

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Institut National de la Recherche Scientifique
Laval, Québec

DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ DE LA TÉLOMÉRASE PAR DES MÉCANISMES DÉPENDANTS DU
RÉCEPTEUR AH (HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES) DANS DES CELLULES
MAMMAIRES CANCÉREUSES HUMAINES

Par
Sandra Pittet, B.Sc
Maîtrise en sciences expérimentales de la santé

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de *Magister Scientiæ* (M.Sc.)
septembre 2011

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Louis Gaboury Centre hospitalier de l'Université de Montréal Université de Montréal
Examineur interne	Dr Yves St-Pierre INRS-Institut Armand-Frappier Institut National de la Recherche Scientifique
Directeur de recherche	Dr Michel Charbonneau INRS-Institut Armand-Frappier Institut National de la Recherche Scientifique

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche Michel Charbonneau qui m'a d'abord accueilli en tant que stagiaire au sein de son équipe. J'ai été encadrée par un chercheur de grande expérience et qui a su me donner des conseils judicieux tout au long de mon parcours.

Je tiens également à remercier Mme Guylaine Lassonde avec qui j'ai développé une relation de collaboration sans égale. Merci également aux autres membres du laboratoire Andréa Scarino, Marc-André Verner, Hajer Jegham, Duong Letithuy, Marjolaine Miclette et Charly Larrieu avec qui j'ai partagé des expériences professionnelles et personnelles des plus captivantes et enrichissantes.

Je me dois également de souligner l'importance des innombrables conseils que m'ont donnés Julie Dufresne et Èvemie Dubé, membres de laboratoire de Dr Daniel Cyr. Je dois également mentionner l'importance qu'a eu l'ensemble des étudiants-chercheurs que j'ai cotoyés de même que les membres du corps professoral de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Merci à vous tous ; partager mon quotidien avec vous fut très agréable.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de ma famille et mes amis qui n'ont jamais cessé de m'appuyer et de m'encourager lors des dernières années. Vous êtes les premiers à avoir cru en mon potentiel et à avoir compris ce que j'étais en mesure d'accomplir. Vos encouragements continus m'ont permis de surmonter les obstacles qui se sont présentés et de mener à bien l'ensemble des projets que j'ai entamés. Merci pour tout!

Enfin, je tiens à remercier la Fondation Armand-Frappier et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour le soutien financier.

RÉSUMÉ

Le cancer du sein est la tumeur maligne féminine la plus importante à l'échelle mondiale et elle est surtout diagnostiquée dans les pays occidentaux. Même si de nos jours cette maladie est l'une des plus étudiée et qu'elle est conserve un bon pronostic, le cancer du sein fait des millions de victimes à travers le monde et l'étiologie demeure inconnue. Les polluants organiques persistants (POP) sont des composés lipophiles et ubiquitaires dont la présence dans notre environnement découle entre autres du développement industriel et comme ceux-ci se bio-accumulent dans la chaîne alimentaire, on les retrouve dans les tissus adipeux humains telle que la glande mammaire et il a été suggéré que les POP soient des agents procarcinogènes. Des études épidémiologiques de même que des études fondamentales effectuées avec des modèles de rongeurs ont toutefois démontré un rôle équivoque de ces polluants dans le développement de ces cancers chez l'humain, de sorte qu'il demeure impossible de statuer sur les effets des POP en ce qui à trait à la cancérogénèse mammaire humaine.

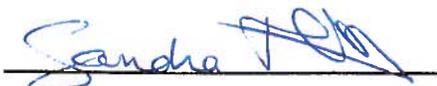
Un nombre croissant de travaux démontrent également que le récepteur des hydrocarbures polyaromatiques (Ah), classiquement associé aux effets pro-cancérigènes d'une sous-classe de POP, les hydrocarbures poly- et halogénés (PAH et HAH), peut induire des effets anti-cancérigènes. À cet effet, des résultats préliminaires ayant été obtenus dans notre laboratoire ont démontré que l'exposition de la lignée cellulaire mammaire humaine MCF-7 à un mélange de ligands du récepteur Ah inhibe tant la prolifération cellulaire que l'activité de la télomérase, une enzyme clé permettant la survie prolongée des les cellules cancéreuses. L'étude qui en a découlée est présentée dans ce mémoire et l'hypothèse générale avancée est que le récepteur Ah est essentiel aux effets anti-cancérigènes induits par les PAH et les HAH. L'objectif principal est de démontrer le lien mécanistique entre l'activation du récepteur Ah par ses ligands exogènes et l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'activité de la télomérase, deux paramètres majeurs parmi ceux influençant la cancérogénèse.

À l'instar de résultats obtenus avec la lignée mammaire MCF-7, l'exposition des lignées T47D et MDA-MB-231 à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), le plus fort ligand du récepteur Ah, inhibe la prolifération cellulaire et l'activité de la télomérase chez ces deux lignées mammaires humaines qui expriment le récepteur Ah. L'exposition des cellules T47D à d'autres solutions, composées de ligands du récepteur Ah tel des biphényles, furanes et dioxines

polychlorés (PCB, PCDD et PCDF), a également engendré un ralentissement de la prolifération cellulaire et une diminution l'activité enzymatique de la télomérase. L'exposition des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y, qui n'expriment pas le récepteur Ah, a quant à elle été sans effet sur la prolifération cellulaire et l'activité de la télomérase, ce qui à appuie l'hypothèse selon laquelle les effets anti-cancérigènes observés sont induits par les ligands du récepteur Ah lorsque le récepteur est exprimé.

La lignée cellulaire sélectionnée à titre de modèle sont les cellules mammaires T47D et les expériences subséquentes ont révélé la diminution du niveau du récepteur Ah dans la fraction cytoplasmique des cellules exposées à la TCDD, ce qui est corrélé à la diminution des niveaux d'ARNm de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), la sous-unité du complexe enzymatique reconnue comme l'élément limitant de l'activité enzymatique. Des éléments de réponse spécifiques au récepteur Ah, les *inhibitory Dioxin Response Elements* (iDRE), ont été détectés dans la séquence du gène TERT et les expériences de retard sur gel (EMSA) ont mises en évidence la liaison du récepteur Ah avec ces séquences lorsque les cellules sont exposées à la TCDD. De plus, il a été observé que l'induction de la diminution quantitative significative des niveaux d'expression du récepteur Ah (*knock down*), réalisée à l'aide d'ARN interférents (siRNA) entraîne la perte de l'effet inhibiteur de la TCDD sur la prolifération cellulaire et la transcription de la sous-unité hTERT, ce qui confirme la nécessité du récepteur Ah dans les effets anti-cancérigènes observés. L'implication d'autres protéines comme Akt et ErbB2 a également été démontré, tout comme de nombreuses modulations post-traductionnelles.

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire démontrent le potentiel anti-cancérigène du récepteur Ah, ce qui appuie la littérature émergente qui met en évidence un nouveau rôle pour le récepteur Ah. En effet, nos travaux démontrent que l'activation du récepteur Ah inhibe l'activité enzymatique de la télomérase et freine la prolifération cellulaire et ce, en absence de cytotoxicité. Cette étude est en soi une preuve de concept qui permet d'affirmer que le récepteur Ah est au cœur de voies signalétiques d'importances majeures et qu'il est une nouvelle cible thérapeutique potentiellement exploitable dans la lutte et la résolution de cancers mammaires chez l'humain.



Sandra Pittet, B.Sc.



Michel Charbonneau, Ph.D.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	ii
Résumé	iii
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Chapitre 1 : Revue de littérature	13
1.1 Le cancer du sein	13
1.1.1 Revue des statistiques.....	13
1.1.2 La classification des tumeurs	14
1.1.3 Les facteurs de risque.....	18
1.1.4 Les polluants environnementaux et le développement du cancer du sein	20
1.2 Le récepteur Ah	22
1.2.1 La famille du récepteur Ah.....	22
1.2.2 La structure du récepteur Ah.....	23
1.2.3 Les ligands du récepteur Ah.....	24
1.2.3.1 Les ligands exogènes	25
1.2.3.2 Les ligands endogènes.....	27
1.2.4 Les isoformes du récepteur Ah	29
1.2.5 Le polymorphisme du récepteur Ah humain	31
1.2.6 Les fonctions biologiques du récepteur Ah	33
1.2.6.1 La transcription génique dépendante du récepteur Ah.....	33
1.2.7 Le récepteur Ah et la régulation de la cancérogénèse	34
1.2.7.1 Les effets pro-carcinogènes du récepteur Ah.....	34
1.2.7.2 Les effets anti-carcinogènes du récepteur Ah.....	36
1.2.7.3 Les fonctions physiologiques dépendantes du récepteur Ah..	36
1.2.8 Le récepteur Ah et la cancérogénèse mammaire.....	37
1.3 La télomérase.....	38
1.3.1 La structure et les sous-unités de la télomérase	38
1.3.1.1 La sous-unité TER et ses protéines associées	38
1.3.1.2 La sous-unité TERT et ses protéines associées.....	40
1.3.2 Les rôles de la télomérase.....	42
1.3.2.1 La synthèse des télomères et leur rôle dans la longévité des cellules.....	42
1.3.2.2 Les rôles de la télomérase indépendants de la synthèse des télomères.....	44
1.3.3 La télomérase et la cancérogénèse.....	46
1.3.4 La régulation de l'activité enzymatique de la télomérase.....	47
1.3.4.1 La régulation de la transcription de TERT.....	47
1.3.4.2 L'épissage alternatif de hTERT	49

1.3.4.3	Les modifications post-traductionnelles de la sous-unité hTERT	51
1.3.4.4	L'assemblage du complexe enzymatique actif.....	52
1.4	Hypothèses et objectifs de recherche	53
Chapitre 2 :	Down-regulation of telomerase through Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)- dependant mechanisms in human breast cancer cells.....	54
2.1	Participation des auteurs au contenu de l'article	54
2.2	Résumé de l'article soumis traduit en français.....	54
2.3	L'article tel que soumis.....	56
2.3.1	Abstract	57
2.3.2	Introduction	58
2.3.3	Materials and Methods.....	60
2.3.4	Results.....	67
2.3.5	Discussion.....	78
2.3.6	Conclusion.....	84
2.3.7	Abbreviations	85
2.3.8	Keywords.....	85
2.3.9	Author's contribution.....	85
2.3.10	Competing conflicts.....	85
2.3.11	Acknowledgements.....	85
2.3.12	References	86
Chapitre 3 :	Discussion générale et conclusion.....	94
3.1	Les notions d'agoniste et d'antagoniste du récepteur Ah.....	94
3.2	La modulation de l'expression de gènes autres que hTERT.....	95
3.3	Les autres protéines du complexe impliquant le récepteur Ah.....	97
3.4	La télomérase et le cycle cellulaire.....	99
3.5	Conclusion.....	101
Références	102
Annexe I	119
Annexe II - Preuve de Soumission à la Revue Breast Cancer Research.....		120

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Introduction

- Figure 1.1 Schématisation de la structure et des domaines des protéines régulatrices de la transcription génique appartenant à la famille des bHLH/PAS. p.23
- Figure 1.2 Schématisation de la structure du récepteur Ah..... p.24
- Figure 1.3 Schématisation du squelette de la structure des PCDD, des PCDF et des BPC et structure de la 2,3,7,8-tétracholodibenzo-*p*-dioxine p.26
- Figure 1.4 Schématisation du squelette de ligands exogènes naturels du récepteur Ah, les membres de la famille des flavonoïdes : les flavones, les flavonols, les flavonones et les isoflavones..... p.27
- Figure 1.5 Structure de ligands endogènes potentiels du récepteur Ah dérivés du tryptophane..... p.28
- Figure 1.6 Structure des dérivés de l'hème (bilirubine et biliverdine), de l'indigo et de l'indirubine, des ligands endogènes potentiels du récepteur Ah..... p.29
- Figure 1.7 Schématisation des régions codantes du récepteur Ah humain..... p.31
- Figure 1.8 Schématisation du mécanisme de régulation de la transcription génique dépendant de l'activation du récepteur Ah par un ligand exogène..... p.34
- Figure 1.9 Schématisation de la sous-unité TER et de sa structure secondaire comprenant la séquence matrice d'ARN (CR1), le domaine pseudoknot CR2/CR3, le domaine de transactivation (CR4/CR5), le domaine box H/ACA (CR6/CR8) et le domaine CR7..... p.39
- Figure 1.10 Schématisation de la longueur des télomères dans des cellules où la télomérase est (a) absente ou inactive et dans des cellules où elle est (b) faiblement active ou activée de façon transitoire p.43

Chapitre 2 : Down-regulation of telomerase through Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)-dependent mechanisms in human breast cancer cells

- Figure 2.1 Effects of (A) PAH mixtures and (B) non AhR-ligands on cell proliferation and telomerase activity in T47D cells..... p.68
- Figure 2.2 Effect of TCDD on cytoplasmic levels of AhR and HSP90 in T47D cells exposed for (A) 24 h and (B) 6 d p.69
- Figure 2.3 (A) Characterization and (B) basal telomerase enzymatic activity in the human mammary cell lines T47D and MDA-MB-231 and in the neuroblastoma cell line SH-SH5Y..... p.70

Figure 2.4	Effects of TCDD (6 d exposure) on cell proliferation and telomerase enzymatic activity in human (A) T47D mammary cancer cells, (B) MDA-MB-231 mammary cancer cells and (C) SH-SY5Y neuroblastoma cells	p.71
Figure 2.5	Effects of TCDD (2 d exposure) on cell cycle and clonogenic activity in human mammary cancer cells	p.72
Figure 2.6	Effects of TCDD (1 to 72 h exposure) on hTERT mRNA level over time in human mammary T47D cells	p.73
Figure 2.7	Silencing of AhR in human mammary T47D cells	p.74
Figure 2.8	EMSA analyses for the Ah receptor in human mammary T47D cells.....	p.75
Figure 2.9	Effects of TCDD on TERT, Akt, ErbB2 and c-Myc in human mammary T47D cells	p.77

Chapitre 3 : Discussion générale

Figure 3.1	Schématisation des mécanismes dépendants du récepteur Ah dans les cellules cancéreuses mammaires T47D responsables de l'inhibition de l'activité de la télomérase	p.100
-------------------	--	--------------

Annexe I

Figure I.1	Effets de l'α-naphthoflavone et de la TCDD sur la prolifération et l'activité de la télomérase des cellules T47D	p.119
-------------------	---	--------------

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 : Introduction

Tableau 1.1 Liste des polymorphismes répertoriés pour le récepteur Ah humain..... p.32

Chapitre 2 : Down-regulation of telomerase through Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)-dependent mechanisms in human breast cancer cells

Table 2.1 Composition of the three polyhalogenated hydrocarbon mixtures used in this study..... p.67

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondriale
Ah	hydrocarbures aromatiques polycycliques
AhRE	Élément de réponse du récepteur Ah
Akt	Protéine tyrosine kinase « Akt »
ALT	<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Acide Aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH/PAS	motif structural <i>basic Helix-Loop-Helix</i> / domaine protéique PAS
BPC	Biphényles polychlorés
CDK	protéines kinases dépendantes des cyclines
c-Abl	protéine tyrosine kinase c-Abl
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRE	Éléments de réponse de la dioxine
DMBA	7,12-diméthylbenz[α]anthracène
DKC	Dyskératose congénitale
DDT	dichloro-diphényltrichloroéthane
E ₂	17 β -estradiol
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Récepteur des œstrogènes
EROD	Éthoxyrésorufine-o-dééthylase
EGFR	Récepteur des facteurs de croissance épidermiques
HER2/ERBB2 ou ErbB2	Récepteur de facteurs de croissance HER 2
FGF	Facteurs de croissances fibroblastiques
FICZ	6-formylindolo(3,2b)carbazole
Glu	Glutamine
HAH	Hydrocarbures aromatiques monohalogéné
HCB	Hexachlorobenzène
hTER	Sous-unité TER humaine
hnRNP	Ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires
HOP	protéine <i>Heat Shock Protein Organizing Protein</i>
HSP	protéines <i>Heat Shock Protein</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HH	Syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson
hTERT	sous-unité catalytique de la télomérase humaine

HIF	Facteurs inductibles de l'hypoxie
iDRE	Éléments de réponse inhibiteurs de la dioxine
Ile	Isoleucine
IARC	Centre International de Recherche sur le Cancer
IL-1	Interleukine 1
kDa	kilodaltons
kb	kilobases
LBD	Domaine de liaison du ligand
Lys	Lysine
MAPK	MAP kinases
MZF-2	<i>Myeloid-specific zinc finger protein 2</i>
N/D	Non déterminé
NLS	Signal de localisation nucléaire
NES	Signal d'exportation nucléaire
nM	nanomolaire
NPI	<i>Le Nottingham Prognostic Index</i>
PAH	Hydrocarbures aromatiques polyhalogénés
PCDD	Dioxines poly chlorées
PCDF	Furanes poly chlorées
pM	picomolaires
POP	Polluants organiques persistants
Pro	Proline
pb	paires de bases
PPA2	protéine phosphatase 2A
PKC	protéine kinase PKC
RB	Protéine du rétinoblastome
RT	Transcriptase inverse
RR	Risque relatif
SIM1	<i>Single Minded Protein 1</i>
SIM2	<i>Single Minded Protein 2</i>
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
Ser	Sérine
siRNA	ARN interférents
Sp1	facteur de transcription Sp1
snoRNA	ARN nucléolaires
TAD	Domaine de transactivation

TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TEF	Facteur d'équivalence toxique
TEP1	<i>Telomerase associated Protein 1</i>
TEQ	Quantité toxique équivalente
TER	Sous-unité de la télomérase contenant le substrat d'ARN
TERT	Sous-unité catalytique de la télomérase
Thr	Thréonine
TS5	Taux de survie à 5 ans
TGF-β	Le facteur de croissance transformant bêta
Tyr	Tyrosine
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Val	Valine
WT1	suppresseur de tumeurs <i>Wilm's tumor 1</i>
XRE	Éléments de réponses des xénobiotiques
μM	micromolaire
γ-HCH	Lindane
[¹²⁵ I]N3Br2DpD	(¹²⁵ I)-2-azido-3-iodo-7,8-dibromodibenzo- <i>p</i> -dioxine
[³ H]TCDD	2,3,7,8-Tétrachloro[1,6- ³ H]dibenzo- <i>p</i> -dioxine

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le cancer du sein

1.1.1 Revue des statistiques

Selon le rapport *Statistiques canadiennes sur le cancer 2010*, un document produit annuellement et conjointement par la Société Canadienne du Cancer, l'Institut national du cancer du Canada, Statistique Canada, le Registre du cancer des provinces et des territoires et l'Agence de santé publique du Canada (Société canadienne du cancer, 2010), rapporte que lorsque la totalité des causes de décès des canadiens sont considérées, 29,3% des décès sont attribuables au cancer. Plus spécifiquement, le cancer du sein est le plus répandu chez la femme lorsqu'on exclut les cancers de la peau autre que le mélanome. Pour 2010, les estimations faites rapportent que 23 200 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués et 5 300 femmes en sont décédées (Encyclopédie canadienne du cancer de la Société canadienne du cancer, 2011).

Le sujet particulier traité dans le rapport *Statistiques canadiennes sur le cancer 2007* est le cancer du sein et on y fait état de l'importance de cette maladie, notamment dans les pays industrialisés. Le cancer du sein y est présenté comme la tumeur maligne féminine la plus répandue mondialement, responsable de 7% des cas de décès par cancer à travers le monde, ce qui se chiffre à environ 532 000 décès. Toujours selon ce même rapport, le taux d'incidence du cancer du sein au Canada est l'un des plus importants au monde avec 104 nouveaux cas pour 100 000 habitants, un taux comparable à celui des autres pays occidentaux tels les États-Unis, les pays de l'Europe du Nord et l'Australie alors que les taux recensés pour l'Asie, l'Amérique latine et l'Afrique sont en deçà du tiers du taux recensé pour le Canada (Société canadienne du cancer, 2007).

Malgré le grand nombre de femmes atteintes de cette maladie, le cancer du sein conserve un bon pronostic avec des taux de survie à 5 ans (TS5) globaux de 86 % (Société canadienne du cancer, 2007) et 87% (Société canadienne du cancer, 2010) rapportés pour les années 2007 et 2010 respectivement. Toutefois, lorsque le TS5 est exprimé en fonction du stade de

développement du cancer au moment du diagnostic, les TS5 sont alors variables. Lorsque les cancers sont détectés aux stades I et II, les TS5 sont respectivement de 96% et 86%, alors qu'il diminue à 59% pour les cancers de stade III et atteint 26% pour les cancers de stade IV (Société canadienne du cancer, 2007). Le stade de développement du cancer au moment du diagnostic influence donc la survie des patientes, ce qui apporte une nuance importante lorsqu'il est question du pronostic de la maladie.

L'âge au moment du diagnostic est également un facteur qui affecte les tendances des taux d'incidence et de mortalité des Canadiennes. Lorsque toutes les tranches d'âge sont considérées, on note que l'incidence de la maladie, qui était en hausse depuis le début des années 1970 s'est stabilisée depuis 1999, alors que le taux de mortalité est en constante diminution depuis les années 1970. Lorsque l'on catégorise les patientes atteintes du cancer en fonction de leur âge, les tendances des taux d'incidence sont divergentes. Mises à part de légères fluctuations, les taux d'incidence sont généralement à la baisse pour les femmes âgées entre 20 et 59 ans de même que pour les femmes âgées de plus de 70 ans. Chez les femmes âgées entre 60 et 69 ans, le taux d'incidence a été en constante augmentation depuis 1989, bien qu'un renversement de cette tendance semble se dessiner depuis 2003 pour ce groupe (Société canadienne du cancer, 2007).

Bien que les quarante dernières années aient été marquées par des avancées majeures dans la compréhension et dans la lutte aux cancers mammaires, notamment par l'instauration de techniques de dépistage précoce et par le développement de traitements spécifiques, le cancer du sein demeure l'une des plus importantes causes de décès par cancer à travers le monde. Bien que le nombre d'études en tous genres (épidémiologiques, cliniques ou fondamentales) menées à ce jour est impressionnant, d'autres s'avèrent encore nécessaires puisque de nombreux phénomènes impliqués dans le développement, l'évolution et la résolution de la maladie demeurent incompris, notamment parce qu'il existe de nombreux types de cancer mammaires.

1.1.2 La classification des tumeurs

L'une des difficultés dans la lutte au cancer de sein est l'établissement d'une thérapeutique efficace puisqu'il s'agit d'une maladie hétérogène et qui concerne donc différents types cellulaires. Classiquement, les cancers du sein étaient classifiés selon des critères morphologiques et moléculaires, comme la taille de la tumeur, l'atteinte des ganglions lymphatiques, les niveaux des récepteurs endocriniens et l'amplification du gène du récepteur

du facteur de croissance épidermique ErbB2 (Perou et al. 2000; Dinh et al. 2007; Cianfrocca et al. 2009; Rakha et al. 2010; Schnitt 2010). Or, étant donné l'absence d'uniformité dans la réponse aux traitements octroyés, le besoin de mettre au point une classification plus précise des tumeurs mammaires est apparu comme une nécessité, de sorte que plusieurs systèmes de classifications qui sont continuellement sujets à changements ont été mis sur pied.

La première méthode de classification à avoir été utilisée reposait essentiellement sur l'approche proposée dans les années 1940 par Dr. Pierre Denoix. Elle permettait de classer les cancers de tous genres et en considérant trois critères : la taille de la tumeur, le niveau d'atteinte des ganglions lymphatiques et la présence de métastases (Sobin et al. 1988; Yamamoto et al. 1998; Veronesi et al. 2009). Cette méthode de classification est encore utilisée aujourd'hui et, en 2010 l'*Union for International Cancer Control* (UICC) publiait la septième édition du livre *TNM Classification of Malignant Tumours*, un ouvrage destiné aux professionnels de la santé et qui rapporte les dernières modifications globalement acceptées de cette méthode de classification. Le *Nottingham Prognostic Index* (NPI) a quant à lui été spécifiquement développé pour établir le pronostic d'un patient atteint d'un cancer mammaire primaire et opérable (Galea et al. 1992). Les facteurs considérés sont la taille de la tumeur, le niveau d'atteinte des ganglions lymphatiques, de même que l'évaluation histologique de la tumeur qui dépend de trois facteurs : le taux de tubules présents dans la tumeur, le pléomorphisme nucléaire et l'activité mitotique (Elston et al. 1991; Galea et al. 1992; Elston et al. 2002). L'utilisation du NPI s'est avéré un outil pratique pour lequel le taux de corrélation établi représente bien le pronostic du patient. Il est d'ailleurs utilisé au Royaume-Uni, dans les pays d'Europe, aux États-Unis et au Canada et l'UICC de même que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le recommande pour la classification dans les tumeurs mammaires (Elston et al. 2002). La tendance actuelle est également d'intégrer le profil d'expression génétique dans la classification des tumeurs mammaires, ce qui a mené à l'établissement de nouveaux sous-types tumoraux.

L'analyse du patron d'expression génique tumoral d'échantillons provenant de différents types de carcinomes (canaux infiltrants, canaux *in situ* et lobulaires) et de fibroadénomes ont d'abord permis à l'équipe de Perou et al. de mettre en évidence les variations nombreuses et multidimensionnelles dans l'expression génique des différents types de cancer (Perou et al. 2000), rendant l'établissement de paramètres généraux complexe. Ils ont tout de même établi quatre classes tumorales distinctes en fonction des patrons d'expression génique.

D'abord, ils ont subdivisé les tumeurs mammaires selon la surexpression des récepteurs aux œstrogènes (ER). Le premier type établi, le *ER+/luminal-like*, est caractérisé par la surexpression conjointe des ER et des gènes avec lesquels il est co-exprimés de par leur proximité physique sur le chromosome de même que par les nombreuses caractéristiques des cellules épithéliales luminales (Perou et al. 2000). Les tumeurs ER-, se subdivisent en deux groupes, le sous-type *ER/basal-like*, qui sont des tumeurs dont le patron d'expression génique comporte des similitudes avec les cellules épithéliales basales et/ou myoépithéliales et le sous-type *ER/ErbB2+* regroupant les tumeurs qui surexpriment le gène codant ErbB2 et les gènes co-exprimés avec ce dernier de part leur positionnement sur le chromosome (Perou et al. 2000). Enfin, ils ont décrit le type *normal breast-like*, caractérisé par l'expression forte de gènes typiques des cellules épithéliales basales et adipeuses et qui expriment très peu de gènes spécifiques aux cellules épithéliales luminales (Perou et al. 2000).

Des analyses subséquentes ont permis de mettre en évidence que le groupement *ER+/luminal-like*, peut être scindé en deux groupes, le sous-type luminal A, qui surexprime très fortement le gène du récepteur ER α , de même que les gènes *GATA binding protein 3*, *X-box binding protein 1*, *trefoil factor 3*, *hepatocyte nuclear factor 3 a*, et *estrogen-regulated LIV-1*, et le type luminal B, qui surexprime fortement ER α alors que les autres gènes sont exprimés modérément ou faiblement (Sorlie et al. 2001). L'éventuelle présence d'un troisième groupe, le type luminal C a aussi été proposée étant donné qu'un sous-groupe à l'intérieur du type luminal B se distingue par la surexpression d'un groupement de gènes surexprimés par les types *ER/basal-like* et *ER/ErbB2+* (Sorlie et al. 2001). Enfin, un septième sous-type, le *claudin-low*, a été décrit plus récemment par l'équipe de Herschkowitz et al. (Herschkowitz et al. 2007). Il se caractérise par l'absence des récepteurs hormonaux et du récepteur ErbB2, de la très faible expression des gènes des claudines 3, 4 et 7, des occludines et de la protéine E-cadhérine, qui sont impliquées dans les jonctions serrées et dans l'adhésion intercellulaire et par l'expression de nombreux marqueurs endothéliaux et lymphocytaires (Herschkowitz et al. 2007).

En outre, à ce jour six sous-types de tumeurs mammaires ont été retenus, soit les types *luminal A*, *luminal B*, *basal-like*, *claudin-low*, *HER2/ERBB2-overexpressing*, et *normal-breast-like*, ceux-ci tenant compte du profil de mutations génétiques, des caractéristiques moléculaires et de l'origine de la tumeur (Visvader 2009). Toutefois, il demeure toujours difficile d'effectuer un classement juste et, à ce propos, une hypothèse selon laquelle les caractéristiques présentées par un type cellulaire à un moment précis ne reflètent pas nécessairement l'origine de la tumeur a été énoncée. En effet, la progression tumorale est un développement long durant lequel la

plasticité cellulaire peut engendrée des différences indépendantes de l'origine cellulaire (Visvader 2009).

Parmi les sous-types de cancers mammaires établis, les types luminaux A et B, *basal-like*, et *HER2/ERBB2-overexpressing* sont les plus communs et par conséquent, les mieux caractérisés (Schnitt 2010). De nombreuses évidences permettent d'affirmer que le groupe *basal-like*, qui est de mauvais pronostic, qui a été décrit une première fois il y a une trentaine d'années et qui touche davantage les Afro-Américaines, est un groupe hétérogène qui regroupe plusieurs sous-types qui comportent notamment des différences histologiques, de patron d'expression des biomarqueurs et d'évolution clinique (Schnitt 2010). Le pronostic des cancers *basal-like* n'est d'ailleurs pas uniformément mauvais (Schnitt 2010). De plus, des incongruités de classification ont été identifiées dans le groupe *basal-like* et il est fréquent que des marqueurs soit mal définis pour les autres types de cancer mammaires. Par exemple, les cytokératines 7 et 13 sont considérées typiques des cancers *basal-like* alors qu'elles sont des protéines qui ne caractérisent pas les cellules basales (Gusterson 2009). Des contradictions dans les études visant la caractérisation des types cancéreux ont aussi été révélées, ce qui met en lumière la présence de lacunes dans les méthodes de classification et de validation. L'établissement de standards uniformes se basant sur de critères rigoureux apparaît donc nécessaire afin d'uniformiser les paramètres et la nomenclature associés au cancer du sein (Gusterson 2009). De plus, de nouveaux marqueurs ou profils génétiques devront être identifiés ou mis en relation afin de catégoriser la maladie, notamment lorsqu'il est question des cancers de type *basal-like*. Ceci permettra ultimement de mieux prévenir et de mieux comprendre la maladie lorsqu'elle se déclare.

La mise en évidence des cibles thérapeutiques a déjà permis d'amorcer le développement de thérapies personnalisées car elles reposent sur l'établissement de profilages génétiques. Des systèmes permettant l'identification d'empreintes génomiques aidant à cerner la tumeur et d'en prévoir l'évolution de même que la réponse aux traitements sont déjà sur le marché (Dinh et al. 2007; Rakha et al. 2010). On retrouve entre autres, le *Oncotype DX* (21 gènes), le *MammaPrint* (70 gènes), le *Theros H/I* (2 gènes), le *Theros breast cancer index*, une combinaison du *Theros H/I* classant les tumeurs ER+ selon le taux de récurrence et du *THEROS MGI*, qui est un index se basant sur 5 gènes qui détermine ainsi le stade tumoral et la prolifération cellulaire (Dinh et al. 2007; Rakha et al. 2010). Par ailleurs, les études épidémiologiques prospectives TAILORx et MINDACT ont respectivement été mises en route pour évaluer la validité de *Oncotype DX* et *MammaPrint* (Schnitt 2010). Un modèle informatique, nommé *Adjuvant! Online*, est même

disponible en ligne (<http://www.adjuvantonline.com/in dex.jsp>). Il s'agit d'un outil destiné aux professionnels de la santé qui leur permet de mieux évaluer la condition des patients souffrant de différents cancers dont du cancer du sein (Cianfrocca et al. 2009).

1.1.3 Les facteurs de risque

Plusieurs des facteurs de risques associés à l'initiation de la cancérogénèse mammaire sont relativement bien connus à ce jour. On sait entre autres que le cancer du sein a une incidence familiale et qu'au cours d'une vie, l'exposition plus longue aux fluctuations hormonales dues aux cycles menstruels, qui s'explique par l'initiation précoce des menstruations, une ménopause tardive et la nulliparité, sont des facteurs qui favorisent son développement (Société canadienne du cancer, 2011). Des expositions à des radiations ionisantes au niveau du tronc, comme lors de traitements médicaux contre un lymphome hodgkinien (Société canadienne du cancer, 2011), peuvent aussi initier le développement du cancer, surtout lorsque les expositions ont lieu au cours de la puberté (National Cancer Institute, 2011a; Société canadienne du cancer, 2011).

Les hormonothérapies substitutives combinées, utilisant à la fois des œstrogènes et des progestatifs, les contraceptifs oraux et le mode de vie sont quant à eux reconnus comme des facteurs aggravants, ce qui signifie qu'ils ne sont pas initiateurs de la transformation maligne, mais qu'ils en favorisent la progression (Société canadienne du cancer, 2011). À titre d'exemple, l'obésité et la consommation d'alcool sont liés au mode de vie et sont considérés comme des facteurs aggravants. En effet, selon l'étude *The Women's Health Initiative Observational Study*, menée auprès de plus de 85 000 femmes postménopausées, le risque relatif (RR) des femmes obèses (plus de 82,2 kg) est de 2,85 lorsqu'on les compare au groupe de femmes pesant moins de 58,7 kg (National Cancer Institute, 2011a). Il a aussi été démontré que le risque de développer un cancer du sein augmente proportionnellement à la consommation d'alcool et il est incertain que la diminution de la consommation réduit le risque préalablement engendré (National Cancer Institute, 2011a).

En ce qui concerne les cancers mammaires héréditaires, des mutations à l'intérieur de moins de 23 gènes sont présentement corrélées à l'augmentation du RR de développer la maladie. Les gènes concernés sont divisés en trois catégories selon le niveau de l'impact des mutations sur le RR et sur leur fréquence dans la population générale (Mavaddat et al. 2010). Dans la catégorie des mutations à pénétrance élevée, on retrouve les variantes des gènes BRCA1 et BRCA2 qui sont respectivement à l'origine de 10% et 12% des cancers mammaires héréditaires. Ces mutations sont tout de même rares dans la population générale, mais elles entraînent des

RR élevés allant de 2 à 45 (Mavaddat et al. 2010). Les mutations à pénétrance modérée sont un peu plus communes que les précédentes. Elles expliquent 5% des cancers mammaires génétiques et les gènes mutés codent tous pour des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. De plus, ils sont tous liés à BRCA1 et/ou à BRCA2, parce qu'ils peuvent interagir avec celles-ci ou moduler leur localisation, leur stabilité ou leur état de phosphorylation. Enfin, on retrouve les gènes associés aux mutations de faible pénétrance qui sont des gènes plus fréquemment mutés dans la population générale et qui expliquent 8,3% des cancers génétiques diagnostiqués. Les RR associés sont tous en deçà de 1,5 et ils codent pour différents types de protéines, tels que des récepteurs de facteurs de croissance, des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des protéines impliquées dans la signalisation des MAPK, dans l'apoptose, dans la prolifération cellulaire, dans le contrôle du cycle cellulaire ou dans la réparation de l'ADN (Mavaddat et al. 2010).

