

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
Institut national de la recherche scientifique

**EFFETS CELLULAIRES DU  $\beta$ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE  
CHEZ LES CELLULES ÉPITHÉLIALES MAMMAIRES HUMAINES**

Par  
Myriam Binet, B.Sc.

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

Jury d'évaluation

<b>Examineur externe</b>	<b>Dr Pierre Ayotte</b> Institut national de la santé Publique du Québec
<b>Président</b>	<b>Dr Michel Fournier</b> INRS-Institut Armand-Frappier Institut national de la recherche scientifique
<b>Directeur de recherche</b>	<b>Dr Michel Charbonneau</b> INRS-Institut Armand-Frappier Institut national de la recherche scientifique
<b>Codirecteur de recherche</b>	<b>Dr Daniel Desaulniers</b> Section Croissance et développement Division toxicologie environnementale et occupationnelle Santé Canada



## RÉSUMÉ

Le taux d'incidence du cancer du sein est en augmentation d'environ 1,5 % par année depuis 1981 chez les Canadiennes de 30 ans et plus. Nonobstant les facteurs génétiques, nutritionnels et hormonaux, de récentes études épidémiologiques ont démontré que les xénobiotiques environnementaux, notamment les organochlorés, contribuent au développement de la cancérogénèse mammaire. Néanmoins, les résultats de ces études sont contradictoires sur la relation entre la dose interne de ces polluants et le risque de cancer du sein. Ainsi, des données scientifiques sur l'action biologique de ces contaminants au niveau des cellules mammaires devront être recueillies afin de préciser leur rôle potentiel.

La présente étude s'inscrit dans une démarche de détermination de ces mécanismes cellulaires dans le but de mieux évaluer les conséquences de ces toxiques sur la santé humaine. L'objectif principal des présents travaux est de déterminer l'effet de concentrations non cytotoxiques de  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH) sur deux récepteurs membranaires (EGFR et ErbB-2) ainsi que leur voie de signalisation (MEK) dans un système cellulaire en culture, soit une lignée non tumorale de cellules épithéliales mammaires humaines (MCF-10A).

Les résultats de la présente étude démontrent que le pesticide  $\beta$ -HCH (10  $\mu$ M) augmente de façon significative ( $p < 0,01$ ) la prolifération des cellules mammaires MCF-10A, tel que mesuré par quantification de l'incorporation de la 5'bromodéoxyuridine (BrdU). L'effet mitogène du  $\beta$ -HCH est d'intensité comparable à celui induit par E2 (augmentation de 32 % et 34 % respectivement par rapport au véhicule). De plus, cet effet mitogène ne semble pas être médié par la modulation du niveau de récepteur à l'œstrogène.

Le  $\beta$ -HCH, après 10 minutes de traitement, augmente la phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR ( $p < 0,02$ ) et du récepteur ErbB-2 ( $p < 0,02$ ) sans augmenter la quantité totale de ces protéines membranaires de façon significative ( $p = 0,18$  et  $p = 0,08$  respectivement). L'effet du  $\beta$ -HCH sur la phosphorylation du récepteur ErbB-2 est aboli en présence d'AG-825, un inhibiteur spécifique de cette protéine, nous suggérant que l'effet du  $\beta$ -HCH serait médié par l'activation des récepteurs ErbB-2 à la surface des cellules mammaires, élément important de signalisation intracellulaire et se poursuivant par l'activation de facteurs de transcription nucléaires.

Le présent travail constitue la première étude démontrant que le récepteur ErbB-2 serait potentiellement activé par le  $\beta$ -HCH chez les MCF-10A et cette observation est compatible avec un effet pro-cancérogène de cet organochloré environnemental. Ces travaux donnent une indication quant à la plausibilité biologique du  $\beta$ -HCH dans l'étiologie du cancer du sein.



Myriam Binet

Étudiante



Dr Michel Charbonneau

Directeur de Recherche

## REMERCIEMENTS

Selon un dicton populaire, il semblerait que la patience est la mère de toutes les vertus. Dans le cas de la poursuite de ces études, la patience de mon directeur de recherche, Michel Charbonneau a été mise à l'épreuve plus d'une fois et mes premières pensées vont naturellement vers lui. Je conserverai de Michel un esprit méthodique et un souci de l'intégrité scientifique tout au long de ma nouvelle carrière, même si celle-ci diverge passablement de la voie entreprise il y a déjà plusieurs années.

Je voudrais remercier Guylaine, la technicienne angélique du laboratoire à la patience infinie pour ses services techniques. "Mille fois sur le métier" disait-elle. Elle n'avait que trop raison en ce qui concerne la recherche scientifique.

Je tiens aussi à remercier Éric, pour son support moral extraordinaire, sa patience et son amour ainsi que mes quatre parents qui n'ont jamais cessé de m'encourager à poursuivre et terminer mes études supérieures.

Finalement, je ne peux me permettre d'oublier le soutien financier du FCAR-FRSQ et l'INRS-Institut Armand-Frappier qui m'a permis de me consacrer à plein temps à la réussite de ce projet de recherche.

*A B C de la réussite scientifique : de l'Acharnement, beaucoup de Boulot et un peu de Chance...*

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
INTRODUCTION.....	2
CHAPITRE 1 : RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET DÉFINITION DES OBJECTIFS.....	4
1.1. Le cancer du sein.....	4
1.1.1 Les différents types de cancers et les facteurs de risque .....	6
1.1.2 Étiologie de la condition .....	7
1.2 Prolifération et cycle cellulaire des cellules épithéliales.....	8
1.3 Les cellules épithéliales mammaires MCF-10A .....	10
1.4 La famille des récepteurs à l'EGF et son implication dans le cancer .....	10
1.5 Le récepteur EGFR et son implication dans le cancer .....	13
1.6 Relation entre les récepteurs à l'EGF et les récepteurs aux œstrogènes .....	14
1.7 Le récepteur ErbB-2 et son implication dans le cancer.....	16
1.8 Les cascades intracellulaires activées par EGFR et ErbB-2 .....	21
1.9 Les polluants environnementaux.....	21
1.9.1 Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine (TCDD) .....	23

1.9.2	Hexachlorobenzène (HCB) .....	24
1.9.3	Hexachlorocyclohexane (HCH) .....	25
1.9.4	Mécanisme de toxicité .....	26
1.10	Hypothèse et objectifs de recherche .....	27
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....		28
2.1	Matériel .....	28
2.1.1	Culture cellulaire .....	28
2.1.2	Produits toxiques, réactifs et nécessaire pour l'immunobuvardage .....	28
2.1.3	Anticorps utilisés .....	29
2.2	Culture cellulaire .....	29
2.3	Traitement des cellules .....	30
2.4	Récolte des cellules .....	31
2.5	Dosage des protéines .....	31
2.6	Prolifération .....	31
2.7	Analyse de la modulation des récepteurs membranaires ou de MEK par immunobuvardage .....	33
2.8	Utilisation d'un bloqueur spécifique .....	34
2.9	Quantification par densitométrie .....	35
2.10	Statistiques .....	35
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX .....		36
3.1	Mitogenèse .....	36
3.1.1	Optimisation des traitements en fonction du cycle cellulaire .....	36
3.1.2	Potentiel mitogène du $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH) .....	41
3.2	Modulation du récepteur à l'œstrogène .....	41
3.3	Modulation du récepteur EGFR .....	45
3.4	Modulation de la phosphorylation du récepteur EGFR .....	48
3.5	Modulation de la quantité de récepteur ErbB-2 .....	52
3.6	Modulation de la phosphorylation du récepteur ErbB-2 .....	52
3.7	Modulation de la voie de signalisation MEK .....	55

3.8	Modulation d'une protéine inconnue de poids moléculaire 130 .....	58
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....		59
4.1	Choix d'un véhicule et optimisation de la méthode expérimentale .....	59
4.2	Caractérisation du potentiel mitogène du $\beta$ -HCH.....	60
4.3	Étude de la modulation de la quantité de protéines réceptrices .....	61
4.4	Étude de la modulation de l'activité de protéines réceptrices.....	61
4.5	Étude d'un mécanisme responsable du potentiel mitogène du $\beta$ -HCH .....	62
CONCLUSION .....		66
RÉFÉRENCES .....		67



## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1.1 :	Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge pour le cancer du sein chez les femmes canadiennes entre 1972 et 2002.....	5
FIGURE 1.2 :	Régulation de la prolifération cellulaire induite par le récepteur de facteurs de croissance.....	9
FIGURE 1.3 :	Homologie structurale des récepteurs de la famille ErbB .....	12
FIGURE 1.4 :	Voies proposées de la transduction de signaux activés par ErbB-2.....	18
TABLEAU 1.1 :	Surexpression des récepteurs ErbB-2 dans différents types de carcinomes humains.....	19
FIGURE 3.1 :	Effet du 17 $\beta$ -œstradiol (E2) et ses métabolites sur le niveau de prolifération de cellules MCF-10A .....	39
FIGURE 3.2 :	Optimisation de la durée de traitement avec un mitogène pour des cellules MCF-10A à division rapide .....	42
FIGURE 3.3 :	Optimisation de la durée de traitement avec un mitogène pour des cellules MCF-10A à division lente .....	42
FIGURE 3.4 :	Effet du mitogène E2 (20 nM) et du $\beta$ -HCH (10 $\mu$ M) sur la prolifération de cellules MCF-10A en culture.....	42
FIGURE 3.5a :	Effet de différents polluants toxiques sur la quantité de récepteurs à l'œstrogène dans les cellules MCF-10A en culture .....	44
FIGURE 3.5b :	Effet du $\beta$ -HCH sur la quantité de récepteurs à l'œstrogène dans les cellules MCF-10A en culture .....	44
FIGURE 3.6 :	Effet de différents polluants toxiques sur la quantité de récepteurs EGFR des cellules MCF-10A en culture. ....	46
FIGURE 3.7 :	Effet du $\beta$ -HCH sur la quantité de récepteurs EGFR de cellules MCF-10A en culture .....	47
FIGURE 3.8a :	Effet du HCB et du $\beta$ -HCH sur la phosphorylation des récepteurs EGFR des cellules MCF-10A en culture .....	49

FIGURE 3.8b : Effet du $\beta$ -HCH (10 minutes) sur le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR des cellules MCF-10A en culture .....	50
FIGURE 3.9 : Effet du $\beta$ -HCH (30 et 60 min.) sur le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR des cellules MCF-10A en culture.....	51
FIGURE 3.10 : Effet d'une concentration de 10 $\mu$ M de $\beta$ -HCH (30 min.) sur la quantité de récepteurs ErbB-2 des cellules MCF-10A en culture.....	53
FIGURE 3.11 : Effet du $\beta$ -HCH, avec ou sans AG-825, sur le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur ErbB-2 des cellules MCF-10A en culture. ....	54
FIGURE 3.12 : Effet du $\beta$ -HCH (10, 30 et 60 minutes) sur la quantité de protéines MEK des cellules MCF-10A en culture.....	56
FIGURE 3.13 : Effet du $\beta$ -HCH (10, 120 et 240 minutes), avec ou sans AG-825, sur la quantité de protéines MEK des cellules MCF-10A en culture.....	57
FIGURE 3.14 : Effet du $\beta$ -HCH sur le niveau de phosphorylation d'une protéine de 130 kDa des cellules MCF-10A en culture .....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

16-AHE.....	16- $\alpha$ hydroxyestrone
$\beta$ -HCH.....	$\beta$ -hexachlorocyclohexane
BPC.....	Biphényles polychlorés
DDT.....	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DMEM-F12.....	Milieu de culture mixte (Dulbecco/Ham)
DMSO.....	Diméthylsulfoxyde
E2.....	17 $\beta$ -œstradiol
EGF.....	Facteur de croissance épidermique
EGFR.....	Récepteur au facteur de croissance épidermique
ER.....	Récepteur à l'œstrogène
ETOH.....	Éthanol
HCB.....	Hexachlorobenzène
HEPES.....	n-2-hydroxyéthyl-piperazine-n'-2-éthanesulfonate
HS.....	Sérum de cheval
MAPK.....	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK.....	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
NaCl.....	Chlorure de sodium
<i>o,p'</i> -DDT.....	2-(2-chlorophényl)-2-(4-chlorophényl)-1,1,1-trichloroéthane
PBS.....	Tampon phosphate-salin
PEG.....	Polyéthylène glycol
PI3K.....	Phosphatidylinositol 3' kinase
PLC $\gamma$ .....	Phospholipase C $\gamma$
<i>p,p'</i> -DDE.....	1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthylène
<i>p,p'</i> -DDT.....	2,2-bis(4-chlorophényl)-1,1,1-trichloroéthane
SDS.....	Dodécylsulfate de sodium
SH2.....	<i>Src-homology</i>
TCDD.....	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine

## INTRODUCTION

Le cancer de sein constitue le type de cancer ayant la plus haute prévalence chez les femmes canadiennes et il est en deuxième position après le cancer du poumon pour le taux de mortalité (INCC, 2001). Le taux d'incidence de la maladie chez les Canadiennes de plus de 30 ans est en augmentation d'environ 1,5 % par année depuis 1981, et les femmes post-ménopausées sont particulièrement touchées. De nombreuses études ont identifié plusieurs facteurs étiologiques, notamment les facteurs génétiques, hormonaux et nutritionnels (Harris, Morrow et Norton, 1997). Or, des différences géographiques et socio-économiques au niveau de l'incidence de ce cancer ont amené l'hypothèse de facteurs environnementaux dans l'étiologie de la condition.

Des polluants organochlorés, issus de l'usage industriel, se retrouvent dans l'environnement, s'infiltrant dans la chaîne alimentaire et s'accumulent dans les tissus vivants grâce à leur grande liposolubilité et leur faible taux de métabolisme. Ces substances chimiques se retrouvent ainsi dans le tissu adipeux de virtuellement tous les Canadiens et Canadiennes. Puisque des études ont démontré que certains de ces produits sont cancérigènes chez les animaux de laboratoire, leur présence dans le tissu mammaire contribue à alimenter les inquiétudes quant au lien possible entre ces polluants et le cancer du sein, que ce soit au niveau de l'initiation, de la promotion ou de la progression de la pathologie. Toutefois, les mécanismes par lesquels les polluants agissent sont encore nébuleux.

Parmi les éléments cellulaires potentiellement impliqués dans l'évolution de la maladie, les facteurs de croissance et leurs récepteurs occupent une place de plus en plus prépondérante. Les facteurs de croissance sont des protéines qui sont nécessaires à la croissance et la survie de cellules en culture. Les récepteurs de ces facteurs, tels le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ou le récepteur ErbB-2 (aussi connu sous le nom de HER-2/Neu), sont des protéines dimériques phosphorylées sur des

tyrosines et ils ont un rôle potentiel dans le développement du cancer du sein chez l'humain. Il y a une homologie dans la famille des récepteurs ErbB, ce qui laisse supposer des réactions croisées potentielles entre les différents types de signaux.

Des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire du Dr Charbonneau ont démontré que l'hexachlorobenzène (HCB), un contaminant de l'environnement présent dans l'organisme de virtuellement tous les Canadiens, est mitogène chez les cellules de type MCF-10A, une lignée de cellules épithéliales mammaires humaines non tumorigènes. L'effet prolifératif observé semble être médié par le récepteur à l'EGF (Lyrette, 1998: 48), se distinguant ainsi du mode d'action *via* le récepteur à l'œstrogène de certains organochlorés, comme le propose la littérature. Ainsi, il a été démontré que l'HCB augmente le niveau de phosphorylation du récepteur EGFR, un événement au sommet d'un processus de mitogenèse, relayé d'une façon classique par la voie des MAP kinases. D'autres organochlorés environnementaux, tels que les biphényles polychlorés (BPC), certains métabolites du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et le  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH), sont soupçonnés de jouer un rôle dans la cancérogénèse mammaire *via* leur action mitogène. Ce dernier a retenu notre attention et il constitue le centre d'intérêt de ce mémoire.

L'objectif principal des actuels travaux est de déterminer l'effet de concentrations non cytotoxiques de  $\beta$ -HCH sur certains récepteurs membranaires (EGFR, ErbB-2) ainsi que leur voie de signalisation (MEK) dans des cellules mammaires en culture (MCF-10A). Parmi les retombées intéressantes de ce projet, on note la possibilité de mieux comprendre les mécanismes d'action non œstrogéniques par lesquels les polluants induisent la prolifération cellulaire.

Le premier chapitre du présent mémoire expose une revue des connaissances actuelles sur la problématique de recherche et les objectifs spécifiques des travaux de recherche. Le second chapitre décrit les méthodologies développées et appliquées en laboratoire pour répondre à ces objectifs. Le chapitre trois présente les résultats de l'expérimentation et ces derniers sont ensuite discutés au sein du chapitre quatre.

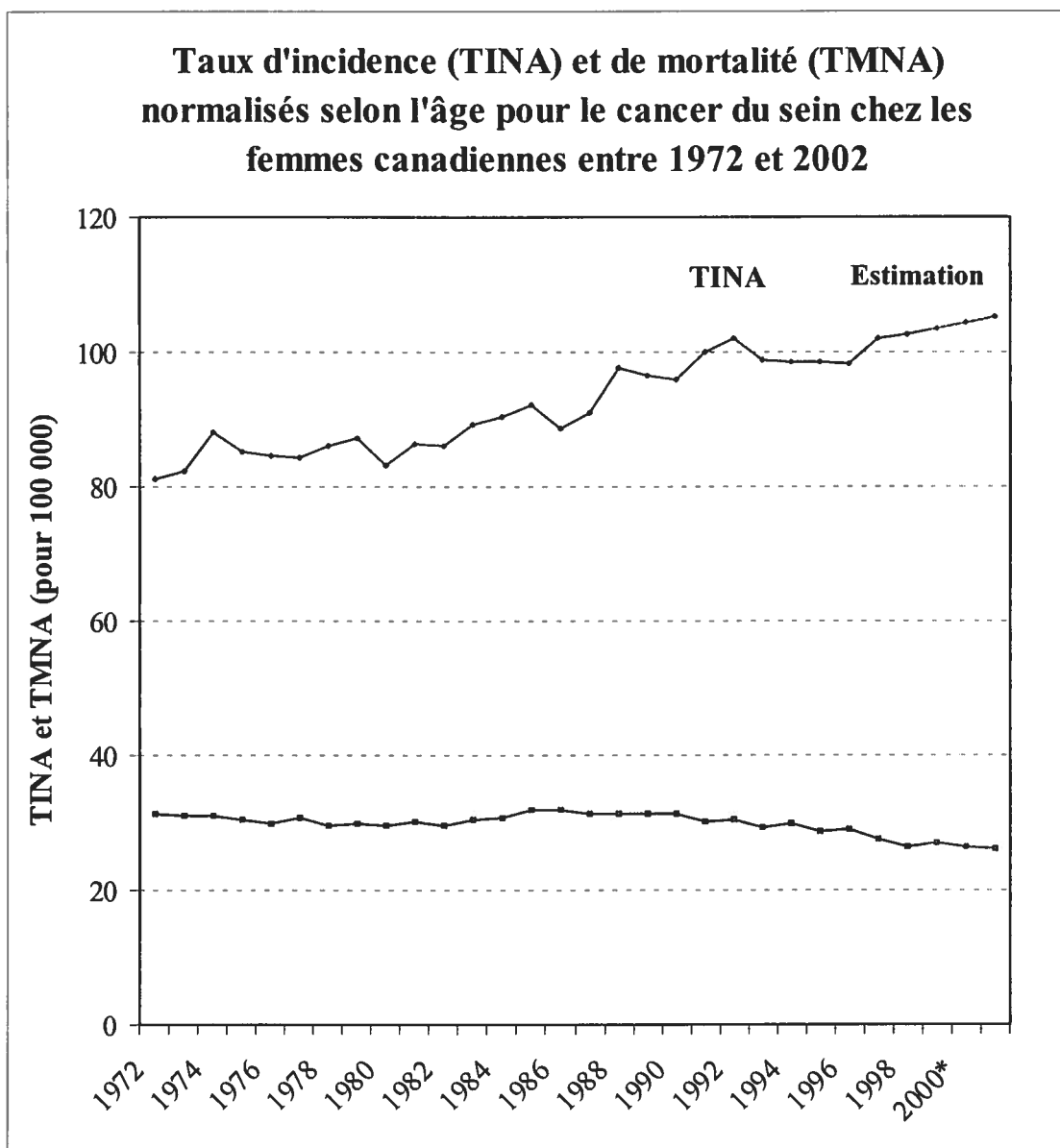
# CHAPITRE 1

## RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET DÉFINITION DES OBJECTIFS

### 1.1. Le cancer du sein

Aux États-Unis et au Canada, bien que le cancer du poumon est le plus mortel tant chez les hommes que chez les femmes, le cancer du sein demeure le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes (INCC, 2002). Cette année et au Canada seulement, on diagnostiquera le cancer du sein chez environ 20 500 femmes (dont 5 200 au Québec) et 5 400 seront emportées par la maladie (INCC, 2002). Ceci représente un risque à vie d'une chance sur 8,8 d'être atteint du cancer du sein et une probabilité d'une sur 26,6 d'en mourir (Figure 1.1).

Depuis les trois dernières décennies, l'incidence du cancer du sein chez les femmes âgées de 50 ans et plus a augmenté de façon constante et graduelle. Cette hausse est, en partie, probablement due à l'augmentation de fréquence des examens mammographiques et elle semble s'être stabilisée depuis 1993. Parallèlement, il y a eu une légère diminution de la mortalité engendrée par le cancer du sein depuis les dix dernières années, en particulier chez les femmes âgées de 40 à 69 ans (figure 1.1). Une étude relativement récente allègue que cette diminution est également observée aux États-Unis, en Australie et au Royaume Uni (Gaudette *et al.*, 1995). Des études supplémentaires devront être effectuées afin de déterminer si cette diminution peut être attribuée aux programmes de dépistage précoce, à l'efficacité accrue des traitements de la maladie ou à l'évolution de certains facteurs prédisposants ou protecteurs (Gaudette *et al.*, 1995).



**Figure 1.1 : Taux d'incidence (TINA) et de mortalité (TMNA) normalisés selon l'âge pour le cancer du sein chez les femmes canadiennes entre 1972 et 2002.** L'incidence est le nombre de nouveaux cas de cancer du sein communiqués au Registre canadien du cancer tenu par Statistique Canada durant un an. La mortalité correspond au nombre de décès attribués au cancer du sein durant l'année, calculé d'après les registres de décès provinciaux de l'état civil. Les chiffres obtenus pour les années 1999 à 2002 sont des estimations obtenues par modélisation à partir de données depuis 1986. La normalisation selon l'âge tient compte de la variation de la répartition par âge de la population au fil des ans et a été calculée en se basant sur les chiffres de population au Canada en 1991 (tableau obtenu à partir des données de l'Institut national du Cancer du Canada, Toronto, Canada, 2002).

### 1.1.1 Les différents types de cancers et les facteurs de risque

Les affections bénignes touchant la glande mammaire comprennent : nodularité diffuse et généralisée, mastalgie, infections, inflammations et abcès du sein, kystes, papillomes, hyperplasie, adénofibromes et écoulements. Les carcinomes mammaires, moins nombreux sont, en ordre décroissant de fréquence : le carcinome invasif des canaux, le carcinome invasif des lobules, le carcinome invasif mixte, le carcinome médullaire, le comédocarcinome, la maladie de Paget (qui est essentiellement une forme agressive de carcinome des canaux *in situ*), le carcinome papillaire, le carcinome tubulaire et les autres carcinomes moins communs (Engel, 1997). La proportion de cas de cancer du sein diagnostiqués comme un carcinome des canaux *in situ* (CCIS) n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années. Cette pathologie est un stade précoce de cancer, détecté avant l'envahissement des tissus plus profonds.

Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques sont potentiellement responsables du déclenchement et de l'évolution du cancer du sein. Ce type de cancer est le plus souvent rencontré chez la femme et l'incidence augmente avec l'âge. Parmi les autres facteurs de risque non modifiables, on dénote les gènes de prédisposition p53, BRCA1 (localisé sur le chromosome 17) et BRCA2 (localisé sur le chromosome 13) (Harris, Morrow et Norton, 1997), la race, l'apparition des premières règles (ménarche) avant l'âge de douze ans, une ménopause tardive (après 50 ans), certaines affectations bénignes du sein et une densité mammaire élevée. Une corrélation positive semble exister entre le nombre de cycles ovulatoires qu'une femme aura au cours de sa vie et le risque éventuel de développer un carcinome mammaire.

Parmi les facteurs de risque dits modifiables, on retrouve l'absence de grossesse ou l'âge élevé lors de la première, certaines habitudes nutritionnelles (consommation régulière d'alcool, alimentation riche en graisses saturées), l'obésité, le faible niveau d'activité physique, l'utilisation précoce de contraceptifs oraux et l'hormonothérapie sur une longue période. Certains facteurs environnementaux, rapportés par la littérature



depuis quelques années, dont l'implication est très controversée (Kelsey et Bernstein, 1996) pourraient être également des facteurs non négligeables.

### **1.1.2 Étiologie de la condition**

Lors du développement d'un cancer, plusieurs changements au niveau du génotype et du phénotype cellulaires interviennent. Le cancer a été décrit comme une maladie génétique due à l'accumulation d'altérations moléculaires multiples et héritables au niveau de certains gènes d'une lignée cellulaire (Temin, 1988). La transformation d'une cellule normale à un phénotype néoplasique est un processus multifactoriel, complexe et se produisant en plusieurs étapes successives. D'après la théorie des différentes étapes de la cancérogénèse, le développement de plusieurs cancers s'effectuerait en quatre phases importantes, soit l'initiation spontanée ou induite par des agents génotoxiques, la prolifération sélective de cellules initiées, la transformation et finalement la progression (Cohen et Ellwein, 1990).

La cellule néoplasique possède certaines caractéristiques morphologiques, biologiques, biochimiques et immunologiques particulières. Parmi celles-ci, on note une prolifération anarchique et autonome, indépendante des limites des cellules avoisinantes et des facteurs de croissance, une diminution du potentiel de différenciation, une immortalité et éventuellement, un pouvoir invasif et métastatique. L'augmentation de l'index mitotique dans un tissu est l'indice d'une augmentation de prolifération cellulaire et celle-ci a été identifiée en tant qu'aspect mécanistique significatif des carcinogènes épigénétiques (Tomatis, 1993). Le cycle cellulaire de la cellule néoplasique est d'une durée normale à légèrement inférieure à celui des cellules non néoplasiques et le nombre de cellules se trouvant en division mitotique est très variable d'un cancer à l'autre et même au sein d'un même cancer. La croissance et la vitesse à laquelle une tumeur progressera varieront selon l'intensité de la prolifération cellulaire et la survie anormale des cellules tumorales. Cet état de déséquilibre contraste avec la stabilité dans les tissus

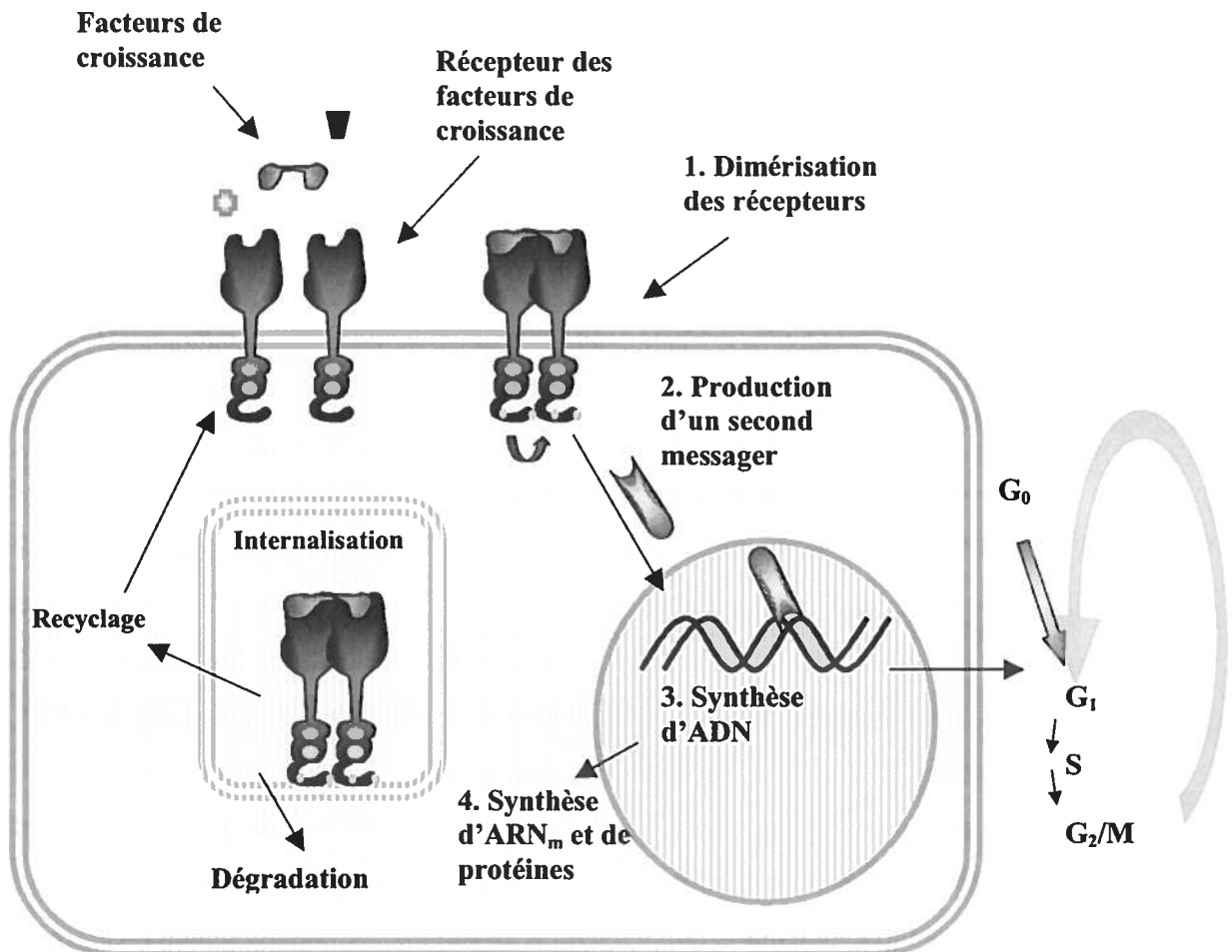
normaux où la mitose est sous contrôle de plusieurs facteurs et l'apoptose normale lors d'anomalies génétiques.

