344(2):968-978.
- Langsch A, David RM, Schneider S, Sperber S, Haake V, Kamp H, Leibold E, Ravenzwaay BV, Otter R (2018) Hexamoll((R)) DINCH: Lack of in vivo evidence for obesogenic properties. *Toxicology Letters* 288:99-110.
- Lanoix D, Lacasse AA, St-Pierre J, Taylor SC, Ethier-Chiasson M, Lafond J, Vaillancourt C (2012) Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta. *Molecular Biotechnology* 52(3):234-243.
- Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 111(14):1783-1785.
- Latini G, Wittassek M, Del Vecchio A, Presta G, De Felice C, Angerer J (2009) Lactational exposure to phthalates in Southern Italy. *Environ Int* 35(2):236-239.
- Lawson-Wood K (2016) *Quantification of Phthalate Leaching from Food Contact Materials by GC/MS*. PerkinElmer, Inc. 1-6 p
- Lee G, Kim S, Kho Y, Kim S, Lee S, Choi G, Park J, Worakhunpiset S, Moon HB, Okanurak K, Geounupakul M, Tangtitawong J, Wetsutthanon K, Trisurat D, Choi K (2020) Urinary levels of phthalates and DINCH metabolites in Korean and Thai pregnant women across three trimesters. *Sci Total Environ* 711:134822.
- Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK (2013) Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 62(1):194-204.
- Lee I, Palmke C, Ringbeck B, Ihn Y, Gotthardt A, Lee G, Alakeel R, Alrashed M, Tosepu R, Jayadipraja EA, Tantrakarnapa K, Kliengchuay W, Kho Y, Koch HM, Choi K (2021) Urinary Concentrations of Major Phthalate and Alternative Plasticizer Metabolites in Children of Thailand, Indonesia, and Saudi Arabia, and Associated Risks. *Environ Sci Technol* 55(24):16526-16537.
- Lee S, Martinez-Arguelles DB, Campioli E, Papadopoulos V (2017) Fetal Exposure to Low Levels of the Plasticizer DEHP Predisposes the Adult Male Adrenal Gland to Endocrine Disruption. *Endocrinology* 158(2):304-318.
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ, Jr., Liu XS, Lazar MA (2008) PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22(21):2941-2952.

- Lehmann BD, Jovanovic B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA (2016) Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 11(6):e0157368.
- Leng J, Li H, Niu Y, Chen K, Yuan X, Chen H, Fu Z, Zhang L, Wang F, Chen C, Heroux P, Yang J, Zhu X, Lu W, Xia D, Wu Y (2021) Low-dose mono(2-ethylhexyl) phthalate promotes ovarian cancer development through PPAR α -dependent PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Sci Total Environ* 790:147990.
- Levacher C, Sztalryd C, Kinebanyan M-F, Picon L (1984) Effects of thyroid hormones on adipose tissue development in Sherman and Zucker rats. *The American Physiological Society* 246:C50-C56.
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B (2019) Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med* 26(1):1-7.
- Li HL, Ma WL, Liu LY, Zhang Z, Sverko E, Zhang ZF, Song WW, Sun Y, Li YF (2019) Phthalates in infant cotton clothing: Occurrence and implications for human exposure. *Sci Total Environ* 683:109-115.
- Li L, Liu JC, Zhao Y, Lai FN, Yang F, Ge W, Dou CL, Shen W, Zhang XF, Chen H (2015) Impact of diethylhexyl phthalate on gene expression and development of mammary glands of pregnant mouse. *Histochemistry and Cell Biology* 144(4):389-402.
- Li N, Liu T, Guo K, Zhu J, Yu G, Wang S, Ye L (2018) Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on proliferation and steroid hormone synthesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 233(4):3629-3637.
- Lichtenstein P, Holm NsV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K (2000) Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine* 343(2):78-85.
- Lin S, Ku HY, Su PH, Chen JW, Huang PC, Angerer J, Wang SL (2011) Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. *Chemosphere* 82(7):947-955.
- Liu F, Gu LN, Shan BE, Geng CZ, Sang MX (2016) Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncology Letters* 12(6):4869-4876.
- Liu K, Cheng L, Flesken-Nikitin A, Huang L, Nikitin AY, Pauli BU (2010) Conditional knockout of fibronectin abrogates mouse mammary gland lobuloalveolar differentiation. *Developmental Biology* 346(1):11-24.

- Loff S, Kabs F, Subotic U, Schaible T, Reinecke F, Langbein M (2002) Kinetics of Diethylhexyl-Phthalate Extraction From Polyvinylchloride-Infusion Lines. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 26(5):305-309.
- Long SE, Kahn LG, Trasande L, Jacobson MH (2021) Urinary phthalate metabolites and alternatives and serum sex steroid hormones among pre- and postmenopausal women from NHANES, 2013-16. *Sci Total Environ* 769:144560.
- Lopez-Carrillo L, Hernandez-Ramirez RU, Calafat AM, Torres-Sanchez L, Galvan-Portillo M, Needham LL, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME (2010) Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. *Environmental Health Perspectives* 118(4):539-544.
- Lopez-Rodriguez D, Aylwin CF, Delli V, Sevrin E, Campanile M, Martin M, Franssen D, Gerard A, Blacher S, Tirelli E, Noel A, Lomniczi A, Parent AS (2021) Multi- and Transgenerational Outcomes of an Exposure to a Mixture of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) on Puberty and Maternal Behavior in the Female Rat. *Environ Health Perspect* 129(8):87003.
- Lounis MA, Lalonde S, Rial SA, Bergeron KF, Ralston JC, Mutch DM, Mounier C (2017) Hepatic BSCL2 (Seipin) Deficiency Disrupts Lipid Droplet Homeostasis and Increases Lipid Metabolism via SCD1 Activity. *Lipids* 52(2):129-150.
- Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ (2011) Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science* 124(Pt 16):2681-2686.
- Lucaccioni L, Trevisani V, Passini E, Righi B, Plessi C, Predieri B, Iughetti L (2021) Perinatal Exposure to Phthalates: From Endocrine to Neurodevelopment Effects. *International Journal of Molecular Sciences* 22(8):1-16.
- Lyons WR (1958) Hormonal synergism in mammary growth. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 149(936):303-325.
- Ma Y, Katiyar P, Jones LP, Fan S, Zhang Y, Furth PA, Rosen EM (2006) The breast cancer susceptibility gene BRCA1 regulates progesterone receptor signaling in mammary epithelial cells. *Molecular Endocrinology* 20(1):14-34.
- Machtinger R, Berman T, Adir M, Mansur A, Baccarelli AA, Racowsky C, Calafat AM, Hauser R, Nahum R (2018) Urinary concentrations of phthalate metabolites, bisphenols and personal care product chemical biomarkers in pregnant women in Israel. *Environ Int* 116:319-325.
- Macias H & Hinck L (2012) Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1(4):533-557.