Il est également intéressant de noter que des éléments préalablement soupçonnés de participer à la cancérogénèse mammaire ont été écartés. À cet effet, le Société canadienne du cancer rapporte que le port du soutien-gorge, le stress, l'utilisation d'antisudorifiques et de déodorants, et les implants mammaires ne sont pas des facteurs corrélés au développement de cancers mammaires (Société canadienne du cancer, 2011).

Il demeure néanmoins que l'impact de certains éléments est ambiguë. On parle alors de facteurs de risque inconnus. En réalité, ceci signifie que les études menées jusqu'à présent se sont avérées non-concluantes et qu'aucune évidence ne permet de les considérer ou de les exclure de façon claire et définie. Selon les données rapportées dans *l'Encyclopédie canadienne du cancer*, cette catégorie regroupe le diéthylstilbestrol, un œstrogène de synthèse abondamment prescrit aux États-Unis entre 1938 et 1971 pour réduire les avortements spontanés et les naissances prématurées (American Academy of Family Physicians, 2004). Une alimentation riche en graisses, le soya, de même que les contaminants environnementaux appartiennent aussi à cette catégorie (Société canadienne du cancer, 2011). Une étude plus approfondie des effets de ces quatre facteurs demeure d'une importance primordiale car des cancers mammaires diagnostiqués demeurent d'étiologie inconnue, ce qui en empêche la prévention et en complique le traitement.

1.1.4 Les polluants environnementaux et le développement du cancer du sein

Au cours des dernières années, nombreux sont ceux qui se sont intéressés à l'identification du lien potentiel entre les polluants environnementaux et la cancérogénèse mammaire. L'une des classes les plus abondamment investiguée est une sous-classe de polluants organiques persistants (POP), les organochlorés, qui sont majoritairement des molécules de synthèse composées de carbones et de chlores. Parmi ceux-ci on retrouve les biphényles, les furanes et les dioxines polychlorés (BPC, PCDF et PCDD), l'hexachlorobenzène (HCB), le lindane (γ -HCH) et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). Ces molécules ont toutes la particularité de s'accumuler dans l'environnement et de se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire car elles ont un caractère lipophile et une très longue demi-vie. Par exemple, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), décrite comme la plus toxique des dioxines polychlorées a une demi-vie d'une dizaine d'années (Rowlands et al. 1997) alors que celle rapportée pour d'autres organochlorés atteint plus de 12 ans (DeBruin et al. 2002). Leur présence dans le sang, dans les tissus adipeux et le lait maternel a d'ailleurs été rapportée dans plusieurs études menées auprès de différentes populations (Schechter et al. 1994; Newsome et al. 1995; Dewailly et al. 1996; Brouwer et al. 1998; Lorber et al. 2002; Raaschou-Nielsen et al. 2005; La Rocca et al. 2008).

Les effets biologiques et toxiques de ces dioxines polychlorées dépendent essentiellement de leur liaison avec une protéine, le récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Ah), liaison nécessaire à l'activation du récepteur (Birnbaum 1994; Rowlands et al. 1997; Denison et al. 2003; Marlowe et al. 2005; Schlezinger et al. 2006; Puga et al. 2009). Parmi toutes les molécules qui se lient et qui activent le récepteur Ah, la TCDD est la plus toxique puisqu'elle a la plus forte affinité pour le récepteur Ah. De plus, les études menées avec des modèles de rongeurs ont démontré que la TCDD a un fort potentiel cancérogène chez l'animal (International Agency for Research on Cancer, 1997; Wolff et al. 1997). Basés sur l'affinité pour le récepteur Ah, des outils mathématiques ont été développés afin d'évaluer la toxicité de mélanges composés de PAH et HAH (Safe 1990; Safe 1993; Klotz et al. 1997; Oenga et al. 2004; Wojtowicz et al. 2004). Le facteur d'équivalence toxique (TEF) est un estimé de la toxicité relative d'un composé en fonction de celle de la TCDD et la quantité équivalente toxique (TEQ), est une valeur unique déterminée à partir des TEF et qui estime la toxicité d'un mélange de composés comme s'il s'agissait d'une solution unique de TCDD (Safe 1993).

En considérant l'ensemble de ces éléments, il est légitime de penser que les polluants environnementaux sont des éléments qui favorisent le développement de cancers mammaires chez l'humain et que ceci implique nécessairement la participation du récepteur Ah. Toutefois, les contradictions dans les études ponctuelles tentant de démontrer ce lien de causalité sont fréquentes, de sorte que les méta-analyses effectuées par le *National Cancer Institute* ne parviennent pas à confirmer ou à infirmer cette théorie (National Cancer Institute, 2011a). Les méta-analyses rapportent que les associations positives sont incohérentes avec les organochlorés identifiés tenus responsables des effets observés. De plus, plusieurs organochlorés possèdent de faibles effets oestrogéniques, ce qui peut expliquer leur rôle dans la cancérogénèse mammaire, mais ceci demeure non prouvé (National Cancer Institute, 2011b). Néanmoins, toute cette ambiguïté fait ressortir la complexité associée au récepteur Ah et elle met en évidence qu'elle mérite qu'on s'y attarde davantage.

1.2 : Le récepteur Ah

1.2.1 La famille du récepteur Ah

Le récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques est un facteur de transcription bien conservé dans l'évolution que l'on retrouve chez la plupart des espèces. Il est exprimé dans pratiquement tous les tissus murins (Abbott et al. 1995) et chez l'être humain, il est présent au niveau du poumon, du thymus, du rein, du foie (Puga et al. 2009), du cerveau, du système cardiaque (Jacobs et al. 2003). Il a aussi été détecté dans le placenta, les lymphocytes B, les ovaires et les cellules cancéreuses mammaires (Rowlands et al. 1997) .

Ce récepteur appartient à une famille de régulateurs hétérodimériques de la transcription génique, la famille des bHLH/PAS, qui est caractérisée par la présence de deux types de domaines de liaison. Le domaine bHLH permet la liaison des récepteurs activés avec l'ADN et la machinerie transcriptionnelle nécessaire à la transcription des gènes cibles (Rowlands et al. 1997; Kewley et al. 2004). Le domaine PAS permet quant à lui la liaison avec des partenaires protéiques. Le domaine PAS est une région qui comprend deux répétitions dégénérées d'une cinquantaine d'acides aminés adjacentes, les domaines PAS A et PAS B. Les protéines bHLH/PAS ont la particularité de former des facteurs de transcription actifs seulement lorsqu'elles sont associées à des protéines de la même famille (Kewley et al. 2004).

La famille des bHLH/PAS se subdivise en deux classes (I et II). Les protéines bHLH/PAS de classe I réunit le récepteur Ah, les facteurs inductibles de l'hypoxie (HIF, HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) et les *Single Minded Proteins* (SIM1 et SIM2) et les protéines de classe I doivent obligatoirement dimériser avec une protéine de classe II pour être en mesure de réguler la transcription génique (Figure 1.1). Parmi les protéines de la classe II, on retrouve les protéines ARNT et ARNT2 et les protéines BMAL1 et BMAL2 impliquées dans la régulation du rythme circadien. Parmi celles-ci, ARNT est une protéine ubiquitaire connue comme le partenaire général des protéines de la famille des bHLH/PAS et elle est la mieux caractérisée des protéines de classe II (Kewley et al. 2004).

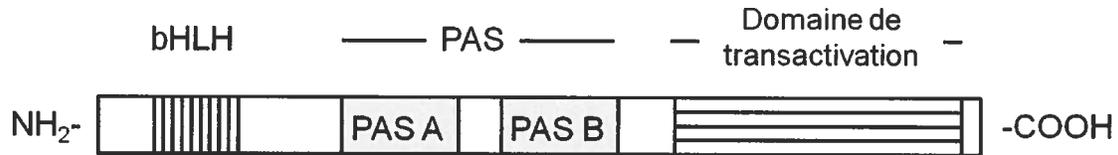


Figure 1.1 Schématisation de la structure et des domaines des protéines régulatrices de la transcription génique appartenant à la famille des bHLH/PAS.

1.2.2 La structure du récepteur Ah

Les analyses de séquences ont révélé que la structure du récepteur Ah se divise en trois régions, la région amino-terminale qui contient le domaine bHLH, la région centrale où se trouve les domaines PAS et la région carboxy-terminale riche en glutamine (Yao et al. 2003). Le récepteur Ah est habituellement présenté comme une protéine très conservée à travers l'évolution étant donné que les études phylogénétiques ont révélé sa présence chez les premiers vertébrés il y a plus de 450 millions d'années (Yao et al. 2003). En effet, l'homologie de séquence des récepteurs Ah de rats et de souris est très forte, avec une homologie de 100% et 98% pour les régions bHLH et PAS respectivement. La région terminale est toutefois moins bien conservée (79%). L'homologie globale entre le récepteur murin et le récepteur humain est aussi forte (73%), mais le taux de conservation des séquences diffère grandement en fonction de la région concernée. En comparaison avec les séquences murines, les domaines bHLH et PAS du récepteur humain sont conservés à 98% et à 87% mais l'homologie passe à moins de 60% pour la portion carboxy-terminale (Dolwick et al. 1993; Jain et al. 1994). Étant donné que la région carboxy-terminale contient les domaines d'activation transcriptionnelle (TAD) (Yao et al. 2003), cette différence peut s'avérer d'une importance capitale puisqu'elle détermine les gènes dont l'expression est modulée lorsque le récepteur Ah est activé.

Les analyses effectuées par les équipes de Ma (Ma et al. 1995), Kumar (Kumar et al. 2001) et leurs collaborateurs respectifs ont d'ailleurs révélé que le TAD du récepteur Ah est une région très complexe. Il a été mis en évidence que le TAD est composé de trois sous-régions indépendantes les unes des autres et leur niveau d'activité respectif est variable (Ma et al. 1995). De plus, les sous-régions du TAD sont indépendantes des domaines de liaisons du ligand (LBD) avec l'ADN et avec les autres protéines et ces domaines sont situés plus près de l'extrémité amino-terminale que le TAD (Ma et al. 1995). Chez l'humain, le TAD du récepteur Ah est composé d'un domaine *acidic* riche acide aspartique (a.a. 500–600), d'un domaine *Q-rich*

riche en glutamine (a.a. 600–713) et d'un domaine *P/S/T* riche en proline, en sérine et en thréonine (a.a. 713–848) (Figure 1.2) (Rowlands et al. 1996; Kumar et al. 2001). Or, le domaine *Q-rich* est essentiel à l'activation de la transcription génique dépendante du récepteur Ah, le domaine *P/S/T* la potentialise, alors que le domaine *acidic* seul ne parvient pas à activer la transcription dépendante du récepteur Ah (Kumar et al. 2001). De plus, la leucine 678 et plusieurs autres résidus sérines situés dans le domaine *Q-rich* sont essentiels à l'activité biologique du récepteur Ah (Kumar et al. 2001).

Enfin, deux domaines de localisation cellulaire font partie intégrante de la structure du récepteur Ah. Les acides aminés 13 à 39 et les acides aminés 55 à 75 forment respectivement le domaine de localisation nucléaire (NLS) et le domaine d'exportation nucléaire (NES) (Ikuta et al. 1998). Ils sont situés dans la région amino-terminale du récepteur et leur rôle dans les fonctions du récepteur Ah a été démontré. En effet, l'exposition de cellules en culture à la leptomycine B, un antifongique qui contrecarre spécifiquement l'exportation des protéines qui contiennent un site NES, inhibe l'exportation du récepteur Ah vers le cytoplasme et ceci est associé à l'inhibition de la transcription génique dépendante du récepteur Ah (Ikuta et al. 2000).

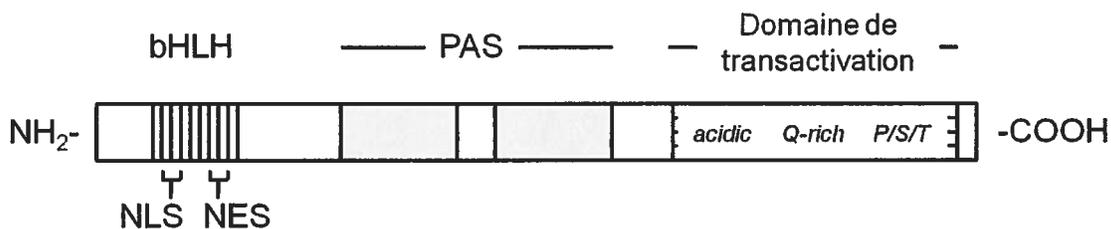


Figure 1.2 Schématisation de la structure du récepteur Ah.

1.2.3 Les ligands du récepteur Ah

L'activation du récepteur Ah dépend de la liaison du ligand et déjà en 2002, Denison et ses collègues (Denison et al. 2002) faisait mention du peu d'information disponible en ce qui concerne le site de liaison, comparativement à l'information disponible sur les ligands du récepteur Ah. Or, encore aujourd'hui, peu de données sont disponibles dans la littérature quant à la structure tridimensionnelle et à la forme du LBD du récepteur Ah. Il existe toutefois un modèle basé sur l'homologie de séquence du récepteur Ah avec les récepteurs nucléaires tel le

récepteur ER α humain (Jacobs et al. 2003). Des validations de ce modèle ont été effectuées en utilisant la TCDD et le PCB 126 comme ligands modèles et elles révèlent que les liaisons entre le récepteur et le ligand s'effectuent via des liaisons non-covalentes aromatiques (π - π) et des liaisons hydrogène et que le LBD a une forme rectangulaire (Jacobs et al. 2003). Enfin, parmi tous les ligands du récepteur Ah à avoir été identifiés à ce jour, la molécule avec la plus forte affinité demeure la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (Denison et al. 2003; Fujii-Kuriyama et al. 2010)

1.2.3.1 Les ligands exogènes

Il existe une panoplie de molécules qui se lient au récepteur Ah et son activation est habituellement associée à l'induction de la transcription d'isoenzymes du cytochrome P450 comme certaines monooxygénases (Rowlands et al. 1997). Les ligands les plus connus et par conséquent sont les molécules planaires HAH qui comprennent les PCDD, PCDF et BPC et les PAH ayant au moins quatre cycles benzoïques (Denison et al. 2003; Nguyen et al. 2008) (Figure 1.3). Ces molécules sont des polluants environnementaux et ce sont les premiers ligands à avoir été identifiés. Les HAH sont actifs à partir de concentrations de l'ordre du picomolaire (pM), alors que les PAH sont de moindre efficacité et doivent atteindre des concentrations de l'ordre du nanomolaire (nM) (Denison et al. 2003). Bien que les ligands du récepteur Ah sont le plus souvent des molécules hydrophobes et planaires, ces caractéristiques ne sont pas une nécessité absolue. Pour l'ensemble des ligands halogénés, la polarité des groupements de même que l'électronégativité de la molécule et les liaisons hydrogènes influencent aussi l'affinité de la molécule pour le récepteur Ah (Denison et al. 2003; Nguyen et al. 2008; Fujii-Kuriyama et al. 2010).

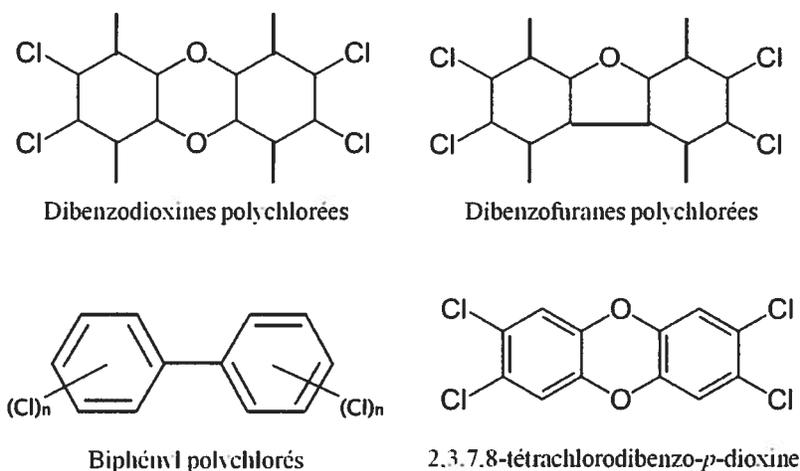


Figure 1.3 Schématisation du squelette de la structure des PCDD, des PCDF et des BPC et structure de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine.

Mis à part ces polluants, une autre grande source de ligands exogènes du récepteur Ah provient de l'alimentation. Ce sont majoritairement des extraits végétaux provenant des légumes, des fruits et du thé. Les flavonoïdes (Figure 1.4), qui incluent les flavones, les flavonoles, les flavonones et les isoflavones est le groupe le plus important des ligands exogènes produits naturellement dans l'environnement (Denison et al. 2003; Nguyen et al. 2008). Ces molécules sont si abondantes dans la diète humaine qu'elles atteignent des concentrations sanguines de l'ordre du micromolaire (μM), une concentration suffisante pour avoir un impact significatif sur les fonctions biologiques qui dépendent du récepteur Ah (Denison et al. 2003).

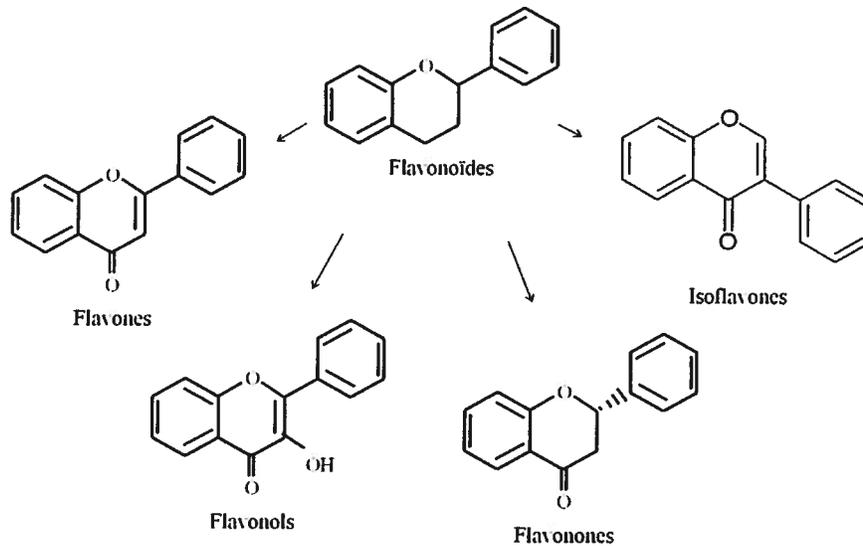


Figure 1.4 Schématisation du squelette de ligands exogènes naturels du récepteur Ah, les membres de la famille des flavonoïdes : les flavones, les flavonols, les flavonones et les isoflavones.

L'analyse des effets d'extraits de suppléments de végétaux, de légumes et de fruits a aussi démontré que l'activation du récepteur Ah est bien corrélée à l'induction de la transcription génique des gènes rapporteurs appartenant à la famille du cytochrome P450. Toutefois, comme un même extrait végétal contient différentes molécules se liant au récepteur Ah, il faut considérer que celles-ci peuvent agir via des mécanismes antagonistes ou synergiques (Jeuken et al. 2003), ce qui implique les ligands exogènes naturels du récepteur Ah peuvent être agonistes ou antagonistes au récepteur Ah.

1.2.3.2 Les ligands endogènes

À ce jour on ne connaît encore aucun ligand endogène au récepteur Ah qui doit l'origine de sa découverte à son rôle dans le métabolisme de contaminants chimiques persistants dans l'environnement. Toutefois des molécules endogènes s'y lient (Safe et al. 2003; Schlezinger et al. 2006; Barouki et al. 2007; Nguyen et al. 2008; Puga et al. 2009). Celles-ci engendrent cependant une activité en deçà de celle de la TCDD et aucune molécule n'a encore permis d'identifier clairement les mécanismes de régulation qui dépendent du récepteur Ah en conditions physiologiques (Nguyen et al. 2008).

Parmi les molécules identifiées, on note la tryptamine, l'acide indole acétique et l'acide indole pyruvique qui sont issues de la conversion enzymatique du tryptophane (Figure 1.5). L'indirubine et l'indigo, des métabolites excrétés dans l'urine humaine, sont aussi des molécules endogènes reconnues comme des agonistes du récepteur Ah (Figure 1.6). Les photo-produits du tryptophane, dont le plus actif est le 6-formylindolo(3,2b)carbazole (FICZ) et qui sont naturellement générés au niveau dans la peau exposée aux rayonnements UV sont aussi soupçonnés de moduler les mécanismes endogènes dépendants du récepteur Ah (Denison et al. 2003). Enfin, la bilirubine et la biliverdine qui sont des métabolites de l'hème, de même que les métabolites de l'acide arachidonique sont aussi des ligands potentiels du récepteur Ah dans des conditions physiologiques (Denison et al. 2003; Nguyen et al. 2008).

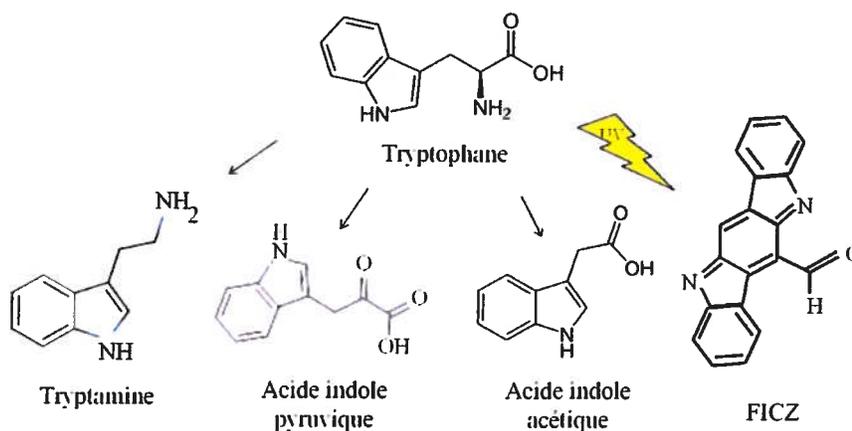


Figure 1.5 Structure de ligands endogènes potentiels du récepteur Ah dérivés du tryptophane.

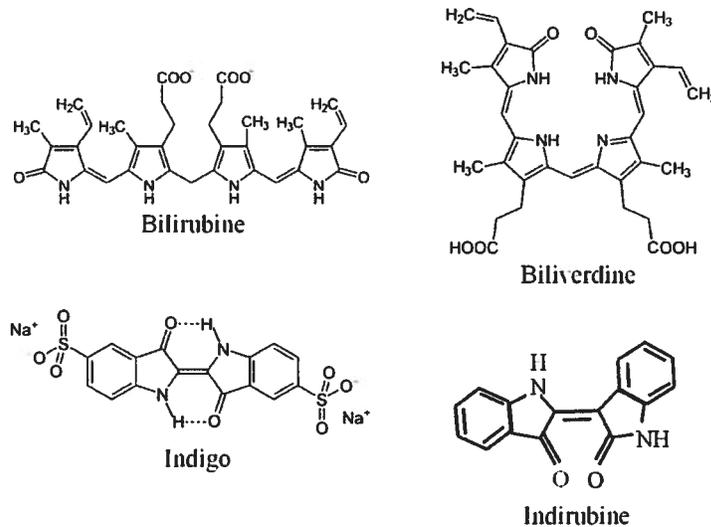


Figure 1.6 Structure des dérivés de l'hème (bilirubine et biliverdine), de l'indigo et de l'indirubine, des ligands endogènes potentiels du récepteur Ah.

1.2.4 Les isoformes du récepteur Ah

Il est également important de noter que les effets qui dépendent du récepteur Ah sont divergents en fonction des ligands, du tissu et de l'espèce concernés et que ceci rend l'établissement de généralités ardu. En plus de la variabilité dans les séquences des TAD préalablement rapportée, on rapporte beaucoup de polymorphismes intra- et inter-espèces pour le récepteur Ah qui peuvent être à l'origine de la diversité des effets qui sont associés aux expositions à la TCDD.

Pour le modèle murin seulement, quatre allèles du récepteur Ah ont été identifiés en fonction de leur affinité pour un même ligand, la (^{125}I) -2-azido-3-iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxine ($[^{125}\text{I}]\text{N3Br2DpD}$), et selon leur masse moléculaire (Yao et al. 2003). Les deux premiers allèles identifiés sont les allèles Ah^d et Ah^{b-2} qui codent tous deux pour des protéines de 104 kDa, mais pour lesquelles l'affinité pour le ligand diffère. En fait, l'affinité de $[^{125}\text{I}]\text{N3Br2DpD}$ pour l'isoforme codée par Ah^d est dix fois plus faible qu'elle ne l'est pour Ah^{b-2} . Les deux autres allèles, Ah^{b-1} et Ah^{b-3} , codent pour des protéines de 95 kDa et 105 kDa respectivement et leur affinité pour ligand est comparable à celle de Ah^{b-2} . Or, des expériences *in vivo* ont démontré que les souris qui expriment l'allèle Ah^d sont les seules à être insensibles aux effets toxiques induits par la TCDD (Fernandez-Salguero et al. 1995; Shimizu et al. 2000; Yao et al. 2003), tout comme les souris AhR -null développées. Par exemple, les souris exprimant l'allèle Ah^d et les

souris *AhR-null* sont insensibles aux effets tératogènes engendrés par la TCDD (Mimura et al. 1997).

La caractérisation de ces isoformes a révélé que seulement trois acides aminés diffèrent entre les allèles *Ah^d* et *Ah^{b-2}* et que le changement d'un seul nucléotide à l'intérieur du LBD, au niveau du codon 375, entraînant alors la substitution d'une valine par une alanine suffit à altérer l'affinité de la TCDD pour le récepteur Ah (Poland et al. 1994). Chez l'humain, le codon 381 de l'exon 9 est l'équivalent du codon 375 murin, mais aucun polymorphisme équivalent n'a pas été détecté pour le récepteur humain (Harper et al. 2002). Le clonage du récepteur Ah humain généré à l'aide de cellules hépatiques a aussi démontré que le récepteur humain a 6 kDa de plus que le récepteur murin codé par *Ah^{b-2}* (Yao et al. 2003). De plus, parmi les différents modèles *in vivo* utilisés en laboratoire, l'animal dont l'homologie de séquence avec la protéine humaine est la plus forte est le cochon d'inde et étonnement, il s'agit de l'espèce la plus sensible aux effets toxiques de la TCDD alors que l'humain est l'une des plus résistantes (Korkalainen et al. 2001).

Il a été aussi révélé que certaines espèces expriment plus d'un récepteur Ah. Les poissons et les oiseaux ont la particularité d'exprimer deux isoformes du récepteur Ah, alors que la plupart des mammifères n'en expriment qu'une. Des travaux menés chez les oiseaux ont révélé que le gène aviaire AhR1 correspond au récepteur Ah que l'on retrouve chez la plupart des mammifères alors que le AhR2 aviaire correspond plutôt à la protéine AhR2 exprimée chez les poissons (Yasui et al. 2007). Or, chez les oiseaux, la TCDD radio-marquée (³H]TCDD) se lie aux deux isoformes du récepteur Ah, mais seul AhR1 induit efficacement la transcription de gènes rapporteurs (Yasui et al. 2007). Il a aussi été démontré que certaines espèces de vertébrés non-mammifères expriment plus de deux isoformes. Par exemple, le poulet *Gallus gallus* en exprime trois, tout comme le poisson-zèbre *Danio rerio* alors que le poisson *Takifugu rubripes*, appartenant à la classe phylogénétique des Ostéichthyes comprenant les poissons osseux et les tétrapodes, en exprime cinq (Hahn et al. 2006). Enfin, les invertébrés semblent quant à eux exprimer une seule isoforme du récepteur Ah, mais les ligands qui s'associent à la protéine sont différents de ceux qui se lient aux récepteurs des vertébrés (Hahn et al. 2006).

1.2.5 Le polymorphisme du récepteur Ah humain

Chez l'humain, le gène codant le récepteur Ah est situé sur le chromosome 7 et il comprend 12 exons qui, une fois transcrits en ARNm mènent à la synthèse d'une protéine de masse moléculaire théorique de 96 kDa alors que les analyses de type SDS-PAGE ont révélées une protéine de 110 kDa (Figure 1.7) (Harper et al. 1991; Micka et al. 1997; Harper et al. 2002).

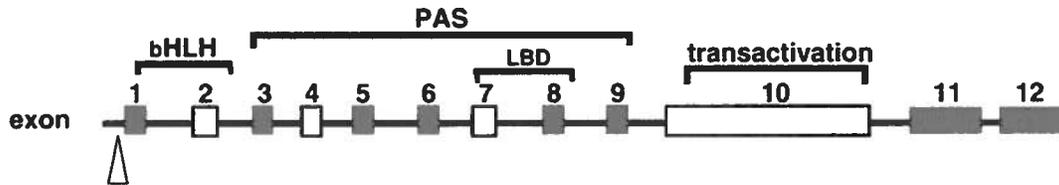


Figure 1.7 Schématisation des régions codantes du récepteur Ah humain. Les exons sont en blanc et la flèche désignent les endroits où des SNPs ont été identifiés. Modifiée de (Harper et al. 2002).

Bien qu'ils sont peu nombreux chez l'être humain, des polymorphismes ont été identifiés pour le récepteur Ah (Tableau 1.1) en fonction de l'ethnicité. La plupart des polymorphismes identifiés et qui ont un effet biologique sont situés dans l'exon 10 qui code le domaine de transactivation (Harper et al. 2002; Rowlands et al. 2010). Les mutations identifiées modifient entre autres la régulation des gènes rapporteurs, soit les enzymes de détoxification du cytochrome P450 EROD et CYP1A1. D'autres polymorphismes ont été identifiés dans les régions codantes et ils sont localisés dans les exons 2, 4 et 7 qui codent respectivement pour les domaines bHLH, PAS et PAS/LBD. Ceux-ci sont toutefois des *SNP synonymes* ce qui signifie que la mutation du nucléotide ne change pas l'acide aminé correspondant dans le codon (Rowlands et al. 2010).

Tableau 1.1 Liste des polymorphismes répertoriés pour le récepteur Ah humain.

Exon	Codon	Nucléotide	Phénotype	Effets	Ethnies	Références
-		-459 G > A	-	-	Français	(Harper et al. 2002)
2	N/D	44 T > C	Asn44Asn	aucun	Caucasien Japonais Asiatiques du Sud-Est Chinois	(Rowlands et al. 2010)
4	44	132 T > C	Asp132Asp	aucun	Japonais Finlandais	(Harper et al. 2002; Rowlands et al. 2010)
7	N/D	277 A > G	Iso277Val	N/D	Japonais	(Rowlands et al. 2010)
10	517	1579 C > T	Pro517Ser	↓ de l'induction de l'activité de CYP1A1 induite par la TCDD lorsque combiné à Arg554Lys + Val570Ile	N/D	(Harper et al. 2002)
	554	1661 G > A	Arg554Lys	↑EROD ↓ de l'induction de l'activité de CYP1A1	Japonais Caucasiens Afro-Américains	(Harper et al. 2002; Rowlands et al. 2010)
	570	1708 G > A	Val570Ile	↑EROD	N/D	(Harper et al. 2002; Rowlands et al. 2010)
	666	666 C > A	Glu666Lys	N/D	Afro-Américains	(Rowlands et al. 2010)
	786	2356 A > G	-	-	N/D	(Harper et al. 2002; Rowlands et al. 2010)

N/D : Données non-disponibles

Enfin, lorsque l'on considère toutes les différences rapportées dans la littérature, il est concevable que l'identification des mécanismes dans lesquels le récepteur Ah est impliqué chez l'humain soit difficile. Cette protéine est au cœur d'effets toxiques rapportés chez certaines espèces animales, mais un nombre grandissant d'études souligne le potentiel anti-cancérigène chez l'humain, de sorte qu'il devient crucial de cerner les mécanismes dans lesquels le récepteur Ah est impliqué.

1.2.6 Les fonctions biologiques du récepteur Ah

Tel que mentionné préalablement, le récepteur Ah est un facteur de transcription dont l'activation dépend du ligand et qui est impliqué dans la régulation de la transcription des enzymes de détoxification du cytochrome P450. Les premières études menées sur le récepteur Ah visaient à identifier la/les voie(s) de signalisation modulée(s) par différents polluants environnementaux comme la TCDD et le paramètre classique était l'étude de la modulation de l'activité des enzymes cytochrome P450.

Parmi les effets toxiques que l'on associe à la TCDD chez l'humain et, par conséquent, à l'activation du récepteur Ah, on note la chloracnée, l'atrophie du thymus et la suppression de la fonction immunitaire (Safe et al. 2003). Le récepteur Ah est aussi soupçonné de participer à la cancérogénèse notamment parce que des études menées avec des rongeurs chez qui l'expression du récepteur Ah a été supprimée ont démontrées que le récepteur Ah est essentiel à la toxicité de polluants environnementaux et à leur effets pro-cancérogènes (International Agency for Research on Cancer, 1997; Barouki et al. 2007). Or, des effets anti-cancérogènes lui sont aussi associés et il apparaît comme une molécule essentielle au développement normal.

1.2.6.1 La transcription génique dépendante du récepteur Ah

Lorsqu'il est inactif, le récepteur Ah est localisé dans le cytosol et il est membre d'un complexe composé d'un dimère de chaperonne *Heat Shock Protein 90* (Hsp90), et des protéines p23 et *Immunophilin-like XAP2* (aussi nommée ARA9 et AIP1), ce qui empêche sa dégradation et le maintien paré pour la liaison avec un ligand (Safe et al. 2003; Schlezinger et al. 2006; Barouki et al. 2007; Nguyen et al. 2008; Puga et al. 2009). L'activation du récepteur Ah par un ligand entraîne la translocation nucléaire du complexe cytosolique duquel le récepteur Ah se dissocie pour se lier à son partenaire ARNT qui réside en permanence dans le noyau cellulaire (Pollenz et al. 1994; Rowlands et al. 1997; Schlezinger et al. 2006; Puga et al. 2009) (Figure 1.8). L'hétérodimère Ah-ARNT nouvellement formé s'associe ensuite à plusieurs histones acétyltransférases et à des facteurs de remodelage de la chromatine, ce qui permet ultimement au complexe Ah-ARNT de se fixer à l'ADN au niveau des éléments de réponse spécifiques au récepteur Ah, les *Aryl hydrocarbon Response Elements* (AhRE), aussi (nommés *Xenobiotic Response Elements* (XRE) ou *Dioxin Response Elements* (DRE)) (Rowlands et al. 1997; Yao et al. 2003; Schlezinger et al. 2006; Barouki et al. 2007; Puga et al. 2009). Ces sites sont situés en

amont des promoteurs des gènes cibles ce qui confèrent à l'hétérodimère la capacité d'initier la transcription. Finalement, l'hétérodimère Ah-ARNT se détache du site de liaison, se dissocie au niveau du noyau cellulaire et le récepteur Ah est redirigé vers le cytosol où s'effectue enfin sa dégradation par le protéasome (Rowlands et al. 1997; Schlezinger et al. 2006; Barouki et al. 2007; Puga et al. 2009).