## 1.2 Prolifération et cycle cellulaire des cellules épithéliales

Les facteurs de croissance sont impliqués dans le processus de prolifération cellulaire, qu'il soit normal ou pathologique. L'acquisition d'une indépendance vis-à-vis ces facteurs de croissance est un phénotype retrouvé chez les cellules tumorales, tout comme l'augmentation de mitose. Le facteur de croissance épidermique (EGF) est le plus connu et provoque la prolifération de cellules épithéliales, endothéliales ou fibroblastiques (Carpenter et Cohen, 1979; Yarden *et al.*, 1996). Plusieurs autres facteurs (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, VEGF, interleukines, cytokines) et autres hormones agissent également comme promoteurs de croissance. Ces facteurs de croissance stimulent la prolifération cellulaire en se liant à des récepteurs membranaires, intracytoplasmiques ou nucléaires spécifiques. Par l'activité tyrosine kinase des récepteurs membranaires, il y a activation et phosphorylation de plusieurs messagers protéiques secondaires dont les plus connus sont les protéines *ras* et d'autres tyrosines kinases non réceptrices (codées par des gènes *abl*, *src*, *fes*, etc.). Ces messagers secondaires peuvent aller se relocaliser au noyau et activer certains gènes de transcription responsables de l'entrée de la cellule épithéliale dans le cycle cellulaire (figure 1.2).

Certains gènes oncosuppresseurs répriment la prolifération cellulaire, qu'elle soit normale ou anarchique, tels ceux des protéines Rb et p53. Rb provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> en se liant à d'autres protéines de transcription, prévenant ainsi l'entrée de la cellule en phase S. Le gène p53 est, quant à lui, induit lors d'atteintes au génome cellulaire et provoque également l'arrêt du cycle en phase G<sub>1</sub>, empêchant ainsi la cellule ayant subi un dommage de progresser et de proliférer (Oren, 1985). La protéine p53 codée par ce gène est fréquemment mutée dans plusieurs types de cancers (Gasco, Shami et Crook, 2002). D'autres anti-oncogènes, tels APC, NF-1, BRCA1 et BRCA2 ou autres gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération sont tous susceptibles d'être

éventuellement mutés, perturbant ainsi l'équilibre cellulaire et entraînant subséquemment le développement de certains cancers.



**Figure 1.2 : Régulation de la prolifération cellulaire induite par le récepteur de facteurs de croissance.** La liaison du ligand à la région extracellulaire de la protéine réceptrice amène la dimérisation entre les différents membres de la famille réceptrice et l'autophosphorylation sur des tyrosines menant au recrutement subséquent de protéines effectrices et à la stimulation de plusieurs voies de signalisation, dont la cascade *Ras/Raf*/MAP-kinase qui est la principale. Selon le type de ligand, l'endocytose des dimères, le recyclage de ceux-ci à la surface de la cellule ou la dégradation dans les lysosomes préservera la cellule d'une activation constante.

### 1.3 Les cellules épithéliales mammaires MCF-10A

Les études épidémiologiques ne permettent pas à elles seules une compréhension définitive du rôle des contaminants environnementaux et l'activité biologique de ces derniers se doit d'être démontrée au niveau cellulaire. Puisque l'objectif de ce travail est une étude mécanistique de l'effet à très court terme du  $\beta$ -HCH, les cellules mammaires humaines *in vitro* se sont révélées plus appropriées pour représenter l'organe-cible (i.e. la glande mammaire) que des études *in vivo* sur des rongeurs, par exemple. En effet, le tissu mammaire comporte plusieurs types cellulaires et son organisation varie d'une espèce à l'autre. De plus, les courts temps d'exposition utilisés nécessitaient une récolte des cellules rapide, sans étape de purification risquant d'altérer la voie de signalisation intracellulaire.

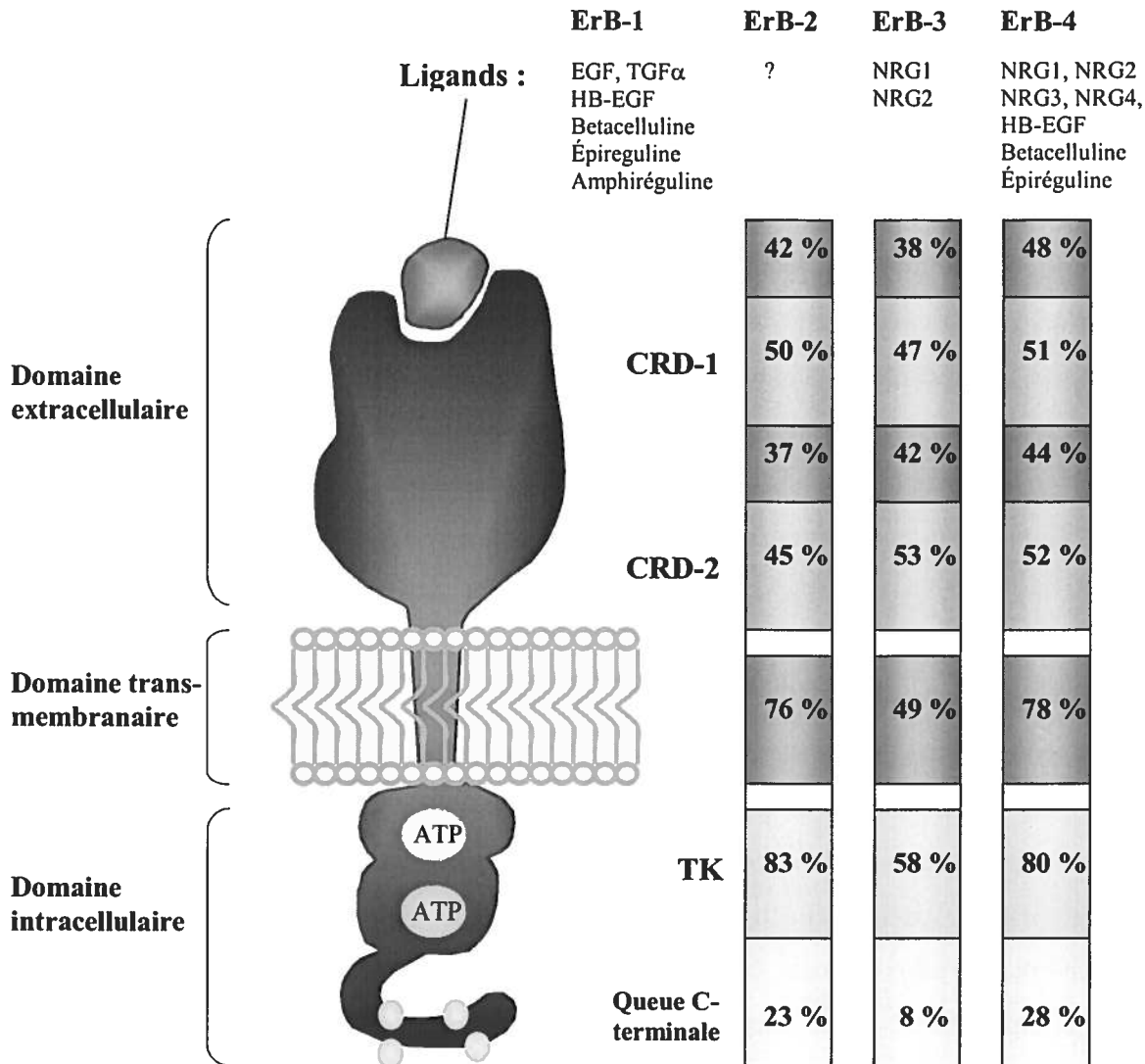
La majorité des études ont été effectuées à l'aide de cellules cancéreuses (MCF-7, T47D, 184B5/HER, MDA-468, MDA-MB-231, etc.), dérivées de carcinomes mammaires. Notre étude se distingue puisqu'elle évalue le potentiel mitogène d'un polluant chez des cellules épithéliales normales. En effet, les cellules MCF-10A sont des cellules mammaires humaines qui ont été isolées de tissu mammaire fibrocystique non tumorigène (Soule *et al.*, 1990; Tait, Soule et Russo, 1990). Cette lignée constitue un bon modèle d'étude puisqu'elle présente la majorité des caractéristiques phénotypiques de l'épithélium mammaire normal et que ces cellules requièrent pour leur croissance un milieu de culture supplémenté en EGF et autres facteurs de croissance (Soule *et al.*, 1990). De plus, la littérature suggère que ces cellules soient déficientes en récepteur à l'œstrogène (Soule *et al.*, 1990; Shen et Novak, 1997; Bhat et Vadgama, 2002).

### 1.4 La famille des récepteurs à l'EGF et son implication dans le cancer

La voie majeure des signaux de croissance des cellules mammaires est médiée par l'activation du récepteur à l'EGF (EGFR) par son substrat (Yarden *et al.*, 1996). La famille des récepteurs à l'EGF se compose de quatre tyrosines kinases homologues

(ErbB-1 à ErbB-4) activées par plus d'une douzaine de facteurs de croissance et de ligands différents (van der Geer, Hunter et Lindberg, 1994). Tous les membres de la famille de récepteurs sont caractérisés par deux séquences riches en cystéine (CRD-1 et CRD-2) et un domaine cytoplasmique tyrosine kinase (TK) flanqué de longs segments hydrophobes, comportant quatre sites d'autophosphorylation. Les quatre zones (CRD-1, CRD-2, TK et queue C-terminale) indiquées à la figure 1.3 montrent une forte variation entre les membres de la famille, tel qu'indiqué par le faible pourcentage d'homologie au récepteur à l'EGF (ErbB-1) qui a été le premier à être identifié.

La diversité apparente au niveau des récepteurs et des ligands contribue probablement aux voies de signalisation cytoplasmiques effectrices diversifiées (Burden et Yarden, 1997), telles les voies des MAPK kinases (MEK) ou des C-Jun kinases (SAPK). Ainsi, chaque ligand possède des affinités différentes pour plusieurs récepteurs et chaque récepteur peut réagir à cette liaison avec un ligand en formant plusieurs complexes homo et hétérodimériques différents contribuant également à la diversification du signal. Il est à noter que le récepteur ErbB-2 n'a pas encore de ligand de forte affinité connu à ce jour. Selon Klapper *et al.* (2000), il apparaît que même si ErbB-2 n'a pas de ligand propre, cette protéine agit comme sous-unité réceptrice pour les autres membres de la famille ErbB, agissant ainsi comme un amplificateur de signal. En fait, les homodimères ErbB-2 possèdent seulement une fraction de l'activité que les hétérodimères génèrent. De plus, la forte homologie entre les membres au niveau du domaine cytoplasmique tyrosine kinase n'est pas retrouvée dans le cas de ErbB-3 qui ne possède pas de région catalytique. La queue cytoplasmique (CT), comportant les sites d'attachement pour les protéines intracellulaires effectrices montre une faible homologie, indiquant un haut niveau de divergence des mécanismes de signalisation, résultant en une diversité jouant un rôle central dans la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse. Dans la plupart des cas, lorsque les membres de la famille ErbB sont surexprimés, particulièrement le récepteur ErbB-2, le pronostic associé à l'évolution de la tumeur est plus sombre (tel que résumé dans le Tableau 1.1 de la section 1.7).



**Figure 1.3 : Homologie structurale des récepteurs de la famille ErbB (Adapté et traduit de Klapper *et al.*, 2000).** Les récepteurs de la famille ErbB comportent un domaine extracellulaire de fixation du ligand riche en cystéines (CRD-1 et CRD-2), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant quatre sites d'autophosphorylation sur des tyrosines (TK). La liaison du ligand au récepteur induit une dimérisation des monomères et produit l'autophosphorylation du domaine cytosolique.

## 1.5 Le récepteur EGFR et son implication dans le cancer

Le récepteur membranaire pour le facteur de croissance épidermique (EGFR) a été le premier membre à être découvert de la famille. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa composée d'un domaine de liaison à son substrat, l'EGF, et d'un domaine kinase cytoplasmique, reliés par une chaîne hydrophobe (Downward, Parker et Waterfield, 1984). L'EGF peut stimuler *in vitro* la croissance de cellules épithéliales mammaires normales ou tumorales (Osborne *et al.*, 1980; Fitzpatrick, LaChance et Schultz, 1984) *via* l'activation de la fonction kinase cytoplasmique (Yarden et Schlessinger, 1985). Or, l'activation du récepteur EGFR a été reliée pour la première fois aux cancers humains suite à l'identification d'une forte homologie entre celui-ci et l'oncogène viral *v-erb* encodé par le rétrovirus aviaire (Downward *et al.*, 1984).

L'augmentation de l'expression du récepteur EGFR a été retrouvée dans une variété de néoplasmes, indiquant généralement un comportement plus agressif des cellules malignes (Helden et Westermak, 1984). L'utilisation de cette donnée en tant qu'outil de pronostic est cependant controversée puisque la corrélation avec le devenir clinique ne semble pas être démontrée de façon claire (Klijn *et al.*, 1994). Des différences entre les méthodes de détection du EGFR, dans la sélection de la population de patients, dans le nombre de cas analysés et la période d'observation pourraient possiblement expliquer les discordances au niveau des résultats. Ainsi, le pronostic ne semble pas différent entre les patientes atteintes de carcinomes invasifs des canaux qui expriment EGFR (environ 37%), tant au niveau de la durée de rémission qu'au niveau du taux de survie global (Charpin *et al.*, 1993). Une autre équipe de chercheurs n'a trouvé aucune relation entre les niveaux d'EGFR dans les biopsies de tumeurs mammaires et la taille de la tumeur et le grade de malignité (Ferrero *et al.*, 2001). Ils ont néanmoins établi une corrélation négative entre les niveaux d'EGFR dans les tumeurs et l'âge des patientes, tout comme l'équipe d'Eppenberger-Castori *et al.* (2002).

Cependant, Sainsbury *et al.* (1987) ont énoncé que l'augmentation de l'expression de l'EGFR serait un important facteur de pronostic pour les cancers mammaires avec ou

sans envahissement des ganglions lymphatiques. Une association entre l'expression des niveaux du récepteur EGFR et une augmentation dans le grade de malignité a été découverte dans le cas des carcinomes infiltrants des canaux lactifères (Suo *et al.*, 1998) et dans le cas de patientes n'ayant pas de métastase au niveau des ganglions lymphatiques (Harris *et al.*, 1992; Nicholson *et al.*, 1991). De plus, la positivité des cellules tumorales au EGFR est significativement corrélée à une taille supérieure de la tumeur primaire (Tsutsui *et al.*, 2002). Le récepteur EGFR serait également surexprimé dans d'autres cancers de cellules épithéliales, tels celui de la vessie (Berger *et al.*, 1987), de la tête et du cou (Irish et Bernstein, 1993) et il est associé dans ces deux cas à un mauvais pronostic. Une approche thérapeutique considérant l'implication du récepteur EGFR dans l'étiologie du cancer du sein a d'ailleurs vue le jour. L'Iressa est une molécule inhibitrice des résidus tyrosine kinase du récepteur à l'EGF qui a la propriété de bloquer *in vitro* l'activité de la MAPK chez les cellules mammaires MCF-7 résistantes au tamoxifène, un inhibiteur du récepteur à l'œstrogène (Wakeling, Nicholson et Gee, 2001).

Finalement, notre laboratoire a antérieurement démontré que la phosphorylation de ce récepteur était modulée par l'hexachlorobenzène (HCB), un carcinogène épigénétique persistant dans l'environnement. En effet, des concentrations non cytotoxiques de 5, 10 et 20  $\mu\text{M}$  d'HCB sont mitogènes pour les cellules MCF-10A et elles causent une augmentation significative de la phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR, stimulation supprimée par l'ajout de tamoxifène en combinaison avec le traitement (Charbonneau, Lyrette et Côté, 1998).

## **1.6 Relation entre les récepteurs à l'EGF et les récepteurs aux œstrogènes**

Cliniquement, le cancer du sein peut être caractérisé par la présence de récepteur à l'œstrogène et il est généralement pensé que la tumeur progresse d'une forme ER-positif, dépendante aux hormones et sensible à une thérapie anti-œstrogénique, à un phénotype ER-négatif, indépendant aux hormones et insensible aux anti-œstrogènes (Fitzpatrick *et al.*, 1984; Sainsbury *et al.*, 1985). Initialement donc, la majorité des



tumeurs mammaires sont sous le contrôle des œstrogènes, initiant de multiples réponses cellulaires incluant la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (el-Ashry et Lippman, 1994; Dong *et al.*, 1999). La progression subséquente des tumeurs mammaires à un phénotype hormone-indépendant implique la perturbation des mécanismes normaux de contrôle, comme la perte de la régulation des processus cellulaires par l'œstrogène (Wilson et Chrysogelos, 2002). Un des mécanismes par lequel les cellules acquièrent une croissance indépendante aux œstrogènes est par la régulation de récepteurs aux facteurs de croissance, comme le EGFR, ou de leurs substrats (van Agthoven *et al.*, 1992).

Contrairement aux résultats de deux études initiales indiquant seulement une tendance à une relation négative (Fitzpatrick *et al.*, 1984; Peyrat *et al.*, 1984), au moins 30 groupes différents de chercheurs ont reporté une corrélation négative entre les niveaux des récepteurs à l'EGF et ceux des récepteurs à l'œstrogène dans les cancers mammaires et les lignées cellulaires, indépendamment de la méthode de mesure utilisée (Perez *et al.*, 1984; Sainsbury *et al.*, 1985; Wyss *et al.*, 1987; Battaglia *et al.*, 1988; Cappelletti *et al.*, 1988; Delarue *et al.*, 1988; Pkonen *et al.*, 1988; Wrba *et al.*, 1988; Barker *et al.*, 1989; Fekete, Wittliff et Schally, 1989; Foekens *et al.*, 1989; Grimaux *et al.*, 1989; Guérin *et al.*, 1989; Llorens *et al.*, 1989; Toi *et al.*, 1989; Betta *et al.*, 1990; Bolla *et al.*, 1990; Bolufer *et al.*, 1990; Coombes, Barrett-Lee et Luqmani, 1990; Grimaux *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1990; Formento *et al.*, 1991; Hainsworth *et al.*, 1991; Koenders *et al.*, 1991; Nicholson *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 1992; Charpin *et al.*, 1993; Ferrero *et al.*, 2001; Tsutsui *et al.*, 2002). Dotzlaw *et al.*, 1990, ont montré que l'EGF était plus fréquemment détectable dans les biopsies de tumeurs mammaires positives au ER par rapport à des tumeurs négatives à ER. Fait intéressant, il a été établi que le mécanisme principal responsable de la surexpression du EGFR dans les cancers mammaires est le contrôle de la transcription du gène EGFR (Davidson *et al.*, 1987; Haley *et al.*, 1987; Kageyama *et al.*, 1988). Certaines régions du promoteur du gène EGFR sont spécifiquement identifiées dans les cellules ER-positives mais non dans les cellules tumorales ER-négatives (Wilson et Chrysogelos, 2002). De plus, une étude récente de Yarden, Wilson et Chrysogelos (2001), suggère un mécanisme actif de contrôle transcriptionnel réciproque puisque l'expression du EGFR est augmentée lors du retrait d'œstrogènes du milieu de culture et

que la présence à long terme d'œstrogènes est suffisante pour réprimer la transcription du EGFR, tel que reflété par les niveaux d'ARN messager du EGFR et de protéines réceptrices. Inversement, la littérature suggère que le EGFR pourrait exercer ces effets en modulant le récepteur ER (Reddy *et al.*, 1992; Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993), plus précisément en stimulant l'activité transcriptionnelle du domaine AF-1 du ER (Smith, 1998). La présence de voies de signalisation communes et réciproques entre les récepteurs EGFR et ER conduit donc au raisonnement que les interactions entre les facteurs de croissance et les récepteurs stéroïdiens peuvent moduler l'activité hormonale, influençant ainsi la fonction normale et aberrante dans les cellules (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993).

### 1.7 Le récepteur ErbB-2 et son implication dans le cancer

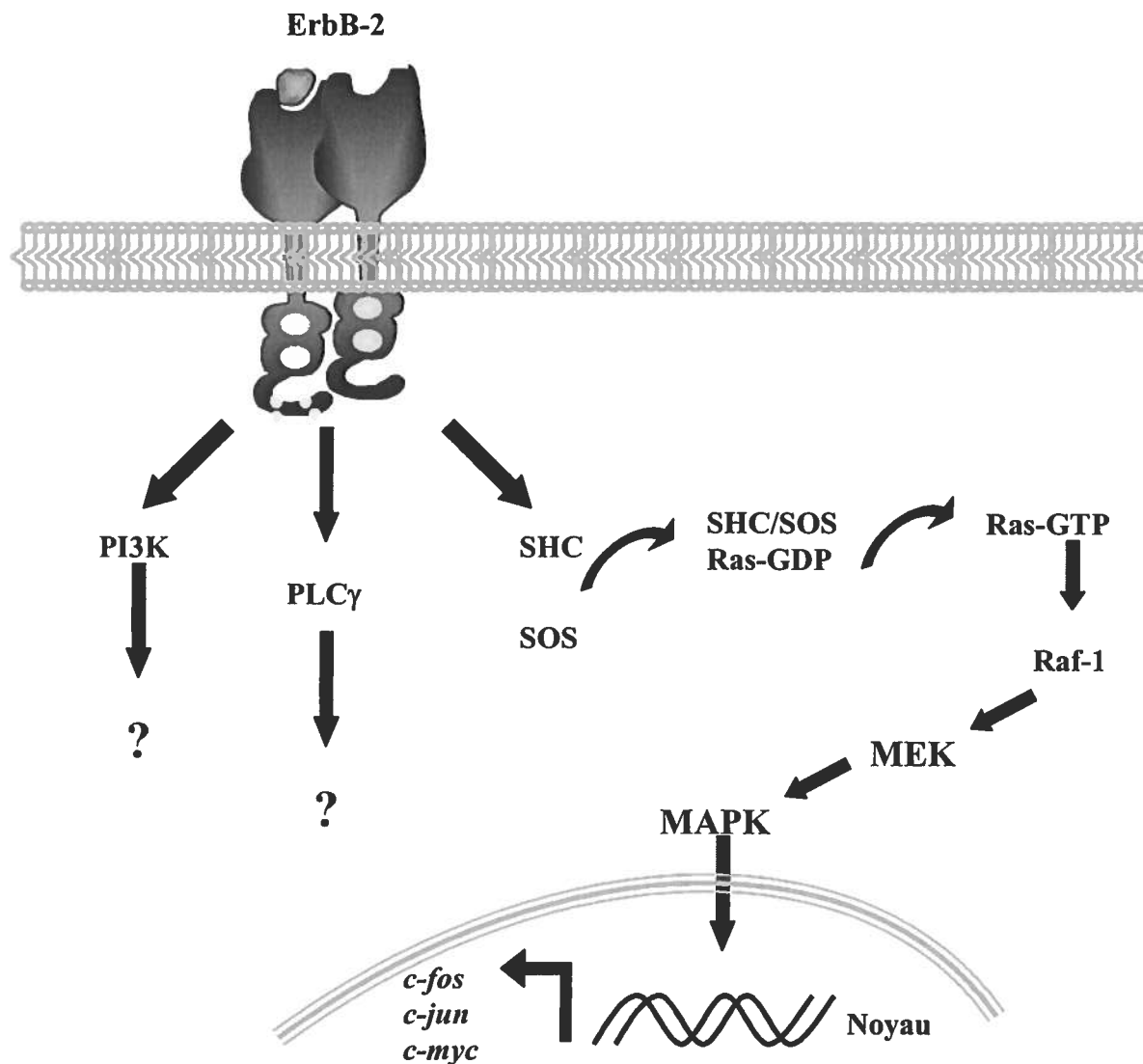
Le récepteur ErbB-2 est exprimé à de faibles niveaux dans les cellules épithéliales normales, particulièrement dans les tissus nerveux, conjonctifs et l'épithélium glandulaire embryonnaire, suggérant un rôle dans la croissance et le développement de plusieurs tissus (Kokai *et al.*, 1987). Certaines protéines (SRC, PI3K et PLC $\gamma$ ) se lient aux tyrosines *via* des régions précises de leur domaine *Src-homology* (SH2) et elles deviennent phosphorylées à leur tour (figure 1.4). La phosphorylation de ces protéines amène une cascade d'éléments potentiellement impliqués dans les voies de signalisation, dont la protéine *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), et elle se poursuit ultimement dans l'activation de facteurs de transcription nucléaires (Koch *et al.*, 1991; Pawson et Gish, 1992; Reese et Slamon, 1997).

La surexpression du proto-oncogène ERBB2 est fréquemment associée à un sombre pronostic de certains adénocarcinomes humains, tel que résumé dans le Tableau 1.1. Son rôle dans la transformation cellulaire, suggéré par son abondance dans une grande variété de tumeurs chez l'humain, est supporté par quelques études qui ont observé que les approches thérapeutiques dirigées envers ce récepteur peuvent empêcher la croissance tumorale (Klapper *et al.*, 2000). La progression dans le processus oncogénique serait expliquée par l'activation aberrante des tyrosines kinases par ErbB-2

(Lonardo *et al.*, 1990; Pierce *et al.*, 1991), conduisant à un signal hypermitogénique intracellulaire essentiel à la transformation des cellules (Klapper *et al.*, 2000). De plus, en stabilisant les hétérodimères formés avec d'autres membres de la famille ErbB, ErbB-2 prolonge et amplifie la traduction du signal cytoplasmique induit par plusieurs facteurs de croissance, ce qui semblerait ainsi conférer un avantage prolifératif aux cellules qui le possèdent et promouvoir la croissance de cellules cancéreuses (Tzahar et Yarden, 1998). Récemment, Eppenberger-Castori *et al.* (2002) ont montré une forte corrélation inverse ( $p < 0,0001$ ) entre les niveaux d'ErbB-2 dans les tumeurs mammaires et l'âge des patientes.

En plus de ses effets mitogéniques, la surexpression de la protéine ErbB-2 est suffisante pour induire la migration et l'invasion cellulaire de MCF-7. Les cellules MCF-7 sont une lignée de cellules épithéliales issues d'un carcinome mammaire humain et qui possèdent un niveau élevé de récepteurs à l'estrogène (Soule *et al.*, 1973). Selon une étude réalisée par Spencer *et al.* (2000), ErbB-2 facilite l'invasion cellulaire *via* l'activation d'une kinase extracellulaire et son couplage subséquent avec des protéines adaptatrices telles que p130Cas et c-CrkII régulant le cytosquelette de myosine et d'actine des cellules en migration.

En raison de tous les facteurs énoncés plus haut, le récepteur ErbB-2 est une cible attrayante pour une thérapie contre le cancer. En effet, différents anticorps dirigés envers la région extracellulaire de cette protéine ont la capacité de diminuer sa présence au niveau de la membrane cellulaire (Hurwitz *et al.*, 1995) et l'on observe une régression de la mitogenèse et une diminution dans la voie de signalisation intracellulaire induite par les facteurs de croissance (Graus-Porta *et al.*, 1995; Karunagaran *et al.*, 1996; Klapper *et al.*, 2000). D'ailleurs, l'Herceptin est le premier agent thérapeutique efficace dirigé vers l'oncogène ERBB2 pour le traitement des tumeurs solides chez les patients qui possèdent une surexpression de cet oncogène (Leyland-Jones, 2002), procurant un avantage au niveau du taux de survie de patientes atteintes du cancer du sein.



**Figure 1.4 : Voies proposées de la transduction de signaux activés par ErbB-2 (Adapté et traduit de Reese et Slamon, 1997).** L'activation du récepteur ErbB-2 induit la phosphorylation de tyrosines spécifiques sur la région carboxy-terminale du récepteur. Les protéines impliquées dans les voies de signalisation *via* des régions précises de leur domaine SH2 se lient aux tyrosines et deviennent phosphorylées. L'activation des voies de signalisation intracellulaires se poursuit dans la transcription de gènes nucléaires.

