

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

LES EFFETS D'UNE EXPOSITION PÉRINATALE AUX RETARDATEURS DE FLAMMES BROMÉS SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE ET SUR LE CANCER DU SEIN

Par
Mélanie LAVOIE

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jacques Bernier
INRS, Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Jonathan Verreault
Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Isabelle Plante
INRS, Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les retardateurs de flammes bromés (BFRs) sont omniprésents dans les produits domestiques et industriels afin de ralentir leur combustion. Même si l'utilisation des BFRs est désormais restreinte, l'exposition humaine subsiste car ils sont toujours libérés des items existants. Plusieurs BFRs sont des perturbateurs endocriniens connus. Cependant, leurs effets sur le développement des glandes mammaires et du cancer du sein demeurent inconnus. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets d'une exposition périnatale à un mélange de BFRs sur le développement mammaire et sur des marqueurs du cancer du sein, et de déterminer les mécanismes toxicologiques des BFRs. Des ratte ont été exposées oralement à une mixture de BFRs deux semaines avant l'accouplement, durant la grossesse et durant la lactation. Les filles de ces femelles ont été sacrifiées 21, 46 et 208 jours après la naissance. Les traitements n'ont eu aucun effet significatif au niveau du poids des animaux ou celui des glandes mammaires, ni sur le développement ductal. Par contre, l'expression protéique du récepteur aux hormones thyroïdiennes α (TR α) est réduite au moment de la puberté (jour 46). Les autres récepteurs hormonaux majeurs n'ont pas été affectés au niveau protéique. La présence de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a été investiguée. L'expression protéique de E-cadhérine est inhibée par une exposition au mélange de BFRs au jour 46 tandis que celle des autres marqueurs de la TEM n'a pas été altérée. Les protéines des jonctions communicantes ne sont pas affectées par cette exposition. Nos résultats suggèrent qu'une exposition périnatale à un mélange de BFRs peut affecter le système endocrinien et l'adhésion cellulaire au moment de la puberté.

Glande mammaire, retardateurs de flammes bromés, exposition périnatale, E-cadhérine, TR α , cancer du sein

ABSTRACT

Brominated flame retardants (BFRs) are chemicals widely used in consumer products to reduce ignition rates. Even though usage of BFRs has been restricted in many countries, human exposure persists as BFRs are still released from existing items. Many BFRs are known endocrine disruptors but their role in breast developmental anomalies and cancer remains poorly understood. This project aims to assess the effects of perinatal exposure to a BFRs mixture on mammary gland development and breast cancer markers; and determine mechanisms involved in BFRs toxicology. Female rats were exposed through diet to an environmentally relevant mixture of BFRs two weeks prior to mating, during gestation and during lactation. Female offspring were sampled at post-natal day 21, 46 and 208. BFRs treatment had no significant effect on total body weight or mammary gland weight nor did it affect ductal growth. However, the thyroid hormone receptor alpha ($TR\alpha$) was significantly down-regulated at the time of puberty (post-natal day 46). The protein expression of the other major hormonal receptors was unaffected. The expression of various epithelial to mesenchymal transition (EMT) markers was assessed. The expression of E-cadherin was significantly down-regulated at post-natal day 46. The remaining EMT markers were not significantly impacted by BFRs treatment. The gap junction proteins were not affected by this exposure. Our results suggest that a perinatal exposure to a mixture of BFRs affects the endocrine system as well as cellular adhesion, at the time of puberty.

Mammary gland, Brominated Flame Retardants, Perinatal exposure, E-cadherin, $TR\alpha$, Breast cancer

Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	VIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 :	3
REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Le cancer	3
1.2 La glande mammaire	5
1.2.1 Anatomie et histologie.....	5
1.2.2 Le développement de la glande mammaire	7
1.3 Cancer du sein	14
1.3.1 Statistiques sur le cancer du sein	14
1.3.2 Les stades du cancer du sein	16
1.3.3 Les grades du cancer du sein.....	16
1.3.4 Les sous-types de cancer du sein.....	17
1.3.5 Les récepteurs hormonaux et le cancer du sein.....	18
1.4 Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes.....	20
1.5 Les jonctions intercellulaires.....	22
1.5.1 Les jonctions serrés.....	23
1.5.2 Les jonctions adhérentes	24
1.5.3 Les jonctions lacunaires (communicantes).....	26
1.6 La transition épithelio-mésenchymateuse.....	29
1.7 Les retardateurs de flammes bromés (BFRs).....	32
1.7.1 Structure et utilisation	32
1.7.2 Les propriétés de perturbateurs endocriniens des BFRs	36
1.7.3 Autres effets néfastes connus.....	38
1.8 Problématique	41
1.9 Hypothèse	42
1.10 Objectifs	42
CHAPITRE 2 :	43
PERINATAL EXPOSURE TO BROMINATED FLAME RETARDANTS SUPPRESSES E-CADHERIN AND THYROID HORMONE RECEPTOR α EXPRESSION IN MAMMARY GLANDS AT PUBERTY.....	43
Auteurs	43
Contribution des auteurs.....	43
Résumé de l'article	44
Article.....	45
Introduction	47
Materials and methods.....	48
Results	51

Discussion	53
Conclusion	58
Acknowledgements.....	58
References	59
<u>Figure legends</u>	64
<u>Figures</u>	65
CHAPITRE 3 :	73
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	73
Modèle expérimental.....	74
Résultats.....	76
Perspectives.....	76
Évaluation du risque	78
Conclusion	79
RÉFÉRENCES.....	80
ANNEXE I.....	97

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1. Revue de littérature

Tableau 1 Les caractéristiques des cellules cancéreuses

Annexe I.

Tableau 2 Composition chimique du mélange de BFRs

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1. Revue de littérature

- Figure 1 Les étapes du développement du cancer
- Figure 2 Schéma représentant l'anatomie du sein
- Figure 3 Représentation schématique d'un canal galactophore
- Figure 4 Contrôle hormonal de la glande mammaire
- Figure 5 Représentation schématique des jonctions intercellulaires dans l'épithélium mammaire
- Figure 6 Représentation schématique de la localisation des diverses connexines dans l'épithélium mammaire
- Figure 7 Représentation schématique de la transition épithélio mésenchymateuse
- Figure 8 Représentation schématique de la contribution de la TEM à la progression du cancer
- Figure 9 Structure des molécules majeures de la famille des BFRs

Chapitre 2 Perinatal Exposure to Brominated Flame Retardants Suppresses E-cadherin and Thyroid Hormone Receptor α in Mammary Glands at Puberty

- Figure 1 A perinatal exposure to a BFRs mixture did not affect body and mammary gland weights
- Figure 2 Mammary gland morphogenesis is not affected by a perinatal exposure to BFRs
- Figure 3 Perinatal exposure to BFRs mixture did not alter mammary gland structure
- Figure 4 E-cadherin protein expression is only affected during puberty
- Figure 5 N-cadherin and Vimentin are not affected by a BFRs treatment at PND46
- Figure 6 BFRs treatment has no impact on gap junctions
- Figure 7 STAT1 is unaffected by treatment with the BFRs mixture at PND46
- Figure 8 Thyroid hormone receptor alpha (TR α) is down-regulated by BFRs treatment whereas estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors are not

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ABS	Acrylonitrile butadiène
ADN	Acide désoxyribonucléique
AR	Récepteur aux androgènes
BFRs	Retardateurs de flammes bromés (Brominated flame retardants)
BPA	Bisphénol A
CDH1	Gène codant pour E-cadhérine
Cxs	Connexines
DES	Diethylstilboestrol
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ER	Récepteur à l'œstrogène
ER α	Récepteur α à l'œstrogène
ER β	Récepteur β à l'œstrogène
ERE	Élément de réponse à l'œstrogène (Estrogen Response Element)
FOXC2	Facteur de transcription (Forkhead box protein C 2)
GH	Hormone de croissance (Growth hormone)
GJIC	Communication intercellulaire par les jonctions gap
GSC	Facteur de transcription (Goosecoid)
HBCD	Hexabromocyclododécane
HER2	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
hPL	Somatomammotrophine chorionique humaine (Human placental lactogen)
hPNCs	Cellules neuronales progénitrices humaine
IGF-1	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (Insulin-like growth factor 1)
Igf2b	Protéine de liaison du facteur de croissance ressemblant à l'insuline
MaSC	Cellules souches mammaires
Micro-ARN	Micro acide ribonucléique
P53	Suppresseur de tumeur P53
PBB	Polybromobiphényles
PBDE	Éthers diphényles polybromés
POP	Polluants organiques persistants
PR	Récepteur à la progestérone
PR-A	Récepteur A à la progestérone
PR-B	Récepteur B à la progestérone

PRE	Élément de réponse à la progestérone (Progesterone Response Element)
Prl	Prolactine
RXR	Récepteur X rétinoïde
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TBBPA	Tétabromobisphénol A
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TR	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TR α	Récepteur α aux hormones thyroïdiennes
TR β	Récepteur β aux hormones thyroïdiennes
TSH	Thyréostimuline
TTR	Transthyrétine
UNEP	Programme environnemental des nations unies
WHI	Women's Health Initiative
WT	Phénotype sauvage (Wild type)
ZEB1	Facteur de transcription (Zinc finger E-box-binding homeobox 1)
ZO	Zona Occludens

INTRODUCTION

Le sein est composé de tissu épithélial glandulaire entouré de tissu stromal. La glande mammaire est un organe ramifié qui contient plusieurs lobes subdivisé en lobules, qui eux contiennent une dizaine d'acini (Moffat *et al.*, 1996, Venta *et al.*, 1994). L'épithélium mammaire est un épithélium à deux couches; autour du lumen on retrouve les cellules luminales qui sont entourées de la couche basale. La couche basale contient principalement des cellules myoépithéliales reposant sur une membrane basale (Hassiotou *et al.*, 2013). La fonction principale de la glande mammaire est la production, le transport et la sécrétion du lait afin d'alimenter le nouveau-né et de lui conférer une protection immunitaire (Medina, 1996). La production du lait a lieu au niveau des acini, les unités sécrétrices, puis le transport est effectué le long des canaux, jusqu'au mamelon où le lait est excrété (Hassiotou *et al.*, 2013). Durant la grossesse, certaines cellules luminales au niveau des acini se différencient en cellules sécrétrices en préparation à l'allaitement (Lavialle *et al.*, 2000). De plus, les cellules myoépithéliales se contractent, tel un muscle lisse, pour faire circuler le lait en réponse à une hormone, l'ocytocine (Briskin *et al.*, 2010).

Contrairement aux autres organes, le développement de la glande mammaire est majoritairement post-natal. Il y a une croissance importante lors de la puberté, la grossesse et l'allaitement en réponse aux diverses hormones, telles que l'œstrogène, la progestérone et la prolactine (Sternlicht *et al.*, 2006). Puisque le développement mammaire est hautement régulé par les hormones, cet organe est particulièrement vulnérable aux effets des perturbateurs endocriniens.

Un perturbateur endocrinien est un composé exogène qui mime, inhibe ou modifie l'activité d'hormones endogènes (Fenton *et al.*, 2012). Une exposition à de tels composés lors de périodes vulnérables peut avoir des conséquences à long terme comme des anomalies développementales ou encore le développement de divers cancers (Fenton *et al.*, 2012). Parmi la liste de perturbateurs endocriniens auxquels nous sommes exposés de façon chronique, on retrouve des retardateurs de flammes bromés (BFRs). Les BFRs sont des molécules communément ajoutées à toutes sortes de produits domestiques ou industriels afin de ralentir leur combustion. Il y a 4 familles majeures de BFRs : les éthers diphényles polybromés (PBDE), les polybromobiphényles (PBB), le tétrabromobisphénol A (TBBPA) et l'hexabromocyclododécane (HBCD) (Y. R. Kim *et al.*, 2014). Plusieurs études ont démontré que certains de ces composés peuvent interférer avec diverses voies de

signalisation hormonale (Blake *et al.*, 2011, Chevrier *et al.*, 2011, Gosavi *et al.*, 2013, Hamers *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2013, Lefevre *et al.*, 2016, Meerts *et al.*, 2001, Meerts *et al.*, 2000, Stoker *et al.*, 2005)

Les perturbateurs endocriniens peuvent potentiellement agir au niveau de plusieurs récepteurs hormonaux présents dans la glande mammaire. Parmi les récepteurs principaux, impliqués à la fois dans le développement de la glande mammaire et en cas de cancer du sein, on retrouve les récepteurs à l'œstrogène (ER), les récepteurs à la progestérone (PR), le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique (HER2) ainsi que les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR).