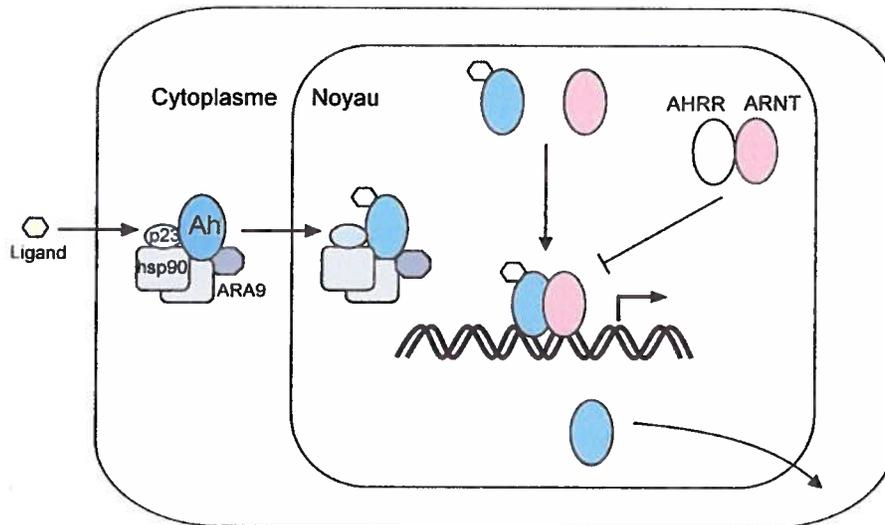


Figure 1.8 Schématisation du mécanisme de régulation de la transcription génique dépendant de l'activation du récepteur Ah par un ligand exogène. Modifiée de (Nguyen et al. 2008)

1.2.7 Le récepteur Ah et la régulation de la cancérogénèse

Les résultats discutés dans la littérature mettent en évidence que la résultante de l'activation du récepteur Ah peut être pro- ou anti-cancérogène, notamment lorsqu'il est question de cancérogénèse mammaires ce qui rend difficile la compréhension des mécanismes sous-jacents. Toutefois, comme le récepteur Ah est membre de complexes multiprotéiques, qu'il dimérise et qu'il module l'expression génique, il est évident que les mécanismes de régulation impliqués subissent une influence multifactorielle.

1.2.7.1 Les effets pro-cancérigènes du récepteur Ah

C'est en 1997 que le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé la TCDD comme un agent carcinogène de classe 1, ce qui signifie que les circonstances des expositions impliquent que l'agent étudié est un cancérigène pour les humains et que ceci est lié à la force

de la preuve quant à l'effet pro-cancérigène de l'exposition et non pas à la mesure de l'activité cancérigène (puissance) du composé ni à l'identification des mécanismes impliqués. Pour l'humain, le degré d'évidence de cancérogénécité de la TCDD est classé *limité*, ce qui signifie que la corrélation entre une exposition à l'agent et le développement de cancer est positive et crédible, mais que des biais ou des éléments confondants ne peuvent être exclus selon une évidence raisonnable. Chez l'animal, le degré d'évidence est quand à lui *suffisant*, ce qui sous-entend que la relation causale a été établie entre la TCDD et le développement accru de néoplasmes malins ou une combinaison de néoplasmes bénins et malins dans (a) deux espèces ou plus lors d'une même étude ou (b) pour une seule espèce, mais que ceci a été démontré dans deux études indépendantes (le moment de l'étude, les laboratoires et les protocoles utilisés) ou plus (International Agency for Research on Cancer; 1997).

En fait, le titre de promoteur de tumeurs que l'on donne au récepteur Ah vient surtout du fait que la TCDD le ligand avec la plus forte affinité et que bon nombre d'études utilisant des modèles animaux ont démontrées une corrélation positive entre l'exposition à la TCDD et l'inhibition significative de l'apoptose de cellules initiées qui portent des lésions génotoxiques (Puga et al. 2009). Chez l'animal, la nécessité de la présence du récepteur Ah a été démontrée dans les effets carcinogènes de polluants environnementaux comme les PCDD, les PCB, HAH les PAH. De façon générale, ces substances activent le récepteur Ah et induisent la transcription génique de plusieurs enzymes de détoxification du cytochrome P450 de phase I (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 and CYP2S1) et de phase II (UDP-glucuronyl transférase UGT1A6, quinone oxydoréductase-1 dépendante de NADPH (NQO1), l'aldéhyde déshydrogénase ALDH3A1 et plusieurs glutathione-S-transférases) tel que décrit précédemment. Or, les POP sont des molécules très stables, mais ils engendrent la synthèse des enzymes du cytochrome P450 qui accentuent leur propre métabolisme, et ce sont le plus souvent les métabolites secondaires issus de ces réactions qui ont un fort potentiel mutagène et qui réagissent avec des macromolécules comme l'ADN, ce qui induit finalement la transformation cellulaire (Mimura et al. 2003; Mandal 2005; Puga et al. 2009). De plus, le fait que le récepteur Ah soit aussi responsable de l'inhibition de la transcription de gènes comme HSP27, dont l'expression est corrélée à l'inhibition de la croissance cellulaire des cellules mammaires (Horman et al. 1997; Vargas-Roig et al. 1997; Kindas-Mugge et al. 1998), ou du gène suppresseur de tumeurs BRCA1 (Jeffy et al. 2002), illustre la participation du récepteur Ah dans de nombreuses voies de signalisation qui favoriseront la prolifération cellulaire maligne.

1.2.7.2 Les effets anti-cancérigènes du récepteur Ah

L'activation du récepteur Ah est aussi associée à la perturbation du cycle cellulaire, notamment à l'arrêt du cycle cellulaire en phase en phase G0/G1 et en G2/M, ce qui a pour conséquence de diminuer la réplication génomique et d'inhiber la prolifération cellulaire. Ceci a notamment été démontré par l'exposition à la TCDD de différentes lignées cellulaires qui normalement prolifèrent (Puga et al. 2002; Marlowe et al. 2005; Hahn et al. 2009).

L'utilisation d'ARN interférents (siRNA) dirigés contre le récepteur Ah inhibe la croissance cellulaire. L'utilisation de ces ARN interférents affectent la transcription des cyclines D1, E et les kinases dépendantes des cyclines 2 et 4 (CDK2 et CDK4) ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Marlowe et al. 2005). La suppression de la signalisation impliquant ER α , l'induction de p27, l'altération de la voie de signalisation de TGF- β et de l'interaction avec la RB de même que le déplacement de p300 du promoteur E2F sont des événements qui témoignent de la variété des mécanismes par lesquels le récepteur Ah peut mener à la suppression de la croissance (Schleizinger et al. 2006). De plus, quelques études épidémiologiques ont établies une corrélation entre des expositions aux PCDD et aux PCDF et la réduction du nombre de cas de cancers mammaires et utérins, notamment dans les groupes de femmes exposées aux plus fortes doses (Bertazzi et al. 1993; Viel et al. 2008).

1.2.7.3 Les fonctions physiologiques dépendantes du récepteur Ah

Mis à part les mécanismes sous-jacents aux effets toxiques de POP, il est désormais évident que le récepteur Ah participe à un bon nombre de processus physiologiques. Il participe à d'importantes fonctions biologiques comme le développement et le maintien neurologique, le rythme circadien, la réponse à l'hypoxie, l'angiogénèse, le maintien de la réponse immune, le développement ovarien, la modulation de l'adhésion et de la migration cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Barouki et al. 2007; Hahn et al. 2009; Puga et al. 2009).

L'exemple le plus avancé dans la littérature pour appuyer l'importance du rôle du récepteur Ah dans le développement normal est le phénotype de modèles murins *AhR-null* qui ont été développés. En effet, les souris *AhR-null* ont des atteintes cardiaques (Lund et al. 2006), dermiques (Fernandez-Salguero et al. 1997), immunitaires (Fernandez-Salguero et al. 1995), ovariennes (Abbott et al. 1999), hépatiques (Fernandez-Salguero et al. 1995; Schmidt et al. 1996) et vasculaires (Fernandez-Salguero et al. 1997).

1.2.8 Le récepteur Ah et la cancérogénèse mammaire

Selon Schlezinger (Schlezinger et al. 2006), c'est en 1978 que l'induction de l'enzyme CYP1A1 a été détecté dans les glandes mammaires de rates et que l'implication du récepteur Ah dans le contrôle de la croissance normale de la glande a été démontré (Fysh et al. 1978). Des études effectuées chez les rongeurs ont démontré une augmentation de l'expression du récepteur Ah dans les lésions mammaires primaires (Hahn et al. 2009; Puga et al. 2009), ce qui peut être préalable à la formation de tumeurs lorsqu'on considère les effets de l'augmentation quantitative des enzymes de détoxification de la famille du cytochrome P450.

Dans la modulation de l'apoptose, le rôle du récepteur Ah est équivoque. Dans le cas des tumeurs mammaires, le récepteur Ah est considéré comme un promoteur tumoral par sa capacité à inhiber l'apoptose et à promouvoir le phénotype métastatique, mais la perte du récepteur Ah n'est pas un évènement pro-apoptotique en soi ; le taux d'apoptose est même plus important dans des modèles murins *AhR-null* (Puga et al. 2009). De plus, chez des rats présentant des tumeurs mammaires induites par le 7,12-diméthylbenz[α]anthracène (DMBA), il a été démontré que les traitements à la TCDD réduisent la formation des tumeurs (Holcomb et al. 1994) ou la favorisent en participant au processus de contrôle du cycle cellulaire via l'interaction avec la protéine RB (Andrysik et al. 2007). Il est également bien connu que la TCDD peut renverser les effets pro-cancérigènes engendrés par les œstrogènes (Safe et al. 1998; Kohle et al. 2002; Safe et al. 2003; Oenga et al. 2004) et des molécules présentées comme des modulateurs sélectifs et non-toxiques du récepteur Ah ont été proposés comme traitements anti-cancéreux (Morrow et al. 2004; Fritz et al. 2009), notamment dans la lutte au cancer du sein (Safe et al. 1999; Zhang et al. 2009).

Dans les cellules ER α positives qui expriment le récepteur Ah, l'activation du récepteur par des ligands exogènes peut entraîner la dégradation de ER α , ce qui supprime la transcription dépendante de ER α et *c-fos* induite par les œstrogènes (Hahn et al. 2009). Or, dans le promoteur du gène de la cathépsine D on retrouve des motifs permettant la liaison du dimère ER-Sp1, caractéristique des gènes dont la régulation dépend de l'hétérodimère formé de ER α et Sp1, de même qu'un site AhRE au centre de ce motif ERE-Sp1. L'activation du récepteur Ah par un ligand entraîne sa liaison via cette séquence et la transcription dépendante de ER α /Sp1 est alors impossible (Krishnan et al. 1994; Safe et al. 1998). Comme ER α est identifié comme un récepteur central dans l'initiation du développement tumoral mammaire, ces données révèlent le potentiel protecteur du récepteur Ah vis-à-vis le récepteur ER α (Hahn et al. 2009).

1.3 : La télomérase

Les mécanismes sous-jacents au maintien de l'intégrité des chromosomes et de leur protection de l'érosion et des réarrangements chromosomiques sont longtemps restés inconnus, mais c'est finalement dans les années 1980 que les Drs Elizabeth H Blackburn, Jack W Szostak et Carol W Greider ont démontré que le tout dépendait essentiellement d'une enzyme, la télomérase. Étant donné le rôle central de cette enzyme dans plusieurs processus biologiques importants comme la division et la viabilité cellulaire, le renouvellement des cellules souches, le maintien des tissus et la cancérogénèse, cette découverte en fût une d'envergure qui donna le coup d'envoi à une multitude d'études qui a profondément bouleversé la recherche biomédicale, notamment le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer dont certaines sont d'ailleurs en cours d'évaluation. En 2009, les Drs Blackburn, Szostak et Greider se sont vu conjointement remettre le prix Nobel de Médecine pour l'ensemble de leurs travaux portant sur la télomérase, ce qui témoigne bien de l'importance des retombées de leur découverte (Varela et al. 2010).

1.3.1 La structure et les sous-unités de la télomérase

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique composé essentiellement de trois éléments, la sous-unité TER qui contient un substrat intrinsèque d'ARN, la sous-unité catalytique TERT et d'autres protéines associées dont le rôle consiste à stabiliser l'ARN et coordonner l'assemblage du complexe enzymatique fonctionnel (Counter et al. 1994; Herbert et al. 1999; Pitts et al. 1999; Cong et al. 2002; Sekaran et al. 2009). Le rôle de la télomérase consiste en la synthèse des télomères qui sont des répétitions de courtes séquences d'ADN double-brins localisées aux extrémités des chromosomes et qui ont un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité du code génétique (Moyzis et al. 1988; Cong et al. 2002; De Semir et al. 2007).

1.3.1.1 La sous-unité TER et ses protéines associées

La sous-unité TER permet à la télomérase de se fixer au chromosome et elle fournit la séquence matrice d'ARN nécessaire à la synthèse des télomères. La séquence primaire de TER est caractéristique à chaque espèce, mais la structure secondaire de cette riboprotéine est très conservée, témoignant de l'importance de sa structure pour accomplir ses fonctions. TER contient quatre éléments structuraux essentiels, soit le domaine pseudoknot (CR2/CR3), le

domaine de transactivation (CR4/CR5), le domaine box H/ACA (CR6/CR8) et le domaine CR7 (Figure 1.9). Les domaines pseudoknot, de transactivation et box H/ACA permettent le bon fonctionnement enzymatique de la télomérase et le domaine de transactivation et le domaine de box H/ACA interagissent de façon indépendante et non-coopérative avec la sous-unité catalytique TERT (Cong et al. 2002; Sekaran et al. 2009). Le domaine CR7 influence quant à lui l'assemblage, la localisation et le déplacement de la sous-unité à l'intérieur de la cellule sans influencer directement l'activité enzymatique du complexe (Sekaran et al. 2009).

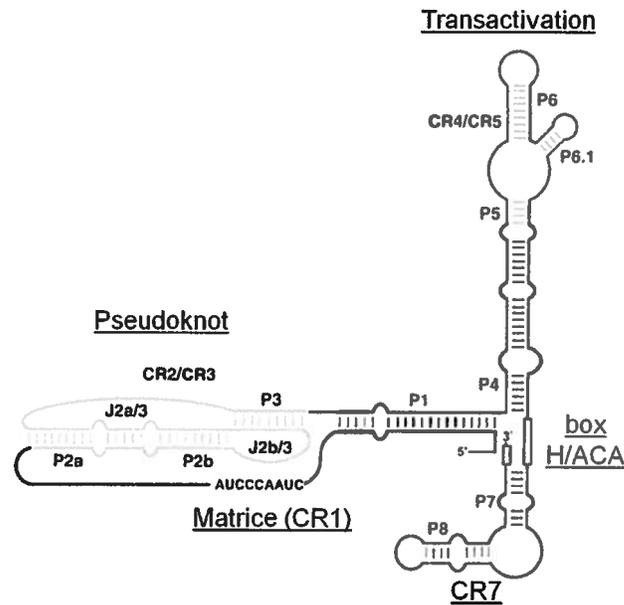


Figure 1.9 Schématisation de la sous-unité TER et de sa structure secondaire comprenant la séquence matrice d'ARN (CR1), le domaine pseudoknot CR2/CR3, le domaine de transactivation (CR4/CR5), le domaine box H/ACA (CR6/CR8) et le domaine CR7. Modifiée de (Sekaran et al. 2009)

Parmi les protéines associées à TER, on retrouve les protéines de liaison des petits ARN nucléolaires (snoRNA) hGAR1, dyskérine/NAP57, hNOP10 et hNHP2, qui sont associées au domaine H/ACA et qui influencent la stabilité, l'accumulation, la maturation et la localisation de la sous-unité. Les ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (hnRNPs) C1, C2, A1 et UP1 s'associent à TER et elles permettent l'accessibilité de TER aux télomères (Cong et al. 2002; Wojtyla et al. 2010).

Enfin, bien que la sous-unité TER soit nécessaire à l'activité enzymatique de la télomérase, son niveau d'expression n'est pas corrélée à l'activité enzymatique mesurée dans la cellule de sorte qu'elle peut être exprimée dans une cellule chez laquelle on ne détecte pas d'activité de la télomérase (Cong et al. 2002).

1.3.1.2 La sous-unité TERT et ses protéines associées

La sous-unité TERT est l'unité catalytique de l'enzyme indispensable à la synthèse des télomères aux extrémités des chromosomes (Pitts et al. 1999; Aisner et al. 2002; Cong et al. 2002). Selon des études phylogénétiques, contrairement à TER, la séquence primaire de TERT est bien conservée parmi les différentes espèces (Cong et al. 2002; Sekaran et al. 2009), bien qu'une quarantaine de protéines TERT ou TERT-*like* ait été identifiées chez des eucaryotes aussi différents que les champignons, les plantes, les protozoaires et les mammifères (Autexier et al. 2006).

La structure secondaire de TERT comporte beaucoup de similarités avec les autres transcriptases inverses et elle se divise essentiellement en trois domaines primaires : le domaine de liaison à l'ARN (comprenant les motifs CP et T), le domaine de transcriptase inverse (RT) qui contient 7 motifs conservés (1, 2, A, B', C, D et E) et le domaine *Thumb* qui consiste en la portion carboxy-terminale de TERT (Autexier et al. 2006; Sekaran et al. 2009). La région *Thumb* est la région dont la séquence est la plus variable et cette dernière est impliquée dans la localisation cellulaire de l'enzyme de même que dans l'établissement de sa fonction. Toutefois, chez certaines souches de nématodes *Caenorhabditis*, ce domaine est absent, mais cette perte est compensée par le gain d'autres domaines ou par l'optimisation de domaines analogues afin de conserver l'activité enzymatique de la protéine (Autexier et al. 2006).

La structure secondaire de TERT a une forme comparable à celle d'une main et elle est très similaire à la structure d'autres polymérases. Le domaine RT, dans lequel sont présents les résidus catalytiques clés, forme la région de la structure qui est associée à la paume et aux doigts, alors que la région carboxy-terminale a la forme d'un pouce, d'où son nom de région *Thumb* (Sekaran et al. 2009). Chez les vertébrés, les levures et les ciliés on retrouve le domaine supplémentaire TEN qui est situé dans la région amino-terminale. Son rôle exact demeure incertain, mais il possède une forte affinité pour l'ADN et pourrait ainsi faciliter la liaison initiale de l'enzyme avec les télomères (Sekaran et al. 2009). Une étude récente a aussi mis en évidence le rôle du domaine TEN lors du positionnement de l'extrémité 3' du télomère à l'intérieur de site actif de la télomérase (Jurczyluk et al. 2010). Enfin, le niveau d'expression de TERT est corrélé à l'activité enzymatique mesurée à l'intérieur d'une cellule, ce qui définit TERT comme l'élément structural limitant de l'activité du complexe enzymatique (Xu et al. 1999; Aisner et al. 2002; Cong et al. 2002).

Tout comme pour TER, plusieurs protéines s'associent à la sous-unité TERT. La première protéine identifiée est la *Telomerase associated Protein 1* (TEP1) et celle-ci relie TERT au

substrat matrice d'ARN de la sous-unité TER. TEP1 contient d'ailleurs 12 répétitions du motif WD40 qui permet les interactions interprotéiques (Chang et al. 2002; Cong et al. 2002). Plusieurs chaperonnes ont aussi été identifiées et leur rôle consiste essentiellement en la stabilisation de la sous-unité afin d'en permettre l'assemblage et elles influencent aussi la localisation cellulaire (Cong et al. 2002). Par exemple, les protéines p23 et p90 se lient à TERT et participent à l'assemblage fonctionnel (Cong et al. 2002) et elles sont liées de façon permanente au complexe enzymatique (Holt et al. 1999). Ce qui caractérise la télomérase humaine est qu'elle effectue des synthèses successives de sorte que plusieurs séquences nucléotidiques TTAGGG sont ajoutées à l'extrémité du chromosome avant que l'enzyme ne soit relâchée. L'enzyme se doit donc de transloquer à l'extrémité 3' dès qu'un nouveau télomère est synthétisé et il a été démontré que la présence des chaperonnes p23 et HSP90 est essentielle à ce déplacement (Forsythe et al. 2001).

Les protéines HSP40, HSP70 et HSP90 et HOP (Heat Shock Protein Organizing Protein) sont également des partenaires de TERT qui participent à l'assemblage adéquat du complexe actif (Holt et al. 1999; Chang et al. 2002), tout comme la protéine 14-3-3, connue pour ses rôles dans la transduction de signaux, dans les points de contrôle du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Seimiya et al. 2000; Sekaran et al. 2009). 14-3-3 influence la localisation cellulaire de TERT en interagissant avec les résidus sérines/thréonines de la région carboxy-terminale de TERT. D'ailleurs, des mutations des résidus thréonine 1030 et sérines 1037 et 1041, de même qu'une expression négative dominante de 14-3-3 se solde par une accumulation de TERT dans le cytoplasme. Ce qui mène conséquemment ultimement à la perte de l'activité enzymatique de la télomérase (Seimiya et al. 2000; Sekaran et al. 2009).

Enfin, l'état d'oligomérisation de la télomérase est aussi un phénomène variable qui dépend de l'espèce. Des complexes atteignant jusqu'à 1 000 kDA ont été identifiés chez les mammifères (Beattie et al. 2001). Des modèles multimériques avec plus d'un site actif, sont avec plusieurs sous-unités TERT, ont été proposés (Niu et al. 2000). Chez l'humain, des multimères fonctionnels ont été identifiés et cette conformation facilite la reconnaissance et l'élongation du substrat, autant dans les modèles *in vitro* ou *in vivo* (Beattie et al. 2001). Même si seule la présence des unités TER et TERT est essentielle pour mesurer la fonction enzymatique minimale de la télomérase, il est évident que ces sous-unités font parties de groupements protéiques complexes.

1.3.2 Les rôles de la télomérase

Tel que mentionné précédemment, c'est en cherchant à identifier le mécanisme par lequel certains types de cellules ont une longévité cellulaire accrue que la télomérase a été découverte. Or, mis à part sa capacité à synthétiser les télomères, des travaux ont révélé que la télomérase est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans l'apoptose.

1.3.2.1 La synthèse des télomères et leur rôle dans la longévité des cellules

La synthèse *de novo* des télomères est la fonction la mieux connue de cette enzyme (Greider et al. 1985; Cong et al. 2008; Sekaran et al. 2009). Les télomères sont des répétitions de courtes séquences double-brins riches en GT (TTAGGG chez l'humain) (Moyzis et al. 1988; Cong et al. 2002; De Semir et al. 2007) et qui se terminent en 3' par une séquence simple-brin de longueur variable (Cong et al. 2002). Normalement, la longueur globale des télomères est uniforme pour l'ensemble des chromosomes à l'intérieur d'une même cellule et elle oscille entre 3 et 12 kilobases (Moyzis et al. 1988). Ceux-ci ont une importance capitale puisqu'ils empêchent la dégradation de l'ADN, les recombinaisons homologues et les fusions chromosomiques aberrantes de type *end-to-end* (Cong et al. 2002).

En absence de télomères, l'ADN chromosomique est instable et soumise au processus de réparation des dommages de l'ADN. Lorsqu'elle est détectée, l'ADN non-protégée par les télomères est dégradée par les endonucléases avant d'être fusionnée avec une autre extrémité libre (Greider 1999). Or, les analyses de microscopie électronique ont révélées que les télomères permettent d'échapper à ce mécanisme via la formation d'une structure fermée, la *T-loop*, qui se forme par le repliement de l'extrémité simple-brin en 3' à l'intérieur de la séquence double-brin du télomère au niveau de la boucle de déplacement *D-loop* (Greider 1999). La formation de la *T-loop* et le recrutement de la télomérase pour la synthèse *de novo* des télomères demandent aussi la liaison constitutive d'un complexe formé de six protéines, la shelterine. Ce complexe participe donc activement à la protection des télomères et possède lui-aussi un rôle important dans le maintien de l'intégrité et de la stabilité du génome (de Lange 2005).

La longueur des télomères est l'élément qui permet de déterminer le nombre de divisions possibles pour une cellule donnée. Dans la cellule somatique saine, la télomérase est inactive et l'ADN polymérase qui est responsable de la synthèse des nucléotides ne parvient pas à synthétiser l'extrémité 3' en entier. Chacune des divisions cellulaires entraînent donc le

raccourcissement du chromosome. La perte va de 50 à 200 bases par division chez l'être humain (Pitts et al. 1999; Cong et al. 2008). Lorsque les télomères atteignent une longueur critique, l'intégrité du code génétique est menacée par de nouvelles divisions cellulaires et cet état dit « de crise » se traduit par l'entrée de la cellule en sénescence réplivative. Elle cesse ainsi de proliférer tout en demeurant viable (Masutomi et al. 2003; Cong et al. 2008). Des études ont toutefois révélé que la télomérase est active dans certaines cellules normales et différenciées comme les kératinocytes, les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques progénitrices CD34⁺ (Masutomi et al. 2003), et dans des sous-populations de cellules à fort taux de prolifération au niveau de la peau, des follicules pileux, du tractus gastro-intestinal, de l'endomètre et des testicules (Collins et al. 2002). Par contre, l'activité de la télomérase y est faible ou transitoire et, par conséquent, elle demeure insuffisante pour contrecarrer totalement le raccourcissement des télomères. Les divisions cellulaires que pourront effectuer ces cellules seront plus nombreuses, mais leur durée de vie demeure limitée (Figure 1.10) (Collins et al. 2002; Masutomi et al. 2003).

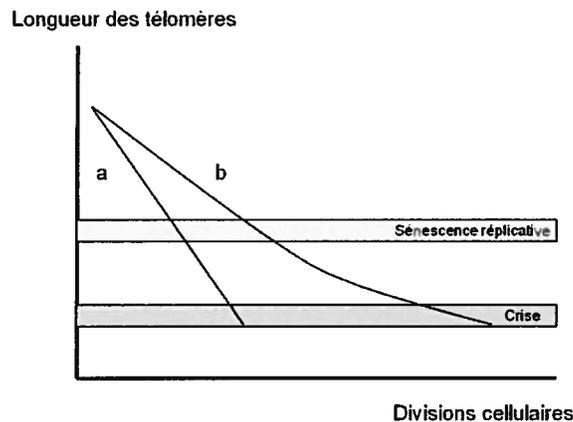


Figure 1.10 Schématisation de la longueur des télomères dans des cellules où la télomérase est (a) absente ou inactive et dans des cellules où elle est (b) faiblement active ou activée de façon transitoire.

Lorsque les télomères sont épuisés, la poursuite du cycle cellulaire et des divisions cellulaires est possible quand les voies de signalisation du rétinoblastome (Rb) et de p53 sont inactivées. Certaines séquences codantes essentielles sont alors endommagées de façon irréversible, ce qui entraîne inévitablement la mort de la cellule par apoptose (Masutomi et al. 2003). L'érosion des télomères est aussi un mécanisme normal et d'une importance capitale dans la protection naturelle de l'organisme, notamment pour contrer la cancérogénèse. Le fait de limiter le nombre de divisions cellulaires permet par le fait même de réduire l'introduction et l'accumulation d'erreurs dans le code génétique qui sont des éléments déclencheurs à son initiation. Dans les

modèles *in vivo*, les télomères sont d'ailleurs plus courts chez les individus les plus âgés et, dans les modèles *in vitro*, les cellules mises en culture pour une plus longue période et qui subissent plusieurs passages ont habituellement des télomères plus courts (Forsyth et al. 2002).

Enfin, chez plusieurs espèces dont l'être humain, la sous-unité TERT peut agir en temps qu'endonucléase, c'est-à-dire qu'elle coupe la séquence d'ADN à l'intérieur même de la séquence double-brin (Huard et al. 2004; Oulton et al. 2004). L'utilité de cette fonction n'a pas encore été clairement établie, mais il a été proposé que ceci participe au maintien de l'intégrité de la séquence des télomères, en plus de faciliter le rapatriement de la télomérase au chromosome et d'initier la réparation du chromosome endommagé. Dans l'ensemble, ceci permet de conserver la séquence nucléotidique modèle intacte, elle qui est nécessaire à l'élongation des télomères (Sekaran et al. 2009).

1.3.2.2 Les rôles de la télomérase indépendants de la synthèse des télomères

Des travaux rapportés dans la littérature proposent aussi d'autres rôles à la télomérase, plus particulièrement à la sous-unité catalytique TERT. La plupart sont indépendants des télomères et ils illustrent l'implication de l'enzyme dans d'autres mécanismes biologiques. Par exemple, l'enzyme est impliquée dans le vieillissement, dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans l'apoptose.

Comme l'activité de la télomérase régule la longévité de la cellule, un lien entre l'enzyme et le vieillissement est suggéré. Des expériences menées à l'aide d'un modèle murin résistant au développement tumoral par l'augmentation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (p53, p16 et p19ARF) ont révélés que la surexpression additionnelle du gène TERT se traduit par le ralentissement du vieillissement et par l'augmentation de l'espérance de vie (Tomas-Loba et al. 2008). La coordination neuromusculaire et la tolérance au glucose, les paramètres utilisés dans l'évaluation du vieillissement, sont meilleures dans le groupe murin surexprimant TERT que dans le groupe témoin (Tomas-Loba et al. 2008). Toutefois, lorsque les modèles utilisés ne sont pas résistants au développement tumoral, la réactivation de la télomérase est corrélée au développement de tumeurs dans les modèles *in vivo* (Gonzalez-Suarez et al. 2001; Chen et al. 2007; Casalbore et al. 2009) et à la transformation des modèles *in vitro* vers un phénotype tumorigène (Zhou et al. 2003; Mason et al. 2006; Luan et al. 2009).

D'autres travaux menés chez la souris ont démontré que la surexpression de TERT est associée à l'augmentation de la prolifération cellulaire, de la croissance et de la cicatrisation, mais le nombre de tumeurs se développant est aussi en hausse (Gonzalez-Suarez et al. 2001). Des études menées avec les cellules épithéliales mammaires humaines HMECs transfectées pour surexprimer TERT ont démontré que la prolifération cellulaire accrue dépend aussi de modulations dans le patron d'expression de plusieurs gènes, dont l'induction de l'expression des gènes de facteurs de croissance épidermique (EGFR) et fibroblastique (FGF) (Smith et al. 2003). L'expression ectopique de TERT s'accompagne en plus de la répression de gènes qui inhibent la croissance cellulaire, comme le gène du récepteur endogène de l'interleukine 1 (IL-1R) qui bloque la croissance cellulaire induite par l'interleukine 1 (Smith et al. 2003). Enfin, l'expression ectopique de TERT entraîne une perte d'efficacité du facteur de transformation TGF β , un inhibiteur de la croissance cellulaire (Stampfer et al. 2001; Geserick et al. 2006). Il semble donc que, dans des cellules murines et humaines, l'induction de l'expression de TERT s'accompagne de nombreuses modifications dans le patron d'expression de gènes qui sont eux-mêmes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire.

Des travaux menés dans certaines cellules cancéreuses murines et humaines ont mis en évidence l'implication de TERT dans l'apoptose. TERT a une activité catalytique qui module les dommages à l'ADN mitochondrial (ADNmt) car TERT contient un signal de localisation mitochondriale. Lorsque des dommages à l'ADNmt sont induits par des substances génotoxiques comme des réactifs oxygénés tel que le H₂O₂ (Santos et al. 2006; Cong et al. 2008) ou l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (Zhang et al. 2003), TERT est recruté. Les dommages de l'ADNmt et le taux de mort cellulaire par apoptose sont aussi plus importants lorsque TERT est recruté à la mitochondrie (Zhang et al. 2003; Santos et al. 2006; Gordon et al. 2010).

Dans l'ensemble, ces données révèlent que la télomérase est impliquée de diverses fonctions dont la mieux caractérisée demeure la synthèse des télomères. Toutefois ses rôles dans l'apoptose et dans la régulation génique doivent aussi d'être pris en considération, étant donné leur importance respective dans la régulation de la survie cellulaire. Il est donc évident que la télomérase représente une protéine importante dans le domaine de la cancérogénèse.

1.3.3 La télomérase et la cancérogénèse

La télomérase est un joueur majeur en cancérogénèse puisque sa réactivation, qui s'effectue pour la quasi-totalité des cas de cancers, engendre le maintien des télomères. Pouvant alors échapper à la sénescence réplivative, la cellule prolifère de façon illimitée, ce qui est une prédisposition à la conversion néoplasique (Oshimura et al. 1997). Une étude menée par Kim *et al.* a d'ailleurs démontré que la télomérase est active dans environ 90% des tissus tumoraux humains alors qu'elle est indétectable de l'ensemble des tissus sains environnants les tumeurs (Kim et al. 1994). Parmi les tissus tumoraux testés dans cette études et qui proviennent de 12 types tissulaires distincts, les tumeurs négatives pour la télomérase sont les tumeurs bénignes, suggérant que l'agressivité de la tumeur est aussi corrélée à l'activité de la télomérase (Kim et al. 1994). Les travaux effectués par Hiyama *et al.* appuient d'ailleurs ces observations. Ils ont démontré de leur côté que la télomérase est active dans 93% des échantillons tumoraux provenant exclusivement d'échantillons mammaires alors que seulement 4% des tissus non-cancéreux adjacents aux tumeurs démontrent des signes d'activité de la télomérase (Hiyama et al. 1996). La classification des échantillons en fonction du développement tumoral démontre que celui-ci est corrélée à l'activité enzymatique puisque, pour les stades 2, 3 et 4, 98%, 96% et 100% des tumeurs sont positives pour la télomérase, alors que seulement 68% des tumeurs de stade tumoral 1 l'expriment (Hiyama et al. 1996). Enfin, les rechutes pour un cancer sont plus fréquentes quand l'activité de la télomérase est forte (Herbert et al. 1999; Pitts et al. 1999).

Même quand la télomérase n'est pas réactivée, des séquences télomériques sont maintenues dans les cellules cancéreuses. Ceci s'effectue par un processus autre nommé Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) (Herbert et al. 1999; Pitts et al. 1999). L'ALT est un terme général qui regroupe différents mécanismes comme la rétrotransposition de séquences, la conversion génique et la recombinaison homologue (Grandin et al. 2008). La contribution de ces mécanismes dans le maintien des télomères n'est toutefois pas équivalente aux effets de la télomérase en ce qui concerne la transformation cellulaire. Dans les fibroblastes humains immortalisés GM84 où les télomères sont maintenus par ALT, l'introduction de l'oncogène ras est insuffisante pour initier la transformation des cellules vers un phénotype tumorigène alors que l'introduction de l'expression de TERT et de ras, permet la transformation des cellules immortelles en cellules tumorigènes (Stewart et al. 2002).