		Surexpression de ErbB-2	Références
Sein	Carcinome des canaux <i>in situ</i> (DCIS)	Plus de 90 % des DCIS surexpriment ErbB-2.  Surexpression plus fréquente chez les DCIS moins différenciés.	Barnes <i>et al.</i> , 1992 Van de Vijver <i>et al.</i> , 1988  Zafrani <i>et al.</i> , 1994 Mack <i>et al.</i> , 1997
	Carcinome invasif des canaux	31 % manifestent une amplification d'ErbB-2.  Les tumeurs de plus de 1 cm montrent plus souvent une surexpression de ErbB-2.  Les tumeurs de grade plus avancés surexpriment ErbB-2 plus fréquemment que les moins avancés.	Lipponen <i>et al.</i> , 1993 Slamon <i>et al.</i> , 1989  Schimmelpenning <i>et al.</i> , 1992  Tervahauta <i>et al.</i> , 1991
Gynécologique	Ovaires	20-35 % des tumeurs quasi-cancéreuses et 30-60 % des cancers ovariens expriment ErbB-2, alors que le tissu ovarien normal ne l'exprime pas.  Dans certaines études, ErbB-2 a été associé avec un stade plus élevé de la maladie et à un pronostic plus sombre ou une diminution de la réponse à la thérapie.	Eltabbakh <i>et al.</i> , 1997 Harlozinska <i>et al.</i> , 1997 Huettner <i>et al.</i> , 1992  Berchuck <i>et al.</i> , 1990 Harlozinska <i>et al.</i> , 1997 Meden <i>et al.</i> , 1994 Natali <i>et al.</i> , 1990 Slamon <i>et al.</i> , 1989
	Vulve	Surexpression de ErbB-2 est associée avec un risque plus élevé de métastases.	Gordinier <i>et al.</i> , 1997
	Endomètre	Selon certains chercheurs, même si 48 % des tumeurs de l'endomètre surexpriment ErbB-2, il n'y a pas de différence dans le pronostic.  D'autres équipes ont démontré une augmentation du risque de métastases, une diminution du taux de survie et une période de rémission plus courte.	Backe <i>et al.</i> , 1997 Bell <i>et al.</i> , 1997 Gassel <i>et al.</i> , 1998  Berchuck <i>et al.</i> , 1991 Hamel <i>et al.</i> , 1996 Kohlberger <i>et al.</i> , 1996 Lukes <i>et al.</i> , 1994
	Col de l'utérus	12-22 % des cancers des cellules épithéliales du col de l'utérus de stade II ou III ont une amplification de ErbB-2.	Kristensen <i>et al.</i> , 1996 Mittra <i>et al.</i> , 1994 Ndubisi <i>et al.</i> , 1997 Wong <i>et al.</i> , 1996
	Prostate	30 % des cancers de la prostate sont ErbB-2 positifs, alors que l'hypertrophie prostatique bénigne n'exprime pas de récepteurs ErbB-2.	Sadasivan <i>et al.</i> , 1993 Kuhn <i>et al.</i> , 1993

**Tableau 1.1 : Surexpression des récepteurs ErbB-2 dans différents types de carcinomes humains** (Résumé et synthèse d'informations tirées de Klapper *et al.*, 2000)

		<b>Surexpression de ErbB-2</b>	<b>Références</b>
<b>Gastro-intestinal</b>	<b>Côlon</b>	<p>L'antigène ErbB-2 augmente avec les stages de Dukes dans les carcinomes du colon et démontre une corrélation significative avec le temps de rémission et la période de survie post-opératoire.</p> <p>Environ 50 % des carcinomes du colon surexpriment ErbB-2.</p> <p>Les cancers du colon qui forment des métastases au foie ou aux ganglions lymphatiques ont des niveaux d'ErbB-2 plus élevés que ceux qui ne métastasent pas.</p>	<p>Kapitanovic <i>et al.</i>, 1997</p> <p>Caruso et Valentini, 1996</p> <p>Shirai <i>et al.</i>, 1995 Yang <i>et al.</i>, 1997 Saeki <i>et al.</i>, 1995</p>
	<b>Œsophage</b>	43 % des tumeurs oesophagiennes sont positives à ErbB-2.	Duhaylongsod <i>et al.</i> , 1995
	<b>Estomac</b>	La surexpression d'ErB-2 dans le cancer de l'estomac est commune, particulièrement dans les stages avancés et la sous-catégorie intestinale et peut être associée avec un pronostic plus sombre.	Kim <i>et al.</i> , 1993 Ooi <i>et al.</i> , 1998 Wu <i>et al.</i> , 1998 Amadori <i>et al.</i> , 1997 Yonemura <i>et al.</i> , 1998
	<b>Pancréas</b>	La surexpression d'ErB-2 a été reliée à un pronostic plus sombre dans les tumeurs de l'ampoule de Vater.	Vaidya <i>et al.</i> , 1996a, b
<b>Cou et tête</b>		La surexpression d'ErB-2 est associée à une diminution du temps de rémission dans certains adénocarcinomes des sinus para-nasaux, des glandes salivaires palatines et dans les carcinomes mucoépidermoïdes des glandes salivaires.	<p>Gallo <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Giannoni <i>et al.</i>, 1995</p> <p>Press <i>et al.</i>, 1994</p>
<b>Cerveau</b>		ErbB-2 est relié avec le grade histologique des astrocytomes et des méningiomes et il est associé à un temps de survie plus court des patients avec un neuroblastome.	<p>Bernstein <i>et al.</i>, 1993 Schwechheimer <i>et al.</i>, 1994 Layfield <i>et al.</i>, 1995</p>
<b>Reins</b>		La forte expression d'EGFR et d'ErbB-2 combinée est en corrélation avec la présence de métastases.	Stumm <i>et al.</i> , 1996
<b>Vessie</b>		<p>70 % des tumeurs, mais aucun spécimen sain, surexprimaient ErbB-2.</p> <p>La surexpression d'ErbB-2 a été reliée au grade et au taux de survie.</p>	<p>Zhau <i>et al.</i>, 1990</p> <p>Korkolopoulou <i>et al.</i>, 1997 Lipponen <i>et al.</i>, 1991 Zhang <i>et al.</i>, 1997 Lonn <i>et al.</i>, 1993</p>

**Tableau 1.1 (suite)**

## **1.8 Les cascades intracellulaires activées par EGFR et ErbB-2**

La signalisation cellulaire *via* les récepteurs tyrosine kinases ErbB est complexe. ErbB-2 est un substrat pour le récepteur EGFR préalablement activé par l'EGF, chez des cellules mammaires tumorales (King *et al.*, 1988). Une fois le dimère ErbB activé, il peut interagir avec un grand nombre de protéines cytoplasmiques contenant des phosphotyrosines. Celles-ci incluent des protéines effectrices telles que SHC (Pelicci *et al.*, 1992; Segatto *et al.*, 1993), Grb-2 (Buday et Downward, 1993), Src (Anderson *et al.*, 1990; Luttrell *et al.*, 1994; Sheffield, 1998) et la phospholipase C $\gamma$  qui s'associe avec EGFR et ErbB-2 mais pas avec les autres membres de la famille ErbB (Cohen *et al.*, 1996; Peles *et al.*, 1991). Une fois activés, les récepteurs sont régulés par des processus d'internalisation, de recyclage ou de dégradation.

## **1.9 Les polluants environnementaux**

Au Canada, de 25 000 à 30 000 produits chimiques sont fabriqués, produits ou répandus sous forme d'émissions ou de déchets dans l'environnement (Santé Canada, 2002). Néanmoins, peu de données établissent un lien direct entre l'exposition à ces produits chimiques et l'incidence de certains cancers.

Au cours des dernières années, il y a eu une certaine préoccupation que certains contaminants, y compris plusieurs organochlorés, pourraient exercer une action toxique par la modulation hormonale, en particulier en perturbant la fonction endocrinienne. Plusieurs composés non stéroïdiens, naturels ou anthropiques, possèdent une activité œstrogénique. Même si ces xénoœstrogènes exogènes sont moins actifs au niveau biologique que les œstrogènes endogènes, ils demeurent d'intérêt puisqu'ils persistent dans l'environnement, résistent aux dégradations chimiques ou enzymatiques et peuvent contaminer la chaîne alimentaire et s'accumuler dans le tissu adipeux (Korach, 1993). Puisqu'un pourcentage élevé des cancers mammaires est de type "œstrogène dépendant", une hypothèse classique avait suggéré un rôle mécaniste possible pour les cancers du sein

induits par les organochlorés. Cette hypothèse a été supportée par des différences géographiques et socio-économiques dans l'incidence de cancer de sein.

Plusieurs études épidémiologiques de type cas-témoin ont évalué les niveaux de base d'organochlorés chez les patientes atteintes de cancer de sein en comparaison avec ceux observés chez des témoins, examinant ainsi le risque de développer un cancer du sein en relation avec les organochlorés. On a observé des résultats mitigés : dans une méta-analyse récente réalisée à l'Université Harvard aux États-Unis, en mai 2001, des données de cinq grandes études sur le cancer du sein ont été combinées et aucun lien avec les xénoœstrogènes *p,p'*-DDE et BPC n'a été établi. L'analyse des données combinées a conclu que ni l'une ni l'autre de ces expositions n'expliquait l'incidence élevée du cancer de sein aux États-Unis (Laden *et al.*, 2001). Ces résultats sont cohérents avec certaines autres études qui avaient observé que les cas de cancer avaient de niveaux similaires ou plus faibles de DDE (Krieger *et al.*, 1994; Hunter *et al.*, 1997; Lopez-Carrillo *et al.*, 1997; Schecter *et al.*, 1997; Dorgan *et al.*, 1999; Helzlsouer *et al.*, 1999; Demers *et al.*, 2000; Stellman *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000), de  $\beta$ -HCH (Zheng *et al.*, 1999a; Dorgan *et al.*, 1999) et d'HCB (Zheng *et al.*, 1999b) lorsque comparés avec les témoins. Cependant, une variation importante dans la méthodologie de ces études existe. Certaines utilisent les valeurs des niveaux sériques des organochlorés, alors que d'autres utilisent celles des niveaux retrouvés dans le tissu adipeux, qui tend à concentrer de 100 à 350 fois davantage ces produits fortement liposolubles (Ahlborg *et al.*, 1995). Le point le plus important est toutefois que ces études ne tiennent généralement pas compte de la pharmacocinétique des différents composés et de la période de latence extrêmement longue qui subsiste entre l'exposition initiale et le développement de la maladie, soit de quinze à trente ans pour le cancer du sein.

D'autres études épidémiologiques de type cas-témoin ont néanmoins démontré qu'en comparaison avec des témoins, les femmes avec un cancer mammaire possédaient des niveaux sériques ou lipidiques plus élevés de certains composés chlorés persistants dans l'environnement, dont le  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH), les BPC totaux ou certains congénères, le 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthylène (*p,p'*-DDE), l'HCB



et la dieldrine (Mussalo-Rauhamaa *et al.*, 1990; Falck *et al.*, 1992; Wolff *et al.*, 1993; Krieger *et al.*, 1994; Dewailly *et al.*, 1996; Güttes *et al.*, 1998; Hoyer *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1998; Demers *et al.*, 2002).

### 1.9.1 Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD)

Le DDT est un insecticide qui a été introduit dans les années 40 et qui s'est accumulé dans les tissus humains *via* la consommation de nourriture contaminée, particulièrement les poissons, les viandes et les produits laitiers. Le DDT, composé d'un mélange de *p,p'*-DDT (85 %) et d'*o,p'*-DDT (15 %) et leurs métabolites sont séquestrés dans le tissu adipeux avec de très longues demi-vies (Falck *et al.*, 1992; Wolff *et al.*, 1993). Le principal métabolite du DDT, le *p,p'*-DDT, aurait une très faible capacité de liaison au récepteur à l'œstrogène et serait plutôt anti-androgénique (Kelce *et al.*, 1995, Ahlborg *et al.*, 1995). Le *p,p'*-DDT semblerait également être en mesure d'augmenter le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur ErbB-2 et de la protéine MAPK et ce, à une concentration de 10 nM (Shen et Novak, 1997). L'*o,p'*-DDT et ses métabolites (*o,p'*-DDE et *o,p'*-DDD) ont été historiquement identifiés comme xénoœstrogènes puisqu'ils possèdent une habilité de se lier au récepteur à l'œstrogène ou du moins, d'activer la transcription des gènes de réponse à l'ER (Kelce *et al.*, 1995). Récemment, Enan et Matsumura, 1998, ont démontré que l'effet de l'*o,p'*-DDT serait médié spécifiquement par ErbB-2 et non par le ER ou même le EGFR.

Des études antérieures ont démontré que le TCDD pouvait mimer une stimulation à un facteur de croissance et la croissance cellulaire chez la lignée cellulaire MCF-10A en modulant la phosphorylation de tyrosines kinases (Tannheimer *et al.*, 1998). De plus, le TCDD semble stimuler de façon autocrine les MCF-10A, résultant en une augmentation de la prolifération cellulaire causée par une diminution de l'apoptose, élévation dépendante et spécifique du récepteur à l'EGF puisque supprimée en présence de son inhibiteur spécifique, l'AG1478 (Davis *et al.*, 2001). Il est donc possible qu'en stimulant

excessivement la voie du EGFR et en altérant des kinases impliquées dans l'apoptose que le TCDD soit capable de réguler l'apoptose de cellules MCF-10A (Davis *et al.*, 2001).

### 1.9.2 Hexachlorobenzène (HCB)

Ce produit est dérivé de la synthèse de pesticides et il a été largement distribué dans l'environnement suite à son utilisation comme fongicide dans les années 70. Tout comme le  $\beta$ -HCH, l'HCB s'accumule dans les graisses des organismes vivants et il contamine le lait maternel. Il exerce ses effets sans provoquer de mutations dans le génome cellulaire.

Par l'utilisation des cellules MCF-10A, nous avons récemment observé que le HCB est mitogène et qu'il module une voie de signalisation principale de transduction impliquée dans le processus de prolifération cellulaire. Ainsi, notre laboratoire a montré qu'une concentration de 20  $\mu$ M d'HCB génère une augmentation au niveau de la phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR, un récepteur impliqué dans le processus de mitose. Deux autres concentrations plus faibles d'HCB testées, c'est-à-dire 5 et 10  $\mu$ M, ont également causé une augmentation dans la phosphorylation du récepteur EGFR. D'autres échantillons ont été immunoprécipités avant les analyses d'immunobuvardage pour la phosphorylation de la tyrosine. Les doses croissantes d'EGF causent une augmentation dose-dépendante de phosphorylation du récepteur après 10 minutes de traitement. Nos observations avec l'HCB et les cellules mammaires humaines démontrent que les produits chimiques environnementaux peuvent exercer des actions biologiques en tant que xénoœstrogène, tout comme proposé par l'hypothèse classique sur le cancer du sein potentiellement induit par les contaminants (Davis *et al.*, 1993). L'hypothèse principale a été considérée lors de la mise sur pieds du présent travail de recherche.

### 1.9.3 Hexachlorocyclohexane (HCH)

Le lindane ( $\gamma$ -HCH) est l'un des plus anciens pesticides synthétiques organochlorés employés dans les années 50 et 60 contre les insectes phytophages en agriculture. Il a été utilisé pour le contrôle de la Malaria dans les pays sous-développés et est encore en usage dans certains pays tropicaux comme l'Inde. Chez le rat, plusieurs études suggèrent qu'une exposition chronique à de faibles doses de lindane cause des effets comportemental, neurochimique et électrophysique impliquant les mécanismes GABA énergiques (Anand *et al.*, 1998; Sahoo *et al.*, 1999). Également, il altère les fonctions reproductrices mâles (Gautam *et al.*, 1989; Prasad *et al.*, 1995; Walsh et Stocco, 2000). Puisque Santé Canada et Environnement Canada évaluent les effets d'une substance chimique toxique et impose des règlements pour protéger la santé humaine et l'environnement, le  $\beta$ -HCH fait partie de la liste des substances prioritaires au Canada et son utilisation a été interdite en 1978.

Le lindane est un mélange d'isomères, incluant le  $\beta$ -HCH qui est la forme résistante au métabolisme. Celui-ci s'accumule dans les graisses et se retrouve dans les tissus humains *via* essentiellement la consommation de nourriture contaminée. Dans une étude, le  $\beta$ -HCH a été retrouvé à une concentration de 522  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dans le lait maternel (Basri Ustunbas *et al.*, 1994). Les autres isomères du lindane ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) sont rapidement bio transformés et excrétés et ils ne sont que rarement retrouvés dans le sérum et le tissu adipeux de la population américaine (Zheng *et al.*, 1999a).

Le  $\beta$ -HCH, qui possède une faible activité œstrogénique, augmente la quantité de récepteurs à la progestérone dans les cellules MCF-7 exposées (Coosen et Van Velsen, 1989). Il stimulerait la prolifération des cellules MCF-7 d'une façon dose-dépendante en activant un ligand intracellulaire du récepteur à l'œstrogène (Steinmetz *et al.*, 1996). Toutefois, bien que le  $\beta$ -HCH (10  $\mu\text{M}$ ) cause une redistribution des récepteurs ER de façon similaire à E2, il ne semble pas posséder une affinité de liaison au récepteur à l'œstrogène ou compétitionner avec E2 pour la liaison au récepteur (Coosen et Van Velsen, 1989; Steinmetz *et al.*, 1996). Fait intéressant, des études récentes ont démontré que le

récepteur ErbB-2 serait potentiellement activé par le  $\beta$ -HCH chez les MCF-7 (Enan et Matsumura, 1998; Hatakeyama et Matsumura, 1999). De plus, selon la plus récente de ces études, le  $\beta$ -HCH stimulerait de façon significative la formation de foyers au niveau des cellules et cet effet a été prévenu par une co-incubation du  $\beta$ -HCH avec un anticorps monoclonal dirigé contre ErbB-2.

Des concentrations plus élevées (Mussalo-Rauhamaa *et al.*, 1990), ou plus faibles de  $\beta$ -HCH ont été détectées dans les tissus de femmes atteintes du cancer du sein par rapport à des témoins (Güttes *et al.*, 1998). Dans l'étude de Mussalo-Rauhamaa *et al.* (1990), sur la base des données ajustées en fonction de l'âge et de la parité, le  $\beta$ -HCH demeure un facteur de risque significatif pour le cancer du sein lorsque retrouvé en concentration supérieure à 0,1 mg/kg de tissu adipeux mammaire. Dans une autre étude, le seuil significatif n'a pas été atteint même si le risque de développer un cancer mammaire semblait légèrement plus élevé lorsque les concentrations sériques de  $\beta$ -HCH sont accrues (Hoyer *et al.*, 1998). Ces observations n'ont cependant pas été supportées par d'autres études (Zheng *et al.*, 1999a).

#### 1.9.4 Mécanisme de toxicité

Tout comme les hormones, les dioxines chlorées pénètrent à travers les membranes lipidiques des cellules de plusieurs tissus pour se lier à leurs protéines cytoplasmiques réceptrices. Suite à la liaison et à l'activation du récepteur Ah, certaines protéines cellulaires sont synthétisées, notamment l'isoenzyme CYP1A1 du cytochrome P450 dans le foie, perturbant ainsi de multiples voies endocriniennes endogènes et exogènes (Ahlborg *et al.*, 1995).

D'autres agents chimiques peuvent également altérer l'ADN des cellules menant à la formation de mutations, mais cet effet ne sera pas discuté dans le présent mémoire. Nous nous concentrerons plutôt sur les effets sur la mitogenèse des polluants en question puisque toute lésion caractérisée par une augmentation anormale du nombre des mitoses

et une altération de la différenciation cellulaire constitue un terrain favorable pour le développement d'un néoplasme bénin ou malin.

### **1.10 Hypothèse et objectifs de recherche**

Selon la littérature et les études épidémiologiques, le rôle des organochlorés persistants dans l'environnement dans l'augmentation du taux d'incidence de cancer du sein en Amérique du Nord est controversé. Notre hypothèse est que le  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH), un pesticide environnemental persistant, pourrait être impliqué dans le processus de développement de tumeurs mammaires en modulant la mitogenèse de cellules épithéliales non initiées. Le principal objectif de ces travaux de recherche est de caractériser l'effet de concentrations non cytotoxiques du  $\beta$ -HCH envers les cellules épithéliales mammaires en culture. La lignée cellulaire non tumorigène MCF-10A a été choisie comme modèle *in vitro* pour répondre à cet objectif. Les objectifs spécifiques sont :

- i) d'étudier l'effet du  $\beta$ -HCH sur la prolifération de cellules MCF-10A, tel que mesuré par l'incorporation de BrdU ;
- ii) d'étudier l'effet du  $\beta$ -HCH sur l'expression des protéines réceptrices transmembranaires (EGFR, ErbB-2), tel que mesuré par immunobuvardage et densitométrie ;
- iii) d'étudier l'effet du  $\beta$ -HCH sur l'activité des récepteurs EGFR et ErbB-2, tel que mesuré par immunobuvardage et densitométrie ;
- iv) d'étudier l'effet du  $\beta$ -HCH sur la voie de signalisation (MEK) activée par EGFR et ErbB-2, tel que mesuré par immunobuvardage et densitométrie.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériel

##### 2.1.1 Culture cellulaire

Le milieu de culture DMEM-F12, l'insuline, l'hydrocortisone (>97 %) et transformés (>97 %) servant à la culture cellulaire proviennent de chez Supelco/Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Le sérum de cheval et la toxine de choléra proviennent de chez Gibco Life Technologies (Burlington, ON). Le mélange antibiotique pénicilline et streptomycine, ainsi que le dissociant cellulaire à base de trypsine et d'EDTA ont été obtenus de Bio Média (Drummondville, QC).

##### 2.1.2 Produits toxiques, réactifs et nécessaire pour l'immunobuvardage

Le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'*o,p'*-DDE, le *p,p'*-DDE, le  $\beta$ -HCH, le réactif de Bradford, le thimerosal, le TRIZMA<sup>®</sup> base, le TRIZMA<sup>®</sup> hydrochloride, le 4-(2-Hydroxyéthyl)piperazine-1-acide éthanosulfonique (HEPES), le NaCl, le glycérol, le 1,2-Bis(diméthylamino)éthane (TEMED), l'aprotinine, l'inhibiteur de trypsine, le dithiothreitol, l'albumine bovine, proviennent tous de Supelco-Sigma (St-Louis, MO). L'HCB, l'atrazine et la dieldrine proviennent tous de Supelco/Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Le dodécylsulfate de sodium (SDS) a été obtenu de chez Gibco Life technologies (Burlington, Ontario) et la glycine, le Tween 20, l'EDTA et l'éthanol de chez Fisher (Montréal, QC). Le substrat luminescent pour l'immunobuvardage provient de Roche Molecular Biochemicals (Laval, QC), l'inhibiteur spécifique des tyrosines kinases AG-825 de BIOMOL Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA), les poids

moléculaires SDS-PAGE pré-colorés de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California) et la membrane Hybond<sup>TM</sup>-P sont de la compagnie Amersham Pharmacia Biotechnologies (Baie D'Urfé, QC). Les pellicules de films X-Omat AR, les solutions de révélateur et de fixateur provenaient de Kodak (Montréal, QC).

### 2.1.3 Anticorps utilisés

De la compagnie Upstate biotechnology (Lake Placid, NK) les premiers anticorps suivants ont été obtenus : l'anticorps IgG<sub>1</sub>, clone LA, monoclonal de souris anti-EGFR (neutralisant); l'anticorps monoclonal IgG1<sub>κ</sub> de souris anti-phospho-EGFR (Y1173); l'anticorps IgG lapin purifié anti-phospho-Erb B2/HER-2 (Y1248); l'anticorps de souris anti-MEK1-NT (MAPKK-NT); l'anticorps IgG polyclonal de lapin et l'anticorps monoclonal IgG<sub>2bκ</sub> de souris anti-phosphotyrosine, clone 4G10. L'anticorps monoclonal IgG<sub>1</sub> anti-ER de souris provient de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). L'anticorps anti-phosphotyrosine PY20 a été acheté chez Transduction Laboratories (Lexington, KY). Finalement, l'anticorps monoclonal de souris anti-actine servant à la quantification des bandes et les seconds anticorps couplés à une peroxydase anti-souris IgG et anti-lapin Ig proviennent tous les deux de Supelco/Sigma-Aldrich (St-Louis, MO).

## 2.2 Culture cellulaire

La lignée MCF-10A est maintenue en culture à 37°C sous une pression atmosphérique contrôlée contenant 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules sont maintenues dans le milieu de culture DMEM-F12 sans rouge de phénol, additionné de 5 % de sérum de cheval (HS), 10 mg/ml d'insuline, 500 ng/ml d'hydrocortisone, 100 ng/ml de toxine de choléra, 20 ng/ml d'EGF, 0,1 % d'albumine bovine sérique (BSA) et 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 96 puits (analyses de prolifération cellulaire) ou dans des boîtes de Pétri de 10 centimètres à une densité de 5 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cultures sont repiquées au moins deux fois par semaine, lors de

l'atteinte de 80 % de confluence. Elles sont prélevées à l'aide d'un mélange de 0,25 % de trypsine et 1 mM d'EDTA, comptées puisensemencées à nouveau.

### 2.3 Traitement des cellules

Le  $\beta$ -HCH et les autres toxiques parfois utilisés pour fins de comparaison ont été dissous dans le solvant (DMSO 0,1 %) à une concentration finale de 10  $\mu$ M en chauffant la solution à 55°C et en la soumettant à un traitement de quelques secondes aux ultrasons. Des solutions concentrées des différents traitements ont été ajoutées dans le milieu de culture des pétris à des temps d'exposition variant entre 10 minutes et 16 heures. Des cellules non traitées (milieu de culture seulement) et des cellules traitées au véhicule (DMSO 0,1 %) ont servi de témoins. Le potentiel toxique de du  $\beta$ -HCH et de l'HCB a été mesuré antérieurement par le test de formation de colonies dans le laboratoire du Dr Charbonneau. Chez les cellules MCF-10A exposées durant 24 heures à des concentrations variant de 1  $\mu$ M à 1000  $\mu$ M, le seuil de cytotoxicité, correspondant à la plus petite concentration générant une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du taux de formation de colonies, a été évalué à 100  $\mu$ M pour le  $\beta$ -HCH et l'HCB (Lyrette, 1998 : 38). Également, le laboratoire du Dr Charbonneau avait noté qu'une concentration de 10  $\mu$ M de HCB chez les cellules MCF-10A causait un degré de phosphorylation optimal lorsque comparé à des concentrations de 5 et 20  $\mu$ M (Lyrette, 1998 : 48). Puisque nous étions intéressés à comparer les effets biologiques du  $\beta$ -HCH avec ceux obtenus avec l'HCB, une concentration finale de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH, nettement inférieure au seuil de cytotoxicité, a été retenue. De plus, cette concentration correspond à celle de utilisée par Steinmetz *et al.* (1996) et qui engendrait une réponse maximale quant'à l'augmentation du nombre de cellules MCF-7. Rappelons que le but n'était pas de reproduire les concentrations plasmatiques retrouvées dans l'organisme humain.



## **2.4 Récolte des cellules**

À la fin des expositions, le milieu de culture recouvrant les cellules est aspiré et le pétri est rincé rapidement avec 10 ml de PBS froid (4°C). Puis, un volume de 200 µl de tampon de lyse HNMETG (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 10 % glycérol, 1 mM sodium orthovanadate, pH 10 et 10 µg/ml d'aprotinine) par pétri est alors ajouté à la surface du pétri pour lyser les cellules. Les cellules et le tampon de lyse sont alors récoltés par grattage de la surface du pétri, transférés dans un microtube de type "Eppendoff" de 1,5 ml refroidi sur glace. L'échantillon est ensuite passé successivement 30 secondes aux ultrasons et quelques secondes supplémentaires au Vortex, ces deux dernières étapes répétées une seconde fois. Après une centrifugation à 3 000 RPM durant 10 minutes en chambre froide (4°C), le surnageant comportant les protéines membranaires solubles est recueilli et la fraction soluble est aliquotée et congelée à -80 °C en attente d'une éventuelle analyse par immunobuvardage.

## **2.5 Dosage des protéines**

La concentration des protéines est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). L'absorbance de l'échantillon est lue à 595 nm par le spectrophotomètre automatisé EL X 800 (Bio-Tek Instruments Inc.) et la valeur obtenue est comparée à une droite étalon élaborée à l'aide d'échantillons d'albumine de boeuf dont la concentration protéique est connue.

## **2.6 Prolifération**

La prolifération cellulaire a été reconnue comme étant un aspect mécanique important des carcinogènes épigénétiques (Ames et Gold, 1990; Tomatis, 1993). Pendant la prolifération cellulaire, l'ADN doit être répliqué avant que la cellule puisse se diviser

en deux cellules filles. Cette proche association entre la synthèse de l'ADN et la division cellulaire fait de ce paramètre un choix idéal pour la mesure de la prolifération cellulaire. Ainsi, la prolifération des MCF-10A est évaluée en mesurant l'intensité de l'incorporation de BrdU dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en réplication. Le nombre de cellules marquées est évalué par une méthode ELISA réalisée directement dans les plaques de 96 puits où s'est fait la culture des cellules. Cette méthode est une alternative non radioactive à l'incorporation de thymidine tritiée et elle possède néanmoins une sensibilité comparable (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). La méthode de vérification du potentiel mitogène d'une substance est décrite ci-dessous.

Environ 2800 cellules dans un milieu de DMEM-F12 supplémenté sont ensemencées par puits dans une microplaque totalisant 96 puits. Une période de 24 heures permet aux cellules d'adhérer au plat de pétri puis le milieu de culture est alors remplacé par du milieu contenant le contaminant et conservé pour les 16 à 44 prochaines heures, selon le temps de doublage des cellules. La solution de BrdU est alors ajoutée au milieu pour 4 heures supplémentaires, intervalle de traitement sélectionné suite à l'étude du cycle cellulaire des MCF-10A par cytométrie en flux, visant à établir le moment et la durée de la phase S. Cette méthode, qui utilise l'iodure de propidium, a démontré que des cellules MCF-10A sont en phase S de leur cycle à cet intervalle suite à un arrêt de la division cellulaire durant 24 heures avec un milieu sans EGF et 0,1 % HS suivi d'un redémarrage subséquent de la division cellulaire avec ajout dans le milieu normal de 20 ng/ml d'EGF et 0,5 % HS. Par la suite, les cellules sont fixées et la mesure de la quantité de BrdU incorporée est effectuée par ELISA utilisant un anticorps anti-BrdU. Un facteur de correction, correspondant à l'addition des valeurs moyennes de densité optique de puits sans cellule et sans BrdU, de puits avec cellules seulement et de puits sans cellule mais avec BrdU a été soustrait aux valeurs obtenues.