En plus de la régulation hormonale, le développement mammaire est également régulé par la présence de jonctions intercellulaires. Il y a trois types majeurs de jonctions intercellulaires. Les jonctions serrées sont situées du côté apicale des cellules luminales et elles sont responsables de la polarité de ces cellules. Les jonctions adhérentes permettent la liaison des cellules adjacentes, le maintien de la forme cellulaire et contribuent également à la polarité des cellules. Finalement, les jonctions communicantes permettent la circulation de petites molécules directement entre le cytoplasme de deux cellules adjacentes. La dérégulation au niveau de l'expression ou de la localisation des protéines de ces jonctions est liée au développement de plusieurs types de cancer et survient lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (El-Saghir *et al.*, 2011).

Un processus survenant couramment en cas de cancer du sein est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Chez les cellules épithéliales mammaires, celui-ci implique le passage d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux. Cette transition permet aux cellules mammaires d'acquérir des capacités de migration et d'invasion supérieures (Lange *et al.*, 2008). La TEM va aussi affecter la polarité des cellules ainsi que leur adhésion à la membrane basale. Tous ces changements vont augmenter la motilité des cellules cancéreuses et favoriser le développement de métastases (Obr *et al.*, 2012).

Certains BFRs sont des perturbateurs endocriniens connus et plusieurs effets néfastes ont déjà été rapportés suite à leur exposition. Par contre, leurs effets au niveau du développement mammaire et au niveau des marqueurs du cancer du sein demeurent inconnus. Puisqu'ils sont omniprésents dans notre environnement, il est primordial d'évaluer les risques encourus par l'exposition à ces produits, tant pour le développement des glandes mammaires que pour le cancer du sein.

CHAPITRE 1 :

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le cancer

Le cancer est une pathologie caractérisée par une croissance anormale et non-contrôlée des cellules. Il se développe normalement en 3 étapes majeures : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 1.1). Plusieurs années vont habituellement s'écouler entre l'exposition à un agent ou un événement cancérigène et l'apparition d'un cancer. En effet, plusieurs mutations génétiques sont généralement requises pour le développement des tumeurs.

La première étape du développement du cancer est l'initiation où l'on observe des modifications génétiques irréversibles (Weston et al, 2003). Afin que la mutation persiste, elle doit avoir lieu chez une cellule qui prolifère et qui survit pour la durée de la vie de l'organisme. On qualifie d'évènement initiateur toute mutation causant l'activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène supresseur de tumeur (Weston et al, 2003). Un oncogène est tout simplement un gène dont l'expression favorise la cancérogénèse. Des mutations au niveau des gènes nommés proto-oncogènes entraînent une prolifération non-contrôlée des cellules. Les gènes supresseurs de tumeurs sont des gènes qui protègent normalement contre le cancer. En effet, ils ralentissent ou arrêtent complètement la croissance cellulaire et ils contrôlent la mort cellulaire. Lors d'une mutation au niveau de l'un de ces gènes, la croissance, la division et la mort cellulaire s'en trouvent alors perturbées. Un exemple de gène supresseur de tumeur que l'on retrouve muté chez plusieurs cancers est le gène p53, un gène généralement impliqué dans l'apoptose (Hanahan *et al.*, 2000). Les gènes ayant comme fonction la réparation de l'ADN sont aussi considérés comme des gènes supresseurs de tumeurs puisqu'ils préviennent l'apparition de mutations.

La seconde étape du développement du cancer est la promotion. Lors de la promotion, il y a une expansion clonale sélective des cellules initiées. Cette accumulation de cellules initiées produit une plus grande population de cellules susceptibles de devenir cancéreuses. Cette étape est généralement réversible et de longue durée (Figure 1.1).

La dernière étape du développement est la progression et implique une transformation d'un phénotype prénéoplasique à un phénotype néoplasique (Figure 1.1). Cette étape requière l'acquisition de mutations supplémentaires et mène à la croissance d'une tumeur avec des capacités, entre autres, invasives et métastatiques (Tableau 1.1) (Kang *et al.*, 2011). Cette transformation, couplée avec la capacité d'invasion et de diffusion métastatique, permet la formation éventuelle de tumeurs secondaires chez l'organisme (Hanahan *et al.*, 2000).

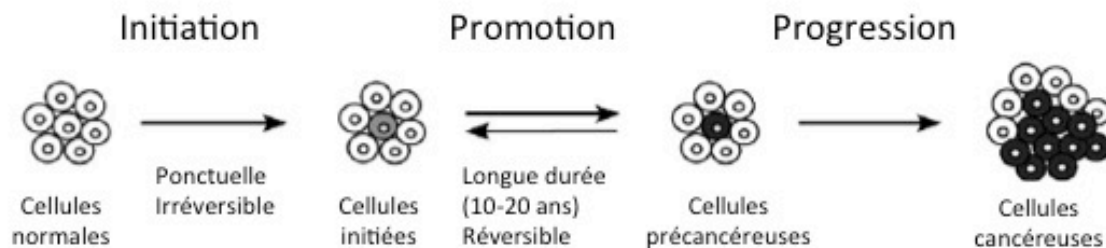


Figure 1.1 : Les étapes du développement du cancer. Des cellules normales subissent des modifications génétiques lors de l'initiation, une étape irréversible du développement du cancer. La seconde étape, la promotion, implique l'expansion clonale sélective des cellules initiées. Cette étape est l'étape la plus longue et elle est dite réversible. La dernière étape, la progression, implique l'acquisition d'un phénotype néoplasique. Modifiée de (Kang *et al.*, 2011)

Tableau 1.1 Les caractéristiques des cellules cancéreuses. Les six caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, tel que mentionnées par (Hanahan *et al.*, 2000)

Caractéristique	Explication
1. Indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs	Les cellules ne dépendent plus de la perception de signaux externes pour leur prolifération. Elles sont auto-suffisantes.
2. Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	Les cellules cancéreuses échappent aux tentatives de contrôle prolifératif du milieu.
3. Résistance à l'apoptose	Les cellules ne répondent plus aux signaux pro-apoptotiques.
4. Capacité d'angiogénèse	Les cellules cancéreuses favorisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'alimenter la tumeur.
5. Potentiel de division illimité	Sans interventions, les cellules cancéreuses peuvent se diviser à l'infini.
6. Capacité d'invasion des tissus et de diffusion métastatique	Les cellules cancéreuses arrivent à envahir les tissus avoisinants. Elles peuvent aussi pénétrer dans la circulation systémique et/ou lymphatique afin de se propager vers des organes secondaires.

1.2 La glande mammaire

1.2.1 Anatomie et histologie

Les seins sont composés de tissus glandulaires et adipeux qui sont soutenus par un réseau de tissu conjonctif fibreux, aussi connu sous le nom de ligaments de Cooper. Ces ligaments tirent leur nom d'un des pionniers de l'anatomie mammaire (Cooper, 1840, Hassiotou *et al.*, 2013). Chez l'homme comme chez la femme, on retrouve les seins par-dessus les muscles pectoraux (Figure 1.2). Le tissu glandulaire, plus communément appelé glande mammaire, est composé de lobes qui se sous-divisent en lobules qui eux contiennent une dizaine d'acini (Figure 1.2)(Moffat *et al.*, 1996, Venta *et al.*, 1994).

Le rôle principal de la glande mammaire est la synthèse, le stockage et la sécrétion du lait afin d'alimenter le nouveau-né, d'assurer son développement et de le protéger de corps étrangers (Medina, 1996). Lors de l'allaitement, le lait est produit par les cellules sécrétrices retrouvées dans les lobules, puis il est stocké et transporté par un système de canaux jusqu'aux mamelons pour la sécrétion (Hassiotou *et al.*, 2013). En fait, plusieurs petits canaux galactophores émergent des acini pour former un canal principal qui se dilate pour former des sinus lactifères. Il rétrécit ensuite avant de passer par le mamelon et atteindre la surface externe de celui-ci (Figure 1.2) (Hassiotou *et al.*, 2013). Le mamelon est composé de fibres musculaires lisses orientées de façon spécifique afin qu'il fonctionne comme sphincter. À la surface du sein, le mamelon est entouré par l'aréole, une surface ronde rosée ou brunâtre qui contient des glandes sudoripares participant à l'allaitement (Zucca-Matthes *et al.*, 2016).

Le système lymphatique joue un rôle important dans la prévention d'infections. Le sein contient de nombreux vaisseaux lymphatiques qui transportent la lymphe jusqu'à des petites masses, nommées ganglions lymphatiques, qui entourent la région mammaire (Estourgie *et al.*, 2004) La lymphe est un liquide contenant des éléments nutritifs, des lymphocytes et des anticorps. Le drainage des glandes mammaires par le système lymphatique a été fortement caractérisé dû à son lien avec la propagation du cancer du sein (Estourgie *et al.*, 2004)

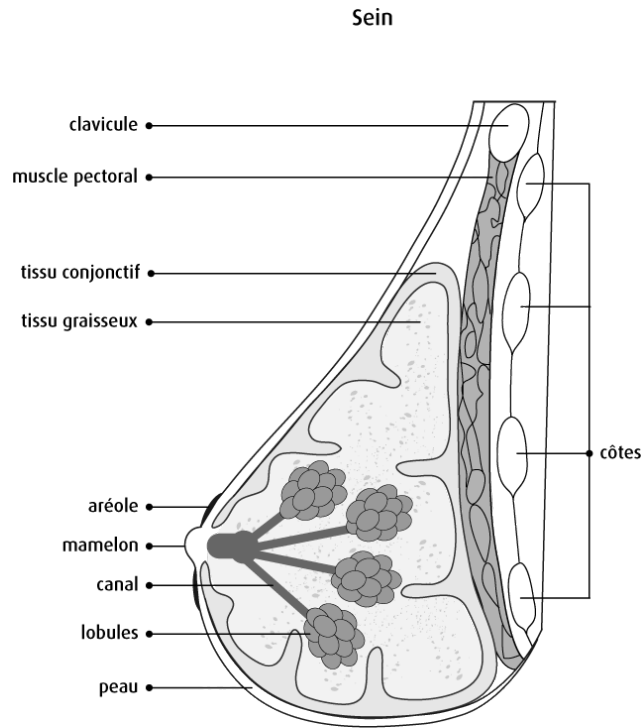


Figure 1.2. Schéma représentant l'anatomie du sein. Vue latérale démontrant la localisation et la composition de la glande mammaire humaine. Tiré de (Société canadienne du cancer, 2016)

Au niveau histologique, le sein est principalement formé de tissu épithélial dans les canaux et de tissu fibreux dans le stroma. Il contient également une quantité importante d'adipocytes (Hassiotou *et al.*, 2013). Le tissu épithélial est subdivisé en deux couches : les cellules luminales, qui englobent le lumen, et la couche basale, majoritairement composée de cellules myoépithéliales, qui entoure les cellules luminales (Figure 1.3)(Hassiotou *et al.*, 2013). La couche luminale contient des cellules épithéliales cuboïdes polarisées et certaines d'entre elles vont se différencier en cellules sécrétrices de lait, les lactocytes, au moment de la lactation (Lavialle *et al.*, 2000). Les cellules myoépithéliales ont des propriétés contractiles comme les muscles lisses, ce qui leur permet de faire circuler le lait lors de l'allaitement (Briskin *et al.*, 2010). Elles vont se contracter en réponse à l'ocytocine, une hormone sécrétée lors de l'allaitement pour stimuler l'éjection du lait des lobules jusqu'au mamelon en passant par les canaux galactophores (Hassiotou *et al.*, 2013). La couche basale, composée majoritairement de ces cellules myoépithéliales, repose sur une membrane basale (Figure 1.3). Cette couche contient également des cellules souches mammaires (MaSC) bi-potentes, c'est à dire capable de se différencier à la fois en cellules myoépithéliales et en cellules luminales (Visvader, 2009).