Puisqu'elle permet la survie de la majorité des types de cellules cancéreuses, la télomérase est une cible thérapeutique intéressante dans la lutte aux cancers. Toutefois, comme elle est très faiblement exprimée en conditions physiologiques et qu'elle est membre de complexes protéiques de taille importante, il est ardu de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans sa régulation. Il s'avère toutefois primordial de les identifier et de les comprendre.

1.3.4 La régulation de l'activité enzymatique de la télomérase

La télomérase est une enzyme très complexe et la modulation de son activité dépend de nombreux éléments. La transcription des sous-unités TER et TERT, l'épissage alternatif, la maturation et les modifications des sous-unités, le transport et la localisation cellulaire de chacune des composantes, l'assemblage du complexe actif et l'accessibilité des télomères par la télomérase sont tous des éléments qui ont un impact sur l'efficacité enzymatique (Cong et al. 2002; Forsyth et al. 2002; Wojtyla et al. 2010). Les mécanismes impliqués sont donc très nombreux et méritent qu'on s'y attarde. Il est également possible qu'une combinaison de certains d'entre eux soit spécifique aux cellules cancéreuses. Or, comme ceux-ci sont nombreux et que TERT est reconnu comme l'élément limitant de l'activité de la télomérase, seul la régulation de la transcription, l'épissage alternatif et les modulations post-traductionnelles de la sous-unité TERT seront abordés dans ce mémoire et une brève attention sera donnée aux protéines qui influencent l'assemblage du complexe enzymatique et l'accessibilité aux télomères.

1.3.4.1 La régulation de la transcription de TERT

La régulation de la transcription de la sous-unité TERT est considérée comme l'un des mécanismes les plus importants dans la modulation de l'activité de la télomérase. Il a été démontré que le promoteur de hTERT est inactif dans les cellules normales et dans les cellules transformées et non-immortelles, alors qu'il est actif dans les cellules immortalisées (Cong et al. 2002).

Chez l'humain, le gène TERT est situé sur le chromosome 5p en une seule copie sur la partie la plus distale du bras court (Bryce et al. 2000). Dans les cellules cancéreuses, le plus grand nombre de transcrits s'explique par une augmentation du nombre de chromosome plutôt que par la duplication du nombre de loci à l'intérieur du chromosome 5 (Cong et al. 2002). Chez

l'humain, le gène TERT (hTERT) est composé de 16 exons et de 15 introns, et il s'étend sur environ 35 kb. La séquence promotrice minimale du gène hTERT comprend les 330 pb en amont du codon de départ ATG et elle s'étend jusqu'au début du deuxième exon (Cong et al. 2002). De plus, le promoteur est riche en GC, ce qui est caractéristique de la présence d'îlots CpG et reflète l'importance de la méthylation dans la régulation de la transcription génique de hTERT. Aucune boîte TATA ou CAAT est présente, mais le promoteur contient de nombreux sites de liaisons spécifiques à divers facteurs de transcription (Cong et al. 1999). La présence des sites de liaisons des facteurs de transcription révèle ainsi que la régulation de hTERT dépend du contexte cellulaire et qu'elle est sujette à plusieurs niveaux de contrôle (Cong et al. 1999; Cong et al. 2002).

Certains des facteurs de transcription qui lient le promoteur de hTERT sont des activateurs de la transcription génique alors que d'autres sont des répresseurs. Selon la revue de littérature de Poole *et al.* publiée en 2001 (Poole et al. 2001), il y a des sites de liaisons pour 18 facteurs de transcriptions activateurs, pour quatre répresseurs et un dont l'effet est incertain. Ceux-ci couvrent les 950 pb en amont du codon de départ de hTERT jusqu'aux 360 pb en aval. Or, parmi les facteurs qui favorisent l'activité de la télomérase, le plus connu est c-Myc. Le promoteur minimal de hTERT contient deux sites de liaison auquel c-Myc se lie, les *E-box*. Ils sont situés en -34 et -242 en amont du codon ATG (Cong et al. 1999) et il a été démontré que c-Myc favorise la transcription de hTERT dans plusieurs types cellulaires humains dont les cellules de cancers colorectaux (Endoh et al. 2005; Hao et al. 2008; Hu et al. 2009) et prostatiques (Latil et al. 2000; Gil et al. 2005; Jagadeesh et al. 2006).

Il a aussi été mis en évidence que les facteurs Sp1 et ER participent à la régulation positive de la transcription de hTERT. Entre les deux *E-box*, on retrouve cinq *GC-box*, qui sont des sites de liaison qui permettent l'interaction de Sp1 avec l'ADN (Cong et al. 1999; Poole et al. 2001) et la collaboration de c-Myc avec Sp1 pour réguler la transcription de hTERT chez l'humain a été démontré (Kyo et al. 2000; Cong et al. 2002). Un site de liaison potentiel pour Sp1 a aussi été identifié en dehors de la région promotrice minimale dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, en -873, et il est adjacent à un demi site spécifique au ER (Kyo et al. 1999; Poole et al. 2001). Or, le site Sp1/ER ne semble pas affecté la transcription de hTERT dans les MCF-7 exposées aux œstrogènes, mais des sites similaires ont été rapportés pour la cathepsine D, et la présence des deux demi-sites est nécessaire aux effets dépendants des œstrogènes (Krishnan et al. 1994). L'activation de la transcription du gène hTERT par les œstrogènes peut aussi être indirecte parce que E₂ induit l'expression du facteur c-Myc dans les cellules

cancéreuses mammaires MCF-7 (Kyo et al. 1999) tout comme dans les cellules de choriocarcinomes humains BeWo (Sarkar et al. 2006). Malgré ces évidences, la corrélation entre l'expression des gènes c-Myc et hTERT n'est pas toujours présente dans les cellules cancéreuses mammaires humaines, ce qui implique que c-Myc n'est pas obligatoirement impliqué dans la modulation de la transcription génique de la télomérase (Kirkpatrick et al. 2003; Kirkpatrick et al. 2004; Elkak et al. 2005).

La répression de l'activité de la télomérase dépend aussi de facteurs de transcription qui modulent l'expression de hTERT. Le premier répresseur de transcription de hTERT découvert est le *Wilm's tumor 1 tumor suppressor* (WT1) (Oh et al. 1999). Or, l'expression de WT1 est spécifique aux reins, aux gonades et à la rate. La répression de TERT dépendante de WT1 se fait donc que dans ces tissus lors de la différenciation cellulaire et du développement des tissus (Poole et al. 2001; Cong et al. 2002).

Mad1 se dimérise à Max et l'hétérodimère formé réprime la transcription de hTERT en se liant aux *E-box* (Cong et al. 2002). C-Myc et Mad1 sont de la même famille et elles ont des rôles opposés dans la régulation de la transcription de gènes, notamment dans la régulation de hTERT dans les cellules cancéreuses mammaires humaines (Cong et al. 2002; Papanikolaou et al. 2009). Le suppresseur de tumeur p53 est aussi reconnu pour réprimer l'expression de la sous-unité TERT et sa dimérisation avec Sp1 est essentielle (Xu et al. 2000; Poole et al. 2001; Cong et al. 2002; Kyo et al. 2008). Enfin, des sites de liaison pour le répresseur *Myeloid-specific zinc finger protein 2* (MZF-2) (Fujimoto et al. 2000) ont été identifiés et les protéines RB et E2F inhibent la transcription de hTERT dans les cellules MCF-7 (Cong et al. 2002; Berletch et al. 2008).

1.3.4.2 L'épissage alternatif de hTERT

Jusqu'à présent, 10 transcrits de hTERT ont été identifiés (Wojtyla et al. 2010), mais les transcrits *full length*, *α -spliced*, *β -spliced* sont ceux qui retiennent l'attention parce qu'ils sont les plus abondants dans les cellules qui expriment hTERT (Ulaner et al. 1998; Mavrogiannou et al. 2007). La variation dans les transcrits de hTERT est d'autant plus importante en embryogénèse, puisque la perte d'activité de télomérase dans les tissus foétaux en développement est corrélée aux changements dans les niveaux d'expression de transcrits de hTERT (Ulaner et al. 1998; Poole et al. 2001; Ulaner et al. 2001; Wojtyla et al. 2010). Les mécanismes responsables de l'épissage alternatif de hTERT sont toutefois peu décrits dans la littérature, mais toutes les

jonctions exons/introns sont conformes aux séquences consensus GT/AG à l'exception du site donneur du dernier intron dont la séquence est GC (Cong et al. 2002).

Le transcrit *full length* correspond à la séquence entière du gène hTERT et il forme l'enzyme avec la plus forte activité catalytique (Ulaner et al. 1998; Ulaner et al. 2001; Strati et al. 2009). Dans les tissus fœtaux humains, son expression est corrélée à une télomérase active tandis que la répression de son expression est associée à la baisse de l'activité de la télomérase indépendamment de la présence des autres transcrits (Ulaner et al. 1998). Dans des tissus normaux ovariens humains où la télomérase est inactive, il a étonnamment été observé que dans 16 des 20 échantillons expriment le transcrit *full length* qui est habituellement décrit comme l'élément limitant de l'activité de la télomérase. Dans les quatre échantillons où l'ARNm de hTERT est absent, deux n'expriment aucun transcrit et deux expriment le *β -spliced* (Ulaner et al. 2000). Ceci qui témoigne du rôle des mécanismes subséquents à l'épissage alternatif dans la régulation de l'activité de la télomérase.

Le transcrit *α -spliced* se caractérise par une délétion de 36 pb de l'exon 6, situé dans le motif conservé du domaine transcriptase inverse A (Ulaner et al. 1998; Hisatomi et al. 2003). Or, ce transcrit n'est jamais exprimé seul dans la cellule et sa surexpression dans la cellule est corrélée à l'inactivité enzymatique de la télomérase (Colgin et al. 2000; Yi et al. 2000). On le désigne comme la forme dominante négative de l'enzyme.

Le *β -spliced* se caractérise quant à lui par la délétion partielle des exons 7 et 8 qui entraîne une perte de 182 bases menant à une mutation non-sens. Il en résulte une protéine tronquée inactive où les motifs B, C, D et E du domaine de transcriptase inverse sont absents (Ulaner et al. 1998; Ulaner et al. 2001; Hisatomi et al. 2003). Or, tout comme le transcrit *full length*, le *β -spliced* peut être exprimé seul dans la cellule (Ulaner et al. 1998; Ulaner et al. 2001; Rha et al. 2009).

Dans les cellules en culture, il a été démontré que le nombre et la nature des transcrits de TERT changent en fonction de l'état pré- ou post-critique de la cellule. Ceci suggère que des changements dans l'épissage alternatif de la sous-unité hTERT sont nécessaires quand la cellule contourne l'état de sénescence répliquative pour devenir immortelle (Kilian et al. 1997). En condition d'hypoxie, les transcrits *full length* augmentent au détriment du nombre de transcrits *β -spliced*, bien que le niveau global d'ARNm de hTERT reste inchangé et ceci est associé à l'augmentation de l'activité de la télomérase (Anderson et al. 2006). Or, il a été démontré à l'aide de lignées cellulaires issues de cancers humains leucémiques, mammaires, cervicaux et colorectaux que le transcrit le plus abondant est le *β -spliced*, suivi du *full length* alors que le

transcrit *α -spliced* est peu abondant ou absent (Mavrogiannou et al. 2007). Enfin, dans les cancers mammaires spécifiquement, il y a une tendance générale selon laquelle l'activité de la télomérase est plus faible dans les échantillons provenant de patients qui expriment seulement le transcrit *β -spliced* (Rha et al. 2009).

1.3.4.3 Les modifications post-traductionnelles de la sous-unité hTERT

Les modifications post-traductionnelles sont également importantes dans la régulation de l'activité de la télomérase puisqu'elles en modifient l'activité générale ou interfèrent avec son recrutement aux télomères (Xu et al. 1999; Forsyth et al. 2002; Wojtyla et al. 2010). La protéine kinase Akt (PKB) est reconnue pour activer la télomérase lorsqu'elle phosphoryle des résidus sérine/thréonine de la sous-unité hTERT. Le séquençage du gène hTERT a permis l'identification des sérines 227 et 824 comme substrats potentiels d'Akt puisqu'elles appartiennent à une séquence correspondant parfaitement au site reconnu par cette kinase ($xxRxRxxS/TXx$, où X est un acide aminé hydrophobe) de même que les sérines 267 et 984 qui font parties de séquences similaires (Kang et al. 1999). Des changements dans les niveaux de phosphorylation de hTERT, conséquents à des modulations dans l'activité de la télomérase ont d'ailleurs été corrélés à la modulation de l'activité d'Akt (Kunisada et al. 2005; Jagadeesh et al. 2006; Zhao et al. 2008; Moon et al. 2009; Moon et al. 2009) et Akt est reconnue pour être active et fortement phosphorylée dans les cellules cancéreuses humaines (Lin et al. 2005). La protéine phosphatase 2A (PPA2) peut quant à elle réprimer l'activité de la télomérase dans les cellules cancéreuses mammaires humaines en déphosphorylant les résidus sérines et ainsi renverser l'activation induite par Akt (Wojtyla et al. 2010).

Les différentes isoformes de la kinase PKC comptent aussi la sous-unité hTERT parmi ses substrats (Cong et al. 2002; Wojtyla et al. 2010). Par exemple, l'inhibition de PKC est corrélée à l'inhibition de la télomérase dans des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Eitsuka et al. 2006). La régulation de la télomérase par des modulations de la phosphorylation de hTERT par la PKC- α a été démontrée dans des cellules cancéreuses mammaires (Li et al. 1998) et prostatiques (Jagadeesh et al. 2006), alors que les isoformes α , β , δ , ϵ et ζ régulent l'activité de la télomérase dans des cellules cancéreuses humaines de la tête et du cou. Enfin, PKC- δ est aussi d'une importance capitale dans le processus de sénescence cellulaire des cellules normales humaines via la répression de hTERT (Katakura et al. 2009).

Enfin, le niveau de phosphorylation de résidus tyrosines, notamment la tyrosine 707, a un impact sur l'activité de l'enzyme qui influence la localisation cellulaire de TERT ce qui affecte ultimement le niveau d'apoptose cellulaire (Haendeler et al. 2003; Jakob et al. 2008). Il a également été démontré que la tyrosine kinase c-Abl phosphoryle la tyrosine 310, située dans un site riche en proline, ce qui réprime l'activité catalytique de hTERT (Kharbanda et al. 2000).

1.3.4.4 L'assemblage du complexe enzymatique actif

L'assemblage de la télomérase est une étape essentielle pour l'obtention d'un complexe enzymatique fonctionnel et de nombreuses protéines participent à sa formation. Certaines d'entre elles font parties du complexe en tout temps alors que d'autres n'y sont associées que transitoirement. Par exemple, les chaperonnes HSP90 et p23 sont des partenaires essentielles à l'assemblage du complexe (Holt et al. 1999) et HSP90 participe à la stabilité (Keppler et al. 2006).

De plus en plus d'évidences démontrent également que les membres du complexe télomérique varient selon le stade de maturation de l'enzyme et que seules les sous-unités TERT, TER et la dyskérine sont nécessaires à une activité enzymatique minimale (Sekaran et al. 2009). Par exemple, la pontine et la reptine, deux ATPases, sont membres du complexe et participent à son assemblage et à son accumulation nucléaire dépendante de l'ATP (Sekaran et al. 2009). Or, leur présence est corrélée à une activité enzymatique plus faible et suggère que ces deux ATPases doivent être relâchées en cours de maturation pour que l'enzyme soit pleinement active (Sekaran et al. 2009).

TCAB1 est aussi un membre important puisqu'elle permet le déplacement de la télomérase vers les *Cajal bodies* (Sekaran et al. 2009), des sous-organelles nucléaires suggérés comme le site de biosynthèse de la télomérase où s'accumulent hTER (Zhu et al. 2004). L'assemblage du complexe enzymatique a aussi été décrit comme un processus dynamique pendant le cycle cellulaire. En effet, l'assemblage de la télomérase se fait directement au niveau des télomères et la localisation de la télomérase au niveau des télomères est d'autant plus importante lors de la phase S. Durant les autres phases du cycle cellulaire un système de transport éloigne les sous-unités essentielles de la télomérase des télomères (Tomlinson et al. 2006; Wojtyla et al. 2010).

1.4 Hypothèses et objectifs de recherche

Tel que souligné, le cancer du sein est une maladie hétérogène pour laquelle le rôle des polluants environnementaux est incertain, bien qu'abondamment étudié par la communauté scientifique. Le projet de recherche présenté dans ce mémoire vise l'étude de la régulation de la télomérase par certains composés chimiques contaminants de l'environnement. Plus spécifiquement, il vise à démontrer les rôles du récepteur Ah dans l'inhibition de l'activité de la télomérase concomitante à la réduction de la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses mammaires humaines exposées à des ligands du récepteur Ah.

Les sections précédentes ont mis en lumière que le récepteur Ah est un facteur de transcription responsable des effets de plusieurs polluants et que les effets biologiques résultant de son activation dépendent à la fois du tissu et de l'espèce animale. Afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués chez l'humain, l'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* humains est apparue comme étant le choix le plus judicieux. Comme les ligands du récepteur Ah sont nombreux et que la TCDD est l'agoniste connu pour avoir la plus forte affinité, elle a été choisie comme composé modèle pour la réalisation des expériences mécanistiques. Ainsi, afin de répondre à l'objectif spécifique de déterminer quels sont les mécanismes sous-jacents aux effets anti-cancérogènes induits par la TCDD, des cellules cancéreuses mammaires humaines ont été exposées de façon continue à la TCDD pour des périodes allant de quelques heures à plusieurs jours. De nombreux éléments de réponse spécifiques au récepteur Ah ont été répertoriés dans le génome humain. Ainsi, l'une des hypothèses formulées est que l'activation du récepteur Ah par la TCDD mène à des modulations de transcription génique. Nous avons procédé à la mesure des niveaux d'ARNm de la sous-unité hTERT à l'aide d'une technique de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (*quantitative Real Time PCR*) chez des cellules exposées à la TCDD, avec ou sans une réduction quantitative de la protéine récepteur Ah (*knock down*) à l'aide d'ARN interférents. La liaison à l'ADN du récepteur Ah activé a aussi été vérifiée par une méthode de retardation sur gel (EMSA). Comme des modulations post-traductionnelles peuvent influencer le niveau d'activité de la télomérase et la prolifération cellulaire, les niveaux protéiques et de phosphorylation de divers résidus sérine/thréonine et tyrosine ont été mesurés par immunobuvardage de type Western, à partir de lysats cytosoliques, nucléaires ou entiers de cellules exposées à la TCDD. Ultimement, le but visé est d'identifier des voies de signalisation responsables des effets anti-cancérogènes observés.

CHAPITRE 2 : Down-regulation of telomerase through Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)-dependent mechanisms in human breast cancer cells

L'article présenté dans la présente section a été soumis au périodique *Breast Cancer Research* en date du 7 septembre 2011 par Dr Michel Charbonneau. Ce journal a été sélectionné notamment parce que les articles publiés sont des recherches originales, des revues de littératures et des commentaires ou des rapports concernant la biologie du cancer du sein. Les articles choisis se doivent d'amener de nouvelles données pertinentes dans le domaine de la biologie du cancer du sein, notamment au niveau génétique, biochimique et cellulaire. L'ensemble des articles publiés sont d'abord révisés par des pairs et la preuve de soumission de cet article est présentée en annexe de ce mémoire (Annexe II).

2.1 Participation des auteurs au contenu de l'article

L'ensemble des mises au point technique, les expériences et les analyses statistiques effectuées pour ce projet d'étude ont été réalisées par la première auteure de cet article, Sandra Pittet, à l'exception de la réalisation des expériences d'essais clonogéniques et de cytométrie en flux qui ont respectivement été réalisées par mesdames Hajer Jegham et Guylaine Lassonde. Sandra Pittet, a également effectué la rédaction complète de la première version de l'article. Dr Michel Charbonneau, second auteur, a encadré et supervisé l'ensemble du projet présenté en plus de réviser et corriger la version finale de l'article soumis.

2.2 Résumé de l'article soumis traduit en français

Introduction : La télomérase est une ADN polymérase dépendante de l'ARN est responsable de la synthèse des télomères et elle est réactivée dans la plupart des cas de cancers. La sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) est reconnue comme l'élément limitant de l'activité de la télomérase. Le récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques est un facteur de transcription dont l'activation est dépendante de la liaison du ligand. La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (TCDD) est le ligand modèle du récepteur Ah. Le récepteur

Ah activé par un ligand se lie à l'ADN via les éléments de réponse de la dioxine (DRE) pour moduler l'expression de gène ciblé. La TCDD prévient l'augmentation marquée de l'activité de la télomérase induite par le facteur de croissance épidermique dans les kératinocytes humains SIK.

Méthodes : Cette étude vise à déterminer si les mécanismes dépendants du récepteur Ah peuvent moduler l'activité de la télomérase à la baisse dans les cellules cancéreuses mammaires humaines. Les cellules mammaires humaines T47D ont été utilisées à titre de modèle pour évaluer les effets de la TCDD sur l'activité de la télomérase, de la transcription de la sous-unité hTERT, l'inhibition de l'expression du récepteur Ah, la liaison du récepteur Ah à l'ADN, la modulation des messagers clés de signalisation cellulaires comme la voie du récepteur carcinogénique ErbB2 et de la kinase Akt, de même que les effets sur la prolifération et le cycle cellulaire.

Résultats : Les données obtenues montrent le rôle du récepteur Ah dans la modulation à la baisse de la télomérase en se basant i) sur la propriété commune des ligands du récepteur Ah à réduire l'activité de la télomérase alors que des polluants chimiquement similaires mais qui ne sont pas des ligands du récepteur Ah sont sans effet; ii) la diminution de l'activité enzymatique de la télomérase dans les cellules qui expriment le récepteur Ah (T47D et MDA-MB-231) et l'absence d'effet dans les cellules qui n'expriment pas le récepteur; iii) l'activation claire de la voie de signalisation dans les cellules cancéreuses humaines tel que démontré par la translocation nucléaire du récepteur Ah et sa liaison concomitante aux éléments de réponse de la dioxine (DRE) de même qu'à la séquence promotrice du gène hTERT ; la perte de l'effet inhibiteur de la TCDD sur l'inhibition de la transcription du gène hTERT lorsqu'on diminue l'expression du récepteur Ah à l'aide d'ARN interférants (siRNA). De plus, une forte augmentation des niveaux du récepteur ErbB2 jumelée à une réduction des niveaux de phosphorylation de la kinase Akt (de facteur 2) dans les cellules traitées à la TCDD suggèrent fortement le rôle mécanistique du récepteur Ah dans la voie de signalisation menant à l'inhibition de l'activité de la télomérase.

Conclusion : La TCDD est un ligand du récepteur Ah qui inhibe la télomérase via la diminution de la transcription de la sous-unité hTERT et des modulations post-traductionnelles concomitantes à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Cette étude met en évidence un nouveau rôle du récepteur Ah dans le contrôle de la régulation de la télomérase et suggère un potentiel thérapeutique des ligands du récepteur Ah pour le traitement des cancers mammaires humains.

2.3 L'article tel que soumis

DOWN-REGULATION OF TELOMERASE THROUGH ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AhR)-DEPENDENT MECHANISMS IN HUMAN BREAST CANCER CELLS

Sandra Pittet¹ and Michel Charbonneau^{1,2}

Running title: AhR-dependent reduction of telomerase

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, 531 des Prairies boulevard, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

² To whom correspondence should be addressed

Tel. : (450) 687-5010 ext. 8831 Fax : 450-686-5309

Email: michel.charbonneau@iaf.inrs.ca

2.3.1 Abstract

Introduction : Telomerase, a RNA-dependent DNA polymerase responsible for the synthesis of telomeres, is reactivated in almost all cancer cases. The telomerase reverse transcriptase catalytic subunit (hTERT) has been shown to be the limiting component for telomerase activity. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) is as a model AhR ligand. Ligand-activated AhR binds to dioxin response elements (DRE) on DNA to modulate target gene expression. TCDD prevented the marked increase in telomerase activity induced by the Epidermal Growth Factor in human SIK keratinocyte cells. This research aimed to determine if AhR-dependent mechanisms can down-regulate telomerase activity in breast cancer cells.

Methods : Using the T47D human mammary cancer cell line model, we assessed the effect of TCDD on telomerase activity, transcription of hTERT and the role of AhR in its down-regulation, AhR DNA binding, modulation of certain key cell signaling messengers, such as the carcinogenic ErbB2 receptor-Akt pathway, and on cell proliferation and cell cycle.

Results : Data showed a role for AhR in the down-regulation of telomerase based on : i) the common property of AhR ligands, but not of chemically similar non AhR ligands, to decrease telomerase activity ; ii) the decreased telomerase activity in AhR-positive (T47D and MDA-MB-231) but not AhR-negative cancer cells ; iii) the clear activation of the AhR-pathway in human mammary cancer cells, as demonstrated by the nuclear translocation of AhR and its binding to both the well-known classic DRE DNA binding domain and a first reported sequence in the hTERT promoter ; iv) the loss in AhR-silenced cells of the down-regulation of hTERT transcription induced by TCDD. Moreover, a strong increase in ErbB2 levels concomitant with a 2-fold reduction in Akt phosphorylation level in TCDD-treated cells strongly supports a mechanistic role of this pathway in the AhR-dependent telomerase down-regulation.

Conclusion : The AhR ligand TCDD down-regulates telomerase through decreased transcription of the hTERT subunit and post-translational modifications concomitantly to a G1 cell cycle arrest. This novel AhR-dependent molecular control of telomerase suggests that AhR ligands may open a new therapeutic avenue for breast cancer treatment.

2.3.2 Introduction

The 2009 Nobel Prize in medicine granted to Drs Elizabeth H Blackburn, Carol W Greider and Jack W Szostak recognised the role of telomeres and the enzyme telomerase in chromosome maintenance [1]. Telomerase is a RNA-dependent DNA polymerase responsible for the synthesis of telomeres which are DNA sequences located at the end of linear chromosomes. They control the replication of chromosomes and protect the genomic integrity from degradation and aberrant homologous recombination of chromosomes [2-5]. When telomerase is inactive, multiple cell divisions lead to telomere shortening until they reach a critical length where additional cell divisions threaten the genomic integrity. To avoid cell death, normal cells then stop proliferating and enter into replicative senescence meaning they survive without further cell division [4, 6-8]. Telomerase is absent from the majority of the normal somatic cells but is expressed in stem and germinal cells. The shortening of telomeres is a normal process proposed to be a tumor-protective mechanism [4]. Reactivation of telomerase has indeed been shown to be sufficient to provide cell immortality, a characteristic of cancer cells [3, 9]. Telomeres are maintained in almost all cancer cases and *de novo* synthesis of telomeres occurs in about 85% of cancers as a result of telomerase activity [10]. In some other cases, telomeres are maintained through a pathway called Alternative Lengthening of Telomeres [11, 12]. Due to the critical role of telomerase in cancer cells, it is a promising therapeutic target for anti-cancer therapies [13-15].

Telomerase is a ribonucleoprotein complex containing two core elements, the hTER subunit which contains the RNA template of telomeres, and the telomerase reverse transcriptase subunit (hTERT), as well as other associated proteins [3, 5]. The catalytic hTERT subunit has been shown to be the limiting component for telomerase activity and its expression is sufficient to restore enzymatic activity in cells lines [16-18]. Post-translational modifications in hTERT have also been identified to influence the enzymatic telomerase activity in several cancer cell types [19-21], including human mammary cancer cells [22-24].

Persistent organic pollutants (POP), including the Polyhalogenated Aromatic Hydrocarbons (PHAH) such as the polychlorodibenzodioxins, polychlorinated biphenyls (PCB) and some organochlorine pesticides, are ubiquitous chemicals which have long half-lives and bioaccumulate in the adipose tissue including in the breast. The role of POP in breast cancer causation remains equivocal despite numerous studies [25-29]. Using a physiologically based

pharmacokinetic (PBPK) model developed to assess the lifetime toxicokinetic profile for POP, Verner et al. [30] demonstrated that the blood POP concentration at a specific single timepoint, the most common parameter used for these studies, doesn't reflect the lifetime toxicokinetic profile, notably at specific critical time windows of susceptibility in early life, a concept also suggested by others [31, 32]. Thus, such situation may hamper definite conclusions on the role of POP in breast cancer causation.

Literature also suggests that POP may possess anti-carcinogenic activity on the mammary gland. Based on a case-control study of postmenopausal Danish women who developed breast cancer and who were previously enrolled in the prospective study "Diet, Cancer and Health", the relative risk (RR) values adjusted for adipose organochlorine concentrations were all under 1.0 for four organochlorine pesticides assessed. Moreover, the mean RR adjusted value in estrogen receptor-negative breast cancers were the lowest for women with the highest chemical concentrations of *p,p'*-DDE (RR=0.1), β -hexachlorocyclohexane (RR=0.2), oxychlordan (RR=0.1), *trans*-Nonachlor (RR=0.2) and HCB (RR=0.2) [33]. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) has also been shown to reduce the volume of mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) in Sprague-Dawley rats [34]. Finally, experiments conducted with rats exposed to PCB have demonstrated increases in hepatocellular carcinomas, thyroid adenomas, gastric and intestinal tumors, while no tumors were detected in the mammary gland of these exposed animals [29].

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor which has been widely studied over the last decades and has been shown to drive the effects of some PHAH [35-37]. AhR is a member of the bHLH/PAS family (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-AhR-SIM homology domain) which are heterodimeric transcription regulators [35, 38-40]. When inactive, AhR is located in the cytoplasm and associated to a molecular chaperone complex made of a p23, XAP2 and a dimer of HSP90, waiting for activation by a ligand [39, 41]. When AhR is activated by an exogenous ligand, such as TCDD, it translocates into the nucleus, dimerizes with the aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) and the resulting AhR/ARNT complex binds co-activators or co-repressors to interact with DNA on xenobiotic response elements, called XRE or DRE, to modulate the expression of target genes [35, 38, 39, 41]. Although no endogenous ligand of AhR has been identified, numerous evidence suggest that AhR is more than a protein managing the effects of xenobiotics and important physiological functions of AhR in cell proliferation and differentiation, embryonic development, reproduction, immune system homeostasis and tumorigenesis have been proposed [38, 39, 42].

In a minimally-deviated spontaneously immortalized cultured human keratinocyte cell line (SIK), TCDD treatment prevented the marked Epidermal Growth Factor (EGF)-increase in telomerase activity, while it did not affect the low telomerase activity in controls in the absence of EGF [43]. TCDD has strong affinity to the AhR and is used as a model ligand for this receptor. Overall, all the above data has prompted us to hypothesize that AhR-dependent mechanisms can down-regulate telomerase activity in breast cancer cells. Using the T47D human mammary cancer cell line model, we assessed the effect of TCDD on telomerase activity, transcription of hTERT and the role of AhR in its down-regulation, AhR DNA binding, certain key messengers in signaling pathways, such as the ErbB2 receptor-Akt pathway, and on cell proliferation and cell cycle.

2.3.3 Materials and Methods

Polyhalogenated compounds

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (99.1%) (AccuStandard Inc. Connecticut, USA), PCB, polychlorodibenzofurans, PCDD, mixtures of PHAH (purity > 98%) (Wellington Laboratories, Ontario, Canada), hexachlorobenzene (HCB) (99%) (Aldrich, Milwaukee, USA), *p-p'*-DDE (2,2-Bis-(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene (99%) (Aldrich, Milwaukee), *o-p'*-DDE (1-chloro-2-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl) vinyl]benzene) (Supelco Canada Ltd, Ontario) and β -HCH (1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) (99%) (Supelco Canada Ltd, Ontario) were diluted in DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario).

Cell culture and treatment

T47D cells were grown in RPMI 1640 medium, without phenol red (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 0.01 mg/ml insulin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) and 2 g/L NaHCO₃. MDA-MB-231 cells were grown in RPMI 1640 Gibco® medium (Invitrogen, California, USA) containing 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES and supplemented with 10% FBS and 2 g/L NaHCO₃. SH-SY5Y cells were grown in MEME/F12K medium (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), supplemented with 10% FBS, 0.05 g/L sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 0.9 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) and 0.36 g/L NaHCO₃. T47D, MDA-MB-231 and SH-SY5Y cells were respectively plated at 130 000, 90 000 and 750 000 cells in 20 cm² dishes. They were kept in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C and treatments were initiated 24 h after plating. Media was changed every two days and chemicals were freshly added to culture media. Cells were continuously exposed until the end of

the treatment period and each treatment included a control group exposed to the vehicle only (DMSO 0.1%). At the end of treatment, cells were rinsed once with cold PBS 1X, harvested with a cell scraper and snap-frozen in liquid nitrogen. Dry pellets were kept at -80°C. A series of cells, plated as described above, were grown using charcoal-stripped FBS (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). These cells were gently rinsed with PBS 1X the day after plating and were then incubated with a culture medium containing charcoal-stripped FBS changed every two days. Cells were treated with TCDD for either 48 hr (mRNA analyses) or 4 days (cell proliferation analyses).

Cell confluence was evaluated at the end of treatment using a 81-hit square ocular grid. Six areas per dish were counted. Confluence is expressed as the ratio between the hit points over the total counted points (486).

Clonogenic assay

T47D cells were plated at 300 cells per well in 6-well plates and TCDD exposure (5.3 nM) started 24 h after plating. Media was removed 48 h later and replaced by fresh drug-free media, then changed every 2 or 3 d for approximately 14 d after the end of the TCDD exposure. MDA-MB-231 cells were plated at 200 cells in 6-well plates and exposed to 5.3 nM TCDD 5 h after plating. After 48 h, media was replaced by fresh drug-free media and was changed every 2 or 3 d, for approximately 8 d. At the end of treatment, media was discarded and wells were rinsed twice with PBS 1X. Colonies were stained with 0.5% methylene blue in 50% methanol gently added to each well and incubated for 15 min at room temperature. The dye solution was discarded, wells were rinsed 2 or 3 times with water, plates were dried overnight at ambient air, then colonies were counted manually. Experiments were performed in triplicate sets and repeated three times.

Flow cytometry analyses

Cell cycle

T47D cells were plated with 1 500 000 cells in 20 cm² and exposed to 5.3 nM TCDD. At the end of treatment, cell were rinsed with PBS 1 X and trypsinised with Trypsin-EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Cells were centrifuged at 100 g, 10 min at room temperature and resuspended with 300 µl of PBS 1X. Cells were then fixed with 100% ethanol at -20°C for 15 min and kept overnight at -20°C. Cells were centrifuged at 300 g for 10 min at room temperature and then incubated with 0.5 mg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) and ribonuclease A (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Cells were analyzed by flow cytometry using a

FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, California, USA) and data were analyzed with ModFit LT™ software (Verity Software House, Maine, USA).