## **2.7 Analyse de la modulation des récepteurs membranaires ou de MEK par immunobuvardage**

La division des cellules épithéliales mammaires est sous le contrôle de certains récepteurs membranaires, dont le récepteur EGFR. L'augmentation de la prolifération cellulaire et l'altération du développement de la glande mammaire jouent un rôle important dans le développement du cancer du sein (Golden *et al.*, 1998). L'altération de la phosphorylation des récepteurs tyrosines kinases, dont le récepteur EGFR, est au sommet du processus mitogène, relayé par la cascade des MAP kinases. Pour cette raison, le niveau de phosphorylation des récepteurs EGFR a été vérifié par immunobuvardage.

Cette technique combine la résolution de l'électrophorèse et la spécificité de la détection immunologique. Elle permet de déterminer certaines caractéristiques des protéines antigéniques, soit la présence et la quantité d'un antigène et le poids moléculaire relatif de la molécule. De plus, la séparation de protéines sur gel d'électrophorèse se produit dans des conditions de dénaturation. Par conséquent, les problèmes de solubilisation, d'agrégation et de co-précipitation sont éliminés. Cette technique est très sensible pour mettre en évidence des protéines précises *via* des anticorps spécifiques.

Des quantités définies (40-100 µg) de protéines provenant de lysats cellulaires entiers sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide avec SDS dont la concentration varie entre 6.5 % et 12 % de polyacrylamide [selon le poids moléculaire (P.M.) de la protéine recherchée]. Après la migration d'environ 16 heures à 80 Volts, les protéines sont transférées durant 70 minutes à 900 mA sur membrane Imobilon-P (PVDF) immergées en milieu liquide-liquide dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % de SDS, pH 8.3) contenant 10 (hauts P.M.) ou 20 % (petits P.M.) de méthanol. Après le transfert, les bandes protéiques sont visualisées par rouge Ponceau avant de bloquer les sites non spécifiques de la membrane par trempage durant une heure à température ambiante dans une solution de blocage (PBS 1X, 0.05 % Tween 20, 3 % BSA).

La membrane est ensuite hybridée avec le premier anticorps dilué dans le tampon de blocage durant une heure à température ambiante. La membrane est alors lavée à deux reprises avec de l'eau et incubée avec le deuxième anticorps couplé à une peroxydase, également dilué dans le tampon de blocage, durant une période de 90 minutes à température ambiante avec agitation lente. La membrane est alors de nouveau lavée à l'eau à deux reprises, suivi d'un autre lavage d'une durée de 15 minutes avec du tampon PBS-Tween 20 (0.05 %). La membrane est ensuite lavée à plusieurs reprises avec de l'eau. La détection des protéines reconnues de façon spécifique par les anticorps est réalisée en utilisant une trousse de chemiluminescence. La membrane est incubée en présence de substrat chromogène de la peroxydase durant 10 minutes à l'obscurité. Par la suite, la membrane est égouttée, insérée dans une pellicule de plastique puis exposée à un film sensible aux rayons X pour une durée variant entre une seconde et une heure. Le film est par la suite développé dans une solution de révélateur puis de fixateur. La membrane est par la suite rincée à l'eau Milli-Q, séchée et déposée au congélateur (-20°C) pour d'éventuelles ré-hybridations.

## **2.8 Utilisation d'un bloqueur spécifique**

Le récepteur ErbB-2 est une protéine transmembranaire qui possède une activité tyrosine kinase intrinsèque, tout comme le récepteur à l'EGF. Puisque les deux récepteurs ont une forte homologie, il est apparu essentiel d'utiliser un bloqueur pour démontrer que l'activation du récepteur ErbB-2 était spécifique au traitement. Les tyrphostines sont des inhibiteurs spécifiques des tyrosines kinases ayant des propriétés antiprolifératives (Osherov *et al.*, 1993). L'une de ces molécules, l'AG-825, possède une chaîne latérale de benzothiazole, pénètre rapidement les cellules et bloque l'autophosphorylation du récepteur ErbB-2 ( $IC_{50} = 0,35 \pm 0,07 \mu M$ ) 60 fois plus efficacement que le récepteur EGFR ( $IC_{50} = 19 \pm 4 \mu M$ ) *in vitro* (Osherov *et al.*, 1993; Levitzki et Gazit, 1995). Des analyses cinétiques *in vitro* de l'action de l'AG-825 ont révélé que cette molécule compétitionne avec les sites de liaisons à l'ATP sans altérer par elle-même les niveaux intracellulaires d'ATP (Osherov *et al.*, 1993). Dans le but d'inhiber exclusivement le

récepteur erbB-2, une concentration de 3 à 4  $\mu\text{M}$  d'AG-825 a été employée, soit légèrement inférieure à la dose de 10  $\mu\text{M}$  utilisée par une équipe de recherche pour inhiber spécifiquement ErbB-2 chez des cellules MCF-10A (Davis *et al.*, 2001)

## **2.9 Quantification par densitométrie**

La quantité de récepteurs protéiques et les niveaux de phosphorylation ont été mesurés par densitométrie à l'aide d'un densitomètre Fluor-S MAX MultiImager de Bio-Rad et du logiciel d'analyse d'image Multi-Analyst<sup>®</sup>/PC, version 1.1. Une normalisation des bandes des protéines sélectionnées par rapport à la quantité d'une protéine du cytosquelette cellulaire, révélée par un anticorps spécifique anti-actine (monoclonal de souris, Sigma, Saint-Louis, MO), a été utilisée.

## **2.10 Statistiques**

La moyenne et l'erreur-type sur la moyenne ont été calculés pour chaque groupe. La comparaison des moyennes des groupes exposés au  $\beta\text{-HCH}$  vis-à-vis celle des témoins véhicule (DMSO 0,1 %) a été réalisée par un test de t de Student pour petits échantillons indépendants, précédé par un test de F de comparaison de variance pour vérifier l'équivalence des données. Une probabilité inférieure à 0,05 est jugée statistiquement significative.

## CHAPITRE 3

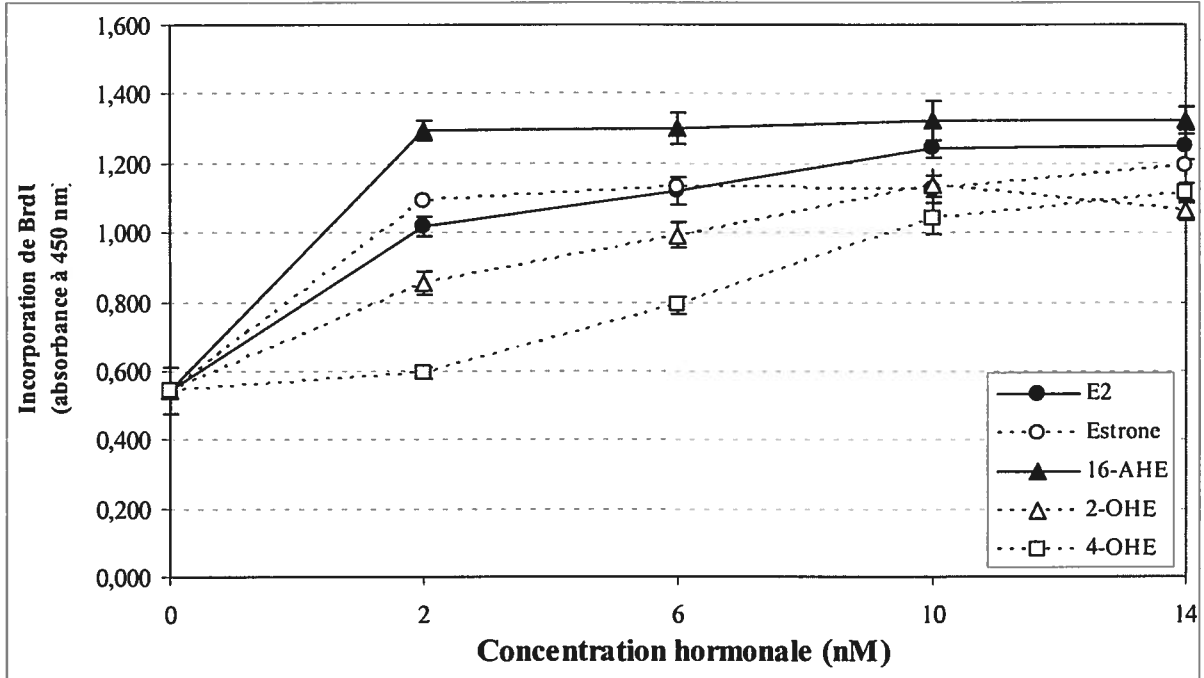
### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

#### 3.1 Mitogenèse

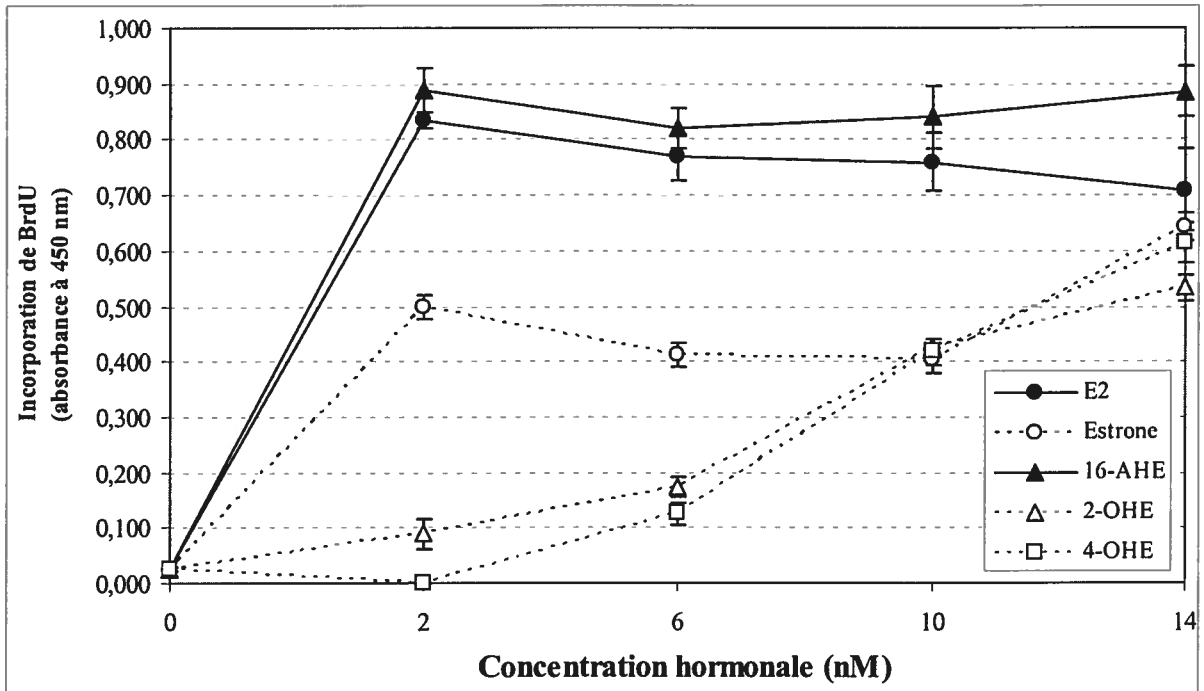
##### 3.1.1 Optimisation des traitements en fonction du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose de différentes étapes successives où l'induction de la phase de multiplication est caractérisée par le point  $G_2/M$ . La durée du cycle cellulaire est variable d'un type cellulaire à l'autre et à l'intérieur d'une même lignée cellulaire. La fenêtre de traitement idéale, c'est-à-dire le moment du début d'un traitement à la suite d'un passage ainsi que la durée de celui-ci, est celle risquant le plus de produire une réponse proliférative de la part des cellules. Dans le but de la déterminer, plusieurs moments de début de traitement suite à un passage ont été effectués préalablement par cytométrie en flux sur des populations cellulaires synchronisées et corrélées avec les phases du cycle cellulaire. Dans cette série d'expériences, le synchronisme des cellules par privation en EGF était important car il permettait de mieux visualiser l'effet mitogène en permettant à toute la population de réagir simultanément à l'effet d'une stimulation à l'EGF et d'entrer ensemble dans le cycle de la phase d'arrêt  $G_1$  à la phase S puis  $G_2/M$ . Après avoir déterminé que la quantité de cellules MCF-10A, temps de doublage de 48 heures, en phase  $G_2/M$  était plus importante 24 heures après un passage, une optimisation de la durée de traitement a été réalisée par BrdU.

Cette dernière méthode, qui utilise l'iodure de propidium, a démontré antérieurement dans le laboratoire du Dr Charbonneau que des concentrations de 2 à 14 nM de  $17\beta$ -œstradiol (E2) ou de l'un de ses métabolites, le 16- $\alpha$ hydroxyestrone (16-AHE), possédaient tous deux un fort potentiel à induire la prolifération des cellules MCF-10A, qu'elles aient une division rapide (temps de doublage de 24 heures, figure 3.1a) ou



a. Cellules MCF-10A à division rapide (temps de doubleage de 24 heures)



b. Cellules MCF-10A à division lente (temps de doubleage de 85 heures)

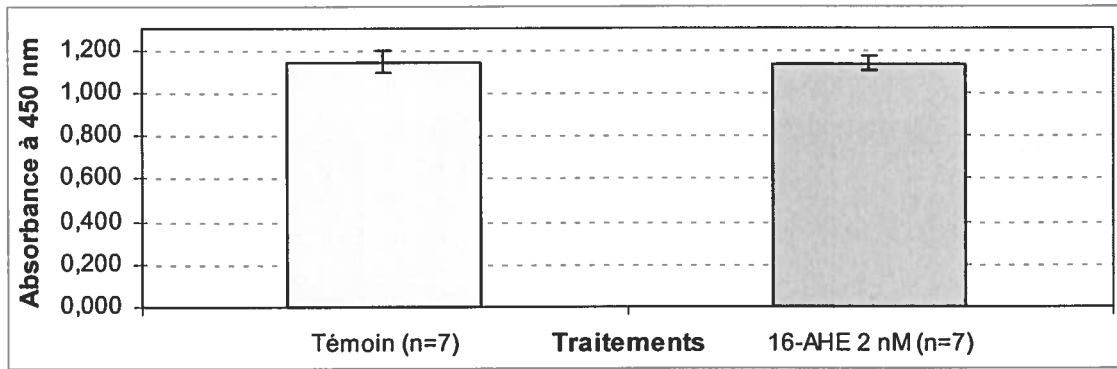
Figure 3.1 : Effet du  $17\beta$ -œstradiol (E2) et ses métabolites sur le niveau de prolifération de cellules MCF-10A, tel que quantifié par l'incorporation de BrdU. Chaque point des graphiques représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 7 puits dans le cas des traitements ou 16 puits dans le cas des témoins milieu normal (0 nM).

lente (temps de doublement de 85 heures, figure 3.1b). Les autres métabolites de l'E2 (l'estrone, le 2-O-hydroxyestrone et le 4-O-hydroxyestrone) semblaient également stimuler la division cellulaire mais à des concentrations hormonales supérieures. À la suite de ces résultats, l'E2 et le 16-AHE ont été sélectionnés comme témoins positifs de la prolifération cellulaire et utilisés à une concentration de 2 nM ou de 20 nM si le temps de traitement était supérieur à 24 heures.

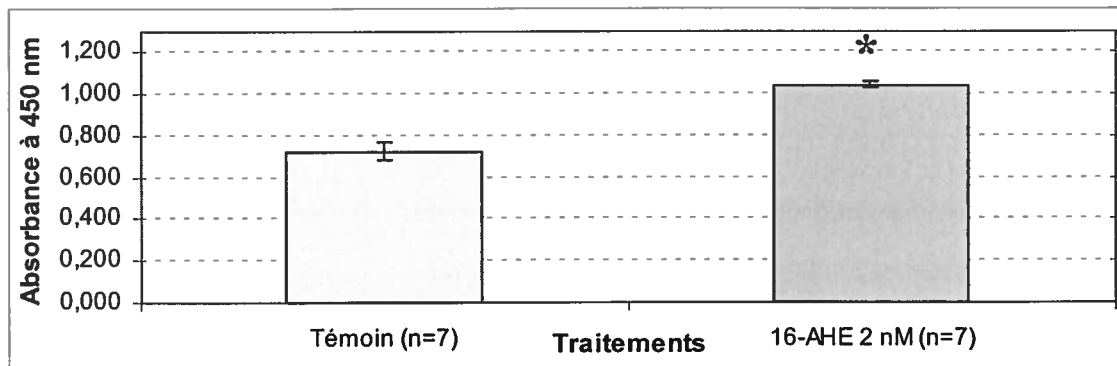
Les cellules MCF-10A semblent avoir une intensité de réponse à un signal mitogène (2 nM de 16-AHE) qui est dépendante du temps de doublement. En effet, les cellules avec un temps de doublement de 24 heures ont une plus grande réponse à un signal mitogène (2 nM de 16-AHE) par rapport au témoin (milieu normal) après 24 heures de traitement (figure 3.2c), tel que montré par la valeur de l'absorbance nette à 450 nm. Les durées de traitements plus courtes de 14 et 16 heures (figure 3.2a et b) produisaient une réponse moindre lorsque comparées au témoin. Les cellules ayant un temps de doublement de 37 heures semblent mieux réagir à une stimulation de 2 nM de 16-AHE lorsque celui-ci est en contact avec les cellules durant une durée beaucoup plus longue, soit 48 heures (figure 3.3b), par rapport à un traitement plus court de 16 heures (figure 3.3a).

Suite à ces différentes optimisations des fenêtres de traitement, lors des études de potentiel mitogène, les cellules MCF-10A sont mises en culture durant 24 heures après un passage pour leur permettre d'atteindre une confluence adéquate et d'être potentiellement en phase G<sub>2</sub>/M. Par la suite, elles sont mises en contact avec le mitogène (E2 ou 16-AHE), du milieu de culture normal, le véhicule DMSO 0,1 % ou le  $\beta$ -HCH durant un temps de traitement sensiblement égal au temps de doublement des cellules.

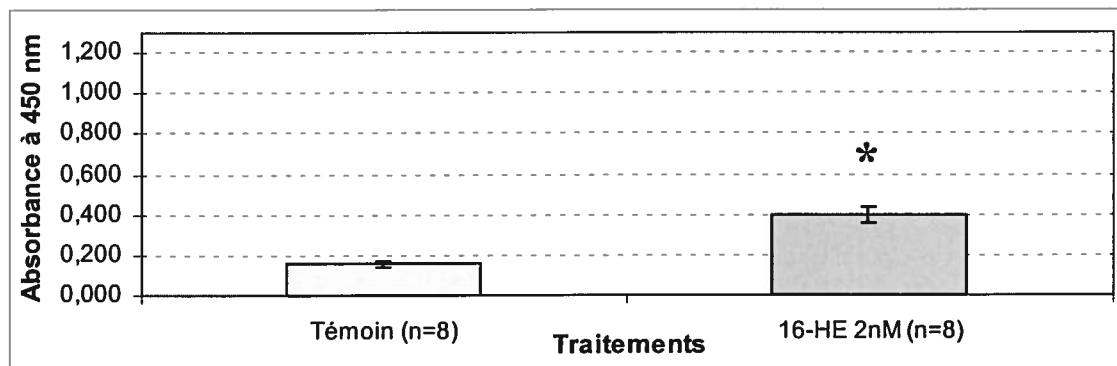




a. 14 heures de traitement



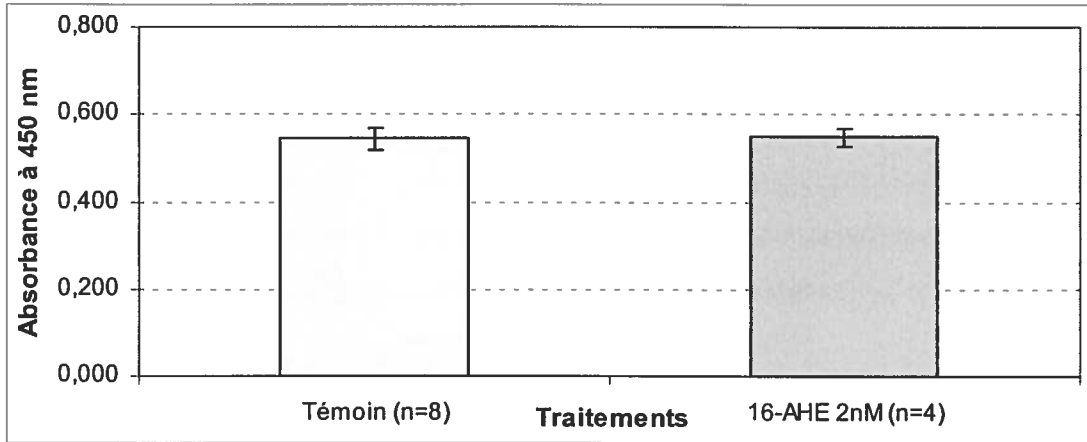
b. 16 heures de traitement



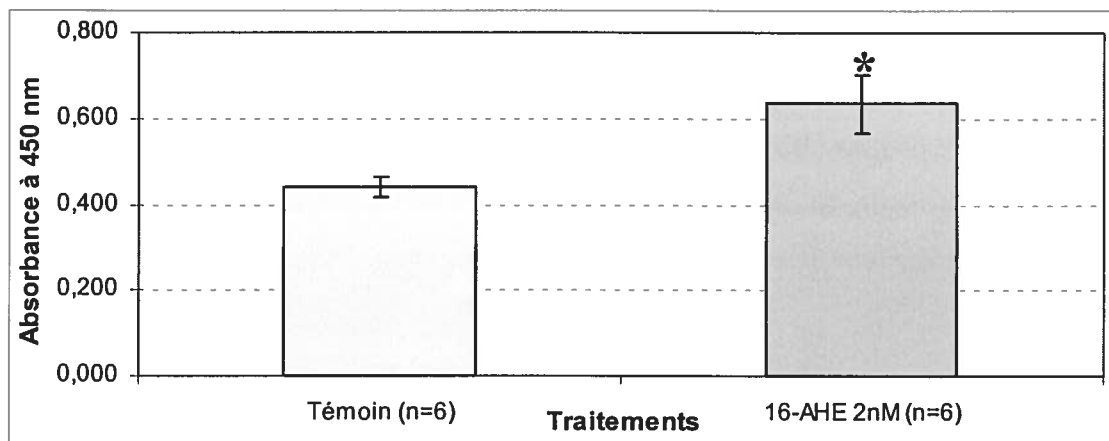
c. 24 heures de traitement

**Figures 3.2 : Optimisation de la durée de traitement avec un mitogène pour des cellules MCF-10A à division rapide.** La différence de l'absorbance (450 nm) entre le témoin positif 16-AHE et le témoin milieu normal est supérieure lorsque les cellules MCF-10A, temps de doublage de 24 heures sont exposées durant 24 heures au 16-AHE par rapport à des temps de traitements plus courts. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 7 ou 8 puits. Chaque graphique est représentatif des résultats obtenus sur un minimum de 2 expériences.

\* Indique que la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) du témoin.



**a. 16 heures de traitement**



**b. 48 heures de traitement**

**Figures 3.3 : Optimisation de la durée de traitement avec un mitogène pour des cellules MCF-10A à division lente.** La différence de l'absorbance (450 nm) entre le témoin positif 16-AHE et le témoin milieu normal est supérieure lorsque les cellules MCF-10A, temps de doublement de 37 heures sont exposées durant 48 heures au 16-AHE par rapport à un temps de traitement de 16 heures. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 4 à 8 puits. Chaque graphique est représentatif des résultats obtenus sur un minimum de 2 expériences.

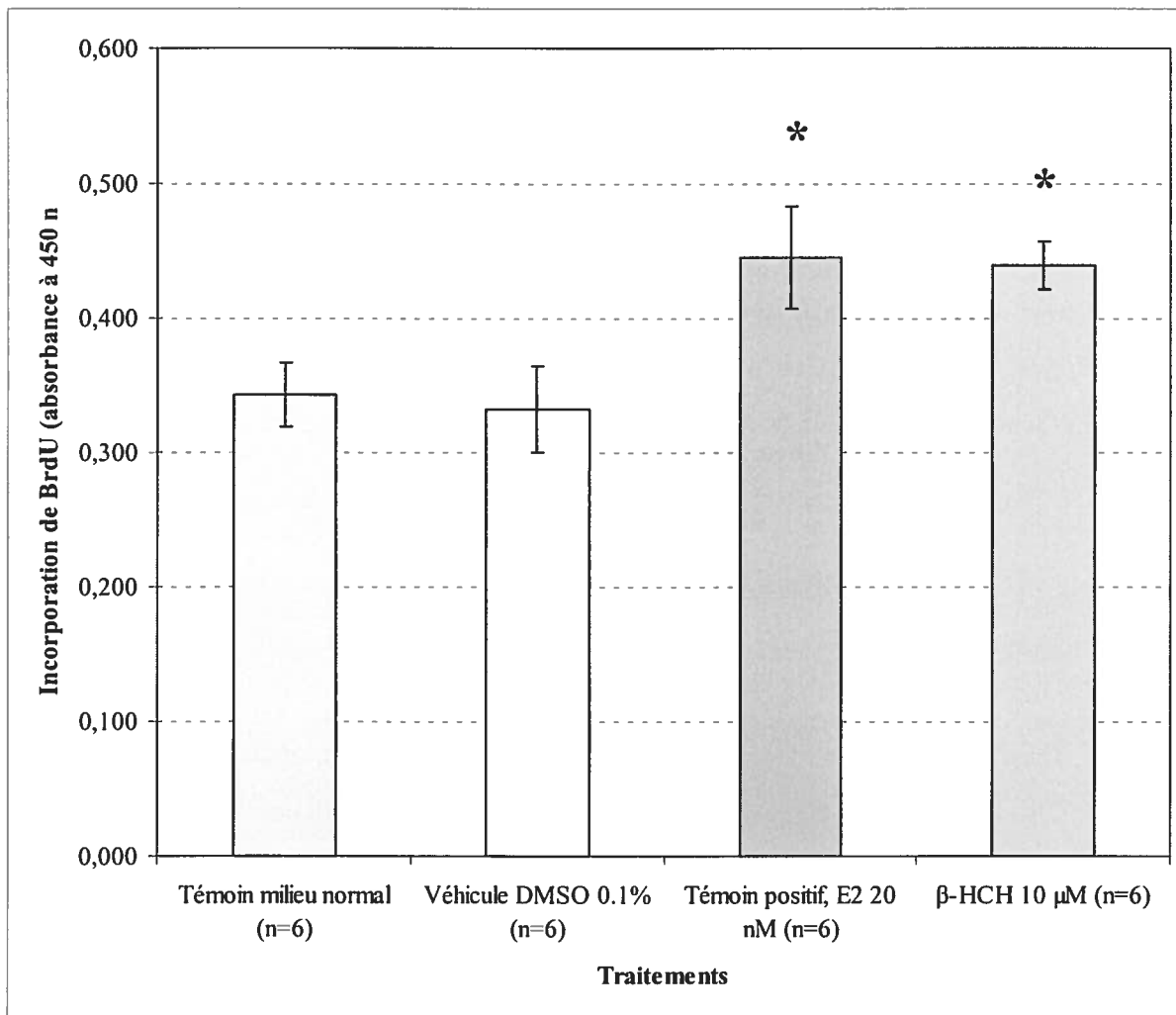
\* Indique que la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) du témoin.

### 3.1.2 Potentiel mitogène du $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH)

La figure 3.4 présente les résultats de l'évaluation du potentiel mitogène d'une exposition de cellules MCF-10A non synchronisées, temps de doublement de 45 heures, à 44 heures de traitement de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH, tel que mesuré par l'incorporation de BrdU dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en réplication. Chaque colonne de traitement représente l'absorbance moyenne de six puits. Le témoin positif (20 nM de E2) amène une nette induction de la prolifération cellulaire de cellules épithéliales mammaires humaines MCF-10A en culture ( $p < 0,01$ ). De façon équivalente au témoin positif, une concentration de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH durant le même temps d'exposition entraîne une nette augmentation de la mitogenèse ( $p < 0,01$ ) comparé au groupe témoin (DMSO 0,1 %).

