

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

***Organochlorés et cancer du sein: Modulation de la signalisation
cellulaire des cellules épithéliales mammaires humaines***

Par
Stéphanie Girard

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Diana Averill Université du Québec à Montréal
Examineur interne	Dr. Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Dr. Michel Charbonneau INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

L'étiologie du cancer du sein repose sur un processus multifactoriel mettant notamment en cause la nutrition, la génétique, l'environnement et les habitudes de vie. En plus d'être l'un des cancers les plus fréquents et les plus dangereux chez la femme, le cancer du sein représente une des premières causes de décès chez celles-ci. Des études épidémiologiques ont suggéré, de façon équivoque, que certains polluants environnementaux, notamment les organochlorés, pourraient contribuer au développement de la cancérogenèse mammaire. Les organochlorés sont des contaminants lipophiles distribués dans les tissus adipeux tels que le tissu mammaire. La démonstration claire de leur implication au niveau du développement du cancer du sein demeure entière.

Un mélange environnemental d'agonistes du *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR; récepteur aux hydrocarbures polycycliques), constitué de trois biphenyles polychlorés (PCB), de sept polychlorodibenzofuranes (PCDF) et de six polychlorodibenzodioxines (PCDD) retrouvés dans le lait maternel, de même que l'hexachlorobenzène (HCB) représentent des exemples de cancérrogènes très répandus dans l'environnement de par leur utilisation massive au cours des années passées et de leur grande bioaccumulation. La présence de ces contaminants dans les tissus humains et animaux a été bien démontrée.

L'hypothèse de ce projet de recherche est que ces contaminants environnementaux peuvent induire la formation de cancers en modulant les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase de la famille erbB et la signalisation cellulaire, plus particulièrement les récepteurs EGFR et erbB2 fréquemment surexprimés dans le cancer du sein, ainsi que des médiateurs intracellulaires tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la « Integrin-Linked Kinase » ILK et la cadhérine E impliquée dans la communication cellulaire. Ces messagers secondaires ont une influence directe sur la différenciation, la prolifération, la communication et l'invasion cellulaire.

L'objectif principal de ce mémoire est de déterminer l'impact d'expositions aiguës et chroniques au mélange d'agonistes du AhR et à l'HCB sur les lignées de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, les MCF-10A et les MCF-12A. Selon l'hypothèse de recherche, ces polluants exerceraient leur action en modulant l'expression

et la phosphorylation des récepteurs de la famille erbB ainsi que des médiateurs cytoplasmiques dans les cellules mammaires, ce qui provoquerait une prolifération excessive, une baisse de communication entre les cellules et favoriserait le développement de tumeurs cancéreuses.

Les cellules MCF-10A et MCF-12A ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM-F12 supplémenté avec 20 ng/ml d'EGF, 10 µg/ml d'insuline, 5% de sérum de cheval, puis exposées de façon aiguë (10 ou 30 min) ou chronique (15 à 40 passages) au mélange d'agonistes du AhR ou à l'HCB. Une collecte cellulaire avec un tampon de lyse a permis d'évaluer l'effet de ceux-ci sur le niveau d'expression et de phosphorylation des récepteurs de facteurs de croissance EGFR et erbB2 et des médiateurs cellulaires tels que la protéine Akt/PKB, la ILK et la cadhérine E à l'aide d'analyses par immunobuvardage.

Les résultats expérimentaux ont démontré qu'une exposition à court terme de 10 et de 30 min au mélange d'agonistes du AhR ne provoque aucune modification du récepteur erbB2 chez les cellules MCF-10A. Par contre, une exposition chronique de 15 passages au mélange d'agonistes du AhR engendre une diminution de la prolifération cellulaire en plus d'une augmentation de l'expression et de la phosphorylation du récepteur erbB2 et de la protéine ILK. Une exposition à court terme de 10 et de 30 min à l'HCB ne provoque aucune modification du récepteur erbB2 chez les cellules MCF-10A. Cependant, une exposition chronique durant 40 passages à l'HCB engendre une augmentation du niveau d'activation du récepteur erbB2 et de EGFR chez les cellules MCF-10A et MCF-12A. Cette même exposition provoque une hausse du niveau d'expression et de phosphorylation de la ILK en plus d'une diminution de la phosphorylation de la Akt/PKB et de l'expression de la cadhérine E.

Dans l'ensemble, ces observations démontrent qu'une exposition chronique à ces contaminants environnementaux cause une suractivation des récepteurs à activité tyrosine kinase fréquemment surexprimés dans les tissus mammaires cancéreux et module la signalisation des cellules mammaires. Ces résultats suggèrent que le mélange d'agonistes du AhR engendrait une action anticancérogène alors que l'HCB exercerait une action procancérogène de type épigénétique en modulant la prolifération et la communication intercellulaire. Les données obtenues faciliteront une meilleure compréhension de la

cancérogène dans les glandes mammaires étant donné que les cellules MCF-10A et MCF-12A, lignées *in vitro* de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, constituent d'excellents modèles pour une extrapolation à l'humain. Cette démarche expérimentale permet de documenter la plausibilité biologique du facteur environnemental dans la cancérogenèse mammaire et elle ouvre la voie à la réalisation de travaux en épidémiologie moléculaire.



Stéphanie Girard, Étudiante



Michel Charbonneau, Directeur

REMERCIEMENTS

Je n'aurai jamais assez de mots pour vous dire, à tous, combien je vous remercie de votre support... Merci...

À mon superviseur, Michel Charbonneau, pour sa patience de mes nombreuses visites, ses conseils soignés et pour toutes ses pensées positives qui m'ont fait réaliser à plusieurs reprises que mon travail fut judicieux... Merci...

À Guylaine Lassonde pour sa bonne humeur débordante, son expérience, son écoute et son aide pour ma culture cellulaire. Sans elle, je n'aurais pu y arriver... Merci...

À tous mes chers compagnons de laboratoire, Robert, Isabelle, Marie-Andrée, David, Patrick et Gianni, pour tout leurs précieux conseils et à leur énergie positive... Merci...

À ma famille que j'adore, pour leurs courriels encourageant, leur soutien, leur joie de vivre...et comme dit si bien ma mère, « la recherche c'est pour chercher et non trouver »... Merci...

Finalement, à Louis, en qui j'ai pu puiser toute mon énergie grâce à son amour, son sourire éclatant, son aide précieuse, sa patience mémorable et son soutien à chaque jour de cette maîtrise...Il est pour moi « source intarissable » de toute mon inspiration...
Merci...

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 Revue de la littérature et définition des objectifs.....	4
1.1. Cancérogène.....	4
1.1.1. Statistiques en cancérologie.....	4
1.1.2. Définition de la cancérogène.....	4
1.1.2.1. Cancérogènes génotoxiques et épigénétiques.....	7
1.1.2.2. Propriétés d'une cellule normale versus cancéreuse.....	8
1.1.3. Cancérogène mammaire.....	8
1.1.3.1. Implication de la régulation du cycle cellulaire dans la cancérisation.....	9
1.1.3.2. Lignées de cellules mammaires en culture.....	10
1.1.4. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs.....	11
1.2. Polluants environnementaux.....	14
1.2.1. Caractérisation chimique.....	14
1.2.1.1. Mélange d'agonistes du AhR.....	14
1.2.1.2. Hexachlorobenzène.....	14
1.2.2. Utilisations et sources d'émission.....	15
1.2.2.1. Mélange d'agonistes du AhR.....	15
1.2.2.2. Hexachlorobenzène.....	16
1.2.3. Épidémiologie et cancer du sein induit par les organochlorés.....	17
1.2.3.1. Hypothèses des mécanismes cancérogènes.....	20
1.2.3.2. Résumé épidémiologique.....	21
1.3. Signalisation cellulaire.....	22
1.3.1. Récepteur membranaire.....	22
1.3.1.1. Caractérisation des récepteurs de la famille erbB.....	23
1.3.1.2. Caractérisation du récepteur Ah.....	26
1.3.1.3. Implication des récepteurs erbB dans le processus de cancérisation.....	28
1.3.2. Médiateurs intracellulaires.....	31
1.3.2.1. La protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB.....	32
1.3.2.2. La protéine « Integrin-Linked Kinase » ILK.....	37
1.3.2.3. Les protéines d'adhésion cellulaire.....	41
1.3.2.4. Intégration des mécanismes antiapoptotiques régulés par les récepteurs erbB.....	47
1.4. Hypothèses et objectifs de recherche.....	51
CHAPITRE 2 Matériel et méthodes.....	52
2.1. Matériel.....	52
2.2. Méthodes.....	52
2.2.1. Décongélation des cellules.....	52
2.2.2. Test de viabilité cellulaire.....	54
2.2.3. Préparation des milieux de culture.....	54
2.2.3.1. Préparation du milieu de culture normal.....	54
2.2.3.2. Méthodologie du passage cellulaire.....	55
2.2.3.3. Préparation du milieu de culture traité.....	55
2.2.4. Traitements cellulaires.....	57
2.2.4.1. Traitement à court terme.....	57
2.2.4.2. Traitement à long terme.....	57
2.2.5. Décompte cellulaire.....	58

2.2.6. Récolte cellulaire	59
2.2.7. Techniques d'analyse.....	59
2.2.7.1. Analyse par immunobuvardage (Western Blot).....	59
2.2.7.2. Analyse par immunoprécipitation	62
2.2.8. Statistiques	63
CHAPITRE 3 Résultats.....	64
3.1. Les effets du mélange d'agonistes du AhR sur les cellules mammaires	64
3.1.1. Traitement à court terme des cellules MCF-10A.....	64
3.1.2. Traitement à long terme des cellules MCF-10A.....	67
3.1.2.1. Effet du mélange d'agonistes du AhR sur la prolifération cellulaire	67
3.1.2.2. Effet du mélange d'agonistes du AhR sur le récepteur erbB2/HER-2	67
3.1.2.3. Effet du mélange d'agonistes du AhR sur la Integrin-Linked Kinase (ILK)	70
3.2. Les effets de l'hexachlorobenzène sur les cellules mammaires	73
3.2.1. Traitement à court terme des cellules MCF-10A.....	73
3.2.2. Traitement à long terme des cellules MCF-10A et MCF-12A	73
3.2.2.1. Effet de l'HCB sur le récepteur erbB2	73
3.2.2.2. Effet de l'HCB sur le récepteur de facteurs de croissance (EGFR)	77
3.2.2.3. Effet de l'HCB sur la Integrin-Linked Kinase (ILK)	81
3.2.2.4. Effet de l'HCB sur la sérine/thréonine kinase Akt.....	84
3.2.2.5. Effet de l'HCB sur la cadhérine E.....	88
CHAPITRE 4 Discussion	91
4.1. Effets du mélange d'agonistes du AhR sur les cellules mammaires	91
4.2. Effets de l'hexachlorobenzène sur les cellules mammaires	95

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Processus de cancérisation	6
Figure 1.2. Processus de la cancérogenèse initié par les cancérogènes génotoxiques.....	13
Figure 1.3. Structure chimique de l'hexachlorobenzène (HCB).....	15
Figure 1.4. Comparaison schématique des domaines d'homologie présents entre le récepteur à l'EGF et les autres membres de la famille des récepteurs de facteurs de croissance.....	27
Figure 1.5. Mécanisme de prolifération cellulaire suite à un niveau d'expression faible de erbB2 (A) et élevé de erbB2 (B).....	30
Figure 1.6. Organisation structurale des trois isoformes de la protéine Akt/PKB.....	33
Figure 1.7. Illustration schématique d'un modèle d'activation de la protéine Akt/PKB par le facteur de croissance via ses mécanismes de phosphorylation.....	35
Figure 1.8. Mécanismes de signalisation de la protéine Akt/PKB impliqués dans la survie des cellules épithéliales mammaires humaines.....	36
Figure 1.9. Interactions de la protéine ILK et signalisation cellulaire médiée par la ILK.....	40
Figure 1.10. Signalisation cellulaire activée par la ILK dans la cancérogenèse.....	42
Figure 1.11. Représentation schématique d'une molécule de cadhérine classique.....	44
Figure 1.12. Signalisation cellulaire de la β -caténine en absence (A) ou en présence de Wnt (B).....	46
Figure 3.1. Effet d'une exposition de 10 min au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression (A) et la phosphorylation (B) de erbB2 des cellules MCF-10A.....	65
Figure 3.2. Effet d'une exposition de 10 ou de 30 min au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression de erbB2 (A), sa phosphorylation (B) et sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) des cellules MCF-10A.....	66
Figure 3.3. Effet d'une exposition de 29 jours au mélange d'agonistes du AhR sur la prolifération des cellules MCF-10A.....	68
Figure 3.4. Effet d'une exposition de 26 jours au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression de erbB2, sa phosphorylation et sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 des cellules MCF-10A.....	69
Figure 3.5. Effet d'une exposition de 13 ou de 17 jours au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression et la phosphorylation de la ILK des cellules MCF-10A.....	71
Figure 3.6. Expression de la ILK (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-ILK/ILK (C) de la lignée de cellules MCF-10A exposées 13 ou 17 jours au mélange d'agonistes du AhR.....	72
Figure 3.7. Effet d'une exposition de 10 ou de 30 min à l'HCB sur l'expression de erbB2 (A), sa phosphorylation (B) et sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) des cellules MCF-10A.....	74

Figure 3.8. Expression de erbB2 (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) de la lignée de cellules MCF-10A exposées 66 ou 72 jours à l'HCB.....	75
Figure 3.9. Expression de erbB2 (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) de la lignée de cellules MCF-12A exposées 52 ou 64 jours à l'HCB.....	76
Figure 3.10. Effet d'une exposition à long terme à l'HCB sur l'expression (A) et la phosphorylation (B) de EGFR des cellules MCF-10A et MCF-12A.	78
Figure 3.11. Expression de EGFR (A) et de sa phosphorylation (B) de la lignée de cellules MCF-10A exposées à long terme à l'HCB.....	79
Figure 3.12. Expression de EGFR (A) et de sa phosphorylation (B) de la lignée de cellules MCF-12A exposées 52 ou 64 jours à l'HCB.....	80
Figure 3.13. Expression de la ILK de la lignée de cellules MCF-10A (A) et MCF-12A (B) exposées à long terme à l'HCB.....	82
Figure 3.14. Expression de la ILK (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-ILK/ILK (C) de la lignée de cellules MCF-10A et MCF-12A exposées respectivement 70 ou 60 jours à l'HCB.....	83
Figure 3.15. Effet d'une exposition à l'HCB sur la phosphorylation de la Akt après 56, 66, 68 ou 70 jours de traitement chez les MCF-10A (A) et après 64 ou 74 jours de traitement chez les MCF-12A (B).....	85
Figure 3.16. Phosphorylation de la Akt de la lignée de cellules MCF-10A exposées 56, 66, 68 ou 70 jours de traitement à l'HCB analysés par immunoprécipitation (A) ou par immunobuvardage (B).	86
Figure 3.17. Phosphorylation de la Akt de la lignée de cellules MCF-10A exposées 58, 68 ou 70 jours (A) et de la lignée de cellules MCF-12A exposées 64 ou 74 jours (B) de traitement à l'HCB.....	87
Figure 3.18. Effet d'une exposition à l'HCB sur l'expression de la cadhérine E après 58, 66, 72 ou 78 jours de traitement chez les cellules MCF-10A (A) et après 52, 64, 70 ou 76 jours de traitement chez les cellules MCF-12A (B).....	89
Figure 3.19. Expression de la cadhérine E de la lignée de cellules MCF-10A exposées 66 ou 72 jours (A) et de la lignée de cellules MCF-12A exposées 52 ou 64 jours (B) de traitement à l'HCB.....	90
Figure 4.1. Représentations schématiques de l'effet de l'hexachlorobenzène sur la signalisation des cellules épithéliales mammaire humaines non tumorales.	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Provenance des produits utilisés dans les expérimentations.	53
Tableau 2. Doses individuelles des 16 hydrocarbures halogénés dans la composition du mélange d'agonistes du AhR.	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

• ADN	Acide désoxyribonucléique
• AhR	Récepteur aux hydrocarbures polycycliques
• BPC	Biphényles polychlorés
• Ca ⁺⁺ ou Ca ²⁺	Ions calcium
• CAM	Molécule d'adhésion cellulaire
• DDE	1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthylène
• <i>p,p'</i> -DDE	Para,para'-1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényle)éthylène
• DDT	2,2-bis(p-chlorophényl)-1,1,1-trichloroéthane
• ECM	Matrice extracellulaire
• EGF	Facteur de croissance épidermique
• EGFR	Récepteur de facteurs de croissance épidermique
• ER	Récepteur à l'œstrogène
• GSK-3	Protéine glycogène synthase kinase 3
• HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
• HCB	Hexachlorobenzène
• HCH	Hexachlorocyclohexane
• IAP	Inhibiteur d'apoptose
• IκB	Inhibiteur kappa B
• IL-1	Interleukine 1
• ILK	Protéine « Integrin-Linked Kinase »
• LEF	« Lymphoid enhancer factor »
• MMP-9	Matrice métalloprotéase de type 9
• NDF	Facteur de différenciation neu ou héréguline
• PCDD	Polychlorodibenzodioxine
• PCDF	Polychlorodibenzofurane
• PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
• PKB	Protéine kinase B
• 2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-tetrachloro- <i>p</i> -dibenzo-dioxine
• TGF- α et β	Facteur de croissance transformant alpha et bêta

INTRODUCTION

Le cancer du sein est une des principales causes de décès chez les femmes canadiennes. Les études épidémiologiques continuent d'élucider les facteurs pouvant être responsables du développement de la cancérogenèse mammaire. Plusieurs facteurs de risque, tels que l'hérédité, le surplus de poids, les habitudes de vie, etc., semblent soulever l'hypothèse que le cancer du sein dérive d'un processus multifactoriel.

Les facteurs environnementaux représentent un facteur de risque important à considérer dans le développement de certains cancers. L'augmentation de l'incidence de tous les types de cancers semble être reliée à l'accroissement des substances cancérogènes polluant l'air et l'eau. Cette tendance se maintiendrait à la hausse (Bonaïti-Pellié *et al.*, 2001). Le mélange d'agonistes du récepteur aux hydrocarbures polycycliques (AhR), composé de biphényles polychlorés (BPC), de polychlorodibenzofuranes (PCDF) et de polychlorodibenzodioxines (PCDD), ainsi que l'hexachlorobenzène (HCB) sont des polluants bien répandus dans l'environnement. Ils ont été majoritairement utilisés comme fongicide dans les années 60-70. Cependant, il y a eu interdiction de l'utilisation de l'HCB en 1972 suite à une reconnaissance de son potentiel toxique pour la santé. Ces produits sont par contre toujours relargués dans l'environnement comme produits secondaires si bien qu'ils se retrouvent encore présents dans les tissus humains et animaux.

Il a été démontré que le mélange d'agonistes du AhR et l'HCB sont des cancérogènes épigénétiques favorisant la formation de tumeurs en modifiant l'expression de certains gènes. Une corrélation entre l'exposition à ces organochlorés et le développement de tumeurs mammaires est suggérée, mais certaines études ne peuvent confirmer cette observation avec certitude.

Depuis quelques années, la modulation de la signalisation cellulaire dans la cancérogenèse est un sujet qui suscite beaucoup d'intérêt. En effet, la prolifération et la communication cellulaire sont modulées lors de la formation et du développement de tumeurs. Des recherches en laboratoire ont permis de démontrer l'influence des récepteurs de facteurs de croissance erbB à activité tyrosine kinase sur les médiateurs

intracellulaires, tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la « Integrin-Linked Kinase » (ILK) et la cadhérine E impliquée dans l'adhésion intercellulaire. Compte tenu de l'importance des mécanismes de régulation de la prolifération et de la communication intercellulaire, l'hypothèse de ce projet de recherche est qu'une exposition aiguë (10 et 30 min) ou chronique (15 à 40 passages) au mélange d'agonistes du AhR et à l'HCB engendre le développement de tumeurs mammaires chez les cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, les MCF-10A et les MCF-12A, en modulant les récepteurs de facteur de croissance épidermique (EGFR) et erbB2, menant à une modulation de l'expression et de la phosphorylation des protéines Akt/PKB, ILK et cadhérine E. L'objectif principal est donc d'étudier l'impact d'une exposition aux organochlorés sur la signalisation cellulaire des cellules MCF-10A et MCF-12A. Pour réaliser cet objectif, les niveaux d'expression et de phosphorylation des récepteurs EGFR et erbB2, de la protéine Akt/PKB, de la ILK et de la cadhérine E ont été mesurés suite à une exposition au mélange d'agonistes du AhR et à l'HCB.

Le premier chapitre de ce mémoire comporte une revue de la littérature détaillée portant sur les 3 sujets principaux du présent projet de recherche, soit la cancérogenèse, les polluants environnementaux et la signalisation cellulaire. Ainsi, la première section de ce chapitre présente un résumé général de l'évolution des connaissances sur le phénomène de la cancérogenèse, plus particulièrement sur la cancérogenèse mammaire. Cette section permet une meilleure compréhension des caractéristiques importantes de la cancérisation. La seconde section se consacre entièrement à la caractérisation, à l'utilisation et aux effets néfastes sur la santé animale et humaine engendrés par le mélange d'agonistes du AhR et par l'HCB. Finalement, la troisième section fait mention des connaissances sur la signalisation cellulaire enclenchée par les récepteurs membranaires, tels que les récepteurs de facteurs de croissance erbB à activité tyrosine kinase, et sur l'implication des médiateurs intracellulaires, tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la ILK et la cadhérine E, dans la cancérogenèse mammaire.

Ces trois sections démontrent la pertinence et l'importance de ce projet de recherche pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le phénomène de cancérogenèse. Ces informations ont mené à l'élaboration

d'hypothèses et d'objectifs de recherche qui seront présentés dans la quatrième section de ce chapitre.

Le deuxième chapitre de ce mémoire comprend une liste détaillée du matériel utilisé et des différentes méthodes qui furent nécessaires lors des expérimentations. Les données sont présentées dans le troisième chapitre. Finalement, le dernier chapitre présente une discussion générale et des conclusions pertinentes portant sur l'analyse des résultats obtenus. Cette section souligne l'apport de ces résultats aux connaissances scientifiques et apporte des pistes de solution et des perspectives de recherche pour contrer et même éliminer le développement de cette maladie.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature et définition des objectifs

1.1. Cancérogenèse

1.1.1. Statistiques en cancérologie

La recherche sur l'étiologie des cancers a connu plusieurs bouleversements au cours des dernières années en raison des multiples découvertes effectuées en biologie cellulaire et moléculaire. Le cancer est la principale cause de décès prématurés au pays. Cette maladie est susceptible d'affecter 41% des hommes et 38% des femmes et ce, majoritairement à l'âge de 60 ans. Au Canada, on a estimé en 2002 à 136 900 le nombre de nouveaux cas de cancer et à 66 200 le nombre de décès attribuables au cancer. En moyenne à chaque semaine, des milliers de personnes recevront un diagnostic de cancer et une centaine de personnes mourront des suites de la maladie (Société Canadienne du Cancer, 2003). C'est pour cette raison qu'il est plus qu'important de prendre conscience de l'ampleur de la situation dans notre société et de mettre l'emphase sur la recherche en cancérologie.

1.1.2. Définition de la cancérogenèse

Afin de mieux comprendre la problématique de ce mémoire, il est important de discuter des principaux événements impliqués lors du processus de cancérisation. En effet, le cancer fait intervenir de multiples changements que ce soit au niveau de l'expression des gènes ou au niveau de la physiologie cellulaire.

Les cellules d'un organisme sont soumises à un contrôle strict du développement. Elles vont se différencier, proliférer, migrer et même parfois mourir pour conduire l'organisme à fonctionner correctement. Par contre, il arrive que les cellules perdent tout

contrôle de leur développement et démontrent une prolifération excessive. Ce désordre de l'équilibre peut mener au développement de deux types de tumeurs possibles: la tumeur bénigne qui se développe par simple expansion et qui reste souvent noyée dans une couche de tissu conjonctif, puis la tumeur maligne qui se développe d'une manière invasive et disperse des cellules qui, par un processus de métastase, colonisent de nouvelles régions du corps. Les tumeurs malignes non traitées sont presque toujours mortelles (Voet et Voet, 1998). En d'autres mots, le cancer se définit comme étant un déséquilibre de la régulation des gènes aboutissant à un désordre de croissance au cours duquel des cellules devenues anormales prolifèrent d'une façon irrégulière, voir même anarchique (Alberts *et al.*, 1995).

Même si on ne connaît pas encore tout sur le cancer, il est possible de comprendre de mieux en mieux le processus de cancérisation, lequel se définit comme étant la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse difforme (Alberts *et al.*, 1995). Cette transformation est possible par le cheminement à travers des étapes particulières illustrées à la Figure 1.1, et après plusieurs altérations progressives dans les gènes sous l'influence de certains facteurs de risque, tels que définit antérieurement. La cellule subit tout d'abord en phase 1 une transformation de son appareil génétique (phénomène d'initiation ou d'amorce néoplasique), suivie d'atteintes ou d'altérations géniques dites de promotion (phase 2) avant que cette cellule ne devienne cancéreuse. L'initiation est considérée comme un stade irréversible dans la cancérogenèse. Une cellule ayant acquise une altération génétique au niveau de son acide désoxyribonucléique (ADN) ne pourra rétablir son état d'origine si les mécanismes de réparation sont déficients (Grasl-Kraupp *et al.*, 1994). Ce sont par la suite les facteurs de promotion (nutrition, influence hormonale, pollution, radiation, etc.) qui graduellement fixent les mutations pour donner des cellules cancéreuses.

L'étape de la promotion est réversible. Il y a arrêt de la transformation cellulaire si l'exposition aux agents promoteurs est réduite (Hendrich *et al.*, 1986). Par la suite, les cellules se multiplient progressivement (phase 3) pour donner naissance à des cellules cancéreuses. Ces dernières vont subir par la suite d'autres mutations permettant de devenir de véritables tumeurs malignes pouvant infiltrer les tissus et produire des métasta-

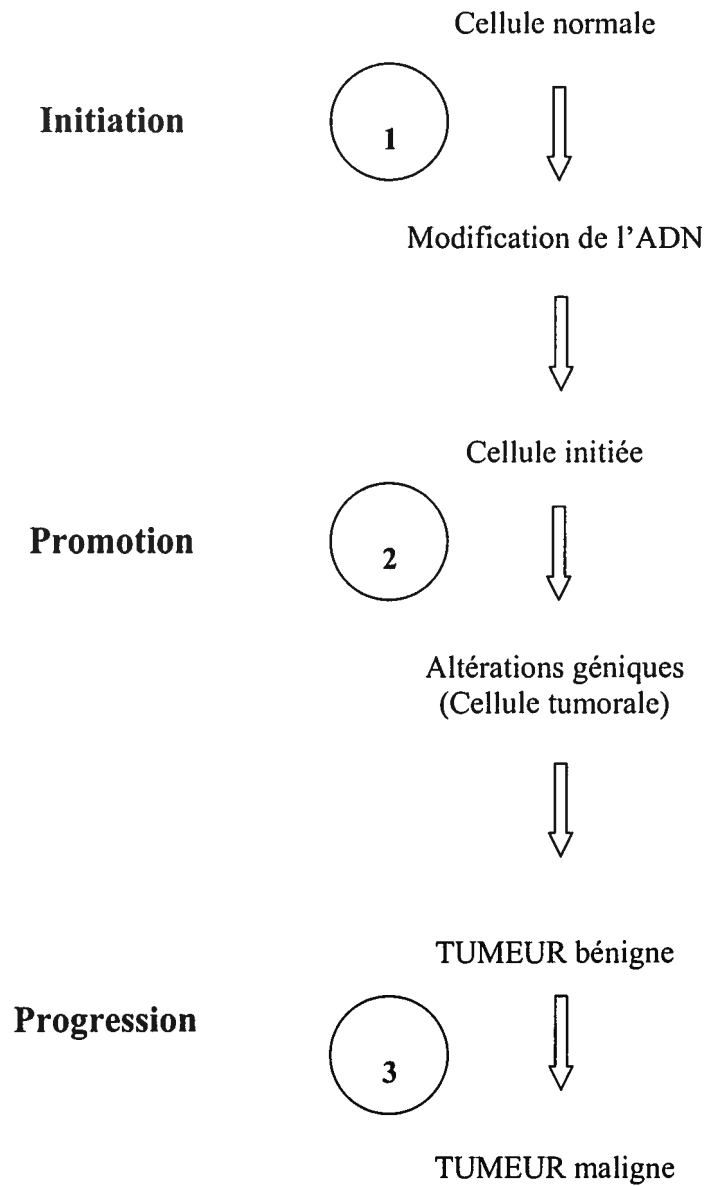


Figure 1.1. Processus de cancérisation

La cancérogenèse est un processus complexe pouvant être divisé en trois phases distinctes telles que l'initiation, la promotion et la progression d'une cellule normale en cellule cancéreuse.

ses (Alberts *et al.*, 1995). Cette étape de progression est aussi irréversible. Ce stade de transformation est considéré comme étant un processus menant au développement de néoplasmes pendant lequel les cellules acquièrent une croissance totalement autonome. Cette théorie de la cancérogenèse multi-stade est sans doute la plus complète et la plus connue des théories concernant la cancérisation. Il est évident que toutes ces étapes prennent plusieurs années voire plusieurs décennies pour se compléter.

1.1.2.1. Cancérogènes génotoxiques et épigénétiques

Plusieurs agents étant à l'origine de l'étiologie du cancer peuvent agir à différents niveaux du processus de cancérisation, soient en influençant le développement de la tumeur, en agissant directement sur l'acide déoxyribonucléotique (ADN), ou en contribuant à l'élaboration des conditions favorables dans la progression de la maladie. Les agents cancérogènes sont regroupés en deux classes distinctes: les cancérogènes génotoxiques et épigénétiques.

Les agents cancérogènes génotoxiques sont des substances directement capables de causer des mutations au niveau de l'ADN. Les radiations ultraviolets ainsi que les agents méthylants sont des exemples d'agents pouvant causer le cancer du sein en endommageant directement l'ADN (Phillips *et al.*, 2002). L'altération protéique, l'expression anormalement élevée d'une protéine cellulaire, la perte de signaux de dégradation, la réorganisation chromosomique, l'amplification génique, l'insertion virale dans un chromosome et la perte ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs représentent différents types de changements génétiques observés pouvant déclencher le cancer (Voet et Voet, 1998). Contrairement aux cancérogènes génotoxiques, les cancérogènes épigénétiques ne causent pas de mutations à l'ADN. Ces substances, telles que le phénobarbital et les hydroxytoluènes butylés, ont plutôt la capacité d'altérer l'expression de certains gènes ce qui aura pour conséquence de moduler la différenciation, la prolifération, l'organisation, les interrelations et la mort cellulaire (Klaassen *et al.*, 1996). En effet, une hausse de la prolifération cellulaire est un facteur important à la base de la promotion induite par ces cancérogènes. Une défaillance dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire promouvoit

la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. La malignité des tumeurs peut donc provenir d'altérations spécifiques.

1.1.2.2. Propriétés d'une cellule normale versus cancéreuse

Plusieurs propriétés phénotypiques différencient la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Par exemple, en culture cellulaire, les cellules normales en croissance forment une couche monocellulaire au fond du pétri puis cessent de se diviser par un processus appelé inhibition de contact. Contrairement à celles-ci, la croissance des cellules tumorales malignes n'est pas empêchée par les contacts intercellulaires; ces cellules en culture forment des couches multicellulaires. De plus, les cellules normales sont beaucoup plus limitées dans leur capacité à se reproduire que les cellules cancéreuses. En effet, les cellules normales en culture ne se divisent que 20 à 60 fois avant d'atteindre la sénescence et la mort, alors que les cellules cancéreuses sont immortelles ce qui signifie que le nombre de divisions cellulaires possibles est sans limite. La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est donc accompagnée d'une série complexe de changements structuraux, biochimiques et génétiques (Voet et Voet, 1998).

1.1.3. Cancérogenèse mammaire

Plusieurs données de compilation démontrent l'importance d'un type de cancer particulier dans la population canadienne, soit le cancer du sein. Les *Statistiques canadiennes sur le cancer 2002* démontrent qu'une femme sur neuf risque d'avoir le cancer du sein au cours de sa vie; une femme sur vingt-sept en mourra, sans compter tous les autres types de cancer, tels que le cancer de la prostate, du poumon, du côlon et du rectum qui feront plusieurs victimes. En somme, le cancer du sein est la forme de cancer la plus souvent diagnostiquée chez les canadiennes; près d'un cancer féminin sur trois est un cancer du sein (Société Canadienne du Cancer, 2003).

Il est primordial d'effectuer des études étiologiques pour mieux comprendre le phénomène de la cancérogenèse car pour pouvoir prévenir une maladie, il faut pouvoir connaître les causes qui l'origine. Dans le cas du cancer du poumon, la cigarette a été identifiée comme facteur prédominant responsable du développement de celui-ci. Des

études épidémiologiques ont démontré que 85% des gens atteints du cancer du poumon étaient des fumeurs, les autres étant souvent des fumeurs passifs (inhalation inconsciente de la fumée secondaire) (Société Canadienne du Cancer, 2003). Par contre, pour ce qui est du cancer du sein, il est difficile de déterminer une relation directe de cause à effet. Les études épidémiologiques permettent toutefois d'apporter des éléments de réponse. On peut ainsi découvrir non pas les causes mais plutôt les « facteurs de risque » du cancer du sein. Ainsi, des recherches épidémiologiques ont permis de déterminer certains facteurs de risque susceptibles de contribuer au développement du cancer du sein. D'après des études récentes, l'apport énergétique en excès, l'obésité, la consommation élevée en gras animal, l'alcool, les facteurs héréditaires, l'incidence selon les pays, les facteurs socio-économiques et la prise d'hormones favoriseraient l'augmentation des cancers du sein (Bonaïti-Pellié *et al.*, 2001; Trichopoulos *et al.*, 1996). Le cancer du sein est donc considéré comme un phénomène multifactoriel.

Un des principaux facteur de risque à considérer dans le développement de la maladie est sans aucun doute le facteur environnemental. Les études épidémiologiques ont observé une plus forte incidence du cancer du sein dans les pays grandement industrialisés qui sont, sans contredit, les plus potentiellement pollués (Trichopoulos *et al.*, 1996). Des études du *Réseau canadien du cancer du sein* ont démontré qu'au cours des dernières années, la production et la consommation de produits chimiques ont grandement augmenté et ne cessent de s'accroître. Ainsi, la recherche a permis de suggérer la possibilité d'une relation entre les produits chimiques et le risque de développer un cancer du sein. Étant de nature très persistante, on retrouve ces substances dans l'environnement et ce, à différents niveaux de la chaîne alimentaire. Par exemple, une grande variété de contaminants ont été détectés dans le lait maternel (Hoover, 1999). Cependant, les scientifiques ne s'entendent pas parfaitement sur l'association entre une exposition aux organochlorés et le risque de cancer du sein.

1.1.3.1. Implication de la régulation du cycle cellulaire dans la cancérisation

On ne peut parler de cancer du sein sans parler du phénomène de mort cellulaire programmée présent durant le développement embryonnaire, durant la croissance des glandes mammaires au cours de la puberté, durant le cycle oestrogénique et finalement

durant la sénescence des glandes mammaires. C'est en 1972 qu'un groupe de pathologistes a identifié un type de mort cellulaire, appelé apoptose (rétrécissement, condensation et fragmentation du noyau), différent morphologiquement du processus de dégénération par la nécrose cellulaire (enflure et rupture des cellules). La mort des cellules joue un rôle critique dans le développement des glandes mammaires normales et est plus que nécessaire pour équilibrer les périodes de prolifération cellulaire. Le contrôle du cycle cellulaire est basé sur deux familles de protéines soit la famille de protéines kinases cycline-dépendante (Cdk) et la famille des cyclines qui se lient aux molécules Cdk. L'activation et le désassemblage des complexes cycline-Cdk sont les principaux événements sur lesquels repose le cycle cellulaire (Alberts *et al.*, 1995). Une défectuosité dans l'initiation, dans l'exécution et dans la régulation de l'apoptose peut provoquer une accumulation des cellules épithéliales ou l'hyperplasie pré-maligne pouvant contribuer au développement néoplasique (Strange *et al.*, 2001). En effet, il a été observé qu'une inhibition de l'apoptose est responsable du processus de cancérisation (Yoganathan *et al.*, 2000). Ainsi, l'équipe de Weinberg (1996) suggère que le cycle cellulaire constitue l'un des éléments les plus importants à considérer pour l'intégrité de la cellule. Les mécanismes impliqués dans la régulation apoptotique et anti-apoptotique seront discutés en section 1.3.2.4.