Le stroma de la glande mammaire humaine contient beaucoup de tissu conjonctif dense. Le stroma inter-lobulaire contient une quantité importante de tissus adipeux tandis que le stroma intra-lobulaire, qui entoure les lobules, contient des cellules mésenchymateuses qui sont très sensibles aux signaux hormonaux ainsi qu'aux changements dans leur microenvironnement. Ces cellules mésenchymateuses sont associées à l'initiation et à la progression des différentes étapes du développement mammaire grâce à leur interaction avec les cellules épithéliales (Bissell *et al.*, 1999).

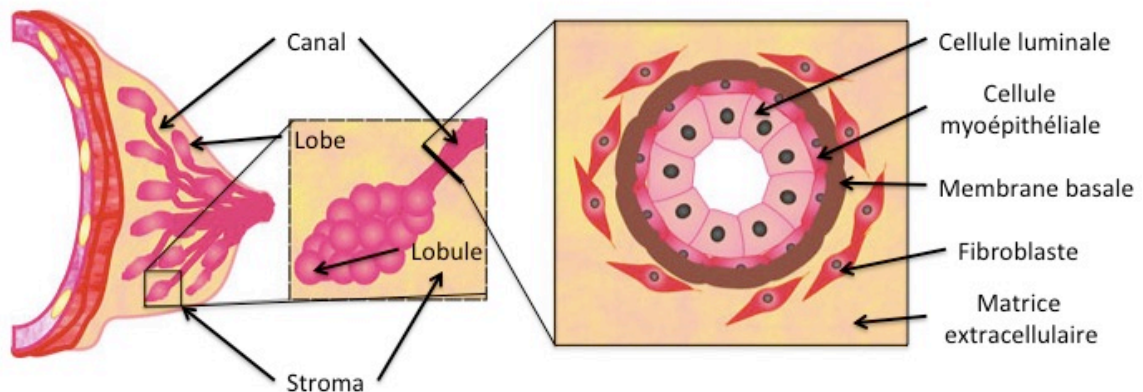


Figure 1.3. Représentation schématique d'un canal galactophore. (À gauche) Vue latérale d'une glande mammaire humaine. (Au centre) Agrandissement montrant un canal galactophore et ses lobules. (À droite) Agrandissement d'une coupe transversale d'un canal galactophore. L'épithélium mammaire est un épithélium à deux couches. Autour du lumen on retrouve les cellules lumineuses. Autour des cellules lumineuses on retrouve la couche basale, contenant les cellules myoépithéliales et reposant sur une membrane basale. À l'extérieur de la membrane basale on retrouve le stroma, contenant la matrice extracellulaire ainsi que des cellules mésenchymateuses, les fibroblastes. Modifiée de (Cyr, 2016)

1.2.2 Le développement de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire se déroule en plusieurs phases et il est majoritairement post-natal, contrairement à la plupart des organes qui se développent *in utero*. Les phases principales du développement sont la croissance fœtale, la croissance pré-puberté, l'expansion lors de la puberté, le remodelage lors de la grossesse et de l'allaitement, et l'involution post-allaitement ou post-ménopause (Geddes, 2007, J. Russo *et al.*, 2004). Un remodelage plus modeste se fait aussi lors de chaque cycle menstruel. Cependant, puisque ce remodelage ne régresse pas complètement à la fin du cycle, il y a une accumulation et un développement continué tout au long de l'adolescence et de la vie adulte (Geddes, 2007).

Le développement de la glande mammaire peut aussi être subdivisé en deux phases majeures selon l'implication des hormones, soit la phase hormone-indépendante et la phase hormone-dépendante. Les hormones principales impliquées dans le développement de la glande mammaire sont l'oestrogène, la progestérone et la prolactine (Figure 1.4.)(Hassiotou *et al.*, 2013).

Des études chez des souris knockout pour les divers récepteurs hormonaux ou encore chez des souris ovariectomisées et/ou hypophysectomisées ont permis de dresser un portrait plus complet du rôle de chaque hormone dans le développement de la glande mammaire (Antal *et al.*, 2008, Briskin *et al.*, 1999, Gallego *et al.*, 2001, Mallepell *et al.*, 2006, Mulac-Jericevic *et al.*, 2003) et ont déterminé que l'hormone de croissance (GH) ainsi que des facteurs de croissance ressemblant à l'insuline, tels que le facteur de croissance 1, (« Insulin-like growth factor 1 », ou IGF-1) jouent aussi un rôle primordial (Bonnette *et al.*, 2001, Kleinberg *et al.*, 2000).

Phase hormone-independante :

Pré-natal et péri-natal :

Le développement fœtal des glandes mammaires est initié dès la sixième semaine de la grossesse. Malgré la présence d'hormones maternelles et placentaires dans l'environnement du fœtus, on dit que cette phase est hormone-indépendante (Briskin *et al.*, 2010). À la naissance, on ne retrouve qu'une glande mammaire précoce avec de simples tubules ou quelques petits canaux (Hinck *et al.*, 2005).

Pré-puberté :

Avant la puberté, les glandes mammaires subissent une croissance dite isométrique puisqu'elles croissent minimalement et à la même vitesse que le reste du corps (Briskin *et al.*, 2010). Ce n'est qu'à l'atteinte de la puberté, vers l'âge de 8-12 ans, que l'on observe une croissance allométrique de l'épithélium mammaire ainsi que du stroma (J. Russo *et al.*, 2004).

En dépit de la présence de récepteurs hormonaux, des études réalisées avec des souris génétiquement modifiées ont démontré que le développement des glandes mammaires avant la puberté n'est pas affecté par l'absence de ces récepteurs et est donc

bel et bien hormone-indépendant (Briskin *et al.*, 1999, Briskin *et al.*, 2010, Gallego *et al.*, 2001, Mallepell *et al.*, 2006, Mulac-Jericevic *et al.*, 2003).

Phase hormone-dépendante :

Puberté :

La glande mammaire sort de sa phase quiescente au début de la puberté, une phase accompagnée d'un afflux d'oestrogène provenant des ovaires (Figure 1.4)(Sternlicht *et al.*, 2006). Suite à la première ovulation et à l'implantation des cycles menstruels réguliers, on observe une croissance rapide des seins (Hassiotou *et al.*, 2013). Cette croissance peut être majoritairement attribuée à l'accumulation de tissu adipeux au sein de la glande, mais on observe aussi un développement épithélial et stromal (J. Russo *et al.*, 1987). On observe une élongation des canaux existants ainsi que la formation de branches secondaires au bout desquelles apparaissent des bourgeons épithéliaux qui forment des amas qui donneront naissance aux lobules (J. Russo *et al.*, 2004). Avec l'aide de facteurs de croissance locaux, tels qu'Igf1, l'oestrogène va permettre l'élongation des canaux galactophores ainsi que leur embranchement dichotomique (Soyal *et al.*, 2002). De plus, c'est la GH, relâchée au niveau de la glande pituitaire avant même l'afflux systémique d'oestrogène, qui est responsable de l'expression stromal d'Igf1. De cette façon, la GH permet la formation de bourgeons terminaux, l'élongation et l'embranchement dichotomique de l'épithélium mammaire (Sternlicht *et al.*, 2006). Tout au long de la puberté, l'oestrogène est l'instigateur principal de la prolifération et incite la mitose des cellules distales des bourgeons terminaux grâce à sa signalisation à l'aide du ER α (Figure 1.4)(Mallepell *et al.*, 2006).

L'oestrogène et ses récepteurs

Il existe deux isoformes du récepteur à l'oestrogène : ER α et ER β . Le rôle physiologique d'ER β dans l'épithélium mammaire ou dans le stroma mammaire demeure peu connu (Briskin *et al.*, 2010). ER β est important au niveau du système reproducteur mâle et femelle, alors qu'il ne semble pas être requis pour le développement ou le fonctionnement normal d'autres systèmes majeurs (Antal *et al.*, 2008). Par contre, ER α est essentiel au développement de la glande mammaire, en particulier au moment de la puberté lorsqu'une poussée d'oestrogène est sécrétée au niveau des ovaires. Chez des souris ovariectomisées, le développement des canaux est inhibé, alors que l'addition d'oestrogènes exogènes est associée à un développement mammaire normal (Daniel *et al.*,

1987). Le récepteur ER α est retrouvé à la fois dans l'épithélium mammaire et dans le stroma, mais sa présence est uniquement requise dans l'épithélium afin d'assurer le développement normal de la glande mammaire (Mallepell *et al.*, 2006).

Le gène codant pour ER α produit une protéine d'une masse de 66 kDa (Briskin *et al.*, 2010). ER α est un membre de la famille des récepteurs nucléaires. La liaison de l'oestradiol au récepteur entraîne un changement de conformation qui permet l'association de co-régulateurs. Le complexe ligand-récepteur-corégulateurs va ensuite se lier à un élément de réponse (Estrogen Response Element (ERE)) sur le promoteur de gènes spécifiques (Ali *et al.*, 2000).

Suite à l'augmentation du taux systémique d'œstrogène, il y a augmentation du nombre de récepteurs à la progestérone (PR)(Figure 1.4)(Haslam *et al.*, 1979). Au niveau des seins, la progestérone agit principalement lors de la grossesse afin de préparer la glande mammaire pour l'allaitement. Des études réalisées avec des souris n'exprimant pas PR ont démontré que l'absence de ce récepteur ne semblait pas avoir d'effet sur l'élongation de l'épithélium associé avec la puberté, mais inhibait plutôt le développement lors de la grossesse (Lydon *et al.*, 1995). En fait, la progestérone est surtout impliquée dans la croissance tertiaire, c'est-à-dire la prolifération et la différenciation des cellules qui vont donner naissance aux acini.

La progestérone et ses récepteurs

La progestérone est une hormone stéroïdienne cyclique produite au niveau de l'ovaire. Sa production est maximale lors de la phase lutéale du cycle menstruel et elle joue un rôle important au niveau de l'endomètre (Obr *et al.*, 2012). La progestérone est également maintenue à des niveaux élevés tout au long de la grossesse pour ensuite chuter significativement suite à l'accouchement et à l'expulsion du placenta (Graham *et al.*, 1997).

La signalisation induite par la progestérone est impliquée dans le développement normal de la glande mammaire, mais également dans le développement et la progression du cancer du sein (Kariagina *et al.*, 2007). La progestérone contrôle la prolifération de l'épithélium mammaire aux différents stades du développement, mais elle a aussi un rôle important en fin de grossesse en inhibant la sécrétion du lait jusqu'à l'accouchement (Graham *et al.*, 1997). La progestérone empêche également la fermeture des jonctions serrées qui est requise lors de la sécrétion du lait (Nguyen *et al.*, 2001).

Chez l'humain, comme chez les rongeurs, un seul gène code pour les deux isoformes du récepteur de la progestérone, soit PR-A et PR-B (Kastner *et al.*, 1990). Les effets de la progestérone sont médiés par ces récepteurs qui sont classifiés comme des facteurs de transcription ligand-dépendants. Ils font également partie de la grande famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes avec les ER, et les récepteurs aux androgènes (AR), aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes. Ces récepteurs stimulent ou inhibent la transcription de divers gènes en se liant soit directement ou indirectement à des sites spécifiques sur l'ADN de la cellule (Obr *et al.*, 2012). En absence du ligand, PR est couplé avec des molécules chaperonnes, telles les protéines de choc thermique. La liaison du ligand entraîne des changements de conformation, la dimérisation des récepteurs ainsi que leur dissociation des protéines chaperonnes (Lange *et al.*, 2008). Une fois activé, le récepteur est transporté et retenu au niveau du noyau où il s'associe à des co-régulateurs afin de stimuler ou inhiber la transcription de gènes cibles en se liant à l'élément de réponse (Progesterone Response Element (PRE)) présent dans la région du promoteur (Lange *et al.*, 2008).