- Madsen MS, Siersbaek R, Boergesen M, Nielsen R, Mandrup S (2014a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Mol Cell Biol* 34(6):939-954.
- Madsen MS, Siersbaek R, Boergesen M, Nielsen R, Mandrup S (2014b) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Molecular and Cellular Biology* 34(6):939-954.
- Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi AM, Virtanen HE, Petersen DV, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE (2006) Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environmental Health Perspectives* 114(2):270-276.
- Malarvannan G, Onghena M, Verstraete S, van Puffelen E, Jacobs A, Vanhorebeek I, Verbruggen S, Joosten KFM, Van den Berghe G, Jorens PG, Covaci A (2019) Phthalate and alternative plasticizers in indwelling medical devices in pediatric intensive care units. *Journal of Hazardous Materials* 363:64-72.
- Maliniak ML, Miller-Kleinhenz J, Cronin-Fenton DP, Lash TL, Gogineni K, Janssen EAM, McCullough LE (2021) Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue: Early Evidence and Current Issues in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 13(9).
- Mallepell S, Krust A, Chambon P, Briskin C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α 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.
- Mallow EB & Fox MA (2014) Phthalates and critically ill neonates: device-related exposures and non-endocrine toxic risks. *Journal of Perinatology* 34(12):892-897.
- Mangelsdorf DJ & Evans RM (1995) The RXR Hereodimers and Orphan Receptors. *Cell* 83:841-850.
- Manteiga S & Lee K (2017) Monoethylhexyl Phthalate Elicits an Inflammatory Response in Adipocytes Characterized by Alterations in Lipid and Cytokine Pathways. *Environmental Health Perspectives* 125(4):615-622.
- Markarian J (2007) PVC additives – What lies ahead? *Plastics, Additives and Compounding* 9(6):22-25.
- Marlatt VL, Bayen S, Castaneda-Cortès D, Delbès G, Grigorova P, Langlois VS, Martyniuk CJ, Metcalfe CD, Parent L, Rwigemera A, Thomson P, Van Der Kraak G (2022) Impacts of

- endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans. *Environmental Research* 10.1016/j.envres.2021.112584.
- Martinelli MI, Mocchiutti NO, Bernal CA (2006) Dietary di(2-ethylhexyl)phthalate-impaired glucose metabolism in experimental animals. *Human & Experimental Toxicology* 25:531-538.
- Martinelli MI, Mocchiutti NO, Bernal CA (2010) Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on lipolysis and lipoprotein lipase activities in adipose tissue of rats. *Hum Exp Toxicol* 29(9):739-745.
- Martinez-Arguelles DB, Campioli E, Culty M, Zirkin BR, Papadopoulos V (2013) Fetal origin of endocrine dysfunction in the adult: the phthalate model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 137:5-17.
- Martinez-Arguelles DB & Papadopoulos V (2016) Prenatal phthalate exposure: epigenetic changes leading to lifelong impact on steroid formation. *Andrology* 4(4):573-584.
- Martinez-Pomares L, Platt N, McKnight AJ, da Silva RP, Gordon S (1996) Macrophage Membrane Molecules: Markers of Tissue Differentiation and Heterogeneity. *Immunobiology* 195(4-5):407-416.
- Martinez MA, Rovira J, Sharma RP, Schuhmacher M, Kumar V (2020a) Reconstruction of phthalate exposure and DINCH metabolites from biomonitoring data from the EXHES cohort of Tarragona, Spain: A case study on estimated vs reconstructed DEHP using the PBPK model. *Environmental Research* 186:1-10.
- Martinez MA, Rovira J, Sharma RP, Schuhmacher M, Kumar V (2020b) Reconstruction of phthalate exposure and DINCH metabolites from biomonitoring data from the EXHES cohort of Tarragona, Spain: A case study on estimated vs reconstructed DEHP using the PBPK model. *Environ Res* 186:109534.
- Martis L, Freid E, Woods E (1987) Tissue distribution and excretion of tri-(2-ethylhexyl)trimellitate in rats. *J Toxicol Environ Health* 20(4):357-366.
- Maskarinec G & Noh JJ (2004) The Effect of Migration on Cancer Incidence Among Japanese in Hawaii. *Ethnicity & Disease* 14:431-439.
- Masso-Welch PA, Darcy KM, Strangle-Castor NC, Ip MM (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5(2):165-185.
- McCready J, Arendt LM, Glover E, Iyer V, Briendel JL, Lyle SR, Naber SP, Jay DG, Kuperwasser C (2014) Pregnancy-associated breast cancers are driven by differences in adipose stromal cells present during lactation. *Breast Cancer Research* 16(R2):19.

- McGowan E & Clarke CL (1999) Effect of Overexpression of Progesterone Receptor A on Endogenous Progestin-Sensitive Endpoints in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology* 13(10):1658-1671.
- McGowan EM, Saad S, Bendall LJ, Bradstock KF, Clarke CL (2004) Effect of progesterone receptor A predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. *Breast Cancer Research and Treatment* 83:211-220.
- McManaman JL (2014) Lipid transport in the lactating mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 19(1):35-42.
- McNally S & Stein T (2017) Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. *Methods in Molecular Biology* 1501:1-17.
- 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.
- Meeker JD, Calafat AM, Hauser R (2009) Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *Journal of Andrology* 30(3):287-297.
- Meltzer D, Martinez-Arguelles DB, Campioli E, Lee S, Papadopoulos V (2015) In utero exposure to the endocrine disruptor di(2-ethylhexyl) phthalate targets ovarian theca cells and steroidogenesis in the adult female rat. *Reproductive Toxicology* 51:47-56.
- Melzer C, von der Ohe J, Hass R (2017) Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. *Biomed Res Int* 2017:1-11.
- Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD (2001) Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *Journal of Biological Chemistry* 276(20):16649-16654.
- Minguez-Alarcon L, Souter I, Chiu YH, Williams PL, Ford JB, Ye X, Calafat AM, Hauser R, Earth Study T (2016) Urinary concentrations of cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monohydroxy isononyl ester, a metabolite of the non-phthalate plasticizer di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), and markers of ovarian response among women attending a fertility center. *Environmental Research* 151:595-600.
- Moche H, Chentouf A, Neves S, Corpart JM, Nesslany F (2021) Comparison of In Vitro Endocrine Activity of Phthalates and Alternative Plasticizers. *Journal of Toxicology* 2021:1-14.
- Monneret C (2017) What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies* 340(9-10):403-405.
- Montuori P, Jover E, Morgantini M, Bayona JM, Triassi M (2008) Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate

- and glass bottles. *Food Additives & Contaminants. Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 25(4):511-518.
- Mortensen GK, Main KM, Andersson AM, Leffers H, Skakkebaek NE (2005) Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem* 382(4):1084-1092.
- Mose T, Mortensen GK, Hedegaard M, Knudsen LE (2007) Phthalate monoesters in perfusate from a dual placenta perfusion system, the placenta tissue and umbilical cord blood. *Reproductive Toxicology* 23(1):83-91.
- Mota AL, Evangelista AF, Macedo T, Oliveira R, Scapulatempo-Neto C, Vieira RA, Marques MMC (2017) Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncology Letters* 13(6):4708-4712.
- Mote PA, Arnett-Mansfield RL, Gava N, deFazio A, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Clarke CL (2006) Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. *Endocrinology* 147(12):5503-5512.
- Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL (2002) Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* 72:163-172.
- Moyer B & Hixon ML (2012) Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). *Reproductive Toxicology* 34(1):43-50.
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Martin J, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM (1998) Terminal Differentiation of Human Breast Cancer through PPAR γ . *Molecular Cell* 1:465-470
- Mukhopadhyay M, Jalal M, Vignesh G, Ziauddin M, Sampath S, Bharat GK, Nizzetto L, Chakraborty P (2022) Migration of Plasticizers from Polyethylene Terephthalate and Low-Density Polyethylene Casing into Bottled Water: A Case Study From India. *Bull Environ Contam Toxicol* 10.1007/s00128-022-03474-x:1-7.
- Mutt SJ, Hypponen E, Saarnio J, Jarvelin MR, Herzig KH (2014) Vitamin D and adipose tissue—more than storage. *Frontiers in Physiology* 5:228.
- Myers JA (1917) Studies on the mammary gland. II. The fetal development of the mammary gland in the female albino rat. *The American journal of anatomy* 22:195-223.
- Nair AB & Jacob S (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7(2):27-31.

- Nakagawa H, Hayata Y, Kawamura S, Yamada T, Fujiwara N, Koike K (2018) Lipid Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* 10(11):1-14.
- Nardelli TC, Albert O, Lalancette C, Culty M, Hales BF, Robaire B (2017) In Utero and Lactational Exposure Study in Rats to Identify Replacements for Di(2-ethylhexyl) Phthalate. *Scientific Reports* 7(1):1-13.
- Nardelli TC, Erythropel HC, Robaire B (2015a) Toxicogenomic Screening of Replacements for Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Using the Immortalized TM4 Sertoli Cell Line. *PLoS ONE* 10(10):e0138421.
- Nardelli TC, Erythropel HC, Robaire B (2015b) Toxicogenomic Screening of Replacements for Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Using the Immortalized TM4 Sertoli Cell Line. *PloS One* 10(10):1-17.
- Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, Nazario AC (2005) Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Research* 7(3):R306-313.
- Nelson LR & Bulun SE (2001) Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(3 Suppl):S116-124.
- Nerger BA & Nelson CM (2019) 3D culture models for studying branching morphogenesis in the mammary gland and mammalian lung. *Biomaterials* 198:135-145.
- Neville MC, McFadden TB, Forsyth I (2002) Hormonal Regulation of Mammary Differentiation and Milk Secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 8(1):49-66.
- Neville MC, Medina D, Monks J, Hovey RC (1998) The Mammary Fat Pad. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3(2):109-116.
- Niermann S, Rattan S, Brehm E, Flaws JA (2015) Prenatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) affects reproductive outcomes in female mice. *Reproductive Toxicology* 53:23-32.
- Noyola-Martinez N, Halhali A, Barrera D (2019) Steroid hormones and pregnancy. *Gynecological Endocrinology* 35(5):376-384.
- Obr AE & Edwards DP (2012) The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 357(1-2):4-17.
- OMS (2022) Cancer. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=Le%20mot%20%C2%AB%20cancer%20%C2%BB%20est%20un,tumeurs%20malignes%20ou%20de%20n%C3%A9oplasmes>.

- Otter R (2016) Letter to the editor against the publication "Cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid diisononyl ester and metabolite effects on rat epididymal stromal vascular fraction differentiation of adipose tissue" by Enrico Campioli, Tam B. Duong, Francois Deschamps, Vassilios Papadopoulos, *Environmental Research* 140 (2015), 145-156, merits some critical comments. *Environmental Research* 144(Pt A):165-166.
- 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.
- Paiva R, Wrona M, Nerin C, Bertochi Veroneze I, Gavril GL, Andrea Cruz S (2021) Importance of profile of volatile and off-odors compounds from different recycled polypropylene used for food applications. *Food Chemistry* 350:1-7.
- 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.
- Papadaki I, Mylona E, Giannopoulou I, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L (2005) PPARgamma expression in breast cancer: clinical value and correlation with ERbeta. *Histopathology* 46(1):37-42.
- Parada H, Jr., Gammon MD, Chen J, Calafat AM, Neugut AI, Santella RM, Wolff MS, Teitelbaum SL (2018) Urinary Phthalate Metabolite Concentrations and Breast Cancer Incidence and Survival following Breast Cancer: The Long Island Breast Cancer Study Project. *Environmental Health Perspectives* 126(4):047013.
- Park CJ, Barakat R, Ulanov A, Li Z, Lin PC, Chiu K, Zhou S, Perez P, Lee J, Flaws J, Ko CJ (2019) Sanitary pads and diapers contain higher phthalate contents than those in common commercial plastic products. *Reproductive Toxicology* 84:114-121.
- Park J & Schwarzbauer JE (2014) Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33(13):1649-1657.
- Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE, Jr. (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58(2):339-349.
- Patton S & Jensen R (1975) Lipid Metabolism and Membrane Functions of the Mammary Gland. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 14:163-277.
- Paulose T, Speroni L, Sonnenschein C, Soto AM (2015) Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reproductive Toxicology* 54:58-65.
- Pfeifer GP (2015) How the environment shapes cancer genomes. *Current Opinion in Oncology* 27(1):71-77.

- Philippat C, Rolland M, Lyon-Caen S, Pin I, Sakhi AK, Sabaredzovic A, Thomsen C, Slama R (2021) Pre- and early post-natal exposure to phthalates and DINCH in a new type of mother-child cohort relying on within-subject pools of repeated urine samples. *Environ Pollut* 287:1-8.
- Pinguet J, Kerckhove N, Eljezi T, Lambert C, Moreau E, Bernard L, Boeuf B, Decaudin B, Genay S, Masse M, Storme L, Sautou V, Richard D, Group AS (2019) New SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous determination in urine of 22 metabolites of DEHP and alternative plasticizers from PVC medical devices. *Talanta* 198:377-389.
- 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, Winn LM, Vaillancourt C, Grigorova P, Parent L (2022) Killing two birds with one stone: Pregnancy is a sensitive window for endocrine effects on both the mother and the fetus. *Environmental Research* 205:1-23.
- Plichta V, Volkel W, Fembacher L, Spolders M, Wockner M, Aschenbrenner B, Schafft H, Fromme H (2019) Bioavailability of phthalate and DINCH(R) plasticizers, after oral administration of dust to piglets. *Toxicology Letters* 314:82-88.
- Plichta V, Volkel W, Fembacher L, Wockner M, Nowak D, Fromme H (2022) The oral bioavailability of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), di-isononyl phthalate (DiNP) and di-(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH(R)) in house dust. *Toxicology Letters* 355:82-87.
- Pocar P, Fiandanese N, Berrini A, Secchi C, Borromeo V (2017a) Maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) promotes the transgenerational inheritance of adult-onset reproductive dysfunctions through the female germline in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 322:113-121.
- Pocar P, Fiandanese N, Berrini A, Secchi C, Borromeo V (2017b) Maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) promotes the transgenerational inheritance of adult-onset reproductive dysfunctions through the female germline in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 322:113-121.
- Polyak K (2007) Breast cancer: origins and evolution. *Journal of Clinical Investigation* 117(11):3155-3163.
- Postic C & Girard J (2008) Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *Journal of Clinical Investigation* 118(3):829-838.