1.1.3.2. Lignées de cellules mammaires en culture

Différents types de lignées cellulaires mammaires sont utilisés pour étudier les mécanismes cellulaires dans plusieurs domaines de recherche dont la cancérogenèse. Les lignées de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales ont la capacité de se reproduire et elles peuvent se cultiver *in vitro*. Les cellules MCF-10A utilisées dans cette recherche représentent un exemple de lignée de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales. Elles proviennent d'une femme de 36 ans qui a subi une mastectomie des tissus mammaires, plus particulièrement d'un tissu mammaire fibrocystique (Soule *et al.*, 1990). Ces cellules normales se sont transformées et modifiées, de façon spontanée, pour les rendre immortelles lorsqu'elles sont cultivées en culture. La concentration en ions calcium (Ca^{2+}) du milieu de culture a été abaissée afin d'augmenter la longévité des cellules. Ainsi, à partir de cellules épithéliales mammaires diploïdes mortelles (MCF-

10M), une croissance dans un milieu de culture réduit en Ca^{2+} a permis de générer une lignée de cellules immortelles comptant des cellules adhérentes, les MCF-10A et des cellules flottantes, les MCF-10F. Les cellules MCF-10A présentent des similitudes avec les cellules épithéliales mammaires humaines primaires, telles une absence de production de tumeur chez les souris immunodéficientes, une croissance en trois dimensions lorsqu'elles sont cultivées sur du collagène, une culture contrôlée par des traitements hormonaux, tels que des facteurs de croissance, et une adhérence entre les cellules. Cette lignée cellulaire se rapproche donc véritablement des cellules épithéliales mammaires normales et constitue un très bon modèle d'étude (Soule *et al.*, 1990).

Les cellules MCF-12A représentent une seconde lignée de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales issues d'une chirurgie sur une femme de 60 ans. Ces cellules sont de forme plus cuboïdales que les MCF-10A, mais elles présentent toutefois des caractéristiques semblables à celles-ci (Paine *et al.*, 1992). Ces deux lignées cellulaires sont donc considérées comme des bons modèles pour l'étude des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse mammaire étant donné les similarités rencontrées avec les cellules mammaires humaines primaires.

1.1.4. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Il existe deux classes de gènes susceptibles de jouer un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose et dans le mécanisme de cancérogenèse, soient les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Un oncogène est défini comme étant un gène actif qui promouvoit la transformation cellulaire (Dawkins *et al.*, 1993). On parle d'un protooncogène comme étant un gène normalement exprimé dans une cellule qui est nécessaire à la survie et à la croissance cellulaire. Lorsque celui-ci est muté, il devient un oncogène carcinogénique qui conduit à une multiplication excessive des cellules (Weinberg, 1996). Il existe plusieurs types d'oncogènes codant pour des protéines ayant un rôle dans la prolifération cellulaire telles que les facteurs de croissance, les récepteurs des facteurs de croissance, les transducteurs intracellulaires de signaux ou seconds messagers, les facteurs de transcription nucléaire et les protéines régulatrices du cycle mitotique (Alberts *et al.*, 1995).

Plusieurs oncogènes ont été associés à la cancérogenèse. Par exemple, une surexpression de *c-myc*, un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de l'apoptose et de la prolifération et de la différenciation cellulaire, a souvent été observée dans les tumeurs. La surexpression des protooncogènes *c-fos*, *c-jun* et *c-myc* a été associée à la prolifération excessive des cellules hépatiques (Fausto et Webber, 1993; Saeter et Seglen, 1990). De plus, l'oncogène *v-erb* code une version tronquée du récepteur de facteurs de croissance épidermique (c-erbB) qui possède un domaine tyrosine kinase intracellulaire continuellement actif; les protéines kinases codées par des oncogènes phosphorylent d'une manière inappropriée les protéines cibles normalement reconnues par les récepteurs de facteurs de croissance entraînant ainsi les cellules touchées dans un état de prolifération libre (Alberts *et al.*, 1995; Voet et Voet, 1998).

Contrairement aux oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs contribuent au développement de cancer en étant inactivés par des mutations. Ils perdent donc leurs fonctions de suppression et privent les cellules d'un arrêt crucial de prolifération, ce qui favorise l'apparition d'une croissance excessive inappropriée. Par exemple, le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) peut arrêter la croissance des différentes sortes de cellules normales (ex., cellules du côlon). La protéine antioncogène appelée gène du rétinoblastome (pRb) et la protéine p53 sont aussi des exemples qui constituent un frein majeur dans la division d'une cellule et dans l'induction de l'apoptose (Weinberg, 1996).

En somme, lorsqu'un oncogène est activé ou qu'un gène suppresseur de tumeur est inactivé, il y aura une perte de contrôle au niveau de la prolifération et de la différenciation cellulaire et de l'apoptose. Ces gènes viendront bouleverser l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose au sein de la cellule (voir Figure 1.2).

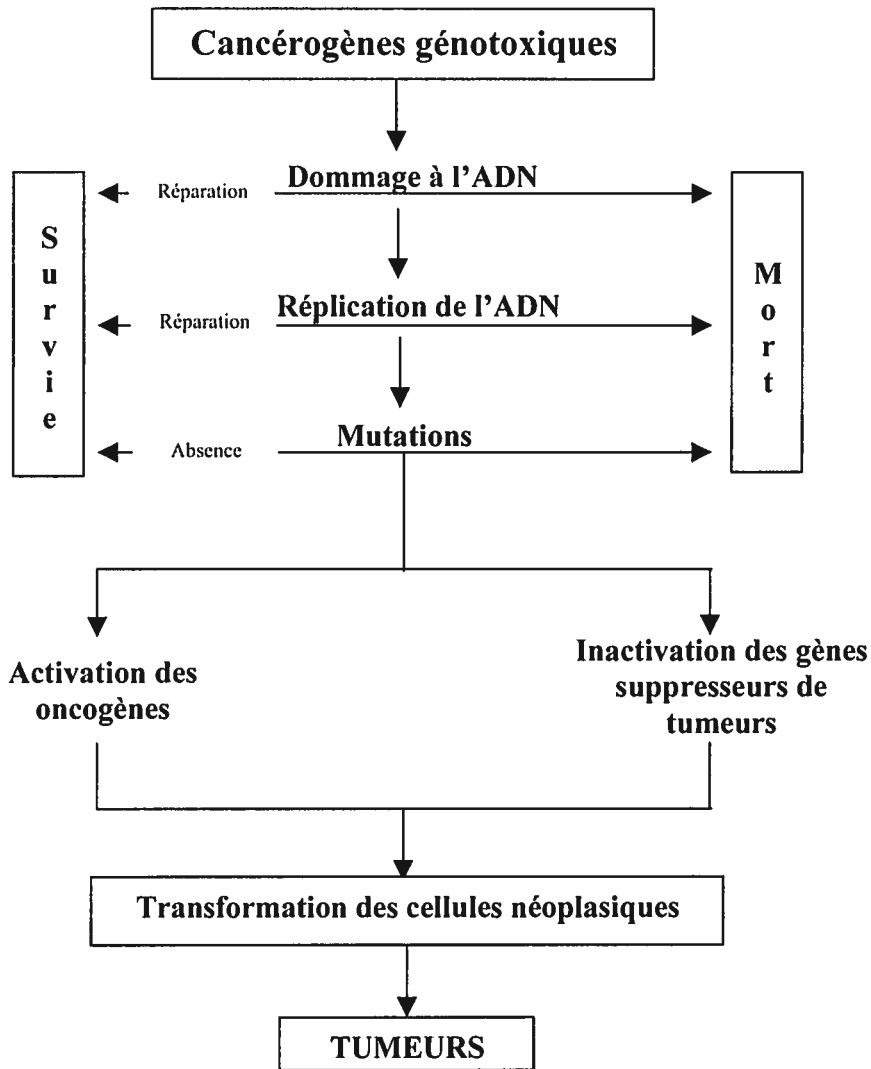


Figure 1.2. Processus de la cancérogenèse initié par les cancérogènes génotoxiques.

Des modifications chimiques et physiques peuvent induire la transformation néoplasique des cellules par des mécanismes génotoxiques et épigénétiques via l'activation des oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. (Figure inspirée de Klaassen *et al.*, 1996)

1.2. Polluants environnementaux

Le rôle des facteurs environnementaux dans l'étiologie du cancer du sein est étudié depuis plusieurs années. La pollution environnementale est composée de divers contaminants toxiques, incluant les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les amines aromatiques et les nitrosamines, pouvant endommager l'ADN après métabolisation. En absence de mécanismes de réparation efficaces, des aberrations moléculaires peuvent initier la cancérogenèse (Jeffy *et al.*, 2002). Dans la section suivante de ce mémoire, un mélange environnemental d'agonistes du récepteur AhR et l'hexachlorobenzène représentent deux exemples d'agents cancérogènes pouvant être à l'origine de la cancérisation.

1.2.1. Caractérisation chimique

1.2.1.1. Mélange d'agonistes du AhR

Dans le cadre de ce mémoire, un mélange d'agonistes du AhR composé d'une dose individuelle de 16 hydrocarbures polyhalogénés, soient de trois BPC, de sept PCDF et de six PCDD retrouvés dans le lait maternel humain, a été étudié. Ces derniers représentent une famille de contaminants environnementaux composée de 210 sous-produits toxiques dérivant de la combustion de matériau organique, contenant ou non du chlore. Ils peuvent aussi se former au cours de certains procédés chimiques (Inventaires des Dioxines et des Furannes, 1999). Leur structure chimique complexe rend ces contaminants de nature lipophile résistants à la dégradation.

1.2.1.2. Hexachlorobenzène

L'HCB est un hydrocarbure aromatique polyhalogéné de forme chimique C_6Cl_6 (voir Figure 1.3). Il est de nature lipophile, inerte, stable chimiquement et il s'accumule dans les organismes comme beaucoup d'autres contaminants environnementaux. Cet organochloré est un produit bioaccumulable qui est peu dégradé par les processus physiques ou chimiques environnementaux normaux (Sala *et al.*, 1999).

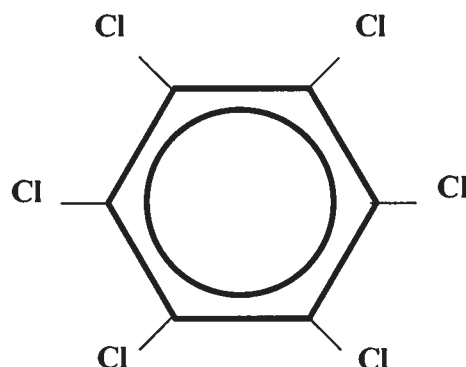


Figure 1.3. Structure chimique de l'hexachlorobenzène (HCB).

La molécule d'HCB est composée d'un anneau benzène aromatique portant un atome de chlore sur chacun de ses atomes de carbone (C_6Cl_6).

1.2.2. Utilisations et sources d'émission

1.2.2.1. Mélange d'agonistes du AhR

En général, les organochlorés sont ou ont été utilisés comme pesticides et, de ce fait, sont omniprésents dans l'environnement. Les BPC ont été manufacturés commercialement à partir de 1929 pour diverses applications. Ils ont été utilisés dans les transformeurs diélectriques et dans les systèmes hydrauliques, mais plus récemment utilisés dans la composition des huiles et des lubrifiants (Moysich *et al.*, 1998). Leur production a cessé aux États-Unis en 1977 dû aux effets néfastes rapportés sur la santé humaine. Les PCDD et les PCDF, quant à eux, sont aussi des contaminants toxiques omniprésents dans l'air, le sol, les sédiments et dans les organismes vivants même s'ils n'ont jamais été produits intentionnellement et qu'ils n'ont aucun usage spécifique connu. Ces substances représentent des sous-produits issus de diverses activités humaines telles que l'incinération des déchets, la fabrication de produits chimiques, le raffinage du pétrole, la combustion du bois et de l'essence. Aujourd'hui, la principale source de contamination du milieu naturel par les PCDD et les PCDF est l'incinération des résidus urbains (Gouvernement du Canada, 1999). Étant persistants dans l'environnement, ces contaminants tendent à s'accumuler dans les tissus adipeux des organismes vivants ce qui

a pour conséquence de se bioaccumuler dans les chaînons de la chaîne alimentaire, incluant l'humain (Oliver et Niimi, 1985).

1.2.2.2. Hexachlorobenzène

Au Canada, l'HCB a été utilisé entre 1948 et 1972 comme fongicide de plusieurs semences (blé, orge avoine et seigle) afin de prévenir les mycoses. Suite à des préoccupations pour l'environnement et la santé humaine, le Gouvernement Canadien a décidé en 1972 de le bannir. Ainsi, l'HCB ne sert plus dans le domaine du commerce au Canada même s'il est rejeté en faible quantité dans l'environnement canadien sous forme de sous-produits de la fabrication et de l'utilisation de solvants chlorés et de pesticides et sous forme d'émissions provenant d'incinérateurs et de procédés industriels. Une monographie préparée dans le cadre de la Loi Canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE) dénombre plusieurs utilisations indirectes de l'HCB. Par exemple, celui-ci a été utilisé dans la fabrication de pièces pyrotechniques, de balles traçantes, comme préservatif pour le bois et comme peptisant dans la production de caoutchouc nitroso et de caoutchouc au styrène (Gouvernement du Canada, 1993).

L'HCB est une substance persistante dans l'environnement qui s'est propagée dans toutes les régions du Canada. Ce contaminant a souvent été détecté dans les divers milieux auxquels peuvent être exposés les humains et d'autres organismes, que ce soit dans l'eau, le sol, les sédiments, les précipitations, et se retrouve en particulier dans les tissus adipeux. L'HCB se retrouve partout dans l'environnement canadien à cause de sa mobilité et de sa grande résistance à la dégradation. Un fois capturé par sédimentation, il a tendance à s'accumuler et à devenir emprisonné par les sédiments. Ainsi, les organismes bioaccumulent l'HCB provenant de l'eau et de leur alimentation via contamination de la chaîne alimentaire (Gouvernement du Canada, 1993).

De plus, l'absorption de l'HCB suite à une exposition via l'alimentation se fait à 98% principalement sous forme de produits laitiers. Il a été estimé que les doses moyennes d'HCB consommées par la population canadienne générale varient de 214 ng/kg/jour chez les nouveaux-nés allaités à 2,8 ng/kg/jour chez les adultes. Si l'on suppose une durée de vie de 70 ans, on estime à 6,2 ng/kg/jour, moyenne calculée sur

toute une vie, la dose journalière totale de HCB absorbée par la population générale (Gouvernement du Canada, 1993).

1.2.3. Épidémiologie et cancer du sein induit par les organochlorés

Tout d'abord, aucune étude n'a été rapportée jusqu'à présent sur l'effet toxique du mélange d'agonistes du AhR particulier qui a été confectionné spécifiquement pour réaliser les travaux de ce mémoire. Par contre, plusieurs recherches sur les composantes de ce mélange ont été identifiées. En effet, 33 articles scientifiques présentant les données de 26 études différentes ont été répertoriés pour examiner particulièrement la relation entre l'exposition environnementale aux organochlorés et le risque de développer un cancer du sein (Woolcott et Aronson, 2001). Ces études épidémiologiques suggèrent que les BPC en général sont incapables d'induire l'augmentation de l'incidence de tumeurs mammaires (Golden *et al.*, 1998). Cependant, il a été démontré que certains congénères des BPC, tels que le 118 (Aronson *et al.*, 2000; Dorgan *et al.*, 1999) et le 138 (Aronson *et al.*, 2000; Hoyer *et al.*, 2000) pourraient augmenter le risque de développer des tumeurs mammaires. Ces divergences suscitent donc la controverse concernant la plausibilité biologique que ces organochlorés peuvent affecter le risque de cancer du sein.

Malgré le bon nombre d'articles scientifiques répertoriés depuis 1976, l'association entre une exposition aux organochlorés et le risque de cancer du sein n'est pas consistante (Davidson et Yager, 1997). Des études dans différentes régions du monde telles que les Etats-Unis, le Canada, l'Asie, l'Europe et le Sud de l'Afrique ont été rapportées. En général, aucune association entre le risque de cancer du sein et une exposition aux BPC n'a été identifiée, à l'exception des études de Wasserman *et al.* (1976) et de Falck *et al.* (1992) et d'une plus importante étude de Wolff *et al.* (1993) qui suggèrent cette association. En effet, les résultats expérimentaux de cette dernière étude montrent que le niveau moyen de BPC détecté dans les tissus mammaires des patientes New-Yorkaise ayant le cancer du sein (58 femmes malades) est supérieur (35% plus élevé) à celui des patientes témoins (171 femmes en santé). Cependant, l'étude plus récente de Gammon *et al.* (2002) ne supporte pas l'hypothèse qu'une exposition aux organochlorés (BPC) augmente le risque de cancer du sein chez 646 patientes malades contre 429 patientes témoins dans le Long Island.

Des recherches expérimentales ont de plus démontré l'effet toxique des composés aromatiques tricycliques chlorés, tels que les PCDD et PCDF, chez diverses espèces animales; la plupart de ces études ont été réalisées avec la 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dibenzo-dioxine (2,3,7,8-TCDD), l'un des composés chimiques les plus toxiques pour l'animal (Inventaires des dioxines et des Furannes, 1999). Les doses létales (DL50), bien que variant de façon considérable selon les espèces, s'échelonnent de 0,0006 mg/kg chez le cobaye à 3 mg/kg chez le hamster. Sur le plan toxicologique, chez l'animal, ces produits engendrent une faible toxicité aiguë, en revanche, leur toxicité consécutive à une exposition chronique est bien connue (Agence Française de Sécurité des Aliments, 1998). Parmi les multiples congénères, la 2,3,7,8-TCDD est cancérigène pour les rats et les souris. Malgré le peu de données toxicologiques chez l'humain, c'est en 1997 que cette substance fut reconnue comme cancérigène pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer. En effet, de nombreuses études épidémiologiques en cours prétendent que la 2,3,7,8-TCDD est à l'origine de l'augmentation de certains types de cancers chez les personnes exposées (Agence Française de Sécurité des Aliments, 1998).

Par la suite, plusieurs études effectuées chez des animaux de laboratoire, majoritairement chez le rat, ont déterminé les effets toxiques associés à une exposition à l'HCB. Les doses utilisées, les voies d'exposition et les périodes d'exposition varient beaucoup d'une étude à l'autre (doses entre 5 mg/kg/jour et 1300 mg/kg/jour, pendant 6 à 12 semaines, chaque jour ou aux deux jours), ce qui mène à une panoplie de symptômes chez les animaux traités (Gouvernement du Canada, 1993). Ce contaminant environnemental est ainsi considéré comme une « substance toxique sans seuil d'exposition », ce qui signifie qu'elle peut avoir un effet nocif sur la santé à n'importe quel niveau d'exposition. C'est donc à partir de ces considérations que le ministre de l'Environnement et le ministre de la Santé nationale et du Bien-être social ont conclu que les concentrations d'HCB présentes dans l'environnement au Canada peuvent constituer un grand danger pour l'environnement, la vie et la santé humaine.

Un rapport présentant une dizaine d'études scientifiques depuis les dernières années a relaté l'effet potentiel de l'HCB sur le développement du cancer du sein chez l'humain (Woolcott et Aronson, 2001). Deux d'entre elles suggèrent une association positive entre une exposition à l'HCB et le risque de cancer du sein sur la base de

concentrations plus élevées d'HCB dans le plasma des patientes malades (Dewailly *et al.*, 1994; Dorgan *et al.*, 1999). Par contre, aucune association n'a pu être identifiée dans les autres études (Falck *et al.*, 1992; Guttus *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1998; Moysich *et al.*, 1998; Mussalo-Rauhamaa *et al.*, 1990). En effet, l'étude de Zheng *et al.* (1999) a été effectuée chez 304 cas de patientes atteintes de cancer du sein et chez 186 cas témoins au Connecticut entre 1994 et 1997 pour examiner l'association entre les niveaux d'HCB retrouvés dans les tissus adipeux mammaires et l'incidence du cancer du sein. Aucune association positive entre l'exposition environnementale à l'HCB et le risque de cancer du sein n'a été identifiée. Finalement, deux études plus récentes rapportent l'absence d'association entre une exposition à l'HCB et le risque de cancer du sein (Aronson *et al.*, 2000; Stellman *et al.*, 2000).

Une des raisons majeures de l'impossibilité à démontrer hors de tout doute la relation existante entre une exposition à ces deux contaminants et l'incidence du cancer du sein est sans contredit l'absence de la mesure véritable de l'exposition à ces organochlorés durant le développement de la glande mammaire. Les humains sont exposés dès leur plus jeune âge au facteur environnemental. En plus de la bioaccumulation des contaminants dans les tissus adipeux et du transfert de ces éléments via la lactation, des changements reproductifs et endocriniens peuvent survenir tout au long du cheminement physiologique de la femme (puberté, grossesse, ménopause) ce qui peut influencer la susceptibilité à développer un cancer du sein. En effet, la proportion de femmes ayant connue une grossesse et la variation de la durée de l'allaitement de leur bébé varient selon les études. Ainsi, l'utilisation des mesures d'expositions cumulatives ne reflète pas la véritable période de risque de développer un cancer du sein. Ces observations, selon plusieurs auteurs, modifient l'effet des organochlorés sur les risques de cancer du sein (Woolcott et Aronson, 2001). Ainsi, ce phénomène rend difficile la prise de données correspondant véritablement à la quantité d'un contaminant à une période donnée. Ce biais méthodologique doit donc être considéré dans l'extrapolation des résultats.

1.2.3.1. Hypothèses des mécanismes cancérigènes

Deux principales voies ont été rapportées pour déterminer le potentiel cancérigène de ces organochlorés. Premièrement, ces contaminants peuvent agir directement en tant qu'agents cancérigènes: des études portant sur l'effet toxique des BPC démontrent que ceux-ci favorisent le développement de cancer du foie chez les rats par une induction du cytochrome P450 (International Agency for Research of Cancer, 1978 et 1991). Cette modulation est suspectée dans l'étiologie de certains cancers humains. De plus, ces produits sont des agonistes pour un facteur de transcription, le récepteur aux hydrocarbures polycycliques (Institute of Medicine, 1996). Deuxièmement, les agents cancérigènes peuvent agir via des mécanismes hormonaux. En effet, la principale hypothèse étiologique du cancer du sein est reliée à l'exposition cumulative des hormones ou des autres substances agissant en tant qu'hormones (Henderson *et al.*, 1991; Henderson et Feigelson, 2000). Certains de ces organochlorés peuvent exercer une action oestrogénique qui pourrait être responsable de l'incidence du cancer du sein.

Les oestrogènes endogènes jouent un rôle critique dans la prolifération cellulaire et la croissance des tissus. En effet, cette hormone est un facteur prédominant dans la pathogenèse du cancer du sein en agissant en tant que promoteur ou cocarcinogène par opposition à un rôle d'initiateur de tumeurs. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les oestrogènes provoquaient des effets mitogènes sur les cellules épithéliales mammaires par une augmentation du nombre de cellules normales, par une prolifération anarchique des cellules ou par la présence d'altérations dans le contrôle de la croissance des cellules malignes ou pré-malignes (Alberts *et al.*, 1995). Une étude de Hoyer *et al.* (1998) démontre clairement que plusieurs autres organochlorés, tels que le 2,2-bis(p-chlorophényl)-1,1,1-trichloroéthane (DDT), le chlordane, la lindane et la dieldrine peuvent provoquer un désordre du système endocrinien. Cette étude a pour but d'évaluer si un haut taux de ces composés, potentiellement oestrogéniques, dans le sérum représente un risque élevé dans le développement du cancer du sein. En effet, la dieldrine qui a des effets oestrogéniques peut augmenter les risques de cancer du sein (Hoyer *et al.*, 1998). Cette hypothèse de l'oestrogénicité ne sera cependant pas étudiée dans ce mémoire.

1.2.3.2. Résumé épidémiologique

Les études épidémiologiques, bien qu'elles ne puissent établir et clarifier correctement les mécanismes de toxicité, ont le pouvoir de fournir des estimations directes dans l'association entre l'exposition à un contaminant et le risque de cancer du sein. Cependant, les renseignements présents à l'heure actuelle ne suffisent pas pour évaluer le pouvoir cancérigène du mélange d'agonistes du AhR et de l'HCB chez les êtres humains. Ces études ne peuvent supporter une relation de cause à effet entre une exposition aux organochlorés et le développement de cancer du sein. Ce jugement est basé sur l'inconsistance entre les résultats des études épidémiologiques et l'absence d'informations majeures nécessaires aux analyses expérimentales. Des recherches attentives et suivies continuent de progresser dans le but d'élucider cette hypothèse controversée. Il est maintenant plus qu'important d'étudier les répercussions de ces substances toxiques au niveau cellulaire pour une meilleure compréhension. La section suivante est consacrée aux éléments impliqués spécifiquement dans la signalisation des cellules épithéliales mammaires non tumorales et à leur implication dans la cancérogenèse. Elle offre un résumé substantiel des connaissances sur les récepteurs et les médiateurs susceptibles de modifier, de près ou de loin, les mécanismes de cancérisation.

1.3. Signalisation cellulaire

Les mécanismes permettant à une cellule d'influencer le comportement d'autres cellules ont certainement existé dans le monde des organismes unicellulaires bien avant que les organismes pluricellulaires n'apparaissent sur la terre. Ce concept provient de plusieurs études faites chez les eucaryotes unicellulaires actuels, telle que la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que les cellules mènent normalement des vies indépendantes, elles peuvent communiquer et influencer la prolifération des autres cellules en vue d'une conjugaison (accouplement cellulaire). Alors que les levures sécrètent un facteur de conjugaison peptidique pour activer la conjugaison, les cellules des animaux supérieurs communiquent au moyen de centaines de molécules telles que des protéines, des petits peptides, des acides aminés, des nucléotides, des stéroïdes, des rétinoïdes et des dérivés d'acides gras. La plupart de ces molécules sont sécrétées par la *cellule de transmission* par exocytose, libérées par diffusion à travers la membrane plasmique ou restent solidement fixées à la surface de la cellule pour agir directement avec les cellules avoisinantes. Quelle que soit la nature du signal, la *cellule cible* répond au moyen d'une protéine spécifique appelée récepteur. Ce récepteur fixe spécifiquement la molécule de transmission et il initie ensuite une réponse dans la cellule cible. Dans la majorité des cas, les récepteurs sont des protéines transmembranaires présentes à la surface de la cellule cible qui fixent une molécule extracellulaire appelée ligand. Une fois la fixation accomplie, les récepteurs deviennent activés de telle sorte qu'ils génèrent une cascade de signaux intracellulaires qui modifient le comportement de la cellule (Alberts *et al.*, 1995).

1.3.1. Récepteur membranaire

Il existe trois classes de récepteurs protéiques de surface: les récepteurs couplés aux canaux ioniques, couplés aux protéines G et ceux possédant une activité enzymatique. Les récepteurs à activité enzymatique sont des protéines transmembranaires qui présentent leur domaine de liaison au ligand à la face externe de la membrane plasmique. Leurs domaines cytoplasmiques possèdent une activité enzymatique intrinsèque qui s'associent directement à une enzyme. Les signaux reçus à la surface cellulaire par ces

récepteurs sont souvent transmis au noyau où ils modifient l'expression de gènes spécifiques et donc le comportement de la cellule (Alberts *et al.*, 1995). Cette section présente la façon dont opèrent les récepteurs de facteurs de croissance, un exemple de récepteurs couplés à une activité enzymatique. Les membres de la famille erbB font partie de la classe des récepteurs à activité tyrosine kinase.

1.3.1.1. Caractérisation des récepteurs de la famille erbB

Les récepteurs de facteurs de croissance épidermique structurellement reliés aux récepteurs à activité tyrosine kinase font partie de la famille des récepteurs erbB. Leur implication est cruciale au niveau de la prolifération, de la différenciation et de la survie des cellules normales et ils influencent directement l'apoptose, l'angiogénèse, la motilité et l'invasion des cellules épithéliales (de Bono et Rowinsky, 2002). Les membres de la famille erbB jouent donc un rôle majeur dans les mécanismes de la cancérogenèse.

Il existe quatre membres de la famille des récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinase (erbB) identifiés comme suit : le récepteur erbB1 (EGFR ou HER-1), le récepteur erbB2 (HER2 ou Neu), le récepteur erbB3 (HER3) et le récepteur erbB4 (HER4). Le premier récepteur reconnu comme étant une protéine ayant une activité kinase spécifique aux tyrosines a été le récepteur de facteur de croissance de l'épiderme (EGFR). L'EGFR est une protéine d'environ 1200 acides aminés qui stimule la prolifération des cellules épidermiques et d'une grande variété d'autres cellules. Ce récepteur est caractérisé par la présence d'un seul domaine transmembranaire et d'une grande partie extracellulaire glycosylée qui fixe le facteur de croissance de l'épiderme, l'EGF (Alberts *et al.*, 1995). Son domaine cytoplasmique est divisé en deux régions, soit le domaine tyrosine kinase et le domaine carboxyl terminal à 200 acides aminés contenant quatre résidus tyrosine qui sont les sites d'autophosphorylation par la kinase (Dougall *et al.*, 1993). Des ligands connus, tels que le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α), l'héparine, les facteurs de croissance, la bêta-celluline et l'amphiréguline peuvent lier le récepteur de l'EGF de surface ce qui provoquera son activation. Il présente un poids moléculaire de 170 kDa (Lohrisch et Piccart, 2001). Le erbB1 présente des homologies avec les autres membres de sa famille, tel que le erbB2 (Hung et Lau, 1999). Finalement, le EGFR est surexprimé dans le développement adulte de plusieurs types cellulaires et

certaines études démontrent que sa présence dans les cellules mammaires cancéreuses est associée à un mauvais pronostic de la patiente atteinte de la maladie (Slichenmyer et Fry, 2001).

Le erbB2 est le deuxième membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase; il possède une similarité dans sa structure et dans sa fonctionnalité avec le EGFR. Ce gène a été découvert en premier chez les neuroblastomes de rat induits par l'éthylnitrosourea et a été ainsi appelé *neu* (Lupu *et al.*, 1996). ErbB2 est localisé sur le chromosome p17 et code pour une glycoprotéine monomérique transmembranaire d'un poids moléculaire de 185 kDa qui a une activité tyrosine kinase. Il est composé de trois domaines distincts: un domaine extracellulaire de 640 acides aminés incluant deux sous-domaines riches en cystéine, une hélice transmembranaire amphipathique de 24 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 580 acides aminés qui inclut le domaine tyrosine kinase pour l'autophosphorylation des sites (Dougall *et al.*, 1993). Les ligands pouvant se lier à erbB2 n'ont pas encore été identifiés clairement, mais certains ont le potentiel de joindre les membres de la famille erbB, tels que le facteur de différenciation neu « neu differentiation factor (NDF)» ou héréguiline, par un phénomène indirect d'hétérodimérisation qui sera décrit plus loin. Le erbB2 présente des similarités structurales avec le EGFR de la même famille; le domaine extracellulaire de erbB2 présente 40% d'homologie avec le EGFR, alors que sa région intracellulaire présente environ 85% d'homologie avec celui-ci (Dawkins *et al.*, 1993).

Une association solide entre la positivité de cette oncoprotéine (protooncogène) est corrélée avec un mauvais pronostic chez les patientes qui ont le cancer du sein (Harris *et al.*, 1999). Les cellules épithéliales mammaires normales possèdent deux copies du gènes HER2 et elles ont entre 20 000 et 50 000 récepteurs erbB2. Contrairement à celles-ci, les cellules tumorales qui surexpriment erbB2 ont plus de deux millions de récepteurs erbB2. La surexpression de erbB2 se retrouve dans 25% à 30% des cas de cancers du sein invasifs et dans 50% des cas de cancers du sein inflammatoires ce qui indique son grand rôle dans la pathogenèse cellulaire (Liu *et al.*, 1999). La surexpression de ce récepteur est aussi identifiée dans plusieurs autres types de tumeurs, tels le cancer de la vessie (de 27% à 63%), du pancréas (31% à 80%), des ovaires (18% à 43%), de l'endomètre (10% à 52%), du colon (33% à 85%), de l'œsophage (10% à 26%) et de la prostate (5% à 46%)

(Lohrisch et Piccart, 2001). Le fait que le taux de survie et le temps de rechute d'une patiente surexprimant erbB2 soit beaucoup plus court que celui d'une patiente ne le surexprimant pas démontre sans contredit que cet oncogène est un marqueur d'un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Hung et Lau, 1999). En somme, l'expression du récepteur EGFR et la forte surexpression de erbB2 sont associées avec le développement de la maladie. La section 1.3.1.3 de ce mémoire discutera de leur implication au niveau du processus de cancérisation.

Le erbB3 est le troisième membre de cette famille. Il s'agit d'une glycoprotéine dont le poids moléculaire est de 180 kDa et qui a une similarité structurale aux récepteurs EGFR et erbB2. Un ligand spécifique tel que le NDF se lie directement au récepteur erbB3 (Ram *et al.*, 1995). Il se retrouve dans les tissus adultes et fœtaux normaux, dans un certain nombre de tumeurs primaires et dans plusieurs lignées de cellules tumorales. Il jouerait lui aussi un rôle dans la pathogenèse puisqu'une forte expression de erbB3 est associée à un faible taux de survie chez les patientes présentant des anomalies au niveau du poumon, les NSCLC « non-small cell lung cancer » (Hung et Lau, 1999). Selon deFazio *et al.* (2000), erbB3 serait exprimé dans une proportion significative dans les tissus mammaires cancéreux. De plus, le erbB3 a une fonction particulière au niveau du système nerveux périphérique et dans la formation des synapses neuromusculaires. En somme, la littérature a démontré qu'environ 1/5 des cancers totaux semble surexprimer le erbB3 (Gullick et Srinivasan, 1998).

Le erbB4 est le dernier membre de la famille des récepteurs erbB. Il code pour une protéine tyrosine kinase transmembranaire de 180 kDa. Son domaine extracellulaire présente une forte similarité au erbB3, alors que son domaine cytoplasmique est très homologue aux récepteurs erbB2 et EGFR. Le ligand NDF est aussi capable de lier directement le erbB4. Ce récepteur est exprimé normalement dans plusieurs tissus humains et dans certaines lignées de cellules mammaires humaines présentant des carcinomes (Hung et Lau, 1999). Des études indiquent que le erbB4 est exprimé durant le développement normal des souris et qu'il se retrouve principalement dans le système nerveux central et dans le cœur. Finalement, des données expérimentales ont montré qu'il y a présence modérée du récepteur erbB4 dans les cellules épithéliales mammaires, dans les cellules myoépithéliales et épithéliales ductales (Gullick et Srinivasan, 1998). La

Figure 1.4 présente un résumé schématique des quatre membres de la famille des récepteurs de facteurs de croissance erbB identifiant les ligands, les domaines et l'homologie structurale spécifiques à chacun.

1.3.1.2. Caractérisation du récepteur Ah

Il existe un autre type de récepteur qui pourrait jouer un rôle fondamental dans les mécanismes de toxicité des polluants environnementaux, soit le récepteur aux hydrocarbures polycycliques (AhR), structurellement apparenté aux récepteurs nucléaires. Le récepteur AhR est un facteur de transcription activé par des ligands qui influence la transcription de plusieurs gènes et médie l'induction des dommages à l'ADN, l'arrêt de croissance et l'apoptose dans les systèmes cellulaires (Jeffy *et al.*, 2002). Des études rapportent que l'effet toxique de plusieurs contaminants, tels que les HAP, les PCDD et les PCDF, seraient presque entièrement attribuables à leurs actions sur le récepteur Ah, protéine présente chez les mammifères, les oiseaux et les poissons (Clark *et al.*, 1992). Ces substances et certains congénères des biphényles polychlorés sont de puissants ligands et activateurs du récepteur Ah.

Il a été démontré chez la souris que les effets de la 2,3,7,8-TCDD semblent passer par l'activation du récepteur Ah qui initie une cascade d'événements impliquant différentes voies de signalisation (protéines kinases, phosphatases, etc.) (Klaassen *et al.*, 1996; Pohanvirta *et al.*, 1988). En absence de ligand extérieur, le récepteur Ah, sous forme quiescente, migre du noyau au cytosol lorsque complexé à la protéine de choc thermique 90 (hsp90) dans le cytosol (Pratt, 1997). La protéine chaperone agit sur des segments particuliers du récepteur Ah, tels que le b-HLH et le PAS, pour préserver la capacité d'interaction avec l'ADN, la fonctionnalité du site de fixation du ligand et la capacité d'hétérodimérisation avec la Arnt (*AhR nuclear translocator*) (Coumailleau *et al.*, 1995). La liaison d'un ligand au récepteur augmente le taux d'exportation du récepteur vers le noyau. La phosphorylation du AhR est importante pour sa fixation à l'ADN, alors que la phosphorylation de Arnt influencerait sa capacité de dimérisation.