PR-B contient 164 acides aminés additionnels du côté N-terminal, ce qui lui confère une fonction de transactivation supplémentaire et lui permet de se lier à un ensemble de co-régulateurs différents de ceux se liant à PR-A (Sartorius *et al.*, 1994). En fait, des études *in vitro* ont montré que PR-B agit souvent comme un trans-activateur alors que PR-A agit plutôt comme un trans-inhibiteur et peut même inhiber d'autres récepteurs aux hormones stéroïdiennes, tels que PR-B ou ER α (Vegeto *et al.*, 1993).

Des études réalisées avec des modèles murins « knockout » pour les deux récepteurs PR ont démontré que seul PR-B est requis pour le développement de la glande mammaire (Mulac-Jericevic *et al.*, 2003). Par contre, PR-A est essentielle pour le développement utérin et la fonction reproductive (Mulac-Jericevic *et al.*, 2000). Des études d'ablations spécifiques ont permis de déterminer que PR-B doit nécessairement être présent chez les cellules épithéliales, et non dans le stroma, afin d'assumer sa fonction dans le développement mammaire (Briskin *et al.*, 1998, Mulac-Jericevic *et al.*, 2003). Même si l'épithélium se développe normalement en absence de PR lors de la puberté (Lydon *et al.*, 1995), la progestérone semble jouer un rôle lors de la prolifération de l'épithélium mammaire en réponse aux cycles menstruels, et ce, tout au long de l'âge de procréation (Graham *et al.*, 1997). Cet effet est corroboré par des études démontrant l'augmentation de la synthèse d'ADN ainsi que de la mitose au niveau de l'épithélium

mammaire lors de la phase lutéale, associée à des taux supérieurs de progestérone dans la circulation sanguine (Anderson *et al.*, 1982, Masters *et al.*, 1977, Potten *et al.*, 1988).

L'effet prolifératif de l'œstrogène et de la progestérone passe par un mécanisme de signalisation paracrine (Mallepell *et al.*, 2006) (Briskin *et al.*, 1998). C'est-à-dire que les cellules n'exprimant pas ER et/ou PR prolifèrent en réponse à ces hormones tandis que les cellules exprimant ER et/ou PR demeurent quiescentes. En effet, les cellules épithéliales luminales de la glande mammaire qui expriment ER et/ou PR reçoivent des signaux hormonaux systémiques et les transforment en stimuli locaux pour les cellules avoisinantes dépourvues de ces récepteurs (Briskin *et al.*, 2010). À peu près un tiers des cellules épithéliales luminales exprime ER α et PR, et leur expression se chevauche couramment (Clarke *et al.*, 1997). Ce mode d'action paracrine permet la coordination et l'amplification des signaux hormonaux et suggère l'importance du rôle de la communication intercellulaire pour le développement épithélial normal (Bissell *et al.*, 1999, Briskin *et al.*, 1998, Hinck *et al.*, 2005)

Grossesse :

Le développement de l'épithélium mammaire lors de la grossesse peut être divisé en deux phases principales : la phase proliférative et la phase de différenciation. La phase proliférative, qui a lieu au début de la grossesse, implique l'élongation et l'embranchement tertiaire des canaux ainsi que le développement lobulo-alvéolaire (Geddes, 2007). À cette étape, les cellules épithéliales composant les acini sont beaucoup plus nombreuses et volumineuses (J. Russo *et al.*, 2004).

Lors de la phase proliférative, l'action de la progestérone est requise (Figure 1.4)(Briskin *et al.*, 1998, Lydon *et al.*, 1995). Chez des souris PR-/- on observe une réduction du développement des canaux et l'absence d'acini, même après avoir traité les souris avec des niveaux d'œstrogène et de progestérone mimant les taux présents lors de la grossesse (Lydon *et al.*, 1995). Grâce à la transplantation d'un épithélium PR-/- chez une souris WT, il a été confirmé que PR joue un rôle important dans le développement de l'épithélium mammaire (Briskin *et al.*, 1998). Cette étude a permis de démontrer que la signalisation avec PR est nécessaire à l'embranchement tertiaire et au développement lobulo-alvéolaire associés à la phase proliférative de la grossesse (Briskin *et al.*, 1998). La prolactine (Prl) est aussi impliquée indirectement lors de la phase proliférative (Figure 1.4).

Elle agit sur le corps jaune afin de maintenir les niveaux systémiques de la progestérone qui assurent la formation d'acini (Briskin, 2002).

La seconde phase, qui se déroule durant le deuxième trimestre de la grossesse, se nomme « lactogénèse I » et implique la différenciation des cellules luminales des acini en lactocytes, des cellules capables de produire le lait (Pang *et al.*, 2007). Lors de cette phase, la poursuite du développement des acini dépend de l'action directe de la Prl sur l'épithélium mammaire (Briskin *et al.*, 1999). En fait, dès le deuxième trimestre de la grossesse, il y a une augmentation graduelle des niveaux de Prl dans la circulation systémique et celle-ci permet la différenciation de cellules épithéliales luminales en lactocytes (Figure 1.4)(Briskin *et al.*, 1999, Pang *et al.*, 2007). L'étape subséquente, la « lactogénèse II », a lieu à la toute fin de la grossesse et implique l'activation de la sécrétion du lait (Pang *et al.*, 2007).

Allaitement :

Suite à l'accouchement et surtout à l'expulsion placentaire, il y a une diminution du niveau de la somatomammotrophine chorionique humaine (hPL) et de la progestérone systémique, ce qui augmente le niveau de Prl systémique et engendre une production rapide de lait par les lactocytes (J. Russo *et al.*, 2004). L'hPL est une hormone produite par le placenta qui promouvoit la croissance du fœtus, mais qui prépare également la glande mammaire maternelle à l'allaitement (Buhimschi, 2004).

Un autre changement morphologique clé, après l'accouchement, est la réduction de la perméabilité de la membrane basale séparant le stroma de l'épithélium mammaire. Cette modification a comme but de contrôler les signaux stromaux et systémiques atteignant l'épithélium mammaire (Itoh *et al.*, 2003). Cette baisse de la perméabilité est principalement modulée par l'organisation des jonctions serrées au pôle apical des cellules luminales, ce qui empêche la circulation de messagers entre les cellules luminales (Pitelka *et al.*, 1973) (Stull *et al.*, 2007). La présence de cette ceinture de jonctions serrées permet également de contenir le lait dans le lumen de la glande mammaire lors de l'allaitement (Itoh *et al.*, 2003)

L'ocytocine est une autre hormone qui est impliquée à la fois lors de l'accouchement pour encourager les contractions utérines, mais aussi lors de la lactation afin de stimuler les cellules myoépithéliales pour qu'elles se contractent et éjectent le lait (Geddes, 2007).

Involution :

Finalement, il y a l'involution ou le retour à l'état de repos. Dans le cas de l'involution post-allaitement, c'est la cessation ou la réduction significative de l'expulsion du lait,

communément nommée sevrage, qui assure cette régression du sein à un état non-fonctionnel (Hurley, 1989). Deux mécanismes interviennent à cette étape : le remodelage modulé par les protéinases et la régression modulée par l'apoptose (Hughes *et al.*, 2012, Hurley, 1989, Soyak *et al.*, 2002). Les acini seront vidés de leur lait durant cette transition et l'état de repos sera conservé jusqu'à la prochaine grossesse (Hurley, 1989). Un type d'involution plus permanent existe. Il s'agit de l'involution post-ménopause. Lors de cette transformation, la quantité de tissu glandulaire va être réduite et celle de tissu adipeux va augmenter. On associe cette involution avec une détérioration fonctionnelle des ovaires (Hutson *et al.*, 1985).

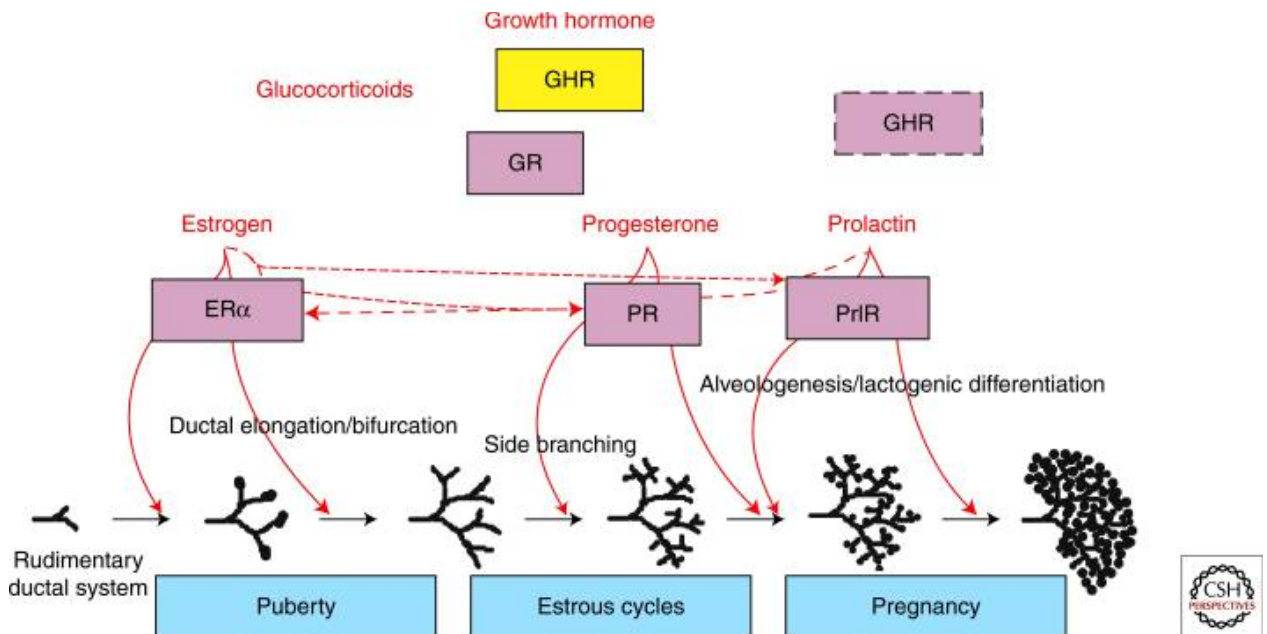


Figure 1.4. Contrôle hormonal de la glande mammaire. L'embranchement et la prolifération qui se déroulent lors de la puberté nécessitent l'hormone de croissance, l'œstrogène et le récepteur à l'œstrogène α (ER α). Ensuite, l'embranchement qui a lieu tout au long de la vie adulte et du début du développement des lobules nécessite la progestérone ainsi que son récepteur, PR-B. Puis, le reste du développement alvéolaire et la différenciation des cellules luminales en lactocytes requièrent l'action de l'hormone prolactine sur son récepteur (PrIR). Tiré de (Briskin *et al.*, 2010)

1.3 Cancer du sein

1.3.1 Statistiques sur le cancer du sein

Mondialement, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes

(Hassiotou *et al.*, 2013). Il s'agit de la deuxième cause de décès liée au cancer chez les Canadiennes après le cancer du poumon (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). Au Canada, on estime qu'une femme sur neuf développera un cancer du sein au cours de sa vie et qu'une femme sur 30 en mourra (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). Les données les plus récentes indiquent un taux de survie à 5 ans de 88 %, c'est-à-dire que 88 % des femmes vivront au moins 5 ans après avoir été diagnostiquées avec un cancer du sein (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015).

En 2015, on estimait que 5000 Canadiennes meurent du cancer du sein à chaque année. Malgré ceci, le nombre de décès causés par le cancer du sein a diminué dans les dernières décennies. Le pic de la mortalité due au cancer du sein a eu lieu en 1986 et depuis ce chiffre a diminué de 44 % (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). On peut attribuer cette diminution du taux de mortalité, en partie, à des diagnostics plus précoces. Les progrès technologiques dans le domaine du dépistage, la sensibilisation de la population et des professionnels de la santé, la pratique régulière des mammographies et le développement de meilleurs traitements ont également contribué à cette réduction (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015).