- Prat A & Perou CM (2009) Mammary development meets cancer genomics. *Nature Medicine* 15(8):842-844.
- Propper AY, Howard BA, Veltmaat JM (2013) Prenatal morphogenesis of mammary glands in mouse and rabbit. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 18(2):93-104.
- Qi W, Zhou L, Zhao T, Ding S, Xu Q, Han X, Zhao Y, Song X, Zhao T, Zhang X, Ye L (2019) Effect of the TYK-2/STAT-3 pathway on lipid accumulation induced by mono-2-ethylhexyl phthalate. *Mol Cell Endocrinol* 484:52-58.
- Quintana-Belmares RO, Kraus AM, Esfahani BK, Rosas-Perez I, Mucs D, Lopez-Marure R, Bergman A, Alfaro-Moreno E (2018) Phthalate esters on urban airborne particles: Levels in PM10 and PM2.5 from Mexico City and theoretical assessment of lung exposure. *Environmental Research* 161:439-445.
- Radke EG, Glenn BS, Braun JM, Cooper GS (2019) Phthalate exposure and female reproductive and developmental outcomes: a systematic review of the human epidemiological evidence. *Environ Int* 130:104580.
- Rahman M & Brazel C (2004) The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science* 29(12):1223-1248.
- Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, Selvaraj J, Balasubramanian K (2013) Phthalate is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: role of antioxidant vitamins. *J Cell Biochem* 114(3):558-569.
- Ralston JC, Badoud F, Cattysse B, McNicholas PD, Mutch DM (2014) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes upregulates elongase 6 and downregulates genes affecting triacylglycerol synthesis. *International Journal of Obesity (2005)* 38(11):1449-1456.
- Reed JR & Schwertfeger KL (2010) Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15(3):329-339.
- Repouskou A, Stamatakis A, Kitraki E (2021) In utero exposure to phthalates and reproductive toxicity in rodents. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism* 35(5):1-11.
- Rezaei R, Wu Z, Hou Y, Bazer FW, Wu G (2016) Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. *J Anim Sci Biotechnol* 7:1-22.

- Roberts LD, Murray AJ, Menassa D, Ashmore T, Nicholls AW, Griffin JL (2011) The contrasting roles of PPAR δ and PPAR γ in regulating the metabolic switch between oxidation and storage of fats in white adipose tissue. *Genome Biology* 12:1-19.
- Rochefort H (2017) Endocrine disruptors (EDs) and hormone-dependent cancers: Correlation or causal relationship? *C R Biol* 340(9-10):439-445.
- 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.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002) C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 16(1):22-26.
- Routti H, Harju M, Luhmann K, Aars J, Ask A, Goksoyr A, Kovacs KM, Lydersen C (2021) Concentrations and endocrine disruptive potential of phthalates in marine mammals from the Norwegian Arctic. *Environ Int* 152:1-10.
- Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertility and Sterility* 78(6):1187-1194.
- 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.
- Russo IH, Medado J, Russo J (1989) Endocrine influence on the mammary gland. *Integument and mammary glands*, .Jones TC, Mohr I, Hunt RD (Édit.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Monographs on Pathology of Laboratory Animals.
- Sakakura T, Kusano I, Kusakabe M, Inaguma Y, Nishizuka Y (1987) Biology of mammary fat pad in fetal mouse: capacity to support development of various fetal epithelia in vivo. *Development* 100:421-430.
- Sakakura T, Sakagami Y, Nishizuka Y (1982) Dual Origin of Mesenchymal Tissues Participating in Mouse Mammary Gland Embryogenesis. *Development biology* 91:202-207.
- Sampayo R, Recouvreux S, Simian M (2013) The hyperplastic phenotype in PR-A and PR-B transgenic mice: lessons on the role of estrogen and progesterone receptors in the mouse mammary gland and breast cancer. *Vitamins and Hormones* 93:185-201.
- Santé Canada (2021) *Sixième rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimique de l'environnement au Canada - Résultat de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé Cycle 6 (2018 à 2019)*. (H126-5F-PDF). 1-26 p

- Santé Canada & Environnement et Changement climatique Canada (2020) Approche de gestion des risques pour le phtalate de bis (2-éthylhexyle) [DEHP]. Édit Canada EECC).
- Santé publique France (2019) Imprégnation de la population Française par les phtalates. Édit Santé Environnement).
- Sarath Josh MK, Pradeep S, Vijayalekshmi Amma KS, Balachandran S, Abdul Jaleel UC, Doble M, Spener F, Benjamin S (2014) Phthalates efficiently bind to human peroxisome proliferator activated receptor and retinoid X receptor alpha, beta, gamma subtypes: an in silico approach. *Journal of Applied Toxicology* 34(7):754-765.
- Sarjeant K & Stephens JM (2012) Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(9):a008417.
- Sathyanarayana S, Butts S, Wang C, Barrett E, Nguyen R, Schwartz SM, Haaland W, Swan SH, Team T (2017) Early Prenatal Phthalate Exposure, Sex Steroid Hormones, and Birth Outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 102(6):1870-1878.
- Saunier EF, Vivar OI, Rubenstein A, Zhao X, Olshansky M, Baggett S, Staub RE, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP, Baxter JD, Leitman DC (2011) Estrogenic plant extracts reverse weight gain and fat accumulation without causing mammary gland or uterine proliferation. *PLoS One* 6(12):e28333.
- Schaffert A, Arnold J, Karkossa I, Bluher M, von Bergen M, Schubert K (2021) The Emerging Plasticizer Alternative DINCH and Its Metabolite MINCH Induce Oxidative Stress and Enhance Inflammatory Responses in Human THP-1 Macrophages. *Cells* 10(9).
- Schaffert A, Karkossa I, Ueberham E, Schlichting R, Walter K, Arnold J, Bluher M, Heiker JT, Lehmann J, Wabitsch M, Escher BI, von Bergen M, Schubert K (2022) Di-(2-ethylhexyl) phthalate substitutes accelerate human adipogenesis through PPAR γ activation and cause oxidative stress and impaired metabolic homeostasis in mature adipocytes. *Environ Int* 164:107279.
- Schedin P, Strange R, Mitrenga T, Wolfe P, Kaeck M (2000) Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling. *Journal of Cell Science* 113(5):795-806.
- Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B (2012) Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on female fertility and adipogenesis in C3H/N mice. *Environmental Health Perspectives* 120(8):1123-1129.
- Schmidt SF, Jørgensen M, Chen Y, Nielsen R, Sandelin A, Mandrup S (2011) Cross species comparison of C/EBP α and PPAR γ profiles in mouse and human adipocytes reveals interdependent retention of binding sites. *BMC Genomics* 12(152):16.

- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302:93-109.
- Schutze A, Kolossa-Gehring M, Apel P, Bruning T, Koch HM (2014) Entering markets and bodies: increasing levels of the novel plasticizer Hexamoll(R) DINCH(R) in 24 h urine samples from the German Environmental Specimen Bank. *Int J Hyg Environ Health* 217(2-3):421-426.
- Schutze A, Lorber M, Gawrych K, Kolossa-Gehring M, Apel P, Bruning T, Koch HM (2015) Development of a multi-compartment pharmacokinetic model to characterize the exposure to Hexamoll(R) DINCH(R). *Chemosphere* 128:216-224.
- Schutze A, Otter R, Modick H, Langsch A, Bruning T, Koch HM (2017) Additional oxidized and alkyl chain breakdown metabolites of the plasticizer DINCH in urine after oral dosage to human volunteers. *Archives of Toxicology* 91(1):179-188.
- Schwedler G, Conrad A, Rucic E, Koch HM, Leng G, Schulz C, Schmied-Tobies MIH, Kolossa-Gehring M (2020a) Hexamoll(R) DINCH and DPHP metabolites in urine of children and adolescents in Germany. Human biomonitoring results of the German Environmental Survey GerES V, 2014-2017. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 229:1-11.
- Schwedler G, Conrad A, Rucic E, Koch HM, Leng G, Schulz C, Schmied-Tobies MIH, Kolossa-Gehring M (2020b) Hexamoll(R) DINCH and DPHP metabolites in urine of children and adolescents in Germany. Human biomonitoring results of the German Environmental Survey GerES V, 2014-2017. *Int J Hyg Environ Health* 229:113397.
- Schwedler G, Seiwert M, Fiddicke U, Issleb S, Holzer J, Nendza J, Wilhelm M, Wittsiepe J, Koch HM, Schindler BK, Goen T, Hildebrand J, Joas R, Joas A, Casteleyn L, Angerer J, Castano A, Esteban M, Schoeters G, Den Hond E, Sepai O, Exley K, Bloemen L, Knudsen LE, Kolossa-Gehring M (2017) Human biomonitoring pilot study DEMOCOPHES in Germany: Contribution to a harmonized European approach. *Int J Hyg Environ Health* 220(4):686-696.
- Sedha S, Lee H, Singh S, Kumar S, Jain S, Ahmad A, Bin Jordan YA, Sonwal S, Shukla S, Simal-Gandara J, Xiao J, Huh YS, Han YK, Bajpai VK (2021) Reproductive toxic potential of phthalate compounds - State of art review. *Pharmacological Research* 167:1-16.
- Sheikh IA & Beg MA (2017) Endocrine disruption: In silico interactions between phthalate plasticizers and corticosteroid binding globulin. *Journal of Applied Toxicology* 37(12):1471-1480.

- Sheikh IA, Yasir M, Abu-Elmagd M, Dar TA, Abuzenadah AM, Damanhoury GA, Al-Qahtani M, Beg MA (2016) Human sex hormone-binding globulin as a potential target of alternate plasticizers: an in silico study. *BMC Structural Biology* 16:1-10.
- Shi HB, Luo J, Yao DW, Zhu JJ, Xu HF, Shi HP, Loo JJ (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the synthesis of monounsaturated fatty acids in dairy goat mammary epithelial cells via the control of stearoyl-coenzyme A desaturase. *Journal of Dairy Science* 96(12):7844-7853.
- Shoaito H, Petit J, Chissey A, Auzeil N, Guibourdenche J, Gil S, Laprevote O, Fournier T, Degrelle SA (2019) The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) in Mono(2-ethylhexyl) Phthalate (MEHP)-Mediated Cytotrophoblast Differentiation. *Environ Health Perspect* 127(2):27003.
- Shu H, Jonsson BAG, Gennings C, Lindh CH, Nanberg E, Bornehag CG (2019) PVC flooring at home and uptake of phthalates in pregnant women. *Indoor Air* 29(1):43-54.
- Shyamala G, Yang X, Silberstein G, Barcellos-Hoff MH, Dale E (1998) Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *PNAS* 95(2):696-701.
- Sidlovská M, Petrovicová I, Kolena B, Pilka T, Sovčíková E, Trnovec T (2017) Exposure of children to phthalates and the impact of consumer practices in Slovakia. *Reviews on Environmental Health* 32(1-2):211-214.
- Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S (2012) Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23(2):56-64.
- Silva MJ, Furr J, Preau JL, Jr., Samandar E, Gray LE, Calafat AM (2012) Identification of potential biomarkers of exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), an alternative for phthalate plasticizers. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 22(2):204-211.
- Sims JN, Graham B, Pacurari M, Leggett SS, Tchounwou PB, Ndebele K (2014) Diethylhexylphthalate (DEHP) modulates cell invasion, migration and anchorage independent growth through targeting S100P in LN-229 glioblastoma cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11(5):5006-5019.
- Sioen I, Fierens T, Van Holderbeke M, Geerts L, Bellemans M, De Maeyer M, Servaes K, Vanermen G, Boon PE, De Henauw S (2012a) Phthalates dietary exposure and food sources for Belgian preschool children and adults. *Environment International* 48:102-108.

- Sioen I, Fierens T, Van Holderbeke M, Geerts L, Bellemans M, De Maeyer M, Servaes K, Vanermen G, Boon PE, De Henauw S (2012b) Phthalates dietary exposure and food sources for Belgian preschool children and adults. *Environment International* 48:102-108.
- Société canadienne du cancer (2021) *Statistiques sur le cancer du sein* <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/breast/statistics>
- Spina E & Cowin P (2021a) Embryonic mammary gland development. *Semin Cell Dev Biol* 10.1016/j.semcdb.2020.12.012.
- Spina E & Cowin P (2021b) Embryonic mammary gland development. *Semin Cell Dev Biol* 114:83-92.
- Spink DC, Wu SJ, Spink BC, Hussain MM, Vakharia DD, Pentecost BT, Kaminsky LS (2008) Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 226(3):213-224.
- Stanko JP & Fenton SE (2017) Quantifying Branching Density in Rat Mammary Gland Whole-mounts Using the Sholl Analysis Method. *J Vis Exp* 10.3791/55789(125).
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z (2006) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74(7):365-381.
- Stroheker T, Regnier JF, Lassarguere J, Chagnon MC (2006) Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture. *Food Chem Toxicol* 44(12):2064-2069.
- Strong P, Coleman RA, Humphrey PPA (1992) PROSTANOID-INDUCED INHIBITION OF LIPOLYSIS IN RAT ISOLATED ADIPOCYTES: PROBABLE INVOLVEMENT OF EP3 RECEPTORS. *Prostaglandins* 43:559-566.
- Suchanek KM, May FJ, Lee WJ, Holman NA, Roberts-Thomson SJ (2002a) Peroxisome proliferator-activated receptor β expression in human breast epithelial cell lines of tumorigenic and non-tumorigenic origin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34:1051-1058.
- Suchanek KM, May FJ, Lee WJ, Holman NA, Roberts-Thomson SJ (2002b) Peroxisome proliferator-activated receptor beta expression in human breast epithelial cell lines of tumorigenic and non-tumorigenic origin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34:1051-1058.
- Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, Lee WJ, Holman NA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ (2002c) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Molecular Carcinogenesis* 34(4):165-171.