L'activation du signal Ah nécessite la translocation du récepteur vers le noyau et il y a association protéique subséquente pour former un complexe. Ce dernier influencera l'expression des gènes via des interactions faites par des xénobiotiques pouvant altérer la

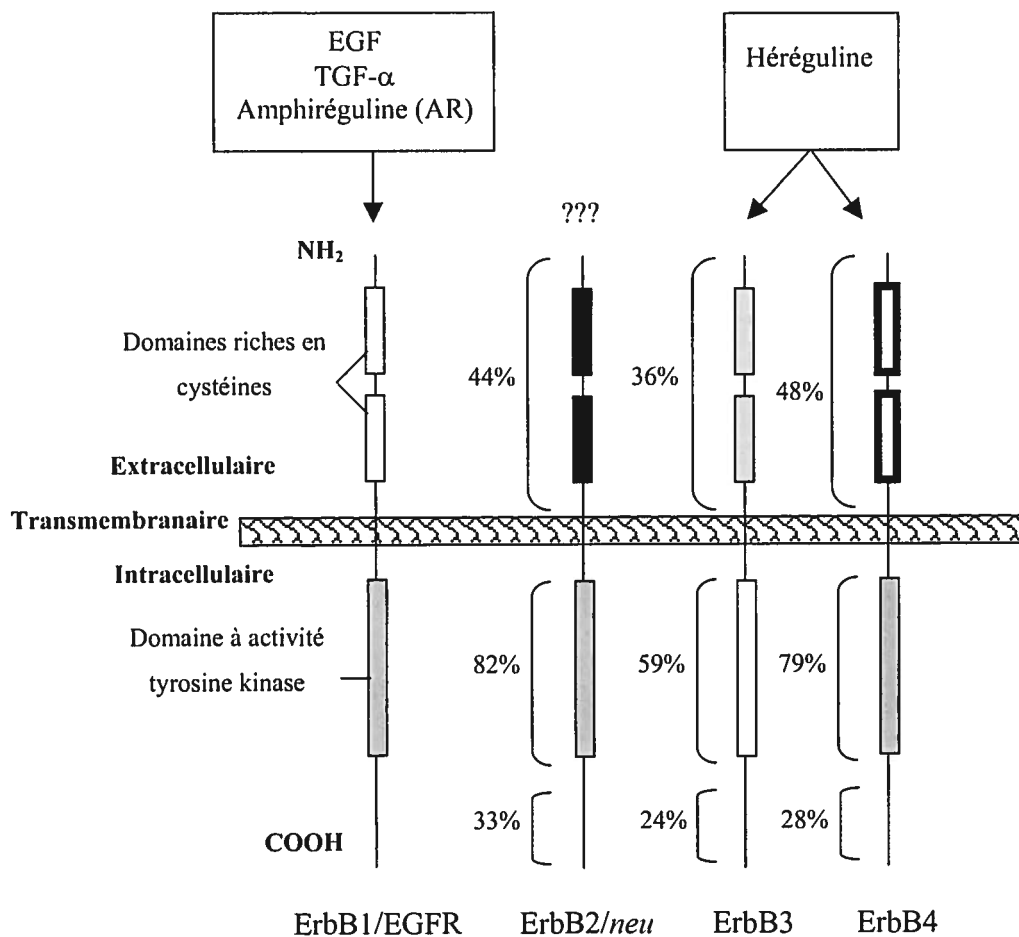


Figure 1.4. Comparaison schématique des domaines d'homologie présents entre le récepteur à l'EGF et les autres membres de la famille des récepteurs de facteurs de croissance.

Représentation des quatre membres de la famille des récepteurs erbB et de leurs ligands respectifs. Aucun ligand spécifique n'a été identifié jusqu'à maintenant pour le erbB2 et aucune activité tyrosine kinase n'est présente chez le erbB3. (Figure inspirée de Dougall *et al.*, 1993 et de Earp *et al.*, 1995)

structure de la chromatine, ce qui facilitera l'accès aux facteurs de transcription. Par exemple, les HAP représentent des facteurs de risque potentiels pour la cancérogenèse mammaire. L'exposition aux HAP cible l'expression des protéines régulatrices impliquées dans la détoxification et la réparation de l'ADN. La susceptibilité des HAP peut être influencée par les facteurs endogènes tels que les récepteurs à l'œstrogène, les récepteurs Ah, la famille des enzymes P450 et la protéine p53. Ces facteurs peuvent moduler l'expression du gène de transcription BRCA-1 soit en engendrant la perte d'expression de ce gène, en empêchant la réparation de l'ADN endommagée ou en dérégulant le cycle cellulaire, ce qui provoque une transformation néoplasique (Jeffy *et al.*, 2002).

1.3.1.3. Implication des récepteurs erbB dans le processus de cancérisation

La famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermique joue un rôle considérable dans la cancérogenèse mammaire et dans le développement des métastases. L'activation de ces récepteurs à activité tyrosine kinase est fortement impliquée dans le développement et la progression de plusieurs types de cancers humains (Kim et Muller, 1999). L'expression et l'amplification oncogénique ont été étudiées pour définir les corrélations moléculaires possibles entre le mauvais pronostic et le comportement clinique du cancer du sein.

Plusieurs études expérimentales suggèrent que la famille des récepteurs erbB joue un rôle complexe dans la signalisation cellulaire. Comment la liaison d'un ligand à la partie extracellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase peut-elle activer le domaine catalytique de l'autre côté de la membrane plasmique et amorcer la cascade de signalisation cellulaire? L'énigme a été résolue lorsqu'on a démontré que la liaison du ligand EGF (monomère) sur le récepteur de l'EGF provoquait la dimérisation de ce récepteur en dimère, rendant les deux domaines intracellulaires capables de se phosphoryler mutuellement sur de multiples résidus tyrosine. Cette liaison semble induire une modification de conformation de la partie extracellulaire de son récepteur provoquant ainsi sa dimérisation. Cette transphosphorylation est appelée autophosphorylation car elle se produit à l'intérieur d'un dimère du récepteur.

Une des particularités les plus intéressantes des membres de la famille de l'EGF est leur capacité à interagir entre eux principalement grâce à l'hétérodimérisation de leurs récepteurs respectifs. On définit plus spécifiquement l'hétérodimérisation comme étant un phénomène initié par la liaison d'un ligand au récepteur causant des liaisons croisées avec les membres de la famille des récepteurs, erbB par exemple, ce qui crée un système complexe de transduction des signaux. La liaison de leur ligand respectif conduit donc à la formation d'homodimères et/ou d'hétérodimères de récepteurs et à l'activation des tyrosine kinases (Suo *et al.*, 2002). Les hétérodimères retrouvés dans le tissu tumoral humains, tels que le EGFR/erbB2, le erbB2/erbB3, le erbB2/erbB4 et le erbB3/erbB4, ont été identifiés dans la littérature récente; le récepteur erbB2 étant le partenaire le plus souvent dimérisé (Klapper *et al.*, 1997; Suo *et al.*, 2002). Il est unique en son genre car il n'a aucune affinité avec un ligand spécifique. Par exemple, les membres de la famille erbB sont capables de former des hétérodimères et de se transphosphoryler en présence du facteur NDF ou de l'EGF. Le ligand NDF peut lier directement le erbB3 et sa coexpression avec le erbB2 formera un complexe qui reconstitue un récepteur de forte affinité pour le NDF. Il peut alors stimuler la prolifération des cellules mammaires et ovariennes (Hung et Lau, 1999).

Une étude de Dougall *et al.* (1993) indique qu'un complexe d'hétérodimères composé de erbB2 et de EGFR a été détecté chez des cellules cancéreuses mammaires SKBR-III. L'interaction physique de erbB2 et EGFR promouvoit ainsi l'augmentation de la prolifération cellulaire. Plusieurs observations récentes ont aussi suggéré le fait que le récepteur erbB2 peut avoir comme partenaire d'hétérodimérisation le EGFR pour promouvoir le développement de tumeurs mammaires (Troyer et Lee, 2001). Ainsi, dans les cellules épithéliales normales ayant un faible niveau de récepteur erbB2, il y a formation de quelques complexes d'hétérodimères avec celui-ci, ce qui résulte en une croissance normale car la signalisation sera faible. Par contre, dans les cas de tumeurs qui surexpriment le erbB2, plusieurs complexes hétérodimères sont formés ce qui provoque un plus fort potentiel de signalisation intracellulaire et une augmentation de la croissance maligne (Lohrisch et Piccart, 2001) (voir Figure 1.5). Une fois la formation des homodimères ou des hétérodimères complétée par la présence de ligands spécifiques et de

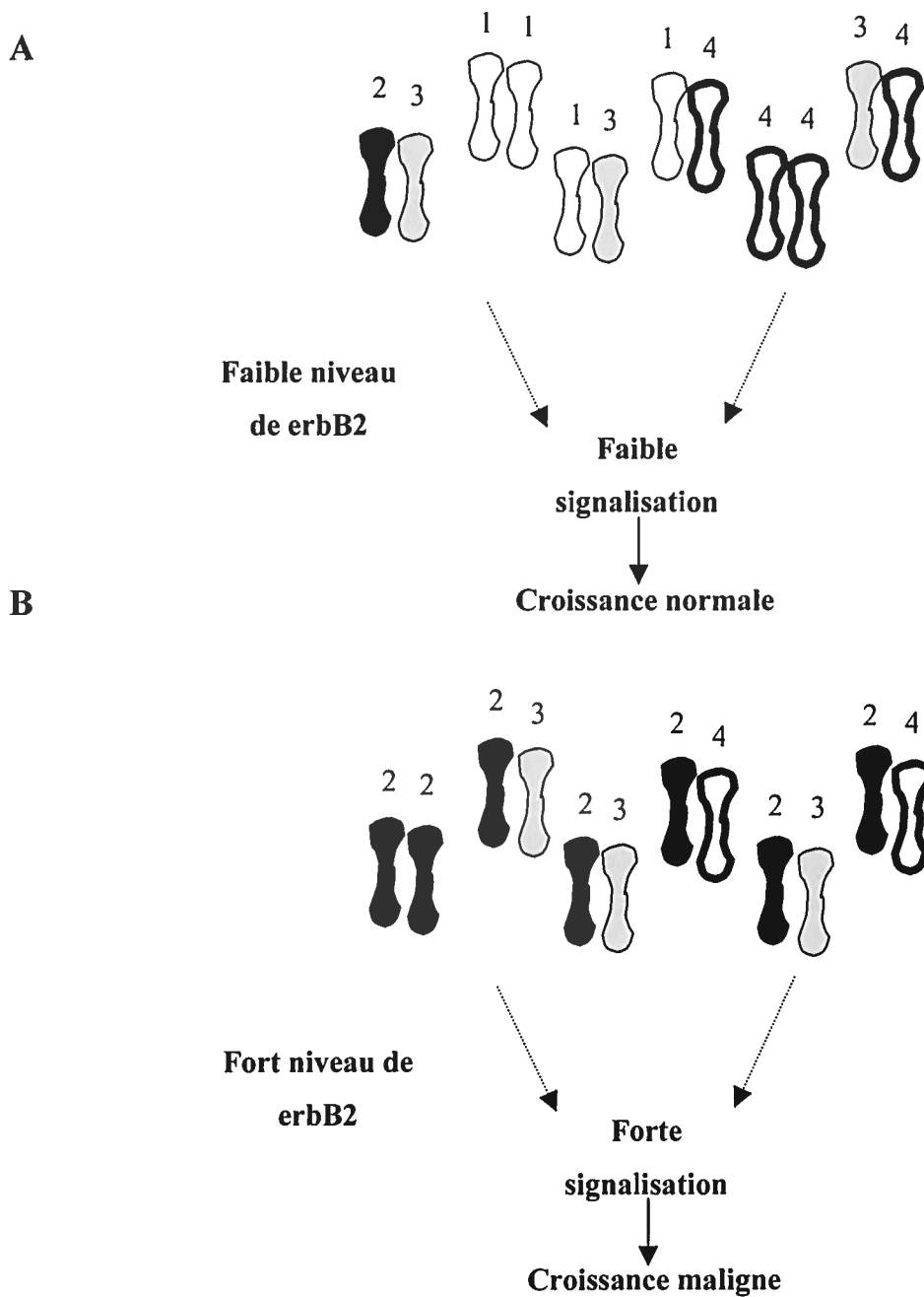


Figure 1.5. Mécanisme de prolifération cellulaire suite à un niveau d'expression faible de erbB2 (A) et élevé de erbB2 (B).

Dans les cellules épithéliales normales, une faible présence de erbB2 et de formation d'hétérodimères conduit à une prolifération et à une croissance normale. Dans les cellules tumorales, une surexpression de erbB2 conduit à la formation de plusieurs hétérodimères créant une prolifération et une croissance aberrante. (Figure inspirée de Lohrish et Piccart, 2001)

combinaisons particulières, la cascade de signalisation cellulaire peut alors s'amorcer via un bon nombre de protéines agissant comme second messenger (Storlelers *et al.*, 2002). L'activation de cette cascade ramifie les signaux dans la cellule et affecte le processus de réarrangement du cytosquelette et de la transduction du signal (Gullick et Srinivasan, 1998).

Des systèmes complexes de protéines de transmission intracellulaires sont nécessaires au relais. En réponse au signal, ces protéines sont phosphorylées par des protéines kinases; elles gagnent un ou plusieurs groupements phosphate dans leur état d'activation et perdent par la suite ces derniers lorsque le signal diminue d'intensité. Elles entraînent donc généralement une phosphorylation de protéines en aval qui constitue une cascade de phosphorylation. Les cascades de phosphorylation sont médiées par deux types principaux de protéines kinases, les kinases à sérine/thréonine qui phosphorylent les protéines sur des résidus sérine et moins souvent sur des résidus thréonine, et les tyrosine kinases qui phosphorylent les protéines sur des résidus tyrosine (Alberts *et al.*, 1995; Yoganathan *et al.*, 2000). La section 1.3.2 présente des exemples de médiateurs intracellulaires impliqués dans la cancérogenèse mammaire.

1.3.2. Médiateurs intracellulaires

Les comportements cellulaires complexes, tels que la survie et la prolifération, sont stimulés non pas par une seule et unique molécule mais par des combinaisons spécifiques de molécules. La cellule doit pouvoir intégrer les informations provenant de molécules informatives différentes pour élaborer sa propre réponse cellulaire, soit pour vivre ou mourir soit pour proliférer ou pour rester au repos. Cette intégration d'informations dépend des interactions entre les différentes cascades de phosphorylation de protéines qui sont activées par les signaux extracellulaires. La plupart des récepteurs déclenchent une séquence d'événements qui modifient la concentration d'un ou de plusieurs petites molécules appelées médiateurs intracellulaires ou messagers intracellulaires (ex., adénosine 5'-monophosphate cyclique (AMPC), les ions calcium, etc.) qui transmettent le signal intracellulaire. Celles-ci transmettent à leur tour le signal en modifiant le comportement des différentes protéines cellulaires (Alberts *et al.*, 1995).

1.3.2.1. La protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB

L'habileté à promouvoir la survie cellulaire suite à une stimulation par un stress a été attribuée en partie à la signalisation cellulaire de la protéine phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (Bacus *et al.*, 2002). La protéine Akt/PKB est une sérine/thréonine kinase et effectrice successive de la PI3K, régulateur majeur de la survie et de la prolifération cellulaire (Mao *et al.*, 2000a). Il existe trois isoformes humaines de la Akt/PKB, la Akt1/PKB α (prédominante), la Akt2/PKB β et la Akt3/PKB δ , toutes les trois exprimées dans les tissus normaux et tumoraux du poumon, du sein, de la prostate et du côlon. Plus spécifiquement, une étude de Zinda *et al.* (2001) montre que Akt1 et Akt2 sont exprimés dans les cellules cancéreuses de la prostate et du sein, alors que Akt3 est exprimé exclusivement dans les cellules de stades plus avancés. Ces trois gènes ont plus de 85% de ressemblance entre leurs séquences et leur organisation structurale. Ces isoformes sont composées d'un domaine homologue de pleckstrin « pleckstrin homology » (PH, site de liaison des phospholipides), d'un domaine catalytique et d'un fragment régulateur au domaine C-terminal. Ils possèdent de plus des résidus sérine et thréonine qui sont primordiaux pour leur activation (voir Figure 1.6) (Kandel et Hay, 1999).

Pour permettre l'activation de la Akt/PKB, la liaison d'un ligand, tel que le facteur de croissance ou l'héréguline, au récepteur de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase doit être complétée; le récepteur est ainsi activé et les résidus tyrosine sont phosphorylés. Il a été démontré que la protéine kinase Akt/PKB est une cible de la PI3K qui permet de réguler les multiples fonctions biologiques (Castoria *et al.*, 2001). Ce dernier s'est révélé être un médiateur de grande importance dans le contrôle de la division cellulaire et dans la régulation de l'apoptose en plus d'être considéré comme un des principaux facteurs intracellulaires responsable de la transmission des signaux antiapoptotiques et du contrôle de la survie cellulaire (Krasilnikov, 2000).

La formation du complexe composé de la sous-unité régulatrice de la PI3K, la p85, et de la sous-unité catalytique du récepteur de facteurs de croissance, la p110, est nécessaire pour l'activation de la PI3K qui formera du PI(3,4,5)-triphosphate. Une fois le

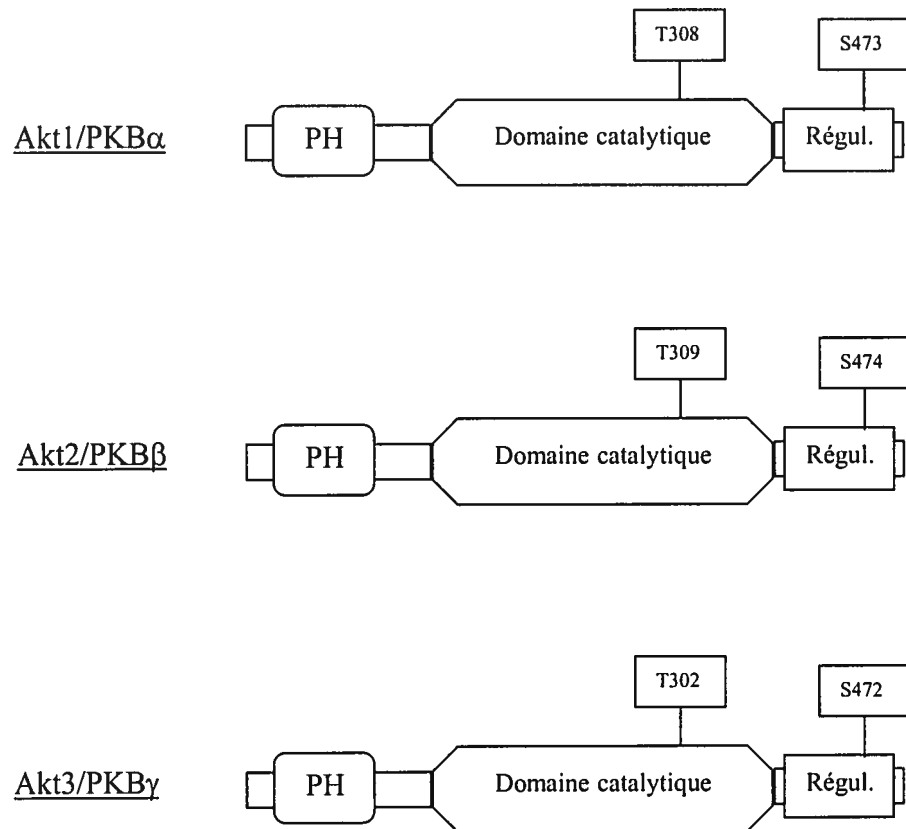


Figure 1.6. Organisation structurale des trois isoformes de la protéine Akt/PKB.

Les trois isoformes de la protéine Akt/PKB contiennent un domaine homologue de pleckstrin (PH), un domaine catalytique et un fragment régulateur à l'extrémité C-terminal (régul.). Les résidus thréonine et sérine pour la phosphorylation sont nécessaires à l'induction des activités enzymatiques. (Figure inspirée de Kandel et Hay, 1999)

PI(3,4,5)-triphosphate produit, celui-ci se lie avec forte affinité au domaine PH de la forme cytoplasmique dormante de l'Akt/PKB. Cette liaison entraîne un changement de conformation de la protéine qui retourne à la membrane plasmique; ceci expose en retour les sites de phosphorylation de la Akt/PKB, soit la phosphorylation de PDK1 à T308 du domaine catalytique et de PDK2 à S473 du domaine C-terminal (Mao *et al.*, 2000a). L'activation de la Akt/PKB induit son détachement de la membrane plasmique et provoque sa translocation dans le cytosol et vers le noyau. La protéine Akt a ainsi accès aux protéines nucléaires cibles et elle régule leurs activités (voir Figure 1.7) (Kandel et Hay, 1999).

Deux observations majeures suggèrent que l'activation de la Akt/PKB est dépendante de la PI3K. Premièrement, l'activation de la Akt/PKB dépend des résidus tyrosine Y740 et Y751 du récepteur de facteurs de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) qui lui est identifié comme étant un site de liaison pour la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K. Deuxièmement, les inhibiteurs de la PI3K, la wortmannin et le LY94002, diminuent l'activation de la Akt/PKB par les facteurs de croissance (Hutchinson *et al.*, 2001). En effet, une étude démontre qu'une inhibition pharmacologique de la PI3K dans la lignée de cellules épithéliales mammaires de souris *scp2* provoque un désordre des jonctions adhérentes ce qui suggère que la PI3K joue un rôle dans la morphogénèse et dans la différenciation spécifique des tissus des glandes mammaires (Somasiri *et al.*, 2000).

L'activité de la Akt/PKB est nécessaire dans la progression du cycle cellulaire en plus de promouvoir la survie cellulaire médiée par les facteurs de croissance et de bloquer l'apoptose. De récentes études ont démontré que l'activation de la protéine Akt par la PI3K provoque premièrement l'inhibition des signaux proapoptotiques tels que les protéines Bad, Bid et Bik (la sous-famille des BH3), Bax et Bak (sous-famille des Bax), la caspase 9 et la famille des facteurs de transcription Forkhead et deuxièmement, elle promouvoit la survie cellulaire par l'activation d'effecteurs antiapoptotiques, tels que le Bcl-2, Bcl-2-x et le régulateur de NF- κ B, l'IKK (voir Figure 1.8) (Kandel et Hay, 1999; Strange *et al.*, 2001). Une étude récente a démontré la corrélation existante entre l'activité des récepteurs *erbB* et le niveau relatif des membres de la famille Bcl-2. En effet, la sur-

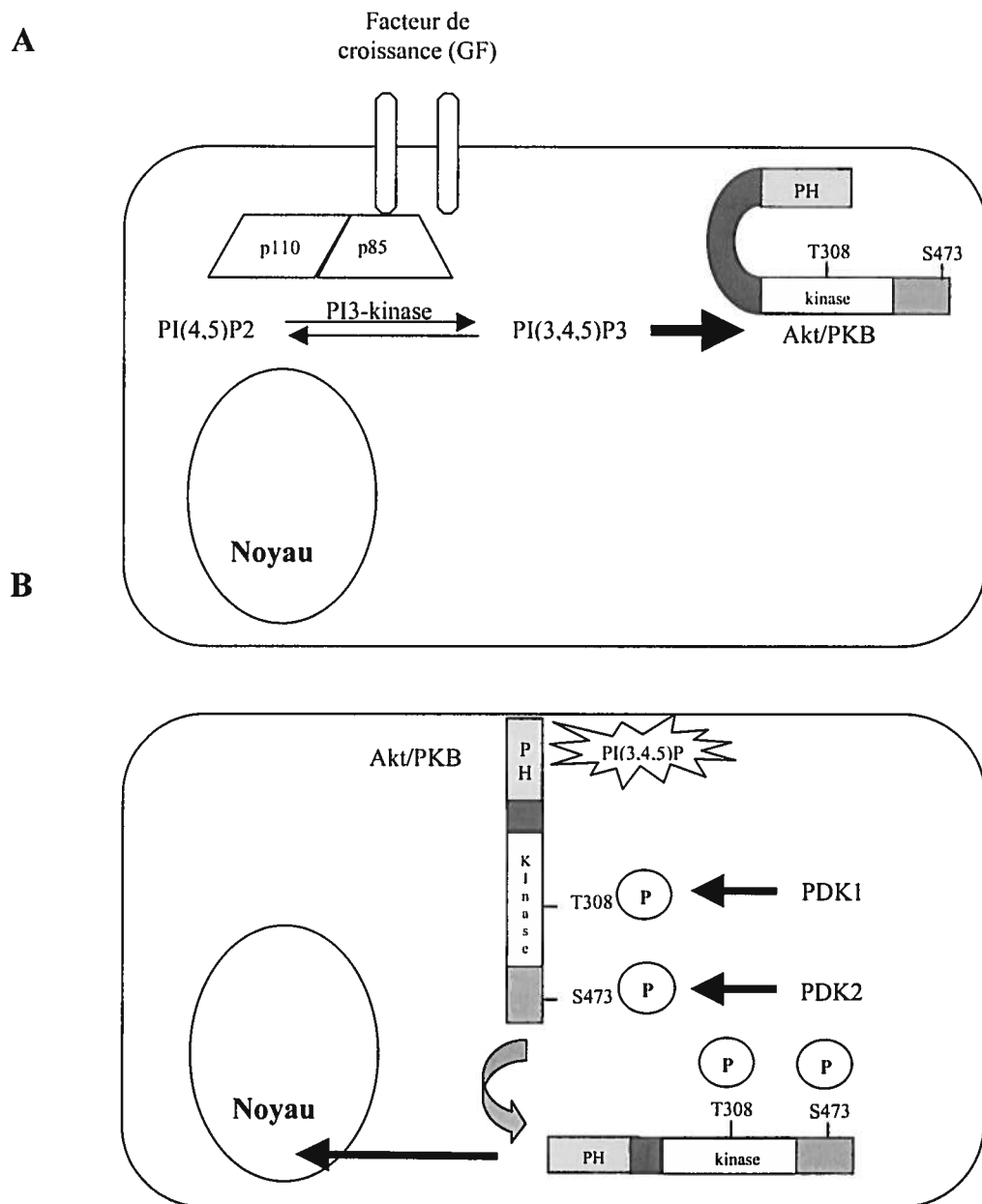


Figure 1.7. Illustration schématique d'un modèle d'activation de la protéine Akt/PKB par le facteur de croissance via ses mécanismes de phosphorylation.

(A) La liaison du facteur de croissance au récepteur à activité tyrosine kinase suscite le recrutement et l'activation de la PI3-kinase. Une fois activée, la protéine PI3K catalyse la production de phosphoinositides phosphorylés à la position 3. La protéine PI(3,4,5)P3 peut ainsi se lier avec forte affinité au domaine PH de la Akt/PKB. (B) Cette liaison induit un changement de conformation ce qui en retour expose la Akt/PKB à la phosphorylation par la PDK1 au site T308 et par la PDK2 au site S473. Subséquemment, la Akt/PKB activée se détache de la membrane plasmique et se transloque dans le cytosol et vers le noyau. (Figure inspirée de Kandel et Hay, 1999)

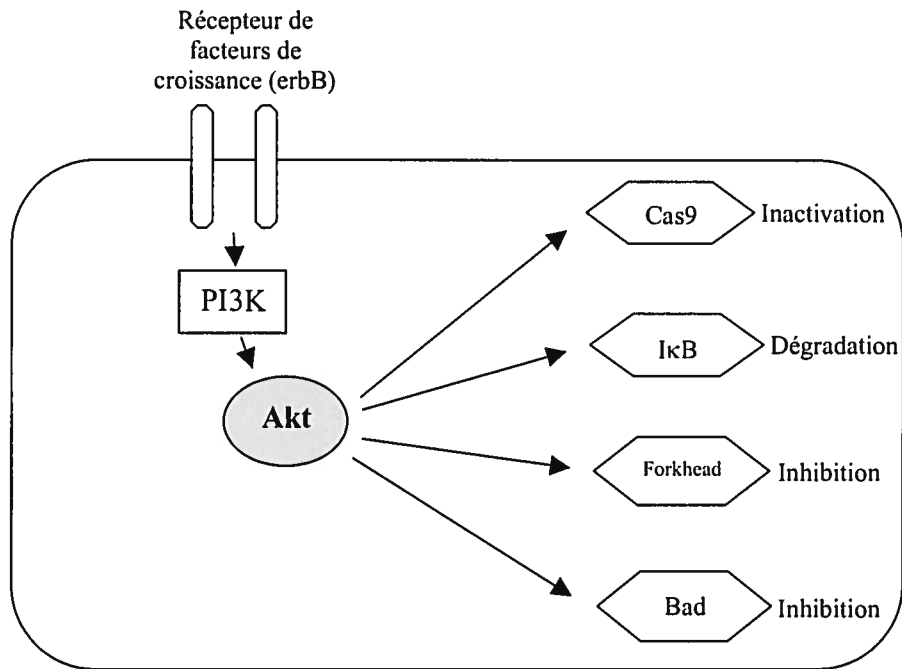


Figure 1.8. Mécanismes de signalisation de la protéine Akt/PKB impliqués dans la survie des cellules épithéliales mammaires humaines.

La phosphorylation de la Akt/PKB bloque l'activation de la caspase 9, qui médie la libération du cytochrome C ce qui entraîne la mort cellulaire. Cette protéine intracellulaire promouvoit la survie cellulaire en augmentant la dégradation de IκB via l'habileté réduite de IKK à phosphoryler IκB ce qui relâche le NF-κB du cytoplasme vers le noyau. L'activation de la Akt/PKB cause une séquestration cytoplasmique et une inhibition de Forkhead, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression du ligand Fas (FasL). Finalement, la phosphorylation de la Akt inhibe l'activité de Bad ce qui permet l'hétérodimérisation des membres Bcl-2 et de Bcl-x avec Bax (médiateur permettant de promouvoir l'apoptose). (Figure inspirée de Strange *et al.*, 2001)

expression de erbB2 dans les cellules épithéliales mammaires humaines tumorales, les MCF-7, provoque une augmentation importante du niveau d'expression des membres antiapoptotiques Bcl-2 (Danielsen et Maihle, 2002).

L'inhibition des effecteurs proapoptotiques par la PI3K et la Akt suggère clairement leur implication dans le développement mammaire anormal et dans la pathogenèse du cancer du sein (Datta *et al.*, 1999; Hutchinson *et al.*, 2001). Une étude de Danielsen et Maihle (2002) démontre que dans les cellules cancéreuses de la prostate, la formation d'homodimères de erbB2 provoque une activation de la voie de signalisation de la PI3K/Akt conduisant à la survie cellulaire. De plus, des recherches ont indiqué que les récepteurs erbB-3 et erbB4 représentent des sites majeurs de liaison pour la protéine PI3K et que la stimulation de NDF cause une activation de la signalisation de PI3K et de la phosphorylation de Akt chez les cellules MCF-7. La littérature mentionne aussi qu'une surexpression et une amplification du récepteur erbB2 chez les cellules mammaires cancéreuses BT474 engendrent une hausse significative de l'expression de la Akt2 (Bacus *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1999). Ces découvertes suggèrent l'implication directe de l'activation de la PI3K/Akt dans la cascade de signalisation provoquée par l'hétérodimérisation de certains membres de la famille erbB surexprimés dans les cellules du cancer du sein.

En somme, ces résultats supportent l'hypothèse que l'expression et l'activation de la cascade de signalisation de PI3K/Akt sont capables d'altérer la survie des cellules épithéliales mammaires en inhibant l'apoptose et en contribuant au développement néoplasique des cellules mammaires.

1.3.2.2. La protéine « Integrin-Linked Kinase » ILK

La croissance normale et le développement des cellules épithéliales mammaires dépendent des interactions entre les cellules et leurs matrices extracellulaires adjacentes (adhésion cellule-cellule). Ces interactions sont médiées par les récepteurs de la famille des intégrines qui jouent un rôle dans la modulation des aspects mécanistiques de l'adhésion cellulaire, tels qu'un assemblage ou un remodelage de la matrice extracellulaire (ECM) aussi bien qu'une promotion de la prolifération, de la différenciation et de la survie des cellules épithéliales. Les intégrines représentent une

grande famille de protéines hétérodimériques transmembranaires qui médient plusieurs interactions. Les sous-unités glycoprotéiques α et β de la partie extracellulaire des intégrines se lient aux protéines de la matrice cellulaire. Les intégrines sont nécessaires pour la liaison de la cellule à la matrice extracellulaire (Zervas *et al.*, 2001). Une fois regroupées, elles génèrent des signaux intracellulaires en initiant l'assemblage d'un complexe de signalisation sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique, par une voie semblable à celle utilisée par les récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (Alberts *et al.*, 1995).

Un des effecteur proximal de la signalisation de l'intégrine est la « Integrin-Linked Kinase » (ILK), une protéine sérine/thréonine kinase d'un poids moléculaire de 59 kDa qui interagit avec le domaine cytoplasmique $\beta 1$ et $\beta 3$ des sous-unités intégrines. La protéine ILK est un médiateur intracellulaire de la signalisation cellulaire des intégrines et des facteurs de croissance d'une manière PI3K dépendante (White *et al.*, 2001). Elle est localisée au niveau des adhésions focales et fibrillaires, ce qui contribue directement aux mécanismes d'adhésion cellulaire, d'extension et d'assemblage entre les matrices. Elle se lie avec la PINCH, une protéine focale de cinq domaines LIM (régule les facteurs de transcription Lin-1, Isl-1 et Mec-3) (Lin *et al.*, 2000). La liaison PINCH-ILK est médiée par le domaine N-terminal ankyrine (ANK) de la ILK et le domaine LIM-1 de la protéine PINCH. La ILK interagit aussi avec la CH-ILKBP, une protéine focale d'adhésion de liaison à l'actine qui contient deux domaines « calponin homology » (CH). L'interaction de la ILK et de CH-ILKBP est permise par l'interaction du domaine kinase C-terminal de la ILK au domaine CH2 de CH-ILKBP. De plus, l'affixine et la paxilline sont deux protéines capables de lier directement le domaine kinase de la ILK via les sites CH2 et LD1 respectivement (Wu et Dedhar, 2001).

Ces interactions simultanées sont médiées par deux domaines séparés (le N- et le C-terminal) de la ILK ce qui a pour but de former un complexe cellulaire stable PINCH-ILK-CH-ILKBL. La formation de ce complexe facilite la localisation de PINCH, de la ILK et de CH-ILKBP aux sites de contact entre les cellules. Ce complexe joue ainsi un rôle crucial dans la connexion physique entre les récepteurs transmembranaires, tels que les intégrines et les filaments d'actine. La ILK participe donc au contrôle de la survie, de la différenciation et de la prolifération des cellules par la signalisation cellulaire (voir

Figure 1.9) (Wu, 2001; Wu et Dedhar, 2001). La protéine ILK, une fois couplée aux intégrines et aux récepteurs de facteurs de croissance, engendre une cascade de signalisation impliquée dans la suppression de l'apoptose et dans la promotion de la survie cellulaire via la phosphorylation de la protéine Akt/PKB au site sérine 473 (Kandel et Hay, 1999; Lynch *et al.*, 1999) et via la protéine glycogène synthase kinase 3 (GSK-3). La GSK-3 est régulée négativement d'une manière dépendante de la PI3K et elle représente un élément critique de la voie de signalisation de Wnt (Delcommenne *et al.*, 1998). L'activation de la ILK dépendante de la PI3K régule la Akt/PKB par la phosphorylation de celle-ci au site sérine 473.

La ILK peut aussi phosphoryler et inhiber l'activité de la protéine kinase GSK-3 au site sérine 9 ce qui provoque une activation du complexe β -caténine/LEF-1 en plus d'une activation du facteur de transcription AP-1. En grande partie, l'architecture des tissus est régulée par les molécules d'adhésion cellulaire qui médient les interactions entre les cellules et les interactions entre les cellules et la ECM (Somasiri *et al.*, 2001). Des études effectuées chez les souris immunodéficientes ont démontré que la surexpression de la ILK dans les cellules épithéliales mammaires et intestinales engendre la tumogénicité, la survie cellulaire et une augmentation de l'invasion de la matrice extracellulaire (ECM). Il a été démontré que la ILK induit l'expression de la matrice métalloprotéase 9 (MMP-9) dépendante du facteur de transcription AP-1. Les métalloprotéases font partie d'une large famille d'endopeptidases dépendantes du zinc capable de dégrader, entre autres, les composantes de la matrice extracellulaire. En plus d'être nécessaire à plusieurs processus physiologiques, la dégradation de l'ECM est aussi impliquée dans l'invasion tumorale, les métastases et l'angiogénèse. Ainsi, une augmentation de l'expression des MMP est associée avec l'invasion tumorale des tumeurs malignes (Troussard *et al.*, 2000).