Le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). D'autres facteurs de risque connus sont une puberté précoce et une ménopause tardive. Ce dernier facteur serait associé à une exposition plus longue aux hormones associées à chaque cycle menstruel, en particulier l'œstrogène (Jenkins *et al.*, 2012). Une hypothèse est que la prolifération des cellules épithéliales mammaires, en réponse aux poussées d'hormones stéroïdiennes ovariennes, permettrait l'acquisition progressive de mutations génétiques. Puis, ces cellules épithéliales initiées subiraient une phase d'expansion qui échapperait aux mécanismes de surveillance (Soyal *et al.*, 2002). Le contraire est aussi vrai : une puberté plus tardive et une ménopause plus jeune protégeraient contre le cancer du sein (Jenkins *et al.*, 2012). Il existe également un lien entre un risque accru de développer le cancer du sein et une grossesse tardive (Butt *et al.*, 2009). En fait, une grossesse à un jeune âge semble avoir un effet protecteur, tandis qu'une grossesse tardive augmenterait le risque de cancer du sein (Briskin, 2002). L'hypothèse est que, chez les femmes plus âgées, on retrouverait plus de cellules initiées dormantes. Puis, les hormones de la grossesse favoriseraient la progression de ces cellules initiées en cancer du sein (Butt *et al.*, 2009).

1.3.2 Les stades du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène. Lors du diagnostic, on classe les cancers selon leur stade, leur grade et leur sous-type moléculaire. Chaque combinaison est associée à différents pronostics et traitements, ce qui rend cette classification indispensable.

Le stade d'un cancer fait référence à la taille et à la distribution de celui-ci (F. Yao *et al.*, 2015). La distribution est déterminée par l'invasion ou non des tissus voisins, des nœuds lymphatiques et la présence ou non de tumeurs secondaires dans d'autres tissus. Dans le cas du cancer du sein, les tumeurs secondaires sont souvent retrouvées aux niveaux des poumons, du foie, des os ou même du cerveau (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). Dans le système de classification actuellement utilisé au Canada, on retrouve 4 stades pour le cancer du sein. Le stade 0 indique une tumeur précoce qui ne s'est pas propagée. Ce type de cancer est surnommé « *in situ* » puisqu'il est contenu « en place ». Les stades I à III indiquent que le cancer s'est propagé aux tissus avoisinants et possiblement aux nœuds lymphatiques. Le stade IV est aussi nommé cancer métastatique puisque le cancer s'est propagé aux autres organes du corps. La classification selon le stade va permettre d'optimiser le traitement du cancer. Par exemple, une chirurgie conservatrice du sein suivi de radiothérapie est un traitement efficace pour la majorité des patientes ayant un cancer du sein de stade précoce, tandis que des traitements plus systémiques sont généralement requis pour les patientes ayant un cancer du sein de stade avancé. Le traitement systémique implique une thérapie hormonale ou de la chimiothérapie en plus d'une chirurgie et de la radiothérapie (F. Yao *et al.*, 2015).

1.3.3 Les grades du cancer du sein

Le grade est une mesure de l'agressivité du cancer et est indépendant du stade. Cette mesure tient compte de la vitesse de croissance et de propagation probable de la tumeur (F. Yao *et al.*, 2015). Comme la progression du cancer du sein peut être très variée, même parmi des patientes avec un cancer du même stade, il est important de tenir compte du grade de la tumeur afin de déterminer le pronostic et le plan de traitement appropriés.

Par contre, ce mode de classification du cancer est moins bien établi que celui du stade et aucun système universel n'existe pour tous les types de cancer. Cependant, dans le cas du cancer du sein, on utilise le système de graduation basé sur le modèle développé en 1957 par Bloom et Richardson (F. Yao *et al.*, 2015). Le système de Bloom et Richardson

est basé sur trois facteurs histologiques, soit le niveau de différenciation structurelle, le degré de variabilité au niveau du noyau et la fréquence d'apparition de structures mitotiques ou hyperchromatiques (Bloom and Richardson, 1957). Le niveau de différenciation structurelle est évalué selon l'arrangement des tubules et des acini dans le tissu observé. Une structure bien définie où les cellules sont regroupées régulièrement autour d'un lumen indique un haut niveau de différenciation et un bon pronostic tandis qu'un tissu désordonné indique un cancer plus menaçant (Bloom and Richardson, 1957). Le degré de variabilité nucléaire est évalué selon la taille, la forme et la coloration des différents noyaux dans le tissu. L'uniformité est associée à une faible agressivité (Bloom and Richardson, 1957). Finalement, une haute fréquence de structures hyperchromatiques ou mitotiques indique un cancer menaçant (Bloom and Richardson, 1957). Lors de la classification selon le grade, on attribue des points pour chaque facteur selon le degré auquel il se manifeste, puis, en additionnant ces chiffres, on obtient le grade. Un chiffre de 3 à 5 correspond avec une faible aggresivité, un 6 ou 7 avec des niveaux intermédiaires et un 8 ou 9 avec une forte agressivité et un faible pronostic (Bloom and Richardson, 1957). Le grade est un outil indispensable qui nous indique la vitesse probable à laquelle des tumeurs secondaires vont se développer chez la patiente (Bloom and Richardson, 1957).

1.3.4 Les sous-types de cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène qui peut être classifiée selon le grade et le stade mais aussi selon l'expression génique des cellules composant la tumeur. Grâce à la technique de regroupement hiérarchique, qui implique la classification de tumeurs selon la ressemblance entre leur génome, 4 sous-types de tumeurs ont été identifiés (Perou *et al.*, 2000). Il s'agit des tumeurs de sous-types luminal A, luminal B, HER2 positif et basal-like. Les cancers de différents sous-types moléculaires peuvent être différenciés par leur expression des différents récepteurs hormonaux, par leurs différents pronostics ainsi que par leur réponse aux divers traitements (Hassiotou *et al.*, 2013). En pratique, le sous-type intrinsèque d'une tumeur mammaire est identifié grâce au profil d'expression génique de celle-ci ou grâce à des marqueurs immunohistochimiques (Kennecke *et al.*, 2010).

Luminal A :

Les tumeurs de sous-type luminal A expriment ER et PR. Elles sont plus souvent associées avec un grade moins élevé et un bon pronostic. En fait, parmi les 4 sous-types,

c'est ce type de tumeur qui croit le plus lentement et qui est associé au meilleur pronostic (Kennecke *et al.*, 2010)

Luminal B :

Les tumeurs de sous-type luminal B, tout comme luminal A, expriment ER, mais de façon moins prononcée. Elles expriment également PR. Elles sont associées avec des grades et taux de prolifération supérieurs au luminal A ainsi qu'à un pronostic moins favorable. Les tumeurs luminal B expriment parfois HER2 (Allison, 2012).

HER2 positif :

Les tumeurs HER-2 positives ont des copies supplémentaires du gène HER-2. Elles sur-expriment donc la protéine associée en trop grande quantité. Ces tumeurs ont tendance à croître rapidement, mais, heureusement, elles ont aussi tendance à bien répondre aux traitements pharmaceutiques ciblés. Les tumeurs de ce sous-type sont souvent associées à un grade plus élevé (Allison, 2012)

Basal-like :

Les tumeurs basal-like sont reconnues comme étant les plus agressives, avec un haut grade et un pronostic peu favorable (Kennecke *et al.*, 2010). La majorité des tumeurs basal-like exprime des gènes et des protéines normalement retrouvés dans la couche basale de la glande mammaire saine (Badve *et al.*, 2011). De plus, la majorité des tumeurs basal-like n'exprime ni ER, ni PR ou HER-2 (Badve *et al.*, 2011).

Selon leur expression des divers récepteurs hormonaux, certains sous-types de cancer ont une croissance dite hormono-dépendante. Donc un déséquilibre hormonal, entres autres par des molécules exogènes, peut non seulement altérer le développement normal des glandes mammaires, mais peut aussi être lié au cancer du sein.

1.3.5 Les récepteurs hormonaux et le cancer du sein

L'oestrogène et ses récepteurs

Le rôle des œstrogènes dans le développement et dans la progression du cancer du sein est bien connu. En fait, le récepteur ER α est lié à la progression du cancer du sein tandis que le récepteur ER β semble agir comme suppresseur de tumeur grâce à son action anti-proliférative (Curtis Hewitt *et al.*, 2000, Speirs *et al.*, 2004, Strom *et al.*, 2004). Lors d'une étude réalisée avec des cellules cancéreuses MCF-7, ER β inhibait la prolifération, *in vitro*, et empêchait la formation de tumeurs après xénogreffes chez un modèle murin et

stimulation à l'oestradiol (Paruthiyil *et al.*, 2004). La signalisation avec ER α est aussi impliquée dans le développement de métastases aux niveaux des os et des poumons, entre autres (Banka *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007).

La présence de ER dans les tumeurs primaires au niveau du sein est un indicateur de pronostic favorable (Hahnel *et al.*, 1979). Leur présence est détectée chez les tumeurs de sous-types luminales (Allison, 2012). Le statut ER va aussi guider le choix du traitement puisque, contrairement aux tumeurs ER-, la majorité des tumeurs ER+ répondent bien aux thérapies hormonales (Osborne *et al.*, 1980).

La progestérone et ses récepteurs

La progestérone est une hormone proliférative qui promeut la progression tumorale. Son rôle direct dans le cancer du sein est bien illustré dans deux études épidémiologiques, soit le Women's Health Initiative (WHI) et le Million Women Study (Chlebowski *et al.*, 2003, Reeves *et al.*, 2006). Celles-ci ont démontré que les femmes suivant des thérapies de remplacement hormonal avec la progestine (une molécule synthétique), en combinaison avec l'œstrogène, avaient un risque augmenté de développer un cancer du sein comparativement aux femmes suivant une thérapie à l'œstrogène seulement. Les tumeurs avaient également une taille et un grade supérieurs (Chlebowski *et al.*, 2003, Reeves *et al.*, 2006). Des études réalisées avec des tumeurs hormono-dépendantes de souris ont démontré que la signalisation avec la progestérone et PR encourage la progression tumorale en passant d'un mode de prolifération paracrine à un mode autocrine (Medina *et al.*, 2003).

Malgré l'action proliférative de la progestérone et son lien avec le développement du cancer du sein, la présence de PR dans les tumeurs primaires est associée à un pronostic plus favorable et à un meilleur taux de survie (Bardou *et al.*, 2003). En fait, chez les tumeurs ER+, la perte de PR est associée à un phénotype plus agressif et à une réponse moins favorable aux thérapies hormonales (Bardou *et al.*, 2003).

HER2

HER2 est un récepteur retrouvé à la surface des cellules et modulé par un mécanisme tyrosine kinase. La dimérisation du récepteur permet l'autophosphorylation des tyrosines présentes sur le récepteur, ce qui active plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et la tumorigénèse (Neve *et al.*, 2001, van der Geer *et al.*, 1994). Il a été démontré grâce à des expériences *in vitro* et *in vivo* que HER2

induit la tumorigenèse au niveau de la glande mammaire (Di Fiore *et al.*, 1987, Muller *et al.*, 1988).

Environ 15-30 % des tumeurs mammaires sur-expriment HER2 (Burststein, 2005). Chez les cellules tumorales, le gène codant pour HER2 peut être présent en 25 à 50 copies et la protéine peut être exprimée 40 à 100 fois plus que la normale (Kallioniemi *et al.*, 1992). Ainsi, environ 2 millions de récepteurs HER2 peuvent être présents sur la surface de cellules cancéreuses dans le cas de tumeurs mammaires surexprimant HER2 (Kallioniemi *et al.*, 1992). Dans le cas du cancer du sein, les tumeurs surexprimant HER2 sont associées avec un pronostic moins favorable, une survie et une survie sans-maladie plus courte ainsi qu'un taux de récurrence supérieur (Press *et al.*, 1993, Slamon *et al.*, 1987). Ces tumeurs primaires HER2+ sont également associées à un taux supérieur de métastases au niveau du cerveau (Gabos *et al.*, 2006).