Apoptosis

Apoptosis of T47D cells was measured with the ApoTarget™ Annexin-V FITC kit (BioSource) according to the manufacturer's instructions. At the end of treatment, culture media was removed, cells were rinsed with PBS and detached with Trypsin-EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Rinsing solution and cells were pooled with the corresponding culture media and the solution was centrifuged at 100 g for 10 min at room temperature. Supernatant was discarded and cells were suspended with 2 ml of PBS. Cell suspension (50 µl) was collected to perform a cell count (hemacytometer). Cells were centrifuged at 100 g for 10 min at room temperature and the annexin-V binding buffer 1X provided with the kit was added to resuspend the cell pellet (5×10^6 cells/ml). Annexin V-FITC (2 µl) and propidium iodide (10 µl) were added to 100 µl of cell suspension and incubated at room temperature, in the dark, for 15 min. Annexin-V binding buffer 1X (400 µl) was added to each tube. Cells were then analyzed by flow cytometry using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, California, USA) and data were analyzed with the ModFit LT™ software (Verity Software House, Maine, USA)

Telomerase Activity

Telomerase enzymatic activity was measured using the TRAPeze® XL Telomerase Detection kit (Millipore, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed at the end of treatment using CHAPS lysis buffer, incubated on ice for 30 min and centrifuged at 12 000 g, 4°C for 20 min. Protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario) and samples were diluted at 180 ng protein/µl using CHAPS lysis buffer. Telomere amplification by PCR was done with a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf Scientific Inc) with the following conditions : 30 min incubation at 30°C followed by 36 cycles at 94°C for 30 s, 59°C for 30 s and 72°C for 60 s, then extension steps of 3 min at 72°C and 25 min at 55°C. Whole PCR products were diluted in 150 µl of buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl and 2 mM MgCl₂) in a black 96-well plate. Fluorescent detection of fluorescein (excitation at 485 nm, detection at 538 nm, cut off at 550 nm) and sulforhodamin (excitation at 585 nm, detection at 636 nm, cut off at 630 nm) were measured with a SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices Corp.).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from fresh cells at the end of treatment using the RNAqueous® -4PCR Kit (Ambion, Texas, USA). Briefly, cells were rinsed with cold PBS 1X, 0.1% DEPC and harvested with a cell scraper. Whole cells were centrifuged at 4°C for 10 min at 100 g. Supernatant was discarded and the Lysis/Binding solution was added, according to manufacturer's instructions. Total RNA was eluted with 80 µl of pre-heated Elution Solution and samples were treated with the DNase I (RNase-free) provided with the kit at 37°C for 1 h. DNase 1 was inactivated using 9 µl of DNase Inactivation Reagent. Total RNA was precipitated by adding 0.5 M ammonium acetate, 0.1 mg/ml linear acrylamide and 200 µl of 100% ethanol and placing the samples at -80°C for at least 30 min. Samples were thawed on ice and centrifuged at 4°C for 15 min at 14 000 g. Supernatants were discarded, total RNA were suspended in 20 µl of water PCR grade and samples were heated at 65°C for 5 min.

cDNA was synthesized using 1 µg of freshly isolated total RNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Laval, Québec), according to the manufacturer's protocol B, using anchored-oligo(dT)₁₈ and random hexamer primers. To eliminate secondary RNA structures, samples and primers were heated at 65°C for 10 min and immediately chilled on ice, before adding the Transcriptor Premix (Transcriptor RT Reaction Buffer, Protector RNase Inhibitor, dNTP Mix and Transcriptor Reverse Transcriptase). cDNA synthesis reaction was done in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf Scientific Inc) with the following conditions : 10 min at 25°C, 30 min at 60°C and holding at 4°C. cDNA was either immediately used or stored at -20°C.

Quantitative Real Time PCR analyses

Real-Time analyses were conducted using the Rotor-Gene™ 3000A Real-time Thermal Cycler (Corbett Research). The catalytic subunit of human telomerase, hTERT, was amplified with 300 nM of hTERT forward primer (5'-GCCTTCAAGAGCCACGTC-3') and 300 nM of hTERT reverse primer (5'-CCACGAACTGTCGCATGT-3'), using the FastStart TaqMan® Probe Master (Roche, Laval, Quebec) and 100 nM of hydrolysis probe Universal Probe Library #19 (Roche, Laval, Quebec) with the following conditions : incubation at 50°C for 2 min followed by a step at 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 45 s. AhR and actin genes amplification were done with the PerfeCTA™SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences). AhR was amplified with 300 nM of AhR forward primer (5'-GAGTCTGGACAAGGAATTGAAGA-3') and 300 nM of AhR reverse primer (5'-CATATGAAGCACCTCTCCATTA-3') with the following

conditions : 10 min at 95°C followed by 35 cycles at 95°C for 15 s, 59.5°C for 30 s and 72°C for 10 s. For actin amplification, 300 nM of actin forward primer (5-CAAACCGCGAGAAGATGA-3') and 300 nM of actin reverse primer (5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3') were used with the following conditions : 10 min at 95°C followed by 35 cycles at 95°C for 15 s, 59°C for 30 s and 72°C for 10 s. Melting curves were done at the end of each run (data not shown) and REST-384© software was used for statistical analysis.

Silencing RNA (siRNA) for AhR

Silencing of AhR was conducted with 100 nM of *ON-TARGETplus SMARTpool, Human AHR* and 100 nM of *ON-TARGETplus Non-targeting Pool* (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario) according to the manufacturer's instructions. Briefly, T47D cells were plated with 200 000 cells in a 6-well plate. After 16 h, media was changed to fresh media containing transfection reagents. After 48 h, media was entirely replaced by one containing transfection reagents and 5.3 nM TCDD for 48 h. At the end of treatment, total RNA was freshly isolated as described before or cells were washed with cold PBS 1X and harvested with a cell scrapper. The whole cell pellet was quickly snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C.

Protein isolation

Nuclear and cytoplasmic protein extractions were performed with NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario) according to the manufacturer's instructions. CER I and NER I reagents were respectively supplemented with 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 0.75 mM PMSF, 0.1 mM Na₃VO₄ and 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 0.1 mM Na₃VO₄ as phosphatase and protease inhibitors.

Whole cell extracts were isolated with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Triton 100X 1%, sodium deoxycholate 1% and SDS 1%) freshly supplemented with 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and 1 mM Na₃VO₄. At the end of treatment, cells were rinsed with cold PBS 1X, harvested with a cell scrapper and centrifuged for 10 min at 100 g at 4°C. Supernatant was discarded, cold RIPA buffer was added on the whole cell pellets and the solution was vigorously vortexed for 15 s and incubated on ice for 20 min, vortexing each 6 min. Lysates were centrifuged at 4°C for 5 min at 14 000 g and supernatants were transferred into pre-cold tubes, then snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. For ErbB2 immunoblots, whole cells were lysed with RIPA B buffer (20 mM sodium phosphate (pH 7.4), 150 mM NaCl, Triton 100 X 1%, 5 mM EDTA, 5 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, and 250 mg/ml Na₃VO₄) as described by Molina *et al.* [44]. Protein concentration was measured with the

BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario) according to the manufacturer's protocol.

Western Blots

Protein samples (20 - 70 µg) were separated onto SDS-PAGE 8% polyacrylamide gels with a 4 % stacking gel and electrophoresis were done until the dye front reached the end of the gel. Proteins were transferred onto a NitroBind nitrocellulose membrane 0.45 µM (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) at 900 mAmps for 90 min at 4°C using a Hoefer Transphor TE 62X Transfer Electrophoresis Unit and TE 50X Power Lid (Amersham Pharmacia Biotech, California, USA) and a transfer buffer (25 mM Tris-Base, 0.19 M glycine, 0.1% SDS and 20 % Methanol). Membranes were finally stained with Ponceau Red S (0.5 % Ponceau, 1 % acetic acid) to assess transfer efficiency. Membranes were blocked with 0.1 % TBS-Tween 20, 3 % BSA or with 0.1 % TBS-Tween 20 5 % non-fat milk at room temperature for 1 h. After washings, blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies at fore mentioned dilutions. Blots were washed with 0.1 % TBS-Tween 20, incubated at room temperature for 1 h with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, then washed and chemiluminescent signals were detected using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Massachusetts, USA) and X-ray films (Universal X-Ray, Lachine, Quebec) developed with a Kodak X-OMAT 1000A Processor.

Primary antibodies used were : **Ah Receptor** (H-211) (sc-5579, rabbit polyclonal, dilution 1:2000), **Estrogen Receptor alpha** (H-184) (sc-7207, rabbit polyclonal, dilution 1:1000), **Estrogen Receptor beta** (H-150) (sc-8974, rabbit polyclonal, 1:3000) and **Actin (C-11)** (sc-1615, goat polyclonal, dilution 1:2000) antibodies purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA) ; **AKT1 phosphoT308** (ab66134, rabbit polyclonal, dilution 1:2500), **AKT1 phosphoS473** (ab66138, rabbit polyclonal, dilution 1:2500), **telomerase [Y182]** (ab32020, rabbit monoclonal, dilution 1:1000), **telomerase phospho S824** (ab63558, rabbit polyclonal, dilution 1:2000), **c-Myc [9E10]** (ab32, mouse monoclonal, dilution 1:1000), **Hsp90 [H90-10]** (ab58590, mouse monoclonal, dilution 1:1000) and **TATA binding protein TBP** (ab62125, mouse monoclonal, dilution 1:15 000) antibodies obtained from Abcam (Massachusetts, USA) ; **Progesterone Receptor A/B** (3176, rabbit polyclonal, dilution 1:1000) and **Akt** (9272, rabbit polyclonal, dilution 1:1000) antibodies obtained from Cell Signaling Technology, Inc (Massachusetts, USA) ; **Anti-human ErbB2 antibody** (AF1129, goat polyclonal, dilution 1:1500) purchased from R&D Systems, Inc. (Minnesota, USA) ; and **anti-phosphotyrosine clone**

4G10® (05-321, mouse monoclonal, dilution 1: 2000) obtained from Millipore (Massachusetts, USA).

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA were done according to the manufacturer's protocol using the EMSA Gel Shift Kit #AY1292 containing the Dioxin Receptor EMSA Probe Set AY1292P (Panomics, California, USA). Custom made oligonucleotide forward (5'-CAGCGAGCGTGACAGCCCAG-3') and anti-sense sequences (5'-CTGGGCTGTCACGCTCGCTG-3') corresponding to a gene sequence in the hTERT promoter (nt2068 to nt2087) which contains a Dioxin Response Elements (DRE, underlined) were also used. Probes were diluted at 500 μ M in PCR grade water and gently mixed at room temperature on an orbital shaker. Oligonucleotide solutions were then heated at 65°C for 30 min and an equal volume of sense and anti-sense oligonucleotide solutions were mixed at room temperature for 30 min on an orbital shaker to form double DNA strands.

Nuclear proteins (5 μ g) and binding reagents were incubated at room temperature for 5 min. Transcription Factor (TF)-specific cold (unlabeled) probes provided with the kit, or hTERT sequences (20 nM) were added and incubated for 5 min at room temperature. TF-specific probes were added to the mixture and binding reaction was completed at 30°C for 15 min. An Receptor (H-211) antibody (500 μ g) (sc-5579, Santa Cruz Biotechnology Inc.) was added to the mixture and incubated at room temperature for 5 min before adding the loading dye into the tubes. A 6% polyacrylamide gel was pre-run in a cold room using chilled 0.5X TBE at 120V for 10 min. Wells were rinsed with 0.5X TBE before loading the gel and electrophoresis was done in non-denaturing conditions at 120V for 4 h. Proteins were transferred onto a Biodyne® B nylon membrane 0.45 μ M (Pall Canada Ltd, Ontario) for 30 min, 300 mAmps, at 4°C using chilled 0.5 X TBE. Oligonucleotides were then fixed on the nylon membrane by baking it for 1 h at 80°C in a dry oven (Utility Oven, model 1305 U, VWR Scientific Product). Blocking, incubation with Streptavidin-HRP, washing and revelation were done according to manufacturer's instructions. Finally, the nylon membrane was exposed overnight to a X-ray film (Universal X-Ray, Lachine, Quebec) subsequently developed using a Kodak X-OMAT 1000A Processor.

Statistical analyses

Cell proliferation and telomerase activity data were analyzed using a Student *t* test or a one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test. Q test were conducted to identify and if applicable reject aberrant values. Flow cytometric analyses were done with the ModFit LT™ software (Verity Software House, ME, USA.) and quantitative Real-Time PCR results were

analyzed using the REST-384 © software. Densitometry analyses were done with the AlphaEase® FC software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). The threshold for significance was set at $p < 0.05$.

2.3.4 Results

Inhibition of cell proliferation and telomerase activity by AhR ligands in human mammary cancer cells

T47D cells were exposed to various mixtures of known AhR ligands (content as described in Table 1.1) or to 5.3 nM TCDD for 6 d. Cell confluence, measured at the end of treatment, was significantly ($p < 0.05$) decreased by 21%, 39%, 41%, 37% and 36% compared to controls for T47D cells exposed to PCBs, PCDFs, PCDDs, PAHs and TCDD, respectively (Figure 2.1A). Telomerase activity was also significantly ($p < 0.05$) decreased by 47%, 63%, 36%, 33% and 34% by the treatments, respectively (Figure 2.1A). T47D cells exposed to the suspected carcinogenic polyhalogenated chemicals HCB (10 and 20 μM), o,p'-DDE (10 μM) and p,p'-DDE (10 μM) showed no significant ($p > 0.05$) change in cell confluence nor in telomerase activity compared to controls (Figure 2.1B). The latter are not known to bind to the AhR. These observations led us to further study AhR-dependent mechanisms in the modulation of telomerase and cell proliferation. TCDD was used as a model AhR ligand.

Table 2.1 Composition of the three polyhalogenated hydrocarbon mixtures used in this study. Values indicate final concentration in the cell culture medium.

PCB		PCDF		PCDD	
Chemical	Concentration (nM)	Chemical	Concentration (nM)	Chemical	Concentration (nM)
Congener 77	5,1	2378-TCDF	73,5	2378-TCDD	1,2
Congener 126	46,4	23478-PEDCF	2,8	12378-PeCDD	2,6
Congener 169	17,6	123478-HxDCF	1,5	123478HxCDD	17,0
		123678-HxDCF	1,0	123789-HxCDD	2,9
		123678-HxDCF	0,5	1234678-HpCDD	19,8
		1234678-HpCDF	2,3	OCDD	54,4
		OCDF	0,4		

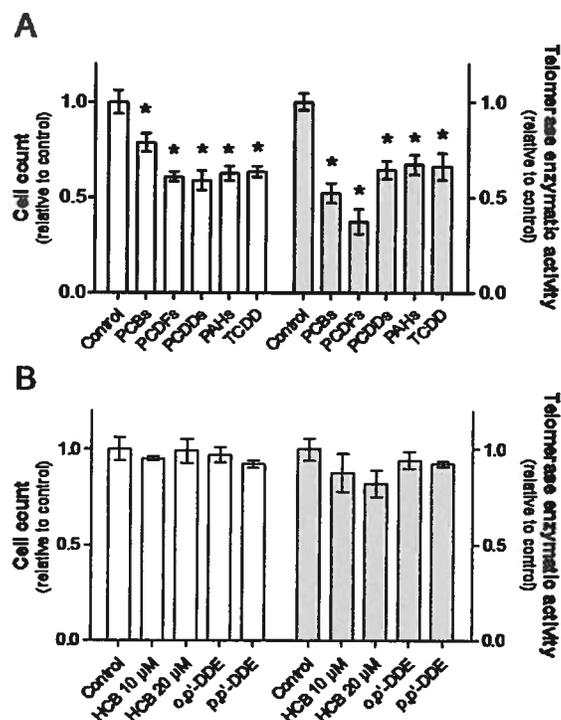


Figure 2.1 Effects of (A) PAH mixtures and (B) non AhR-ligands on cell proliferation and telomerase activity in T47D cells. Cells were exposed for 6 d to (A) mixtures of PCBs, PCDDs, PCDFs, PAHs or TCDD alone (5.3 nM) or (B) 10 μM HCB, 20 μM HCB, 10 μM o,p'-DDE or 10 μM p,p'-DDE. Confluence and enzymatic activity were measured at the end of treatment. Values are expressed relative to control group (DMSO 0.1%). * indicates mean is significantly different from controls ($p < 0.05$).

Cell receptor profiles and telomerase activity, cell proliferation and cell cycle

Ligand activation of the cytosolic AhR leads to dissociation of the complex with other proteins and its nuclear translocation where transcription of AhR-target genes is modulated. The cytosolic level of AhR, normalized to actin level, in 5.3 nM TCDD-treated T47 D cells was 2- and 5-fold lower after 24 h and 6 d, respectively (Figure 2.2), suggesting its activation and nuclear translocation. The cytosolic level of HSP90, a member of the inactive AhR-complex, was not modified by the TCDD treatment (Figure 2.2).

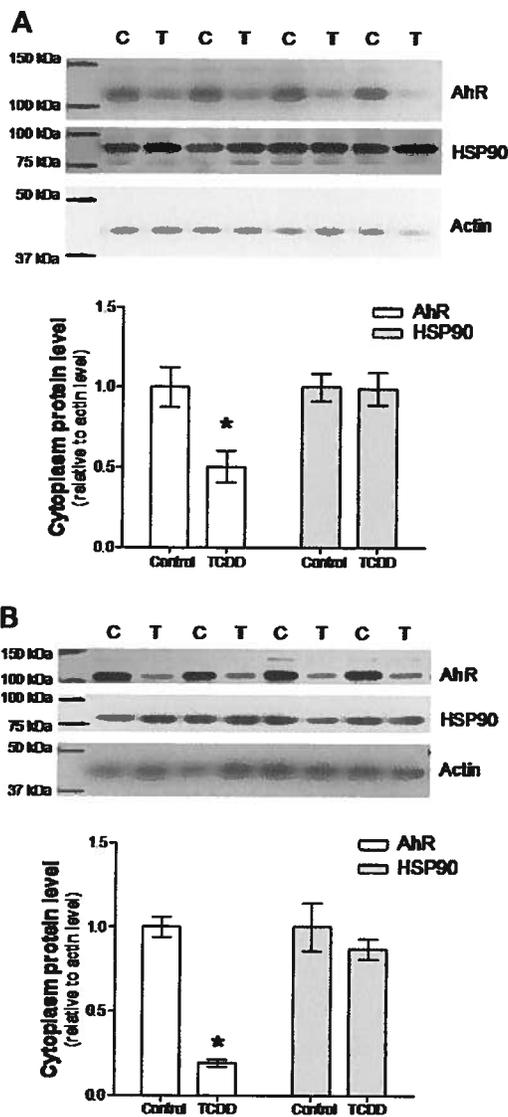


Figure 2.2 Effect of TCDD on cytoplasmic levels of AhR and HSP90 in T47D cells exposed for (A) 24 h and (B) 6 d. AhR and HSP90 were measured by Western blots and densitometric analyses were performed on TCDD-treated cells (T) and controls (C). Results were normalized to the actin level. Values are expressed relative to control group (DMSO 0.1%). * indicates mean is significantly different from controls ($p < 0.05$).

Western blot analyses showed that while human mammary carcinoma T47D cells overexpress ER α , ER β , PR α , PR β , c-erbB2 and AhR, human mammary adenocarcinoma MDA-MB-231 cells are only positive for the AhR, whereas human neuroblastoma SH-SY5Y cells express none of these six receptors (Figure 2.3A). The baseline level of telomerase activity was 2.8-fold higher in the triple-negative MDA-MB-231 cells compared to T47D cells, and similar to that for SH-SY5Y cells (Figure 2.3B). To further demonstrate the importance of the AhR in modulating telomerase activity and cell proliferation, the effects of TCDD in T47D cells were compared to those in MDA-

MB-231 cells and SH-SY5Y cells. TCDD (5.3 nM for 6 d) caused a reduction in telomerase activity in both mammary cells lines, i.e. T47D (28 % reduction, Figure 2.4A) and MDA-MB-231 (23 % reduction, Figure 2.4B), but not in the AhR-negative SH-SY5Y cell line (Figure 4C). It also caused a decrease in cell proliferation only in these two AhR-positive mammary cells (34 % and 21 %, respectively, Figure 2.4A and 2.4B). Moreover, in a clonogenic assay TCDD (5.3 nM, 48 h) caused a significant reduction in the number of colonies formed by these two mammary cancer cell lines, i.e. 27 % for T47D cells and 32 % for MDA-MB-231 cells (Figure 2.5A).

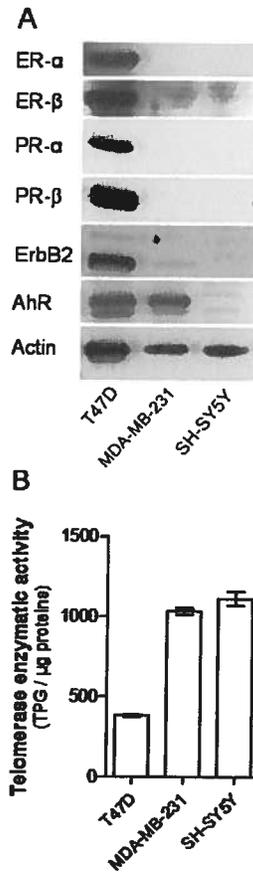


Figure 2.3 (A) Characterization and (B) basal telomerase enzymatic activity in the human mammary cell lines T47D and MDA-MB-231 and in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y.

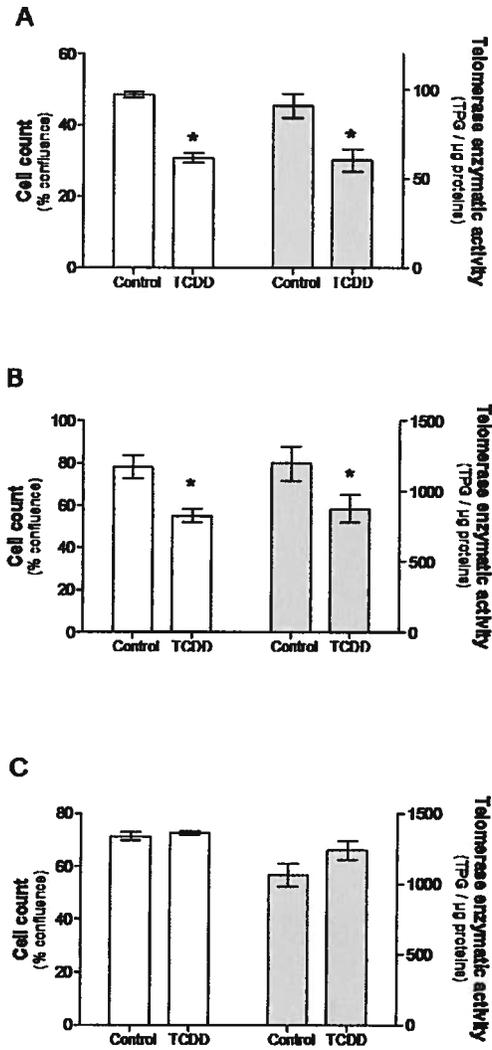


Figure 2.4 Effects of TCDD (6 d exposure) on cell proliferation and telomerase enzymatic activity in human (A) T47D mammary cancer cells, (B) MDA-MB-231 mammary cancer cells and (C) SH-SY5Y neuroblastoma cells. Values are expressed relative to control group (DMSO 0.1%). * indicates mean is significantly different from controls ($p < 0.05$).

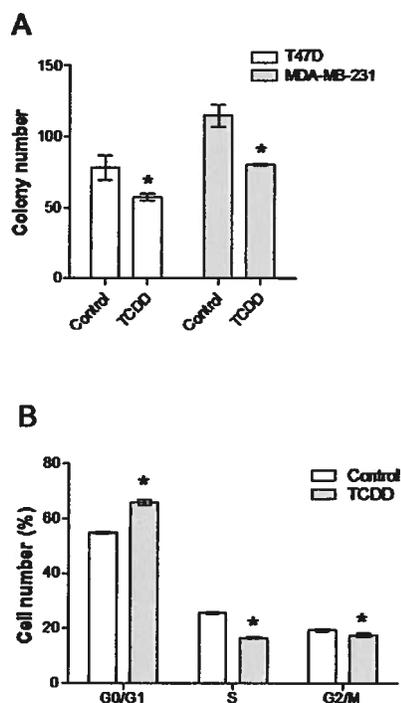


Figure 2.5 Effects of TCDD (2 d exposure) on cell cycle and clonogenic activity in human mammary cancer cells. (A) Clonogenicity evaluation in T47D and MDA-MB-231 cells and (B) flow cytometric analyses of cell cycle in T47D cells. * indicates mean is significantly different from controls ($p < 0.05$).

Cell cycle analysis for T47D cells showed that, compared to controls, TCDD (5.3 nM, 48 h) caused a 20% increase in the number of cells in G0/G1 phase, with concomitant decreases of respectively 35% and 9% in the number of cells in S and G2/M phase (Figure 2.5B), indicating a G0/G1 cell cycle arrest. Finally, this 2 d-treatment with TCDD did not induce apoptosis in T47D cells as assessed by flow cytometry for annexin V (Treated/Control = 0.94).

Effect of TCDD on hTERT mRNA levels in human mammary cancer cells

It has been demonstrated that AhR agonists, such as TCDD, can block the transcription of genes containing the substitution intolerant pentanucleotide -GCGTG- core dioxin response element (DRE) [45-48]. Using the Oligo® software we found this inhibitory DRE core sequence at 600, 2074 and 2758 bp in the promoter of the telomerase reverse transcriptase, hTERT (gene bank AB016767.1). Time course analyses for hTERT mRNA level in T47D cells showed a significant decrease at 48 h and 72 h of TCDD exposure (Figure 2.6) ; hTERT mRNA level was respectively 22 % and 35 % lower compared to controls. Levels of the reference gene actin were unchanged by TCDD treatment.

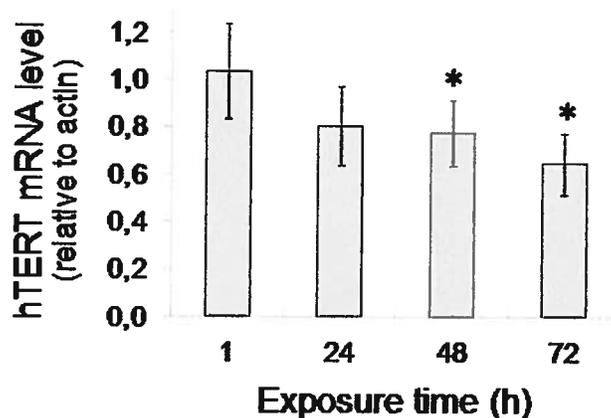


Figure 2.6 Effects of TCDD (1 to 72 h exposure) on hTERT mRNA level over time in human mammary T47D cells. hTERT mRNA levels measured by quantitative Real Time PCR analyses. Levels of mRNA were analysed with REST-384© software and actin mRNA levels were used as reference. * indicates mean is significantly different from the DMSO control group for the same exposure time ($p < 0.05$).

Since telomerase activity is known to be modulated by the sex steroid hormones estradiol and progesterone [3] and cross-talks are known between the AhR and the ER [49], experiments were repeated using the 10 % FBS-containing medium pre-treated with charcoal to remove such hormones : TCDD (5.3 nM for 48 h) caused a significant 58 % decrease ($p < 0.05$) in hTERT mRNA level compared to controls in T47D cells cultured with the charcoal-stripped medium. Similarly, a significant 20 % decrease ($p < 0.05$) in cell proliferation in TCDD-treated cells (5.3 nM for 4 d) compared to controls was observed for cells grown with either the charcoal-stripped or the regular medium. Interestingly, and as predicted by literature [3], the hTERT mRNA level for cells grown in charcoal-stripped FBS medium was only 2 % of that for cells cultured with regular 10 % FBS-containing medium.

AhR in hTERT transcription

To further demonstrate the role of the AhR in telomerase gene expression in TCDD-treated cells, AhR was silenced using a small interfering RNA (siRNA) approach. Transfection of T47D cells with the AhR siRNA (48 h) knocked down both the mRNA and the protein levels of the AhR after 96 h of siRNA treatment (Figure 2.7A and 2.7B). Non-targeting pool-transfected T47D cells (NT) and AhR-silenced cells (48 h exposure to the siRNA) were then exposed to TCDD (5.3 nM) for another 48 h while maintaining the exposure to the AhR siRNA or the NT pool during this period. Western blot analysis confirmed (as shown above in Figure 2.2) that TCDD decreased the level of cytosolic AhR and that the receptor is not detected in siRNA-transfected cells (Figure

2.7C, bottom part). Quantitative real-time PCR analysis showed that hTERT mRNA level was significantly ($p < 0.05$) decreased by TCDD treatment in NT cells, but not ($p > 0.05$) in AhR-silenced cells (Figure 2.7C, upper part), demonstrating a vital role for the AhR in the TCDD-induced down-regulation in hTERT expression. Levels of the co-chaperone HSP90 were unchanged by TCDD treatment in all tested conditions (Figure 2.7D). Interestingly, a HSP90 immunoreactive band with a slightly lower molecular weight appeared when AhR was silenced (Figure 2.7D, right panel).

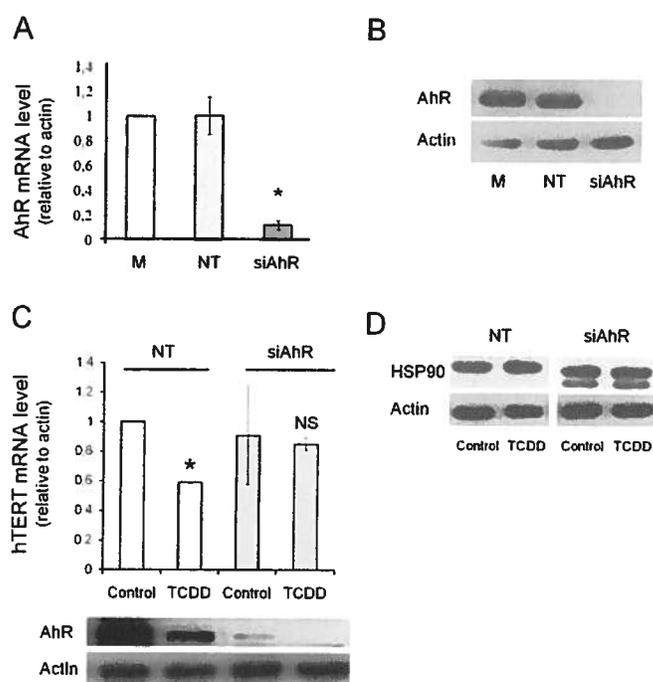


Figure 2.7 Silencing of AhR in human mammary T47D cells. (A) AhR mRNA levels were measured by quantitative Real Time PCR and (B) AhR protein levels were measured by Western blot in whole cell lysate at 96 h of exposure to (M) media only, (NT) 100 nM ON-TARGETplus Non-targeting Pool or (siAhR) 100 nM ON-TARGETplus SMARTpool for human AhR (Dharmacon). mRNA and protein levels for actin were used as reference. (C) Effects of TCDD (2 d exposure from 48 to 96 h) on hTERT mRNA levels measured by quantitative Real Time PCR in siNon-targeting pool-treated cells (NT) and AhR-silenced cells for 48 h. The AhR protein level is reported for each group. mRNA and protein levels for actin were used as reference. * indicates mean is significantly different from controls ($p < 0.05$), while NS indicates the difference is not significant ($p > 0.05$). (D) Effects of TCDD (2 d exposure from 48 to 96 h) on HSP90 protein levels measured by Western blot in whole cell extracts of NT cells and AhR-silenced cells for 48 h.

EMSA experiments were conducted to assess the binding of nuclear AhR to its classic DNA binding site and to a putative binding site on the hTERT gene in human mammary T47D cells. Biotin-labeled probes (BL) and a protein nuclear extract provided with the commercial EMSA kit used revealed two distinct bands specific to AhR-DRE complexes (Figure 2.8A, lane BL), which

are totally inhibited by the addition of unlabeled probes (Figure 2.8A, lane UL). Extracts from control T47D cells incubated with the BL showed the same two bands (Figure 2.8B, lane 1), while no band was seen in the presence of the UL (Figure 2.8B, lane 2). Similarly, no band was detected for the BL alone without nuclear proteins (Figure 2.8B, lane 3). Extracts from TCDD-exposed cells (5.3 nM, 24 h) incubated with the biotin-labeled probe showed two bands as for controls (Figure 2.8B, lane 4). The intensity of the lower band as measured by densitometry was 60 % higher for the TCDD-treated group compared to controls, while the upper band was not different (14% increase). Addition of the UL to these samples strongly inhibited both the upper complex and the lower complex (Figure 2.8B, lane 5). More importantly, addition to the TCDD-treated nuclear extracts of an unlabeled oligonucleotide corresponding to a hTERT promoter gene sequence (2068 to 2087) containing a DRE caused a strong reduction (86 %) in the lower band, while the upper band was reduced by 25% (Figure 2.8B, lane 6), indicating a strong specific competition between the hTERT gene sequence and the BL for AhR binding. Finally, addition of an AhR antibody to the nuclear extract from TCDD-treated cells caused a 39% reduction of the lower complex, while the upper band was unchanged (Figure 2.8B, lane 7).

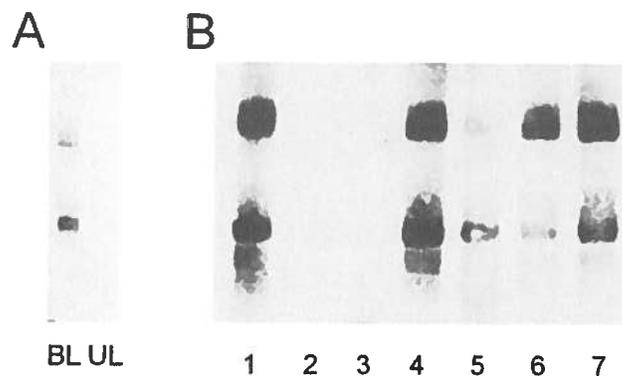


Figure 2.8 EMSA analyses for the Ah receptor in human mammary T47D cells. (A) Nuclear extracts from HeLa cells provided with the kit were incubated with the biotin-labeled probe (lane BL) or the cold unlabeled probe (lane UL). (B) Extracts (4.5 µg protein per well) from control cells were incubated with the biotin-labeled probe (lane 1) or in the presence of the unlabeled probe (lane 2). Lane 3 represents incubation with the biotin-labeled probe alone (lane 4) or, in the presence of the unlabeled probe (lane 5) or, in the presence of an unlabeled oligonucleotide corresponding to a segment of hTERT promoter gene sequence (5'-²⁰⁶⁸CAGCGAGCGTGACAGCCCAG²⁰⁸⁷-3') (lane 6) or, in the presence of 500 µg of AhR antibody (Santa Cruz #sc-5579) (lane 7). The chemiluminescent signal of the biotin-labeled probe was detected as described in the Material and Methods section.