Une étude de Dedhar (2000) démontre que la surexpression de la ILK dans les cellules épithéliales intestinales de rat et dans les cellules épithéliales mammaires de souris conduit à une perte d'adhésion cellulaire entre les cellules et conduit à une diminution des interactions cellulaires. Une perte d'adhésion cellulaire est le résultat dramatique d'une diminution de l'expression entre autre de la cadhérine E accompagnée

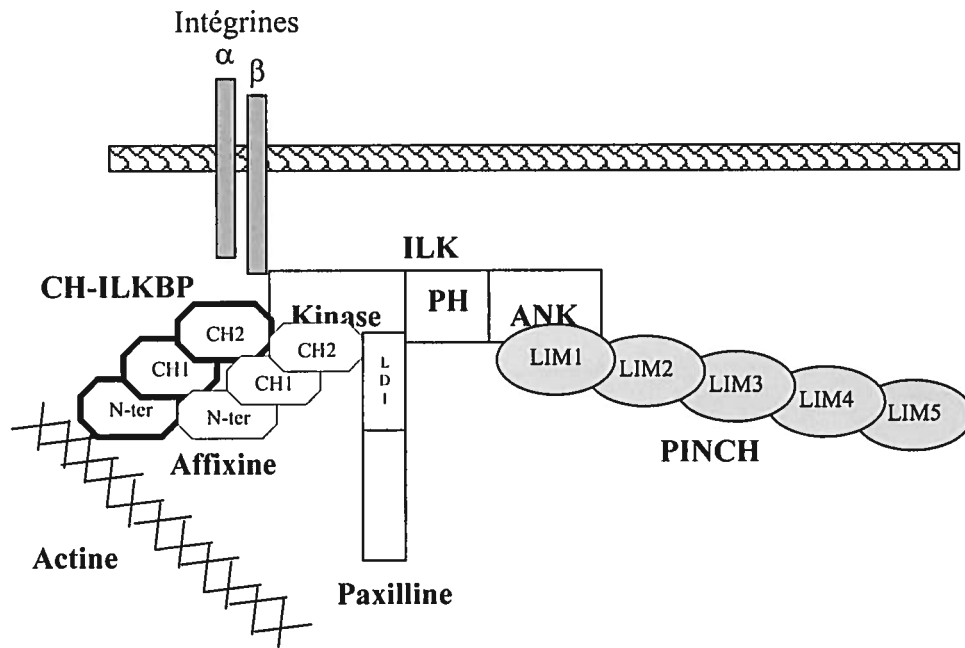


Figure 1.9. Interactions de la protéine ILK et signalisation cellulaire médiée par la ILK.

La ILK se lie à l'intégrine via la sous-unité β cytoplasmique. Le domaine terminal ankyrine (ANK) de la ILK interagit avec PINCH avec forte affinité au domaine LIM1 alors que le domaine kinase terminal de la ILK lie la portion CH2 de la CH-ILKBP, une protéine d'adhésion focale liant l'actine. L'affixine, une protéine relativement liée à la CH-ILKBP, se lie au domaine kinase de la ILK via son site CH2 alors que la paxilline se lie via son domaine LD1. La CH-ILKBP, la paxilline et d'autres protéines liant la ILK se joignent directement ou indirectement aux filaments d'actine. La formation du complexe PINCH-ILK-CH-ILKBP facilite la localisation de ceux-ci aux sites de contacts des membranes extracellulaires. (Figure inspirée de Wu, 2001 et de Wu et Dedhar, 2001)

d'une translocation de la β -caténine dans le noyau qui elle régulera l'expression de la cycline D1 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Yoganathan *et al.*, 2000). La translocation de la β -caténine est induite par la signalisation de Wnt via la protéine ILK, par la perte d'un gène suppresseur de tumeur dans certaines tumeurs ou par la présence de mutations au niveau du domaine N-terminal. Par contre, l'activité de la ILK est régulée négativement par 2 phosphatases: soit la PTEN, une phosphatase lipidique ayant un rôle de suppresseur de tumeur via la déphosphorylation du PI 3,4,5-triphosphate en PI 4,5-biphosphate (PTEN est muté ou absent dans 60% des cancers) et la protéine phosphatase PP2C appelée ILKAP (voir Figure 1.10) (Wu et Dedhar, 2001).

En somme, les altérations phénotypiques de l'expression ou de l'activation de la ILK dans les cellules épithéliales peuvent contribuer aux transformations oncogéniques, telles que l'augmentation de la croissance cellulaire, la suppression de l'apoptose, l'augmentation de l'invasion de la matrice extracellulaire et la tumorigénicité dans les « nude mice ». Le rôle crucial de la ILK dans la cancérogenèse est supporté par des données expérimentales indiquant qu'une inhibition de la ILK induit l'apoptose lorsque les cellules présentent une activation de la Akt/PKB. La ILK peut donc contrôler les activités de signalisation conduisant à une stimulation des effecteurs kinases et des facteurs de transcription soit en activant ou en éliminant l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la survie et du cycle cellulaire.

1.3.2.3. Les protéines d'adhésion cellulaire

Comme vu précédemment, les cellules contiennent des molécules d'adhésion qui servent d'éléments permettant l'intercommunication et l'établissement de contact entre les cellules épithéliales et myoépithéliales. Dans les tissus, les cellules sont reliées les unes aux autres par la matrice extracellulaire au niveau des sites de contact particuliers appelés jonctions cellulaires; celles-ci sont regroupées en trois classes fonctionnelles soit les jonctions imperméables, les jonctions d'ancrage et les jonctions communicantes. Plus spécifiquement, il sera question dans cette section des jonctions d'ancrage qui ont comme fonction principale d'attacher mécaniquement les cellules (et leur cytosquelette) à leurs voisines ou à la matrice extracellulaire. Elles existent sous deux formes structurellement et fonctionnellement différentes, soient les jonctions adhérentes ou les desmosomes et les

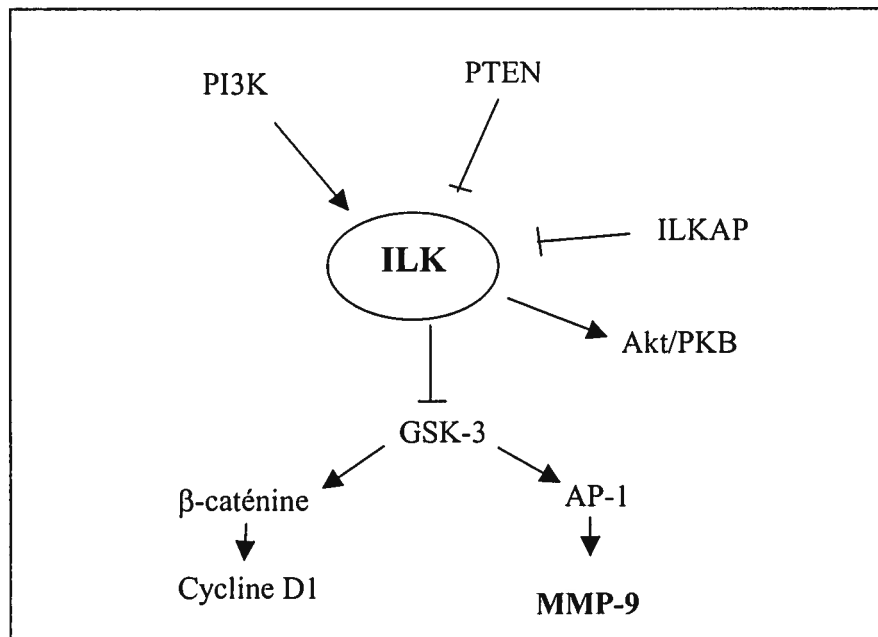


Figure 1.10. Signalisation cellulaire activée par la ILK dans la cancérogenèse.

La PTEN et la ILKAP régulent négativement l'activation de la ILK. La ILK activée peut directement phosphoryler les protéines Akt/PKB et la GSK-3. La phosphorylation de la Akt/PKB par la ILK contribue à la suppression de l'apoptose. L'inhibition de la GSK-3 conduit à une stabilisation de la β -caténine et à la stimulation de l'activité de AP-1. Ce dernier stimule l'expression de la MMP-9. L'activation des caténines via la ILK et la GSK-3 contribue à la surrégulation de la cycline D1. Ces voies de signalisation conduisent donc à l'invasion proliférative des cellules, au développement de l'angiogénèse et à la suppression de l'apoptose. (Figure inspirée de Wu et Dedhar, 2001)

hémidesmosomes. Les jonctions adhérentes sont des sites de liaison pour les filaments d'actine, alors que les desmosomes et les hémidesmosomes sont des sites de liaison pour les filaments intermédiaires (Alberts *et al.*, 1995).

Pour former une jonction, les cellules doivent dans un premier temps adhérer entre elles au moyen de molécules d'adhésion cellulaire « cell-cell adhesion molecule, CAM » telles que les cadhérines. Les cadhérines sont impliquées dans l'adhésion intercellulaire par la formation des jonctions d'ancrage d'une manière Ca^{2+} -dépendante (Nagae *et al.*, 2002). Les trois premières cadhérines découvertes ont été nommées en fonction du type de tissu dans lequel elles ont été identifiées, soit la *cadhérine E* présente à la surface de nombreux types de cellules épithéliales, la *cadhérine N* sur les cellules nerveuses, cardiaques et cristallines et la *cadhérine P* sur les cellules du placenta et de l'épiderme. Plusieurs autres nouveaux types de cadhérines ont été découverts (Alberts *et al.*, 1995).

La cadhérine E (également appelée *uvomoruline*) est la cadhérine la mieux caractérisée. Elle représente les forces majeures permettant l'adhésion entre deux cellules. La cadhérine E est une glycoprotéine transmembranaire qui médie l'adhésion cellulaire dépendante du calcium entre les cellules épithéliales. Cette protéine d'un poids moléculaire de 120 kDa possède un domaine extracellulaire composé de cinq domaines similaires, un domaine transcellulaire et un domaine intracellulaire qui interagit avec l'actine par l'intermédiaire d'un bon nombre de protéines d'attachement intracellulaires, telles que les caténines α , β et γ (voir Figure 1.11) (Alberts *et al.*, 1995; Jiang et Mansel, 2000). Elle forme un « zipper » avec les autres cadhérines E localisées dans les jonctions adhérentes entre les domaines extracellulaires des cellules adjacentes. Le domaine intracellulaire de la cadhérine E interagit avec l'actine du cytosquelette via un complexe protéique contenant la α -caténine, la β -caténine et la δ -caténine; les caténines sont des protéines cytoplasmiques qui interagissent avec le domaine intracellulaire des molécules cadhérines (Anastasiadis et Reynolds, 2000). Plus particulièrement, la β -caténine agit comme pont moléculaire entre le domaine cytoplasmique de la cadhérine E et d'autres protéines jonctionnelles, telles que la α -caténine qui se lie à l'actine et est primordiale pour conserver l'intégrité des jonctions adhérentes. Ce complexe permet la formation des jonctions adhérentes, qui elles constituent les éléments critiques pour la régulation de

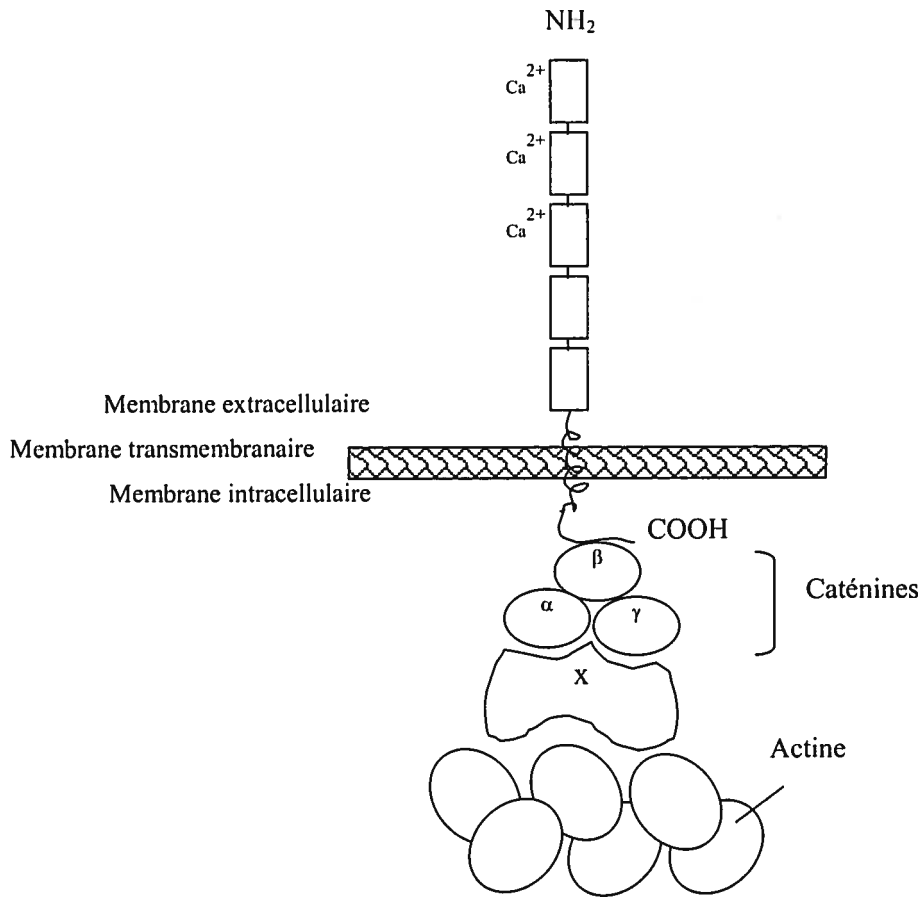


Figure 1.11. Représentation schématique d'une molécule de cadhérine classique.

La partie extracellulaire de la protéine est repliée en cinq domaines similaires dont trois d'entre eux contiennent des sites de liaison aux ions Ca²⁺. Il est probable que le domaine extracellulaire le plus éloigné de la membrane plasmique participe à l'adhérence intercellulaire. La queue cytoplasmique interagit avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un certain nombre de protéines d'attachement intercellulaires telles que les caténines α, β et γ. La molécule x représente les protéines d'attachement non caractérisées impliquées dans le couplage des cadhérines aux filaments d'actine. (Figure inspirée de Alberts *et al.*, 1995 et de Jiang et Mansel, 2000)

l'histogénèse des tissus, de leur stabilité et de leur différenciation. Dans les glandes mammaires, des facteurs micro-environnementaux peuvent désassembler les jonctions adhérentes ce qui impliquera d'importants changements morphogéniques. Un désordre permanent des jonctions adhérentes contribue fortement à l'invasion cellulaire des carcinomes mammaires et aux métastases (van de Wetering *et al.*, 2001).

Plusieurs éléments des différentes cascades de signalisation peuvent influencer la migration cellulaire et l'adhésion intercellulaire. Un désordre au niveau des interactions cadhérines-caténines tend à augmenter les β -caténines libres dans le cytosol, ce qui augmente la disponibilité de cette protéine pour des interactions tumorigènes potentielles avec le complexe cytoplasmique T cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF). Ce mécanisme est impliqué dans certains types de cancer, tels que le cancer du côlon et le mélanome (Hollmann *et al.*, 2001). La β -caténine régule la signalisation de Wnt. Les gènes Wnt sont reconnus pour leur implication dans le développement embryonnaire et spécialement dans l'oncogenèse (Wong *et al.*, 2002). La signalisation de Wnt participe à la croissance, la prolifération, la morphologie, la motilité et au développement des organes. Sans Wnt, l'adenomatous polyposis coli (gène suppresseur de tumeur, APC) et l'axine forment un complexe qui se lie à la GSK-3. La phosphorylation du APC augmentera son affinité pour la β -caténine libre. Ce complexe sera par la suite dégradé par les protéosomes. Par contre, lorsque Wnt est actif, celui-ci interagit avec son récepteur de la famille « Frizzled », ce qui déphosphoryle la protéine GSK-3 et antagonise l'action du complexe APC-axine-GSK-3 sur la β -caténine. Une fois la voie stimulée, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme, s'associe avec le complexe TCF/LEF et subséquentement se transloque vers le noyau. Le complexe TCF/LEF/ β -caténine se lie par la suite à l'ADN et influence négativement la transcription et l'expression de gènes spécifiques, tels que celui de la cycline D et de *myc* impliqués dans la régulation cellulaire (voir Figure 1.12) (Jankowski *et al.*, 1997; Jiang et Mansel, 2000; Persad *et al.*, 2001).

Des anomalies au niveau de l'expression de la cadhérine E ont été observées et caractérisées dans le cancer du sein. En effet, plusieurs changements peuvent survenir durant la formation du complexe impliquant la cadhérine, tels qu'une diminution du niveau de la cadhérine elle-même, une localisation anormale et une présence de mutations

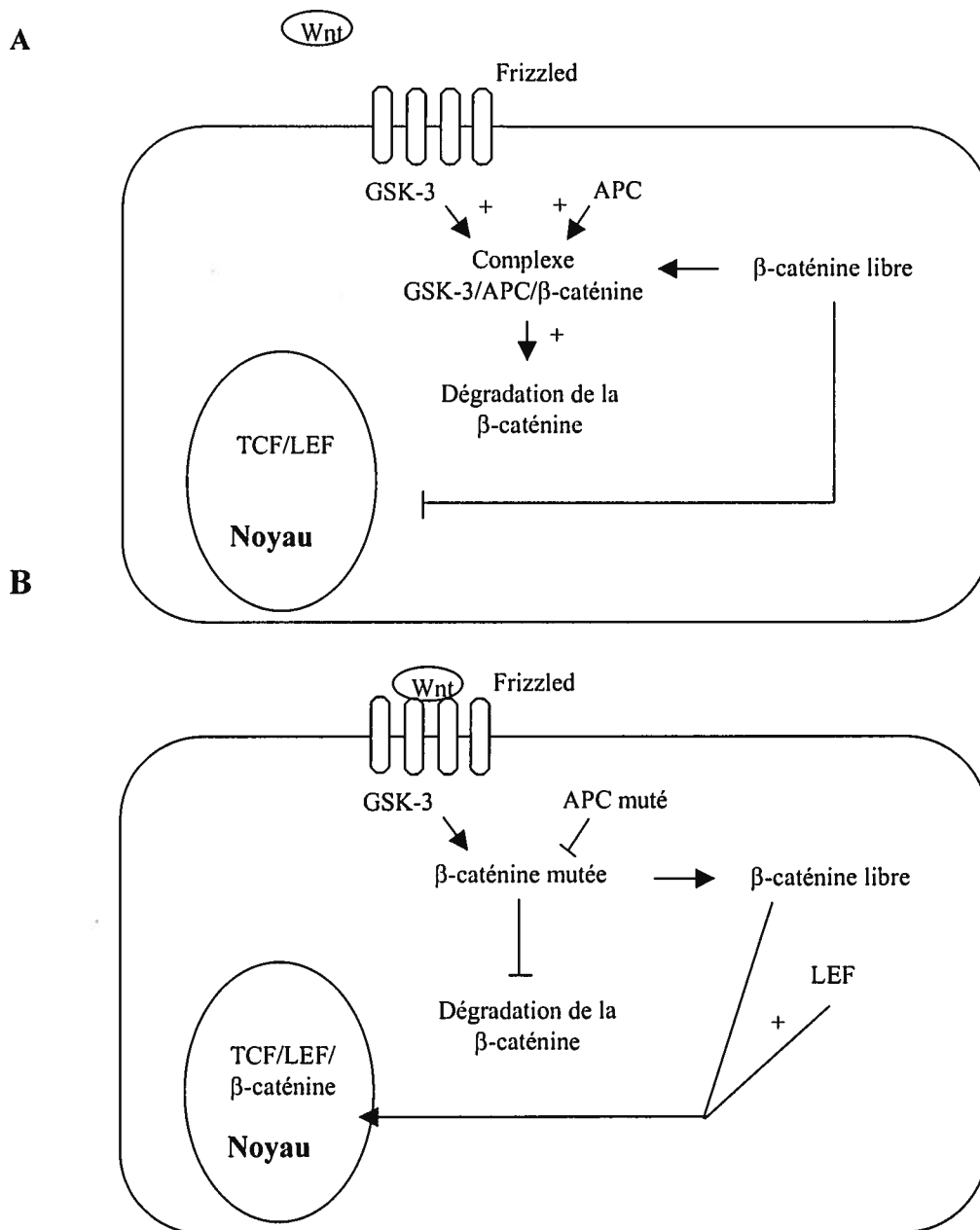


Figure 1.12. Signalisation cellulaire de la β -caténine en absence (A) ou en présence de Wnt (B).

(A) En absence de Wnt, la protéine GSK-3 activée et l'APC se lie à la β -caténine cytoplasmique libre. Ce complexe sera dégradé par les protéosomes. (B) En présence de Wnt, la GSK-3 inactivée et l'APC muté seront incapable de lier la β -caténine. Il y a aura accumulation de celle-ci dans le cytosol qui se liera au complexe LEF/TCF. Ensemble, ils agiront comme cofacteur pour la transcription de gènes dans la régulation négative de l'expression de la cadhérine E (+ indique une stimulation de la voie de signalisation). (Figure inspirée de Jankowski *et al.*, 1997 et de Jiang et Mansel, 2000)

chez celle-ci; des mutations et des niveaux anormaux de la α -caténine, des changements au niveau des partenaires de liaison de la β -caténine et des changements dans la phosphorylation des protéines sont aussi identifiés dans le développement de cancer. Ces modulations suggèrent fortement que le complexe de la cadhérine E est directement impliqué dans la transition d'une tumeur bénigne en tumeur maligne. De plus, il est connu que le niveau de la cadhérine E, de même que celui des caténines, est réduit et perdu dans les cas de cancer du sein. La modulation de la cadhérine E peut donc être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic (Jiang et Mansel, 2000). Il a été démontré par l'équipe de Novak *et al.* (1998) que la ILK peut influencer directement l'expression de la cadhérine E. En effet, cette étude montre qu'une surexpression de la ILK provoque une inhibition de l'adhésion cellulaire des cellules épithéliales intestinales et mammaires de souris par une diminution de l'expression de la cadhérine E, résultant de la translocation de la β -caténine dans le noyau et par l'activation du complexe LEF-1/ β -caténine. Plus spécifiquement, la stabilité de la β -caténine est régulée par la phosphorylation de la protéine GSK-3. Lorsque l'activité de la GSK-3 est inhibée, comme dans le cas de la signalisation de Wnt, la β -caténine ne devient plus phosphorylée et s'accumule dans le cytoplasme et dans le noyau. La surexpression de la ILK peut aussi inhiber l'activité de la GSK-3 et provoquer une accumulation de la β -caténine dans le noyau. La ILK induit donc une augmentation de l'invasion tumorale, ce qui fait de lui un protooncogène.

1.3.2.4. Intégration des mécanismes antiapoptotiques régulés par les récepteurs erbB

Suite à la documentation de la famille des récepteurs de facteurs de croissance et des multiples médiateurs intracellulaires, il est maintenant possible de clarifier leur implication au niveau de la régulation des mécanismes apoptotiques. Tel que mentionné précédemment, l'apoptose joue un rôle prépondérant dans le développement de l'organisme, dans les fonctions du système immunitaire et dans l'élimination des cellules endommagées, malades ou non nécessaires. Ce processus de mort cellulaire programmée est initié par des stimuli extracellulaires qui transmettent leurs actions à la membrane plasmique via des récepteurs, tels que le Fas et le « tumor necrosis factor receptor-1 » (TNFR-1) qui transduisent des signaux intracellulaires. Alors que le récepteur Fas initie l'apoptose via l'activation de la caspase initiatrice, la caspase-8, le récepteur TNFR-1,

activé par le TNF- α , engendre plusieurs cascades enzymatiques effectrices. Une fois la cascade de signalisation initiée, plusieurs médiateurs intracellulaires sont responsables de la transduction des signaux (Danielsen et Maihle, 2002).

Le NF- κ B est un exemple d'effecteur capable d'induire la transcription de plusieurs protéines de survie incluant les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 aussi bien que les inhibiteurs d'apoptose (IAPs), protéines liant et inactivant les membres de la famille des caspases. Le NF- κ B est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans l'inflammation, dans la survie cellulaire, la transformation et dans l'oncogenèse (Danielsen et Maihle, 2002). Il représente un complexe hétérodimérique de la famille des protéines Rel qui est physiquement confiné dans le cytoplasme des cellules normales à travers son interaction avec l'inhibiteur kappa B (I κ B). Suite à une exposition des cellules aux facteurs de croissance et aux cytokines, tels que l'EGF, l'interleukine 1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), une série d'événements de signalisation ciblent la protéine I κ B pour la dégradation et la translocation de NF- κ B dans le noyau. Le NF- κ B se lie donc à l'ADN et active l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation, le cycle cellulaire, l'invasion, le développement de métastases et dans les mécanismes d'angiogénèse et antiapoptotiques. Une équipe a démontré l'activation constitutive de la protéine NF- κ B dans une variété de cancers; étant active dans les cellules cancéreuses du sein, la protéine NF- κ B engendre l'augmentation de l'expression des gènes prométastatiques et antiapoptotiques. De plus, il a été démontré que les récepteurs erbB surexprimés dans les cellules mammaires cancéreuses jouent un rôle dans l'activation constitutive de NF- κ B (Bhat-Nakshatri *et al.*, 2002).

La famille des protéines Bcl-2 est impliquée dans la régulation du cytochrome c par les mitochondries. Elle est composée de 15 membres et est subdivisée en deux sous-groupes, soient les membres proapoptotiques (Bax, Bad, Bak, Bid) ou les membres antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-x) et ce, dépendant du niveau relatif des membres à l'intérieur de la cellule. Par exemple, les cellules surexprimant la Bcl-2 ou la Bcl-x sont résistantes aux signaux apoptotiques alors que l'expression élevée des protéines Bad et Bax dans les cellules induit l'apoptose. Des études ont démontré une corrélation entre

l'activité des récepteurs de la famille erbB et la régulation des niveaux relatifs de la famille Bcl-2. En effet, une étude sur la lignée de cellules mammaires humaines tumorales, les cellules MCF-7, a indiqué qu'une surexpression du récepteur erbB2 provoque une augmentation de 3 à 6 fois du niveau d'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-x. La régulation des membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 par la signalisation des récepteurs erbB est réalisée par 2 mécanismes cellulaires distincts: soit via l'activation du facteur de transcription STAT-3 ou via l'activation de la PI3K ou de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK). La protéine PI3K peut être activée soit en se liant directement aux récepteurs erbB3 ou erbB4 ou soit via l'activation de Ras. Par la suite, la PI3K peut activer une protéine kinase multifonctionnelle telle que la Akt. Cette protéine semble réguler négativement la protéine proapoptotique Bad via la phosphorylation des résidus sérine 112 et 136. En somme, les récepteurs erbB modulent l'expression et la localisation des membres de la famille Bcl-2 qui promouvoient la survie cellulaire; l'activation des erbB conduit à l'induction de plusieurs signaux antiapoptotiques tels que la voie de signalisation de la PI3K, de la Akt et de la protéine Bad ou via la signalisation de la protéine MAPK et de Bad (Danielsen et Maihle, 2002).

1.3.2.4.1. Altérations enzymatiques dans la télomérase

La présence de modifications au niveau des différentes voies de signalisation cellulaire est l'une des multiples explications qui permet une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse. Ces signaux intracellulaires semblent pouvoir agir directement sur les gènes des cellules précancéreuses favorisant la croissance anarchique.

Le matériel génétique des cellules eucaryotes est dispersé sur plusieurs chromosomes linéaires. Des problèmes se posent pour protéger une cellule en croissance: comment protéger l'extrémité de l'ADN de la dégradation et de la fusion tout en répliquant cette extrémité terminale de l'ADN (Meyerson, 2000). Les télomères, terminaisons physiques des chromosomes eucaryotes, jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité structurale des chromosomes, soit en médiant les processus de réplication chromosomique ou en régulant la croissance et le temps de vie cellulaire. Plus les cellules se divisent, plus les télomères rapetissent.

Les télomères sont contrôlés par une polymérase d'ADN très spécialisée, nommée télomérase, qui est activée dans plusieurs cancers humains et dans les lignées de cellules immortelles. Elle empêche les télomères de se raccourcir; les cellules peuvent donc se multiplier indéfiniment (Greider et Blackburn, 1996). Plusieurs évidences indiquent que la télomérase est régulée réversiblement. La protéine Akt/PKB est responsable de la régulation de la télomérase. Elle phosphoryle les résidus sérine 824 du peptide « human telomerase reverse transcriptase » (hTERT), élément essentiel pour l'activation de la télomérase ce qui stimule l'activité télomérase.

L'inhibition de l'activité télomérase est accompagnée d'un raccourcissement des télomères ce qui compromet la croissance des cellules (Greider et Blackburn, 1996; Liu, 1999). Une étude de Liu *et al.* (1999) montre que l'activité télomérase est indétectable dans plusieurs cellules somatiques normales humaines, alors que dans plus de 85% des cas de cancers humains l'activité de la télomérase est très élevée. D'autres données scientifiques confirment une haute fréquence de l'activité de la télomérase dans les tumeurs (Voet et Voet, 1998). En effet, l'utilisation de la télomérase comme outil de diagnostic de cancer peut être intéressante, mais semble limitée par la présence fréquente de l'activité de la télomérase dans une variété de tissus et de cellules normales. La vaste majorité des cancers du sein démontre une activité de la télomérase. Trois études indépendantes ont montré que 79% à 95% des échantillons de carcinomes mammaires étaient pourvus d'activité télomérase contrairement à seulement 11% à 45% chez des échantillons de fibroadénomes (Bednarek *et al.*, 1997; Hiyama *et al.*, 1996; Nawaz *et al.*, 1997). Des facteurs exogènes, tels qu'un niveau élevé d'exposition aux rayons du soleil, aux ultraviolets et aux rayons X, induisent l'activation de la télomérase. Cette enzyme modulée par certains médiateurs cellulaires représente donc un mécanisme d'importance dans la cancérogenèse mammaire.

1.4. Hypothèses et objectifs de recherche

Suite à la lecture des sections précédentes, plusieurs problématiques peuvent être mises en évidence. Tout d'abord, la cancérogenèse mammaire est un phénomène complexe et multifactoriel. Un mélange d'agonistes du AhR et l'HCB sont des polluants très présents dans l'environnement et leur implication, de près ou de loin, dans le développement des tumeurs mammaires a été démontrée dans la littérature. En effet, une exposition involontaire à ces contaminants pourrait initier un dérèglement de l'homéostasie chez les cellules épithéliales mammaires humaines. Ces modifications cellulaires pourraient alors entraîner certaines cellules dans le processus de cancérogenèse.

La signalisation cellulaire est un phénomène qui implique de multiples médiateurs cytoplasmiques, tels que la protéine sérine/thréonine kinase Akt/PKB, la ILK, ainsi que des protéines impliquées dans la communication intercellulaire. Suite à une stimulation exogène, des changements survenant au niveau des voies de signalisation peuvent perturber les signaux intracellulaires engagés dans les mécanismes de régulation de la prolifération, de l'apoptose et de la communication cellulaire.

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'examiner si des organochlorés de types épigénétiques sont susceptibles de provoquer des modifications cellulaires, plus particulièrement au niveau des voies de signalisation des cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales. Cette recherche vise principalement à déterminer l'effet toxique du mélange d'agonistes du AhR et de l'HCB sur les membres erbB et erbB2 de la famille des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase et sur les niveaux d'expression et de phosphorylation de certains médiateurs intracellulaires, tels que les protéines Akt/PKB, ILK et cadhérine E. Des traitements à court (10 ou 30 min) et à long terme (15 et 40 passages) à ces contaminants environnementaux ont été réalisés sur deux lignées de cellules en culture, les MCF-10A et les MCF-12A, et des analyses de leurs niveaux protéiques ont été effectuées par immunobuvardage et par immunoprécipitation.

CHAPITRE 2

Matériel et méthodes

2.1. Matériel

La provenance de chacun des produits utilisés dans cette recherche est indiquée au Tableau 1. Les produits présentés ont un degré de pureté supérieur à 97%.

2.2. Méthodes

La culture cellulaire est une approche expérimentale qui requiert un travail en milieu stérile. Deux lignées de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, les lignées MCF-10A et MCF-12A (American Type Culture Collection; Rockville, MO), ont été utilisées (Paine *et al.*, 1992; Soule *et al.*, 1990).

2.2.1. Décongélation des cellules

Pour effectuer les expérimentations, les échantillons cellulaires utilisés doivent être avant tout dégelés selon le protocole suivant: les vials, préalablement conservés dans l'azote liquide, sont décongelés dans un bain à 37°C jusqu'à disparition du dernier glaçon. Un volume de 9 ml de milieu de culture est ajouté au contenu du vial (1 ml) pour permettre la dilution cellulaire. Après agitation de la préparation, un test de viabilité des cellules (voir section 2.2.2) est effectué. Une centrifugation du tube pendant 10 min à 1000 rpm est alors effectuée. Une fois le surnageant retiré, une certaine quantité de milieu de culture normal est ajouté au culot; ce volume de 4 ou de 8 ml de milieu normal est déterminé en fonction de la quantité de cellules présente et du résultat du test de viabilité qui consiste à déterminer le pourcentage de viabilité des cellules dans la suspension. Le culot de cellules dans le milieu est alors resuspendu et transféré en entier dans un pétri de 10 cm de diamètre avec le milieu de culture qui est ensuite déposé dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO₂ en milieu humidifié.

Produits	Compagnies
Lignées MCF-10A et MCF-12A	<i>American Type Culture Collection (Manassas, VA)</i>
Milieu de culture DMEM-F12, EGF, insuline, DMSO, HEPES, Tween 20, glycérol, solution de Bradford, NaCl, aprotinine, sodium orthovanadate, 1,4 dithiothreitol (DTT), SDS, Tris-Base, acide acétique, Tris-HCl, bleu de trypan	<i>Sigma (Saint Louis, MO)</i>
HCB (>99%)	<i>Aldrich Chemical (Oakville, ON)</i>
Triton X-100, CaCl ₂	<i>Biopharm (Laval, QC)</i>
Méthanol, β-mercaptoéthanol	<i>Caledon (Georgetown, ON)</i>
Trousse de chemiluminescence, albumine sérique de bœuf (BSA), bille d'agarose A	<i>Roche (Laval, QC)</i>
Anti-erbB-2/HER-2, anti-phospho-ErbB2/HER-2 (Y1248), anti-EGFR receptor, anti-ILK, anti-Akt1/PKBα, anti-sheep IgG-HRP	<i>Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)</i>
Anti-phospho-EGFR, E-cadherin (H108), anti-actin (I-19), anti-goat-IgG-HRP, anti-rabbit IgG-HRP	<i>Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)</i>
Anti-phosphoserine	<i>Chemicon International (Temecula, CA)</i>
Anti-Akt/PKB pS ⁴⁷³ phosphospecific	<i>Biosource Internationa (Nivelles, Belgique)</i>
Mélange d'agonistes du AhR, OCDD	<i>Wellington Laboratories (Guelph, ON)</i>
MgCl ₂ , EDTA, glycine, rouge de Ponceau, membrane de nitrocellulose	<i>Fisher (Nepean, ON)</i>
Hydrocortisone, sérum de cheval, toxine de choléra, trypsine/EDTA	<i>Gibco (Burlington, ON)</i>
Pénicilline, streptomycine	<i>Bio Media (Drummondville, QC)</i>

Tableau 1. Provenance des produits utilisés dans les expérimentations.