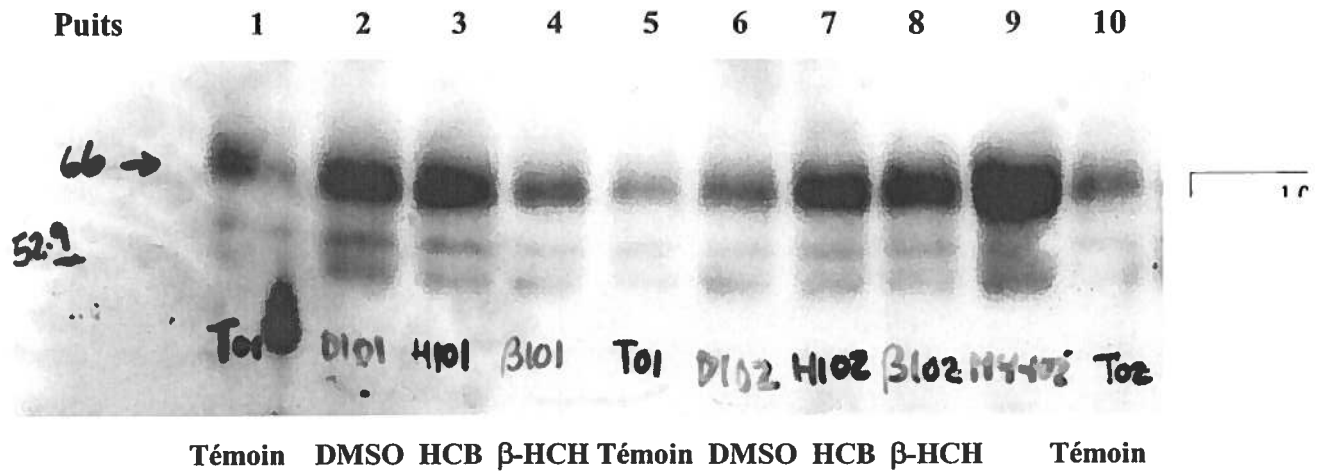
### 3.2 Modulation du récepteur à l'œstrogène

Puisqu'une concentration de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH est mitogène chez les cellules MCF-10A, la deuxième étape était de déterminer si une modulation de la quantité du récepteur à l'œstrogène avait lieu. La modulation de la quantité de récepteur à l'œstrogène a été mesurée à la suite de différents traitements (0,1 % de DMSO, 10  $\mu$ M de HCB ou de  $\beta$ -HCH). La figure 3.5a présente une membrane qui a été exposée à ces traitements pour une durée de 10 minutes. Les puits 1,5 et 10 correspondent aux cellules sans traitement (milieu normal seulement). Les puits 2 et 6 correspondent au véhicule DMSO 0,1 %, chaque puit provenant d'un plat de pétri différent lors de la collecte des cellules. Les puits 4 et 8 correspondent à des cellules exposées au  $\beta$ -HCH et ceux 3 et 7 à des cellules en présence d'HCB. La figure 3.5b présente l'ensemble des résultats obtenus des membranes pour les cellules du même passage, temps de doublement de 42 heures, qui ont été exposées au  $\beta$ -HCH. Celle-ci démontre que la quantité de récepteurs à l'œstrogène n'est pas significativement augmentée ( $p = 0,38$ ) par un traitement d'une durée de 10 minutes de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH. Les observations illustrées aux figures 3.4 et 3.5 suggèrent que le  $\beta$ -HCH peut exercer son action mitogène sans moduler le niveau du ER.

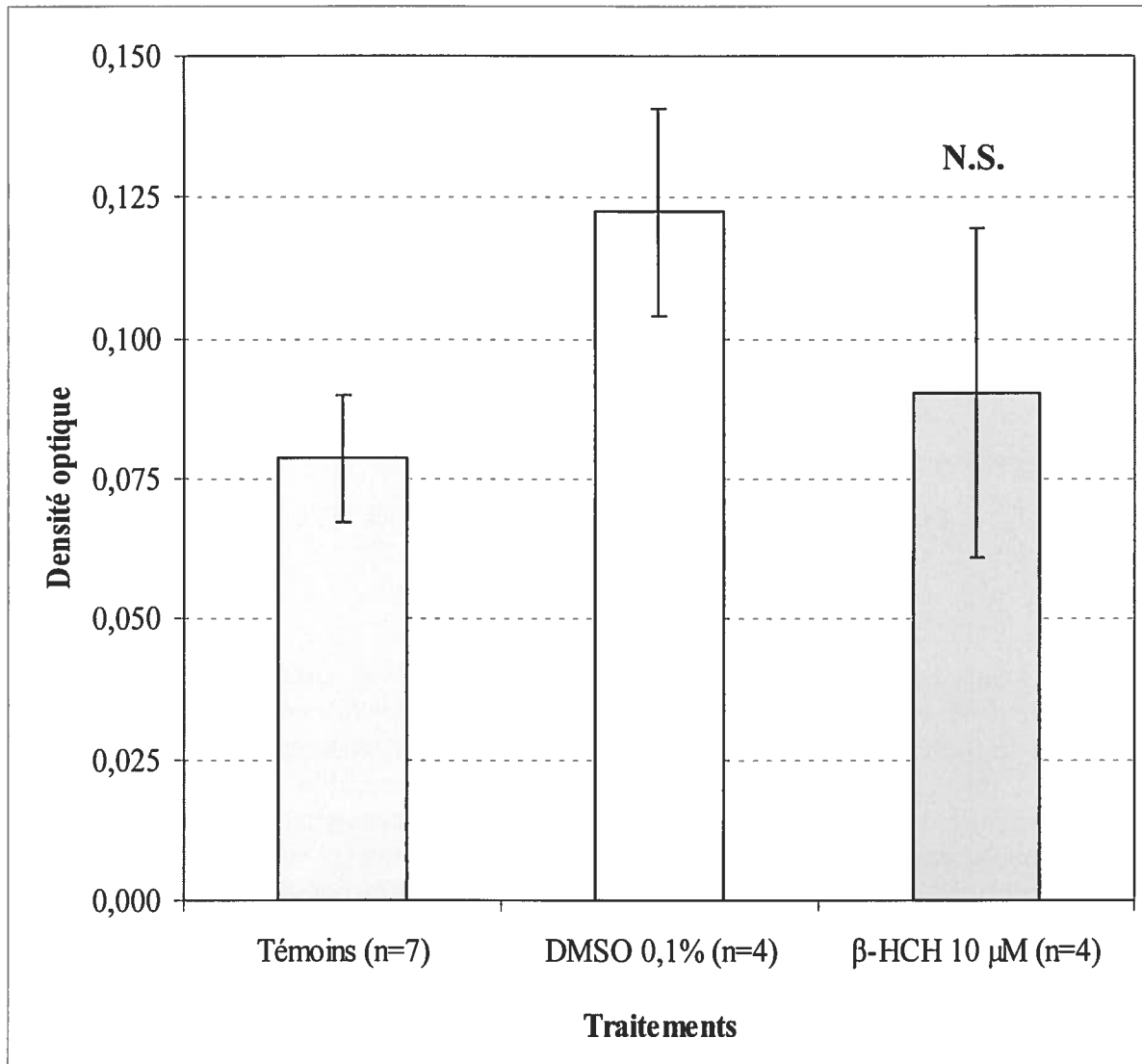


**Figure 3.4 : Effet du mitogène E2 (20 nM) et du β-HCH (10 μM) sur la prolifération de cellules MCF-10A en culture, tel que quantifié par l'incorporation de BrdU. Chaque barre du graphique représente la moyenne ± l'erreur-type pour 6 puits.**

\* Indique que la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) du témoin correspondant.



**Figure 3.5a : Effet de différents polluants toxiques sur la quantité de récepteurs à l'œstrogène dans les cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le HCB et le  $\beta$ -HCH à une concentration de 10  $\mu$ M durant un temps d'exposition de 10 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse kinases. Les quantités de récepteurs à l'œstrogène ont été analysées par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-ER spécifique et un deuxième anticorps anti-peroxydase. La bande de protéine localisée à 66 kDa correspond au récepteur à l'œstrogène. Puits 1, 5 et 10 : cellules sans traitement (milieu de culture seulement). Puits 2 et 6 : véhicule DMSO 0,1 %. Puits 4 et 8 :  $\beta$ -HCH. Puits 3 et 7 : HCB.



**Figure 3.5b : Effet du  $\beta$ -HCH sur la quantité de récepteurs à l'œstrogène dans les cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées durant un temps d'exposition de 10 minutes à une concentration de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH. La colonne "témoins" correspond à des cellules non traitées. Les lysats cellulaires entiers obtenus ont été séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. La quantité de récepteurs à l'œstrogène a été analysée par immunobuvardage en utilisant un anticorps spécifique et un deuxième anticorps anti-souris couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 2 à 4 puits de 2 expériences.

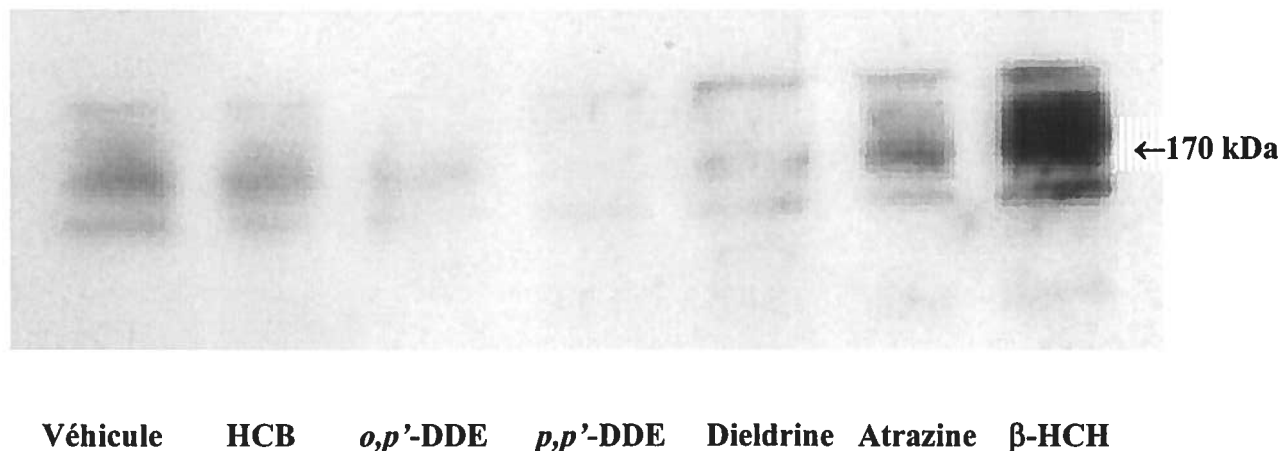
N.S. Indique que la moyenne n'est pas significativement différente ( $p > 0,05$ ) de celle du véhicule DMSO 0,1 % ou du témoin milieu normal.

### 3.3 Modulation du récepteur EGFR

Plusieurs polluants environnementaux pourraient être en mesure d'augmenter le niveau de phosphorylation des tyrosines de la famille des récepteurs ErbB. Nous avons donc procédé à plusieurs expériences avec différents toxiques (HCB, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, dieldrine, atrazine et  $\beta$ -HCH) à une concentration de 10  $\mu$ M durant un temps d'exposition de 10 minutes afin de dépister lesquels étaient les plus prometteurs quant à leur potentiel de modulation du récepteur EGFR.

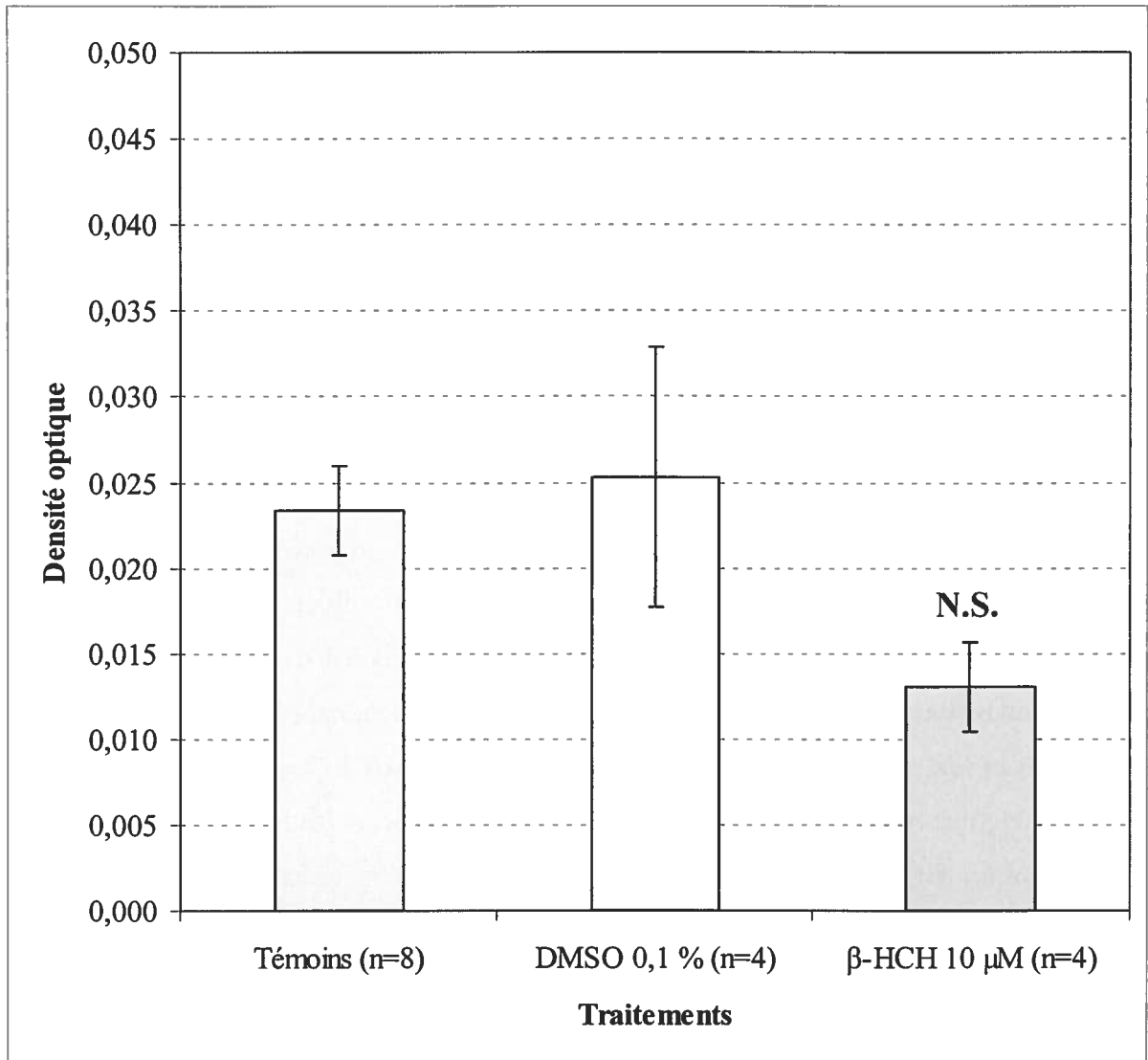
Un immunobuvardage obtenus des lysats cellulaires entiers de cellules MCF-10A, passage 55 avec un temps de doublement d'environ 80 heures, privées durant 16 heures puis traitées avec différents toxiques à une concentration de 10  $\mu$ M durant 10 minutes, est présenté à la figure 3.6. La forte augmentation obtenue de la bande à 170 kDa sur cette membrane est représentative d'expériences réalisées à quelques reprises et suggérait de façon préliminaire que le  $\beta$ -HCH augmente le nombre de récepteurs EGFR à la surface de la membrane cellulaire. Il est à noter que, même si le véhicule utilisé pour la dissolution des produits toxiques dans ce cas-ci, un mélange de polyéthylène glycol et d'éthanol (PEG/ETOH) possédait une activité non négligeable sur la quantité de récepteurs EGFR, la bande correspondant au  $\beta$ -HCH contrastait par rapport à celle du véhicule, ce qui n'était pas le cas pour d'autres toxiques.

Une deuxième série d'expériences, effectuée sur des cellules MCF-10A, passage 61, non privées en EGF avec un temps de doublement de 42 heures, n'a cependant pas montré de différence significative ( $p=0,18$ ) entre le véhicule (DMSO 0,1 %) et le  $\beta$ -HCH 10  $\mu$ M lors d'une exposition de 10 minutes (figure 3.7).



**Figure 3.6 : Effet de différents polluants toxiques sur la quantité de récepteurs EGFR des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le HCB, l'*o,p'*-DDE, le *p,p'*-DDE, la dieldrine, l'atrazine et le β-HCH à des concentrations de 10 μM durant un temps d'exposition de 10 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les quantités de récepteurs à par ont été analysées par immunobuvardage utilisant un anticorps par spécifique et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Il est à noter l'apparition d'une deuxième et d'une troisième bande qui sont reconnues de façon spécifique par l'anticorps. On ne connaît pas pour l'instant la correspondance de ces bandes.





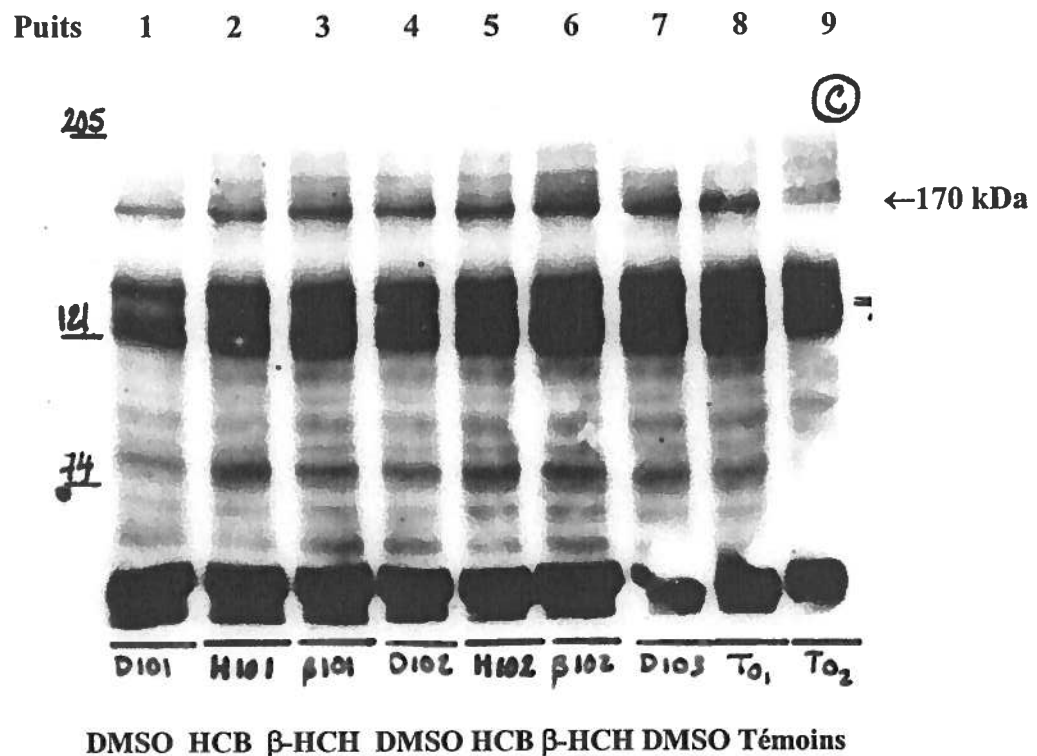
**Figure 3.7 : Effet du  $\beta$ -HCH sur la quantité de récepteurs EGFR de cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le  $\beta$ -HCH à une concentration de 10  $\mu$ M durant un temps d'exposition de 10 minutes. Les lysats cellulaires entiers ont ensuite été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les quantités de récepteurs à par ont été analysées par immunobuvardage utilisant un anticorps par spécifique et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 2 à 4 puits de 2 expériences.

N.S. Indique que la moyenne n'est pas significativement différente ( $p > 0,05$ ) de celle du véhicule DMSO 0,1 %.

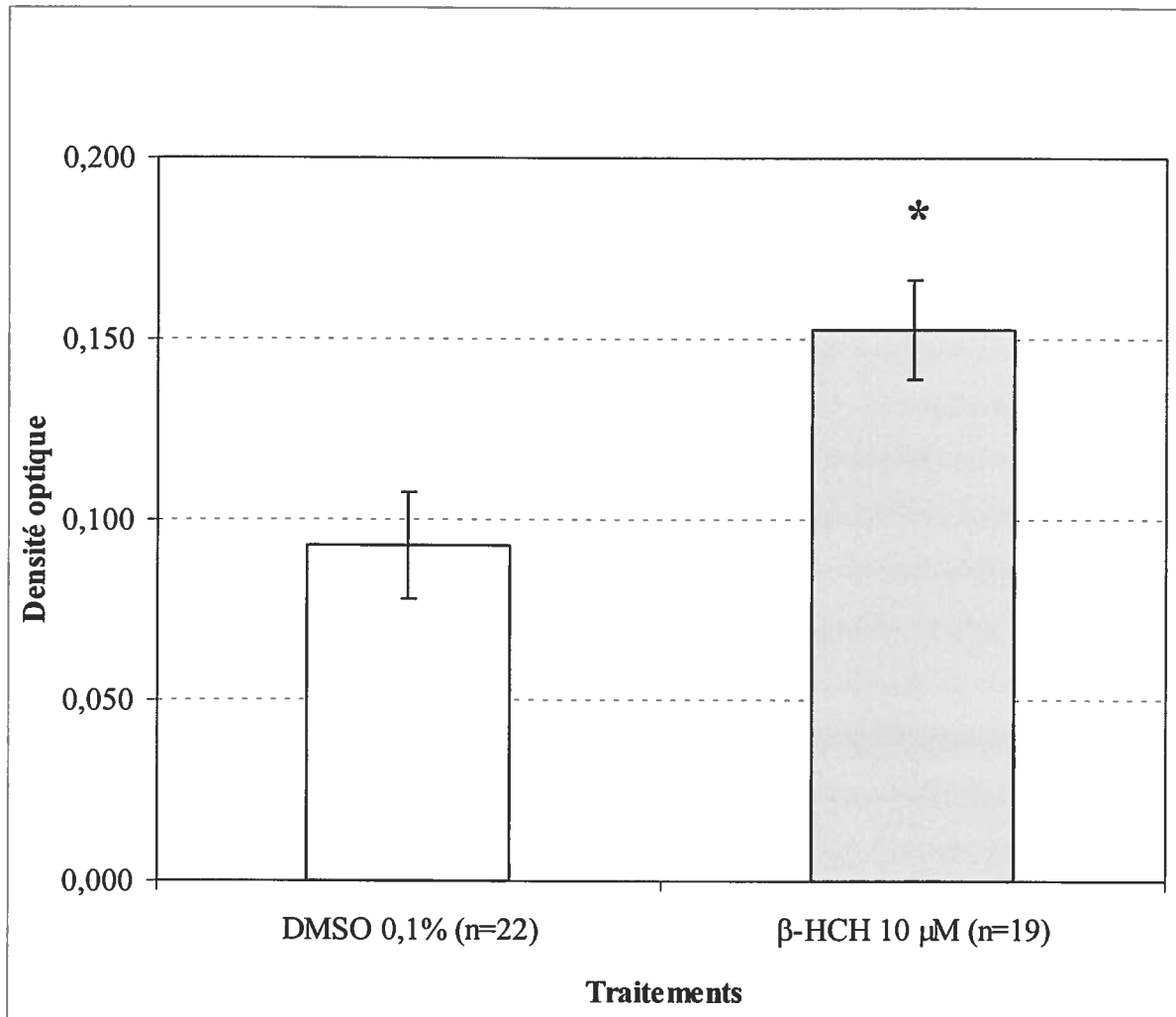
### 3.4 Modulation de la phosphorylation du récepteur EGFR

La technique de l'immunobuvardage, combinée à son analyse par quantification densitométrique permet de comparer les effets des différents toxiques utilisés en comparaison avec l'effet du véhicule (DMSO 0,1 %) sur la modulation du degré de phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR. Un des inconvénients de travailler avec des lignées cellulaires *in vitro* est que celles-ci peuvent posséder des durées de cycle cellulaire variables selon des passages, comme cela a déjà été mentionné. Les deux prochaines séries d'expériences montrent un exemple de cette variabilité, présentant les résultats obtenus pour deux lignées de MCF-10A possédant des temps de doublement différents. La figure 3.8a présente une membrane qui a été exposée à des traitements de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH et de HCB pour une durée de 10 minutes. Les puits 8 et 9 correspondent aux cellules sans traitement (milieu seulement). Les puits 1, 4 et 7 correspondent au véhicule DMSO. Les puits 2 et 5 correspondent à des cellules exposées au HCB et les puits 3 et 6 à des cellules en présence  $\beta$ -HCH. La figure 3.8b présente l'ensemble des résultats obtenus des membranes pour les cellules MCF-10A du passage 66, ayant un temps de doublement de 32 heures, qui ont été exposées au  $\beta$ -HCH pour une durée de 10 minutes à une concentration de 10  $\mu$ M. Le  $\beta$ -HCH possède un effet sur le niveau de phosphorylation de la bande de 170 kDa, correspondant au récepteur EGFR après 10 minutes de traitement ( $p < 0,02$ ).

Une seconde série d'expériences, effectuée sur des cellules MCF-10A, passage 55, non privées en EGF avec un temps de doublement plus lent (53 heures), a révélé que l'effet du  $\beta$ -HCH se produisait à des temps d'exposition plus longs (30 et 60 minutes) plutôt qu'à 10 minutes de traitement comme dans le cas précédent. L'augmentation de phosphorylation de la bande identifiée à 170 kDa n'est cependant pas significative ( $p = 0,07$ ) pour un traitement de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH durant 30 minutes par rapport à la moyenne des véhicules DMSO 0,1 % (figure 3.9).

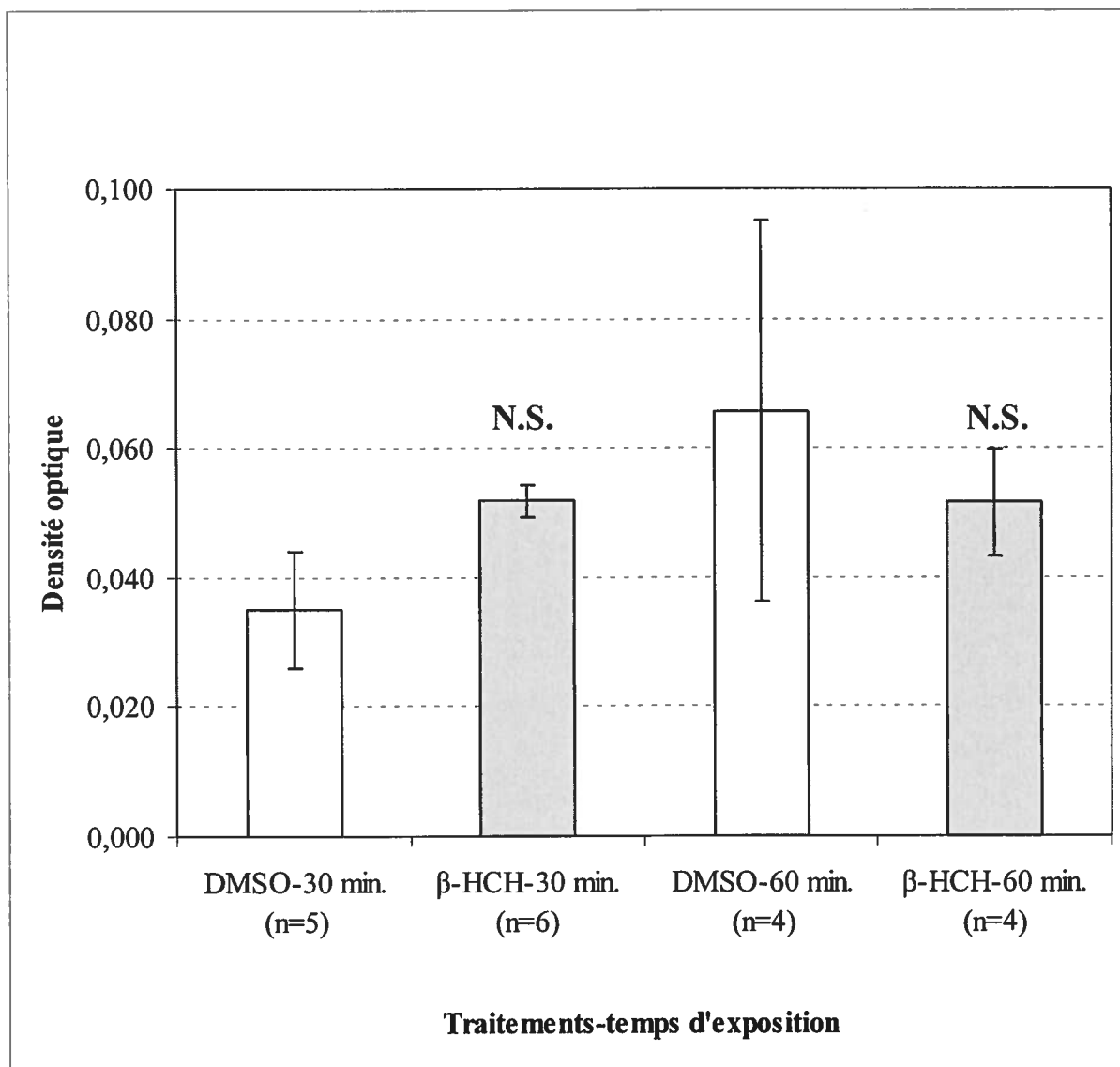


**Figure 3.8a : Effet du HCB et du  $\beta$ -HCH sur la phosphorylation des récepteurs EGFR des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le HCB et le  $\beta$ -HCH à des concentrations de 10  $\mu$ M durant un temps d'exposition de 10 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les niveaux de phosphorylation des récepteurs EGFR ont été analysés par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-phosphotyrosine PY20 et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Il est à noter l'apparition d'une bande fortement phosphorylée possédant un poids moléculaire entre 120 et 130 kDa. On ne connaît pas pour l'instant la correspondance de cette bande. Puits 8 et 9 : cellules sans traitement (milieu de culture seulement). Puits 1, 4 et 7 : véhicule DMSO 0,1 %. Puits 2 et 5 : HCB. Puits 3 et 6 :  $\beta$ -HCH.



**Figure 3.8b : Effet du  $\beta$ -HCH (10 minutes) sur le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le  $\beta$ -HCH à une concentration de 10  $\mu$ M durant un temps d'exposition de 10 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les niveaux de phosphorylation des récepteurs EGFR ont été analysés par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-phosphotyrosine PY20 et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 2 à 3 puits de 8 expériences.

\* Indique que la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) de celle du véhicule DMSO 0,1 %.



**Figure 3.9 : Effet du β-HCH (30 et 60 min.) sur le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec β-HCH à une concentration de 10 μM durant un temps d'exposition de 30 et 60 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les niveaux de phosphorylation des récepteurs EGFR ont été analysés par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-phosphotyrosine PY20 et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne ± l'erreur-type.