- Surhio MA, Talpur FN, Nizamani SM, Talpur MK, Afridi HI, Khaskheli AA, Bhurgri S, Surhio JA (2017) Leaching of phthalate esters from different drinking stuffs and their subsequent biodegradation. *Environmental Science and Pollution Research International* 24(22):18663-18671.
- Svennersten-Sjaunja K & Olsson K (2005) Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology* 29(2):241-258.
- Svensson K, Hernandez-Ramirez RU, Burguete-Garcia A, Cebrian ME, Calafat AM, Needham LL, Claudio L, Lopez-Carrillo L (2011) Phthalate exposure associated with self-reported diabetes among Mexican women. *Environmental Research* 111(6):792-796.
- Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RH, Redmon JB (2015) First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human Reproduction* 30(4):963-972.
- Tanaka A, Adachi T, Takahashi T, Yamaha T (1975) Biochemical studies on phthalic esters I. Elimination, Distribution and Metabolism of Di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* 4:253-264.
- Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J (2019) The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology* 37(7):761-774.
- Taylor SC & Posch A (2014) The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014:361590.
- Teitelbaum SL, Belpoggi F, Reinlib L (2015) Advancing research on endocrine disrupting chemicals in breast cancer: Expert panel recommendations. *Reproductive Toxicology* 54:141-147.
- Tobon H & Salazar H (1974) Ultrastructure of the Human Mammary Gland. I. Development of the Fetal Gland Throughout Gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 39(3):443-456.
- Tong X, Wei L, Wang T, Han R (2021) Remodeling of Macrophages in White Adipose Tissue under the Conditions of Obesity as well as Lipolysis. *Oxid Med Cell Longev* 2021:9980877.
- Toporova L & Balaguer P (2020) Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* 502:110665.
- Townsend LK, Knuth CM, Wright DC (2017) Cycling our way to fit fat. *Physiol Rep* 5(7):1-9.
- Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ (2020) Progesterone and Breast Cancer. *Endocrine Reviews* 41(2).

- Tripathi A, Pandey V, Sahu AN, Singh A, Dubey PK (2019) Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) inhibits steroidogenesis and induces mitochondria-ROS mediated apoptosis in rat ovarian granulosa cells. *Toxicol Res (Camb)* 8(3):381-394.
- U.S. Food and Drug Administration (2001) Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. :1-119.
- United States Consumer Product Safety Commission (2010) *Phthalates and Phthalate Substitutes in Children's Toys*. p
- Urbancova K, Lankova D, Sram RJ, Hajslova J, Pulkrabova J (2019) Urinary metabolites of phthalates and di-iso-nonyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH)-Czech mothers' and newborns' exposure biomarkers. *Environmental Research* 173:342-348.
- Uvnäs-Moberg K, Ekstrom-Bergstrom A, Buckley S, Massarotti C, Pajalic Z, Luegmair K, Kotlowska A, Lengler L, Olza I, Grylka-Baeschlin S, Leahy-Warren P, Hadjigeorgiu E, Villarrea S, Dencker A (2020) Maternal plasma levels of oxytocin during breastfeeding-A systematic review. *PLoS One* 15(8):1-38.
- Uyar R, Yurdakok-Dikmen B, Turgut Y, Filazi A (2022) Diethylhexyl Phthalate and Bisphenol A Promote Vincristine and Tamoxifen Resistance in Vitro. *Chemical Research in Toxicology* 35(3):538-546.
- van 't Erve TJ, Rosen EM, Barrett ES, Nguyen RHN, Sathyanarayana S, Milne GL, Calafat AM, Swan SH, Ferguson KK (2019) Phthalates and Phthalate Alternatives Have Diverse Associations with Oxidative Stress and Inflammation in Pregnant Women. *Environmental Science & Technology* 53(6):3258-3267.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Myers JP, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT (2013) Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reproductive Toxicology* 38:1-15.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP (1993) Human Progesterone Receptor A Form Is a Cell- and Promoter- Specific Repressor of Human Progesterone Receptor B Function. *Molecular Endocrinology* 7:1244-1255.
- Venkata NG, Robinson JA, Cabot PJ, Davis B, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ (2006) Mono(2-ethylhexyl)phthalate and mono-n-butyl phthalate activation of peroxisome proliferator activated-receptors alpha and gamma in breast. *Toxicology Letters* 163(3):224-234.
- Vimalkumar K, Zhu H, Kannan K (2022) Widespread occurrence of phthalate and non-phthalate plasticizers in single-use facemasks collected in the United States. *Environ Int* 158:1-6.

- Vinogradova Y, Coupland C, Hippisley-Cox J (2020) Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. *BMJ* 371:m3873.
- Volkel W, Kiranoglu M, Dettbarn G, John A, Jessel S, Seidel A, Fromme H (2016) Urinary toxicokinetics of di-(isononyl)-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH((R))) in humans following single oral administration. *Toxicology Letters* 248:16-24.
- Wadia PR, Cabaton NJ, Borrero MD, Rubin BS, Sonnenschein C, Shioda T, Soto AM (2013) Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PloS One* 8(5):1-10.
- Wagner ER, He BC, Chen L, Zuo GW, Zhang W, Shi Q, Luo Q, Luo X, Liu B, Luo J, Rastegar F, He CJ, Hu Y, Boody B, Luu HH, He TC, Deng ZL, Haydon RC (2010) Therapeutic Implications of PPAR γ in Human Osteosarcoma. *PPAR Res* 2010:956427.
- Walden PD, Ruan W, Feldman M, Kleinberg DL (1998) Evidence That the Mammary Fat Pad Mediates the Action of Growth Hormone in Mammary Gland Development. *Endocrinology* 139(2):659-662.
- Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA (2013) Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(46):18656-18661.
- Wang H, Airola MV, Reue K (2017a) How lipid droplets "TAG" along: Glycerolipid synthetic enzymes and lipid storage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(10 Pt B):1131-1145.
- Wang K, Wu F, Seo BR, Fischbach C, Chen W, Hsu L, Gourdon D (2017b) Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. *Matrix Biology* 60-61:86-95.
- Wang QA, Song A, Chen W, Schwalie PC, Zhang F, Vishvanath L, Jiang L, Ye R, Shao M, Tao C, Gupta RK, Deplancke B, Scherer PE (2018) Reversible De-differentiation of Mature White Adipocytes into Preadipocyte-like Precursors during Lactation. *Cell Metabolism* 28(2):282-288 e283.
- Wang R, Xu X, Weng H, Yan S, Sun Y (2016a) Effects of early pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on social behavior of mice. *Horm Behav* 80:117-124.
- Wang X, Simpson ER, Brown KA (2015) Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 153:35-44.