2.2.2. Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire permet de vérifier si les cellules décongelées ont été affectées par la congélation suite à une observation en microscopie optique. Cette méthodologie s'effectue en déposant, dans les chambres d'un hémacymètre, une quantité équivalente de suspension cellulaire et de bleu de trypan. Celui-ci pénètre et colore le cytoplasme des cellules mortes, alors que les cellules vivantes restent imperméables au produit (cellules blanches). Le dénombrement des cellules mortes et vivantes est alors possible pour effectuer l'équation suivante:

$$\frac{M_{\text{cellules vivantes}} \times D}{V_{\text{hémacymètre}}} = \frac{N_{\text{cellules vivantes}}}{V_{\text{suspension cellulaire}}}$$

où $M_{\text{cellules vivantes}}$ est la moyenne des cellules vivantes, D le facteur de dilution, $V_{\text{hémacymètre}}$ le volume présent dans une chambre de l'hémacymètre, $N_{\text{cellules vivantes}}$ le nombre total de cellules vivantes et $V_{\text{suspension cellulaire}}$ le volume total de la suspension cellulaire. Dans cette expérience, D est évalué à 2 alors que $V_{\text{hémacymètre}}$ est de 0,1 μl . Ainsi, on obtient:

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{M_{\text{cellules vivantes}}}{N_{\text{cellules}}} \times 100$$

où $M_{\text{cellules vivantes}}$ est la moyenne des cellules vivantes et N_{cellules} est le nombre total de cellules (mortes et vivantes).

2.2.3. Préparation des milieux de culture

2.2.3.1. Préparation du milieu de culture normal

De façon routinière, la culture cellulaire des deux lignées utilisées est effectuée dans des conditions semblables, soit dans un milieu de DMEMF-12 sans rouge phénol supplémenté avec 20 ng/ml d'EGF (0,01%), 10 mg/ml d'insuline (0,1%), 5% de sérum de cheval, 1% d'une solution de pénicilline/streptomycine, 0,1% d'hydrocortisone et 0,01% de toxine de choléra.

Les deux lignées cellulaires sont cultivées dans des pétris de 10 cm de diamètre au nombre de 10 000 cellules par centimètre carré déterminé suite à un décompte cellulaire (voir section 2.2.5). Les cellules sont mélangées à 8 ml de milieu de culture et sont

incubées à 37°C en milieu humidifié contenant 5% de CO₂. À confluence d'environ 80%, les cellules sont récoltées et réensemencées (passage cellulaire) au moins deux fois par semaine à l'aide d'un mélange de trypsine / EDTA 0,25% qui permet de faire décoller les cellules adhérentes au fond du pétri (voir section 2.2.3.2). Il est à noter que pour la culture des cellules MCF-10A et MCF-12A, le milieu de culture ne contient en aucun cas le rouge de phénol puisque ce dernier possède des propriétés oestrogéniques qui pourraient ajouter un biais méthodologique (Berthois *et al.*, 1986).

2.2.3.2. Méthodologie du passage cellulaire

Les passages cellulaires se font généralement trois fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi) dans le but de donner aux cellules un environnement nouveau propice au bon développement cellulaire. Il suffit de retirer le milieu déjà présent dans le pétri et d'ajouter un volume de 10 ml de tampon PBS 1X stérile, de rincer et de retirer le tampon. Un volume de 0,75 ml d'une solution de trypsine/EDTA 0,25% pour des pétris de 10 cm de diamètre permet de faire décoller les cellules adhérentes aux parois de plastique; le numéro de passage cellulaire identifiant cette population est à ce moment augmenté de un. Les pétris sont incubés pendant 10 à 15 min à 37°C afin de permettre l'action de la trypsine. Lorsque la plupart des cellules sont décollées, un volume de 1,25 ml de milieu normal est ajouté et les cellules sont resuspendues. La suspension est alors transférée dans un tube de 15 ml et le volume de milieu de culture est ajouté.

2.2.3.3. Préparation du milieu de culture traité

Dans le but d'effectuer une exposition cellulaire chronique ou aiguë à des contaminants, le mélange d'agonistes du AhR (voir Tableau 2) et l'HCB ont été ajoutés au milieu de culture normal. Étant cependant très hydrophobes, ceux-ci ont dû être solubilisés à une concentration de 1 :1000 dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) agissant comme véhicule pour les deux contaminants. Le mélange d'agonistes du AhR est ajouté à une concentration de 1 :1 avec le dibenzo-p-dioxine octachloré (OCDD) préalablement chauffé à 70°C pour obtenir une bonne solubilisation. L'HCB est préparé à une concentration de 10 mM dans le DMSO pour ensuite être aussi chauffé à 70°C pour la

Produits chimiques	Congénères	% du total	1X la dose (µg/L dans le milieu de culture)
BPC	77	2.2	1.5
	126	21.6	15.2
	169	9.0	12.5
	Total de BPC	33.1	22.9
PCDF	2.3.7.8-TCDF	1.6	1.2
	2.3.4.7.8-P2CDF	1.4	1.0
	1.2.3.4.7.8-HxCDF	0.8	0.6
	1.2.3.6.7.8-HxCDF	0.5	0.4
	2.3.4.6.7.8-HxCDF	0.3	0.2
	1.2.3.4.6.7.8-HpCDF	1.4	1.0
	OCDF	0.3	0.2
	Total de PCDF	6.3	4.4
PCDD	2.3.7.8-TCDD	0.5	0.4
	1.2.3.7.8-PECDD	1.4	1.0
	1.2.3.4.7.8-HxCDD	9.6	6.7
	1.2.3.7.8.9-HxCDD	1.6	1.2
	1.2.3.4.6.7.8-HpCDD	11.2	7.8
	OCDD	36.2	25.0
	Total de PCDD	60.5	41.9
Total d'hydrocarbures halogénés			69.1

Tableau 2. Doses individuelles des 16 hydrocarbures halogénés dans la composition du mélange d'agonistes du AhR.

solubilisation. Une fois solubilisé, la solution traitée est ajoutée au milieu de culture normal à une concentration finale de 1 :1000 pour les deux contaminants. Pour assurer une bonne croissance cellulaire et une adhésion adéquate des cellules aux pétris, le milieu de culture doit être changé après chaque passage. Il s'agit de retirer le milieu présent et d'ajouter entre 8 et 12 ml de milieu frais contenant le milieu approprié (ce volume répond aux besoins nutritifs des cellules et est suffisamment élevé pour recouvrir la surface entière du pétri).

2.2.4. Traitements cellulaires

Une fois l'entretien cellulaire quotidien terminé, les cellules MCF-10A et MCF-12A sont exposées au mélange d'agonistes du AhR et à l'HCB à court (10 ou 30 min) ou à long terme (de 15 à 40 passages) selon l'expérimentation.

2.2.4.1. Traitement à court terme

Dès la décongélation des cellules MCF-10A (voir section 2.2.1), des tests de viabilité cellulaire sont effectués dans le but de dénombrer le total des cellules vivantes (voir section 2.2.2). Les cellules sont par la suite incubées dans le milieu de culture normal. Les traitements au DMSO, au mélange d'agonistes du AhR et à l'HCB chez ces cellules mammaires ont une durée de 10 ou 30 min selon l'expérimentation, suivi d'une récolte de cellules effectuée par la technique décrite en section 2.2.6. Un décompte cellulaire et une évaluation du « doubling time » à chaque passage permet d'évaluer le temps de division cellulaire (voir section 2.2.5). Un nombre important de réplicats par traitement pour chaque expérience permet d'éliminer le facteur de variabilité qui existe entre les échantillons (n = 9).

2.2.4.2. Traitement à long terme

Dès la décongélation des cellules MCF-10A et MCF-12A, des tests de viabilité cellulaire sont effectués dans le but de dénombrer le total des cellules vivantes. Les cellules MCF-10A sont ensuite incubées dans le milieu de culture traité avec le DMSO, le mélange d'agonistes du AhR ou avec l'HCB et ce, dès le premier passage. Le traitement se poursuit pour 26 à 29 jours (\approx 15 passages) pour le mélange d'agonistes du AhR et est

de trois mois (≈ 40 passages) pour l’HCB. Les cellules MCF-10A traitées à l’HCB ont subi une privation de leur milieu en EGF (pour synchroniser les cellules) et en une réduction de sérum de cheval (5 % réduit à 1%) pendant une semaine après 15 passages consécutif en milieu traité; les cellules MCF-12A traitées à l’HCB ont subi une privation dans les mêmes conditions pendant trois semaines dès le début de la culture cellulaire. Les cellules ont par la suite été remises en contact avec leur milieu traité à l’HCB. Ces cultures cellulaires ont été maintenues par une étudiante membre de notre équipe de recherche, madame Marie-Andrée Poirier.

Une récolte de cellules s’est effectuée à chaque passage cellulaire par la technique décrite en section 2.2.6. Un décompte cellulaire et une évaluation du « doubling time » à tous les passages permet d’évaluer le temps de division cellulaire (voir section 2.2.5). Ce traitement à long terme a permis de dériver des lignées cellulaires MCF-10A et MCF-12A modifiées ayant subies une transformation des cellules saines en cellules transformées. L’expérimentation à long terme chez ces cellules mammaires a été répétée à trois reprises différentes dans le but d’éliminer toutes les variations existantes entre les échantillons. A partir d’une même souche cellulaire, des lignées de cellules dérivées et transformées ont été obtenues. L’analyse des résultats des cellules exposées à long terme au mélange d’agonistes du AhR et à l’HCB se fait pour chaque couple d’échantillons appariés (témoin/traité) à un passage cellulaire spécifique.

2.2.5. Décompte cellulaire

Brièvement, le décompte cellulaire s’effectue à l’aide d’un hémacymètre. Cet instrument comporte deux chambres opposées ayant un volume individuel de 0,1 μl et chaque chambre est divisée en quatre sous-unités de seize compartiments. Une petite quantité de suspension cellulaire est utilisée afin de calculer la quantité de cellules présentes dans le pétri et d’établir le temps de doublement, c’est-à-dire le temps que prend une cellule pour se diviser et donner deux cellules filles. Le nombre de cellules par compartiment est déterminé et une moyenne par sous-unités est calculée. L’évaluation du nombre de cellules se fait grâce à la relation suivante :

$$\frac{M_{\text{cellules comptées}}}{V_{\text{hémacymètre}}} = \frac{N}{V_{\text{suspension cellulaire}}}$$

où $M_{\text{cellules comptées}}$ est la moyenne des cellules comptées et N le nombre total de cellules dans le pétri.

Voici l'équation nécessaire pour effectuer le calcul du temps de doublement :

$$T.D.(h) = \frac{T_{\text{culture}}}{\log\left(\frac{N}{N_{\text{initial}}}\right) / \log 2}$$

où T_{culture} est le nombre d'heures des cellules en culture et N_{initial} le nombre de cellules mises au départ.

2.2.6. Récolte cellulaire

Une fois le traitement terminé, les échantillons sont homogénéisés dans un tampon de lyse stringant non dénaturant, le HNMETG ajusté à un pH de 7,5, qui est composé d'une solution d'HEPES pH 7,5 (25 mM), de NaCl (150 mM), de MgCl₂ (10 mM), d'EDTA (1 mM), de Triton X100 (0,1%), de glycérol (10%), d'aprotinine (10 µg/ml) et de sodium orthovanadate Na₃VO₄ de pH 10,0 (100 mM). Les homogénats sont ensuite soniqués et centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C et les surnageants (fraction cellulaire dépourvue des membranes et des noyaux) sont retirés, aliquotés et placés à -80°C pour la congélation. La quantité totale de protéines contenue dans chaque échantillon est mesurée par la méthode de Bradford en utilisant comme standard protéique l'albumine sérique bovine (BSA) et comme réactif, la solution commerciale de bleu de coomassie (Brillant blue G) (Bradford, 1976). Les lectures se sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre Power Wavex Bio-TEK instruments inc. ajusté à 595 nm sur des microplaques de 96 puits .

2.2.7. Techniques d'analyse

2.2.7.1. Analyse par immunobuvardage (Western Blot)

Les échantillons protéiques (40 µg : anti-phospho-ErbB2/HER-2 (Y1248), E-cadherin (H108) et anti-phospho-EGFR; 70 µg : anti-erB-2/HER-2, anti-EGFR receptor,

anti-Akt1/PKB α et anti-Akt/PKB pS⁴⁷³) sont dilués dans un bleu de migration « Laemmli loading buffer 6X » avec du DTT et ils sont déposés en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide de séparation à 6,5% et un gel de compactage à 4% en présence de SDS. Une électrophorèse est faite à 40 V durant environ 16 h jusqu'à ce que la ligne de front rejoigne la fin du gel.

Le gel est par la suite retiré de ses supports vitrés et est placé en conditions permettant aux protéines de transférer sur une membrane de nitrocellulose utilisant un appareil de transfert Transphor Power Lid (Pharmacia Biotech); l'opération s'effectue à 900 mA pendant une heure et demie dans un tampon de transfert 10X (25 mM de Tris-Base, 0,195 M de glycine, 0,1% de SDS, 10% de méthanol et 2 mM de CaCl₂). Une fois le transfert terminé, la membrane est retirée, rincée à l'eau puis immergée d'une solution de coloration de rouge de Ponceau (0,5% de Ponceau et 1% d'acide acétique) pour visualiser les protéines transférées. La membrane est agitée 5 min dans la solution jusqu'à apparition de bandes rouges indiquant la présence de protéines à poids moléculaires spécifiques.

Les membranes de nitrocellulose contenant les protéines transférées sont par la suite bloquées et hybridées avec l'un des premiers et deuxièmes anticorps suivants selon les protocoles ci-dessous: les membranes hybridées avec les anticorps anti-erbB-2/HER-2, anti-phospho-ErbB2/HER-2 (Y1248), anti-EGFR receptor, anti-phospho-EGFR et anti-Akt1/PKB α sont bloquées dans une solution de « phosphate buffer saline » (PBS) contenant 3% de lait en poudre (Carnation ®) pendant 30 min à température de la pièce sous agitation constante. Elles sont ensuite incubées à 4°C pendant la nuit avec les premiers anticorps précédents à la dilution spécifique de 1 :500, 1 :1500, 1 :500, 1 :500 et 1 :750 respectivement. Les membranes sont par la suite rincées deux fois avec de l'eau pour ensuite être hybridées de nouveau avec un deuxièmes anticorps soit anti-lapin 1 :5000 pour l'analyse du récepteur erbB2, anti-mouton 1 :2000, anti-chèvre 1 :1000 et anti-mouton 1 :2000, couplé à une peroxidase « *horseradish peroxydase* » pendant une heure et demie à température de la pièce sous agitation constante. Elles sont finalement rincées à l'eau, lavées 15 min dans le PBS-Tween 20 0,05% et de nouveau rincées à l'eau pendant 5 min pour ensuite être révélées par immunodétection.

Les membranes hybridées avec l'anticorps anti-Akt/PKB pS⁴⁷³ sont bloquées dans une solution de TBS-Tween 20 0,05%-5% lait en poudre pendant une heure à température de la pièce sous agitation constante. Elles sont ensuite incubées avec le premier anticorps anti-Akt/PKB pS⁴⁷³ 1 :800 pendant la nuit pour ensuite être rincées deux fois avec de l'eau et hybridées de nouveau avec le deuxième anticorps anti-lapin 1 :2000 couplé à la *horseradish peroxidase* pendant une heure et demie à température de la pièce sous agitation constante. Les membranes sont finalement rincées deux fois avec de l'eau, lavées 15 min dans le TBS-Tween 20 0,05% pour ensuite être révélées par immunodétection.

Les membranes hybridées avec l'anticorps E-cadhérine sont bloquées dans une solution de PBS-Tween 20 0,05%-5% lait en poudre pendant 30 min à température de la pièce sous agitation constante. Elles sont ensuite incubées avec le premier anticorps E-cadhérine 1 :200 à 4°C pendant une heure pour ensuite être rincées pendant 30 min avec le PBS-Tween 20 0,05%. Les membranes sont de nouveau hybridées avec le deuxième anticorps anti-lapin 1 :8000 couplé à la *horseradish peroxidase* pendant 45 min à température de la pièce sous agitation constante. Elles sont finalement rincées pendant 30 min avec le PBS-Tween 20 0,05% et révélées par immunodétection.

Afin d'effectuer une normalisation en tenant compte de la quantité de protéines déposée sur chacune des membranes à l'aide de l'anticorps anti-actin (I-19), celles-ci sont bloquées pendant une heure à température de la pièce avec du « tris buffer saline » (TBS) contenant du Tween 20 0,05% et du lait en poudre 5% pour ensuite être hybridées pendant la nuit avec un premier anticorps anti-actin (I-19) polyclonal 1 :200. Les membranes sont lavées trois fois avec du TBS-Tween 20 0,05% et subséquemment incubées pendant une heure à température de la pièce avec l'anti-chèvre 1 :4000 comme deuxième anticorps. Elles sont ensuite lavées 30 min avec le TBS-Tween 20 0,05% avant d'être révélées par immunodétection.

Après plusieurs marquages consécutifs, une étape supplémentaire de « stripping » permet de faire décoller les anticorps sur une même membrane. Cette technique s'effectue selon un processus classique: la solution de « stripping » (100 mM de béta-mercapto éthanol, 2% de SDS (w/v), 62,5 mM de Tris-HCl (pH 6,7)) est chauffée dans un bain à

60°C pour ensuite immerger les membranes dans la solution pendant 30 min sous agitation constante. La solution est par la suite récupérée et les membranes sont lavées cinq fois à l'eau pour ensuite être bloquées pour une hybridation spécifique. Ce lavage drastique permet d'éliminer toute trace d'anticorps inutile pouvant nuire à la détection.

Brièvement, la détection des protéines reconnues par les différents anticorps primaires et secondaires couplés à la *horseradish peroxidase* est effectuée en utilisant une trousse de chemiluminescence. La présence d'un signal positif des protéines immunoréactives entraîne une luminescence qui est détectée par autoradiographie. La révélation photographique permet ainsi de visualiser les bandes représentatives de l'expression des protéines désirées. Les photos sont par la suite soumises à un balayage (*scan*) avec un appareil Bio-Rad Multi-Analysist^{TM/PC} afin d'évaluer l'intensité densitométrique des bandes obtenues. Les résultats présentés au CHAPITRE 3 montrent le rapport de la valeur de densitométrie pour une membrane hybridée avec un anticorps spécifique sur celle hybridée avec l'anticorps anti-actine.

2.2.7.2. Analyse par immunoprécipitation

Les échantillons utilisés pour cette analyse sont préparés exactement de la même façon que pour les échantillons ayant servis pour l'immunobuvardage. Cependant, une fois les échantillons dilués dans 1 µg/µl dans le PBS, 150 µg de protéines cellulaires sont incubées pendant la nuit à 4°C avec 4 µg d'anticorps anti-ILK ou d'anti-Akt1/PKBα et sont complétés avec du tampon de lyse HNMETG. Par la suite, 50 µl de protéines d'agarose A, préalablement lavées consécutivement avec le tampon de lyse HNMETG, sont ajoutées au complexe anticorps-lysate pendant deux heures à 4°C. Les échantillons sont par la suite centrifugés à vitesse maximale pendant une minute pour permettre de collecter le complexe anticorps-lysate-billes une fois le surnageant retiré. Le complexe est lavé plusieurs fois avec du PBS et de l'HEPES 25 mM avant d'ajouter le « Laemmli loading buffer 6X » dans les échantillons.

Une analyse par immunobuvardage sur gel de polyacrylamide est effectuée. La membrane est bloquée avec une solution de TBS-Tween 20 0,15%-BSA 1% pendant la nuit sous agitation constante. Elle est hybridée avec l'anti-phosphosérine 1 :500 comme premier anticorps pendant une heure à température de la pièce sous agitation constante

pour ensuite être lavée 30 min avec le TBS-Tween 20 0,15%. La membrane est finalement incubée avec l'anti-lapin 1 :10000 comme deuxième anticorps pendant une heure à température de la pièce sous agitation constante avant d'être révélée par immunodétection.

2.2.8. Statistiques

À partir de la mesure de l'intensité densitométrique de chaque bande révélée par l'immunobuvardage, la moyenne et l'erreur sur la moyenne (SEM) sont calculées pour chaque groupe. Lorsque applicable, les valeurs moyennes entre les groupes témoins et les groupes traités ont été comparées entre elles à l'aide du test de t de Student en utilisant le logiciel Sigma Stat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA). Le seuil de signification est de 0,05.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1. Les effets du mélange d'agonistes du AhR sur les cellules mammaires

Des analyses par immunobuvardage et par immunoprécipitation ont permis de déterminer l'effet des expositions à court et à long terme au mélange d'agonistes du AhR sur des cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, les MCF-10A.

3.1.1. Traitement à court terme des cellules MCF-10A

La Figure 3.1 présente un résultat type d'immunobuvardage pour des extraits de cellules MCF-10A exposées durant 10 min au DMSO (9 premiers puits) ou au mélange d'agonistes du AhR (9 derniers puits) sur l'expression (Figure 3.1-A) et la phosphorylation (Figure 3.1-B) de erbB2. On note une bande unique de protéines immunoréactives dont le poids moléculaire est de 185 kDa pour erbB2 et de 42 kDa pour la protéine de référence, l'actine (Figure 3.1-C). Le signal obtenu pour la mesure de phospho-erbB2 correspond à la bande supérieure du doublet dont le poids est de 185 kDa; la bande inférieure immunoréactive est inconnue. Les rapports densitométriques pour les groupes de pétris montrent que, suite à une exposition de 10 ou de 30 min au mélange d'agonistes du AhR, l'expression de erbB2 est réduite de façon significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin (Figure 3.2-A). Cette même exposition ne provoque aucune modification significative sur la phosphorylation de erbB2 (Figure 3.2-B), ni sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 (Figure 3.2-C) par rapport au groupe témoin.

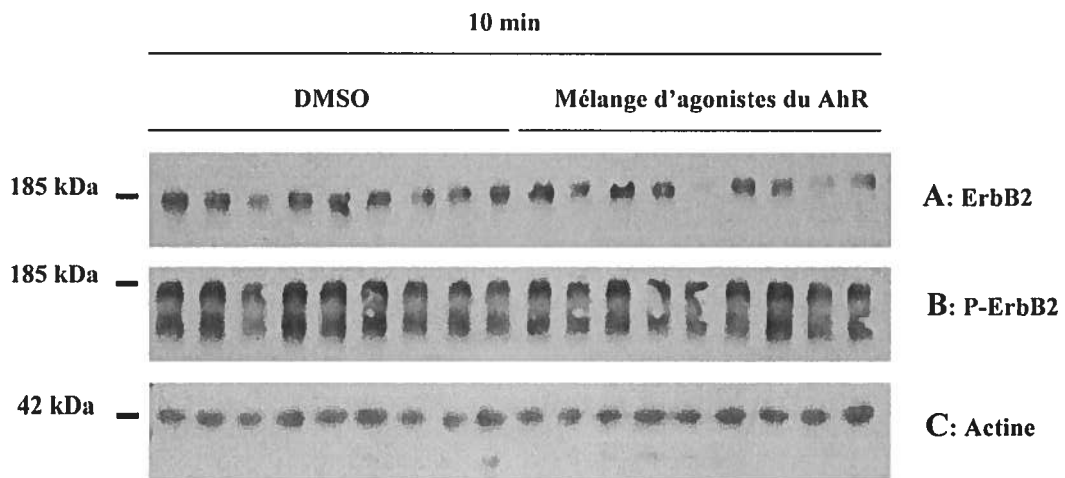
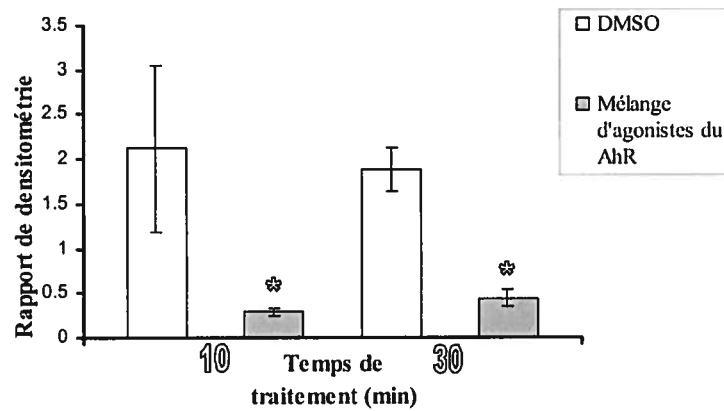


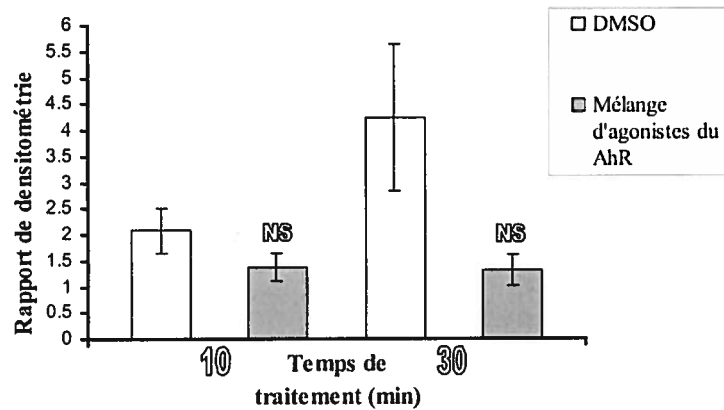
Figure 3.1. Effet d'une exposition de 10 min au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression (A) et la phosphorylation (B) de erbB2 des cellules MCF-10A.

Les cellules MCF-10A sont exposées pendant 10 min au mélange d'agonistes du AhR ou au DMSO (témoin). Une quantité de 70 μ g ou de 40 μ g de protéines cellulaires totales est migrée sur gel de polyacrylamide et analysée par immunobuvardage en utilisant respectivement les anticorps anti-erbB2/HER-2 et anti-phospho-erbB2/HER-2. La normalisation est effectuée à l'aide de la mesure du signal obtenu avec un anticorps anti-actine. Les poids moléculaires des marqueurs (kDa) sont identifiés à gauche.

A



B



C

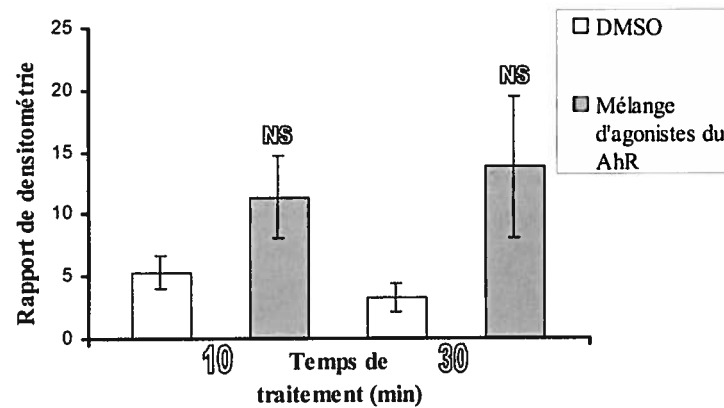


Figure 3.2. Effet d'une exposition de 10 ou de 30 min au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression de erbB2 (A), sa phosphorylation (B) et sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) des cellules MCF-10A.

Les nombres ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-erbB-2/HER-2 ou un anti-phospho-erbB-2/HER-2 sur celle hybridée avec l'anti-actine. NS indique que les données sont non significativement différentes. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) par comparaison aux groupes témoins. N=27

3.1.2. Traitement à long terme des cellules MCF-10A

3.1.2.1. Effet du mélange d'agonistes du AhR sur la prolifération cellulaire

Une série d'expérimentations *in vitro* a permis de déterminer l'effet à long terme du mélange d'agonistes du AhR sur la prolifération cellulaire des cellules MCF-10A. Celles-ci ont étéensemencées, à une densité de 10 000 cellules par centimètre carré, et ont été cultivées continuellement dans un milieu de culture en présence du mélange d'agonistes du AhR ou de son véhicule, le DMSO. Les résultats de la Figure 3.3 montrent que le nombre de cellules témoins (diamant; ligne grasse) augmente pendant les 29 jours consécutifs de traitement au DMSO. Chez les cellules exposées au mélange d'agonistes du AhR (carré; ligne mince), ce nombre augmente durant les 6 premiers jours de culture et diminue subséquemment durant les 23 prochains jours de traitement; au jour 29 on observe un arrêt total de la prolifération des cellules.

3.1.2.2. Effet du mélange d'agonistes du AhR sur le récepteur erbB2/HER-2

Pour déterminer si une exposition chronique au mélange d'agonistes du AhR exerce une modulation de l'expression et de la phosphorylation du récepteur membranaire erbB-2, des analyses par immunobuvardage ont été effectuées. Les résultats de la Figure 3.4 montrent qu'un traitement de 26 jours consécutifs au mélange d'agonistes du AhR ne provoque aucune modification significative de l'expression de erbB2 des cellules MCF-10A. Par contre, le niveau de phosphorylation de erbB2 et le rapport phospho-erbB2/erbB2 des cellules MCF-10A exposées au mélange d'agonistes du AhR durant 26 jours est significativement ($p < 0,05$) augmenté par rapport aux cellules témoins. Ce dernier est alors cinq fois supérieur à celui du groupe témoin.

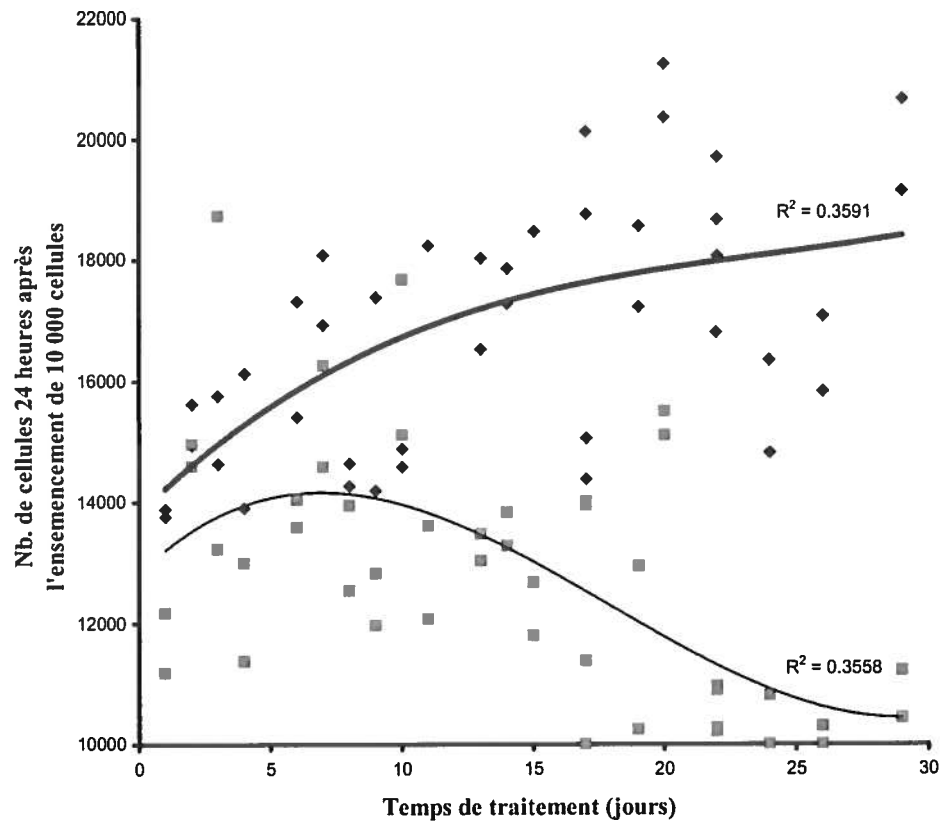


Figure 3.3. Effet d'une exposition de 29 jours au mélange d'agonistes du AhR sur la prolifération des cellules MCF-10A.

La courbe d'extrapolation des cellules témoins (diamant) est exprimée en ligne grasse alors que la courbe des cellules traitées au mélange d'agonistes du AhR est représentée en ligne mince (carré). N=3 ou 4

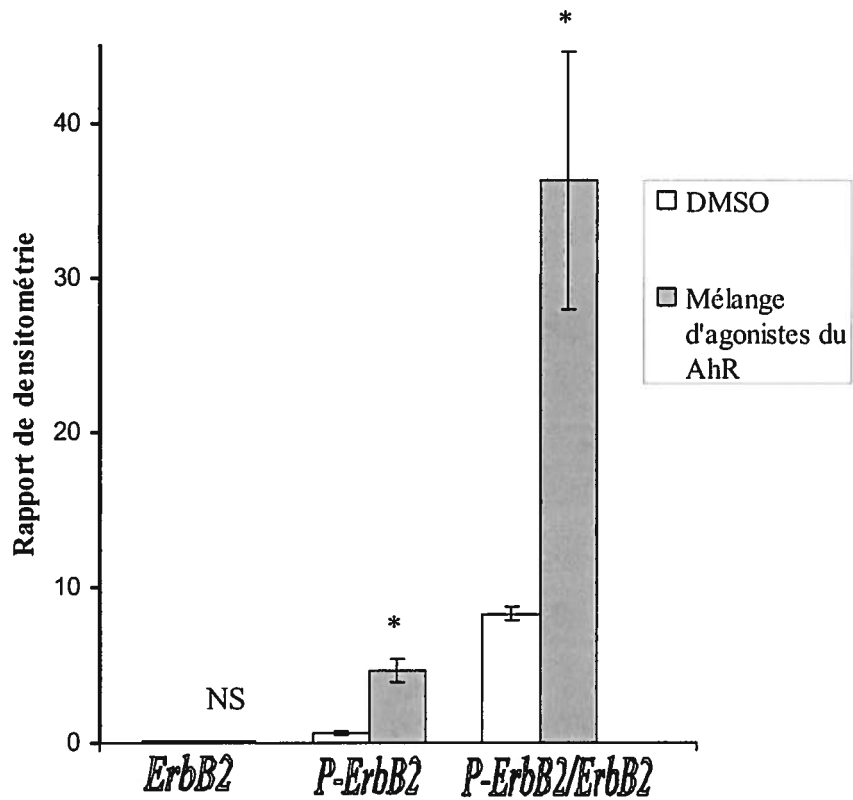


Figure 3.4. Effet d'une exposition de 26 jours au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression de erbB2, sa phosphorylation et sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 des cellules MCF-10A.

Les nombres ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-erbB-2/HER-2 ou un anti-phospho-erbB-2/HER-2 sur celle hybridée avec l'anti-actine. NS indique que les données sont non significativement différentes. L'astérix (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) par comparaison aux groupes témoins. N=4

3.1.2.3. Effet du mélange d'agonistes du AhR sur la Integrin-Linked Kinase (ILK)

Une analyse par immunoprécipitation de la protéine ILK a été effectuée pour déterminer l'effet d'une exposition de 13 ou de 17 jours au mélange d'agonistes du AhR sur la signalisation cellulaire des cellules MCF-10A. La Figure 3.5 présente un résultat type d'immunoprécipitation pour des extraits de cellules MCF-10A exposées 13 ou 17 jours au DMSO ou au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression et la phosphorylation de la ILK. On note une bande unique de protéines immunoréactives dont le poids moléculaire est de 59 kDa correspondant à celui de la ILK. Les valeurs de densitométrie pour les groupes de pétris montrent une augmentation de l'expression de la ILK chez les cellules MCF-10A traitées durant 13 jours au mélange d'agonistes du AhR alors qu'au jour 17 aucune augmentation n'est présente (Figure 3.6-A). On observe aussi une augmentation de la phosphorylation de la ILK (Figure 3.6-B) et du rapport phospho-ILK/ILK (Figure 3.6-C) suite à une exposition de 13 ou de 17 jours au mélange d'agonistes du AhR comparativement aux cellules témoins.

En résumé, les résultats montrent qu'une exposition à court terme au mélange d'agonistes du AhR n'engendre aucune modification de la phosphorylation du récepteur erbB2 chez les cellules MCF-10A. Par ailleurs, un traitement prolongé au mélange d'agonistes du AhR affecte directement la prolifération cellulaire en diminuant le nombre de cellules en division. De plus, cette exposition chronique au mélange d'agonistes du AhR augmente le taux de phosphorylation de erbB2. Finalement, le taux de phosphorylation de la protéine ILK est aussi augmenté chez les cellules MCF-10A traitées au mélange d'agonistes du AhR de façon chronique.