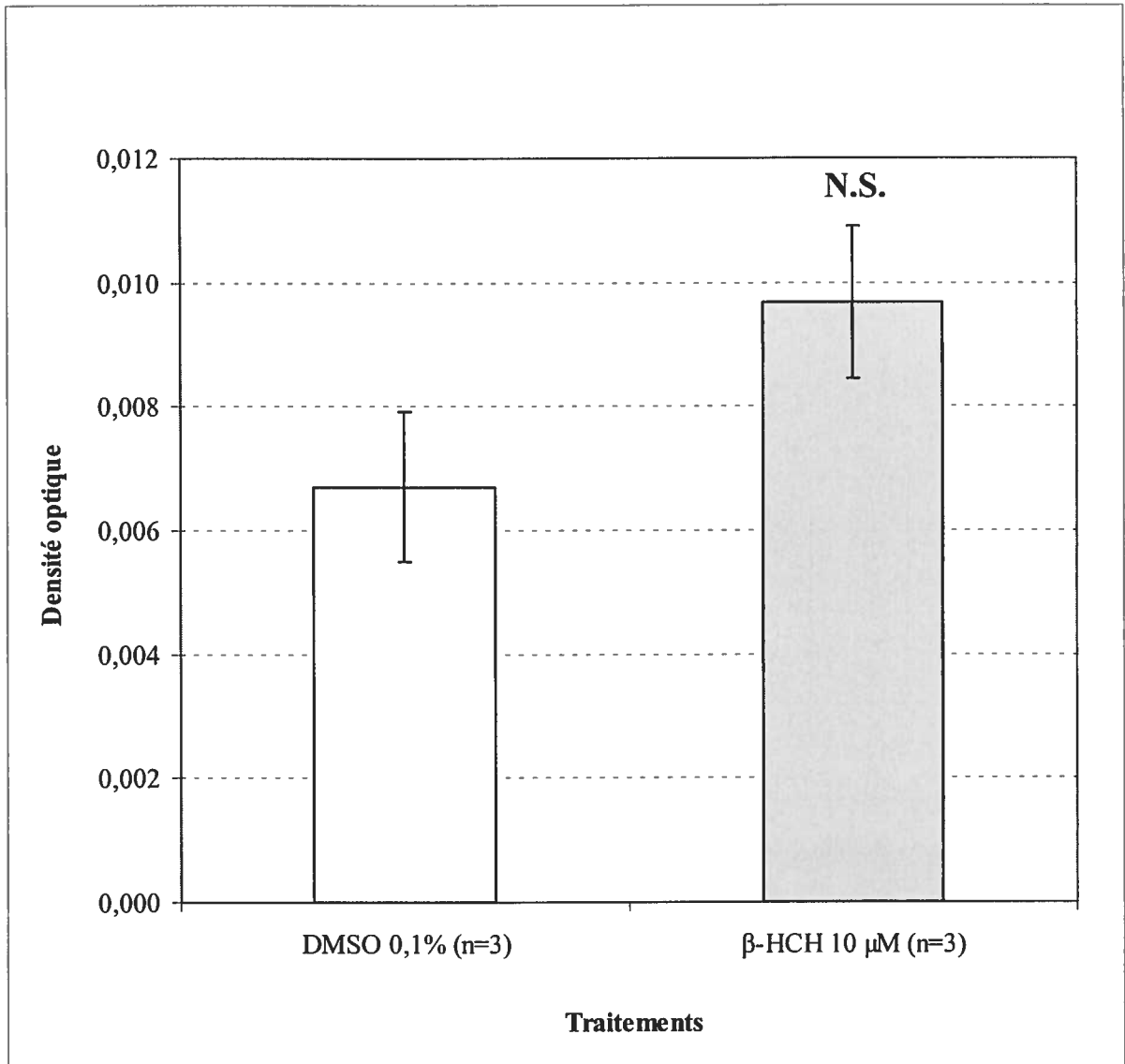
N.S. Indique que la moyenne n'est pas significativement différente ( $p > 0,05$ ) de celle du véhicule DMSO 0,1 % seul.

### **3.5 Modulation de la quantité de récepteur ErbB-2**

Dans le but de déterminer si la stimulation de la prolifération des cellules MCF-10A pouvait s'effectuer *via* l'augmentation de la quantité de la protéine réceptrice ErbB-2 nous avons effectué des immunobuvardages. Des lysats cellulaires entiers de cellules MCF-10A, passage 66, temps de doublage de 32 heures, qui ont été exposées à une concentration de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH durant 30 minutes dans le milieu de culture. La figure 3.10 démontre que la quantité de récepteur ErbB-2, tel que détectée par un anticorps anti-ErbB-2 spécifique n'est pas significativement augmenté ( $p=0,08$ ) par le traitement comparativement au véhicule DMSO 0,1 %.

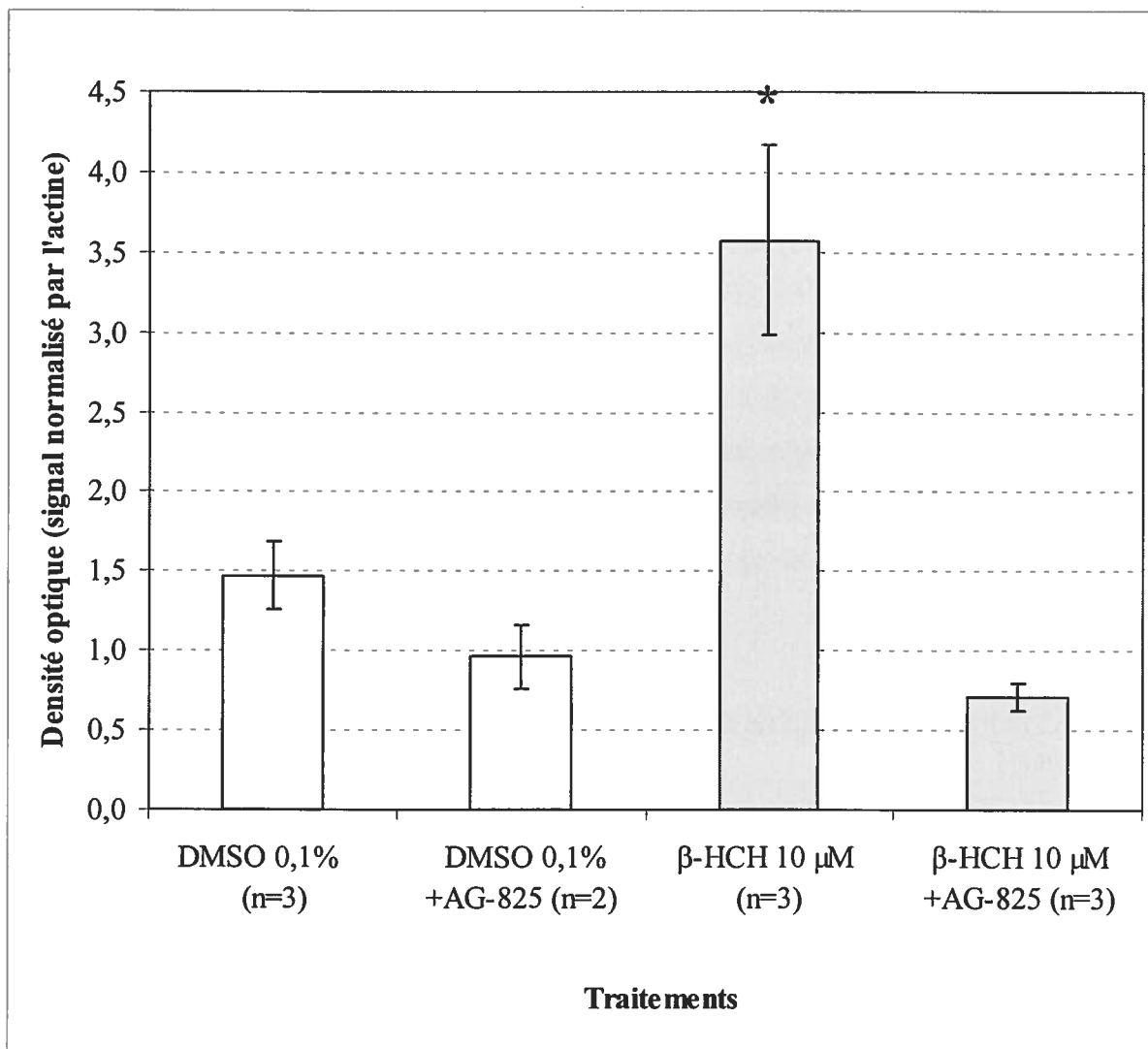
### **3.6 Modulation de la phosphorylation du récepteur ErbB-2**

Nous avons vérifié si le  $\beta$ -HCH à une concentration non cytotoxique dans le milieu de culture pouvait augmenter la phosphorylation du récepteur ErbB-2 chez les cellules non tumorigènes MCF-10A en utilisant un anticorps anti-phospho-ErbB-2 spécifique. Non seulement une concentration de 10  $\mu$ M augmente de façon significative ( $p<0,02$ ) la phosphorylation du récepteur ErbB-2, mais cette modulation disparaît quasi-complètement lors du traitement simultané des cellules avec le bloqueur spécifique de ErbB-2, l'AG-825 (figure 3.11). Ces résultats suggèrent que l'effet du  $\beta$ -HCH serait médié par l'activation des récepteurs ErbB-2 à la surface des cellules mammaires.



**Figure 3.10 : Effet d'une concentration de 10  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{-HCH}$  (30 min.) sur la quantité de récepteurs ErbB-2 des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le véhicule DMSO 0,1 % et le  $\beta\text{-HCH}$  à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  durant un temps d'exposition de 30 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les quantités de récepteurs ErbB-2 ont été analysées par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-ErbB-2 spécifique et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 3 puits.

N.S. Indique que la moyenne n'est pas significativement différente ( $p > 0,05$ ) de celle du véhicule DMSO 0,1 %.



**Figure 3.11 : Effet du  $\beta$ -HCH, avec ou sans AG-825, sur le niveau de phosphorylation des tyrosines du récepteur ErbB-2 des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le  $\beta$ -HCH à des concentrations de 10  $\mu$ M, avec ou sans bloqueur AG-825, durant 10 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les niveaux de phosphorylation des récepteurs EGFR ont été analysés par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-phospho-ErbB-2 spécifique et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase, puis quantifiés par la quantité d'actine à l'aide d'un anticorps spécifique anti-actine et d'un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 2 ou 3 puits.

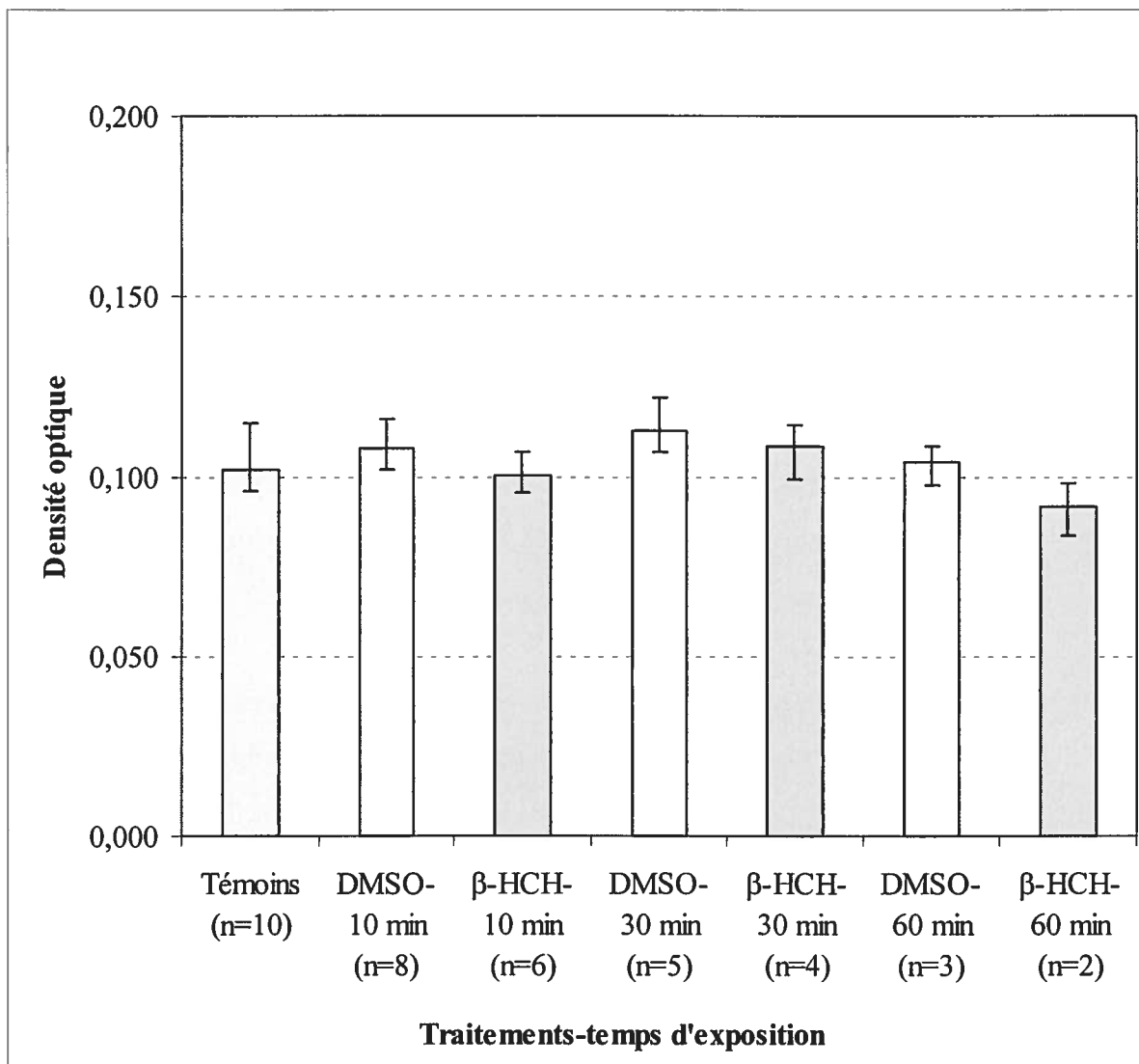
\* Indique que la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) de celle du véhicule DMSO 0,1 %.



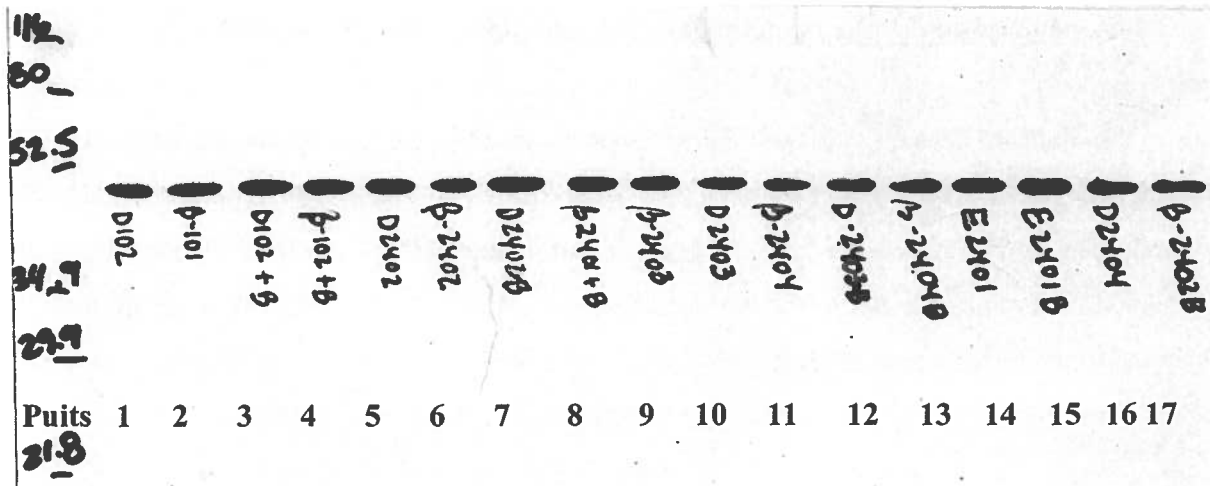
### 3.7 Modulation de la voie de signalisation MEK

La voie de signalisation intracellulaire initiée par l'activation du récepteur EGFR ou ErbB-2 passe par une cascade de phosphorylation de plusieurs protéines cytoplasmiques. Parmi les protéines qui interagissent potentiellement avec le récepteur EGFR, on note la voie des protéines *Ras* qui amène l'activation des MEK, ce qui phosphorylera à son tour des facteurs de transcription nucléaires impliqués dans la division cellulaire. Pour déterminer si le  $\beta$ -HCH exerce son effet prolifératif *via* la voie de signalisation cellulaire des MEK, des analyses par immunobuvardage ont été effectuées avec un anticorps spécifique de souris anti-MEK1-NT. Les résultats illustrés sur la figure 3.12 montrent qu'une concentration de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH ne semble pas moduler la quantité totale de la protéine MEK à des temps de traitements de 10, 30 ou 60 minutes.

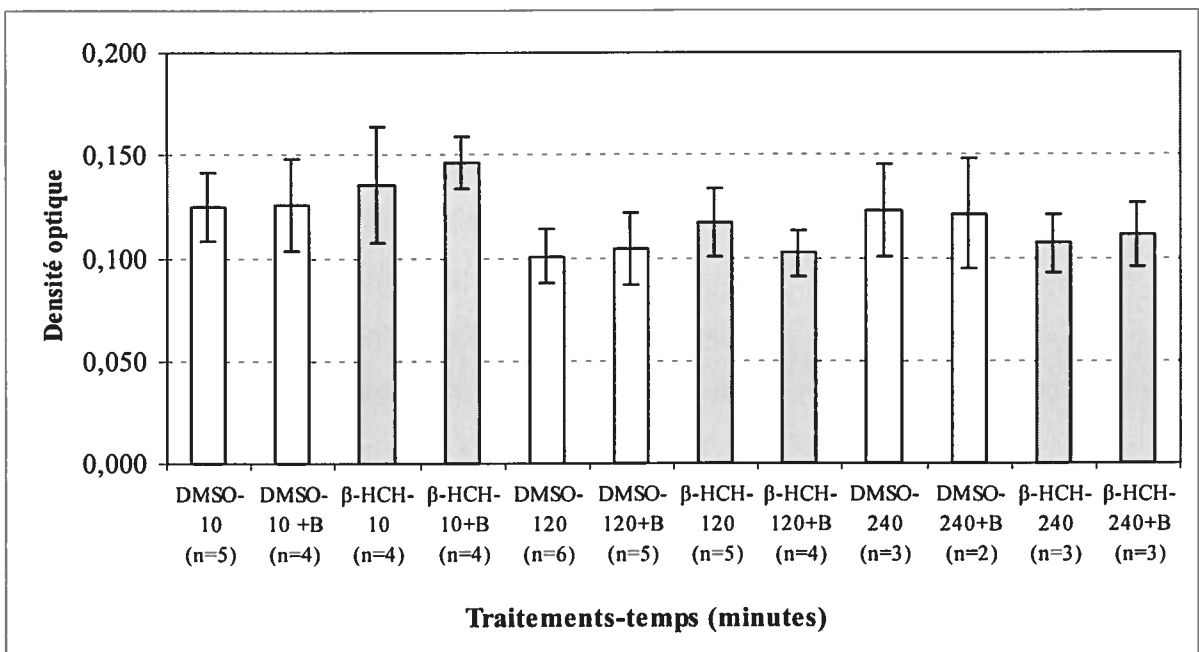
La figure 3.13b présente les résultats obtenus de 3 expériences pour des cellules MCF-10A, passage 64, non privées en EGF avec un temps de doublage d'environ 27 heures. Les cellules ont été exposées au  $\beta$ -HCH à une concentration de 10  $\mu$ M et ce, à des temps de traitements beaucoup plus longs (10, 120 et 240 minutes), avec ou sans bloqueur spécifique du récepteur ErbB-2 (AG-825). Tout comme les résultats précédents, la quantité de protéine MEK ne semble pas être stimulée par le traitement avec le  $\beta$ -HCH et ce, même au temps de stimulation le plus long (240 minutes).



**Figure 3.12 : Effet du  $\beta$ -HCH (10, 30 et 60 minutes) sur la quantité de protéines MEK des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le  $\beta$ -HCH (10  $\mu$ M) durant un temps d'exposition de 10, 30 et 60 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. La quantité de protéine MEK a été analysée par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-MEK1-NT spécifique et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'est observée. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 4 expériences.



a : Membrane

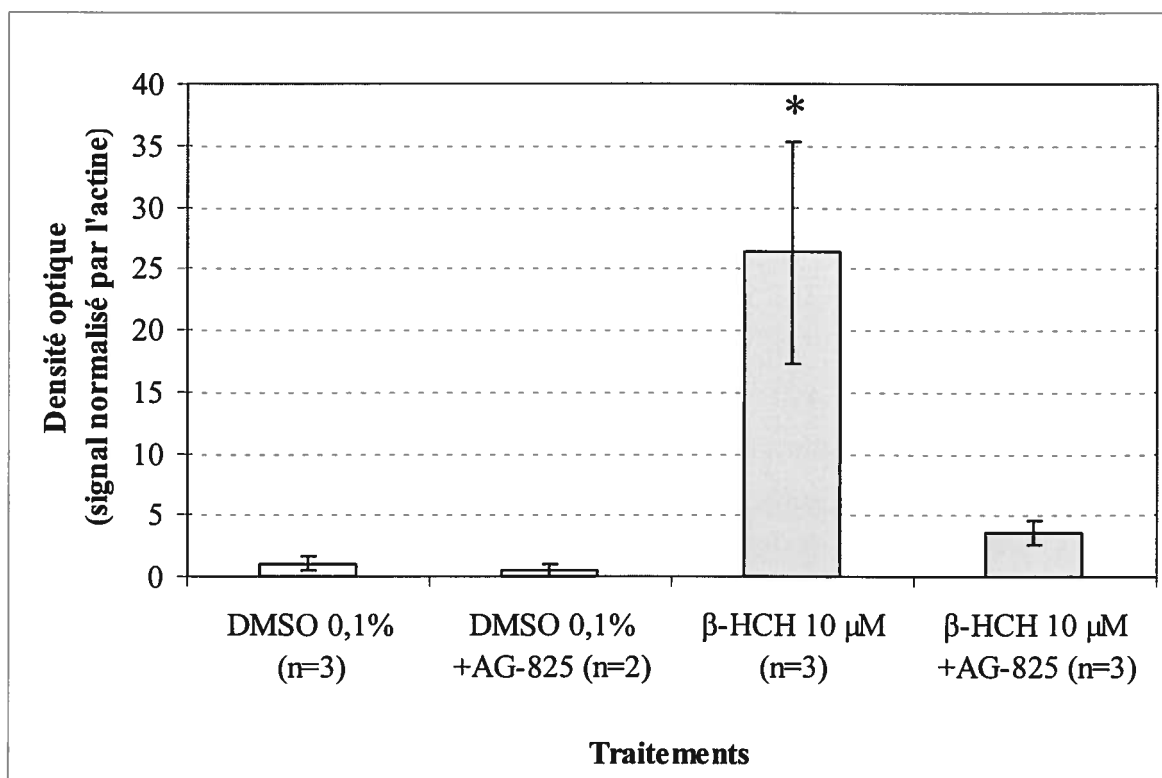


b : Représentation graphique

**Figure 3.13 : Effet du  $\beta$ -HCH (10, 120 et 240 minutes), avec ou sans AG-825, sur la quantité de protéines MEK des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le  $\beta$ -HCH (10  $\mu$ M), avec ou sans inhibiteur AG-825 (+B), durant un temps d'exposition de 10, 120 et 240 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. La quantité de protéine MEK a été analysée par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-MEK1-NT spécifique et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'est observée. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type de 3 expériences.

### 3.8 Modulation d'une protéine inconnue de poids moléculaire 130

Fait intéressant, au cours des expériences effectuées, une bande de protéines phosphorylées, d'un poids moléculaire d'environ 120-130 kDa semblait également modulée significativement ( $p < 0,03$ ) par un traitement à 10  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{-HCH}$ . Fait d'autant plus intéressant que cet effet est réprimé par l'ajout dans le milieu d'un inhibiteur spécifique du récepteur ErbB-2 (AG-825) (figure 3.14).



**Figure 3.14 : Effet du  $\beta\text{-HCH}$  sur le niveau de phosphorylation d'une protéine de 130 kDa des cellules MCF-10A en culture.** Les cellules ont été traitées avec le  $\beta\text{-HCH}$  (10  $\mu\text{M}$ ), avec ou sans bloqueur AG-825 durant 10 minutes, puis les lysats cellulaires entiers ont été récoltés et séparés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les niveaux de phosphorylation des récepteurs EGFR ont été analysés par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-phosphotyrosine 4G10 et un deuxième anticorps couplé à une peroxydase, puis quantifié par la quantité d'actine à l'aide d'un anticorps spécifique anti-actine et d'un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. Chaque barre du graphique représente la moyenne  $\pm$  l'erreur-type pour 2 ou 3 puits.

\* Indique que la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) de celle du véhicule.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### **4.1 Choix d'un véhicule et optimisation de la méthode expérimentale**

Le choix du véhicule (solvant) pour dissoudre les différents polluants organochlorés à l'étude a été optimisé en fonction des résultats obtenus et ceux de la littérature scientifique. Nous avons testé un mélange de 55 % polyéthylène glycol 400 (PEG) et de 45 % d'éthanol (ETOH) puisqu'une étude réalisée par Jain et Pento (1991) semblait indiquer que l'utilisation de ce mélange à une concentration finale de 0,1 % était idéale pour solubiliser les composés hydrophobes sans être cytotoxique pour les lignées de cellules MCF-7. Cependant, lors de l'utilisation de ce mélange pour le traitement des cellules MCF-10A dans notre laboratoire, une stimulation non négligeable de la mitose des MCF-10A a été observée. Suite à ces résultats, le DMSO, qui a un effet mitogène faible, a été réintroduit comme véhicule pour solubiliser les substances chimiques. Cependant, puisque celui-ci induit une division cellulaire et une phosphorylation non négligeable du récepteur EGFR, des cellules traitées uniquement avec le DMSO ont été utilisées comme témoin-véhicule, à l'occasion lui-même comparé au témoin représentant des cellules sans aucun traitement.

La durée du cycle cellulaire varie selon les types de cellules et nous avons noté que celle des cellules MCF-10A avait tendance à diminuer à la suite des différents passages. De plus, nous avons observé que ces cellules cessent de répondre au stimulus mitogène du 16-AHE après un certain nombre de passages consécutifs en culture, généralement entre 15 et 20 passages. Puisque la réponse aux stimuli œstrogéniques était modulée avec l'avancement des passages et le temps de doublage, il était logique de spéculer que la réponse des récepteurs ErbB-2 et EGFR à certains traitements soit également modifiée. Dans le but de s'assurer de travailler avec des cellules réceptives à

un traitement, nous avons décidé d'utiliser des cellules pour seulement une dizaine de passages après la remise en culture initiale suite à leur décongélation. Nous avons également vérifié leur réceptivité au témoin positif par la méthode de BrdU et leur temps de doublage avant de procéder à la stimulation aux différents traitements. Nous avons sélectionné des cellules répondant au 16-AHE de façon significativement différente du témoin et possédant arbitrairement un temps de doublage supérieur à 24 heures.

#### 4.2 Caractérisation du potentiel mitogène du $\beta$ -HCH

La concentration non cytotoxique de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH semble induire la mitogenèse chez les cellules épithéliales mammaires MCF-10A. Comme les œstrogènes semblent impliqués dans la problématique du cancer du sein, nous avons tenté de vérifier si le  $\beta$ -HCH exerçait son action proliférative *via* le récepteur à l'œstrogène. Pour ce faire, nous avons mesuré par immunobuvardage le récepteur à l'œstrogène; le caractère mitogène du  $\beta$ -HCH ne semble pas être relié à une propriété mimétique de l'œstradiol comme semblait le soutenir initialement Coosen et Val Velsen en 1989. Toutefois, ces chercheurs n'avaient pas été en mesure de démontrer que les propriétés oestrogéniques du  $\beta$ -HCH étaient reliées à sa liaison avec le récepteur à l'œstrogène. Nos résultats semblent plutôt démontrer qu'il s'agit d'une réponse proliférative *via* un mécanisme articulé sur des récepteurs aux facteurs de croissance et non à l'œstrogène. Ces résultats concordent donc avec les observations au sein de notre laboratoire concernant le potentiel mitogène de l'HCB dont le mécanisme responsable semble être la voie de signalisation EGFR et de ErbB-2.

Fait intéressant, la littérature semble encore soutenir l'absence de récepteurs à l'œstrogène chez la lignée cellulaire MCF-10A (Soule *et al.*, 1990; Shen et Novak, 1997; Bhat et Vadgama, 2002). Ce travail a permis de démontrer la présence de ces récepteurs au niveau des cellules MCF-10A puisque ceux-ci sont reconnus par un anticorps spécifique dirigé contre le récepteur à l'œstrogène.

#### 4.3 Étude de la modulation de la quantité de protéines réceptrices

Il est reconnu que l'expression du récepteur EGFR est augmentée dans les cancers de cellules épithéliales, tels les néoplasmes de la vessie (Berger *et al.*, 1987), de la tête et du cou (Irish et Bernstein, 1993) et qu'il est associé dans ces deux cas à un mauvais pronostic et à une augmentation dans le grade de malignité dans le cas des carcinomes infiltrants des canaux lactifères (Suo *et al.*, 1998). Nous nous sommes donc penchés sur la possibilité d'augmentation des protéines réceptrices EGFR et ErbB-2 par une concentration non cytotoxique de  $\beta$ -HCH. Dans nos expériences, la quantité de récepteurs membranaires n'est pas affectée ( $p=0,18$ ).