- Wang Y, Chen B, Lin T, Wu S, Wei G (2017c) Protective effects of vitamin E against reproductive toxicity induced by di(2-ethylhexyl) phthalate via PPAR-dependent mechanisms. *Toxicol Mech Methods* 27(7):551-559.
- Wang Y & Qian H (2021) Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare (Basel)* 9(5).
- Wang Y, Zhu H, Kannan K (2019) A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics* 7(2):1-28.
- Wang YX, Zeng Q, Sun Y, You L, Wang P, Li M, Yang P, Li J, Huang Z, Wang C, Li S, Dan Y, Li YF, Lu WQ (2016b) Phthalate exposure in association with serum hormone levels, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis: A cross-sectional study in China. *Environmental Research* 150:557-565.
- Wassenaar PNH & Legler J (2017) Systematic review and meta-analysis of early life exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and obesity related outcomes in rodents. *Chemosphere* 188:174-181.
- Watkins DJ, Sanchez BN, Tellez-Rojo MM, Lee JM, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, Peterson KE, Meeker JD (2017) Impact of phthalate and BPA exposure during in utero windows of susceptibility on reproductive hormones and sexual maturation in peripubertal males. *Environ Health* 16(1):69.
- Watkins DJ, Tellez-Rojo MM, Ferguson KK, Lee JM, Solano-Gonzalez M, Blank-Goldenberg C, Peterson KE, Meeker JD (2014) In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. *Environmental Research* 134:233-241.
- Watson CJ (2006) Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Research* 8(2):1-6.
- Watson CJ & Kreuzaler PA (2011) Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *International Journal of Developmental Biology* 55(7-9):757-762.
- Weiss JM, Gustafsson A, Gerde P, Bergman A, Lindh CH, Krais AM (2018) Daily intake of phthalates, MEHP, and DINCH by ingestion and inhalation. *Chemosphere* 208:40-49.
- Welte MA & Gould AP (2017) Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(10 Pt B):1260-1272.
- Wenzel AG, Reiner JL, Kohno S, Wolf BJ, Brock JW, Cruze L, Newman RB, Kucklick JR (2021) Biomonitoring of emerging DINCH metabolites in pregnant women in Charleston, SC: 2011-2014. *Chemosphere* 262:1-8.

- Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL, Schwarzbauer JE (2008) Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Research* 68(9):3185-3192.
- Wolff MS, Teitelbaum SL, Pinney SM, Windham G, Liao L, Biro F, Kushi LH, Erdmann C, Hiatt RA, Rybak ME, Calafat AM, Breast C, Environment Research C (2010) Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environmental Health Perspectives* 118(7):1039-1046.
- Woodward MJ, Obsekov V, Jacobson MH, Kahn LG, Trasande L (2020) Phthalates and Sex Steroid Hormones Among Men From NHANES, 2013-2016. *J Clin Endocrinol Metab* 105(4):1225-1234.
- World Health Organization (2013) *Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-Water*. IARC Monographs, World Health Organization p
- World Health Organization (2016) *Global Health Estimates 2015* p
- World Health Organization & United nations environment programme (2012) *State of the science of endocrine disrupting chemicals*. p
- Wu AH, Franke AA, Wilkens LR, Tseng C, Conroy SM, Li Y, Polfus LM, De Rouen M, Caberto C, Haiman C, Stram DO, Le Marchand L, Cheng I (2021) Urinary phthalate exposures and risk of breast cancer: the Multiethnic Cohort study. *Breast Cancer Research* 23(1):1-15.
- Wu J, Jiang Y, Cao W, Li X, Xie C, Geng S, Zhu M, Liang Z, Zhu J, Zhu W, Wu R, Ma X, Huang C, Yang X, Wang S, Zhong C (2018) miR-19 targeting of PTEN mediates butyl benzyl phthalate-induced proliferation in both ER(+) and ER(-) breast cancer cells. *Toxicology Letters* 295:124-133.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3(2):151-158.
- Wypych G (2017) Plasticizer types. *Handbook of plasticizers (Third Edition)*, Wypych G (Édit.) ChemTec Publishing. p 7-84.
- Xiaohui L, Xiaohui L, Taylor N, Fang V, Zhang X (2020) The Menstrual Cycle Related Hormone Variations and Breast Cancer Risk: A Novel Theory. *Clinical Oncology and Research* 10.31487/j.COR.2020.04.01:1-6.
- Xu H, Fu JL, Miao YF, Wang CJ, Han QF, Li S, Huang SZ, Du SN, Qiu YX, Yang JC, Gustafsson JA, Breyer RM, Zheng F, Wang NP, Zhang XY, Guan YF (2016) Prostaglandin E2 receptor EP3 regulates both adipogenesis and lipolysis in mouse white adipose tissue. *Journal of Molecular Cell Biology* 8(6):518-529.

- Xu S & Li C (2021) Phthalates in House and Dormitory Dust: Occurrence, Human Exposure and Risk Assessment. *Bull Environ Contam Toxicol* 106(2):393-398.
- Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan GH (2015) The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *Journal of Leukocyte Biology* 97(1):61-69.
- Yamada K & Taketani T (2019) Management and diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation disorders: focus on very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Human Genetics* 64(2):73-85.
- Yan Y, Chen R, Wang X, Hu K, Huang L, Lu M, Hu Q (2019) CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front Cell Dev Biol* 7:212.
- Yang W, Tan W, Zheng J, Zhang B, Li H, Li X (2018) MEHP promotes the proliferation of cervical cancer via GPER mediated activation of Akt. *European Journal of Pharmacology* 824:11-16.
- Yao D, Luo J, He Q, Shi H, Li J, Wang H, Xu H, Chen Z, Yi Y, Loo JJ (2017) SCD1 Alters Long-Chain Fatty Acid (LCFA) Composition and Its Expression Is Directly Regulated by SREBP-1 and PPARgamma 1 in Dairy Goat Mammary Cells. *Journal of Cellular Physiology* 232(3):635-649.
- Yap PL, Mirtle CL, Harvie A, McClelland DBL (1980) Milk protein concentrations in neonatal milk (witch's milk). *Clinical and Experimental Immunology* 39:695-697.
- Yilmaz B, Terekeci H, Sandal S, Kelestimur F (2020) Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 21(1):127-147.
- Yin S, Been F, Liu W, Covaci A (2019) Hair as an alternative matrix to monitor human exposure to plasticizers - Development of a liquid chromatography - tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1104:94-101.
- Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K (2017) The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 486(3):752-758.
- Zarean M, Keikha M, Poursafa P, Khalighinejad P, Amin M, Kelishadi R (2016) A systematic review on the adverse health effects of di-2-ethylhexyl phthalate. *Environmental Science and Pollution Research International* 23(24):24642-24693.