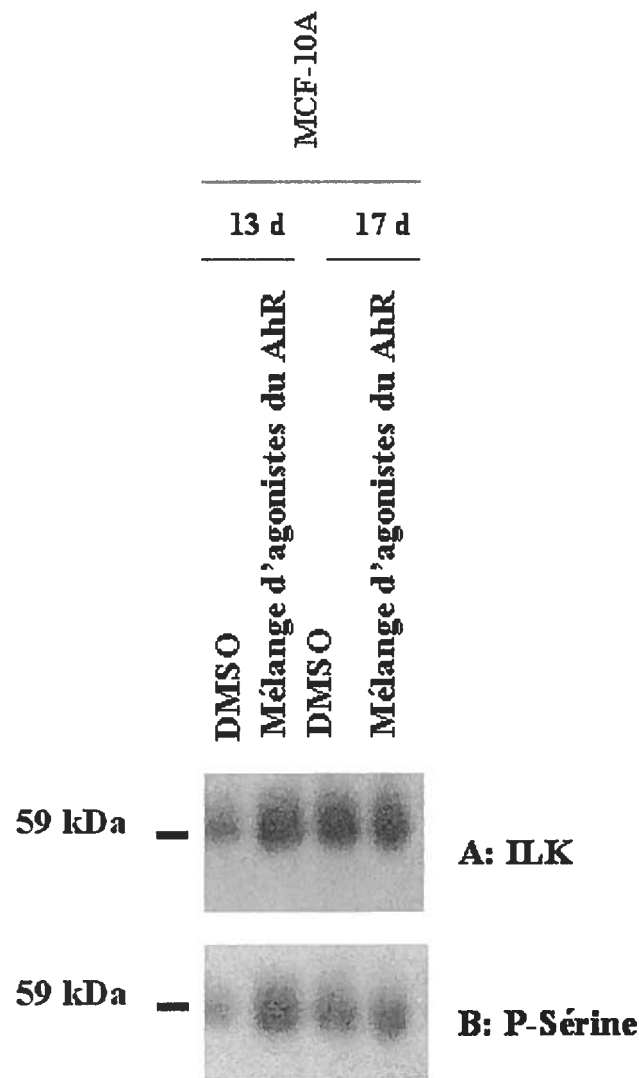
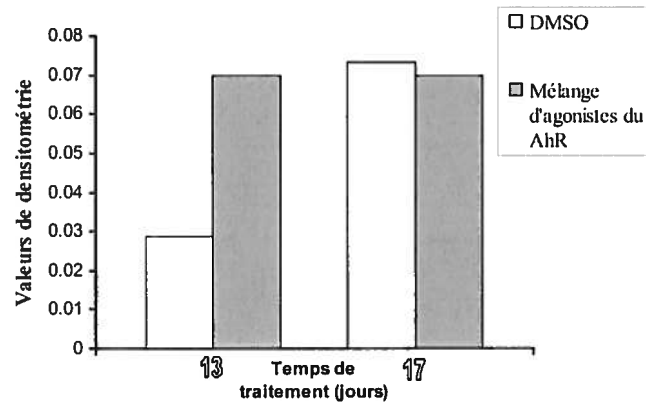


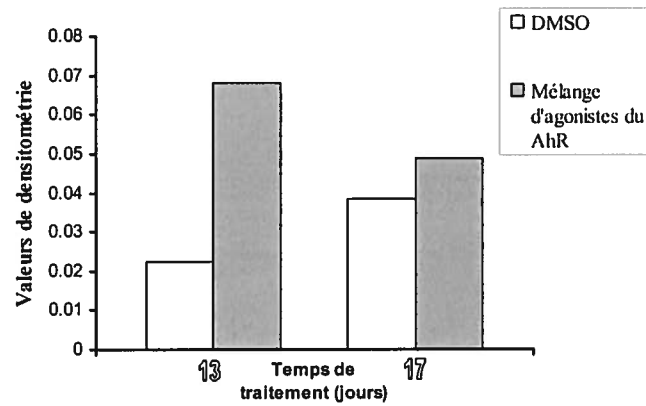
Figure 3.5. Effet d'une exposition de 13 ou de 17 jours au mélange d'agonistes du AhR sur l'expression et la phosphorylation de la ILK des cellules MCF-10A.

Les cellules MCF-10A sont exposées de façon continue au mélange d'agonistes du AhR ou au DMSO (témoin). Une quantité de 150 µg de protéines cellulaires totales est migrée sur gel de polyacrylamide et analysée par immunoprécipitation et par immunobuvardage en utilisant respectivement les anticorps anti-ILK et anti-phosphosérine. Le poids moléculaire du marqueur (kDa) est identifié à gauche.

A



B



C

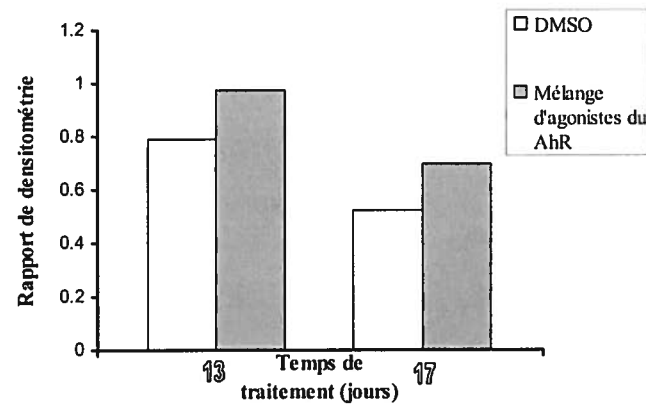


Figure 3.6. Expression de la ILK (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-ILK/ILK (C) de la lignée de cellules MCF-10A exposées 13 ou 17 jours au mélange d'agonistes du AhR.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-ILK pour l'immunoprécipitation ou un anti-phosphosérine pour l'immunobuvardage.

3.2. Les effets de l'hexachlorobenzène sur les cellules mammaires

Des analyses par immunobuvardage et par immunoprécipitation ont permis de déterminer l'effet des expositions à court et à long terme à l'HCB sur deux lignées de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, les MCF-10A et les MCF-12A.

3.2.1. Traitement à court terme des cellules MCF-10A

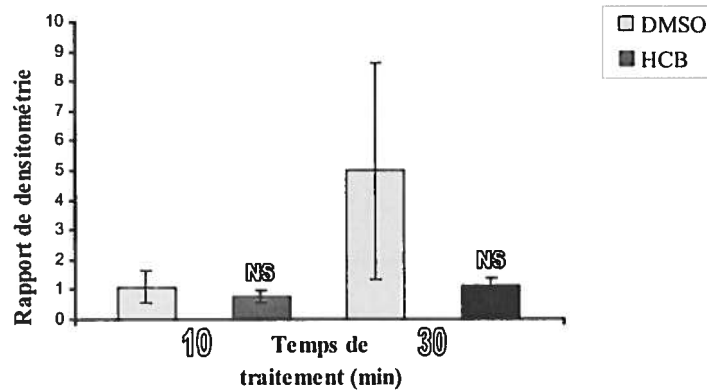
Les rapports densitométriques pour les groupes de pétris des cellules MCF-10A montrent qu'une exposition de 10 ou de 30 min à l'HCB ne provoque aucune modification significative de l'expression de erbB2 (Figure 3.7-A) et du rapport phospho-erbB2/erbB2 (Figure 3.7-C) par rapport au groupe témoin. Par contre, cette même exposition promouvoit une diminution significative ($p < 0,05$) des niveaux de phosphorylation de erbB2 exprimés par rapport au groupe témoin (Figure 3.7-B).

3.2.2. Traitement à long terme des cellules MCF-10A et MCF-12A

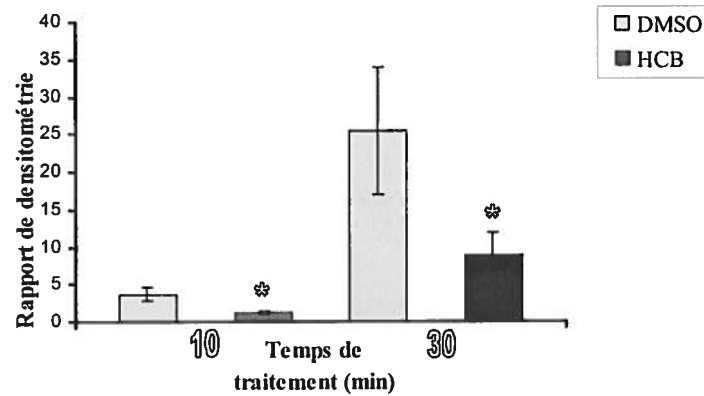
3.2.2.1. Effet de l'HCB sur le récepteur erbB2

Une série d'expérimentations *in vitro* a permis de déterminer l'effet à long terme de l'HCB sur l'expression et la phosphorylation de erbB2 des cellules MCF-10A et MCF-12A. Les résultats de la Figure 3.8-A et 3.8-B montrent qu'une exposition à long terme à l'HCB des cellules MCF-10A provoque une diminution de l'expression et de la phosphorylation de erbB2. Le rapport phospho-erbB2/erbB2 est cependant de 2 à 8 fois supérieur (Figure 3.8-C) chez les cellules exposées à l'HCB durant 66 ou 72 jours consécutifs de traitement comparativement au groupe témoin. De même, chez les cellules MCF-12A exposées pendant 52 ou 64 jours consécutifs à l'HCB, on observe une augmentation de la phosphorylation de erbB2 et du rapport phospho-erbB2/erbB2 comparativement au groupe témoin (Figure 3.9-B et 3.9-C).

A



B



C

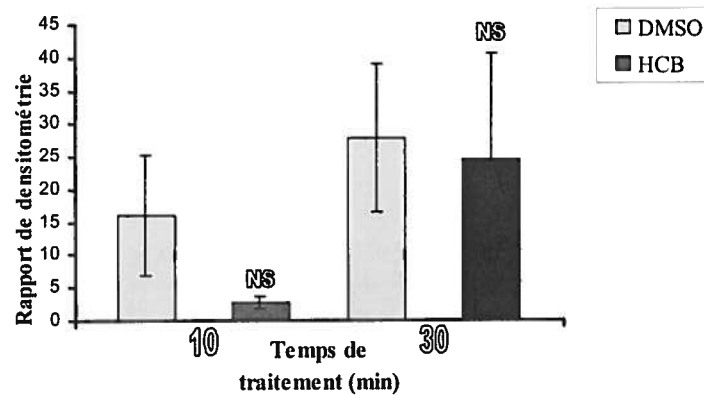
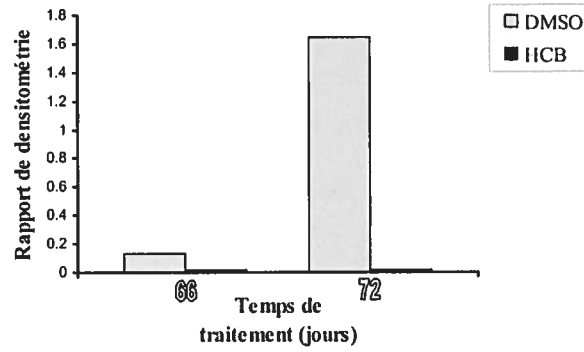


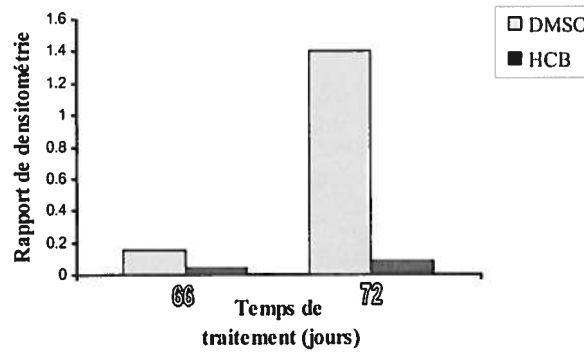
Figure 3.7. Effet d'une exposition de 10 ou de 30 min à l'HCB sur l'expression de erbB2 (A), sa phosphorylation (B) et sur le rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) des cellules MCF-10A.

Les nombres ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-erbB-2/HER-2 ou un anti-phospho-erbB-2/HER-2 sur celle hybridée avec l'anti-actine. NS indique que les données sont non significativement différentes. L'astérix (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) par comparaison aux groupes témoins. N=9

A



B



C

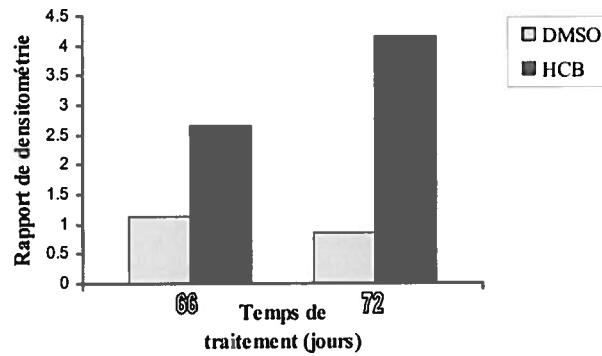
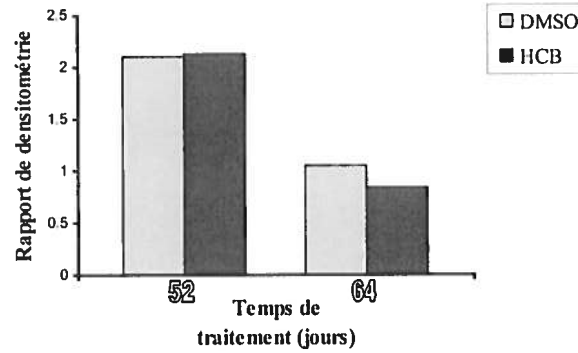


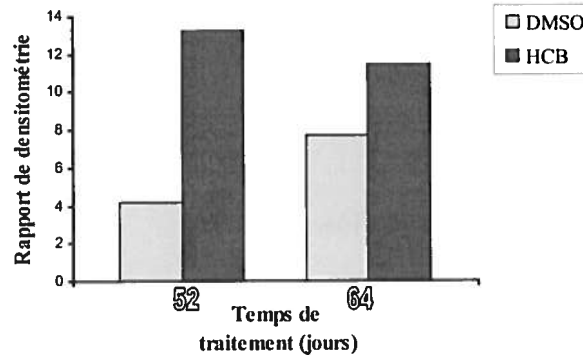
Figure 3.8. Expression de erbB2 (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) de la lignée de cellules MCF-10A exposées 66 ou 72 jours à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-erbB-2/HER-2 ou un anti-phospho-erbB-2/HER-2 sur celle hybridée avec l'anti-actine.

A



B



C

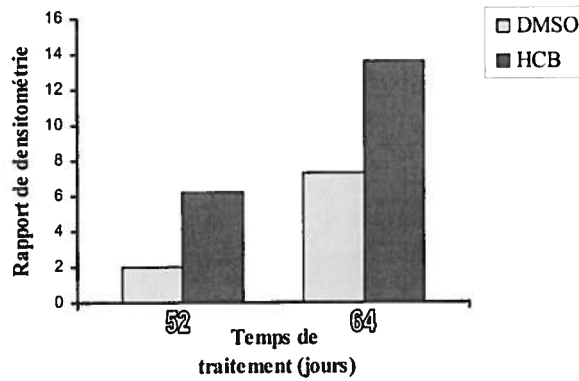


Figure 3.9. Expression de erbB2 (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-erbB2/erbB2 (C) de la lignée de cellules MCF-12A exposées 52 ou 64 jours à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-erbB-2/HER-2 ou un anti-phospho-erbB-2/HER-2 sur celle hybridée avec l'anti-actine.

3.2.2.2. Effet de l'HCB sur le récepteur de facteurs de croissance (EGFR)

La prolifération cellulaire chez les cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales est fortement dépendante du facteur de croissance EGF. Considérant le phénomène d'hétérodimérisation des récepteurs EGFR et erbB2, il est apparu important de déterminer l'effet d'une exposition chronique à l'HCB sur l'expression et la phosphorylation du récepteur de facteurs de croissance EGFR chez les lignées MCF-10A et MCF-12A. La Figure 3.10 présente un résultat type d'immunobuvardage pour des extraits de cellules exposées à l'HCB durant 66 jours chez les cellules MCF-10A et 52 ou 64 jours chez les cellules MCF-12A sur l'expression (Figure 3.10-A) et la phosphorylation (Figure 3.10-B) de EGFR. On note une bande unique de protéines immunoréactives dont le poids moléculaire est de 170 kDa pour EGFR et de 42 kDa pour la protéine de référence, l'actine (Figure 3.10-C).

Les résultats de la Figure 3.11 et de la Figure 3.12 montrent qu'une exposition de plusieurs jours consécutifs à l'HCB provoque une augmentation de l'expression de EGFR (après 66 ou 72 jours; Figure 3.11-A) et de la phosphorylation de EGFR (après 66, 68 ou 70 jours; Figure 3.11-B) de la lignée de cellules MCF-10A. De plus, chez la lignée de cellules MCF-12A, une exposition prolongée à l'HCB de 52 ou de 64 jours consécutifs engendre une hausse de l'expression (Figure 3.12-A) et de la phosphorylation de EGFR (Figure 3.12-B).

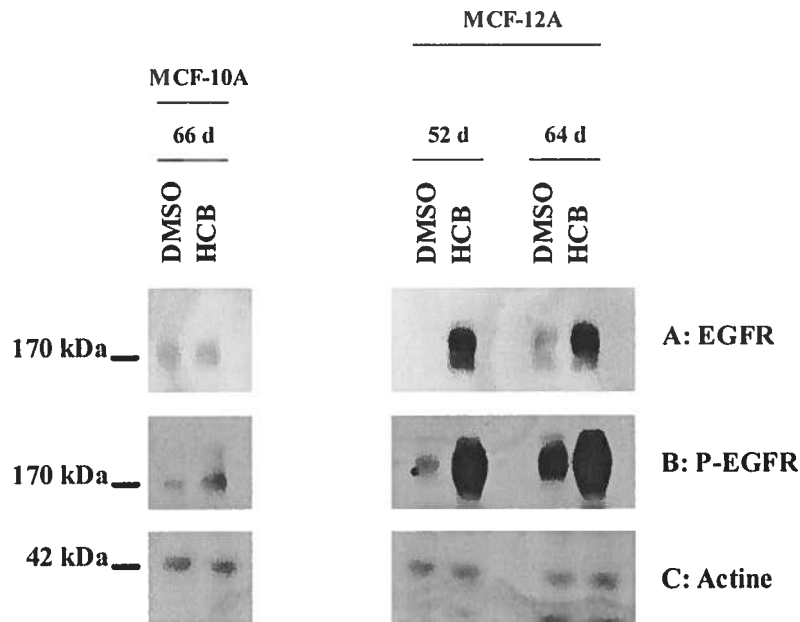
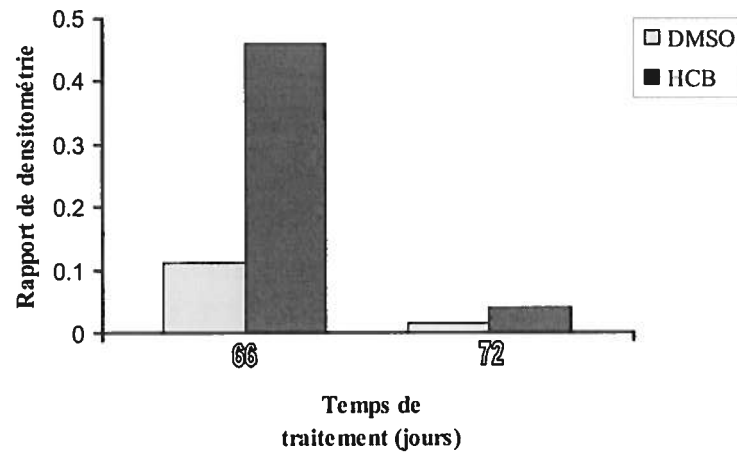


Figure 3.10. Effet d'une exposition à long terme à l'HCB sur l'expression (A) et la phosphorylation (B) de EGFR des cellules MCF-10A et MCF-12A.

Les cellules MCF-10A et MCF-12A sont exposées de façon continue à l'HCB ou au DMSO (témoin). Une quantité de 150 µg de protéines cellulaires totales est migrée sur gel de polyacrylamide et analysée par immunobuvardage en utilisant respectivement les anticorps anti-EGFR et anti-phospho-EGFR. La normalisation est effectuée à l'aide de la mesure du signal obtenu avec un anticorps anti-actine. Le poids moléculaire du marqueur (kDa) est identifié à gauche.

A



B

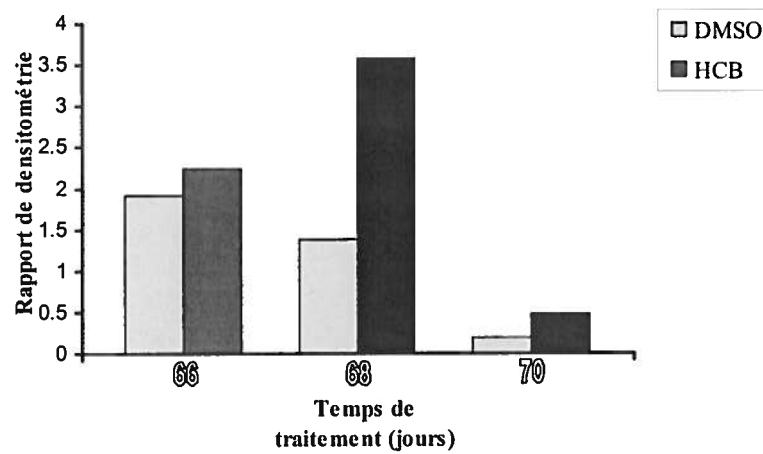
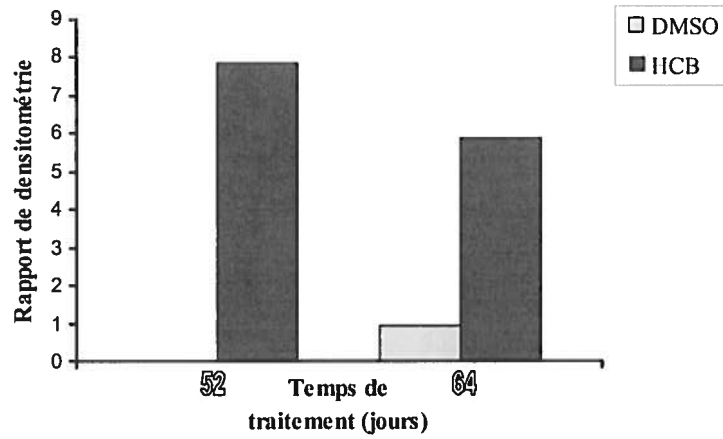


Figure 3.11. Expression de EGFR (A) et de sa phosphorylation (B) de la lignée de cellules MCF-10A exposées à long terme à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-EGFR ou un anti-phospho-EGFR sur celle hybridée avec l'anti-actine.

A



B

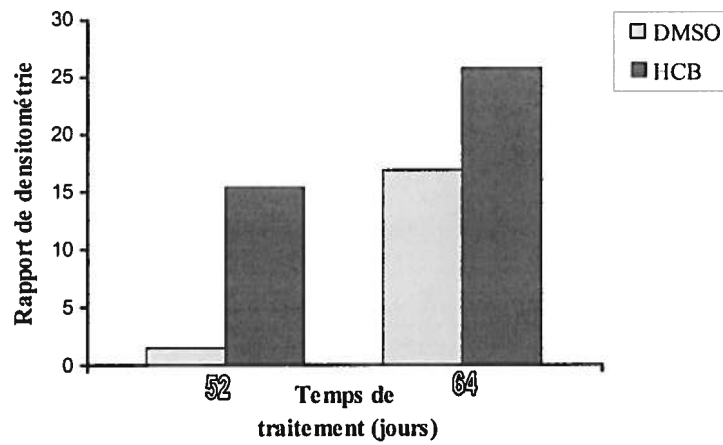


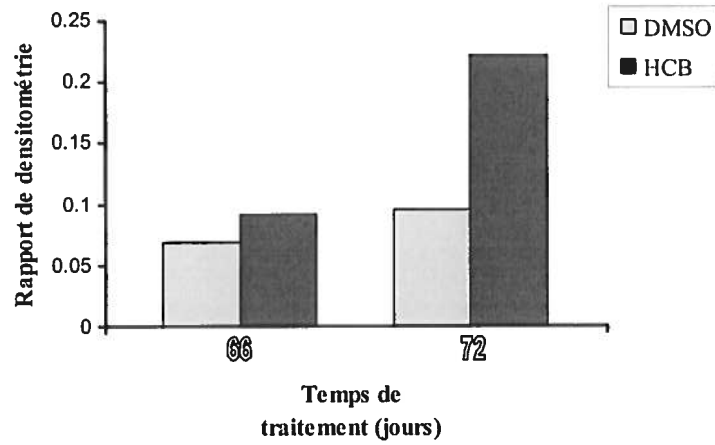
Figure 3.12. Expression de EGFR (A) et de sa phosphorylation (B) de la lignée de cellules MCF-12A exposées 52 ou 64 jours à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-EGFR ou un anti-phospho-EGFR sur celle hybridée avec l'anti-actine.

3.2.2.3. Effet de l'HCB sur la Integrin-Linked Kinase (ILK)

Pour caractériser la cascade de signalisation activée par une augmentation du niveau de phosphorylation de la p185 (erbB2) et une modulation de EGFR chez les cellules exposées chroniquement à l'HCB, le niveau d'expression et de phosphorylation de la protéine ILK a été évalué par immunoprécipitation et par immunobuvardage. Une exposition de 66 ou de 72 jours à l'HCB chez les cellules MCF-10A (Figure 3.13-A) et une exposition de 52, de 60 ou de 64 jours à ce même contaminant chez les cellules MCF-12A (Figure 3.13-B et Figure 3.14-A) engendre une augmentation de l'expression de la ILK comparativement aux cellules traitées au DMSO. De plus, ces expositions de 70 ou de 60 jours à l'HCB, respectivement des cellules MCF-10A et MCF-12A, entraînent une hausse de la phosphorylation de la ILK (Figure 3.14-B) et du rapport phospho-ILK/ILK (Figure 3.14-C) comparativement aux cellules témoins.

A



B

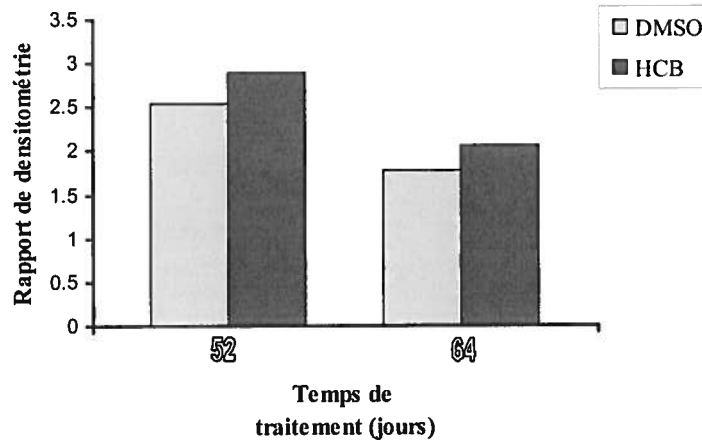
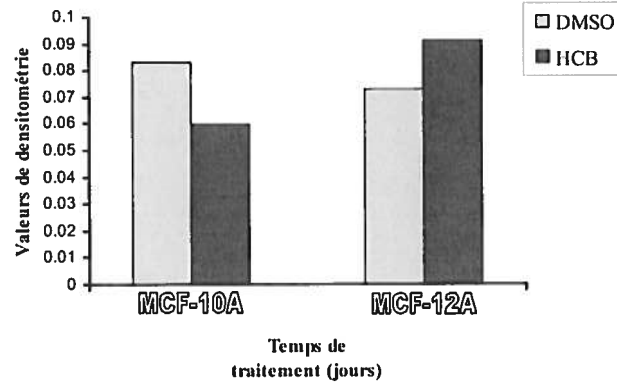


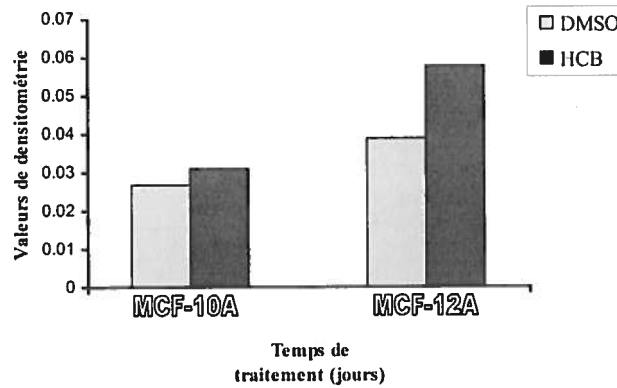
Figure 3.13. Expression de la ILK de la lignée de cellules MCF-10A (A) et MCF-12A (B) exposées à long terme à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-ILK sur celle hybridée avec l'anti-actine.

A



B



C

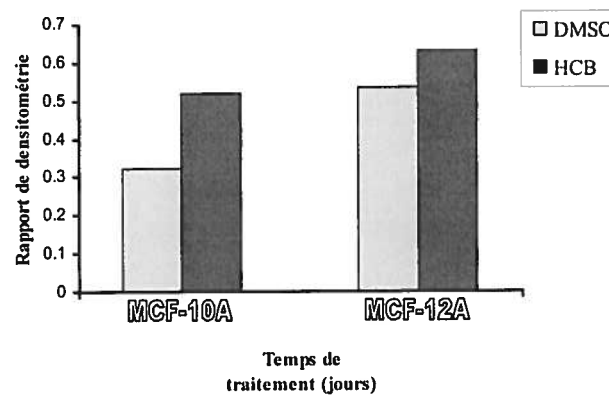


Figure 3.14. Expression de la ILK (A), de sa phosphorylation (B) et du rapport phospho-ILK/ILK (C) de la lignée de cellules MCF-10A et MCF-12A exposées respectivement 70 ou 60 jours à l'HCB.

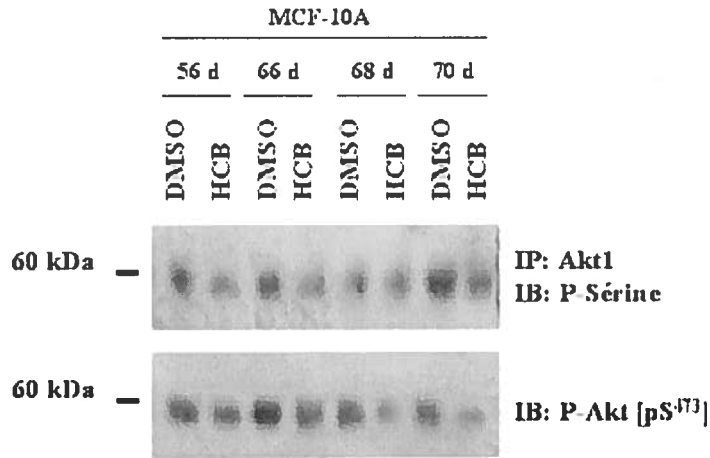
Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-ILK pour l'immunoprécipitation ou un anti-phosphosérine pour l'immunobuvardage.

3.2.2.4. Effet de l'HCB sur la sérine/thréonine kinase Akt

La Akt est une protéine qui exerce un rôle important de médiateur au niveau de la signalisation cellulaire. Ainsi, pour déterminer l'effet de l'HCB sur la phosphorylation de la Akt chez les lignées cellulaires MCF-10A et MCF-12A, des analyses par immunobuvardage et par immunoprécipitation ont été effectuées. La Figure 3.15-A présente un résultat type d'immunobuvardage pour des extraits immunoprécipités de cellules MCF-10A exposées à long terme au DMSO ou à l'HCB sur la phosphorylation (S473) de la Akt après 56, 66, 68 ou 70 jours de traitement. On note une bande unique de protéines immunoréactives dont le poids moléculaire est de 60 kDa.

La Figure 3.15-B présente un résultat type d'immunoprécipitation de l'effet d'une exposition à long terme au DMSO ou à l'HCB sur la phosphorylation de la Akt après 58, 68 ou 70 jours de traitement chez les MCF-10A et après 64 ou 74 jours de traitement chez les MCF-12A. Une exposition de 56, 66, 68 ou 70 jours à l'HCB provoque une diminution marquée de la phosphorylation de la Akt chez les cellules MCF-10A après une analyse effectuée par immunoprécipitation (Figure 3.16-A) et par immunobuvardage (Figure 3.16-B). Des expositions de 58, 68 ou 70 jours à l'HCB chez les MCF-10A et de 64 ou 74 jours à l'HCB chez les MCF-12A entraîne une diminution de la phosphorylation de la Akt (Figure 3.17-A et 3.17-B).

A



B

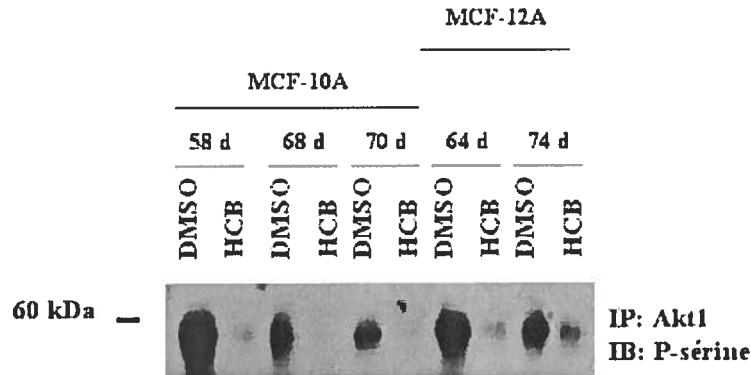
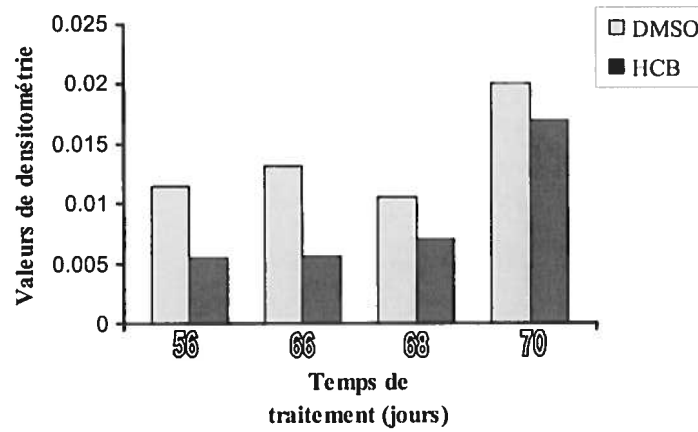


Figure 3.15. Effet d'une exposition à l'HCB sur la phosphorylation de la Akt après 56, 66, 68 ou 70 jours de traitement chez les MCF-10A (A) et après 64 ou 74 jours de traitement chez les MCF-12A (B).

Les cellules MCF-10A et MCF-12A sont exposées de façon continue à l'HCB ou au DMSO (témoin). A, une quantité de 150 µg ou de 70 µg de protéines cellulaires totales est migrée sur gel de polyacrylamide et analysée en utilisant respectivement les anticorps anti-Akt1 et anti-phosphosérine pour l'immunoprécipitation et anti-phospho-Akt [pS⁴⁷³] pour l'immunobuvardage. B, une quantité de 150 µg de protéines cellulaires totales est migrée sur gel de polyacrylamide et analysée par immunoprécipitation et par immunobuvardage en utilisant respectivement les anticorps anti-Akt1 et anti-phosphosérine. Le poids moléculaire du marqueur (kDa) est identifié à gauche.

A



B

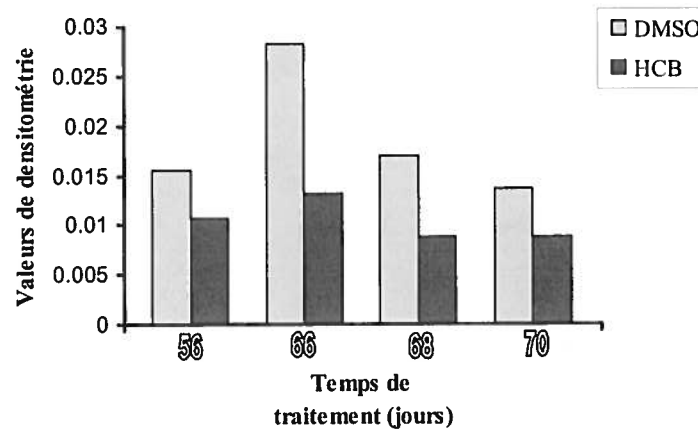
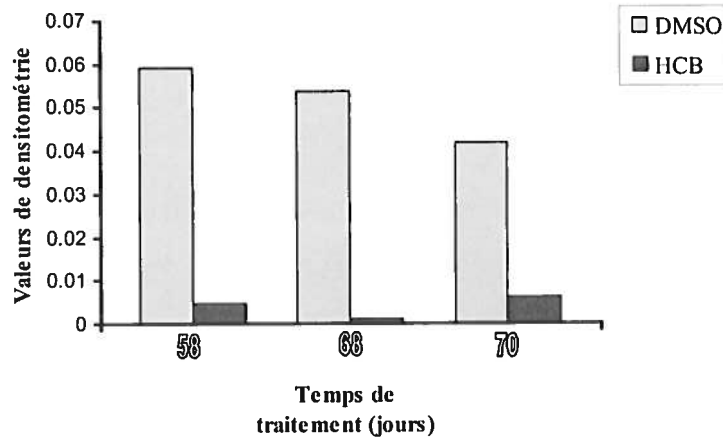


Figure 3.16. Phosphorylation de la Akt de la lignée de cellules MCF-10A exposées 56, 66, 68 ou 70 jours de traitement à l'HCB analysés par immunoprécipitation (A) ou par immunobuvardage (B).