TCDD-induced changes in protein phosphorylation and level in human mammary cells

Akt is a downstream kinase in the EGFR pathway and tyrphostin AG1478, an EGFR inhibitor, is known to decrease both Akt phosphorylation at Ser473 and telomerase enzyme activity in breast cancer cells [24]. Nuclear Akt phosphorylation at Ser473 was 2.2-fold lower in TCDD-treated cells compared to controls (Figure 2.9A) ; the Ser473-Akt/Akt band intensity ratio was 0.6 and 1.3 for the TCDD-treated and control cells, respectively. No signal was detected for Thr308 phosphorylation (data not shown), another classic phosphorylation site for Akt [50, 51]. To globally look at downstream effects of the EGF tyrosine kinase receptor, phospho-tyrosine levels were measured for proteins from whole T47D cell extracts. The phosphorylation level of tyrosine residues was modulated for six major proteins, i.e. a 22% to 59 % reduction for proteins with a molecular weight of 130, 93, 78, 71, 57 and 52 kDa, in cells exposed to TCDD (5.3 nM, 6d) compared to controls (Figure 2.9B).

ErbB2 is considered to be the most oncogenic of all EGFR family members [52] and is known as an important driver of breast cancer carcinogenesis. Using different mammary cancer cell lines hTERT expression as well as telomerase activity were shown to be regulated along with modulations in ErbB2 gene expression induced by ionizing radiations [53]. We therefore measured ErbB2 levels in human mammary T47D cancer cells and found a significant 6.5-fold increase ($p < 0.05$) after exposure to TCDD (48 h) compared to controls (Figure 2.9C) ; after 6 d of TCDD treatment the increase was down to 1.3-fold ($P > 0.05$) (Figure 2.9C). Finally, a correlation has been reported between c-Myc and hTERT gene expression [21, 54, 55] and it has been demonstrated that c-Myc could directly interact with hTERT promoter [56, 57]. In the current model of TCDD exposed human mammary T47D cells, treatment did not change the c-Myc protein level compared to controls (Figure 2.9D), which could suggest that the TCDD-induced inhibition of hTERT expression in T47D cells operates through c-Myc-independent mechanisms.

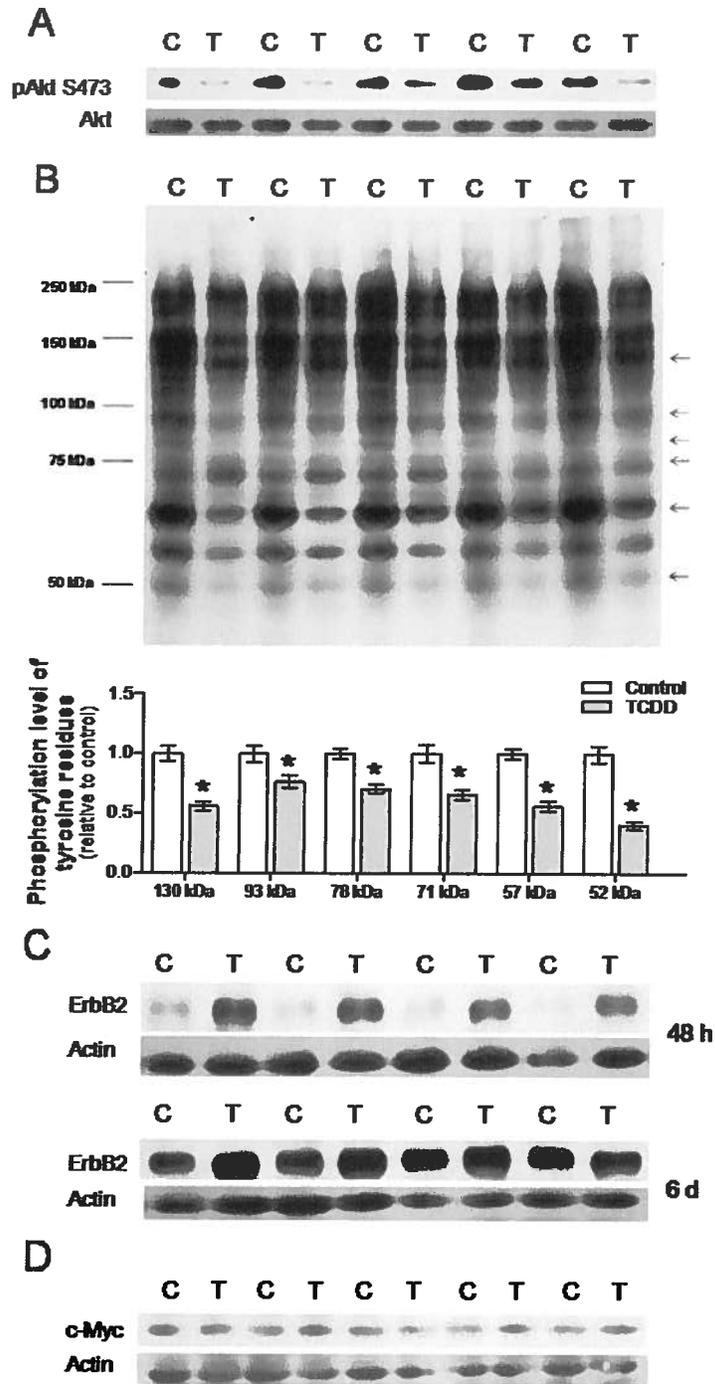


Figure 2.9 Effects of TCDD on TERT, Akt, ErbB2 and c-Myc in human mammary T47D cells. Western blots were conducted to evaluate changes in protein levels or phosphorylation states in TCDD-treated cells (T) compared to controls (C). (A) Effect of TCDD (6 d exposure) on the phosphorylation level of serine 473 in nuclear Akt. Total Akt levels were also measured in both nuclear and cytoplasmic fractions. (B) Phosphorylation of tyrosine residues of proteins in whole cell lysates. Arrows indicate proteins for which phosphorylation is decreased by the TCDD treatment. (C) ErbB2 levels in whole cell lysate from T47D cells exposed for 2 d or 6 d to TCDD (5.3 nM) and (D) c-Myc in whole cell lysates from T47D cells exposed 6 d to TCDD (5.3 nM).

2.3.5 Discussion

Telomerase reactivation is a key event in carcinogenesis giving a major advantage to transformed cells which thereby acquire unlimited cell proliferation and survival. Results reported in this study support ligand-activated AhR-dependent mechanisms causing a down-regulation of telomerase activity through decreased hTERT mRNA expression and post-translational modifications in human mammary cancer cells. Evidence supporting a role for AhR in the down-regulation of telomerase is based on : i) the common property of AhR ligands, but not of non AhR ligands from the same large chemical family, to decrease telomerase activity in human mammary cancer cells ; ii) the decreased telomerase activity in AhR-positive, but not in AhR-negative, cancer cells ; iii) the clear activation of the AhR-pathway in the human mammary cancer cell model used, as demonstrated by the nuclear translocation of AhR and its binding to both the well-known classic DRE DNA binding domain and a first reported sequence in the hTERT promoter and most importantly ; iv) by the loss in AhR-silenced cells of the hTERT transcription down-regulation induced by the model AhR ligand, TCDD.

Positive correlation between the degree of AhR overexpression and states of increasing transformation of mammary epithelial cells appears to occur in the absence of any exogenous AhR ligands [58]. For example, the malignant human mammary Hs578T cell line expresses high levels of AhR, whereas the normal human mammary Hs578Bst cells expresses low levels of AhR mRNA and protein, suggesting that expression of nuclear AhR is a phenotype characteristic of transformed cells [59]. Several other human tumor cell lines, including the MDA-MB-231 assessed in the present study, also express high AhR mRNA levels comparable to those seen for Hs578T cells [59]. Therefore, upregulation of the AhR appears to be a characteristic of the transformation process. Furthermore, nuclear localization of the AhR in Hs578T cells and in other human tumor cell lines suggests that the AhR is transcriptionally active, despite the absence of exogenous ligands [59]. These observations have lead us to propose that the addition of an AhR ligand to mammary cancer cells may disrupt the oncogenic process by triggering intracellular pathways diverging from the AhR-driven processes maintaining the tumorigenic state of these transformed cells, thereby reducing cell proliferation and telomerase transcription and activity.

The AhR is a ligand-activated transcription factor that mediates responses induced by TCDD [35, 41, 60]. Data reported in this paper show that TCDD acts as an inhibitor of transcription of hTERT in human mammary cells. This biological role may also be shared by other AhR ligands.

For example, genistein is an agonist in DRE stably transfected Hepa-1 cells [61] and it inhibits the transcription of hTERT and down-regulates telomerase activity [62]. The exact mechanisms by which AhR is causing a reduction in telomerase mRNA expression and global enzyme activity has however yet to be determined. The following paragraphs will discuss possible mechanistic pathways.

AHR signaling impinges upon numerous molecular pathways both in its physiological state and in its ligand-activated form [38]. In addition to its classic function as a ligand-activated transcription-factor with a nuclear receptor-like mechanism, it can function as a ligand-activated coactivator [63]. The action of AhR is complex as recently demonstrated by data showing that it can also interact with DNA independently of a DRE core suggesting there are alternative mechanisms for AhR-mediated gene regulation [64].

EMSA competition analyses in this study showed that the activated AhR in the nuclear protein fraction of TCDD-treated cells binds to an oligonucleotide corresponding to a DNA sequence which includes a DRE sequence and is located in the promoter of the hTERT gene. Sequence analyses of the hTERT promoter revealed that the core sequence responsible for its regulation do not have TATA or CAAT boxes [65]. The hTERT promoter is however a GC rich area and contains many binding sites for several transcription factors [65]. The Sp1 sites within the core promoter were found to be absolutely required for hTERT promoter activity. While the exact mechanisms by which Sp1 contributes to hTERT transcription are unknown, the fact that Sp1 cooperates with c-Myc to activate hTERT transcription in a cell type-specific manner suggests an involvement of other transcription factors in this regulation [65]. This indirectly supports a role for the AhR as a transcription factor in hTERT modulation. Many response elements specific to ER and PR are located upstream of the core promoter of hTERT [65], but as discussed below these receptors do not play an active role in the TCDD-induced effects.

Regulation of telomerase activity and expression occurs at many levels, including transcription, alternative splicing, phosphorylation, chaperone-mediated folding, nuclear translocation of each subunit, assembly of the telomerase complex, and its accessibility to telomeres [66]. As summarized by Strati et al. [67], hTERT has been shown to contain at least six alternative splicing sites ; only the full-length hTERT transcript is associated with telomerase activity. The α splice site causes a 36-bp deletion within the conserved reverse transcriptase motif A and the splice variant was found to be a dominant negative inhibitor of telomerase activity. The β splice site causes a 182-bp deletion leading to a nonsense mutation truncating the protein before the conserved reverse transcriptase motifs, resulting in a non-active TERT protein and catalytically

inactive telomerase. Thus, hTERT expression level may not always correlate with telomerase activity. For example, telomerase activity changes with alternative splicing of the full-length and beta variants expression of hTERT in breast cancers [68]. Hypoxia increases telomerase activity in ovarian adenocarcinoma cells and hTERT is subject to regulation by alternative splicing under hypoxic conditions involving a switch in the splice pattern in favor of the full-length active variant [69]. Similarly, one can therefore hypothesize that the TCDD-induced down-regulation in telomerase activity observed in this paper may result from a modulation of alternative splicing of hTERT in favor of the non active variant. The reduction in telomerase activity (34 % at 6 d ; Fig. 1A) was however similar to the reduction of total full length hTERT mRNA (35 % at 3 d ; Fig. 6) giving a stronger support to the direct down-regulation of transcription mechanism rather than to a switch in variant production. On the other hand, hTERT protein level was only slightly and non significantly decreased as measured by Western blot (10 % down, data not shown) supporting the contention of a switch in variant production, i.e. lower level of the full length immunoreactive hTERT in TCDD-treated rats. The capabilities of antibodies to adequately and quantitatively detect hTERT protein have however been challenged.

Antibodies against the human TERT protein appear to have a questionable performance. A study demonstrated the poor specificity of many primary antibodies developed to detect the TERT protein [70] : using Western blots and immunoprecipitation experiments to select the best TERT antibodies, then proceeding to protein identification by peptide mass spectrometry, only one TERT antibody was specific to the protein. Unfortunately despite numerous tests to optimize this antibody to detect TERT in T47D mammary cancer cell lysates we could not obtain a signal specific to the protein. One TERT antibody has been reported to detect the wrong protein [71-73], i.e. nucleolin, an abundant nuclear protein which may interact with hTERT [74].

Upregulation of telomerase activity in ER-positive MCF-7 cells was reported after treatment with 17 β -estradiol (E2) that was accompanied by induction of TERT mRNA [75]. Results from ChIP assays showed recruitment of ER α and ER β onto the hTERT promoter, indicating that both receptors are important in telomerase gene regulation [76]. Herein TCDD caused a down-regulation of hTERT in both the ER α -+ER β -positive T47D cells and the ER-negative MDA-MB-231 cells. Moreover, the reduction caused by TCDD relative to controls was more pronounced in T47D cells grown in charcoal-stripped medium to remove estrogens than in regular medium containing 10% FBS. These observations suggest that estrogens and their receptors do not play a major role in the mechanism of TCDD-induced down-regulation of hTERT. This supports a previous observation showing that TCDD, TCDF and diindolylmethane inhibited several aspects

of the metastatic process such as colony formation, cell invasiveness and cell motility in a panel of breast cancer cells lines representative of the major breast cancers subtypes regardless the expression of the steroid receptors ER and PR and levels of ErBb2 [77].

Akt enhances human telomerase activity through phosphorylation of hTERT subunit as one of its substrate proteins [78]. The amino acid sequence of the hTERT subunit contains putative Akt kinase phosphorylation sites corresponding to the consensus sequence $XXRXRXXS/TXX$, which has been observed in many Akt kinase substrates [78]. Modulation of Akt phosphorylation is correlated with telomerase activity, i.e when Akt is up, telomerase is up and more phosphorylated, whereas when Akt is low, telomerase is down and less phosphorylated [78]. For example, the natural toxin pectenotoxin-2 represses telomerase activity in human leukemia cells by reducing the phosphorylation of Akt, thereby reducing the phosphorylation and nuclear translocation of hTERT [79]. Moreover, the anti-cancer drug gefitinib that selectively inhibits epithelial growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase activity, downregulates the activation of Akt and the subsequent hTERT phosphorylation and translocation into the nucleus, resulting in a loss of telomerase activity through this dephosphorylation cascade in MDA-MB-231 cells [23]. Finally, suppression of ERK1/2 and Akt activation is presumed to be involved in the retinoic acid-induced suppression of hTERT in squamous cell carcinoma cells [80]. In the present work, we found a 2-fold reduction in Akt phosphorylation level in TCDD-treated human mammary cells strongly supporting a mechanistic role of this pathway in the AhR-dependent telomerase down-regulation. Finally, phosphorylation of Akt kinase Ser473 in primary human T cells was directly correlated to the phosphorylation levels of hTERT and telomerase activity regardless of the phosphorylation state at Thr308 [81]. Similarly, phosphorylation at Thr308 was not modulated by the TCDD treatment in the human mammary cell model used.

Post translational modulations in hTERT subunit, such as its phosphorylation state, have been shown to be important in telomerase regulation in human breast cancer cells [22]. We attempted to measure by Western blot the phosphorylation level of hTERT at Ser824, a putative Akt phosphorylation site, and found a contradictory small increase ; the efficacy of the antibody used may not, however, have been appropriate (data not shown). Others serine residues are also putative Akt substrate [78], and other kinases, as PKC isoforms, have been shown to regulate telomerase activity by posttranslational modulations in several cancer cell types [82]. Thus, it is possible that TCDD exposure induced changes in the phosphorylation level of other residues. For example, phosphorylation of the tyrosine 707 has been shown to influence the cellular localization of hTERT subunit which in turn influences cell apoptosis [83, 84]

Breast cancer cells, including SKBR3 and T47D cells, showing overexpression of Her2/Neu oncoprotein (also called ErbB2) were reported to show higher telomerase activity than cells deprived of Her2/Neu expression ; inhibition of HER2/Neu was also reported to significantly attenuate telomerase activity in HER2/Neu-overexpressing SKBR3 breast cancer cells [85]. An important oncogenic signaling function of the ErbB2-ErbB3 complex appears to be activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway [86]. Data obtained in this paper showed a strong increase in the immunoreactive level of c-ErbB2 and, as indicated above, a marked reduction in Akt phosphorylation. The level of several tyrosine-phosphorylated proteins was markedly reduced in TCDD-treated cells suggesting a down-regulation of the ErbB2/EGFR pathway. Trastuzumab (Herceptin), a humanized monoclonal antibody directed at the ErbB2 ectodomain, used for the treatment of women with ErbB2-overexpressing breast cancers, has been shown to inhibit the cleavage of the full length ErbB2 [44]. Thus, we propose that similarly to the action of trastuzumab which reduces Her-2/neu heterodimer formation [87], the ligand-activated AhR-dependent mechanism “freezes” ErbB2 to the membrane, thereby reducing dimer formation and activation of the subsequent tyrosine phosphorylation cascade.

The proteolytic cleavage of ErbB3 leads to the shedding of ErbB2 ectodomain and to the generation of the ErbB2 p95 fragment which stays associated to the cell membrane [44]. Trastuzumab was shown to inhibit the ErbB2 proteolytic cleavage and, as a consequence, it was associated to a decrease in the phosphorylation of the p95 fragment which possesses a kinase activity [44]. Interestingly, a decrease in the phosphorylation level of a protein with an estimated molecular weight of 93 kDa, which could possibly correspond to the p95 fragment, was reduced in TCDD-treated cells compared to controls (Figure 2.9B).

TCDD mimics EGF-mediated signaling in different tissues [88]. This is achieved through c-Src, a kinase which is a member of the inactive complex of AhR ; upon TCDD binding and AhR activation, c-Src is released into the cytoplasm and interacts with EGF receptors to modulate the phosphorylation state of tyrosine residue [88]. It appears that c-Src and EGFR acts by bidirectional interactions, meaning that they can either activate or block the EGFR signaling pathways [89]. Thus, a possible mechanistic explanation to the strong decrease in the phosphorylation of both Akt and tyrosine residues on a series of proteins is that AhR activation by TCDD leads to interaction between c-Src and EGFR which inactivate the EGFR signaling pathways. The reported role of c-Src in the TCDD-induced inhibition of insulin-driven cell growth and differentiation in the MCF10A epithelial breast cancer cell line supports this hypothesis [38, 90].

c-Myc is a basic helix-loop-helix transcription factor involved in telomerase regulation through its role in activation of hTERT gene expression [56, 91, 92]. There are two c-Myc binding sites in the hTERT promoter [65]. Surprisingly, the level of immunoreactive c-Myc in TCDD-treated cells was not different compared to controls, suggesting that it is not involved in the AhR-dependent down-regulation of telomerase. Similarly, the level of HSP90 was not modified by the TCDD treatment. Interestingly, a lower molecular weight immunoreactive HSP90 was observed in AhR-silenced cells for both controls and TCDD-treated cells. HSP90 is a co-chaperone which has been demonstrated to be required for the assembly of active telomerase and such telomerase-associated proteins may contribute in enzyme activity [93]. It has also been demonstrated that HSP90 remains associated with functional telomerase complexes [94]. HSP90 interacts with a number of key proteins in breast carcinogenesis including the ER, p53, Akt, and a variety of receptor tyrosine kinases, such as ErbB2 [95]. For example, (-)-epigallocatechin-3-gallate decreases the association of ARNT with TCDD-activated AhR by stabilizing the protein complex made of the AhR, HSP90 and XAP2 and it has anti-cancer activity [96].

T47D cells are derived from human mammary tumors [97]. Data reported herein showed that TCDD decreases T47D, as well as MDA-MB-231, cell proliferation. This reduction in cell proliferation was accompanied by a reduction in telomerase transcription and activity. Oenga *et al.* [98] reported that while TCDD inhibited 17 β -estradiol-stimulated cell proliferation of T47D cells in a dose-responsive manner, it had no significant effect on cell proliferation in the absence of added estradiol. In the present study, as for the case of telomerase activity discussed above, results showed a marked TCDD-induced reduction in cell proliferation for cells cultured in charcoal-stripped medium, i.e. without exogenous estradiol.

Flow cytometry analyses presented in this paper showed that TCDD causes a G1 cell cycle arrest in human mammary cancer cells. It also resulted in an anticolonogenic effect in these cells. This data supports the observations previously reported by others ; AhR ligands have been reported to disrupt the cell cycle in numerous *in vivo* cancer models [reviewed by [39, 88, 99]. AHR synergizes with RB to repress E2F-dependent transcription and to induce cell cycle arrest, i.e. S-phase entry [100]. It has been shown that AHR interacts in a complex with CDK4 and CCND1 in the absence of exogenous ligands to facilitate cell cycle progression [101]. Therefore these authors proposed that this interaction is disrupted by exogenous ligands, such as TCDD, to induce G1 cell cycle arrest. This conclusion supports the hypothesis made above regarding the role of AhR ligands in driving a disruption of the oncogenic process in human mammary cells. Treatment with exogenous AhR agonists significantly inhibited cell invasiveness and

motility in the Boyden chamber assay and inhibited colony formation in soft agar, regardless of the ER, progesterone receptor or EGFR 2 status [77]. Finally, the highest level of hTERT and telomerase activity in HepG2 cells were seen in the G1/S- and S-phases [102].

Effects associated with AhR activation are highly divergent depending on ligands, tissues and species. Phylogenetic analyses revealed that AhR is an ancient protein expressed in early vertebrates and seems to be highly conserved [40, 103], but polymorphism within and across species is quite important and could be responsible to the diversity of effects associated to TCDD exposure. Sun et al. [104] suggested that AhR-mediated gene expression may not be well conserved across species. This could have significant implications in human risk assessment. TCDD is mostly considered as a high carcinogenic compound, an opposite conclusion of the results reported in this paper. Several studies support however the anti-carcinogenic activity contention. TCDD was previously demonstrated to induce a marked reduction in colony size and cell number in both normal keratinocytes and spontaneously immortalized keratinocyte cells [43]. In another study, TCDD induced the differentiation of a putative mammary cancer stem cell line [77]. Finally, in a follow up cancer occurrence epidemiology study conducted in Italy 10 years after an industrial accident near Seveso, which yielded one of the highest documented human TCDD exposure, the number of breast cancers was significantly reduced in comparison to the anticipated cases (RR=0.5), while the relative risk for all malignancies was unchanged (RR=1.0) [105].

In summary, this research identified a novel AhR-dependent down-regulation of telomerase in human mammary cancer cells. This is accompanied by a decrease in cell proliferation. Overall, this opens an avenue to new therapeutic approaches. Numerous exogenous AhR ligands have been identified in natural compounds such in herbal extracts, vegetables and fruits [106], and flavonoids which represent the largest group of naturally occurring dietary AhR ligands [60].

2.3.6 Conclusion

The AhR ligand TCDD down-regulates telomerase through decreased hTERT mRNA expression of the hTERT subunit and post-translational modifications concomitantly to a G1 cell cycle arrest. This novel AhR-dependent molecular control of telomerase suggests that AhR ligands may open a new therapeutic avenue for breast cancer treatment.

2.3.7 Abbreviations

AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor ; hTERT : Telomerase reverse transcriptase catalytic subunit ;
ER : Estrogen receptor ; TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin ; DRE : dioxin responsive
element

2.3.8 Keywords

Telomerase, Ah receptor, hTERT, ErbB2, Akt, TCDD, breast cancer therapy

2.3.9 Author's contribution

SP carried out all the laboratory work, participated in the design of the study, participated in the analysis of the data and prepared the first draft of the manuscript. MC conceived the study and was responsible for leadership in its design and analysis of the data, and wrote the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

2.3.10 Competing conflicts

The authors have no relevant competing interest to declare.

2.3.11 Acknowledgements

Sandra Pittet received a graduate student fellowship from the Fondation Armand-Frappier and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Mixtures (PCB, PCDF, PCDD and all three components together) were gifts from Dr. Daniel Desaulniers from Health Canada, Government of Canada.

2.3.12 References

1. Varela E, Blasco MA: **2009 nobel prize in physiology or medicine: telomeres and telomerase.** *Oncogene* 2010, **29**(11):1561-1565.
2. Greider CW, Blackburn EH: **Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts.** *Cell* 1985, **43**(2 Pt 1):405-413.
3. Cong YS, Wright WE, Shay JW: **Human telomerase and its regulation.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**(3):407-425, table of contents.
4. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW: **Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again.** *Differentiation* 2002, **69**(4-5):188-197.
5. Sekaran VG, Soares J, Jarstfer MB: **Structures of telomerase subunits provide functional insights.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1804**(5):1190-1201.
6. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S: **Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.** *EMBO J* 1992, **11**(5):1921-1929.
7. Oshimura M, Barrett JC: **Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors.** *Eur J Cancer* 1997, **33**(5):710-715.
8. Cong Y, Shay JW: **Actions of human telomerase beyond telomeres.** *Cell Res* 2008, **18**(7):725-732.
9. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE: **Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.** *Science* 1998, **279**(5349):349-352.
10. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: **Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.** *Science* 1994, **266**(5193):2011-2015.
11. Pitts AE, Corey DR: **The telomerase challenge - an unusual problem in drug discovery.** *Drug Discov Today* 1999, **4**(4):155-161.
12. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR: **Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity.** *EMBO J* 1995, **14**(17):4240-4248.
13. Kouniavsky G, Zeiger MA: **The role of telomeres and telomerase in endocrine tumors.** *Discov Med* 2010, **10**(53):340-347.
14. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M: **Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers.** *Cancer Sci* 2008, **99**(8):1528-1538.
15. Corey DR: **Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials.** *Oncogene* 2002, **21**(4):631-637.

16. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA: **Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase.** *Oncogene* 1998, **16**(9):1217-1222.
17. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB *et al*: **Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT.** *Nat Genet* 1997, **17**(4):498-502.
18. Wen J, Cong YS, Bacchetti S: **Reconstitution of wild-type or mutant telomerase activity in telomerase-negative immortal human cells.** *Hum Mol Genet* 1998, **7**(7):1137-1141.
19. Zhao Q, Yang Y, Yu J, You QD, Zeng S, Gu HY, Lu N, Qi Q, Liu W, Wang XT *et al*: **Posttranscriptional regulation of the telomerase hTERT by gambogic acid in human gastric carcinoma 823 cells.** *Cancer Lett* 2008, **262**(2):223-231.
20. Zhao YM, Zhou Q, Xu Y, Lai XY, Huang H: **Antiproliferative effect of rapamycin on human T-cell leukemia cell line Jurkat by cell cycle arrest and telomerase inhibition.** *Acta Pharmacol Sin* 2008, **29**(4):481-488.
21. Jagadeesh S, Kyo S, Banerjee PP: **Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2006, **66**(4):2107-2115.
22. Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu JP: **Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**(27):16729-16732.
23. Moon DO, Kim MO, Heo MS, Lee JD, Choi YH, Kim GY: **Gefitinib induces apoptosis and decreases telomerase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells.** *Arch Pharm Res* 2009, **32**(10):1351-1360.
24. Zhang YG, Du Q, Fang WG, Jin ML, Tian XX: **Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells.** *Int J Oncol* 2008, **33**(3):595-602.
25. DeBruin LS, Josephy PD: **Perspectives on the chemical etiology of breast cancer.** *Environ Health Perspect* 2002, **110** Suppl 1:119-128.
26. Kortenkamp A: **Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective.** *Int J Androl* 2006, **29**(1):193-198.
27. Lopez-Cervantes M, Torres-Sanchez L, Tobias A, Lopez-Carrillo L: **Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence.** *Environ Health Perspect* 2004, **112**(2):207-214.
28. Salehi F, Turner MC, Phillips KP, Wigle DT, Krewski D, Aronson KJ: **Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors.** *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008, **11**(3-4):276-300.
29. Calle EE, Frumkin H, Henley SJ, Savitz DA, Thun MJ: **Organochlorines and breast cancer risk.** *CA Cancer J Clin* 2002, **52**(5):301-309.
30. Verner MA, Charbonneau M, Lopez-Carrillo L, Haddad S: **Physiologically based pharmacokinetic modeling of persistent organic pollutants for lifetime exposure**

assessment: a new tool in breast cancer epidemiologic studies. *Environ Health Perspect* 2008, **116**(7):886-892.

31. Wolff MS, Weston A: **Breast cancer risk and environmental exposures.** *Environ Health Perspect* 1997, **105 Suppl 4**:891-896.
32. Safe S, Papineni S: **The role of xenoestrogenic compounds in the development of breast cancer.** *Trends Pharmacol Sci* 2006, **27**(8):447-454.
33. Raaschou-Nielsen O, Pavuk M, Leblanc A, Dumas P, Philippe Weber J, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Olsen JH: **Adipose organochlorine concentrations and risk of breast cancer among postmenopausal Danish women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(1):67-74.
34. Holcomb M, Safe S: **Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.** *Cancer Lett* 1994, **82**(1):43-47.
35. Rowlands JC, Gustafsson JA: **Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction.** *Crit Rev Toxicol* 1997, **27**(2):109-134.
36. Guenther TM, Nebert DW: **Cytosolic receptor for aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic aromatic compounds. Evidence for structural and regulatory variants among established cell cultured lines.** *J Biol Chem* 1977, **252**(24):8981-8989.
37. Mandal PK: **Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology.** *J Comp Physiol B* 2005, **175**(4):221-230.
38. Puga A, Ma C, Marlowe JL: **The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways.** *Biochem Pharmacol* 2009, **77**(4):713-722.
39. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM: **The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein.** *FEBS Lett* 2007, **581**(19):3608-3615.
40. Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, Perera SA: **Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(25):13743-13748.
41. Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH: **The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression.** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008, **18**(3):207-250.
42. Nguyen LP, Bradfield CA: **The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor.** *Chem Res Toxicol* 2008, **21**(1):102-116.
43. Rea MA, Phillips MA, Degraffenried LA, Qin Q, Rice RH: **Modulation of human epidermal cell response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by epidermal growth factor.** *Carcinogenesis* 1998, **19**(3):479-483.
44. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J: **Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**(12):4744-4749.

45. Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A: **Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms.** *Toxicol Lett* 1998, **102-103**:343-347.
46. Klinge CM, Bowers JL, Kulakosky PC, Kamboj KK, Swanson HI: **The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements.** *Mol Cell Endocrinol* 1999, **157(1-2)**:105-119.
47. Porter W, Wang F, Duan R, Qin C, Castro-Rivera E, Kim K, Safe S: **Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists.** *J Mol Endocrinol* 2001, **26(1)**:31-42.
48. Wang F, Samudio I, Safe S: **Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **172(1-2)**:91-103.
49. Safe S, Wormke M, Samudio I: **Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000, **5(3)**:295-306.
50. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: **Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.** *Curr Biol* 1997, **7(4)**:261-269.
51. Salinas M, Lopez-Valdaliso R, Martin D, Alvarez A, Cuadrado A: **Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells.** *Mol Cell Neurosci* 2000, **15(2)**:156-169.
52. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y: **Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors.** *Adv Cancer Res* 2000, **77**:25-79.
53. Papanikolaou V, Iliopoulos D, Dimou I, Dubos S, Tsougos I, Theodorou K, Kitsiou-Tzeli S, Tsezou A: **The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells.** *Int J Oncol* 2009, **35(5)**:1141-1149.
54. Loveday RL, Greenman J, Drew PJ, Monson JR, Kerin MJ: **Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer.** *Int J Cancer* 1999, **84(5)**:516-520.
55. Gil J, Kerai P, Lleonat M, Bernard D, Cigudosa JC, Peters G, Carnero A, Beach D: **Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc.** *Cancer Res* 2005, **65(6)**:2179-2185.
56. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R: **Direct activation of TERT transcription by c-MYC.** *Nat Genet* 1999, **21(2)**:220-224.
57. Flores I, Evan G, Blasco MA: **Genetic analysis of myc and telomerase interactions in vivo.** *Mol Cell Biol* 2006, **26(16)**:6130-6138.
58. Wong PS, Li W, Vogel CF, Matsumura F: **Characterization of MCF mammary epithelial cells overexpressing the Arylhydrocarbon receptor (AhR).** *BMC Cancer* 2009, **9**:234.

59. Yang X, Liu D, Murray TJ, Mitchell GC, Hesterman EV, Karchner SI, Merson RR, Hahn ME, Sherr DH: **The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells.** *Oncogene* 2005, **24**(53):7869-7881.
60. Denison MS, Nagy SR: **Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003, **43**:309-334.
61. Zhang S, Qin C, Safe SH: **Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**(16):1877-1882.
62. Li Y, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO: **Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms.** *Int J Cancer* 2009, **125**(2):286-296.
63. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Takahashi T, Matsushita N, Miura C, Nikawa J, Gotoh O, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y: **A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor-Arnt heterodimer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **318**(3):746-755.
64. Dere E, Lo R, Celius T, Matthews J, Zacharewski TR: **Integration of Genome-Wide Computation DRE Search, AhR ChIP-chip and Gene Expression Analyses of TCDD-Elicited Responses in the Mouse Liver.** *BMC Genomics* 2011, **12**(1):365.
65. Cong YS, Wen J, Bacchetti S: **The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter.** *Hum Mol Genet* 1999, **8**(1):137-142.
66. Gladych M, Wojtyła A, Rubis B: **Human telomerase expression regulation.** *Biochem Cell Biol* 2011, **89**(4):359-376.
67. Strati A, Papoutsi Z, Lianidou E, Moutsatsou P: **Effect of ellagic acid on the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) alpha+beta+ transcript in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells.** *Clin Biochem* 2009, **42**(13-14):1358-1362.
68. Rha SY, Jeung HC, Park KH, Kim JJ, Chung HC: **Changes of telomerase activity by alternative splicing of full-length and beta variants of hTERT in breast cancer patients.** *Oncol Res* 2009, **18**(5-6):213-220.
69. Anderson CJ, Hoare SF, Ashcroft M, Bilisland AE, Keith WN: **Hypoxic regulation of telomerase gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms.** *Oncogene* 2006, **25**(1):61-69.
70. Wu YL, Dudognon C, Nguyen E, Hillion J, Pendino F, Tarkanyi I, Aradi J, Lanotte M, Tong JH, Chen GQ *et al*: **Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 13):2797-2806.
71. Tuteja R, Tuteja N: **Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998, **33**(6):407-436.
72. Lo SJ, Lee CC, Lai HJ: **The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings.** *Cell Res* 2006, **16**(6):530-538.
73. Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P: **Structure and functions of nucleolin.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 6):761-772.

74. Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S: **Nucleolin interacts with telomerase.** *J Biol Chem* 2004, **279**(49):51508-51515.
75. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M: **Estrogen activates telomerase.** *Cancer Res* 1999, **59**(23):5917-5921.
76. Nanni S, Narducci M, Della Pietra L, Moretti F, Grasselli A, De Carli P, Sacchi A, Pontecorvi A, Farsetti A: **Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer.** *J Clin Invest* 2002, **110**(2):219-227.
77. Hall JM, Bar Hoover MA, Kazmin D, McDonnell DP, Greenlee WF, Thomas RS: **Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation.** *Mol Endocrinol* 2010, **24**(2):359-369.
78. Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI: **Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit.** *J Biol Chem* 1999, **274**(19):13085-13090.
79. Kim MO, Moon DO, Kang SH, Heo MS, Choi YH, Jung JH, Lee JD, Kim GY: **Pectenotoxin-2 represses telomerase activity in human leukemia cells through suppression of hTERT gene expression and Akt-dependent hTERT phosphorylation.** *FEBS Lett* 2008, **582**(23-24):3263-3269.
80. Kunisada M, Budiyo A, Bito T, Nishigori C, Ueda M: **Retinoic acid suppresses telomerase activity in HSC-1 human cutaneous squamous cell carcinoma.** *Br J Dermatol* 2005, **152**(3):435-443.
81. Plunkett FJ, Franzese O, Finney HM, Fletcher JM, Belaramani LL, Salmon M, Dokal I, Webster D, Lawson AD, Akbar AN: **The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8+CD28-CD27- T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation.** *J Immunol* 2007, **178**(12):7710-7719.
82. Wojtyla A, Gladych M, Rubis B: **Human telomerase activity regulation.** *Mol Biol Rep* 2010.
83. Haendeler J, Hoffmann J, Brandes RP, Zeiher AM, Dimmeler S: **Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(13):4598-4610.
84. Jakob S, Schroeder P, Lukosz M, Buchner N, Spyridopoulos I, Altschmied J, Haendeler J: **Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase.** *J Biol Chem* 2008, **283**(48):33155-33161.
85. Goueli BS, Janknecht R: **Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor.** *Oncogene* 2003, **22**(39):8042-8047.
86. Moasser MM: **The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis.** *Oncogene* 2007, **26**(45):6469-6487.
87. Rubin I, Yarden Y: **The basic biology of HER2.** *Ann Oncol* 2001, **12 Suppl 1**:S3-8.

88. Haarmann-Stemmann T, Bothe H, Abel J: **Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways.** *Biochem Pharmacol* 2009, **77**(4):508-520.
89. Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ: **Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis.** *Front Biosci* 1997, **2**:d501-518.
90. Harari D, Yarden Y: **Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer.** *Oncogene* 2000, **19**(53):6102-6114.
91. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ: **Myc activates telomerase.** *Genes Dev* 1998, **12**(12):1769-1774.
92. Fujiki T, Udono M, Kadooka K, Yamashita S, Miura T, Shirahata S, Katakura Y: **Regulatory mechanisms of human and mouse telomerase reverse transcriptase gene transcription: distinct dependency on c-Myc.** *Cytotechnology* 2010, **62**(4):333-339.
93. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW *et al*: **Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes.** *Genes Dev* 1999, **13**(7):817-826.
94. Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE: **Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase.** *J Biol Chem* 2001, **276**(19):15571-15574.
95. Beliakov J, Whitesell L: **Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy.** *Anticancer Drugs* 2004, **15**(7):651-662.
96. Yin Z, Henry EC, Gasiewicz TA: **(-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor.** *Biochemistry* 2009, **48**(2):336-345.
97. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ: **Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin.** *Eur J Cancer* 1979, **15**(5):659-670.
98. Oenga GN, Spink DC, Carpenter DO: **TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation in vitro.** *Toxicol In Vitro* 2004, **18**(6):811-819.
99. Marlowe JL, Puga A: **Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis.** *J Cell Biochem* 2005, **96**(6):1174-1184.
100. Puga A, Barnes SJ, Dalton TP, Chang C, Knudsen ES, Maier MA: **Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest.** *J Biol Chem* 2000, **275**(4):2943-2950.
101. Barhoover MA, Hall JM, Greenlee WF, Thomas RS: **Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4.** *Mol Pharmacol* 2010, **77**(2):195-201.
102. Murofushi Y, Nagano S, Kamizono J, Takahashi T, Fujiwara H, Komiya S, Matsuishi T, Kosai K: **Cell cycle-specific changes in hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: a promising implication of telomerase-dependent targeted cancer gene therapy.** *Int J Oncol* 2006, **29**(3):681-688.

103. Yao G, Harstad E.B., Bradfield CA: **The AH Receptor**. In: *PAS Proteins, Regulators and Senses of Development and Physiology*. 2003: 263.
104. Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD, Fielden MR, Zacharewski TR: **Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences**. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(15):4512-4523.
105. Bertazzi A, Pesatori AC, Consonni D, Tironi A, Landi MT, Zocchetti C: **Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin**. *Epidemiology* 1993, **4**(5):398-406.
106. Jeuken A, Keser BJ, Khan E, Brouwer A, Koeman J, Denison MS: **Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits**. *J Agric Food Chem* 2003, **51**(18):5478-5487.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Tel que rapporté dans l'article présenté, les expériences effectuées dans le cadre de ce projet démontrent l'implication du récepteur Ah dans la modulation de voies de signalisation régulant la survie de cellules cancéreuses mammaires humaines et l'activité enzymatique de la télomérase. Ces observations suggèrent notamment que la modulation du récepteur Ah a un potentiel thérapeutique dans la lutte aux cancers mammaires humains.

Les deux principaux paramètres mesurés permettant d'établir ces conclusions sont la mesure de la modulation de la prolifération cellulaire et de l'activité enzymatique de la télomérase. En effet, l'étude présentée ici démontre que le traitement à la TCDD sollicite plusieurs mécanismes, notamment l'inhibition de la transcription génique de la sous-unité hTERT et la modulation de voies de signalisation dépendantes de la protéine kinase Akt et du récepteur membranaire ErbB₂. D'autres mécanismes dépendants de voies de signalisation connexes peuvent également être impliqués et ainsi participer aux événements anti-cancérigènes rapportés.

3.1 Les notions d'agoniste et d'antagoniste du récepteur Ah

Lorsqu'il est question de l'étude des effets biologiques du récepteur Ah, la TCDD est la molécule rapportée comme l'agoniste type à utiliser et l' α -naphthoflavone est présentée comme un antagoniste du récepteur Ah qui contrecarre les effets engendrés par la TCDD (Jeffy et al. 2002; Cheon et al. 2007). En se basant sur ces connaissances et en considérant l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'activité de la télomérase dépendantes de la TCDD dans le modèle *in vitro* utilisé, l'hypothèse selon laquelle l'exposition simultanée des cellules T47D à l'antagoniste α -naphthoflavone et à la TCDD diminue ou annule les effets inhibiteurs dépendants de la TCDD a été formulée en cours de processus expérimental. Or, les résultats obtenus pour la mesure de l'activité enzymatique de la télomérase chez les cellules exposées à l' α -naphthoflavone (5 μ M), à la TCDD (5,3 nM) ou au mélange des deux produits ont réfuté cette hypothèse. L'activité enzymatique de la télomérase et la prolifération cellulaire ont été mesurées tel que décrit dans l'article présenté au chapitre deux sont rapportés à la figure 2.1 de l'annexe de ce mémoire. Les résultats obtenus démontrent que l'effet inhibiteur de la combinaison de l' α -naphthoflavone et de la TCDD (74 %) est supérieur aux effets inhibiteurs associés aux substances seules (36 % et 56 %, respectivement) (Annexe, Figure I.1A). Puisque l'effet inhibiteur de l' α -naphthoflavone est semblable à celui de la TCDD, ces résultats infirment l'idée

selon laquelle la TCDD et l' α -naphthoflavone sont respectivement un agoniste et un antagoniste du récepteur Ah. De plus, on note que l'effet inhibiteur de la combinaison de l' α -naphthoflavone et de la TCDD sur la prolifération cellulaire est moindre que celui de la TCDD seule, mais qu'il est légèrement plus important que celui de l' α -naphthoflavone seule (Annexe, Figure 1B). Ce résultat suggère donc que pour le récepteur Ah, l' α -naphthoflavone est un agoniste partiel moins puissant que la TCDD. Ainsi, l'effet inhibiteur induit par chacune des molécules est observé, mais on remarque que l' α -naphthoflavone réduit l'inhibition induite par la TCDD sur la prolifération cellulaire, alors qu'elle amplifie l'effet inhibiteur de la TCDD lorsqu'il est question de l'activité enzymatique de la télomérase.

En somme, ces résultats démontrent que l' α -naphthoflavone a des propriétés d'agoniste partiel plutôt que des propriétés d'antagoniste pur. Donc, la classification des ligands du récepteur Ah, en termes d'agoniste ou d'antagoniste, basée classiquement sur le déplacement de la TCDD radioactive ne reflète pas les effets engendrés sur certaines activités biologiques, notamment sur l'effet prolifératif et sur l'activité de la télomérase. Or, avant de statuer sur les propriétés d'un ligand, il apparaît nécessaire de mesurer et d'analyser plusieurs paramètres dépendants du récepteur Ah. Notons d'ailleurs que le paramètre de référence classique pour mesurer le niveau d'activité du récepteur Ah demeure l'induction de la transcription de gènes de la famille du cytochrome P450 (Rowlands et al. 1997; Nguyen et al. 2008).

3.2 La modulation de l'expression de gènes autres que hTERT

Le récepteur Ah est à la croisée de plusieurs voies de signalisation moléculaire majeures ayant un rôle dans la promotion de la cancérogénèse et il est possible que l'expression de nombreux gènes soit affectée par le traitement à la TCDD. Nos résultats ont prouvé que l'expression du gène hTERT est inhibée par la TCDD et que ces effets dépendent du récepteur Ah. De nombreux éléments de réponse du récepteur Ah (DRE) ont déjà été identifiés dans le génome humain (Boutros et al. 2004) de sorte qu'il est justifié d'émettre l'hypothèse que l'expression d'autres gènes soit modulée par la TCDD dans les cellules T47D. La transcription de multiples gènes a d'ailleurs été démontré dans un modèle murin transformé génétiquement pour ne plus exprimer le récepteur Ah (*AhR null*) (Tijet et al. 2006). Avec ce modèle, Tijet et ses collaborateurs ont démontré que le récepteur Ah est un modulateur de la transcription génique tant en présence qu'en absence de ligands exogènes ; la simple répression de l'expression du gène du récepteur Ah engendrant des modulations du niveau d'expression de 392 gènes, dont ceux de la famille du cytochrome P450 comme *Cyp1a2* bien connu pour être induit par la TCDD

(Tijet et al. 2006). Fait intéressant, le gène *Cyp1a2* est quatre fois plus exprimé chez les souris AhR^{+/+} que chez les souris AhR^{-/-}, ce qui suggère que le récepteur Ah en module l'expression même en conditions physiologiques (Tijet et al. 2006). L'exposition des deux groupes de souris (AhR^{+/+} et AhR^{-/-}) à une dose unique de TCDD (1 mg de TCDD/kg de poids corporel) module l'expression de 456 gènes (Tijet et al. 2006), ce qui appuie le rôle suggéré au récepteur Ah dans la modulation de l'expression génique. Des résultats similaires ont été rapportés dans des études utilisant divers modèles cellulaires (Puga et al. 2000; Martinez et al. 2002; Guo et al. 2004; Karyala et al. 2004; Boverhof et al. 2005; Fletcher et al. 2005).

Comme le récepteur Ah est un facteur de transcription bien caractérisé, notre première hypothèse est que l'inhibition de la l'expression génique de la sous-unité hTERT est causée par la réduction de sa transcription génique. Toutefois, la modulation de la stabilité de l'ARNm et de la dégradation des transcrits induites par la TCDD ne peuvent pas encore être écartées. En appui à cette hypothèse, notons que dans les cellules mammaires MCF-7, les augmentations de l'activité enzymatique et de l'expression de l'aromatase dépendantes de la TCDD sont causées uniquement par la stabilité accrue des transcrits du gène *CYP19* (Chang et al. 2010). En effet, l'augmentation du niveau des transcrits de *CYP19* mesurée par PCR en temps réel ne dépend pas d'une activité transcriptionnelle accrue, mais bien uniquement de l'augmentation du niveau de phosphorylation de la kinase ERK qui mène ultimement à la stabilisation des transcrits de l'enzyme (Chang et al. 2010). Dans notre étude, la baisse des niveaux de transcrits de hTERT concomitante à la liaison de protéines nucléaires des cellules T47D aux séquences iDRE consensus démontrée par la méthode de retardation sur gel (EMSA) suggèrent tout de même que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle est impliquée. Des expériences supplémentaires permettraient de le confirmer. Par exemple, une méthode d'immunoprécipitation de chromatine transcriptionnellement active (*CHIP assay*) utilisant un anticorps dirigé contre le récepteur Ah permettrait d'isoler *in situ* les séquences d'ADN contenant les sites de liaison du récepteur Ah activé. Par une méthode PCR, celles-ci seraient ensuite amplifiées afin d'être séquencées et comparées à la séquence promotrice du gène de hTERT. La mesure du niveau d'activité du promoteur de hTERT par une technique de gène rapporteur (*gene reporter assay*) serait également utile pour affirmer qu'il y a bel et bien une inhibition de la transcription génique induite par la TCDD dans les cellules T47D.

Des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire (TGF- β , IL-1 β , PAI-2), dans la poursuite du cycle cellulaire (p27 et jun-B) et dans l'apoptose (Bax) sont aussi modulés par

des ligands du récepteur Ah et un DRE est généralement présent dans leur promoteur (Mimura et al. 2003). L'intégrine $\beta 7$ qui est une protéine impliquée dans les interactions entre la cellule et la matrice et dans les interactions intercellulaires et qui influence l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Son expression modulée par des PAH selon une activation de voies coopératives impliquant le récepteur Ah et c-maf (Monteiro et al. 2007).

Il a également été proposé que des effets dépendants du récepteur Ah sont indépendants des séquences DRE et donc, de la transcription génique (Murray et al. 2009). Puga et collaborateurs (Puga et al. 2009) ont aussi rapportés que plusieurs voies de signalisation majeures comme celles de la régulation du cycle cellulaire, de la cascade des MAP kinases, du recoupement des voies dépendantes de RB et d'E2F et de la mobilisation des réserves de calcium sont affectées par des ligands du récepteur Ah. Étant donné la quantité et la complexité de voies impliquées, ils en concluent que les effets ultimes d'un ligand du récepteur Ah relèvent d'une réponse adaptative complexe et spécifique au contexte tissulaire et cellulaire. Considérant ceci, il devient donc difficile d'établir la nature d'un ligand du récepteur Ah tout comme d'extrapoler les effets observés vers d'autres modèles.

Dans l'ensemble, ces informations permettent d'affirmer que le récepteur Ah participe à la modulation de l'expression génique et qu'il peut être actif constitutivement en conditions physiologiques tel que récemment décrit dans une étude menée à l'aide d'une lignée humaine de cellules de granulosa (Horling et al. 2011). Il est aussi important de noter que l'activation du récepteur Ah peut dépendre de ligands endogènes encore non-identifiés. L'action cellulaire du récepteur Ah peut donc être pléiotropique. En analysant leurs résultats de modulation génique mesurée par puces à haute densité, Puga et collaborateurs (Puga et al. 2000; Martinez et al. 2002; Guo et al. 2004; Karyala et al. 2004; Boverhof et al. 2005; Fletcher et al. 2005) ont déclaré que la compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent les actions cellulaires de la TCDD pourrait être beaucoup plus complexe qu'elle ne l'avait été envisagée initialement.

3.3 Les autres protéines du complexe impliquant le récepteur Ah

Tel que décrit à la section 2.6.1 de ce mémoire, le récepteur Ah se lie à un complexe protéique et probablement que plusieurs de ces protéines influencent le processus d'activation du récepteur. À titre d'exemple, des changements dans les résidus sérines de la protéine HSP90 résultent en une augmentation de son affinité pour le récepteur Ah, ce qui se traduit par une augmentation du potentiel transcriptionnel du récepteur (Ogiso et al. 2004). En effet, la protéine

HSP90 est classiquement identifiée comme un membre du complexe cytosolique inactif du récepteur Ah, alors que dans ce cas-ci, elle favorise plutôt la transcription qui en est dépendante.

La geldanamycine est une molécule qui perturbe les fonctions de la protéine HSP90 de façon à ce qu'elle ne parvienne plus à stabiliser la protéine TERT qui est alors plus sujette à la dégradation par le protéasome (Kim et al. 2005). Or, le travail rapporté dans ce mémoire montre que l'activation du récepteur Ah par la TCDD et l'inhibition de la production du récepteur Ah par l'utilisation d'ARN interférents (siAhR) n'affectent pas le niveau de la protéine HSP90 de masse moléculaire attendue. Il est aussi très intéressant de noter l'apparition d'une bande immunoréactive de masse moléculaire plus faible que celui attendu (Figure 7D, Chapitre 2). Basé sur l'observation principale de l'absence de modulation des niveaux protéiques de HSP90, il en a été conclu que les effets anti-cancérigènes observés ne sont pas liés à cette protéine chaperonne. Néanmoins, on doit souligner son rôle potentiel notamment parce que la protéine HSP90 compte parmi ses protéines clientes le récepteur Ah (Denis et al. 1988; Perdew 1988), la télomérase (Holt et al. 1999; Forsythe et al. 2001; Haendeler et al. 2003; Keppler et al. 2006), le récepteur ErbB2 (Xu et al. 2001; Xu et al. 2002; Citri et al. 2004) et les kinases Akt (Sato et al. 2000; Basso et al. 2002; Cortes-Gonzalez et al. 2010) qui sont toutes des protéines pour lesquelles nous avons observé des modulations, de même que c-Src (Xu et al. 2007) qui est potentiellement impliqué dans les effets rapportés.

De plus, des sites de phosphorylation de HSP90 ont été identifiés (Sérines 225 et 254 pour HSP90 α et Sérine 230 pour HSP90 β (Ogiso et al. 2004)) et ils semblent que ceux-ci influencent l'expression génique dépendante du récepteur Ah. En effet, une fois phosphorylée, HSP90 possède une affinité plus forte pour le récepteur Ah et potentialise ainsi l'activité transcriptionnelle du récepteur activé (Ogiso et al. 2004). Bien que la provenance de la bande immunoréactive de plus faible masse moléculaire n'est pas encore été investiguée et que le rôle de la protéine chaperonne HSP90 dans la modulation de la télomérase dans les cellules mammaires humaines est hypothétique, les données rapportées dans la littérature nous permettent de croire en son implication dans la modulation des voies de signalisation dépendantes du récepteur Ah.

Finalement, l'interaction entre le récepteur Ah et RB s'avère être un point de contrôle important du cycle cellulaire pour les cellules exposées aux agonistes du récepteur Ah (Puga et al. 2009). En ce sens, on sait que le recrutement du récepteur Ah au promoteur des gènes régulés par RB entraîne la formation d'interactions protéiques spécifiques qui obstruent le promoteur,

empêchant ainsi l'accès à l'ADN par des protéines activatrices ce qui bloque ultimement l'initiation de la transcription génique (Huang et al. 2005; Puga et al. 2009).

3.4 La télomérase et le cycle cellulaire

Il est intéressant de rappeler que des cellules normales expriment hTERT et que l'activité enzymatique de la télomérase peut être détectée dans ces cellules. Le plus souvent, lorsqu'il est question de la télomérase, on se réfère normalement aux cellules souches, germinales ou aux cellules ayant une forte capacité répliquative, telles que les cellules cancéreuses. Des modulations dans les niveaux d'ARNm de la sous-unité hTERT et des modulations de niveaux d'activité de la télomérase ont démontré que celles-ci sont en corrélation avec les étapes du cycle cellulaire, et ce, autant dans des cellules cancéreuses (Zhu et al. 1996; Murofushi et al. 2006) que dans les cellules normales (Masutomi et al. 2003). Les analyses du cycle cellulaire par cytométrie en flux ainsi que les tests à l'annexine V et de l'exclusion du bleu de Trypan effectuées au cours de notre étude montrent une accumulation du nombre de cellules en phase G0/G1 jumelée à des diminutions du nombre de cellules en phases G2 et M et à une absence de cytotoxicité. Or, la synchronisation de fibroblastes normaux humains a démontré que l'ARNm de hTERT est exprimé de façon transitoire pendant la phase S en parallèle à l'activation enzymatique temporaire de la télomérase (Masutomi et al. 2003). D'ailleurs, les plus hauts niveaux d'ARNm de hTERT sont mesurés lorsque les cellules sont en phase S. En effet, ils sont globalement fortement plus élevés dans les cellules synchronisées en phase G1/S et en phase S que dans les cellules cancéreuses non synchronisées (Murofushi et al. 2006). Il est donc possible que des mécanismes qui bloquent la progression du cycle cellulaire dans les cellules T47D exposées à la TCDD puissent être responsables de l'inhibition l'expression génique.

Tel qu'indiqué dans les paragraphes précédents, il est difficile d'établir avec certitude le déroulement des événements moléculaires impliqués lorsque les cellules sont exposées à la TCDD. Le travail présenté dans ce mémoire a néanmoins permis de mettre en lumière certains éléments que nous avons regroupé de façon schématique à la figure 3.1 et qui illustre que l'action de la TCDD sur le récepteur Ah réduit l'activité de la télomérase via une baisse de l'expression de sa sous-unité catalytique hTERT ainsi que par la modulation de son niveau de phosphorylation.

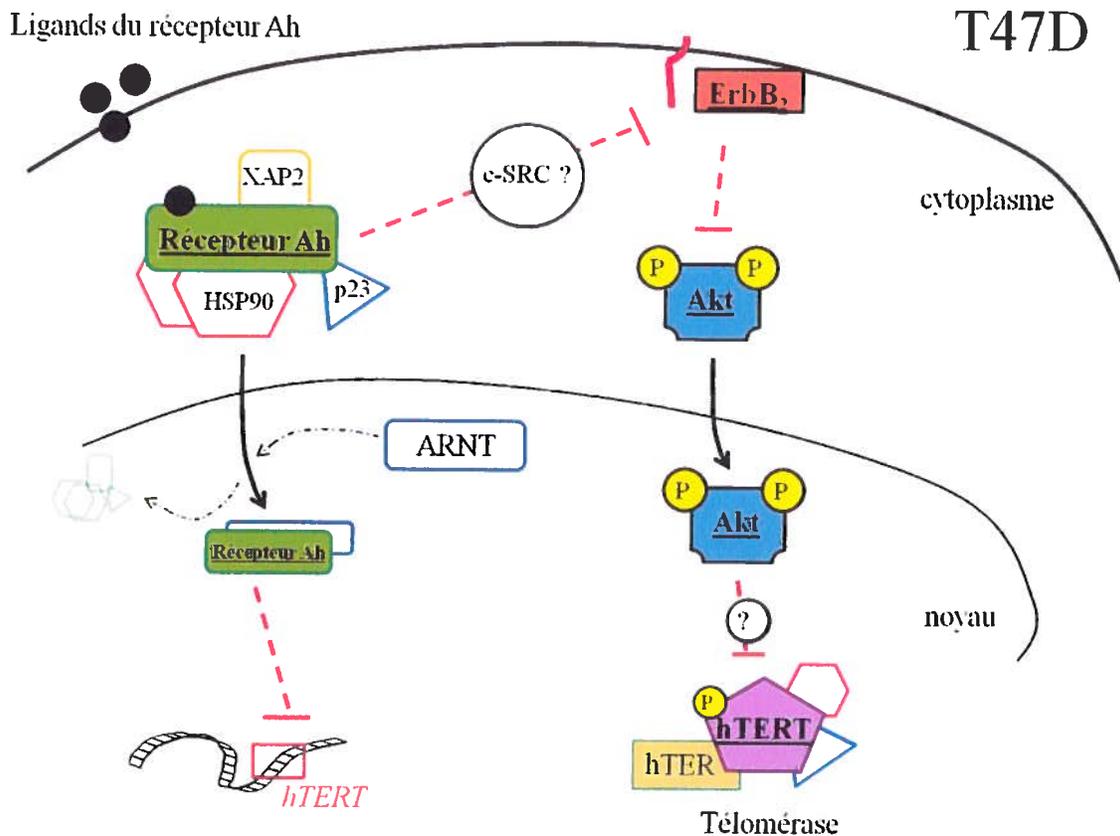


Figure 3.1 Schématisation des mécanismes dépendants du récepteur Ah dans les cellules cancéreuses mammaires T47D responsables de l'inhibition de l'activité de la télomérase. Le récepteur Ah est représenté à l'aide du rectangle vert, les ● représentent les ligands du récepteur Ah, les traits pointillés rouge marquent l'inhibition, les traits pleins noirs marquent la translocation nucléaire alors que les traits pointillés noirs schématisent le changement des partenaires pour le récepteur Ah lorsque celui-ci est transloqué dans le noyau cellulaire. Le rectangle rouge illustre la région promotrice du gène hTERT à laquelle le récepteur Ah activé se lie pour inhiber la transcription de la sous-unité hTERT.

3.5 Conclusion

Le travail présenté dans ce mémoire a démontré que, contrairement à la croyance générale, l'activation du récepteur Ah par des polluants environnementaux ubiquitaires ne représente pas nécessairement un risque pro-cancérogène (International Agency for Research on Cancer, 1997). Au contraire, dans les cellules cancéreuses mammaires humaines T47D qui expriment le récepteur Ah utilisées comme modèle principal dans la présente étude, l'exposition à des ligands du récepteur Ah provoque, en absence de cytotoxicité, des événements anti-cancérogènes, soit le ralentissement de la prolifération cellulaire et la diminution de l'activité de la télomérase qui est une cible thérapeutique de premier niveau.

L'hypothèse de départ selon laquelle il existe un lien mécanistique entre le récepteur Ah et la modulation de l'activité de la télomérase s'est avérée fondée. Il a été démontré que ces effets dépendent autant de modulations transcriptionnelles que post-traductionnelles. Or, il est évident que de nombreuses voies de signalisation sont impliquées, notamment celles de la protéine kinase Akt et du récepteur membranaire ErbB₂, une autre cible thérapeutique importante dans la lutte au cancer du sein. Compte tenu de ces observations et de l'absence de données sur la présence du récepteur Ah dans les cancers mammaires, il apparaît pertinent de développer des travaux de recherche qui détermineront la fréquence et les patrons de positivité à ce récepteur et de mettre ceci en parallèle aux marqueurs classiques tels que ErbB₂ et les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone, dans une cohorte de femmes atteintes de cancer du sein. Rappelons qu'il a notamment observé que les cellules MDA-MB-231, qui n'expriment aucun des récepteurs testés à l'exception du récepteur Ah, ont un taux de prolifération réduit lorsqu'exposées à la TCDD, ce qui est corrélée à une réduction de l'activité enzymatique de la télomérase. En somme, ces résultats jettent des fondements prometteurs en ce qui a trait au développement de thérapies anti-cancérogènes s'appuyant sur une modulation du récepteur Ah, d'autant plus qu'une panoplie de ligands de ce récepteur est déjà connue et que plusieurs d'entre eux sont peu ou non toxiques. Ceux-ci pourront donc être évalués afin de déterminer s'ils engendrent des effets anti-cancérogènes similaires à ceux de la TCDD présentés dans ce mémoire.

RÉFÉRENCES

- Abbott B D, Birnbaum L S et al. (1995). "Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo." *Dev Dyn* 204(2): 133-143.
- Abbott B D, Schmid J E et al. (1999). "Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse." *Toxicol Appl Pharmacol* 155(1): 62-70.
- Aisner D L, Wright W E et al. (2002). "Telomerase regulation: not just flipping the switch." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 80-85.
- Alessi D R, James S R et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* 7(4): 261-269.
- American Academy of Family Physicians, Information from your family doctor. Diethylstilbestrol." (2004). *Am Fam Physician* 69(10): 2401-2402. <http://www.aafp.org/afp/2004/0515/p2401.html> (Visité le 8 février 2011)
- Anderson C J, Hoare S F et al. (2006). "Hypoxic regulation of telomerase gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." *Oncogene* 25(1): 61-69.
- Andrysik Z, Vondracek J et al. (2007). "The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells." *Mutat Res* 615(1-2): 87-97.
- Autexier C & Lue N F (2006). "The structure and function of telomerase reverse transcriptase." *Annu Rev Biochem* 75: 493-517.
- Bar Hoover M A, Hall J M et al. (2010). "Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4." *Mol Pharmacol* 77(2): 195-201.
- Barouki R, Coumoul X et al. (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." *FEBS Lett* 581(19): 3608-3615.
- Basso A D, Solit D B et al. (2002). "Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function." *J Biol Chem* 277(42): 39858-39866.
- Beattie T L, Zhou W et al. (2001). "Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase." *Mol Cell Biol* 21(18): 6151-6160.
- Beischlag T V, Luis Morales J et al. (2008). "The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18(3): 207-250.
- Beliakoff J & Whitesell L (2004). "Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy." *Anticancer Drugs* 15(7): 651-662.
- Belsches A P, Haskell M D et al. (1997). "Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis." *Front Biosci* 2: d501-518.

- Berlitch J B, Liu C et al. (2008). "Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG." *J Cell Biochem* 103(2): 509-519.
- Bertazzi A, Pesatori A C et al. (1993). "Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin." *Epidemiology* 4(5): 398-406.
- Birnbaum L S (1994). "The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment." *Environ Health Perspect* 102 Suppl 9: 157-167.
- Bodnar A G, Ouellette M et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* 279(5349): 349-352.
- Boutros P C, Moffat I D et al. (2004). "Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting." *Biochem Biophys Res Commun* 321(3): 707-715.
- Boverhof D R, Burgoon L D et al. (2005). "Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity." *Toxicol Sci* 85(2): 1048-1063.
- Brouwer A, Ahlborg U G et al. (1998). "Report of the WHO working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs." *Chemosphere* 37(9-12): 1627-1643.
- Bryan T M, Englezou A et al. (1995). "Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity." *EMBO J* 14(17): 4240-4248.
- Bryce L A, Morrison N et al. (2000). "Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization." *Neoplasia* 2(3): 197-201.
- Calle E E, Frumkin H et al. (2002). "Organochlorines and breast cancer risk." *CA Cancer J Clin* 52(5): 301-309.
- Canada. Société canadienne du cancer, Agence de la santé publique du Canada, Statistique Canada, Conseil canadien des registres du cancer et Partenariat canadien contre le cancer, (2007), *Statistiques canadienne sur le cancer 2007*. Canada, 124 p. ., http://www.cancer.ca/Canada-wide/About%20cancer/Cancer%20statistics/~media/CCS/Canada%20wide/Files%20List/liste%20de%20fichiers/pdf/2007%20Canadian%20Cancer%20Statistics%20%20PDF%20French_1816216953.ashx (visité le 8 octobre 2010).
- Canada. Société canadienne du cancer, Agence de la santé publique du Canada, Statistique Canada, Conseil canadien des registres du cancer et Partenariat canadien contre le cancer, (2010), *Statistiques canadienne sur le cancer 2010*. Canada, 135 p. .<http://www.cancer.ca/Canada-wide/About%20cancer/Cancer%20statistics/~media/CCS/Canada%20wide/Files%20List/liste%20de%20fichiers/PDF%20-%20Policy%20-%20Canadian%20Cancer%20Statistics%20%20French/Canadian%20Cancer%20Statistics%202010-%20French.ashx> (Visité le 8 octobre 2010).
- Casalbore P, Budoni M et al. (2009). "Tumorigenic potential of olfactory bulb-derived human adult neural stem cells associates with activation of TERT and NOTCH1." *PLoS One* 4(2): e4434.
- Chang J T, Chen Y L et al. (2002). "Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits." *Eur J Biochem* 269(14): 3442-3450.
- Chang M Y, Huang H et al. (2010). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin increases aromatase (CYP19) mRNA stability in MCF-7 cells." *Mol Cell Endocrinology* 317:8-13.

- Chen R F, Li Z H et al. (2007). "Malignant transformation of the cultured human normal biliary tract epithelial cells induced by hepatitis C virus core protein." *Oncol Rep* 17(1): 105-110.
- Cheon H, Woo Y S et al. (2007). "Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF- α production in differentiated THP-1 human macrophages." *Exp Mol Med* 39(4): 524-534.
- Cianfrocca M & Gradishar W (2009). "New molecular classifications of breast cancer." *CA Cancer J Clin* 59(5): 303-313.
- Citri A, Gan J et al. (2004). "Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation." *EMBO Rep* 5(12): 1165-1170.
- Colgin L M, Wilkinson C et al. (2000). "The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity." *Neoplasia* 2(5): 426-432.
- Collins K & Mitchell J R (2002). "Telomerase in the human organism." *Oncogene* 21(4): 564-579.
- Cong Y & Shay J W (2008). "Actions of human telomerase beyond telomeres." *Cell Res* 18(7): 725-732.
- Cong Y S, Wen J et al. (1999). "The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter." *Hum Mol Genet* 8(1): 137-142.
- Cong Y S, Wright W E et al. (2002). "Human telomerase and its regulation." *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3): 407-425, table of contents.
- Corey D R (2002). "Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials." *Oncogene* 21(4): 631-637.
- Cortes-Gonzalez C, Barrera-Chimal J et al. (2010). "Opposite effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells." *Cell Physiol Biochem* 26(4-5): 657-668.
- Counter C M, Avilion A A et al. (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." *EMBO J* 11(5): 1921-1929.
- Counter C M, Hirte H W et al. (1994). "Telomerase activity in human ovarian carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 2900-2904.
- Counter C M, Meyerson M et al. (1998). "Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase." *Oncogene* 16(9): 1217-1222.
- de Lange T (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." *Genes Dev* 19(18): 2100-2110.
- De Semir D, Nosrati M et al. (2007). "Telomerase: going beyond the ends." *Cell Cycle* 6(5): 546-549.
- DeBruin L S & Josephy P D (2002). "Perspectives on the chemical etiology of breast cancer." *Environ Health Perspect* 110 Suppl 1: 119-128.
- Denis M, Cuthill S et al. (1988). "Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 155(2): 801-807.
- Denison M S & Nagy S R (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309-334.