1.4 Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont des hormones iodées qui sont sécrétées par la glande thyroïde. Parmi celles-ci, on retrouve la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) qui assurent la régulation de la synthèse de protéines, du métabolisme, de la croissance et du développement (Y. R. Kim *et al.*, 2014). Elles sont particulièrement essentielles pour le développement normal du système nerveux central (Dong *et al.*, 2009). La croissance normale chez les enfants est également hautement dépendante des taux circulants d'hormones thyroïdiennes par leurs actions stimulantes en synergie avec les hormones glucocorticoïdes sur la transcription de GH (Barlow *et al.*, 1986, Dace *et al.*, 2000). Au niveau de la glande mammaire, les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans le développement et la différenciation. Plus spécifiquement, les hormones thyroïdiennes régulent l'embranchement tertiaire de l'épithélium mammaire ainsi que le développement alvéolaire chez la souris (Hovey *et al.*, 2002). Une étude réalisée chez le rat hypophysectomisé a permis d'étudier le rôle de la T4 dans le développement mammaire. Cette étude suggère que T4 exercerait son effet, en partie, à travers sa stimulation de la GH (Meites *et al.*, 1964). Des études subséquentes ont démontré que T3 stimule la prolifération des cellules pituitaires produisant la GH (Barrera-Hernandez *et al.*, 1999). Les hormones thyroïdiennes régulent également les niveaux de récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGFR) (Vonderhaar *et al.*, 1986).

La synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes par la glande thyroïde sont régulées par la TSH. La sécrétion de la TSH est à son tour régulée par le taux d'hormones thyroïdiennes grâce à une boucle de rétroaction négative (Gilbert *et al.*, 2012). La sécrétion de TSH est aussi modulée par l'hypothalamus. L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien peut être inhibé ou stimulé par des stimuli physiologiques ou encore par une exposition à des polluants, ce qui peut causer un déséquilibre important (Y. R. Kim *et al.*, 2014). De plus, le fœtus peut uniquement produire la TSH à partir du deuxième trimestre de la grossesse, ce qui veut dire qu'il dépend entièrement de la production maternelle des hormones thyroïdiennes en début de grossesse (Henrichs *et al.*, 2013).

Dans la circulation, les hormones thyroïdiennes peuvent être retrouvées liées à des protéines de transport ou encore sous forme de T3 libre ou T4 libre (Y. R. Kim *et al.*, 2014). La forme T3 libre est la forme active qui va lier le récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne afin de réguler la transcription de différents gènes (Dong *et al.*, 2009). TR α et TR β sont les deux récepteurs aux hormones thyroïdiennes majeurs retrouvés chez les mammifères. Ils agissent tous les deux comme facteurs de transcription, mais de façon différente. L'ARNm de TR α est omniprésent chez les mammifères. On le retrouve dès la vie fœtale et dans plusieurs différents types cellulaires. Par contre, TR β est plutôt exprimé de façon ponctuelle. On le retrouve surtout dans le foie, l'hypophyse, l'oreille interne, la rétine et plusieurs régions du cerveau (Chatonnet *et al.*, 2013). TR α a une affinité supérieure que TR β pour la forme active de l'hormone thyroïdienne (T3) (Velasco *et al.*, 2007).

La liaison du ligand aux récepteurs aux hormones thyroïdiennes va permettre la transactivation de plusieurs gènes suite à l'hétérodimérisation des récepteurs avec un autre récepteur nucléaire, le récepteur X rétinol (RXR) (Chatonnet *et al.*, 2013). Suite à la translocation nucléaire du complexe, il y a liaison à des séquences spécifiques sur l'ADN afin de promouvoir ou inhiber la transcription de gènes spécifiques (Dace *et al.*, 2000). La liaison du T3 au récepteur aux hormones thyroïdiennes peut également induire sa dégradation rapide via une voie ubiquitine. Ceci indique que T3 régule sa propre fonction en contrôlant le nombre de récepteurs présents (Dace *et al.*, 2000).

Le rôle des hormones thyroïdiennes dans le développement du cancer du sein est controversé (Angelousi *et al.*, 2012). Certains suggèrent que l'hypothyroïdisme serait un facteur de risque pour le cancer du sein (Smyth, 1997) tandis que d'autres lui attribuent un rôle protecteur (Cristofanilli *et al.*, 2005). De l'autre côté, certaines études ont associé l'hyperthyroïdisme avec une incidence supérieure du cancer du sein (Saraiva *et al.*, 2005,

Tosovic *et al.*, 2010) tandis que d'autres suggèrent que l'hyperthyroïdisme aurait plutôt un effet protecteur (Vorherr, 1987). De plus, un lien direct entre une hypertrophie de la glande thyroïde et le développement du cancer du sein a été décrit (Smyth *et al.*, 1996).

Finalement, il a été démontré que TR α est localisé dans le noyau des cellules épithéliales des canaux et des acini chez l'humain, mais devient cytoplasmique dans les tumeurs (Conde *et al.*, 2006). À l'opposé, l'expression de TR β est cytoplasmique dans les tissus sains et les carcinomes infiltrants, et devient nucléaire dans les tumeurs bénignes et *in situ* (Conde *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation des TRs peut promouvoir le développement du cancer du sein.

Plusieurs études *in vitro* démontrent l'effet prolifératif des hormones thyroïdiennes chez des lignées de cellules cancéreuses humaines (Cestari *et al.*, 2009, Dinda *et al.*, 2002, Hall *et al.*, 2008, Shao *et al.*, 1995). Chez des cellules cancéreuses T47D et des cellules MCF-7 l'exposition à T3 a favorisé la prolifération de façon dose-dépendante (Hall *et al.*, 2008). Plusieurs suggèrent que cette prolifération des cellules cancéreuses en réponse à T3 serait modulée par un mécanisme impliquant la signalisation oestrogénique (Cestari *et al.*, 2009, Dinda *et al.*, 2002, Hall *et al.*, 2008, Shao *et al.*, 1995). En fait, des études ont démontré que T3 peut réguler la prolifération de cellules cancéreuses mammaires en se liant aux ER (Dinda *et al.*, 2002, Nogueira *et al.*, 1996) ou encore en se liant aux TR et en stimulant ensuite les ERE (Dellovade *et al.*, 1995). Aussi, chez des cellules MDA-MB-231 transfectées avec ER α , le traitement avec T3 a permis d'attribuer un nouveau rôle à cette hormone en tant que modulateur de l'expression génique d'ER α (Cestari *et al.*, 2009).

1.5 Les jonctions intercellulaires

Trois types de jonctions participent aux interactions cellulaires épithéliales, soit les jonctions adhérentes, les jonctions lacunaires et les jonctions serrées. Les jonctions exercent une certaine tension physique qui contribue à la polarisation des cellules épithéliales (El-Saghir *et al.*, 2011). De plus, les jonctions intercellulaires interagissent entre elles pour influencer la signalisation intercellulaire (van Roy *et al.*, 2008).

De façon générale, les jonctions serrées permettent la formation d'une barrière semi-perméable dans une couche de cellules en empêchant la circulation libre dans l'espace intercellulaire. Les jonctions adhérentes permettent la cohésion mécanique des tissus en unissant les cellules adjacentes. Les jonctions lacunaires permettent la

communication intercellulaire grâce à la formation de canaux joignant les cytoplasmes de cellules adjacentes (Figure 1.5).

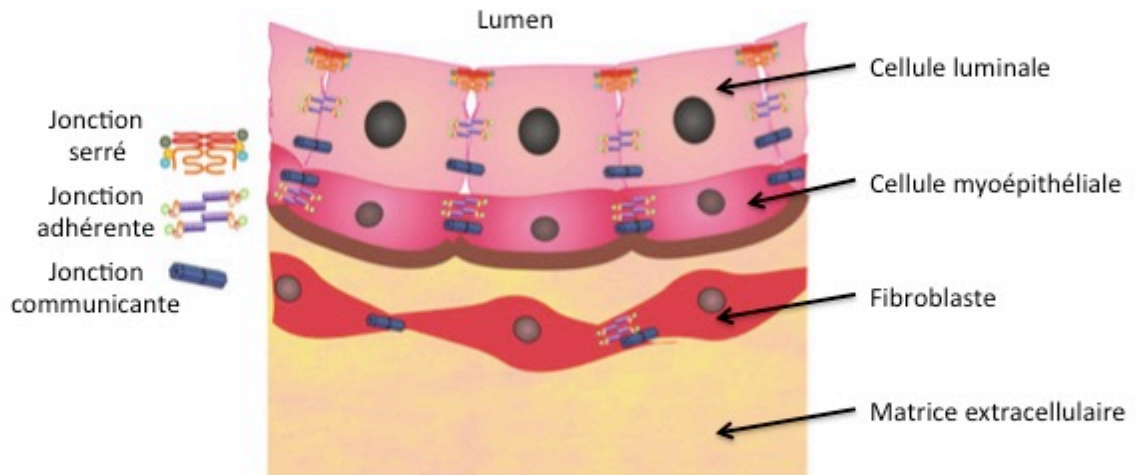


Figure 1.5 : Représentation schématique des jonctions intercellulaires dans l'épithélium mammaire. Les jonctions serrées sont retrouvées au côté apical des cellules luminales, près du lumen. Les jonctions adhérentes sont présentes entre les cellules luminales, entre les cellules myoépithéliales ou encore entre les fibroblastes. Les jonctions communicantes sont les plus répandues, étant présentes à la fois entre deux cellules luminales, entre deux cellules myoépithéliales ou entre une cellule luminale et une myoépithéliale. Elles sont également retrouvées entre les fibroblastes. Modifiée de (Cyr, 2016)

1.5.1 Les jonctions serrées

Du côté apical des cellules épithéliales, on retrouve les jonctions serrées. Ces jonctions ont comme fonction la conservation de l'homéostasie dans les tissus. Elles remplissent leur fonction en formant une barrière semi-perméable sélective entre les cellules et en exerçant un contrôle sur le mouvement paracellulaire (El-Saghir *et al.*, 2011). Elles sont composées de petites protéines transmembranaires, les claudines et l'occludine, qui se rattachent à des protéines cytoplasmiques comme les protéines de la famille Zona Occludens (ZO) (Brennan *et al.*, 2010). Il existe 24 membres à la famille des claudines, mais seules claudine -1, -3, -4 et -7 sont exprimées au niveau de la glande mammaire humaine (Tokes *et al.*, 2005).

Au niveau de l'épithélium mammaire, ces jonctions sont surtout importantes lors de l'allaitement (Itoh *et al.*, 2003). Elles vont moduler la perméabilité de l'épithélium mammaire afin de permettre la circulation du lait dans la lumière des canaux galactophores (Lanigan *et*

al., 2007) La circulation d'ions et de petites molécules à travers les jonctions serrées est régulée par les différents signaux associés à la grossesse, à l'allaitement et à l'involution. Par exemple, chez des souris gestantes ovariectomisées au jour 16 ou 17 de la grossesse, une fermeture des jonctions serrées a été observée au niveau de la glande mammaire (Nguyen *et al.*, 2001). L'injection d'un antagoniste de la progestérone, le RU 486, chez des souris intactes et en gestation tardive, a également entraîné la fermeture des jonctions serrées (Nguyen *et al.*, 2001). Ceci confirme que la baisse du taux de progestérone, associée avec l'accouchement et l'expulsion du placenta, est le stimuli principal encourageant la fermeture des jonctions serrées lors de l'allaitement (Nguyen *et al.*, 2001)

Des modifications au niveau de la composition des jonctions serrées ont été associées à divers types de cancers, incluant le cancer du sein. Par exemple, Claudine-1 est présente au niveau des glandes mammaires saines et des carcinomes *in situ*, mais son expression est significativement réduite chez les tumeurs invasives (Tokes *et al.*, 2005). L'expression de Claudine-7 est aussi diminuée dans des tumeurs mammaires et est corrélée négativement avec le grade histologique de la tumeur (Kominsky *et al.*, 2003).