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-Akt et un anti-phosphosérine pour l'immunoprécipitation et avec un anti-phospho-Akt pour l'immunobuvardage.

A



B

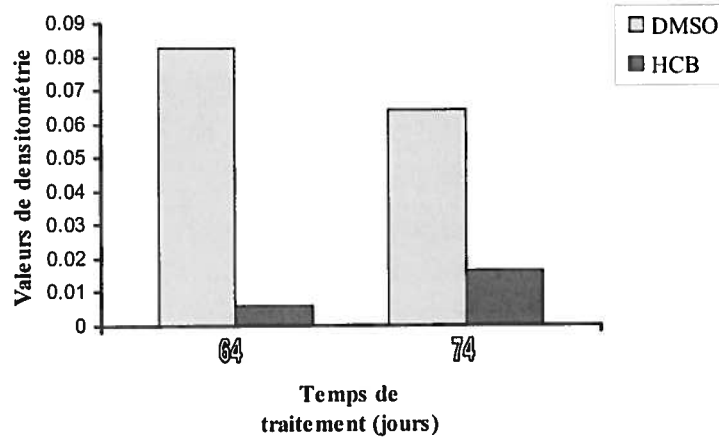


Figure 3.17. Phosphorylation de la Akt de la lignée de cellules MCF-10A exposées 58, 68 ou 70 jours (A) et de la lignée de cellules MCF-12A exposées 64 ou 74 jours (B) de traitement à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-Akt1 et un anti-phosphosérine.

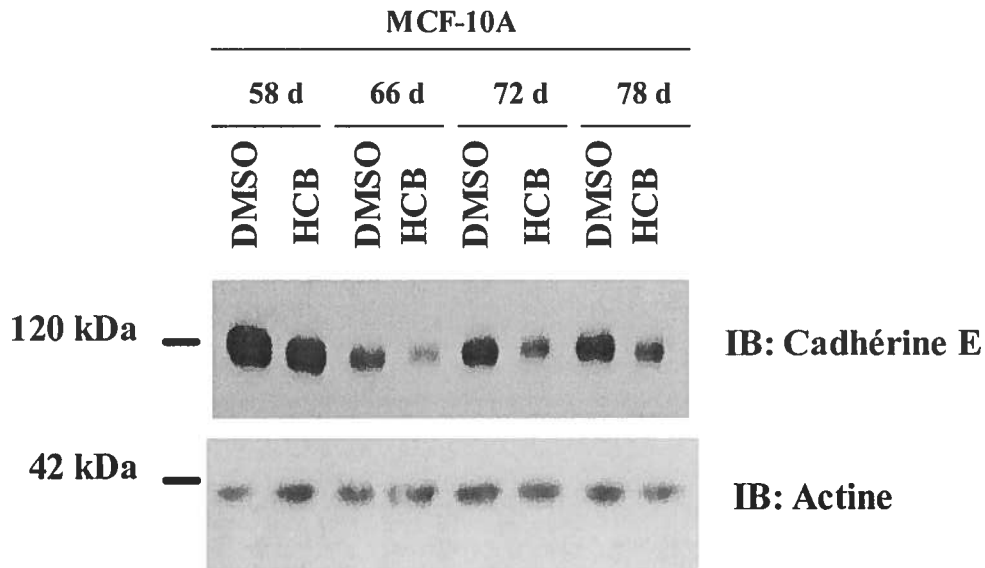
3.2.2.5. Effet de l'HCB sur la cadhérine E

Considérant les liens entre la signalisation ILK dépendante et l'adhésion cellulaire, il est opportun d'étudier l'effet de l'HCB sur l'expression de la cadhérine E. La

Figure 3.18-A et 3.18-B présente un résultat type d'immunobuvardage pour des extraits de cellules exposées à long terme au DMSO ou à l'HCB sur l'expression de la cadhérine E après 58, 66, 72 ou 78 jours de traitement chez les cellules MCF-10A et après 52, 64, 70 ou 76 jours de traitement chez les cellules MCF-12A. On note une bande unique de protéines immunoréactives dont le poids moléculaire est de 120 kDa pour la cadhérine E et de 42 kDa pour la protéine de référence, l'actine. Une diminution marquée de l'expression de la cadhérine E chez les lignées cellulaires MCF-10A (après 66 ou 72 jours; Figure 3.20-A) et MCF-12A (après 52 ou 64 jours; Figure 3.20-B) traitées de façon chronique à l'HCB est observée comparativement aux cellules témoins.

En résumé, les résultats montrent qu'une exposition à court terme à l'HCB des cellules MCF-10A ne provoque aucune modulation de la phosphorylation du récepteur erbB2. Par ailleurs, une exposition chronique à l'HCB pendant plusieurs jours augmente tout d'abord le taux de phosphorylation de erbB2 des cellules MCF-10A et MCF-12A comparativement aux cellules témoins. Cette même exposition chronique à l'HCB élève l'expression et la phosphorylation du récepteur EGFR des cellules MCF-10A et MCF-12A. Cependant, pendant que le taux de phosphorylation du récepteur EGFR des cellules MCF-10A augmente, celui des cellules MCF-12A diminue. De plus, cette exposition chronique augmente l'expression et le taux de phosphorylation de la protéine ILK, et elle réduit le niveau cytoplasmique du médiateur Akt chez les lignées cellulaires mammaires humaines non tumorales MCF-10A et MCF-12A. Finalement, cette exposition chronique à l'HCB module à la baisse l'expression de la cadhérine E.

A



B

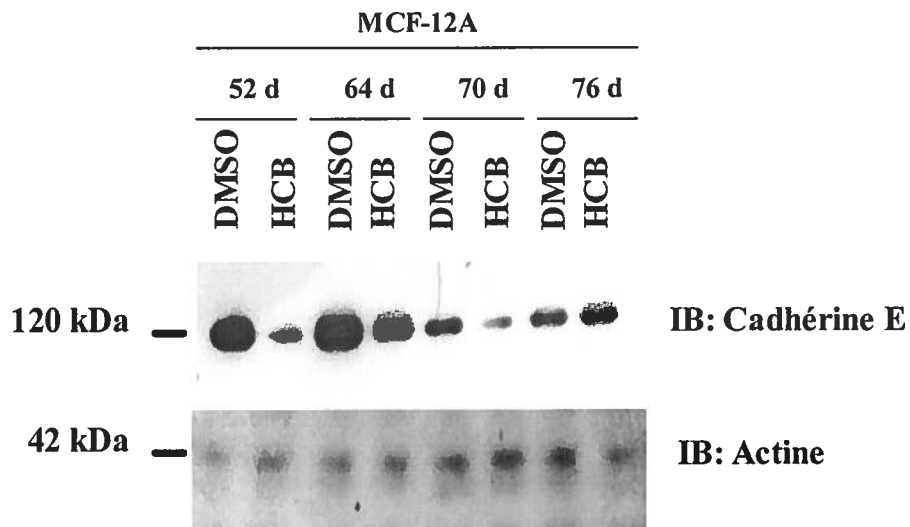
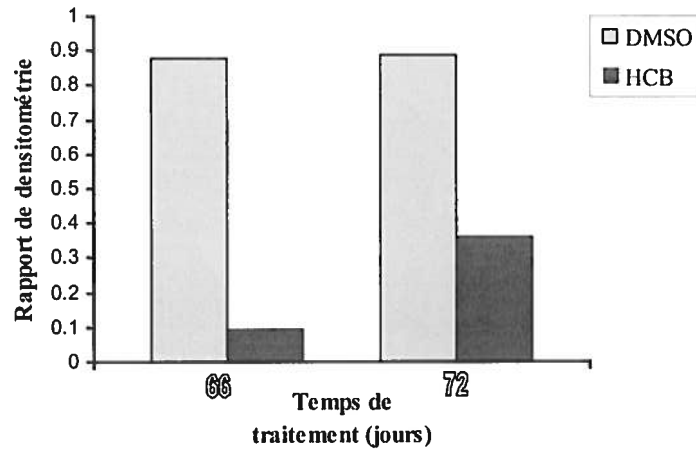


Figure 3.18. Effet d'une exposition à l'HCB sur l'expression de la cadhérine E après 58, 66, 72 ou 78 jours de traitement chez les cellules MCF-10A (A) et après 52, 64, 70 ou 76 jours de traitement chez les cellules MCF-12A (B).

Les cellules MCF-10A et MCF-12A sont exposées de façon continue à l'HCB ou au DMSO (témoin). Une quantité de 40 µg de protéines cellulaires totales est migrée sur gel de polyacrylamide et analysée par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-cadhérine E. La normalisation est effectuée à l'aide de la mesure du signal obtenu avec un anticorps anti-actine. Le poids moléculaire du marqueur (kDa) est identifié à gauche.

A



B

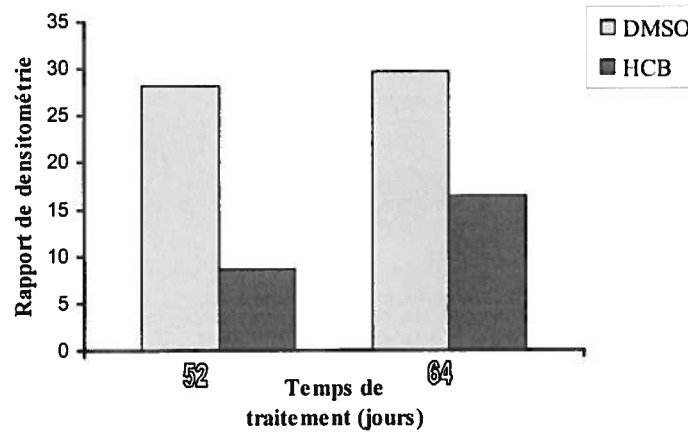


Figure 3.20. Expression de la cadhérine E de la lignée de cellules MCF-10A exposées 66 ou 72 jours (A) et de la lignée de cellules MCF-12A exposées 52 ou 64 jours (B) de traitement à l'HCB.

Les nombres représentent le rapport de la valeur de densitométrie pour la membrane hybridée avec un anti-cadhérine E sur celle hybridée avec l'anti-actine.

CHAPITRE 4

Discussion

Plusieurs polluants environnementaux sont des promoteurs de tumeurs exerçant leur action par des mécanismes épigénétiques. Certains de ces mécanismes ont été identifiés et peuvent être impliqués, de près ou de loin, dans le développement de cancers. Parmi ceux-ci, l'activation des récepteurs de facteurs de croissance modifiant la signalisation des cellules mammaires représente un mécanisme de plus en plus étudié. Étant donné la présence considérable dans l'environnement et dans les tissus humains des composés du mélange d'agonistes du AhR et de l'HCB, il est important de déterminer leurs effets dans le processus de cancérisation. Les points saillants de cette étude fut donc que chez les cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales, une exposition à ces organochlorés favorise la formation de tumeurs mammaires; de plus, cette étude démontre une augmentation de la phosphorylation des récepteurs de facteurs de croissance EGFR et erbB2 et d'un de leur médiateur intracellulaire proximal, la ILK de même qu'une diminution de l'activation de la Akt/PKB et de l'expression de la cadhérine E, qui elle est directement impliquée dans l'adhésion intercellulaire. Ces modifications de la signalisation cellulaire favorisent la prolifération clonale des cellules spontanément initiées.

Suite à l'analyse des résultats du potentiel cancérogène de ces contaminants évalué par leur capacité à promouvoir la transformation des cellules mammaires, il fut intéressant de constater la présence de deux réponses cellulaires opposées: une action anticancérogène engendrée par le mélange d'agonistes du AhR, et une influence procancérogène induite par l'HCB sur les cellules épithéliales mammaires non tumorales.

4.1. Effets du mélange d'agonistes du AhR sur les cellules mammaires

Le mélange d'agonistes du AhR est composé de trois BPC, de sept PCDF et de six PCDD retrouvés dans le lait maternel. Les résultats obtenus montrent que ce mélange

module l'expression et la phosphorylation de récepteurs de facteurs de croissance et leur signalisation dans les cellules épithéliales mammaires. Ces modifications sont à l'origine d'une dérégulation de la croissance et de la prolifération de cellules mammaires MCF-10A. En effet, le premier objectif de cette recherche était d'étudier l'impact d'une exposition au mélange d'agonistes du AhR sur le récepteur de facteurs de croissance erbB2 et sur la signalisation des cellules épithéliales mammaires MCF-10A. Les résultats expérimentaux suggèrent que le mélange d'agonistes du AhR engendre une modulation de la signalisation cellulaire des cellules MCF-10A qui est responsable d'une réponse cellulaire anticancérogène.

Cette activité anticancéreuse a été très bien démontrée par notre étude de l'effet d'une exposition chronique au mélange d'agonistes du AhR sur l'accroissement des cellules mammaires MCF-10A. Contrairement à la croissance continue observée chez les cellules traitées au DMSO, ceci en raison du milieu de culture DMEM-F12 riche en nutriments, le nombre de cellules chez le groupe exposé au mélange d'agonistes du AhR diminue considérablement jusqu'à un arrêt total de la prolifération. Ces résultats peuvent être expliqués par un processus cyostatique (absence de division cellulaire) plutôt que cytotoxique (empoisonnement et mort cellulaire); le nombre de cellules qui s'attachent au pétri diminue de passage en passage sans modification apparente du taux de mortalité cellulaire. Cette effet antiprolifératif pourrait découler d'un problème d'attachement cellulaire plutôt que d'un processus de mort cellulaire. En effet, notre laboratoire a démontré qu'une exposition prolongée au mélange d'agonistes du AhR, et à ses trois principales composantes, les BPC, les PCDF et les PCDD, module les interactions intercellulaires et le phénotype des cellules MCF-7 (Desaulniers *et al.*, 2002). Chez les cellules traitées, le contact entre les cellules est perdu laissant voir au microscope de larges espaces intercellulaires. De plus, la localisation de la cadhérine E est différente; chez les cellules traitées avec le mélange d'agonistes du AhR, la cadhérine E se situe dans le cytoplasme, alors que chez les cellules témoins, la cadhérine E se localise au niveau de la membrane plasmique permettant l'interaction avec les cellules adjacentes. Le mélange d'agonistes du AhR engendre donc des modifications au niveau phénotypique chez les cellules mammaires, ainsi qu'un arrêt complet de la prolifération cellulaire.

Les 16 composés chimiques du mélange d'agonistes du AhR sont identifiés comme des agonistes du récepteur Ah et parmi eux, la TCDD est le composé modèle du mélange d'agonistes du AhR. La littérature concernant les effets de la TCDD sur les cellules mammaires nous renseigne sur les effets attendus. En effet, la TCDD inhibe la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales, les MCF-7 (Biegel et Safe, 1990). Ce contaminant diminue de 60% la croissance des cellules MCF-7 exposées à une concentration de 10 nM pendant 7 jours, et l'effet néfaste est partiellement aboli lorsque les cellules sont cotraitées avec 100 nM de 17 β -oestradiol (Vogel et Abel, 1995). Par contre, la TCDD seule ne provoque que des effets minimaux sur le cycle cellulaire (Wang *et al.*, 1998). Il est possible que le pouvoir antiprolifératif du mélange d'agonistes du AhR testé sur les cellules MCF-10A soit relié à une synergie des effets provoqués par les 16 composés du mélange d'agonistes du AhR. En effet, une étude de Payne *et al.* (2001) a montré que l'effet synergique provoqué par d'autres contaminants semblables, tels que le o,p'-DDT, p,p'-DDE, β -HCH et p,p'-DDT, engendre une croissance proliférative des cellules MCF-7. Les données expérimentales de ce mémoire concordent donc avec le principe observé dans la littérature qui démontre que l'effet synergique provoqué par un ensemble d'organochlorés est à l'origine d'une modulation de la prolifération cellulaire. On peut prétendre, suite à l'extrapolation de nos résultats, que le mélange d'agonistes du AhR provoque une activité anticancérogène sur les cellules mammaires.

Les résultats de ce mémoire supportent l'hypothèse qu'une exposition chronique au mélange d'agonistes du AhR module la signalisation des cellules mammaires par une augmentation du taux de phosphorylation du récepteur erbB2 et de la protéine ILK. Des observations précédentes par l'équipe de Tuomisto *et al.* (1996) ont démontré que la TCDD module la voie du récepteur à l'EGF en augmentant son expression et sa phosphorylation au niveau des cellules utérines de souris. De plus, la protéine ILK est le principal médiateur ayant une fonction de relais entre les tyrosines kinases et les jonctions adhérentes (Wu, 2001). Une hausse de l'activation de la ILK résulte directement en une baisse de communication intercellulaire chez les cellules MCF-10A (Troussard *et al.*, 2000). De plus, la surexpression de la protéine ILK dans les cellules épithéliales intestinales de rat et dans les cellules épithéliales mammaires de souris conduit à une perte d'adhésion et de communication intercellulaire responsables des mécanismes

cancérogènes (Dedhar, 2000). Cette hausse d'activation de la ILK et la modulation de la communication intercellulaire sont donc à l'origine de l'effet antiprolifératif provoqué par une exposition continue au mélange d'agonistes du AhR sur les cellules mammaires humaines.

D'autres événements moléculaires peuvent être à l'origine de l'activité antiproliférative provoquée par une exposition chronique au mélange d'agonistes du AhR. La télomérase est une ribonucléoprotéine responsable de la synthèse et de la maintenance de l'intégrité structurale finale des chromosomes appelé télomère (Voet et Voet, 1998). Ce dernier protège l'ADN génomique de la dégradation et des mécanismes de recombinaison nuisible à sa synthèse (Meyerson, 2000). Cette enzyme n'est généralement pas détectable dans les tissus somatiques normaux, mais elle semble être activée dans une grande variété de tumeurs en plus d'être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Liu, 1999). L'exposition chronique de cellules MCF-10A au mélange d'agonistes du AhR que nous avons testé engendre une réduction progressive de l'activité de la télomérase au cours des neuf premiers jours; l'activité de cette enzyme devient nulle après plusieurs jours de traitement consécutif à ce mélange environnemental (Audet *et al.*, 2003). Cette diminution de l'activité engendre le raccourcissement des télomères ce qui résulte en un arrêt total de la prolifération cellulaire.

Ces analyses expérimentales permettent de mieux caractériser la cascade de signalisation activée par la phosphorylation de erbB2 chez les cellules traitées de façon chronique au mélange d'agonistes du AhR. La voie de signalisation des récepteurs de facteurs de croissance est donc stimulée suite à une exposition prolongée à ce mélange de contaminants. Finalement, ces données expérimentales démontrent qu'une exposition chronique au mélange d'agonistes du AhR est à l'origine d'un effet antiprolifératif. Ce mélange n'est donc pas susceptible d'engendrer une transformation des cellules épithéliales mammaires humaines non tumorales en cellules pré-cancéreuses contrairement à notre hypothèse de départ.

4.2. Effets de l'hexachlorobenzène sur les cellules mammaires

Le second objectif de cette recherche visait l'étude de l'impact d'une exposition à l'HCB sur les cellules épithéliales mammaires. L'HCB est l'un des principaux contaminants environnementaux retrouvés dans le lait maternel des Canadiennes. Nos résultats montrent que ce contaminant épigénétique influence l'expression et la phosphorylation des récepteurs de facteurs de croissance et la signalisation des cellules épithéliales mammaires et qu'il possède le profil d'un cancérigène mammaire; ceci donne appui à l'hypothèse controversée d'une association entre une exposition à l'HCB et le risque de développer un cancer du sein.

La modulation de la signalisation des cellules MCF-10A est responsable d'une réponse cellulaire procancérogène. La signalisation cellulaire de la famille des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, erbB, est d'une importance cruciale en cancérogénèse. En effet, la littérature présente le erbB2 comme un facteur de prédisposition et un indicateur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Hung et Lau, 1999; Suo *et al.*, 2002). Les résultats expérimentaux obtenus montrent une augmentation du taux de phosphorylation du récepteur erbB2 chez les deux lignées de cellules mammaires non tumorales transformées, les MCF-10A et MCF-12A, exposées de façon continue à l'HCB. Ce principe d'activation du récepteur concorde avec la littérature puisque de nombreuses études démontrent une activation du récepteur erbB2 dans certains tissus cancéreux, tels les cellules mammaires (Harris *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Muthuswamy *et al.*, 2001). Nos observations sont cohérentes avec celles de deux études récentes qui ont rapporté que chez les cellules MCF-7 le récepteur erbB2 est activé par l'hexachlorocyclohexane (β -HCH), un organochloré similaire (Enan et Matsumura, 1998; Hatakeyama et Matsumura, 1999). Ces analyses expérimentales montrent que l'HCB exerce son pouvoir procancérogène en modulant la voie des récepteurs de facteurs de croissance.

La littérature propose que la hausse de phosphorylation du récepteur erbB2 est fortement associée à sa surexpression dans les cancers du sein ($\geq 80\%$) (Thor *et al.*, 2000). L'expression du récepteur erbB2 observée dans ce mémoire est cependant réduite suite à une exposition chronique à l'HCB chez les cellules mammaires humaines. Ceci suggère

qu'il y aurait internalisation et dégradation du récepteur à l'intérieur des vésicules intracytoplasmiques. En effet, la littérature soulève une hypothèse intéressante quant aux phénomènes impliqués dans cette baisse d'expression du récepteur membranaire, puisque suite à la fixation d'une hormone peptidique ou d'un facteur de croissance aux récepteurs au niveau de la surface de la cellule cible, celui-ci est généralement internalisé par endocytose par l'intermédiaire du récepteur et il est dirigé aux niveau des endosomes. L'endocytose est pour la cellule un moyen de diminuer le nombre de récepteurs de surface accessibles au ligand lors de fortes stimulations, ce qui participe au processus de désensibilisation (Harris *et al.*, 1999).

La plupart des récepteurs libèrent leurs ligands dans l'environnement acide des endosomes et sont recyclés vers la membrane plasmique pour être ensuite réutilisés, alors que le ligand est acheminé aux lysosomes et dégradé (Harari et Yarden, 2000). Il arrive parfois qu'une partie des récepteurs ne parvienne pas à libérer le ligand et finisse dans les lysosomes où ils seront dégradés en même temps que leur ligand (Zhang *et al.*, 2002). À forte concentration de ligand, le nombre de récepteurs à la surface cellulaire décroît et il y a diminution de la sensibilité de la cellule cible à ce ligand. Par exemple, cette faible régulation de l'expression, mais aussi de l'activité kinase du récepteur, peut être due à l'internalisation de 80-95% du récepteur EGFR, à la perte de liaison au ligand (EGF) et à la destruction des récepteurs dans les lysosomes des cellules (Earp *et al.*, 1995). Ce mécanisme est appelé « régulation par diminution du nombre de récepteurs » (receptor down-regulation) (Alberts *et al.*, 1995). Ainsi, la hausse du taux de phosphorylation observée chez les cellules mammaires transformées par l'HCB indique une activation chronique du récepteur erbB2 résultant en une « down-regulation ».

Aucun ligand spécifique pour le erbB2 n'a été identifié jusqu'à présent, mais ce récepteur peut être activé par son hétérodimérisation avec les membres erbB, erbB3 et erbB4 de la même famille via le ligand NDF (héréguiline) et l'EGF (Thor *et al.*, 2000; Wu et Dedhar, 2001). En effet, la croissance et la prolifération cellulaire des cellules épithéliales mammaires est extrêmement dépendante de l'EGF (Slichenmyer et Fry, 2001). C'est pour cette raison que l'étude du récepteur de la famille des facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, EGFR, est d'un grand intérêt.

Les récepteurs EGFR et erbB2 sont des tyrosines kinases qui suscitent l'intérêt dans l'étiologie de la cancérogenèse mammaire. L'EGF, ligand connu des autres membres de la famille des récepteurs erbB, induit la phosphorylation des tyrosines du récepteur erbB2 par hétérodimérisation (Brandt *et al.*, 1999). En effet, l'agrégation de ces deux récepteurs promouvoit la formation d'un complexe kinase actif. Une fois la dimérisation terminée, la tyrosine kinase du complexe hétérodimérisé EGFR et erbB2 devient active provoquant ainsi l'autophosphorylation du complexe protéique, ce qui déclenche une cascade de signalisation (Dougall *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1999). Une étude de Brandt *et al.* (1999) exécutée dans un modèle de souris immunodéficientes a démontré que chez les cellules qui expriment fortement les récepteurs de facteurs de croissance erbB2 et EGFR, il y a une augmentation de la formation de tumeurs par comparaison aux cellules qui expriment une autre combinaison de récepteurs erbB. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'hétérodimérisation de erbB2 avec l'EGFR module la signalisation cellulaire en induisant des altérations dans la morphologie des cellules qui sont nécessaires dans l'induction du cancer du sein. Les taux d'internalisation, de liaison réversible du ligand et la décision de recycler les récepteurs peuvent être affectés par différents pairages de récepteurs membranaires (Earp *et al.*, 1995). De plus, une variation de combinaisons créées lors de l'hétérodimérisation pourrait être à l'origine des différentes réponses cellulaires observées chez les lignées de cellules MCF-10A et MCF-12A. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'HCB exerce son pouvoir procancérogène en modulant l'activation des récepteurs de facteurs de croissance erbB2 et EGFR.

La modulation de la protéine ILK cytoplasmique semble être impliquée dans la cancérogenèse mammaire induite par les contaminants environnementaux. La littérature montre que la surexpression ou l'activation de la ILK, due aux mutations présentes dans les gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN ou APC, favorise le caractère oncogène de certaines lignées cellulaires (Wu et Dedhar, 2001). La ILK induit un phénotype invasif via la surexpression de la MMP-9 dépendante du facteur de transcription AP-1. Une étude indique que l'inhibition spécifique de l'activité de la ILK supprime l'invasion tumorale des cellules, ce qui démontre de façon évidente le rôle central de la protéine ILK dans la régulation de l'invasion cellulaire (Troussard *et al.*, 2000).

La ILK affecte aussi l'expression des gènes impliqués dans la communication et dans la migration intercellulaire (Yoganathan *et al.*, 2000). Une étude a démontré que dans les cellules épithéliales, la transcription nucléaire et la stimulation de l'activité LEF-1/TCF par la β -caténine sont activées par la surexpression et l'activation de la ILK. Lorsque celle-ci est surexprimée, elle promouvoit des transformations oncogènes, supprime la mort cellulaire et augmente l'invasion due à l'inhibition de l'expression de la cadhérine E (Tan *et al.*, 2001). Ainsi, les résultats obtenus concordent avec la littérature puisqu'une exposition chronique à l'HCB engendre une augmentation de l'expression et du taux de phosphorylation de la ILK chez les cellules MCF-10A et MCF-12A accompagnée par une inhibition de l'expression de la cadhérine E. En effet, la cadhérine E est une protéine importante pour l'adhésion cellulaire. Elle détermine l'organisation et la structure des cellules dans les tissus et gère indirectement le transfert d'informations entre deux cellules voisines (Nagae *et al.*, 2002). La réduction du nombre de jonctions adhérentes via la réduction de la protéine cadhérine E permet à une cellule de se détacher des cellules voisines (Nagae *et al.*, 2002; Vizirianakis *et al.*, 2002). Cette modulation de la voie de signalisation via la ILK contribue à l'action procancérogène de l'HCB.

Dans le cancer du sein, on observe fréquemment un désordre survenant au niveau des fonctions de la cadhérine E et des caténines qui module l'adhésion intercellulaire (Tan *et al.*, 2001). L'équipe de Zantek *et al.* (2001) a démontré chez des cellules MCF-10A des changements d'adhésion qui ont résulté en une modulation des interactions avec la matrice extracellulaire favorisant la migration et l'invasion cellulaire. Ces changements sont reliés à une hausse de l'activité tyrosine kinase et les résultats ont montré que des inhibiteurs des tyrosines kinases rétablissent le phénotype normal des cellules transformées. Une étude récente de Plante *et al.* (2002) a démontré, dans un autre modèle cellulaire, que l'HCB promouvoit la formation de tumeurs hépatiques chez les rats femelles en abaissant considérablement, par rapport aux femelles témoins, l'expression de la cadhérine E et des connexines 26 et 32. Ces connexines se retrouvent au niveau des jonctions lacunaires présentes dans le foie et elles participent à la communication intercellulaire (Berthoud *et al.*, 1992; Evans et Martin, 2002; Zhang et Thorgeirsson, 1994).

La protéine Akt/PKB est un médiateur cytoplasmique impliqué dans la signalisation cellulaire des cellules mammaires. Les résultats obtenus ont montré que les cellules MCF-10A et MCF-12A exposées chroniquement à l'HCB présentent une faible activité de la protéine Akt/PKB cytoplasmique comparativement aux cellules témoins. Dans le modèle du cancer du foie, notre laboratoire a récemment démontré une diminution significative ($p < 0,05$) de l'expression et de la phosphorylation de la Akt/PKB chez les femelles exposées à l'HCB (Plante *et al.*, 2003). Cette étude a aussi démontré une augmentation de la présence de la protéine Akt dans le noyau des cellules hépatiques de ces rats femelles traitées chroniquement à l'HCB. En effet, il est reconnu qu'une suractivation de la voie de signalisation via la ILK résulte en une translocation vers le noyau expliquant la diminution marquée des niveaux cytoplasmiques de la protéine Akt/PKB phosphorylée observée dans ce mémoire (Meier *et al.*, 1997).

De plus, l'hypothèse qu'une voie de signalisation autre que celle de la erbB2/ILK/Akt soit empruntée est plausible. Il se peut que la voie de Wnt soit stimulée via son médiateur central, la GSK-3, impliqué l'adhésion cellulaire (Martinez *et al.*, 2002). L'inhibition de la protéine GSK-3 par phosphorylation via la ILK provoque une diminution de la dégradation cytoplasmique et une stabilisation de la β -caténine qui se transloque vers le noyau. Il y aura par la suite une activation de la transcription des gènes via le facteur de transcription de la famille des LEF/TCF (Hagen *et al.*, 2002). Cette β -caténine joue un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire par sa grande capacité à s'associer directement à la queue intracellulaire de la cadhérine E et à se lier via l' α -caténine aux filaments d'actine (Desbois-Mouthon *et al.*, 2001).

Une autre démonstration claire de l'action procancérogène de l'HCB provoquée sur les cellules mammaires est la modulation de l'activité de la télomérase chez nos lignées de cellules MCF-10A transformées obtenues par exposition chronique à l'HCB (Audet *et al.*, 2003). Ces cellules transformées par l'HCB démontrent une activité de la télomérase élevée comparativement aux cellules témoins. Lorsque les cellules transformées sont recultivées en absence d'HCB, la forte activité de la télomérase est maintenue, ce qui indique que cette lignée de cellules mammaires MCF-10A présente des caractéristiques épigénétiques stables et irréversibles. Ceci confirme qu'il s'agit bien

d'une lignée de cellules transformées. La télomérase, pouvant être modulée directement par l'intermédiaire de certains médiateurs cellulaires tels que par la Akt/PKB, constitue un mécanisme important dans la cancérogenèse mammaire via une stabilisation de la structure des télomères (Liu, 1999). Ces résultats supportent donc la littérature qui suggère que la détection de l'activité de cette enzyme est très utile comme marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein.

L'augmentation de la prolifération cellulaire est une autre caractéristique déterminante et non négligeable dans la cancérogenèse mammaire. L'exposition continue à l'HCB engendre une perte de contrôle et une croissance anarchique des cellules mammaires. En effet, nos lignées transformées par l'exposition chronique à l'HCB ont un taux de prolifération très rapide comparativement aux cellules témoins (temps de doublement des cellules transformées de 21,7 h comparativement à 40,7 h pour les cellules témoins). De plus, la hausse de prolifération est maintenue pendant plusieurs passages même lorsque l'HCB est retiré du milieu de culture. Il s'agit donc d'un autre changement épigénétique qui représente une caractéristique à l'origine de l'action procancérogène provoquée par l'HCB.

Finalement, d'autres travaux de notre laboratoire (Dr. Michel Charbonneau, communication personnelle) ont permis d'évaluer le potentiel cancérogène des lignées MCF-10A et MCF-12A transformées à l'HCB lorsque celles-ci sont injectées sous forme de xénogreffe dans la glande mammaire des souris *scid-beige* immunodéficientes (absence de lymphocytes B et T et de cellules cytotoxiques naturelles); l'injection d'un témoin cellulaire positif, les MCF-7, a servi de guide pour l'évaluation de la croissance tumorale. Les résultats indiquent que chez les souris injectées avec les cellules transformées à l'HCB, il y a présence de lésions cancéreuses chez trois des neuf souris, alors qu'aucune masse n'a été détectée chez les sept souris témoins.

Les travaux de recherche de ce mémoire sont au premier rang dans l'évaluation des effets des contaminants environnementaux sur l'homéostasie cellulaire. Ils ont apporté non seulement des éléments essentiels pour la compréhension du phénomène de la cancérogenèse du sein, mais ils pourraient aussi contribuer à l'élaboration d'une thérapie éventuelle pour contrer ce fléau qu'est le cancer. Cette maladie est l'un des

problèmes majeurs de santé humaine qui fait toujours l'objet de recherches biomédicales considérables. Cette démarche a permis de documenter la plausibilité biologique du facteur environnemental dans la cancérogenèse mammaire et d'ouvrir la voie à des travaux en épidémiologie moléculaire. Ceci apporte également un appui aux travaux en épidémiologie qui font face aux problèmes de la mesure de l'exposition rétrospective à de faibles doses.

CONCLUSION

Contrairement à notre hypothèse de départ, nous avons observé une action anticancérogène chez les cellules mammaires humaines suite à une exposition prolongée au mélange d'agonistes du AhR. L'exposition chronique à l'HCB chez les cellules épithéliales mammaires humaines a cependant permis de générer des lignées de cellules transformées ayant des propriétés tumorales, telles qu'une modification de la signalisation cellulaire et une communication intercellulaire déficiente. La signalisation chez ces cellules mammaires démontre que la voie erbB2/ILK/téломérase est suractivée chez les cellules transformées par une exposition prolongée à l'HCB via la translocation de la protéine Akt/PKB dans le noyau. Ces cellules démontrent une perte de l'inhibition de contact intercellulaire due à la réduction marquée de l'expression de la cadhérine E et une augmentation de la prolifération cellulaire. Cette cascade suractivée supporte le fait qu'une exposition prolongée à l'HCB est capable de transformer les cellules mammaires normales en cellules tumorales.

On dit qu'une figure vaut mille mots. Ainsi, la Figure 4.1 présente une figure récapitulative de nos observations concernant la cascade de signalisation intracellulaire de type tyrosine kinase chez les cellules mammaires exposées chroniquement à l'HCB. Les études en cours dans notre laboratoire supportent notre hypothèse concernant l'action toxique de l'HCB via une modulation de la voie de signalisation erbB/ILK/cadhérine E.

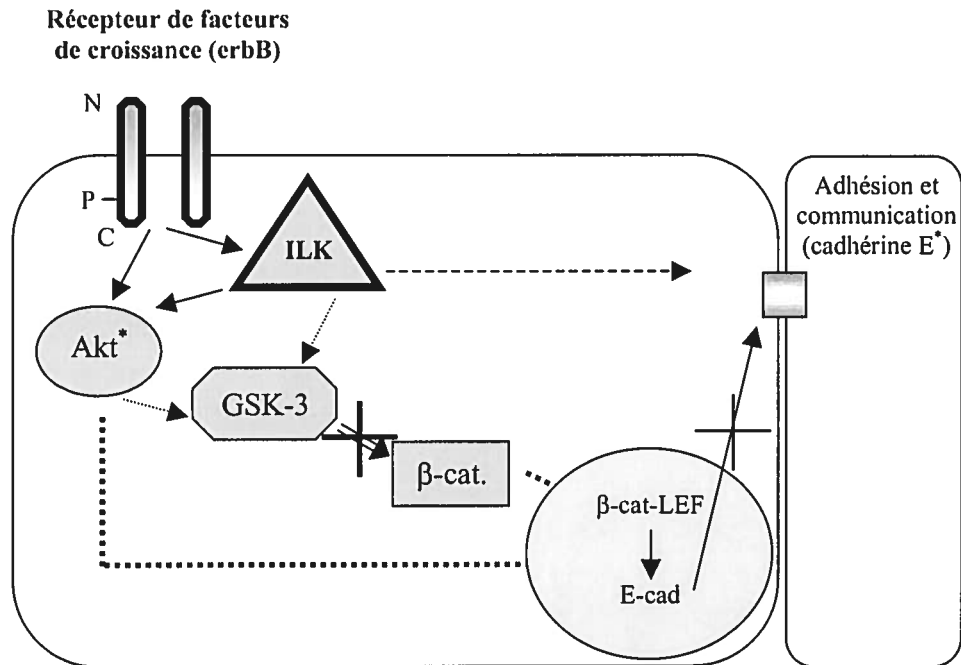


Figure 4.1. Représentations schématiques de l'effet de l'hexachlorobenzène sur la signalisation des cellules épithéliales mammaire humaines non tumorales.