#### 4.4 Étude de la modulation de l'activité de protéines réceptrices

Nous avons donc vérifié si le  $\beta$ -HCH pouvait exercer son action mitogène en modulant le niveau de phosphorylation des tyrosines des récepteurs EGFR et ErbB-2. Les résultats d'immunovardage ont montré que les niveaux de phosphorylation des tyrosines du récepteur EGFR augmentent à la suite d'une exposition de dix minutes à une concentration de 10  $\mu$ M  $\beta$ -HCH ( $p<0,02$ ). De plus, le  $\beta$ -HCH engendre une hausse significative ( $p<0,02$ ) de la phosphorylation du récepteur ErbB-2. Ces résultats démontrent que le  $\beta$ -HCH stimule la prolifération cellulaire *via* l'activation de récepteurs membranaires de la famille ErbB. Fait intéressant, il a été récemment indiqué que le récepteur ErbB-2 est activé par le  $\beta$ -HCH chez des cellules MCF-7 et qu'il stimule la formation de foyers, effet prévenu par une co-incubation du  $\beta$ -HCH avec l'anticorps monoclonal de ErbB-2 (Enan et Matsumura, 1998; Hatakeyama et Matsumura, 1999).

L'amplification et/ou la surexpression de l'oncogène de ErbB-2 observées dans certains néoplasmes est un indice de mauvais pronostic lorsqu'une tumeur possède ces changements physiologiques. L'activation des cascades intracellulaires de transduction du signal par le récepteur ErbB-2 est cohérente avec sa capacité de transformer les cellules épithéliales mammaires ou ovariennes, bien que les molécules par lesquelles le signal est

traduit demeurent encore inconnues (Reese et Slamon, 1997). Toutefois, jusqu'à ce jour, aucune étude ne s'était attardée à l'activation de ce récepteur par le  $\beta$ -HCH sur une lignée de cellules non tumorigènes comme nous l'avons démontré. Le  $\beta$ -HCH s'ajoute donc à la liste des organochlorés, dont fait déjà parti le HCB, qui modulent la voie des récepteurs de croissance épidermique. Cependant, nos résultats n'excluent pas totalement la possibilité que le  $\beta$ -HCH agisse comme agoniste du récepteur à l'œstrogène et il aurait été nécessaire pour exclure cette possibilité d'inhiber le récepteur ER à l'aide du tamoxifène ou encore mieux, de bloquer les domaines AF-1 et AF-2 du ER à l'aide d'un anti-œstrogène spécifique, tel le EM-652.

Une étude dépidémiologique a révélé une augmentation significative du risque de cancer du sein à la suite d'une exposition à des niveaux modérés à élevés d'atrazine (Kettles *et al.*, 1997) et l'effet prolifératif observé sur des cellules MCF-7 ne semble pas médié par le récepteur à l'œstrogène (Connor *et al.*, 1996). L'hypothèse classique selon laquelle les produits chimiques environnementaux agissent comme xénoœstrogènes sur le récepteur à l'œstrogène et peuvent induire des cancers mammaires (Davis *et al.*, 1993) est par conséquent de plus en plus nuancée.

#### **4.5 Étude d'un mécanisme responsable du potentiel mitogène du $\beta$ -HCH**

La phosphorylation des tyrosines et l'activation du récepteur ErbB-2 enclenche une cascade d'activation de voies de signalisation dans les cellules mammaires, y compris la cascade des ras/MAP kinase, celle de la phosphatidyl-inositol 3-kinase et de la phospholipase C. Les voies de transduction du signal du récepteur ErbB-2 convergent finalement vers le noyau, où il y a induction de l'expression de divers gènes.

Suite aux observations intéressantes obtenues avec l'activation de deux récepteurs membranaires par le  $\beta$ -HCH, nous avons entrepris de vérifier si cet effet se transmettait *via* la voie de signalisation des MAP kinases. Aux temps de traitement à l'étude, c'est-à-dire de 10 minutes à 4 heures, la quantité de protéine MEK ne semble pas modulée par



notre traitement. D'autres expériences sont présentement en cours dans le laboratoire du Dr Charbonneau afin de vérifier si l'activité (niveau de phosphorylation) de MEK serait elle altérée par une stimulation induite par le  $\beta$ -HCH.

La complexité des voies de signalisation de la famille des récepteurs à l'EGF est encore plus importante suite au fait que ces récepteurs peuvent former des hétérodimères et s'activer mutuellement selon un ligand particulier ou le type de récepteurs qu'exprime une cellule. Cette capacité d'interférence entre récepteurs est cruciale dans l'agressivité de certaines cellules mammaires car elle diversifie les signaux intracellulaires générés. Les changements phénotypiques incluent la modulation du récepteur ErbB-2, l'inhibition de la croissance des cellules tumorales, le renversement de la résistance des cytokines, la restauration des niveaux de cadherine-E et la diminution de la production de facteur de croissance endothélial (VEGF). D'autres protéines impliquées dans la transmission des signaux de phosphorylation devront également être investiguées. La connaissance de ces nouveaux mécanismes biologiques amènera de nouvelles voies de traitement dans la pathogenèse du cancer du sein.

Lors des immunobuvardages révélés avec l'anticorps anti-phosphotyrosine PY20, une bande intense, de poids moléculaire approximatif de 120 à 130 kDa, a été observée et celle-ci était fortement modulée à la hausse par un traitement de 10  $\mu$ M de  $\beta$ -HCH durant un temps d'exposition de 10 minutes. Fait intéressant, cette hausse de phosphorylation est réprimée par l'ajout dans le milieu d'un inhibiteur spécifique du récepteur ErbB-2 (AG-825). Parmi les protéines susceptibles de se retrouver dans cette bande à 120-130 kDa, on note la caténine p130Cas, elle-même impliquée dans la diminution de l'adhésion cellulaire et l'augmentation de la migration des cellules MDA-MB-468 (Hazan et Norton, 1998). La fonction de celle-ci serait altérée par l'activation du récepteur EGFR. De plus, ErbB-2 facilite l'invasion cellulaire en activant une kinase régulée de façon extracellulaire [*extracellular regulated kinase* (ERK)] et en se couplant à la protéine adaptatrice p130Cas qui régit le cytosquelette d'actine et de myosine des cellules en migration (Graus-Porta *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 2000). La surexpression de ErbB-2 sur des cellules d'adénocarcinomes mammaires serait même suffisante à elle seule pour

induire l'activation de ERK et de p130Cas menant à la migration cellulaire selon Spencer *et al.* (2000). Une autre étude a démontré qu'une forte expression de BRCA-1/p130Cas dans le cytoplasme de cellules tumorales mammaires primaires positives pour le récepteur à l'œstrogène correspondait avec un faible taux de réussite à un traitement au tamoxifène (van der Flier *et al.*, 2000).

Une autre candidate susceptible d'être la bande mystère à 120-130 kDa est la *protéine focal adhesion kinase* (p125FAK) En effet, une amplification de la phosphorylation de cette dernière a été observée dans des tissus pulmonaires néoplasiques mais non dans le tissu pulmonaire normal (Imaizumi *et al.*, 1997). Cette phosphorylation a été étroitement corrélée avec le temps de rémission de la maladie, suggérant que les voies de signalisation intracellulaires *via* la phosphorylation des tyrosines joue un rôle dans la progression et l'immortalisation du cancer du poumon. Or, la phosphorylation de cette protéine kinase d'adhésion focale a été également retrouvée chez des cellules épithéliales mammaires MCF-7 et celle-ci serait modulée par HRG, un substrat pour les récepteurs de la famille ErbB (Vadlamudi *et al.*, 2002). En sachant que HRG induit aussi la transcription et l'expression de la protéine G3BP dans les cellules mammaires tumorales MCF-7 et que G3BP est une protéine effectrice de la voie de signalisation induite par Ras (Barnes *et al.*, 2002), des avenues de recherche sont possibles afin de vérifier la modulation de cette protéine à la suite de traitements aux organochlorés.

Outre la modulation de ces protéines de poids moléculaire 120-130 kDa, d'autres molécules d'adhésion cellulaire de faible poids moléculaire, telles les connexines, pourraient être impliquées dans la diminution d'adhésion cellulaire et la migration cellulaire. L'activation du récepteur EGFR par la liaison à son ligand résulte en une interruption rapide et transitoire de la communication entre les jonctions lacunaires et une augmentation du niveau de phosphorylation de la connexine 43, activation dépendante de MAPK (Lau *et al.*, 1992; Kanemitsu et Lau, 1993; Warn-Cramer *et al.*, 1996).

Comme les populations humaines sont exposées à des mélanges de composés ayant des propriétés oestrogéniques ou non, il serait intéressant de considérer

éventuellement l'impact des effets combinés en utilisant un mélange de différents composés organiques halogénés dont les proportions viseraient à recréer celles retrouvées dans le lait maternel et les tissus humains. Une récente étude a d'ailleurs démontré l'effet synergique de l'*o,p'*-DDT, du *p,p'*-DDE, du *p,p'*-DDT et du  $\beta$ -HCH sur l'induction de la prolifération de cellules mammaires MCF-7 (Payne, Scholze et Kortenkamp, 2001).

## CONCLUSION

La présente étude s'inscrit dans le processus de connaissance des mécanismes de prolifération cellulaire afin de mieux évaluer les conséquences du  $\beta$ -HCH, un toxique environnemental sur la santé humaine, plus précisément dans leur implication au niveau de la cancérogenèse mammaire. Le présent travail se distingue des autres études puisqu'il s'est attardé à l'étude des effets prolifératifs d'un de ces xénobiotiques, le  $\beta$ -HCH, sur la signalisation cellulaire médiée par deux des récepteurs, le récepteur EGFR et le récepteur ErbB-2, dans un système clé, les cellules mammaires non tumorales *in vitro*.

Les résultats obtenus montrent que le  $\beta$ -HCH est mitogène *in vitro* pour des cellules mammaires non tumorigènes en culture et ce, à un niveau similaire à celui engendré par une stimulation par le 17- $\beta$  œstradiol. La prolifération cellulaire induite par le  $\beta$ -HCH est associée à une modulation de l'activité de récepteurs de la famille ErbB. Le présent travail constitue la première étude qui démontre que le récepteur ErbB-2 serait potentiellement activé par le  $\beta$ -HCH chez les MCF-10A et cette observation est compatible avec un effet pro-cancérogène de cet organochloré environnemental. L'effet du  $\beta$ -HCH serait également associé à des perturbations de signalisation cellulaire sous la dépendance de tyrosines kinases, mais il ne semble pas se transmettre par des changements dans la quantité de protéines MEK au temps de traitement à l'étude. Des études subséquentes devraient être entreprises pour tenter d'identifier la voie de signalisation induite, telle celle impliquant la protéine p130Cas.

La réalisation la plus importante de ces travaux est de fournir des résultats suggérant la plausibilité biologique d'un rôle du  $\beta$ -HCH dans la régulation des récepteurs EGFR et ErbB-2 dans des cellules épithéliales mammaires *in vitro*. Des données expérimentales *in vivo* sur les effets à long terme de concentrations physiologiques de  $\beta$ -HCH, seul ou en association avec d'autres organochlorés, retrouvées dans le tissu adipeux mammaire devraient être obtenues pour mieux quantifier cette action.

## RÉFÉRENCES

AHLBORG, U.G., L. Lipworth, L. Titus-Ernstoff, C.C. Hsieh, A. Hanberg, J. Baron, D. Trichopoulos et H.O. Adami. 1995. "Organochlorine Compounds in Relation to Breast Cancer, Endometrial Cancer, and Endometriosis: An Assessment of the Biological and Epidemiological Evidence". Critical Reviews in Toxicology, vol. 25, no. 6, p. 463-531.

AMADORI, D., M. Maltoni, A. Volpi, O. Nanni, E. Scarpi, B. Renault, N.S. Pellegata, M. Gaudio, E. Magni et G.N. Ranzani. 1997. "Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric carcinoma". Cancer, vol. 79, no. 2, p. 226-232.

AMES, B.N. et L.S. Gold. 1990. "Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, no. 19, p. 7772-7776.

ANAND, M., A.K. Agrawal, B.N. Rehmani, G.S. Gupta, M.D. Rana et P.K. Seth. 1998. "Role of GABA receptor complex in low dose lindane (HCH) induced neurotoxicity: neurobehavioural, neurochemical and electrophysiological studies". Drug and Chemical Toxicology, vol. 21, no. 1, p. 35-46.

ANDERSON, D., C.A. Koch, L. Grey, C. Ellis, M.F. Moran et T. Pawson. 1990. "Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors". Science, vol. 250, no. 4983, p. 979-982.

BACKE, J., A.M. Gassel, S. Krebs, T. Muller et H. Caffier. 1997. "Immunohistochemically detected HER-2/neu-expression and prognosis in endometrial carcinoma". Archives of Gynecology and Obstetrics, vol. 259, no. 4, p. 189-195.

BARKER, S., C. Panahy, J.R. Puddefoot, A.W. Goode et G.P. Vinson. 1989. "Epidermal growth factor receptor and oestrogen receptors in the non-malignant part of the cancerous breast". British Journal of Cancer, vol. 60, no. 5, p. 673-677.

BARNES, C.J., F. Li, M. Mandal, Z. Yang, A.A. Sahin et R. Kumar. 2002 "Heregulin Induces Expression, ATPase Activity, and Nuclear Localization of G3BP, a Ras Signaling Component, in Human Breast Tumors". Cancer Research, vol. 62, no. 5, p. 1251-1255.

BARNES, D.M., J. Bartkova, R.S. Campeljoh, W.J. Gullick, P.J. S nith et R.R. Millis. 1992. "Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein: why does this occur more frequently in ductal carcinoma in situ than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance?". European Journal of Cancer, vol. 128, no. 2-3, p. 644-648.

BASRI USTUNBAS, H., M.A. Ozturk, E. Hasanoglu et M. Dogan. 1994. "Organochlorine pesticide residues in human milk in Kayseri". Human and Experimental Toxicology, vol. 13, no. 5, p. 299-302.

BATTAGLIA, F., G. Scambia, S. Rossi, P.B. Panici, R. Bellantone, G. Polizzi, P. Querzoli, R. Negrini, S. Iacobelli et F. Crucitti. 1988. "Epidermal Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptors and axillary lymph node involvement". European Journal of Cancer & Clinical Oncology, vol. 24, no. 11, p. 1685-1690.

BELL, J.G., A. Minnick, G.C. Reid, J. Judis et M. Brownell. 1997. "Relationship of nonstaging pathological risk factors to lymph node metastasis and recurrence in clinical stage I endometrial carcinoma". Gynecologic Oncology, vol. 66, no. 3, p. 388-392.

BERCHUCK, A., A. Kamel, R. Whitaker, B. Kerns, G. Olt, R. Kinney, J.T. Soper, R. Dodge, D.L. Clarke-Pearson et P. Marks. 1990. "Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer". Cancer Research, vol. 50, no. 13, p. 4087-4091.

BERCHUCK, A., G. Rodriguez, R.B. Kinney, J.T. Soper, R.K. Dodge, D.L. Clarke-Pearson et R.C. Bast Jr. 1991. "Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease". American Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 164, no. 1, p. 15-21.

BERGER, M.S., C. Greenfield, W.J. Gullick, J. Haley, J. Downward, D.E. Neal, A.L. Harris et M.D. Waterfield. 1987. "Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours". British Journal of Cancer, vol. 56, no. 5, p. 533-537.

BERNSTEIN, J.J., A.V. Anagnostopoulos, E.A. Hattwick et E.R. Laws Jr. 1993. "Human-specific c-neu proto-oncogene protein overexpression in human malignant astrocytomas before and after xenografting". Journal of Neurosurgery, vol. 78, no. 2, p. 240-251.

BETTA, P.G., F. Robutti, G. Spinoglio et G. Bottero. 1989. "Expression of epidermal growth factor receptor in human breast carcinoma and its correlation with morphological and biological features of tumour aggressiveness". Pathologica, vol. 81, no. 1074, p. 425-431.

BHAT, H.K. et J.V. Vadgama. 2002. "Role of estrogen receptor in the regulation of estrogen induced amino acid transport of System A in breast cancer and other receptor positive tumor cells". International Journal of Molecular Medicine, vol. 9, no. 3, p. 271-279.

BOLLA, M., M. Chedin, C. Souvignet, J. Marron, C. Arnould et E. Chambaz. 1990. "Estimation of epidermal growth factor receptor in 177 breast cancers: correlation with prognostic factors". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 16, no. 2, p. 97-102.

BOLUFER, P., F. Miralles, A. Rodriguez, C. Vazquez, A. Lluch, J. Garcia-Conde et T. Olmos. 1990. "Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with cytosolic and nuclear ER receptors and with biological and histological tumor characteristics". European Journal of Cancer, vol. 26, no. 3, p. 283-290.

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. 248-254.

BUDAY, L. et J. Downward. 1993. "Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor". Cell, vol. 73, no. 3, p. 611-620.

BURDEN, S. et Y. Yarden. 1997. "Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis". Neuron, vol. 18, no. 6, p. 847-855.

CAPPELLETTI, V., M. Brivio, P. Miodini, G. Granata, D. Coradini et G. Di Fronzo. 1988. "Simultaneous estimation of epidermal growth factor receptors and steroid receptors in a series of 136 resectable primary breast tumors". Tumour Biology, vol. 9, no. 4, p. 200-211.

CARPENTER, G. et S. Cohen. 1979. "Epidermal Growth factor". Annual Reviews of Biochemistry, vol. 48, p. 193-216.

CHARBONNEAU, M., N. Lyrette et J.F. Côté. 1998. "Increased epidermal growth factor (EGF) phosphorylation in hexachlorobenzene (HCB)-induced mitogenesis of human mammary epithelial cells". Toxicological Sciences, vol. 42, p. 243.

CARUSO, M.L. et A.M. Valentini. 1996. "Immunohistochemical p53 overexpression correlated to c-erbB-2 and cathepsin D proteins in colorectal cancer". Anticancer Research, vol. 16, no. 6B, p. 3813-3818.

CHARPIN, C., B. Devictor, P. Bonnier, L. Andrac, M.N. Lavaut, C. Allasia et L. Piana. 1993. "Epidermal growth factor receptor in breast cancer: correlation of quantitative immunocytochemical assays to prognostic factors". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 25, no. 3, p. 203-210.

COHEN, B.D., J.M. Green, L. Foy et H.P. Fell. 1996. "HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. Evidence for HER1-HER4 heterodimers". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 9, p. 4813-4818.

COHEN, M.S. et B.L. Ellwein. 1990. "Cell proliferation in Carcinogenesis". Science, vol. 249, p. 1007-1011.

COHEN, S., H. Ushiro, C. Stoscheck et M Chinkers. 1982. "A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles". Journal of Biochemistry, vol. 257, no. 3, p. 1523-1531.

CONNOR, K., J. Howell, I. Chen, H. Liu, K. Berhane, C. Sciarretta, S. Safe et T. Zacharewski. 1996. "Failure of chloro-S-triazine-derived compounds to induce estrogen receptor-mediated responses in vivo and in vitro". Fundamental and applied toxicology, vol. 30, no. 1, p. 93-101.

COOMBES, R.C., P. Barrett-Lee et Y. Luqmani. 1990. "Growth factor expression in breast tissue". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 37, no. 6, p. 833-836.

COOSEN, R. et F.L. van Velsen. 1989. "Effects of the beta-isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 101, no. 2, p. 310-318.

DAVIDSON, N.E., E.P. Gelmann, M.E. Lippman et R.B. Dickson. 1987. "Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines". Molecular Endocrinology, vol. 1, no. 3, p. 216-223.

DAVIS, D.L., H.L. Bradlow, M. Wolff, T. Woodruff, D.G. Hoel et H. Anton-Culver. 1993. "Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer". Environmental Health Perspectives, vol. 101, no. 5, p. 372-377.

DAVIS, J.W., F.T. Lauer, A.D. Burdick, L.G. Hudson et S.W. Burchiel. 2001. "Prevention of Apoptosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the MCF-10A Cell Line: Correlation with Increased Transforming Growth Factor  $\alpha$  Production". Cancer Research, vol. 61, no. 8, p. 3314-3320.

DELARUE, J.C., S. Friedman, H. Mouriessse, F. May-Levin, H. Sancho-Garnier et G. Contesso. 1988. "Epidermal growth factor receptor in human breast cancers: correlation with estrogen and progesterone receptors". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 11, no. 2, p. 173-178.

DEMERS, A., P. Ayotte, J. Brisson, S. Dodin, J. Robert et E. Dewailly, E. 2000. "Risk and Aggressiveness of Breast Cancer in Relation to Plasma Organochlorine Concentrations" Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, vol. 9, p. 161-166.

DEMERS, A., P. Ayotte, J. Brisson, S. Dodin, J. Robert et E. Dewailly. 2002. "Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis". American Journal of Epidemiology, vol. 155, no. 7, p. 629-635.

DONG, L., W. Wang, F. Wang, M. Stoner, J.C. Reed, M. Harigai, I. Samudio, M.P. Kladdé, C. Vyhlidal et S. Safe. 1999. "Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, no. 5, p. 32099-32107.



- DORGAN, J.F., J.W. Brock, N. Rothman, L.L. Needham, R. Miller, H.E. Stephenson, N. Schussler et P.R. Taylor. 1999. "Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA)". Cancer Causes Control, vol. 10, no. 1, p. 1-11.
- DOWNWARD, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger et M.D. Waterfield. 1984. "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences". Nature, vol. 307, no. 5951, p. 521-527.
- DOWNWARD, J., P. Parker et M.D. Waterfield. 1984. "Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor". Nature, vol. 311, no. 5985, p. 483-485.
- DUHAYLONGSOD, F.G., M.R. Gottfried, J.D. Iglehart, A.L. Vaughn et W.G. Wolfe. 1995. "The significance of c-erb B-2 and p53 immunoreactivity in patients with adenocarcinoma of the esophagus". Annals of Surgery, vol. 221, no. 6, p. 677-684.
- EL-ASHRY, D. et M.E. Lippman. 1994. "Molecular biology of breast carcinoma". World Journal of Surgery, vol. 18, no. 1, p. 12-20.
- ELTABBAKH, G.H., J.L. Belinson, A.W. Kennedy, C.V. Biscotti, G. Casey et R.R. Tubbs. 1997. "p53 and HER-2/neu overexpression in ovarian borderline tumors". Gynecologic Oncology, vol. 65, no. 2, p. 218-224.
- 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 Biochemistry and Molecular Toxicology, vol. 12, no. 2, p. 83-92.
- ENGEL, J. 1997. Le cancer du sein et autres maladies du sein. Traduit par A.-C. Hatton. Laval, Québec : Guy Saint-Jean, 298 p.
- EPPENBERGER-CASTORI, S., D.H. Moore, A.D. Thor, S.M. Edgerton, W. Kueng, U. Eppenberger et C.C. Benz. 2002. "Age-associated biomarker profiles of human breast cancer". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 34, p. 1318-1330.
- FALCK, F., A. Ricci, 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. 143-146.
- FEKETE, M., J.L. Wittliff et A.V. Schally. 1989. "Characteristics and distribution of receptors for [D-TRP6]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer". Journal of Clinical Laboratory Analysis, vol. 3, no. 3, p. 137-147.

FERRERO, J.M., A. Ramaioli, R. Largillier, J.L. Formento, M. Francoual, F. Ettore, M. Namer et G. Milano. 2001. "Epidermal growth factor receptor expression in 780 breast cancer patients: A reappraisal of the pronostic value based on an eight-year median follow-up". Annals of Oncology, vol. 12, no. 6, p. 841-846.

FITZPATRICK, S.L., M.P. LaChance et G.S. Schultz. 1984. "Characterization of epidermal growth factor and action on human breast cancer cells in culture". Cancer Research, vol. 44, no. 8, p. 3442-3447.

FITZPATRICK, S.L., J. Brightwell, J.L. Wittliff, G.H. Barrows et G.S. Schultz. 1984. "Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterin receptor levels". Cancer Research, vol. 44, no. 8, p. 3448-3453.

FOEKENS, J.A., H. Portengen, W.L. van Putten, A.M. Trapman, J.C. Reubi, J. Alexieva-Figusch et J.G. Klijn. 1989. "Prognostic value of receptors for insulin-like growth factor 1, somatostatin, and epidermal growth factor in human breast cancer". Cancer Research, vol. 49, no. 24, p. 7002-7009.

FORMENTO, J.L., M. Francoual, P. Formento, M.C. Etienne, J.L. Fischel, M. Namer, M. Frenay, E. Francois et G. Milano. 1991. "Epidermal growth factor receptor assay: validation of a single point method and application to breast cancer". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 17, no. 3, p. 211-219.

GALLO, O., A. Franchi, I. Fini-Storchi, G. Cilento, V. Boddi, S. Boccuzzi et C. Urso. 1998. "Prognostic significance of c-erbB-2 oncoprotein expression in intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract". Head & Neck, vol. 20, no. 3, p. 224-231.

GASCO M., S. Shami et T. Crook. 2002. "The p53 pathway in breast cancer". Breast Cancer Research, vol. 4, no. 2, p. 70-76.

GASSEL, A.M., J. Backe, S. Krebs, S. Schon, H. Caffier et H.K. Muller-Hermelink. 1998. "Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long-term outcome". Journal of Clinical Pathology, vol. 51, no. 1, p. 25-29.

GAUDETTE, L.A., C.A. Altmayer, M. Wysocki, R.N. Gao et M. Wysockei. 1995. "Le point sur la mortalité par cancer du sein". Rapports sur la santé 1997, vol. 9, no. 1, p. 31-34.

GAUTAM, A.K., D.N. Gandhi, J.P. Jani, H. Venkatakrishna-Bhatt et A.R. Chowdhury. 1989. "Histological and pharmacological changes in vas deferens of rats exposed to hexachlorocyclohexane". Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, vol. 63, no. 3, p. 463-466.

GIANNONI, C., A.K. El-Naggar, N.G. Ordonez, Z.N. Tu, J. Austin, M.A. Luna et J.G. Batsakis. 1995. "c-erbB-2/neu oncogene and Ki-67 analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms". Otolaryngology-Head and Neck Surgery, vol. 112, no. 3, p. 391-398.

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.

GORDINIER, M.E., M.M. Steinhoff, J.W. Hogan, J.F. Peipert, W.H. Gajewski, S.S. Falkenberry et C.O. Granai. 1997. "S-Phase fraction, p53, and HER-2/neu status as predictors of nodal metastasis in early vulvar cancer". Gynecologic oncology, vol. 67, no. 2, p. 200-202.

GRAUS-PORTA, D., R.R. Beerli et N.E. Hynes. 1995. "Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling". Molecular and Cellular Biology, vol. 15, no. 3, p. 1182-1191.

GRIMAUX, M., S. Romain, Y. Remvikos, P.M. Martin et H. Magdelenat. 1989. "Prognostic value of epidermal growth factor receptor in node-positive breast cancer". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 14, no. 1, p. 77-90.

GRIMAUX, M., E. Mady, Y. Remvikos, C. Laine-Bidron et H. Magdelenat. 1990. "A simplified immuno-enzymetric assay of the epidermal growth factor receptor in breast tumors: evaluation in 282 cases". International journal of cancer, vol. 45, no. 2, p. 255-262.

GUÉRIN, M., M. Gabillot, M.C. Mathieu, J.P. Travagli, M. Spielmann, N. Andrieu et G. Riou. 1989. "Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance". International journal of cancer, vol. 43, no. 2, p. 201-208.

GUTTES, 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. 140-147.

HAINSWORTH, P.J., M.A. Henderson, R.G. Stillwell et R.C. Bennett. 1991. "Comparison of EGFR, c-erbB-2 product and ras p21 immunohistochemistry as prognostic markers in primary breast cancer". European Journal of Surgical Oncology, vol. 17, no. 1, p. 9-15.

HALEY, J., N. Whittle, P. Bennet, D. Kinchington, A. Ullrich et M. Waterfield. 1987. "The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription". Oncogene Research, vol. 1, no. 4, p. 375-396.

HAMEL, N.W., T.J. Sebo, T.O. Wilson, G.L. Keeney, P.C. Roche, V.J. Suman, T.C. Hu et K.C. Podratz. 1996. "Prognostic value of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in endometrial carcinoma". Gynecologic Oncology, vol. 62, no. 2, p. 192-198.

HARLOZINSKA, A., J.K. Bar, E. Sobanska et M. Goluda. 1997. "p53, c-erbB-2 and p21ras expression in tumor effusion cells of patients with histopathologically different ovarian neoplasms". Anticancer Research, vol. 17, no. 5A, p. 3545-3552.

HARRIS, A.L., S. Nicholson, R. Sainsbury, C. Wright et J. Farndon. 1992. "Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers". Journal of the National Cancer Institute, vol. 11, p. 181-187.

HARRIS, J., M. Morrow et L. Norton. 1997. "Malignant tumors of the breast". Dans Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5<sup>e</sup> édition. Éditeurs : V. T. DeVita, J.S. Hellman, et S.A. Rosenberg.

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.

HAZAN, R.B. et L. Norton. 1998. "The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 15, p. 9078-9084.

HELDEN, C.H. et B. Westermak. 1984. "Growth factors: mechanisms of action and relation to oncogens". Cell, vol. 37, p. 9-15.