1.5.2 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes ont comme fonction principale l'adhésion intercellulaire, mais participent aussi à la polarisation des cellules et à l'activation de diverses voies de signalisations (Cavallaro *et al.*, 2004). Les jonctions adhérentes sont principalement composées de cadhérines. Les cadhérines sont une famille de glycoprotéines transmembranaires qui modulent l'adhésion spécifique des cellules de façon calcium dépendante (Albergaria *et al.*, 2011). L'assemblage de cadhérines membranaires, retrouvées sur des cellules adjacentes, permet le recrutement de molécules de signalisation cytoplasmique. Cet assemblage contribue, entre autres, au maintien de l'intégrité du tissu épithélial mammaire lors du développement et de l'allaitement (Lanigan *et al.*, 2007). Les cadhérines peuvent être subdivisées en cadhérines classiques ou cadhérines desmosomales selon leur association avec l'actine ou les filaments intermédiaires, respectivement (El-Saghir *et al.*, 2011). Chez les cadhérines classiques, le domaine intracellulaire va se lier directement aux caténines cytoplasmiques qui elles se lient au cytosquelette d'actine (Albergaria *et al.*, 2011). Les cadhérines classiques incluent la E-cadhérine, la N-cadhérine, la P-cadhérine et la R-cadhérine qui sont nommées d'après le site où elles ont été retrouvées pour la première fois, c'est-à-dire épithélial, neuronal, placentaire et rétinale, respectivement. E-cadhérine est le membre de la famille des

cadhérines le plus exprimé dans tous les tissus épithéliaux (van Roy *et al.*, 2008). Au niveau cytoplasmique les cadhérines se rattachent au cytosquelette via un complexe de protéines comprenant α -caténine, β -caténine, γ -caténine (aussi nommé plakoglobine) et p120-caténine (Lanigan *et al.*, 2007). p120-caténine est impliquée dans la translocation et la stabilisation des complexes cadhérine-caténine à la membrane plasmique (Reynolds *et al.*, 2004) tandis que β -caténine ainsi que γ -caténine permettent la liaison à α -caténine (Lien *et al.*, 2006). α -caténine permet ensuite la liaison aux filaments d'actine formant le cytosquelette (Yamada *et al.*, 2005). En plus de son rôle dans l'attachement des cadhérines au cytosquelette, β -caténine est un facteur de transcription important qui intervient dans plusieurs voies de signalisation, notamment dans la voie de signalisation Wnt (Brembeck *et al.*, 2006). Cette voie permet, entre autres, l'activation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Lanigan *et al.*, 2007).

Le rôle de E-cadhérine et de P-cadhérine dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium mammaire ainsi que dans le développement normal de la glande mammaire est bien connu. E-cadhérine est exprimée aux niveaux des cellules luminales et myoépithéliales alors que P-cadhérine est seulement retrouvée au niveau de la couche myoépithéliale (Figure 1.6)(Paredes *et al.*, 2002). La E-cadhérine est essentielle pour l'intégrité de l'épithélium mammaire. Son inhibition à l'aide d'un anticorps neutralisant a perturbé l'adhésion de la couche luminale de l'épithélium. Suite à l'inhibition de E-cadhérine on observait des cellules luminales flottantes dans le lumen de la glande mammaire (Daniel *et al.*, 1995). De plus, l'inhibition de E-cadhérine par la présence de cet anticorps, a également diminué la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire (Daniel *et al.*, 1995). L'inhibition totale de l'expression de P-cadhérine grâce à l'insertion d'une mutation dans le gène engendre plutôt une différenciation alvéolaire précoce chez des souris vierges et une hyperplasie des glandes mammaires chez des souris plus âgées (Radice *et al.*, 1997).

Il existe un consensus sur le rôle de *CDH1*, le gène codant pour E-cadhérine, en tant que gène suppresseur de tumeur. En fait, E-cadhérine inhibe l'invasion et la métastase de cellules cancéreuses de diverses origines. De plus, les tumeurs épithéliales ont tendance à perdre E-cadhérine partiellement ou complètement lors de leur progression en tumeurs malignes (Frixen *et al.*, 1991, Strumane *et al.*, 2004, Vleminckx *et al.*, 1991). Le rôle de E-cadhérine a été étudié dans les tumeurs mammaires où son rôle de suppresseur de tumeurs et plus spécifiquement son action anti-métastatique ont pu être confirmé (Yoshida *et al.*, 2001). Une inhibition de la E-cadhérine est également liée à la TEM, un

processus hautement impliqué dans la cancérogénèse. À l'opposé, la N-cadhérine est surexprimée en cas de cancer du sein et lors de la transition, et promeut la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que le développement de métastases (Hazan *et al.*, 2000). Contrairement à E-cadhérine, P-cadhérine est considérée comme un indicateur d'un mauvais pronostic puisqu'elle est surexprimée chez les tumeurs à grades supérieurs (Paredes *et al.*, 2005, Peralta Soler *et al.*, 1999).

Finalement, une dérégulation au niveau de la β -caténine peut également promouvoir le développement du cancer. Comme vu précédemment, la β -caténine agit à la fois au niveau des jonctions adhérentes pour permettre l'adhésion des cellules et au niveau du noyau où elle active la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire afin de promouvoir la prolifération cellulaire (Lanigan *et al.*, 2007). Lorsque la β -caténine se dissocie des jonctions adhérentes et est retrouvée dans le cytoplasme elle peut soit être phosphorylée dans le but d'être dégradée ou être stabilisée par des signaux Wnt (Brembeck *et al.*, 2006). Dans le deuxième cas, β -caténine va être transportée dans le noyau où elle va activer la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tel que c-myc et cyclin D1 et ainsi stimuler la prolifération des cellules (Meniel *et al.*, 2003). Il existe un équilibre important entre ces deux fonctions et un déséquilibre qui promeut la fonction transcriptionnelle et cause une perte de la fonction adhérente va promouvoir le développement et la progression du cancer (Brembeck *et al.*, 2006). En fait, la perte de E-cadhérine est corrélée avec une augmentation de la transcription β -caténine-dépendante (Orsulic *et al.*, 1999, Stockinger *et al.*, 2001) et ces changements sont associés avec un mauvais pronostic (Thiery, 2002).

1.5.3 Les jonctions lacunaires (communicantes)

Les jonctions lacunaires permettent la communication directe entre le cytoplasme de deux cellules adjacentes en facilitant l'échange de petites molécules à travers des canaux semi-perméables (El-Saghir *et al.*, 2011). Les jonctions lacunaires sont composées d'une famille de protéines transmembranaires d'environ 26-60kDa nommées connexines (Cxs). Les Cxs s'assemblent en groupes de six pour former des connexons. Deux connexons, provenant de chacune des deux cellules adjacentes, se joignent pour former ensuite un canal (El-Saghir *et al.*, 2011). Chez l'humain, il existe 21 Cxs, nommées selon leur poids moléculaires, et chaque protéine apporte des propriétés uniques aux canaux qu'elle forme, entre autre au niveau de la perméabilité (Willecke *et al.*, 2002).

Au niveau de la glande mammaire humaine, on retrouve deux Cxs soit la Cx26 et la Cx43. La Cx26 est surtout exprimée entre les cellules luminales des canaux galactophores mais est aussi retrouvée entre les cellules luminales au niveau des lobules (Monaghan *et al.*, 1996). Par contre, Cx43 est surtout exprimée entre les cellules de la couche basale (Monaghan *et al.*, 1996). Les glandes mammaires des souris et des rats expriment également Cx26 et Cx43, mais elles expriment aussi Cx32 et Cx30 au niveau des cellules luminales (Figure 1.6)(Talhouk *et al.*, 2013).

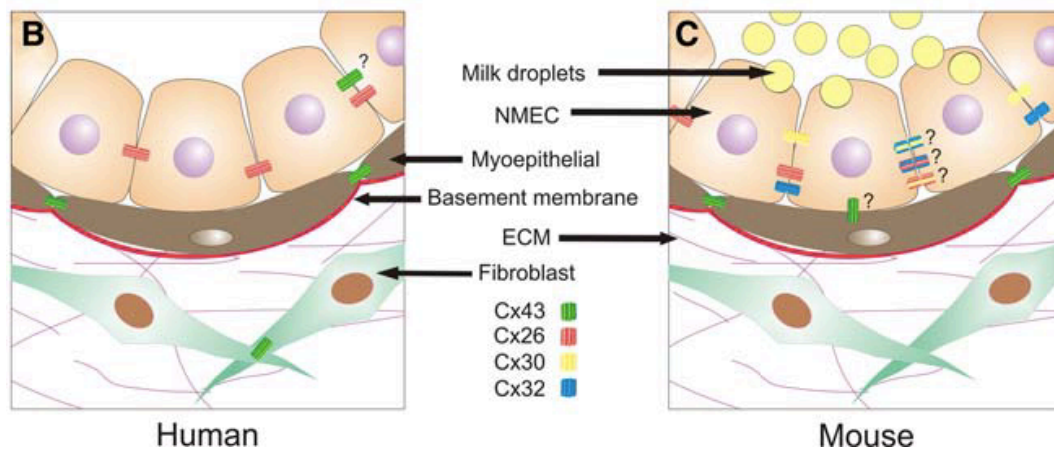


Figure 1.6 : Représentation schématique de la localisation des diverses connexines dans l'épithélium mammaire. Cx26 et Cx43 sont les seules Cxs retrouvées chez l'humain. Cx26 est uniquement localisée entre les cellules luminales tandis que Cx43 est localisé entre les cellules myoépithéliales et entre les fibroblastes. Sa localisation entre les cellules luminales est controversée. Chez la souris, Cx26, Cx30 et Cx32 sont retrouvées entre les cellules luminales et Cx43 est retrouvée entre les cellules myoépithéliales. La localisation de Cx43 entre les cellules myoépithéliales et luminales et entre deux cellules luminales a été rapportée, mais est toujours controversée. Modifié de (McLachlan *et al.*, 2007)

L'expression des diverses Cxs et la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires (GJIC) sont essentielles au développement et à la différenciation de la glande mammaire (McLachlan *et al.*, 2007). Les souris « knockout » pour Cx26 ou Cx43 ne sont pas viables. Ainsi, afin d'étudier les fonctions de ces deux protéines, ainsi que celles de Cx30 et Cx32, divers modèles animaux génétiquement modifiés ont été utilisés. Le premier modèle implique l'inactivation de la Cx32 ce qui a permis d'étudier la fonction de Cx32 (Bry *et al.*, 2004). Le second modèle implique un remplacement de la Cx43 par la Cx32 (Cx43KI32) afin d'étudier la fonction de Cx43 (Bry *et al.*, 2004). Dans les deux cas, le développement des glandes mammaires était normal. Un troisième modèle implique une inhibition conditionnelle de Cx26 dans la glande mammaire à différents moments au cours

de la vie des souris (Bry *et al.*, 2004). Lorsque l'expression de Cx26 était réduite avant la puberté (MMTV-Cre), le développement des lobules et l'allaitement étaient affectés. À l'opposé, l'inhibition conditionnelle de Cx26 durant la grossesse tardive (WAP-Cre) n'affecte pas le développement alvéolaire ou le fonctionnement de la glande mammaire (Bry *et al.*, 2004). Finalement, un autre modèle d'inhibition conditionnelle de Cx26, qui réduisait l'expression de Cx26 environ au 10^{ème} jour de la grossesse (BLG-Cre), a permis de conclure que l'augmentation physiologique de Cx26 qui a lieu lors de la grossesse n'est pas nécessaire pour assurer l'allaitement (Stewart *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la Cx32 peut compenser pour la perte de la Cx26 lors de la grossesse, mais que la Cx26 est indispensable au développement initial de l'épithélium mammaire.