Les lignes pleines représentent l'activation des protéines Akt et ILK par les récepteurs de facteurs de croissance et identifient l'activation de la Akt par la phosphorylation de la ILK. La régulation négative de l'expression de la cadhérine E est générée par le complexe β -cat-LEF (X). Les lignes pointillées claires indiquent l'inactivation de la cadhérine E par la ILK et de la GSK-3 par la Akt et la ILK. Lorsque la GSK-3 est inactivée, la dégradation (ligne double) de la β -cat est inhibée (X). Cette inhibition engendre la translocation de la β -cat dans le noyau; la Akt est de même transloquée dans le noyau lorsque la ILK est surexprimée (lignes pointillées grasses). Les items en gras sont surexprimés chez les cellules mammaires traitées à long terme au mélange d'agonistes du AhR et à l'HCb et les items étoilés sont régulés à la baisse.

RÉFÉRENCES

Agence française de sécurité sanitaire des aliments. 1998. Dioxines : Données de contamination et d'exposition de la population française, Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France.

ALBERTS, B., D. Bray, L. Julian, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson. 1995. Biologie moléculaire de la cellule, Troisième édition. Flammarion Médecine-Sciences, France, 1294 pages.

ANASTASIADIS, P. Z. et A. B. Reynolds. 2000. «The P120 Catenin Family: Complex Roles in Adhesion, Signaling and Cancer». Journal of Cell Science, vol. 113 (Pt 8), p. 1319-34.

ARONSON, K. J., A. B. Miller, C. G. Woolcott, E. E. Sterns, D. R. McCready, L. A. Lickley, E. B. Fish, G. Y. Hiraki, C. Holloway, T. Ross, W. M. Hanna, S. K. SenGupta et J. P. Weber. 2000. «Breast Adipose Tissue Concentrations of Polychlorinated Biphenyls and Other Organochlorines and Breast Cancer Risk». Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, vol. 9, no. 1, p. 55-63.

AUDET, R. M., S. Girard, G. Lassonde, D. Desaulniers et M. Charbonneau. 2003. «Effect of aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists on the expression of telomerase in human mammary cells». Toxicological Sciences, vol. 72, p. 239.

BACUS, S. S., D. A. Altomare, L. Lyass, D. M. Chin, M. P. Farrell, K. Gurova, A. Gudkov et J. R. Testa. 2002. «AKT2 Is Frequently Upregulated in HER-2/Neu-Positive Breast Cancers and May Contribute to Tumor Aggressiveness by Enhancing Cell Survival». Oncogene, vol. 21, no. 22, p. 3532-40.

BEDNAREK, A. K., A. Sahin, A. J. Brenner, D. A. Johnston et C. M. Aldaz. 1997. «Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage». Clinical Cancer Research, vol. 3, no. 1, p. 11-6.

BERTHOIS, Y., J. A. Katzenellenbogen et B. S. Katzenellenbogen. 1986. «Phenol Red in Tissue Culture Media Is a Weak Estrogen: Implications Concerning the Study of Estrogen-Responsive Cells in Culture». Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 83, no. 8, p. 2496-500.

BERTHOUD, V. M., V. Iwanij, A. M. Garcia et J. C. Saez. 1992. «Connexins and Glucagon Receptors During Development of Rat Hepatic Acinus». The American Journal of Physiology, vol. 263, no. 5 (Pt 1), p. G650-8.

BHAT-NAKSHATRI, P., C. J. Sweeney et H. Nakshatri. 2002. «Identification of Signal Transduction Pathways Involved in Constitutive NF-KappaB Activation in Breast Cancer Cells». Oncogene, vol. 21, no. 13, p. 2066-78.

BIEGEL, L. et S. Safe. 1990. «Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) on Cell Growth and the Secretion of the Estrogen-Induced 34-, 52- and 160-KDa Proteins in Human Breast Cancer Cells». The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 37, no. 5, p. 725-32.

BONAÏTI-PELLIÉ, C., F. Doyon, et M. G. Lê. 2001. «Où en est l'épidémiologie des cancers en l'an 2001?». Médecine/Sciences, vol.17, p.586-95.

BRADFORD, M. M. 1976. «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding». Analytical Biochemistry, vol. 72, p. 248-54.

BRANDT, B. H., A. Roetger, T. Dittmar, G. Nikolai, M. Seeling, A. Merschjann, J. R. Nofer, G. Dehmer-Moller, R. Junker, G. Assmann et K. S. Zaenker. 1999. «C-ErbB-2/EGFR As Dominant Heterodimerization Partners Determine a Motogenic Phenotype in Human Breast Cancer Cells». FASEB Journal, vol. 13, no. 14, p. 1939-49.

CASTORIA, G., A. Migliaccio, A. Bilancio, M. Di Domenico, A. de Falco, M. Lombardi, R. Fiorentino, L. Varricchio, M. V. Barone et F. Auricchio. 2001. «PI3-Kinase in Concert With Src Promotes the S-Phase Entry of Oestradiol- Stimulated MCF-7 Cells». EMBO Journal, vol. 20, no. 21, p. 6050-9.

CLARK, G., A. Tritscher, D. Bell et G. Lucier. 1992. «Integrated Approach for Evaluating Species and Interindividual Differences in Responsiveness to Dioxins and Structural Analogs». Environmental Health Perspectives, vol. 98, p. 125-32.

COUMAILLEAU, P., L. Poellinger, J. A. Gustafsson et M. L. Whitelaw. 1995. «Definition of a Minimal Domain of the Dioxin Receptor That Is Associated With Hsp90 and Maintains Wild Type Ligand Binding Affinity and Specificity». The Journal of Biological Chemistry, vol. 270, no. 42, p. 25291-300.

DANIELSEN, A. J. et N. J. Maihle. 2002. «The EGF/ErbB Receptor Family and Apoptosis». Growth Factors, vol. 20, no. 1, p. 1-15.

DATTA, S. R., A. Brunet et M. E. Greenberg. 1999. «Cellular Survival: a Play in Three Akts». Genes & Development, vol. 13, no. 22, p. 2905-27.

DAVIDSON, N. E. et J. D. Yager. 1997. «Pesticides and Breast Cancer: Fact or Fad?». Journal of the National Cancer Institute, vol. 89, no. 23, p. 1743-4.

DAWKINS, H. J., P. D. Robbins, K. L. Smith, M. Sarna, J. M. Harvey, G. F. Sterrett et J. M. Papadimitriou. 1993. «What's New in Breast Cancer? Molecular Perspectives of Cancer Development and the Role of the Oncogene C-ErbB-2 in Prognosis and Disease». Pathology Research and Practice, vol. 189, no. 10, p. 1233-52.

- DE BONO, J. S. et E. K. Rowinsky. 2002. «The ErbB Receptor Family: a Therapeutic Target for Cancer». Trends in Molecular Medicine, vol. 8, no. 4, p. S19-26.
- DEDHAR, S. 2000. «Cell-Substrate Interactions and Signaling Through ILK». Current Opinion in Cell Biology, vol. 12, no. 2, p. 250-6.
- DEFAZIO, A., Y. E. Chiew, R. L. Sini, P. W. Janes et R. L. Sutherland. 2000. «Expression of C-ErbB Receptors, Heregulin and Oestrogen Receptor in Human Breast Cell Lines». International Journal of Cancer, vol. 87, no. 4, p. 487-98.
- DELCOMMENNE, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett et S. Dedhar. 1998. «Phosphoinositide-3-OH Kinase-Dependent Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 and Protein Kinase B/AKT by the Integrin-Linked Kinase». Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 19, p. 11211-6.
- DESAULNIERS, D., M. Charbonneau et B. Tsang. 2002. «Reproductive/mammary tumorigenic effects of neonatal exposure to breast-milk contaminants». Rapport #45, Initiative de recherche sur les substances toxiques, Gouvernement du Canada, p. 128.
- DESBOIS-MOUTHON, C., A. Cadoret, M. J. Blivet-Van Eggelpoel, F. Bertrand, G. Cherqui, C. Perret et J. Capeau. 2001. «Insulin and IGF-1 Stimulate the Beta-Catenin Pathway Through Two Signalling Cascades Involving GSK-3 β Inhibition and Ras Activation». Oncogene, vol. 20, no. 2, p. 252-9.
- DEWAILLY, E., S. Dodin, R. Verreault, P. Ayotte, L. Sauve, J. Morin et J. Brisson. 1994. «High Organochlorine Body Burden in Women With Estrogen Receptor- Positive Breast Cancer». Journal of the National Cancer Institute, vol. 86, no. 3, p. 232-4.
- DORGAN, J. F., J. W. Brock, N. Rothman, L. L. Needham, R. Miller, H. E. Jr. Stephenson, N. Schlusser, P. R. Taylor. 1999. «Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk : results from a prospective analysis (USA)». Cancer Causes and Control, vol. 10, p. 1-11.
- DOUGALL, W. C., X. Qian et M. I. Greene. 1993. «Interaction of the Neu/P185 and EGF Receptor Tyrosine Kinases: Implications for Cellular Transformation and Tumor Therapy». Journal of Cellular Biochemistry, vol. 53, no. 1, p. 61-73.
- EARP, H. S., T. L. Dawson, X. Li et H. Yu. 1995. «Heterodimerization and Functional Interaction Between EGF Receptor Family Members: a New Signaling Paradigm With Implications for Breast Cancer Research». Breast Cancer Research and Treatment, vol. 35, no. 1, p. 115-32.
- ENAN, E. et F. Matsumura. 1998. «Activation of C-Neu Tyrosine Kinase by O,p'-DDT and Beta-HCH in Cell- Free and Intact Cell Preparations From MCF-7 Human Breast Cancer Cells». Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, vol. 12, no. 2, p. 83-92.

- EVANS, W. H. et P. E. Martin. 2002. «Gap Junctions: Structure and Function (Review)». Molecular Membrane Biology, vol. 19, no. 2, p. 121-36.
- FALCK, F. Jr, A. Ricci Jr, M. S. Wolff, J. Godbold et P. Deckers. 1992. «Pesticides and Polychlorinated Biphenyl Residues in Human Breast Lipids and Their Relation to Breast Cancer». Archives of Environmental Health, vol. 47, no. 2, p. 143-6.
- FAUSTO, N. et E. M. Webber. 1993. «Control of liver growth». Critical Reviews in Eucaryotic Gene Expression, vol. 3, p. 117-35.
- GAMMON, M. D., M. S. Wolff, A. I. Neugut, S. M. Eng, S. L. Teitelbaum, J. A. Britton, M. B. Terry, B. Levin, S. D. Stellman, G. C. Kabat, M. Hatch, R. Senie, G. Berkowitz, H. L. Bradlow, G. Garbowski, C. Maffeo, P. Montalvan, M. Kemeny, M. Citron, F. Schnabel, A. Schuss, S. Hajdu, V. Vinceguerra, N. Niguidula, K. Ireland et R. M. Santella. 2002. «Environmental Toxins and Breast Cancer on Long Island. II. Organochlorine Compound Levels in Blood». Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, vol. 11, no. 8, p. 686-97.
- GOLDEN, R. J., K. L. Noller, L. Titus-Ernstoff, R. H. Kaufman, R. Mittendorf, R. Stillman et E. A. Reese. 1998. «Environmental Endocrine Modulators and Human Health: an Assessment of the Biological Evidence». Critical Reviews in Toxicology, vol. 28, no. 2, p. 109-227.
- GOUVERNEMENT DU CANADA. 1993. Canadian Environmental Protection, Act Priority Substances List, Supporting Document: Hexachlorobenzene. National Health and Welfare/Department of the Environment, Ottawa.
- GOUVERNEMENT DU CANADA. 1999. Dioxines et furannes et hexachlorure de benzène. Inventaire et communiqués de presse. Environnement Canada et le Groupe de travail fédéral-provincial sur les dioxines et les furannes, Bureau national de la prévention de pollution, Hull (Québec).
- GRASL-KRAUPP, B., W. Bursch, B. Ruttkey-Nedecky, A. Wagner, B. Lauer et R. Schulte-Hermann. 1994. «Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver». Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 9995-9.
- GREIDER, C. W. et E. H. Blackburn. 1996. «Telomeres, telomerase and cancer». Scientific American, vol. 274, no. 2, p. 92-7.
- GULLICK, W. J. et R. Srinivasan. 1998. «The Type 1 Growth Factor Receptor Family: New Ligands and Receptors and Their Role in Breast Cancer». Breast Cancer Research and Treatment, vol. 52, no. 1-3, p. 43-53.

- GUTTUS, S., K. Failing, K. Neumann, J. Kleinstein, S. Georgii et H. Brunn. 1998. «Chlororganic Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Breast Tissue of Women With Benign and Malignant Breast Disease». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 35, no. 1, p. 140-7.
- HAGEN, T., E. Di Daniel, A. A. Culbert et A. D. Reith. 2002. «Expression and Characterization of GSK-3 Mutants and Their Effect on Beta-Catenin Phosphorylation in Intact Cells». The Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 26, p. 23330-5.
- HARARI, D. et Y. Yarden. 2000. «Molecular Mechanisms Underlying ErbB2/HER2 Action in Breast Cancer». Oncogene, vol. 19, no. 53, p. 6102-14.
- HARRIS, L., D. Luftner, W. Jager et J. F. Robertson. 1999. «C-ErbB-2 in Serum of Patients With Breast Cancer». The International Journal of Biological Markers, vol. 14, no. 1, p. 8-15.
- HATAKEYAMA, M et F. Matsumura. 1999. «Correlation between the activation of Neu tyrosine kinase and promotion of foci formation induced by selected organochlorine compounds in the MCF-7 model system». Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, vol. 13, no. 6, p. 296-302.
- HENDERSON, B. E. et H. S. Feigelson. 2000. «Hormonal carcinogenesis» Carcinogenesis, vol. 21, p. 427-33.
- HENDERSON, B. E., R. K. Ross et M. C. Pike. 1991. «Toward the primary prevention of cancer». Science, vol. 254, p. 1131-8.
- HENDRICH, S., H. P. Glauert et H. C. Pitot. 1986. « The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of Phenobarbital ». Carcinogenesis, vol. 7, p. 2041-5.
- HIYAMA, E., L. Gollahon, T. Kataoka, K. Kuroi, T. Yokoyama, A. F. Gazdar, K. Hiyama, M. A. Piatyszek et J. W. Shay. 1996. «Telomerase Activity in Human Breast Tumors». Journal of the National Cancer Institute, vol. 88, no. 2, p. 116-22.
- HOLLMANN, C. A., F. S. Kittrell, D. Medina et J. S. Butel. 2001. «Wnt-1 and Int-2 Mammary Oncogene Effects on the Beta-Catenin Pathway in Immortalized Mouse Mammary Epithelial Cells Are Not Sufficient for Tumorigenesis». Oncogene, vol. 20, no. 52, p. 7645-57.
- HOOVER, S. M. 1999. «Exposure to Persistent Organochlorines in Canadian Breast Milk: a Probabilistic Assessment». Risk Analysis, vol. 19, no. 4, p. 527-45.
- HOYER, A. P., P. Grandjean, T. Jorgensen, J. W. Brock et H. B. Hartvig. 1998. «Organochlorine Exposure and Risk of Breast Cancer». Lancet, vol. 352, no. 9143, p. 1816-20.

HOYER, A. P., T. Jorgensen et P. Grandjean. 2000. «Repeated measurements of organochlorine exposure and breast cancer risk (Denmark)». Cancer Causes and Control, vol.11, p. 177-84.

HUNG, M. C. et Y. K. Lau. 1999. «Basic Science of HER-2/Neu: a Review». Seminars in Oncology, vol. 26, no. 4 Suppl 12, p. 51-9.

HUTCHINSON, J., J. Jin, R. D. Cardiff, J. R. Woodgett et W. J. Muller. 2001. «Activation of Akt (Protein Kinase B) in Mammary Epithelium Provides a Critical Cell Survival Signal Required for Tumor Progression». Molecular and Cellular Biology, vol. 21, no. 6, p. 2203-12.

Institute of Medecine (US). 1996. Committee to Review the Health Effects in Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides. Veterans and Agent Orange : Update. Washington, D. C. : National Academy Press.

International Agency for Research on Cancer. 1978. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man, volume 18. Polychlorinated biphenyl and polybrominated biphenyls. Lyon, IARC.

International Agency for Research on Cancer. 1991. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man, volume 53. Occupational exposures to insecticide application, and some pesticides. Lyon, IARC.

Inventaires des dioxines et des furannes. 1999. Émissions Nationales et Régionales des PCDD/PCDF, Élaboré par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement / Substances Chimiques.

JANKOWSKI, J. A., R. Bruton, N. Shepherd et D. S. Sanders. 1997. «Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression». Molecular Pathology, vol. 50, no. 6, p. 289-90.

JEFFY, B. D., R. B. Chirnomas et D. F. Romagnolo. 2002. «Epigenetics of Breast Cancer: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons As Risk Factors». Environmental and Molecular Mutagenesis, vol. 39, no. 2-3, p. 235-44.

JIANG, W. G. et R. E. Mansel. 2000. «E-Cadherin Complex and Its Abnormalities in Human Breast Cancer». Surgical Oncology, vol. 9, no. 4, p. 151-71.

KANDEL, E. S. and N. Hay. 1999. «The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB». Experimental Cell Research, vol. 253, no. 1, p. 210-29.

KIM, H. et W. J. Muller. 1999. «The Role of the Epidermal Growth Factor Receptor Family in Mammary Tumorigenesis and Metastasis». Experimental Cell Research, vol. 253, no. 1, p. 78-87.

- KLAASSEN, C. D., M. Amdur et J. Doull. 1996. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. New York, McGraw-Hill, 1111 pages.
- KLAPPER, L. N., N. Vaisman, E. Hurwitz, R. Pinkas-Kramarski, Y. Yarden et M. Sela. 1997. «A SuBcl-2ass of Tumor-Inhibitory Monoclonal Antibodies to ErbB-2/HER2 Blocks Crosstalk With Growth Factor Receptors». Oncogene, vol. 14, no. 17, p. 2099-109.
- KRASILNIKOV, M. A. 2000. «Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent Pathways: the Role in Control of Cell Growth, Survival, and Malignant Transformation». Biochemistry (Mosc), vol. 65, no. 1, p. 59-67.
- LILJEGREN, G., L. Hardell, G. Lindstrom, P. Dahl et A. Magnuson. 1998. «Case-Control Study on Breast Cancer and Adipose Tissue Concentrations of Congener Specific Polychlorinated Biphenyls, DDE and Hexachlorobenzene». European Journal of Cancer Prevention, vol. 7, no. 2, p. 135-40.
- LIN, D., K. Binns, N. Warner, P. Nash, I. Donaldson, J. Fawcett, B. Baskin, T. Kubiseski et T. Pawson. 2000. «Cell Signaling Technology Catalog, Reference Section on Protein Domains», New England.
- LIU, J. P. 1999. «Studies of the Molecular Mechanisms in the Regulation of Telomerase Activity». FASEB Journal, vol. 13, no. 15, p. 2091-104.
- LIU, W., J. Li et R. A. Roth. 1999. «Heregulin Regulation of Akt/Protein Kinase B in Breast Cancer Cells». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 261, no. 3, p. 897-903.
- LOHRISCH, C. et M. Piccart. 2001. «An Overview of HER2». Seminars in Oncology, vol. 28, no. 6 Suppl 18, p. 3-11.
- LUPU, R., M. Cardillo, C. Cho, L. Harris, M. Hijazi, C. Perez, K. Rosenberg, D. Yang et C. Tang. 1996. «The Significance of Heregulin in Breast Cancer Tumor Progression and Drug Resistance». Breast Cancer Research and Treatment, vol. 38, no. 1, p. 57-66.
- LYNCH, D. K., C. A. Ellis, P. A. Edwards et I. D. Hiles. 1999. «Integrin-Linked Kinase Regulates Phosphorylation of Serine 473 of Protein Kinase B by an Indirect Mechanism». Oncogene, vol. 18, no. 56, p. 8024-32.
- MAO, M., X. Fang, Y. Lu, R. Lapushin, R. C. Bast Jr et G. B. Mills. 2000a. «Inhibition of Growth-Factor-Induced Phosphorylation and Activation of Protein Kinase B/Akt by Atypical Protein Kinase C in Breast Cancer Cells». The Biochemical Journal, vol. 352 (Pt 2), p. 475-82.
- MARTINEZ, A., A. Castro, I. Dorronsoro et M. Alonso. 2002. «Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors As New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation». Medicinal Research Reviews, vol. 22, no. 4, p. 373-84.

MEIER, R., D. R. Alessi, P. Cron, M. Andjelkovic et B. A. Hemmings. 1997. «Mitogenic Activation, Phosphorylation, and Nuclear Translocation of Protein Kinase Bbeta». The Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 48, p. 30491-7.

MEYERSON, M. 2000. «Role of Telomerase in Normal and Cancer Cells». Journal of Clinical Oncology, vol. 18, no. 13, p. 2626-34.

MOYSICH, K. B., C. B. Ambrosone, J. E. Vena, P. G. Shields, P. Mendola, P. Kostyniak, H. Greizerstein, S. Graham, J. R. Marshall, E. F. Schisterman et J. L. Freudenheim. 1998. «Environmental Organochlorine Exposure and Postmenopausal Breast Cancer Risk». Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, vol. 7, no. 3, p. 181-8.

MUSSALO-RAUHAMAA, H., E. HASANEN, H. Pyysalo, K. Antervo, R. Kauppila, P. Pantzar. 1990. «Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients». Cancer, vol. 66, p. 2124-8.

MUTHUSWAMY, S. K., D. Li, S. Lelievre, M. J. Bissell et J. S. Brugge. 2001. «ErbB2, but Not ErbB1, Reinitiates Proliferation and Induces Luminal Repopulation in Epithelial Acini». Nature Cell Biology, vol. 3, no. 9, p. 785-92.

NAGAE, Y., K. Kameyama, M. Yokoyama, Z. Naito, N. Yamada, S. Maeda, G. Asano, Y. Sugisaki et S. Tanaka. 2002. «Expression of E-Cadherin Catenin and C-ErbB-2 Gene Products in Invasive Ductal-Type Breast Carcinomas». Journal of Nippon Medical School, vol. 69, no. 2, p. 165-71.

NAWAZ, S., T. L. Hashizumi, N. E. Markham, A. L. Shroyer et K. R. Shroyer. 1997. «Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastases». American Journal of Clinical Pathology, vol. 107, no. 5, p. 542-7.

NOVAK, A., S. C. Hsu, C. Leung-Hagesteijn, G. Radeva, J. Papkoff, R. Montesano, C. Roskelley, R. Grosschedl et S. Dedhar. 1998. «Cell Adhesion and the Integrin-Linked Kinase Regulate the LEF-1 and Beta-Catenin Signaling Pathways». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 8, p. 4374-9.

OLIVER, B. G. et A. J. Niimi. 1985. «Bioconcentration factors of some halogenated organics for rainbow trout: limitations in their use for prediction for environmental residues». Environmental Science and Technology, vol. 19, p. 842-49.

PAINE, T. M., H. D. Soule, R. J. Pauley et P. J. Dawson. 1992. «Characterization of Epithelial Phenotypes in Mortal and Immortal Human Breast Cells». International Journal of Cancer, vol. 50, no. 3, p. 463-73.

PAYNE, J., M. Scholze et A. Kortenkamp. 2001. «Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation». Environmental Health Perspectives, vol. 109, no. 4, p. 391-7.

- PERSAD, S., A. A. Troussard, T. R. McPhee, D. J. Mulholland et S. Dedhar. 2001. «Tumor Suppressor PTEN Inhibits Nuclear Accumulation of Beta-Catenin and T Cell/Lymphoid Enhancer Factor 1-Mediated Transcriptional Activation». The Journal of Cell Biology, vol. 153, no. 6, p. 1161-74.
- PHILLIPS, D. H., F. L. Martin, J. A. Williams, L. M. Wheat, L. Nolan, K. J. Cole et P. L. Grover. 2002. «Mutagens in Human Breast Lipid and Milk: the Search for Environmental Agents That Initiate Breast Cancer». Environmental and Molecular Mutagenesis, vol. 39, no. 2-3, p. 143-9.
- PLANTE, I., M. Charbonneau et D. G. Cyr. 2002. «Decreased Gap Junctional Intercellular Communication in Hexachlorobenzene-Induced Gender-Specific Hepatic Tumor Formation in the Rat». Carcinogenesis, vol. 23, no. 7, p. 1243-9.
- PLANTE, I. D. G. Cyr, et M. Charbonneau. 2003. «Overexpression of the Integrin-Linked-Kinase pathway in HCB-treated female rats». Toxicological Sciences, vol. 72, p. 237-38.
- POHANVIRTA, R., R. Juvonen, S. Kärenlampi, H. Raunio et J. Tuomisto. 1988. «Hepatic Ah-receptor levels and the effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activity in a TCDD-susceptible and-resistant rat strain». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 92, p. 131-140.
- PRATT, W. B. 1997. «The Role of the Hsp90-Based Chaperone System in Signal Transduction by Nuclear Receptors and Receptors Signaling Via MAP Kinase». Annual Review Pharmacology and Toxicology, vol. 37, p. 297-326.
- RAM, T. G., K. E. Kokeny, C. A. Dilts et S. P. Ethier. 1995. «Mitogenic Activity of Neu Differentiation Factor/Heregulin Mimics That of Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor-I in Human Mammary Epithelial Cells». Journal of Cellular Physiology, vol. 163, no. 3, p. 589-96.
- SAETER, G. et P. O. Seglen. 1990. «Cell biology of hepatocarcinogenesis». Critical Reviews in Oncogenesis. vol. 1, p. 437-66.
- SALA, M., J. Sunyer, R. Otero, M. Santiago-Silva, D. Ozalla, C. Herrero, J. To-Figueras, M. Kogevinas, J. M. Anto, C. Camps et J. Grimalt. 1999. «Health Effects of Chronic High Exposure to Hexachlorobenzene in a General Population Sample». Archives of Environmental Health, vol. 54, no. 2, p. 102-9.
- SLICHENMYER, W. J. et D. W. Fry. 2001. «Anticancer Therapy Targeting the ErbB Family of Receptor Tyrosine Kinases». Seminars in Oncology, vol. 28, no. 5 Suppl 16, p. 67-79.
- Société canadienne du cancer, Institut National du cancer du Canada, Statistique Canada, Registres du cancer des provinces et des territoires, Santé Canada. 2003. Statistiques Canadiennes sur le Cancer, Canada.

- SOMASIRI, A., A. Howarth, D. Goswami, S. Dedhar et C. D. Roskelley. 2001. «Overexpression of the Integrin-Linked Kinase Mesenchymally Transforms Mammary Epithelial Cells». Journal of Cell Science, vol. 114, no. (Pt 6), p. 1125-36.
- SOMASIRI, A., C. Wu, T. Ellchuk, S. Turley et C. D. Roskelley. 2000. «Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Required for Adherens Junction- Dependent Mammary Epithelial Cell Spheroid Formation». Differentiation, vol. 66, no. 2-3, p. 116-25.
- SOULE, H. D., T. M. Maloney, S. R. Wolman, W. D. Peterson Jr, R. Brenz, C. M. McGrath, J. Russo, R. J. Pauley, R. F. Jones et S. C. Brooks. 1990. «Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10». Cancer Research, vol. 50, no. 18, p. 6075-86.
- STELLMAN, S. D., M. V. Djordjevic, J. A. Britton, J. E. Muscat, M. L. Citron, M. Kemeny, E. Busch et L. Gong. 2000. «Breast Cancer Risk in Relation to Adipose Concentrations of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Long Island, New York». Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, vol. 9, no. 11, p. 1241-9.
- STORTELERS, C., M. L. van De Poll, A. E. Lenferink, M. M. Gadellaa, C. van Zoelen et E. J. van Zoelen. 2002. «Epidermal Growth Factor Contains Both Positive and Negative Determinants for Interaction With ErbB-2/ErbB-3 Heterodimers». Biochemistry, vol. 41, no. 13, p. 4292-301.
- STRANGE, R., T. Metcalfe, L. Thackray et M. Dang. 2001. «Apoptosis in Normal and Neoplastic Mammary Gland Development». Microscopy Research and Technique, vol. 52, no. 2, p. 171-81.
- SUO, Z, B. Risberg, M. G. Karlsson, K. Villman, E. Skovlund et J. M. Nesland. 2002. «The expression of EGFR family ligands in breast carcinomas». International Journal of Surgical Pathology, vol. 10, no. 2, p. 91-9.
- TAN, C., P. Costello, J. Sanghera, D. Dominguez, J. Baulida, A. G. de Herreros et S. Dedhar. 2001. «Inhibition of Integrin Linked Kinase (ILK) Suppresses Beta-Catenin-Lef/Tcf-Dependent Transcription and Expression of the E-Cadherin Repressor, Snail, in APC-/- Human Colon Carcinoma Cells». Oncogene, vol. 20, no. 1, p. 133-40.
- THOR, A. D., S. Liu, S. Edgerton, D. Moore 2nd, K. M. Kasowitz, C. C. Benz, D. F. Stern et M. P. DiGiovanna. 2000. «Activation (Tyrosine Phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/Neu): a Study of Incidence and Correlation With Outcome in Breast Cancer». Journal of Clinical Oncology, vol. 18, no. 18, p. 3230-9.
- TRICHOPOULOS, D., F. P. Li et D. J. Hunter. 1996. «What Causes Cancer?». Scientific American, vol. 275, no. 3, p. 80-7.

TROUSSARD, A. A., P. Costello, T. N. Yoganathan, S. Kumagai, C. D. Roskelley et S. Dedhar. 2000. «The Integrin Linked Kinase (ILK) Induces an Invasive Phenotype Via AP-1 Transcription Factor-Dependent Upregulation of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)». Oncogene, vol. 19, no. 48, p. 5444-52.

TROYER, K. L. et D. C. Lee. 2001. «Regulation of Mouse Mammary Gland Development and Tumorigenesis by the ERBB Signaling Network». Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, vol. 6, no. 1, p. 7-21.

TUOMISTO, J., C. H. Sewall, M. Unkila, R. Pohjanvirta, G. C. Clark, M. Viluksela, K. Rozman et G. W. Lucier. 1996. «Differences in binding of epidermal growth factor to liver membranes of TCDD-resistant and TCDD-sensitive rats after a single dose of TCDD». Environmental Toxicology and Pharmacology, vol. 1, p. 109-16.

VAN DE WETERING, M., N. Barker, I. C. Harkes, M. van der Heyden, N. J. Dijk, A. Hollestelle, J. G. Klijn, H. Clevers et M. Schutte. 2001. «Mutant E-Cadherin Breast Cancer Cells Do Not Display Constitutive Wnt Signaling». Cancer Research, vol. 61, no. 1, p. 278-84.

VIZIRIANAKIS, I. S., Y. Q. Chen, S. S. Kantak, A. S. Tsiftoglou et R. H. Kramer. 2002. «Dominant-Negative E-Cadherin Alters Adhesion and Reverses Contact Inhibition of Growth in Breast Carcinoma Cells». International Journal of Oncology, vol. 21, no. 1, p. 135-44.

VOET, D. et G. J. Voet. 1998. Biochimie. Paris, De Boeck Université, 1361 pages.

VOGEL, C. et J. Abel. 1995. «Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Growth Factor Expression in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7». Archives of Toxicology, vol. 69, no. 4, p. 259-65.

WANG, W., R. Smith 3rd et S. Safe. 1998. «Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Antiestrogenicity in MCF-7 Cells: Modulation of Hormone-Induced Cell Cycle Enzymes». Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 356, no. 2, p. 239-48.

WASSERMANN, M., D. P. Nogueira, L. Tomatis, A. P. Mirra, H. Shibata, G. Arie, S. Cucos, D. Wassermann. 1976. «Organochlorine compounds in neoplastic and adjacent apparently normal breast tissue». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 15, p. 478-84.

WEINBERG, R. A. 1996. «How Cancer Arises». Scientific American, vol. 275, no. 3, p. 62-70.

WHITE, D. E., R. D. Cardiff, S. Dedhar et W. J. Muller. 2001. «Mammary Epithelial-Specific Expression of the Integrin-Linked Kinase (ILK) Results in the Induction of Mammary Gland Hyperplasias and Tumors in Transgenic Mice». Oncogene, vol. 20, no. 48, p. 7064-72.

- WOLFF, M. S., P. G. Toniolo, E. W. Lee, M. Rivera et N. Dubin. 1993. «Blood Levels of Organochlorine Residues and Risk of Breast Cancer». Journal of the National Cancer Institute, vol. 85, no. 8, p. 648-52.
- WONG, S. C., S. F. Lo, K. C. Lee, J. W. Yam, J. K. Chan et W. L. Wendy Hsiao. 2002. «Expression of Frizzled-Related Protein and Wnt-Signalling Molecules in Invasive Human Breast Tumours». The Journal of Pathology, vol. 196, no. 2, p. 145-53.
- WOOLCOTT, C. G. et K. J. Aronson. 2001. «Organochlorines». Chap. V dans Review of lifestyle and environmental risk factors for breast cancer, The Canadian Breast Cancer Initiative (CBCI)-Workshop on the Primary Prevention of Breast Cancer, vol. 2, Québec, p. 309-82.
- WU, C. 2001. «ILK Interactions». Journal of Cell Science, vol. 114, no. (Pt 14), p. 2549-50.
- WU, C. et S. Dedhar. 2001. «Integrin-Linked Kinase (ILK) and Its Interactors: a New Paradigm for the Coupling of Extracellular Matrix to Actin Cytoskeleton and Signaling Complexes». The Journal of Cell Biology, vol. 155, no. 4, p. 505-10.
- YOGANATHAN, T. N., P. Costello, X. Chen, M. Jabali, J. Yan, D. Leung, Z. Zhang, A. Yee, S. Dedhar et J. Sanghera. 2000. «Integrin-Linked Kinase (ILK): a "Hot" Therapeutic Target». Biochemical Pharmacology, vol. 60, no. 8, p. 1115-9.
- ZANTEK, N. D., J. Walker-Daniels, J. Stewart, R. K. Hansen, D. Robinson, H. Miao, B. Wang, H. J. Kung, M. J. Bissell et M. S. Kinch. 2001. «MCF-10A-NeoST: a New Cell System for Studying Cell-ECM and Cell-Cell Interactions in Breast Cancer». Clinical Cancer Research, vol. 7, no. 11, p. 3640-8.
- ZERVAS, C. G., S. L. Gregory et N. H. Brown. 2001. «Drosophila Integrin-Linked Kinase Is Required at Sites of Integrin Adhesion to Link the Cytoskeleton to the Plasma Membrane». The Journal of Cell Biology, vol. 152, no. 5, p. 1007-18.
- ZHANG, L., M. Bewick et R. M. Lafrenie. 2002. «EGFR and ErbB2 Differentially Regulate Raf-1 Translocation and Activation». Laboratory Investigation, vol. 82, no. 1, p. 71-8.
- ZHANG, M. et S. S. Thorgeirsson. 1994. «Modulation of Connexins During Differentiation of Oval Cells into Hepatocytes». Experimental Cell Research, vol. 213, no. 1, p. 37-42.
- ZHENG, T., T. R. Holford, S. T. Mayne, J. Tessari, P. H. Owens, S. H. Zahm, B. Zhang, R. Dubrow, B. Ward, D. Carter et P. Boyle. 1999. «Environmental Exposure to Hexachlorobenzene (HCB) and Risk of Female Breast Cancer in Connecticut». Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, vol. 8, no. 5, p. 407-11.

ZINDA, M. J., M. A. Johnson, J. D. Paul, C. Horn, B. W. Konicek, Z. H. Lu, G. Sandusky, J. E. Thomas, B. L. Neubauer, M. T. Lai et J. R. Graff. 2001. «AKT-1, -2, and -3 Are Expressed in Both Normal and Tumor Tissues of the Lung, Breast, Prostate, and Colon». Clinical Cancer Research, vol. 7, no. 8, p. 2475-9.