- Denison M S, Pandini A et al. (2002). "Ligand binding and activation of the Ah receptor." *Chem Biol Interact* 141(1-2): 3-24.
- Dere E, Lo R et al. (2011). "Integration of Genome-Wide Computation DRE Search, AhR ChIP-chip and Gene Expression Analyses of TCDD-Elicited Responses in the Mouse Liver." *BMC Genomics* 12(1): 365.
- Dewailly E, Ayotte P et al. (1996). "Polychlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) concentrations in the breast milk of women in Quebec." *Am J Public Health* 86(9): 1241-1246.
- Dinh P, Sotiriou C et al. (2007). "The evolution of treatment strategies: aiming at the target." *Breast* 16 Suppl 2: S10-16.
- Dolwick K M, Schmidt J V et al. (1993). "Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA." *Mol Pharmacol* 44(5): 911-917.
- Eitsuka T, Nakagawa K et al. (2006). "Down-regulation of telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells by tocotrienol." *Biochem Biophys Res Commun* 348(1): 170-175.
- Elkak A E, Meligonis G et al. (2005). "hTERT protein expression is independent of clinicopathological parameters and c-Myc protein expression in human breast cancer." *J Carcinog* 4: 17.
- Elston C W & Ellis I O (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 19(5): 403-410.
- Elston C W & Ellis I O (2002). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 41(3A): 154-161.
- Elston C W & Ellis I O (2002). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410." *Histopathology* 41(3A): 151-152, discussion 152-153.
- Encyclopédie canadienne du cancer de la Société canadienne du cancer (2011). *Facteurs de risque du cancer du sein*, <http://info.cancer.ca/cceecc/default.aspx?cceid=185&toc=10&lf=stomach&Lang=F#>, (Visité le 20 janvier 2011)
- Endoh T, Tsuji N et al. (2005). "Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription." *Exp Cell Res* 305(2): 300-311.
- Fernandez-Salguero P, Pineau T et al. (1995). "Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor." *Science* 268(5211): 722-726.
- Fernandez-Salguero P M, Ward J M et al. (1997). "Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice." *Vet Pathol* 34(6): 605-614.
- Fletcher N, Wahlstrom D et al. (2005). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study." *Toxicol Appl Pharmacol* 207(1): 1-24.
- Flores I, Evan G et al. (2006). "Genetic analysis of myc and telomerase interactions in vivo." *Mol Cell Biol* 26(16): 6130-6138.

- Forsyth N R, Wright W E et al. (2002). "Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again." *Differentiation* 69(4-5): 188-197.
- Forsythe H L, Jarvis J L et al. (2001). "Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase." *J Biol Chem* 276(19): 15571-15574.
- Fritz W A, Lin T M et al. (2009). "The selective aryl hydrocarbon receptor modulator 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran inhibits prostate tumor metastasis in TRAMP mice." *Biochem Pharmacol* 77(7): 1151-1160.
- Fujii-Kuriyama Y & Kawajiri K (2010). "Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86(1): 40-53.
- Fujiki T, Udono M et al. (2010). "Regulatory mechanisms of human and mouse telomerase reverse transcriptase gene transcription: distinct dependency on c-Myc." *Cytotechnology* 62(4): 333-339.
- Fujimoto K, Kyo S et al. (2000). "Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT." *Nucleic Acids Res* 28(13): 2557-2562.
- Fysh J M & Okey A B (1978). "Aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase development in rat mammary tissue." *Biochem Pharmacol* 27(24): 2968-2972.
- Galea M H, Blamey R W et al. (1992). "The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 22(3): 207-219.
- Geserick C, Tejera A et al. (2006). "Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming growth factor-beta signaling." *Oncogene* 25(31): 4310-4319.
- Gil J, Kerai P et al. (2005). "Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc." *Cancer Res* 65(6): 2179-2185.
- Ginisty H, Sicard H et al. (1999). "Structure and functions of nucleolin." *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 761-772.
- Gladych M, Wojtyla A et al. (2011). "Human telomerase expression regulation." *Biochem Cell Biol* 89(4): 359-376.
- Gonzalez-Suarez E, Samper E et al. (2001). "Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes." *EMBO J* 20(11): 2619-2630.
- Gordon D M & Santos J H (2010). "The emerging role of telomerase reverse transcriptase in mitochondrial DNA metabolism." *J Nucleic Acids* 2010.
- Goueli B S & Janknecht R (2003). "Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor." *Oncogene* 22(39): 8042-8047.
- Grandin N & Charbonneau M (2008). "Protection against chromosome degradation at the telomeres." *Biochimie* 90(1): 41-59.
- Greider C W (1999). "Telomeres do D-loop-T-loop." *Cell* 97(4): 419-422.
- Greider C W & Blackburn E H (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." *Cell* 43(2 Pt 1): 405-413.

- Guenther T M & Nebert D W (1977). "Cytosolic receptor for aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic aromatic compounds. Evidence for structural and regulatory variants among established cell cultured lines." *J Biol Chem* 252(24): 8981-8989.
- Guo J, Sartor M et al. (2004). "Expression of genes in the TGF-beta signaling pathway is significantly deregulated in smooth muscle cells from aorta of aryl hydrocarbon receptor knockout mice." *Toxicol Appl Pharmacol* 194(1): 79-89.
- Gusterson B (2009). "Do 'basal-like' breast cancers really exist?" *Nat Rev Cancer* 9(2): 128-134.
- Haarmann-Stemann T, Bothe H et al. (2009). "Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways." *Biochem Pharmacol* 77(4): 508-520.
- Haendeler J, Hoffmann J et al. (2003). "Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707." *Mol Cell Biol* 23(13): 4598-4610.
- Haendeler J, Hoffmann J et al. (2003). "Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation." *FEBS Lett* 536(1-3): 180-186.
- Hahn M E, Allan L L et al. (2009). "Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor." *Biochem Pharmacol* 77(4): 485-497.
- Hahn M E, Karchner S I et al. (2006). "Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics." *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305(9): 693-706.
- Hahn M E, Karchner S I et al. (1997). "Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13743-13748.
- Hall J M, Barhoover M A et al. (2010). "Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation." *Mol Endocrinol* 24(2): 359-369.
- Hao H, Nancai Y et al. (2008). "siRNA directed against c-Myc inhibits proliferation and downregulates human telomerase reverse transcriptase in human colon cancer Colo 320 cells." *J Exp Clin Cancer Res* 27: 27.
- Harari D & Yarden Y (2000). "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." *Oncogene* 19(53): 6102-6114.
- Harper P A, Prokipcak R D et al. (1991). "Detection and characterization of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the human colon adenocarcinoma cell line LS180." *Arch Biochem Biophys* 290(1): 27-36.
- Harper P A, Wong J Y et al. (2002). "Polymorphisms in the human AH receptor." *Chem Biol Interact* 141(1-2): 161-187.
- Herbert B, Pitts A E et al. (1999). "Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14276-14281.
- Herschkowicz J I, Simin K et al. (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." *Genome Biol* 8(5): R76.

- Hisatomi H, Ohyashiki K et al. (2003). "Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene." *Neoplasia* 5(3): 193-197.
- Hiyama E, Gollahon L et al. (1996). "Telomerase activity in human breast tumors." *J Natl Cancer Inst* 88(2): 116-122.
- Holcomb M & Safe S (1994). "Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." *Cancer Lett* 82(1): 43-47.
- Holt S E, Aisner D L et al. (1999). "Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes." *Genes Dev* 13(7): 817-826.
- Horling K, Santos A N et al. (2011). "The AhR is constitutively activated and affects granulosa cell features in the human cell line KGN." *Mol Hum Reprod* 17(2): 104-114.
- Horman S, Galand P et al. (1997). "Changes in the phosphorylation status of the 27 kDa heat shock protein (HSP27) associated with the modulation of growth and/or differentiation in MCF-7 cells." *Cell Prolif* 30(1): 21-35.
- Hu X, Yu N et al. (2009). "Downregulation of human telomerase reverse transcriptase through anti-C-myc siRNA in human colon cancer Colo 320 cells." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 28(1): 1-11.
- Huang G & Elferink C J (2005). "Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest." *Mol Pharmacol* 67(1): 88-96.
- Huard S & Autexier C (2004). "Human telomerase catalyzes nucleolytic primer cleavage." *Nucleic Acids Res* 32(7): 2171-2180.
- Ikuta T, Eguchi H et al. (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* 273(5): 2895-2904.
- Ikuta T, Tachibana T et al. (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biochem* 127(3): 503-509.
- Jacobs M N, Dickins M et al. (2003). "Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure." *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(2-3): 117-132.
- Jagadeesh S & Banerjee P P (2006). "Inositol hexaphosphate represses telomerase activity and translocates TERT from the nucleus in mouse and human prostate cancer cells via the deactivation of Akt and PKCalpha." *Biochem Biophys Res Commun* 349(4): 1361-1367.
- Jagadeesh S, Kyo S et al. (2006). "Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells." *Cancer Res* 66(4): 2107-2115.
- Jain S, Dolwick K M et al. (1994). "Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini." *J Biol Chem* 269(50): 31518-31524.
- Jakob S, Schroeder P et al. (2008). "Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase." *J Biol Chem* 283(48): 33155-33161.

- Jeffy B D, Chirnomas R B et al. (2002). "Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors." *Environ Mol Mutagen* 39(2-3): 235-244.
- Jeuken A, Keser B J et al. (2003). "Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits." *J Agric Food Chem* 51(18): 5478-5487.
- Jurczyk J, Nouwens A S et al. (2010). "Direct involvement of the TEN domain at the active site of human telomerase." *Nucleic Acids Res.*
- Kang S S, Kwon T et al. (1999). "Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit." *J Biol Chem* 274(19): 13085-13090.
- Karyala S, Guo J et al. (2004). "Different global gene expression profiles in benzo[a]pyrene- and dioxin-treated vascular smooth muscle cells of AHR-knockout and wild-type mice." *Cardiovasc Toxicol* 4(1): 47-73.
- Katakura Y, Udono M et al. (2009). "Protein kinase C delta plays a key role in cellular senescence programs of human normal diploid cells." *J Biochem* 146(1): 87-93.
- Keppler B R, Grady A T et al. (2006). "The biochemical role of the heat shock protein 90 chaperone complex in establishing human telomerase activity." *J Biol Chem* 281(29): 19840-19848.
- Kewley R J, Whitelaw M L et al. (2004). "The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators." *Int J Biochem Cell Biol* 36(2): 189-204.
- Keydar I, Chen L et al. (1979). "Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin." *Eur J Cancer* 15(5): 659-670.
- Kharbanda S, Kumar V et al. (2000). "Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase." *Curr Biol* 10(10): 568-575.
- Khurts S, Masutomi K et al. (2004). "Nucleolin interacts with telomerase." *J Biol Chem* 279(49): 51508-51515.
- Kilian A, Bowtell D D et al. (1997). "Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types." *Hum Mol Genet* 6(12): 2011-2019.
- Kim J H, Park S M et al. (2005). "Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT." *Genes Dev* 19(7): 776-781.
- Kim M O, Moon D O et al. (2008). "Pectenotoxin-2 represses telomerase activity in human leukemia cells through suppression of hTERT gene expression and Akt-dependent hTERT phosphorylation." *FEBS Lett* 582(23-24): 3263-3269.
- Kim N W, Piatyszek M A et al. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* 266(5193): 2011-2015.
- Kindas-Mugge I, Micksche M et al. (1998). "Modification of growth in small heat shock (hsp27) gene transfected breast carcinoma." *Anticancer Res* 18(1A): 413-417.
- Kirkpatrick K L, Newbold R F et al. (2004). "There is no correlation between c-Myc mRNA expression and telomerase activity in human breast cancer." *Int Semin Surg Oncol* 1(1): 2.
- Kirkpatrick K L, Ogunkolade W et al. (2003). "hTERT expression in human breast cancer and non-cancerous breast tissue: correlation with tumour stage and c-Myc expression." *Breast Cancer Res Treat* 77(3): 277-284.

- Klapper L N, Kirschbaum M H et al. (2000). "Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors." *Adv Cancer Res* 77: 25-79.
- Klinge C M, Bowers J L et al. (1999). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements." *Mol Cell Endocrinol* 157(1-2): 105-119.
- Klotz D M, Ladlie B L et al. (1997). "o,p'-DDT and its metabolites inhibit progesterone-dependent responses in yeast and human cells." *Mol Cell Endocrinol* 129(1): 63-71.
- Kohle C, Hassepass I et al. (2002). "Conditional expression of a constitutively active aryl hydrocarbon receptor in MCF-7 human breast cancer cells." *Arch Biochem Biophys* 402(2): 172-179.
- Korkalainen M, Tuomisto J et al. (2001). "The AH receptor of the most dioxin-sensitive species, guinea pig, is highly homologous to the human AH receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 285(5): 1121-1129.
- Kortenkamp A (2006). "Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective." *Int J Androl* 29(1): 193-198.
- Kouniavsky G & Zeiger M A (2010). "The role of telomeres and telomerase in endocrine tumors." *Discov Med* 10(53): 340-347.
- Krishnan V, Wang X et al. (1994). "Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells." *J Biol Chem* 269(22): 15912-15917.
- Kumar M B, Ramadoss P et al. (2001). "The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity." *J Biol Chem* 276(45): 42302-42310.
- Kunisada M, Budiyanto A et al. (2005). "Retinoic acid suppresses telomerase activity in HSC-1 human cutaneous squamous cell carcinoma." *Br J Dermatol* 152(3): 435-443.
- Kyo S, Takakura M et al. (2008). "Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers." *Cancer Sci* 99(8): 1528-1538.
- Kyo S, Takakura M et al. (1999). "Estrogen activates telomerase." *Cancer Res* 59(23): 5917-5921.
- Kyo S, Takakura M et al. (2000). "Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT)." *Nucleic Acids Res* 28(3): 669-677.
- La Rocca C, Alivernini S et al. (2008). "TEQ(S) and body burden for PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in human adipose tissue." *Chemosphere* 73(1): 92-96.
- Latil A, Vidaud D et al. (2000). "hTERT expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer." *Int J Cancer* 89(2): 172-176.
- Li H, Zhao L et al. (1998). "Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells." *J Biol Chem* 273(50): 33436-33442.
- Li H, Zhao L L et al. (1997). "Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells." *J Biol Chem* 272(27): 16729-16732.

- Li Y, Liu L et al. (2009). "Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms." *Int J Cancer* 125(2): 286-296.
- Lin H J, Hsieh F C et al. (2005). "Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer." *Br J Cancer* 93(12): 1372-1381.
- Lo S J, Lee C C et al. (2006). "The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings." *Cell Res* 16(6): 530-538.
- Lopez-Cervantes M, Torres-Sanchez L et al. (2004). "Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: a meta-analysis of the epidemiologic evidence." *Environ Health Perspect* 112(2): 207-214.
- Lorber M & Phillips L (2002). "Infant exposure to dioxin-like compounds in breast milk." *Environ Health Perspect* 110(6): A325-332.
- Loveday R L, Greenman J et al. (1999). "Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer." *Int J Cancer* 84(5): 516-520.
- Luan F, Liu H et al. (2009). "Hepatitis B virus protein preS2 potentially promotes HCC development via its transcriptional activation of hTERT." *Gut* 58(11): 1528-1537.
- Lund A K, Goens M B et al. (2006). "Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice." *Toxicol Appl Pharmacol* 212(2): 127-135.
- Ma Q, Dong L et al. (1995). "Transcriptional activation by the mouse Ah receptor. Interplay between multiple stimulatory and inhibitory functions." *J Biol Chem* 270(21): 12697-12703.
- Mandal P K (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." *J Comp Physiol B* 175(4): 221-230.
- Marlowe J L & Puga A (2005). "Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis." *J Cell Biochem* 96(6): 1174-1184.
- Martinez J M, Afshari C A et al. (2002). "Differential toxicogenomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells." *Toxicol Sci* 69(2): 409-423.
- Mason D X, Keppler D et al. (2006). "Defined genetic events associated with the spontaneous in vitro transformation of E1A/Ras-expressing human IMR90 fibroblasts." *Carcinogenesis* 27(2): 350-359.
- Masutomi K, Yu E Y et al. (2003). "Telomerase maintains telomere structure in normal human cells." *Cell* 114(2): 241-253.
- Mavaddat N, Antoniou A C et al. (2010). "Genetic susceptibility to breast cancer." *Mol Oncol* 4(3): 174-191.
- Mavrogiannou E, Strati A et al. (2007). "Real-time RT-PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase splice variants in tumor cell lines and non-small cell lung cancer." *Clin Chem* 53(1): 53-61.
- Micka J, Milatovich A et al. (1997). "Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility." *Pharmacogenetics* 7(2): 95-101.

- Mimura J & Fujii-Kuriyama Y (2003). "Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD." *Biochim Biophys Acta* 1619(3): 263-268.
- Mimura J, Yamashita K et al. (1997). "Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor." *Genes Cells* 2(10): 645-654.
- Moasser M M (2007). "The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis." *Oncogene* 26(45): 6469-6487.
- Molina M A, Codony-Servat J et al. (2001). "Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells." *Cancer Res* 61(12): 4744-4749.
- Monteiro P, Gilot D et al. (2007). "AhR- and c-maf-dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons." *Biochem Biophys Res Commun* 358(2): 442-448.
- Moon D O, Kim M O et al. (2009). "Gefitinib induces apoptosis and decreases telomerase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells." *Arch Pharm Res* 32(10): 1351-1360.
- Moon D O, Kim M O et al. (2009). "Butein suppresses c-Myc-dependent transcription and Akt-dependent phosphorylation of hTERT in human leukemia cells." *Cancer Lett* 286(2): 172-179.
- Morrow D, Qin C et al. (2004). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation." *J Steroid Biochem Mol Biol* 88(1): 27-36.
- Moyzis R K, Buckingham J M et al. (1988). "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(18): 6622-6626.
- Murofushi Y, Nagano S et al. (2006). "Cell cycle-specific changes in hTERT promoter activity in normal and cancerous cells in adenoviral gene therapy: a promising implication of telomerase-dependent targeted cancer gene therapy." *Int J Oncol* 29(3): 681-688.
- Murray I A, Morales J L et al. (2009). "Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity." *Mol Pharmacol* 77(2): 247-254.
- Nanni S, Narducci M et al. (2002). "Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer." *J Clin Invest* 110(2): 219-227.
- National Cancer Institute (2011), *Breast Cancer: Prevention, Genetics, Causes* <http://www.cancer.gov/cancertopics/prevention-genetics-causes/breast#Causes+and+Risk+Factors> (Visité le 20 janvier 2011).
- National Cancer Institute (2011), *Description of Evidence* http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/breast/HealthProfessional/page2#Section_280, (Visité le 8 février 2011).
- Newsome W H, Davies D et al. (1995). "PCB and organochlorine pesticides in Canadian human milk--1992." *Chemosphere* 30(11): 2143-2153.
- Nguyen L P & Bradfield C A (2008). "The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor." *Chem Res Toxicol* 21(1): 102-116.
- Niu H, Xia J et al. (2000). "Characterization of the interaction between the nuclease and reverse transcriptase activity of the yeast telomerase complex." *Mol Cell Biol* 20(18): 6806-6815.

- Oenga G N, Spink D C et al. (2004). "TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation in vitro." *Toxicol In Vitro* 18(6): 811-819.
- Ogiso H, Kagi N et al. (2004). "Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex." *Biochemistry* 43(49): 15510-15519.
- Oh S, Song Y et al. (1999). "The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene." *J Biol Chem* 274(52): 37473-37478.
- Oshimura M & Barrett J C (1997). "Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors." *Eur J Cancer* 33(5): 710-715.
- Oulton R & Harrington L (2004). "A human telomerase-associated nuclease." *Mol Biol Cell* 15(7): 3244-3256.
- Papanikolaou V, Iliopoulos D et al. (2009). "The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells." *Int J Oncol* 35(5): 1141-1149.
- Perdew G H (1988). "Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein." *J Biol Chem* 263(27): 13802-13805.
- Perou C M, Sorlie T et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406(6797): 747-752.
- Pitts A E & Corey D R (1999). "The telomerase challenge - an unusual problem in drug discovery." *Drug Discov Today* 4(4): 155-161.
- Plunkett F J, Franzese O et al. (2007). "The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8+CD28-CD27- T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation." *J Immunol* 178(12): 7710-7719.
- Poland A, Palen D et al. (1994). "Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor." *Mol Pharmacol* 46(5): 915-921.
- Pollenz R S, Sattler C A et al. (1994). "The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy." *Mol Pharmacol* 45(3): 428-438.
- Poole J C, Andrews L G et al. (2001). "Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT)." *Gene* 269(1-2): 1-12.
- Porter W, Wang F et al. (2001). "Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists." *J Mol Endocrinol* 26(1): 31-42.
- Puga A, Barnes S J et al. (2000). "Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest." *J Biol Chem* 275(4): 2943-2950.
- Puga A, Ma C et al. (2009). "The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways." *Biochem Pharmacol* 77(4): 713-722.
- Puga A, Maier A et al. (2000). "The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells." *Biochem Pharmacol* 60(8): 1129-1142.

- Puga A, Marlowe J et al. (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." *Toxicology* 181-182: 171-177.
- Raaschou-Nielsen O, Pavuk M et al. (2005). "Adipose organochlorine concentrations and risk of breast cancer among postmenopausal Danish women." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(1): 67-74.
- Rakha E A, Reis-Filho J S et al. (2010). "Combinatorial biomarker expression in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 120: 293-308.
- Rea M A, Phillips M A et al. (1998). "Modulation of human epidermal cell response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by epidermal growth factor." *Carcinogenesis* 19(3): 479-483.
- Rha S Y, Jeung H C et al. (2009). "Changes of telomerase activity by alternative splicing of full-length and beta variants of hTERT in breast cancer patients." *Oncol Res* 18(5-6): 213-220.
- Rowlands C J, Staskal D F et al. (2010). "The human AHR: identification of single nucleotide polymorphisms from six ethnic populations." *Pharmacogenet Genomics* 20(5): 283-290.
- Rowlands J C & Gustafsson J A (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." *Crit Rev Toxicol* 27(2): 109-134.
- Rowlands J C, McEwan I J et al. (1996). "Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors." *Mol Pharmacol* 50(3): 538-548.
- Rubin I & Yarden Y (2001). "The basic biology of HER2." *Ann Oncol* 12 Suppl 1: S3-8.
- Safe S (1990). "Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs)." *Crit Rev Toxicol* 21(1): 51-88.
- Safe S (1993). "Development of bioassays and approaches for the risk assessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds." *Environ Health Perspect* 101 Suppl 3: 317-325.
- Safe S & Papineni S (2006). "The role of xenoestrogenic compounds in the development of breast cancer." *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 447-454.
- Safe S, Qin C et al. (1999). "Development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of breast cancer." *Expert Opin Investig Drugs* 8(9): 1385-1396.
- Safe S, Wang F et al. (1998). "Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms." *Toxicol Lett* 102-103: 343-347.
- Safe S & Wormke M (2003). "Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action." *Chem Res Toxicol* 16(7): 807-816.
- Safe S, Wormke M et al. (2000). "Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(3): 295-306.
- Salehi F, Turner M C et al. (2008). "Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11(3-4): 276-300.
- Salinas M, Lopez-Valdaliso R et al. (2000). "Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells." *Mol Cell Neurosci* 15(2): 156-169.

- Santos J H, Meyer J N et al. (2006). "Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis." *Hum Mol Genet* 15(11): 1757-1768.
- Sarkar P, Shiizaki K et al. (2006). "Activation of telomerase in BeWo cells by estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in co-operation with c-Myc." *Int J Oncol* 28(1): 43-51.
- Sato S, Fujita N et al. (2000). "Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10832-10837.
- Schechter A, Furst P et al. (1994). "Chlorinated dioxins and dibenzofurans in human tissue from general populations: a selective review." *Environ Health Perspect* 102 Suppl 1: 159-171.
- Schlezinger J J, Liu D et al. (2006). "A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis." *Biol Chem* 387(9): 1175-1187.
- Schmidt J V, Su G H et al. (1996). "Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6731-6736.
- Schnitt S J (2010). "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy." *Mod Pathol* 23 Suppl 2: S60-64.
- Seimiya H, Sawada H et al. (2000). "Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase." *EMBO J* 19(11): 2652-2661.
- Sekaran V G, Soares J et al. (2009). "Structures of telomerase subunits provide functional insights." *Biochim Biophys Acta* 1804(5): 1190-1201.
- Shimizu Y, Nakatsuru Y et al. (2000). "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 779-782.
- Smith L L, Collier H A et al. (2003). "Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation." *Nat Cell Biol* 5(5): 474-479.
- Sobin L H, Hermanek P et al. (1988). "TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions." *Cancer* 61(11): 2310-2314.
- Société canadienne du cancer (2011), *Causes of breast cancer*, http://www.cancer.ca/Canadawide/About%20cancer/Types%20of%20cancer/Causes%20of%20breast%20cancer.aspx?sc_lang=fr-ca. (Visité le 19 janvier 2011).
- Sogawa K, Numayama-Tsuruta K et al. (2004). "A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor-Arnt heterodimer." *Biochem Biophys Res Commun* 318(3): 746-755.
- Sorlie T, Perou C M et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10869-10874.
- Stampfer M R, Garbe J et al. (2001). "Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor beta growth inhibition in p16INK4A(-) human mammary epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4498-4503.
- Stewart S A, Hahn W C et al. (2002). "Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12606-12611.

- Strati A, Papoutsi Z et al. (2009). "Effect of ellagic acid on the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) alpha+beta+ transcript in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells." *Clin Biochem* 42(13-14): 1358-1362.
- Sun Y V, Boverhof D R et al. (2004). "Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences." *Nucleic Acids Res* 32(15): 4512-4523.
- Tijet N, Boutros P C et al. (2006). "Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries." *Mol Pharmacol* 69(1): 140-153.
- Tomas-Loba A, Flores I et al. (2008). "Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice." *Cell* 135(4): 609-622.
- Tomlinson R L, Ziegler T D et al. (2006). "Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres." *Mol Biol Cell* 17(2): 955-965.
- Tuteja R & Tuteja N (1998). "Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33(6): 407-436.
- Ulaner G A, Hu J F et al. (1998). "Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts." *Cancer Res* 58(18): 4168-4172.
- Ulaner G A, Hu J F et al. (2001). "Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development." *Int J Cancer* 91(5): 644-649.
- Ulaner G A, Hu J F et al. (2000). "Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium." *Int J Cancer* 85(3): 330-335.
- Varela E & Blasco M A (2010). "2009 nobel prize in physiology or medicine: telomeres and telomerase." *Oncogene* 29(11): 1561-1565.
- Vargas-Roig L M, Fanelli M A et al. (1997). "Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples." *Cancer Detect Prev* 21(5): 441-451.
- Verner M A, Charbonneau M et al. (2008). "Physiologically based pharmacokinetic modeling of persistent organic pollutants for lifetime exposure assessment: a new tool in breast cancer epidemiologic studies." *Environ Health Perspect* 116(7): 886-892.
- Veronesi U, Zurrada S et al. (2009). "Rethinking TNM: a breast cancer classification to guide to treatment and facilitate research." *Breast J* 15(3): 291-295.
- Viel J F, Clement M C et al. (2008). "Dioxin emissions from a municipal solid waste incinerator and risk of invasive breast cancer: a population-based case-control study with GIS-derived exposure." *Int J Health Geogr* 7: 4.
- Visvader J E (2009). "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis." *Genes Dev* 23(22): 2563-2577.
- Wang F, Samudio I et al. (2001). "Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition." *Mol Cell Endocrinol* 172(1-2): 91-103.
- Wang J, Xie L Y et al. (1998). "Myc activates telomerase." *Genes Dev* 12(12): 1769-1774.

- Weinrich S L, Pruzan R et al. (1997). "Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT." *Nat Genet* 17(4): 498-502.
- Wen J, Cong Y S et al. (1998). "Reconstitution of wild-type or mutant telomerase activity in telomerase-negative immortal human cells." *Hum Mol Genet* 7(7): 1137-1141.
- Wojtowicz A K, Gregoraszczyk E L et al. (2004). "Effect of single and repeated in vitro exposure of ovarian follicles to o,p'-DDT and p,p'-DDT and their metabolites." *Pol J Pharmacol* 56(4): 465-472.
- Wojtyla A, Gladych M et al. (2010). "Human telomerase activity regulation." *Mol Biol Rep*.
- Wolff M S & Weston A (1997). "Breast cancer risk and environmental exposures." *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4: 891-896.
- Wong P S, Li W et al. (2009). "Characterization of MCF mammary epithelial cells overexpressing the Arylhydrocarbon receptor (AhR)." *BMC Cancer* 9: 234.
- World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (1997). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (1997) Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans Lyon, World Health Organization. Volume 69, 666 p.
- Wu K J, Grandori C et al. (1999). "Direct activation of TERT transcription by c-MYC." *Nat Genet* 21(2): 220-224.
- Wu Y L, Dudognon C et al. (2006). "Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths." *J Cell Sci* 119(Pt 13): 2797-2806.
- Xu D, Gruber A et al. (1999). "Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms." *Br J Cancer* 80(8): 1156-1161.
- Xu D, Wang Q et al. (2000). "Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells." *Oncogene* 19(45): 5123-5133.
- Xu W, Mimnaugh E et al. (2001). "Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90." *J Biol Chem* 276(5): 3702-3708.
- Xu W, Mimnaugh E G et al. (2002). "Hsp90, not Grp94, regulates the intracellular trafficking and stability of nascent ErbB2." *Cell Stress Chaperones* 7(1): 91-96.
- Xu W, Yuan X et al. (2007). "Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity." *Mol Cell Biol* 27(1): 220-228.
- Yamamoto H, Morimoto T et al. (1998). "[Proposals for revisions of UICC TNM system (1997)--breast cancer]." *Gan To Kagaku Ryoho* 25(7): 1087-1093.
- Yang X, Liu D et al. (2005). "The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells." *Oncogene* 24(53): 7869-7881.
- Yao G, Harstad E.B. et al. (2003). The AH Receptor. PAS Proteins, Regulators and Senses of Development and Physiology: 263.
- Yasui T, Kim E Y et al. (2007). "Functional characterization and evolutionary history of two aryl hydrocarbon receptor isoforms (AhR1 and AhR2) from avian species." *Toxicol Sci* 99(1): 101-117.
- Yi X, White D M et al. (2000). "An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity." *Neoplasia* 2(5): 433-440.

- Yin Z, Henry E C et al. (2009). "(-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor." *Biochemistry* 48(2): 336-345.
- Zhang P, Chan S L et al. (2003). "TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability." *FASEB J* 17(6): 767-769.
- Zhang S, Lei P et al. (2009). "The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy." *Endocr Relat Cancer* 16(3): 835-844.
- Zhang S, Qin C et al. (2003). "Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context." *Environ Health Perspect* 111(16): 1877-1882.
- Zhang Y G, Du Q et al. (2008). "Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells." *Int J Oncol* 33(3): 595-602.
- Zhao Q, Yang Y et al. (2008). "Posttranscriptional regulation of the telomerase hTERT by gambogic acid in human gastric carcinoma 823 cells." *Cancer Lett* 262(2): 223-231.
- Zhao Y M, Zhou Q et al. (2008). "Antiproliferative effect of rapamycin on human T-cell leukemia cell line Jurkat by cell cycle arrest and telomerase inhibition." *Acta Pharmacol Sin* 29(4): 481-488.
- Zhou J H, Zhang H M et al. (2003). "Relationship between telomerase activity and its subunit expression and inhibitory effect of antisense hTR on pancreatic carcinoma." *World J Gastroenterol* 9(8): 1808-1814.
- Zhu X, Kumar R et al. (1996). "Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 6091-6095.
- Zhu Y, Tomlinson R L et al. (2004). "Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells." *Mol Biol Cell* 15(1): 81-90.

ANNEXE I

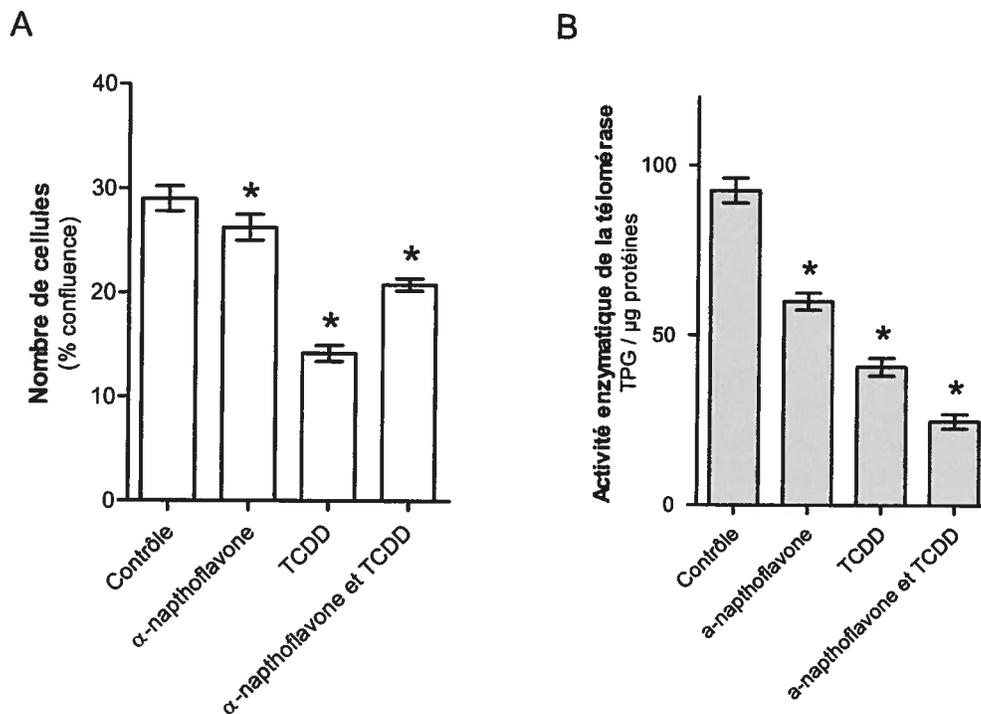


Figure I.1 Effets de l'α-naphtoflavone et de la TCDD sur la prolifération et l'activité de la télomérase des cellules T47D. Les cellules ont été exposées à l'α-naphtoflavone (5 μM), à la TCDD (5,3 nM) et au mélange des deux composés durant 9 j. (a) La confluence cellulaire et (b) l'activité enzymatique de la télomérase ont été mesurées à la fin du traitement et comparées au groupe contrôle (DMSO 0,1%). * = $p < 0,05$.

ANNEXE II - Preuve de soumission à la revue *Breast Cancer Research*

De : Charbonneau, Michel

Envoyé : 7 septembre 2011 10:56

À : Pittet, Sandra

Objet : TR: Breast Cancer Research - **Your manuscript, MS: 3581197535948394**

De : Breast Cancer Research Editorial [mailto:editorial@breast-cancer-research.com]

Envoyé : 7 septembre 2011 10:51

À : Charbonneau, Michel

Objet : Breast Cancer Research - Your manuscript, MS: 3581197535948394

Dear Prof Charbonneau

Breast Cancer Research would like to confirm receipt of your manuscript. You will shortly receive a further e-mail that will provide you with links to the PDF that is now being generated and will be used for assessing it.

At any time, you may log in to My Breast Cancer Research (<http://breast-cancer-research.com/my/>) to view the status of the manuscript, or you can bookmark the URL of your manuscript: http://breast-cancer-research.com//manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=3581197535948394

If you have any questions, please visit the BioMed Central Support Center (<http://breast-cancer-research.com/support/>) or e-mail us at editorial@breast-cancer-research.com.

With thanks and best wishes,

The Breast Cancer Research Editorial Team
Email: editorial@breast-cancer-research.com

Floor 6, 236 Gray's Inn Road
London, WC1X 8HL. UK
W: <http://breast-cancer-research.com/>
T: +44 (0) 20 3192 2013
F: +44 (0) 20 3192 2011