- Zhang L, Sun W, Duan X, Duan Y, Sun H (2019a) Promoting differentiation and lipid metabolism are the primary effects for DINP exposure on 3T3-L1 preadipocytes. *Environ Pollut* 255(Pt 1):113154.
- Zhang S, Ma J, Fu Z, Zhang Z, Cao J, Huang L, Li W, Xu P, Cao X (2016) Promotion of breast cancer cells MDA-MB-231 invasion by di(2-ethylhexyl)phthalate through matrix metalloproteinase-2/-9 overexpression. *Environmental Science and Pollution Research International* 23(10):9742-9749.
- Zhang S, Sun C, Zhao S, Wang B, Wang H, Zhang J, Wang Y, Cheng H, Zhu L, Shen R, Sun M, Xu T, Zhao L (2020a) Exposure to DEHP or its metabolite MEHP promotes progesterone secretion and inhibits proliferation in mouse placenta or JEG-3 cells. *Environ Pollut* 257:113593.
- Zhang X & Chen Z (2014) Observing phthalate leaching from plasticized polymer films at the molecular level. *Langmuir* 30(17):4933-4944.
- Zhang X, Cheng C, Zhang G, Xiao M, Li L, Wu S, Lu X (2021) Co-exposure to BPA and DEHP enhances susceptibility of mammary tumors via up-regulating Esr1/HDAC6 pathway in female rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 221:112453.
- Zhang XF, Zhang LJ, Li L, Feng YN, Chen B, Ma JM, Huynh E, Shi QH, De Felici M, Shen W (2013) Diethylhexyl phthalate exposure impairs follicular development and affects oocyte maturation in the mouse. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54(5):354-361.
- Zhang Y, Zhou L, Zhang Z, Xu Q, Han X, Zhao Y, Song X, Zhao T, Ye L (2020b) Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and high-fat diet on lipid metabolism in rats by JAK2/STAT5. *Environmental Science and Pollution Research International* 27(4):3837-3848.
- Zhang YZ, Zhang ZM, Zhou LT, Zhu J, Zhang XH, Qi W, Ding S, Xu Q, Han X, Zhao YM, Song XY, Zhao TY, Ye L (2019b) Di(2-ethylhexyl) phthalate Disorders Lipid Metabolism via TYK2/STAT1 and Autophagy in Rats. *Biomedical and Environmental Sciences* 32(6):406-418.
- Zhao H, Li J, Zhou Y, Zhu L, Zheng Y, Xia W, Li Y, Xiang L, Chen W, Xu S, Cai Z (2018) Investigation on Metabolism of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Different Trimesters of Pregnant Women. *Environ Sci Technol* 52(21):12851-12858.
- Zhou L, Chen H, Xu Q, Han X, Zhao Y, Song X, Zhao T, Ye L (2019) The effect of di-2-ethylhexyl phthalate on inflammation and lipid metabolic disorder in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 170:391-398.

- Zhu J, Phillips SP, Feng Y-L, Yang X (2006) Phthalate Esters in Human Milk: Concentration Variations over a 6-Month Postpartum Time. *Environmental Science & Technology* 40(17):5276-5281.
- Zimmermann S, Gruber L, Schlummer M, Smolic S, Fromme H (2012) Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels. *Food Additives & Contaminants. Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29(11):1780-1790.
- 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.
- Zuo Y, Qiang L, Farmer SR (2006) Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *Journal of Biological Chemistry* 281(12):7960-7967.
- Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV (2018) Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism* 27(1):68-83.

11 ANNEXE

11.1 Proposition d'alternatives plus saines par les académiciens, une belle initiative à poursuivre

Notre étude *in vivo* fait partie du projet *Green Plasticizers*, dont le but initial était de générer de nouveaux plastifiants avec d'excellentes propriétés de plastifiants et étant non-toxiques, et tout particulièrement pour l'appareil reproducteur masculin. Ce projet a été mis en place et dirigé par une équipe multidisciplinaire comptant des chimistes, des biologistes, des toxicologues spécialisés dans le développement de l'appareil reproducteur mâle.

Ainsi ce projet s'est organisé en 4 étapes (Albert *et al.*, 2018a).

1. L'ingénierie chimique : La première étape de ce projet a été de produire des plastifiants permettant de répondre aux besoins de l'industrie, n'ayant pas une structure similaire au DEHP, mais aussi limitant l'exposition de l'humain et de l'environnement (faible relargage et propriété élevée de biodégradation). Ainsi 3 acides organiques ont été sélectionnés, l'acide succinique, l'acide fumarique et l'acide maléique (Erythropel *et al.*, 2012), ainsi qu'un dibenzoate. Pour chacune de ces familles, 3 à 4 candidats ont été proposés et leurs propriétés de relargage et de biodégradation ont été vérifiées (Kastner *et al.*, 2012).
2. Détermination de la toxicité *in vitro* : afin de réduire le nombre de candidats et de s'assurer d'une absence de toxicité des composés sélectionnés avant de les tests *in vivo*, des lignées de cellules de Leydig tumorales (MA-10) et de spermatogonies (C18-4) (Boisvert *et al.*, 2016), des lignées de cellules de Sertoli (TM4) (Nardelli *et al.*, 2015b), ainsi que des cultures *ex vivo* de testicules ont été utilisées. Elles ont permis de sélectionner deux candidats : le dioctyle succinate (DOS) et le 1,4-butanediol benzoate (BDB) (Albert *et al.*, 2018a).
3. La 1^{re} étape *in vivo* a été d'exposer des rats mâles par gavage à partir de PND29 avec 15 et 150 mg/kg/jr de BDB ou de DOS. Plusieurs paramètres de leur santé ont été évalués à PND57, et les rats ont été sacrifiés à PND58. Aucune altération du comportement ou de la santé globale des rats, ni du poids des organes testés, n'a été observée avec les traitements aux plastifiants. Une certaine altération a été observée au niveau des reins, foie, et poumons, mais les auteurs ont considéré ces résultats aspécifiques (Albert *et al.*, 2018a). Il est à noter que cette étape 3 ne comprenait que 4 animaux par conditions, afin de réaliser un prétest avant les expositions à grande échelle de l'étape 4.
4. Connaissant les propriétés de PEs du DEHP et l'importance des fenêtres de sensibilité dans sa toxicité, il a été décidé d'étudier en parallèle l'exposition au DEHP, au BDB et au DOS,

mais aussi le DINCH durant la période de sensibilité qu'est la vie *in utero* et la lactation *via* le gavage de leur mère. Le protocole expérimental a été détaillé dans la section 3.2.1 (pages 91-92) de l'article 2 de ce manuscrit. Plusieurs laboratoires de recherche se sont intégrés à ce projet afin de pouvoir récolter des organes en lien avec leur expertise. Ainsi nous avons eu l'opportunité d'obtenir les glandes mammaires des rats de l'expérience, soit celles des mères directement exposées, et de leurs bébés.

Au moment du dépôt final de ce manuscrit, seuls notre étude et les articles réalisés dans le laboratoire du Professeur Bernard Robaire, qui est au cœur du projet *Green Plasticizers*, ont été publiés concernant la toxicologie de l'étape 4. Des expériences préliminaires réalisées dans notre laboratoire sur les animaux de l'étape 4 ont montré que le BDB semblait induire des anomalies au niveau de la glande mammaire (résultats non présentés). Cependant, ces études sont restées aux stades préliminaires, car des modifications ont été apportées sur ces plastifiants par l'équipe de chimistes, afin d'améliorer leurs propriétés de plastifiants et de diminuer leur toxicité, faisant en sorte que le BDB et le DOS ne seront pas commercialisés tels qu'ils ont été testés dans notre étude. Même si ce projet n'a pas abouti, il est indispensable que d'autres initiatives d'académiciens indépendantes soit réalisées. En effet, l'absence d'intérêt financier, et la priorisation de l'innocuité des plastifiants permettraient, selon moi, d'éviter la mise sur le marché d'alternative plus dangereuses que les composés qu'ils remplacent.