HELZLSOUER, K. J., A.J. Alberg, H.-Y. Huang, S.C. Hoffman, P.T. Strickland, J.W. Brock, V.W. Burse, L.L. Needham, D.A. Bell, J.A. Lavigne, J.D. Yager et G.W. Comstock. 1999. "Serum concentrations of organochlorine compounds and the subsequent development of breast cancer". Cancer Epidemiology, biomarkers & prevention, p. 525-532.

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. 1816-1820.

HUETTNER, P.C., W.P. Carney, S.P. Naber, R.A. DeLellis, W. Membrino et H.J. Wolfe. 1992. "Neu oncogene expression in ovarian tumors: a quantitative study". Modern Pathology, vol. 5, no. 3, p. 250-256.

HUNTER, D.J., S.E. Hankinson, F. Laden, G.A. Colditz, J.E. Manson, W.C. Willett, F.E. Speizer et M.S. Wolff. 1997. "Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer". The New England Journal of Medicine, vol. 337, p. 1253-1258.

HURTWITZ, E., I. Stancovski, M. Sela et Y. Yarden. 1995. "Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, no. 8, p. 3353-3357.

IGNAR-TROWBRIDGE, D.M., C.T. Teng, K.A. Ross, M.G. Parker, K.S. Korach et J.A. McLachlan. 1993. "Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element". Molecular Endocrinology, vol. 7, no. 8, p. 992-998.

IMAZUMI M., M. Nishimura, S. Takeuchi, M. Murase et M. Hamaguchi. 1997. "Role of tyrosine specific phosphorylation of cellular proteins, especially EGF receptor and p125FAK in human lung cancer cells". Lung Cancer, vol. 17, no. 1, p. 69-84.

Institut national du Cancer du Canada. 2002. "Statistiques canadiennes sur le cancer 2002". Toronto, Canada.

IRISH, J.C. et A. Bernstein. 1993. "Oncogenes in head and neck cancer". Laryngoscope, vol. 103, no. 1, p. 42-52.

JAIN, P.T. et J.T. Pento. 1991. "A vehicle for the evaluation of hydrophobic compounds in cell culture". Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, vol. 74, no. 1, p. 105-116.

KAGEYAMA, R., G.T. Merlino et I. Pastan. 1988. "A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, vol. 85, no. 14, p. 5016-5020.

KANEMITSU, M.Y. et A.F. Lau. 1993. "Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase". Molecular Biology of the Cell, vol. 4, no. 8, p. 837-848.

KAPITANOVIC, S., S. Radosevic, M. Kapitanovic, S. Andelinovic, Z. Ferencic, M. Tavassoli, D. Primorac, Z. Sonicki, S. Spaventi, K. Pavelic et R. Spaventi. 1997. "The expression of p185 (HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer". Gastroenterology, vol. 112, no. 4, p. 1103-1113.

KARUNAGARAN, D., E. Tzahar, R.R. Beerli, X. Chen, D. Graus-Porta, B.J. Ratzkin, R. Seger, N.E. Hynes et Y. Yarden. 1996. "ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer". EMBO Journal, vol. 15, no. 2, p. 254-264.

KELCE, W.R., C.R. Stone, S.C. Laws, L.E. Gray, J.A. Kemppainen et E.M. Wilson. 1995. "Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist". Nature, vol. 375, no. 6532, p. 581-585.

KELSEY, J.L. et L. Bernstein. 1996. "Epidemiology and prevention of breast cancer". Annual Review Public Health; vol. 17, p.47-67.

KETTLES, M.K., S.R. Browning, T.S. Prince et S.W. Horstman. 1997. "Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties". Environmental Health Perspectives, vol. 105, no. 11, p. 1222-1227.

KIM, Y.J., H.D. Ghu, D.Y. Kim, H.J. Kim, S.K. Kim et C.S. Park. 1993. "Expression of cellular oncogenes in human gastric carcinoma: c-myc, c-erb B2, and c-Ha-ras". Journal of Surgical Oncology, vol. 54, no. 3, p. 167-170.

KING, C.R., I. Borrello, F. Bellot, P.Comoglio et J. Schlessinger. 1988. "Egf binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the erbB-2 protein in the mammary tumor cell line SK-BR-3". EMBO Journal, vol. 7, no. 6, p.1647-1651.

KLAPPER, L.N., M.H. Kirschbaum, M. Sela et Y. Yarden. 2000. "Biochemical and clinical implications of the ErB/HER signaling network of growth factor receptors". Advances in Cancer Research, vol. 77, p. 25-79.

KLIJN, J.G., M.P. Look, H. Portengen, J. Alexieva-Figusch, W.L. van Putten et J.A. Foekens. 1994. "The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 29, no. 1, p. 73-83.

KLOTZ, D.M., B.L. Ladlie, P.M. Vonier, J.A. McLachlan et S.F. Arnold. 1997. "o,p'-DDT and its metabolites inhibit progesterone-dependent responses in yeast and human cells". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 129, no. 1, p. 63-71.

KOCH, C.A., D. Anderson, M.F. Moran, C. Ellis et T. Pawson. 1991. "SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins". Science, vol. 252, no. 5006, p. 668-674.

KOENDERS, P.G., L.V. Beex, A. Geurts-Moespot, J.J. Heuvel, C.B. Kienhuis et T.J. Benraad. 1991. "Epidermal growth factor receptor-negative tumors are predominantly confined to the subgroup of estradiol receptor-positive human primary breast cancers". Cancer Research, vol. 51, no. 17, p. 4544-4548.

KOHLBERGER, P., A. Loesch, H. Koelbl, G. Breitenecker, C. Kainz et G. Gitsch. 1996. "Prognostic value of immunohistochemically detected HER-2/neu oncoprotein in endometrial cancer". Cancer Letters, vol. 98, no. 2, p. 151-155.

KOKAI, Y., J.A. Cohen, J.A. Drebin et M.I. Greene. 1987. "Stage- and tissue-specific expression of the neu oncogene in rat development". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 84, no. 23, p. 8498-5801.

KORACH, K.S. 1993. "Editorial: Surprising places of estrogenic activity". Endocrinology, vol. 132, no. 6, p. 2277-2278.

KORKOLOPOULOU, P., P.Christodoulou, P. Kapralos, M. Exarchakos, A. Bisbiroula, M. Hadjiyannakis, C. Georgountzos et E. Thomas-Tsagli. 1997. "The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer". Pathology Research and Practice, vol. 193, no. 11-12, p. 767-775.

KRIEGER, N., M.S. Wolff, R.A. Hiatt, M. Rivera, J. Vogelman et N. Orentreich. 1994. "Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women". Journal Of The National Cancer Institute, vol. 86, p. 589-599.

KRISTENSEN, G.B., R. Holm, V.M. Abeler et C.G. Trope. 1996. "Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study". Cancer, vol. 78, no. 3, p. 433-440.

KUHN, E.J., R.A. Kurnot, I.A. Sesterhenn, E.H. Chang et J.W. Moul. 1993. "Expression of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma". Journal of Urology, vol. 150, no. 5, partie 1, p. 1427-1433.

LADEN, F., G. Collman, K. Iwamoto, A.J. Alberg, G.S. Berkowitz, J.L. Freudenheim, S.E. Hankinson, K.J. Helzlsouer, T.R. Holford, H.Y. Huang, K.B. Moysich, J.D. Tessari, M.S. Wolff, T. Zheng et D.J. Hunter. 2001. "1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene and Polychlorinated Biphenyls and Breast Cancer: Combined Analysis of Five U.S. Studies". Journal of the National Cancer Institute, vol. 93, no. 10, p. 768-775.

LAU, A.F., M.Y. Kanemitsu, W.E. Kurata, S. Danesh et A.L. Boynton. 1992. "Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine". Molecular Biology of the Cell, vol. 3, no. 8, p. 865-874.

LAYFIELD, L.J., J.K. Thompson, R.K. Dodge et B.J. Kerns. 1995. "Prognostic indicators for neuroblastoma: stage, grade, DNA ploidy, MIB-1-proliferation index, p53, HER-2/neu and EGFr-a survival study". Journal of Surgical Oncology, vol. 59, no. 1, p. 21-27.

LEVITZKI, A. et A. Gazit. 1995. "Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development". Science, vol. 267, no. 5205, p. 1782-1788.

LEWIS, S., A. Locker, J.H. Todd, J.A. Bell, R. Nicholson, C.W. Elston, R.W. Blamey et I.O. Ellis. 1990. "Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma". Journal of Clinical Pathology, vol. 43, no. 5, p. 385-389.

LEYLAND-JONES, B. 2002. "Trastuzumab: hopes and realities". Lancet Oncology, vol. 3, no. 3, p. 137-144.

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, vol. 7, p. 135-140.

LIPPONEN, H.J., S. Aaltomaa, S. Syrjanen et K. Syrjanen. 1993. "c-erbB-2 oncogene related to p53 expression, cell proliferation and prognosis in breast cancer". Anticancer Research, vol. 13, no. 4, p. 1147-1152.

LIPPONEN, P., M. Eskelinen, S. Syrjanen, A. Tervahauta et K. Syrjanen. 1991. "Use of immunohistochemically demonstrated c-erb B-2 oncoprotein expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder". European Urology, vol. 20, no. 3, p. 238-242.

LLORENS, M.A., M.J. Bermejo, M.C. Salcedo, A.L. Charro et M. Puente. 1989. "Epidermal growth factor receptors in human breast and endometrial carcinomas". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 34, no. 1-6, p. 505-509.

LONARDO, F., E. Di Marco, C.R. King, J.H. Pierce, O. Segatto, S.A. Aaronson et P.P. Di Fiore. 1990. "The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand". New Biology, vol. 2, no. 11, p. 992-1003.

LONN, U., S. Lonn, U. Nylen, S. Friberg et B. Stenkvis. 1993. "Gene amplification detected in carcinoma cells from human urinary bladder washings by the polymerase chain reaction method". Cancer, vol. 71, no. 11, p. 3605-3610.

LOPEZ-CARRILLO, L., Blair A., M. Lopez-Cervantes, M. Cebrian., C. Rueda, R. Reyes, A. Mohar et J. Bravo. 1997. "Dichlorodiphenyltrichloroethane serum levels and breast cancer risk: a case-control study from Mexico". Cancer Research, vol. 57, p. 3728-3732.

LUKES, A.S., M.F. Kohler, C.F. Pieper, B.J. Kerns, R. Bentley, G.C. Rodriguez, J.T. Soper, D.L. Clarke-Pearson, R.C. Bast Jr et A. Berchuck. 1994. "Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer". Cancer, vol. 73, no.9, p. 2380-2385.

LUTTRELL, D.K., A. Lee, T.J. Lansing, R.M. Crosby, K.D. Jung, D. Willard, M. Luther, M. Rodriguez, J. Berman et T.M. Gilmer. 1994. "Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, no. 1, p. 83-87.



LYRETTE, N. 1998. Modulation de la prolifération cellulaire par les organochlorés dans les cellules épithéliales mammaires humaines. Mémoire de maîtrise, INRS-Santé, Pointe-Claire.

MACK, L., N. Kerkvliet, G. Doig et F.P. O'Malley. 1997. "Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erb B2, bcl-2, and ki-67". Human Pathology, vol. 28, no. 8, p. 974-979.

MEDEN, H., D. Marx, W. Rath, M. Kron, A. Fattahi-Meibodi, B. Hinney, W. Kuhn et A. Schauer. 1994. "Overexpression of the oncogene c-erb B2 in primary ovarian cancer: evaluation of the prognostic value in a Cox proportional hazards multiple regression". International journal of Gynaecological pathology, vol. 13, no. 1, p. 45-53.

MITRA, A.B., V.V. Murty, M. Pratap, P. Sodhani et R.S. Chaganti. 1994. "ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix". Cancer Research, vol. 54, no. 3, p. 637-639.

MUSSALO-RAUHAMAA, H., E. Hasanen, H. Pyysalo, K., Antervo, R. Kauppila et P. Pantzar. 1990. "Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients". Cancer, vol. 66, no. 10, p. 2124-2128.

NATALI, P.G., M.R. Nicotra, A. Bigotti, I. Ventura, D.J. Slamon, B.M. Fendly et A. Ullrich. 1990. "Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues". International journal of cancer, vol. 45, no. 3, p. 457-461.

NDUBISI, B., S. Sanz, L. Lu, E. Podczaski, G. Benrubi et S. Masood. 1997. "The prognostic value of HER-2/neu oncogene in cervical cancer". Annals of Clinical and Laboratory Science, vol. 27, no. 6, p. 396-401.

NICHOLSON, S., J. Richard, C. Sainsbury, P. Halcrow, P. Kelly, B. Angus, C. Wright, J. Henry, J.R. Farndon et A.L. Harris. 1991. "Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup". British Journal of Cancer, vol. 63, no. 1, p. 146-150.

OOI, A., M. Kobayashi, M. Mai et I. Nakanishi. 1998. "Amplification of c-erbB-2 in gastric cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence in situ hybridization". Laboratory Investigation, vol. 78, no. 3, p. 345-351.

OREN, M. 1985. "The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties". Biochimica et biophysica acta, vol. 823, no. 1, p. 67-78.

OSBORNE, C.K., B. Hamilton, G. Titus et R.B. Livingston. 1980. "Epidermal growth factor stimulation on human breast cancer cells in culture". Cancer Research, vol. 40, no. 7, p. 2361-2366.

OSHEROV, N., A. Gazit, C. Gilon et A. Levitzki. 1993. "Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrophostins". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 15, p. 11134-11142.

PAWSON, T. et G. D. Gish. 1992. "SH2 and SH3 domains: from structure to function". Cell, vol. 71, no. 3, p. 359-362.

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. 391-397.

PEKONEN, F., S. Partanen, T. Makinen et E.M. Rutanen. 1988. "Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor I and their relation to steroid receptors in human breast cancer". Cancer Research, vol. 48, no. 5, p. 1343-1347.

PELES, E., R.B. Levy, E. Or, A. Ullrich et Y. Yarden. 1991. "Oncogenic forms of the neu/HER2 tyrosine kinase are permanently coupled to phospholipase C gamma". EMBO Journal, vol. 10, no. 8, p. 2077-2086.

PELICCI, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McClade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson et P.G. Pelicci. 1992. "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction". Cell, vol. 70, no. 1, p. 93-104.

PEREZ, R., M. Pascual, A. Macias et A. Lage. 1984. "Epidermal growth factor receptors in human breast cancer". Breast Cancer Research and Treatment, vol.4, no.3, p. 189-193.

PEYRAT, J.P., J. Bonnetterre, B. Vandewalle, J. Djiane et J. Lefebvre. 1984. "EGF receptors in human breast cancers; relation to hormonal receptors". Annales d'Endocrinologie, vol. 45, no. 6, p. 412-413.

PIERCE, J.H., P. Arnstein, E. DiMarco, J. Artrip, M.H. Kraus, F. Lonardo, P.P. Di Fiore et S.A. Aaronson. 1991. "Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells". Oncogene, vol. 6, no. 7, p. 1189-1194.

PRASAD, A.K., N. Pant, S.C. Srivastava, R.Kumar et S.P. Srivastava. 1995. "Effect of dermal application of hexachlorocyclohexane (HCH) on male reproductive system of rat". Human and Experimental Toxicology, vol. 14, no. 6, p. 484-488.

PRESS, M.F., M.C. Pike, G. Hung, J.Y. Zhou, Y. Ma, J. George, J. Dietz-Band, W. James, D.J. Slamon et J.G. Batsakis. 1994. "Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis". Cancer Research, vol. 54, no. 21, p. 5675-5682.

REDDY, K.B., G.L. Mangold, A.K. Tandon, T. Yoneda, G.R. Mundy, A. Zilberstein et C.K. Osborne. 1992. "Inhibition of breast cancer cell growth in vitro by a tyrosine kinase inhibitor". Cancer Research, vol. 52, no. 13, p. 3636-3641.

REESE, D.M. et D.J. Slamon. 1997. "HER-2/*neu* Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer". Stem Cells, vol. 15, no. 1, p. 1-8.

SADASIVAN, R., R. Morgan, S. Jennings, M. Austenfeld, P. Van Veldhuizen, R. Stephens et M. Noble. 1993. "Overexpression of Her-2/*neu* may be an indicator of poor prognosis in prostate cancer". Journal of Urology, vol. 150, no. 1, p. 126-131.

SAEKI, T., D.S. Salomon, G.R. Johnson, W.J. Gullick, K. Mandai, K. Yamagami, S. Moriwaki, M. Tanada, S. Takashima et E. Tahara. 1995. "Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas". Japanese Journal of Clinical Oncology, vol. 25, no. 6, p. 240-249.

SAHOO, A., L. Samanta, A. Das, S.K. Patra et G.B. Chainy. 1999. "Hexachlorocyclohexane-induced behavioural and neurochemical changes in rat". Journal of Applied Toxicology, vol. 19, no. 1, p. 13-18.

SAINSBURY, J.R.C., G.V. Sherbet, J.R. Farndon et A.L. Harris. 1985. "Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer". Lancet, vol. 1, no. 8425, p. 364-366.

SAINSBURY, J.R., J.R. Farndon, G.K. Needham, A.J. Malcolm et A.L. Harris. 1987. "Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer". Lancet, vol. 1, no. 8547, p. 1398-1402.

SANTÉ CANADA, 2002. [http://www.hcsc.gc.ca/ehp/dhm/catalogue/generale/votre\\_sante/cancer\\_chimiques.htm](http://www.hcsc.gc.ca/ehp/dhm/catalogue/generale/votre_sante/cancer_chimiques.htm)

SCHIMMELPENNING, H., E.T. Eriksson, U.G. Falkmer, E. Azavedo, G. Svane et G.U. Auer. 1992. "Expression of the c-erbB-2 proto-oncogene product and nuclear DNA content in benign and malignant human breast parenchyma". Virchows Archives A Pathological Anatomy and Histopathology, vol. 420, no. 5, p. 433-440.

SCHECTER A., P. Toniolo, L.C. Dai, L.T. Thuy et M.S. Wolff. 1997. "Blood levels of DDT and breast cancer risk among women living in the north of Vietnam". Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 33, no. 4, p. 453-456.

SCHWECHHEIMER, K., R.M. Laufle, W. Schmahl, M. Knodlseder, H. Fischer et H. Hofler. 1994. "Expression of neu/c-erbB-2 in human brain tumors". Human Pathology, vol. 25, no. 8, p. 772-780.

SEGATTO, O., G. Pelicci, S. Giuli, G. Digiesi, P.P. Di Fiore, J. McGlade, T. Pawson et P.G. Pelicci. 1993. "Shc products are substrates of erbB-2 kinase". Oncogene, vol. 8, no. 8, p. 2105-2112.

SHEFFIELD, L.G. 1998. "C-Src activation by ErbB2 leads to attachment-independent growth of human breast epithelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 250, no. 1, p. 27-31.

SHEN, K. et R.F. Novak. 1997. "DDT stimulates c-erbB2, c-met, and STATS tyrosine phosphorylation, Grb2-Sos association, MAPK phosphorylation, and proliferation of human breast epithelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 231, p. 17-21.

SHIRAI, H., E. Ueno, M. Osaki, S. Tatebe, H. Ito et N. Kaibara. 1995. "Expression of growth factors and their receptors in human early colorectal carcinomas: immunohistochemical study". Anticancer Research, vol. 15, no. 6B, p. 2889-2894.

SLAMON, D.J., W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove et A. Ullrich. 1989. "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer". Science, vol. 244, no. 4905, p. 707-712.

SLIWKOWSKI, M.X., J.A. Lofgren, G.D. Lewis, T.E. Hotaling, B.M. Fendly et J.A. Fox. 1999. "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)". Seminars in Oncology, vol. 26, no. 4, suppl. 12, p. 60-70.

SMITH, C.L. 1998. "Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways". Biology of Reproduction, vol. 58, no. 3, p. 627-632.

SOULE, H.D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert et M. Brennan. 1973. "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". Journal of the National Cancer Institute, vol. 51, no. 5, p. 1409-1416.

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. 6075-6086.

SPENCER, K.S.R., D. Graus-Porta, J. Leng, N.E. Hynes et R.L. Klemke. 2000. "ErbB2 Is Necessary for Induction of Carcinoma Cell Invasion by ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases". The Journal of Cell Biology, vol. 148, no. 2, p. 385-397.

STEINMETZ, R., P.C. Young, A. Caperell-Grant, E.A. Gize, B.V. Madhukar, N. Ben-Jonathan et R.M. Bigsby. 1996. "Novel estrogenic action of the pesticide residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells". Cancer Research, vol. 56, no. 23, p. 5403-5409.

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, p. 1241-1249.

STUMM, G., S. Eberwein, S. Rostock-Wolf, H. Stein, S. Pomer, J. Schlegel et R. Waldherr. 1996. "Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis". International Journal of Cancer, vol. 69, no. 1, p. 17-22.

SUO, Z., E. Emilsen, K.M. Tveit et J.M. Nesland. 1998. "Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions". Histopathology, vol. 33, no. 6, p. 514-521.

TAIT, L., H.D. Soule et J. Russo. 1990. "Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10". Cancer Research, vol. 50, no. 18, p. 6087-6094.

TANNHEIMER, S.L., S.P. Ethier, K.K. Caldwell et S.W. Burchiel. 1998. "Benzo[a]pyrene- and TCDD-induced alterations in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line". Carcinogenesis, vol. 19, no. 7, p. 1291-1297.

TEMIN, H.M. 1988. "Evolution of cancer genes as a mutation-driven process". Cancer Research, vol. 48, no. 7, p.1697-1701.

TERVAHAUTA, A., M. Eskelinen, S. Syrjanen, P. Lipponen, P. Pajarinen et K. Syrjanen. 1991. "Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 oncoprotein expression in female breast cancer and its prognostic significance". Anticancer Research, vol. 11, no. 5, p. 1677-1681.

TOI, M., Y. Hamada, T. Nakamura, H. Mukaida, S. Suehiro, T. Wada, T. Toge, M. Niimoto et T. Hattori. 1989. "Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer tissues: relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion". International Journal of Cancer, vol. 43, no. 2, p. 220-225.

TOMATIS, L. 1993. "Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report". Environmental Health Perspectives, vol. 101, suppl. 5, p. 149-152.

TSUTSUI, S., S. Ohno, S. Murakami, Y. Hachitanda et S. Oda. 2002. "Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer". Breast Cancer Research and Treatment, vol. 71, p. 67-75.

TZAHAR, E. et Y. Yarden. 1998. "The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1377, no. 1, p. 25-37.

VADLAMUDI, R.K., L. Adam, D. Nguyen, M. Santos et R. Kumar. 2002. "Differential regulation of components of the focal adhesion complex by heregulin: role of phosphatase SHP-2". Journal of Cell Physiology, vol. 190, no. 2, p.189-199.

VAIDYA, P., Y. Kawarada, T. Higashiguchi, T. Yoshida, T. Sakakura et R. Yatani. 1996a. "Overexpression of different members of the type 1 growth factor receptor family and their association with cell proliferation in periampullary carcinoma". Journal of Pathology, vol. 178, no. 2, p. 140-145.

VAIDYA, P., T. Yosida, T. Sakakura, R. Yatani, T. Noguchi et Y. Kawarada. 1996b. "Combined analysis of expression of c-erbB-2, Ki-67 antigen, and tenascin provides a better prognostic indicator of carcinoma of the papilla of Vater". Pancreas, vol. 12, no. 2, p. 196-201.

VAN AGTHOVEN, T., T.L. van Agthoven, H. Portengen, J.A. Foekens et L.C. Dorssers LC. 1992. "Ectopic expression of epidermal growth factor receptors induces hormone independence in ZR-75-1 human breast cancer cells". Cancer Research, vol. 52, no. 18, p. 5082-5088.

VAN DER FLIER, S., C.M. Chan, A. Brinkman, M. Smid, S.R. Johnston, L.C. Dorssers et M. Dowsett. 2000. "BCAR1/p130Cas expression in untreated and acquired tamoxifen-resistant human breast carcinomas". International Journal of Cancer, vol. 89, no. 5, p. 465-468.

VAN DER GEER, P., T. Hunter et R.A. Lindberg. 1994. "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways". Annual Review of Cell Biology, vol. 10, p. 251-337.

VAN DE VIJVER, M.J., J.L. Peterse, W.J. Mooi, P. Wisman, J. Lomans, O. Dalesio et R. Nusse. 1988. "Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer". The New England Journal of Medicine, vol. 319, no. 19, p. 1239-1245.

WAKELING, A.E., R. Nicholson et J.M. Gee. 2001. "Prospects for combining hormonal and nonhormonal growth factor inhibition". Clinical Cancer Research, vol. 7, no. 12, p. 4350-4355.

WALSH, L.P. et D.M. Stocco. 2000. "Effects of lindane on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression". Biology of Reproduction, vol. 63, no. 4, p.1024-1033.

WARD, E.M., P. Schulte, B. Grajewski, A. Andersen, D.G. Patterson, W. Turner, E. Jellum, J.A. Deddens, J. Friedland, N. Roeleveld, M. Waters, M.A. Butler, E. DiPietro et L.L. Needham. 2000. "Serum Organochlorine Levels and Breast Cancer: A Nested Case-Control Study of Norwegian Women". Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, vol. 9, p. 1357-1367.

WARN-CRAMER, B.J., P.D. Lampe, W.E. Kurata, M.Y. Kanemitsu, L.W.M. Loo, W. Eckhart et A.F. Lau. 1996. "Characterization of the Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on the Connexin-43 Gap Junction Protein". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 7, p. 3779-3786.

- WILSON, M.A. et S.A. Chrysogelos. 2002. "Identification and characterization of a negative regulatory element within the epidermal growth factor receptor gene first intron in hormone-dependent breast cancer cells". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 85, no. 3, p. 601-614.
- 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. 648-652.
- WONG, Y.F., T.K. Chung, T.H. Cheung, S.K. Lam, O.S. Tam, H.J. Lu, F.D. Xu et A.M. Chang. 1996. "HER-2/neu gene amplification in cervical cancer in Chinese women of Hong Kong and China". Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, vol. 22, no. 2, p. 171-175.
- WRBA, F., A. Reiner, E. Ritzinger, J.H. Holzner et G. Reiner. 1988. "Expression of epidermal growth factor receptors (EGFR) on breast carcinomas in relation to growth fractions, estrogen receptor status and morphological criteria. An immunohistochemical study". Pathology Research and Practice, vol. 183, no. 1, p. 25-29.
- WU, M.S., C.T. Shun, J.C. Sheu, H.P. Wang, J.T. Wang, W.J. Lee, C.J. Chen, T.H. Wang et J.T. Lin. 1998. "Overexpression of mutant p53 and c-erbB-2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stages". Journal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 13, no. 3, p. 305-310.
- WYSS, R., D. Fabro, R. Regazzi, C. Borner, A. Takahashi et U. Eppenberger. 1987. "Phorbol ester and epidermal growth factor receptors in human breast cancer". Anticancer Research, vol. 7, no.4B, p. 721-727.
- YANG, J.L., J.R. Hanley, Y. Yu, C.R. Berney, P.J. Russell et P.J. Crowe. 1997. "In vivo overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in xenografts of mice implanted with human colon cancer lines". Anticancer Research, vol. 17, no. 5A, p. 3463-3468.
- YARDEN, R.I., A.H. Lauber, D. El-Ashry et S.A. Chrysogelos. 1996. "Bimodal Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor by Estrogen in Breast Cancer Cells". Endocrinology, vol. 137, no. 7, p. 2739-2747.
- YARDEN, Y. et J. Schlessinger. 1985. "The EGF receptor kinase: evidence for allosteric activation and intramolecular self-phosphorylation". Ciba Foundation Symposium, vol. 116, p. 23-45.
- YARDEN, R.I., M.A. Wilson et S.A. Chrysogelos. 2001. "Estrogen Suppression of EGFR Expression in Breast Cancer Cells: A Possible Mechanism to Modulate Growth". Journal of Cellular Biochemistry Supplement, vol. 36, p. 232-246.
- YARDEN, Y. et M.X. Sliwkowski. 2001. "Untangling the ErbB signalling network". Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 2, no. 2, p. 127-137.

YONEMURA, Y., I. Ninomiya, K. Tsugawa, S. Fushida, T. Fujimura, I. Miyazaki, T. Uchibayashi, Y. Endou et T. Sasaki. 1998. "Prognostic significance of c-erbB-2 gene expression in the poorly differentiated type of adenocarcinoma of the stomach". Cancer Detection and Prevention, vol. 22, no. 2, p. 139-146.

ZAFRANI, B., A. Leroyer, A. Fourquet, M. Laurent, D. Trophilme, P. Validire et X. Sastre-Garau. 1994. "Mammographically-detected ductal in situ carcinoma of the breast analyzed with a new classification. A study of 127 cases: correlation with estrogen and progesterone receptors, p53 and c-erbB-2 proteins, and proliferative activity". Seminars in Diagnostic Pathology, vol. 11, no. 3, p. 208-214.

ZHANG, X.H., I. Takenaka, C. Sato et H. Sakamoto. 1997. "p53 and HER-2 alterations in renal cell carcinoma". Urology, vol. 50, no. 4, p. 636-642.

ZHAU, H.E., X. Zhang, A.C. von Eschenbach, K. Scorsone, R.J. Babaian, J.Y. Ro et M.C. Hung. 1990. "Amplification and expression of the c-erb B-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer". Molecular Carcinogenesis, vol. 3, no. 5, p. 254-257.

ZHENG, T., T.R. Holford, S.T. Mayne, P.H. Owens, B. Ward, D. Carter, R. Dubrow, S.H. Zahm, P. Boyle et J. Tessari. 1999a. "Beta-benzene hexachloride in breast adipose tissue and risk of breast carcinoma". Cancer, vol. 85, no. 10, p. 2212-2218.

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. 1999b. "Environmental exposure to hexachlorobenzene (HCB) and risk of female breast cancer in Connecticut". Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, vol. 8, p. 407-411.