Un modèle murin ayant une mutation autosomale dominante au niveau de la Cx43 a été utilisé pour étudier la fonction de cette protéine sur le développement des glandes mammaires. La réduction de l'expression protéique de Cx43 chez ces souris était associée à une réduction de la GJIC entre les cellules myoépithéliales de la glande mammaire (Plante *et al.*, 2008). Malgré leur production importante de plusieurs protéines du lait comme la β -caséine et le WAP, les glandes mammaires de ces souris mutantes n'arrivaient pas à excréter le lait en réponse à une stimulation par l'ocytocine. Ces résultats suggèrent un rôle important de la Cx43 au niveau de la contraction de cellules myoépithéliales et de l'expulsion du lait lors de l'allaitement (Plante *et al.*, 2008). La diminution de l'expression de Cx43 a également été associée à un délai important dans le développement mammaire. Les mesures de l'élongation de l'épithélium après 6 semaines et 10 semaines était 75% et 50% plus courtes chez les souris mutées que chez les souris WT (Plante *et al.*, 2008).

Depuis quelques années, il a été démontré que les protéines des jonctions lacunaires ont des fonctions autres que la communication intercellulaire. Elles agissent également au niveau de diverses voies de signalisation (El-Saghir *et al.*, 2011). Par exemple, les protéines des jonctions lacunaires vont former des complexes et séquestrer β -caténine à la membrane, ce qui va empêcher sa translocation au noyau où elle induit normalement la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et la motilité cellulaire (Talhouk *et al.*, 2008).

Bien qu'elles aient été longtemps considérées comme des gènes suppresseurs de tumeurs, il est maintenant admis que le rôle des Cxs dans le cancer du sein est contexte dépendant. Ainsi, elles sont toujours considérées comme des suppresseurs de tumeurs dans la tumeur primaire, mais elles pourraient agir soit comme supresseur de tumeur ou

comme facilitateur de la progression du cancer dans des tumeurs avancées (McLachlan *et al.*, 2007). Des études réalisées avec des tumeurs mammaires, prélevées chez des patientes, démontrent une perte de l'expression des Cxs ou encore une re-localisation intracellulaire de celles-ci (Kanczuga-Koda *et al.*, 2003, Laird *et al.*, 1999). D'autres études *in vitro* ont démontré que l'expression des Cxs menait à une réduction de la capacité de migration des cellules et de leur capacité d'invasion à travers une membrane basale (Momiyama *et al.*, 2003). Cette fonction des Cxs expliquerait leur rôle de suppresseur de tumeurs dans les tumeurs primaires. Par conséquent, les Cxs ont des propriétés suppressives de tumeurs au commencement des processus métastatique; lorsque les cellules doivent se dissocier de la tumeur principale et envahir puis migrer dans les tissus avoisinants, pour atteindre la circulation. Par contre, à l'entrée et à la sortie des vaisseaux sanguins, les Cxs peuvent promouvoir la progression tumorale en permettant la communication hétérocellulaire avec l'endothélium et en facilitant, de cette façon, la migration trans-endothéliale (Pollmann *et al.*, 2005).

1.6 La transition épithelio-mésenchymateuse

La transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) est un processus par lequel les cellules épithéliales acquièrent des propriétés de cellules mésenchymateuses (Figure 1.7). La TEM entraîne une perte de la polarité des cellules épithéliales et modifie l'interaction de ces dernières avec la membrane basale, leur conférant une motilité supérieure (Obr *et al.*, 2012). Toutes les modifications biochimiques qui ont lieu chez les cellules épithéliales lors de la TEM leur permettent d'adopter un phénotype mésenchymateux. Un tel phénotype inclut, en plus d'une motilité supérieure, une plus grande capacité d'invasion, une résistance supérieure à l'apoptose et une production plus importante des composants de la matrice extracellulaire (Kalluri *et al.*, 2003, Lange *et al.*, 2008).

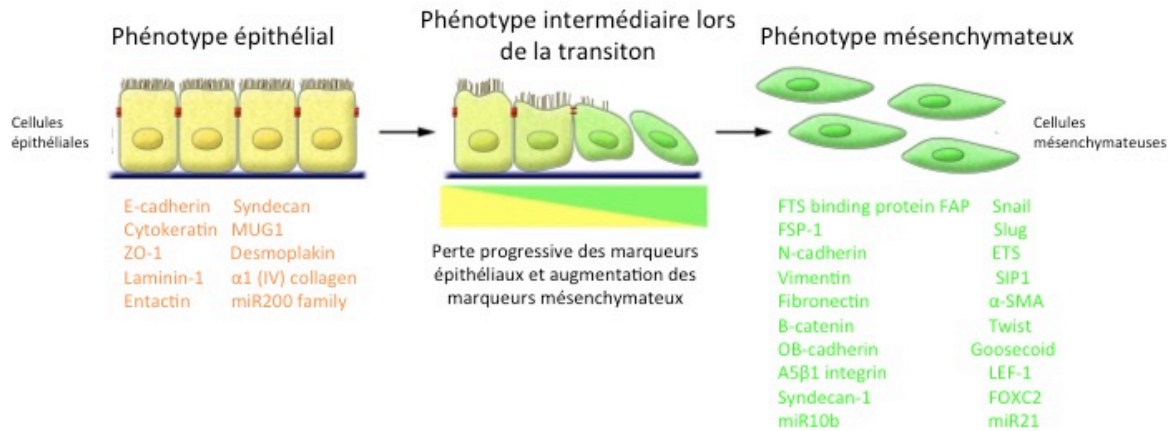


Figure 1.7 : Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse. À gauche, des cellules épithéliales sont bien organisées et les marqueurs associés à ce phénotype sont exprimés (liste orange). Au centre, les changements structuraux progressifs sont illustrés. Entre autre, il y a un changement au niveau de la forme des cellules, une perte de l'adhérence entre les cellules et un détachement des cellules par rapport à leur membrane basale. À droite, des cellules mésenchymateuses sont représentées et les marqueurs associés à ce phénotype sont exprimés (liste verte). Modifié de (Kalluri *et al.*, 2009)

La TEM se déroule dans trois différents contextes biologiques où elle entraîne de conséquences fonctionnelles très différentes. Premièrement, elle est impliquée lors de l'implantation, la formation de l'embryon et le développement des organes. Au niveau de l'embryon, elle permet la dispersion de cellules diverses possédant toutes un phénotype mésenchymateux (Lee *et al.*, 2006). En second lieu, la TEM est associée avec la cicatrisation, la régénération de tissus et la fibrose. Suite à une blessure quelconque, la production de cellules mésenchymateuses à partir de cellules épithéliales est stimulée par l'inflammation et, normalement, cesse lorsque l'inflammation subsiste (Kalluri *et al.*, 2003). La fibrose est une forme de cicatrisation qui entre en jeu suite à une inflammation persistante (Kalluri *et al.*, 2009). Finalement, la TEM se déroule chez les cellules cancéreuses qui ont déjà subi des modifications génétiques ou épigénétiques au niveau de gènes favorisant le développement de tumeurs (Figure 1.8). Ces modifications génétiques ou épigénétiques, subies lors de la formation de la tumeur primaire, rendent les cellules cancéreuses particulièrement vulnérables aux signaux induisant la TEM qui proviennent du stroma environnant (Thiery, 2002)

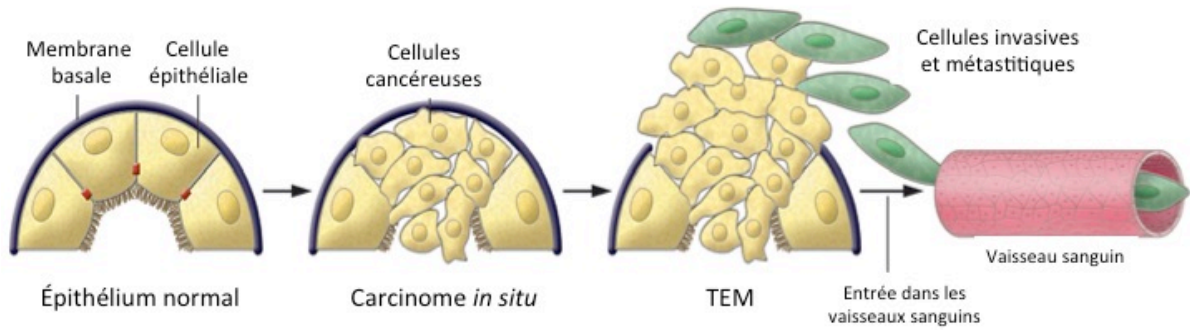


Figure 1.8 : Représentation schématique de la contribution de la TEM à la progression du cancer. De gauche à droite, la progression d'un tissu épithélial sain jusqu'à une tumeur secondaire est représentée. Tout d'abord, la progression d'un épithélium normal à un carcinome *in situ* est illustrée. La membrane basale demeure intacte, mais l'organisation des cellules est perturbée. Puis, la TEM permet l'entrée des cellules avec un phénotype mésenchymateux dans les vaisseaux sanguins. Modifié de (Kalluri *et al.*, 2009).

L'activation de ce processus de transition est une étape précoce et critique de la formation de métastases du cancer du sein. Ce processus se déroule indépendamment des changements sur la prolifération cellulaire (Obr *et al.*, 2012). Plusieurs mécanismes moléculaires différents sont impliqués dans l'initiation et la complétion de la TEM. Ceux-ci incluent l'activation de divers facteurs de transcription, l'expression de protéines de surface spécifiques, la réorganisation et l'expression de protéines du cytosquelette, la production d'enzymes pouvant dégrader la matrice extracellulaire ainsi que des changements au niveau de l'expression de certains micro-ARN (Kalluri *et al.*, 2009).

Les signaux induisant la TEM incluent le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance dérivé de plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant beta (TGF- β). Ceux-ci vont activer des facteurs de transcriptions tel que Snail, Slug, ZEB1, Twist, Goosecoid (GSC) et FOXC2 (Kokudo *et al.*, 2008, Medici *et al.*, 2008, Shi *et al.*, 2003, Thiery, 2002). Une fois activé, chacun de ces facteurs de transcription va agir de façon pléiotropique, et souvent en collaboration avec un ou plusieurs autres facteurs de transcription (Kalluri *et al.*, 2009).

Le changement des cadhérines est un phénomène important de la TEM. Celui-ci implique la perte de l'E-cadhérine et l'augmentation simultanée de la N-cadhérine ou d'autres membres de la famille des cadhérines impliqués dans la croissance invasive, telle que P-cadhérine. Pour ce qui est de la TEM induite chez les cellules cancéreuses, le changement de la E-cadhérine à la N-cadhérine est le plus documenté. Il mène à l'inhibition des jonctions intercellulaires et promeut la migration et l'invasion des cellules tumorales

(Hazan *et al.*, 2000). Le changement de E-cadhérine à P-cadhérine est plutôt observé lors de l'embryogénèse et est moins souvent rapporté lors de la progression tumorale (Albergaria *et al.*, 2011). D'autres marqueurs de phénotype mésenchymateux, tel que la vimentine et la fibronectine, sont communément utilisés lors de l'étude de la TEM (Lee *et al.*, 2006).

1.7 Les retardateurs de flammes bromés (BFRs)

1.7.1 Structure et utilisation

Les retardateurs de flammes sont des molécules synthétiques ajoutées à toutes sortes de produits domestiques ou industriels afin de ralentir leur combustion. Les BFRs sont une classe de retardateurs de flammes omniprésente dans notre environnement. L'utilisation globale des BFRs était estimée à 311,000 tonnes/année en 2005 et en 2008 elle s'élevait à 410,000 tonnes/année (Shoeib *et al.*, 2012). En ce moment, on compte plus de 75 différents BFRs commerciaux (Stubbings *et al.*, 2014). Ce groupe de composés contient 4 familles majeures : le TBBPA, les PBDE, les PBB et l'HBBD (Y. R. Kim *et al.*, 2014). La structure moléculaire des BFRs varie grandement selon le composé. Conséquemment l'affinité des diverses molécules de BFRs aux récepteurs ou encore aux protéines de transport est très variable.

Selon Environnement Canada, les PBDE composent la famille de BFRs la plus répandue et la plus importante en terme de quantité produite (Environment and Climate Change, 2013). Les PBDE sont utilisés depuis plusieurs décennies et dans plusieurs produits domestiques tels que les meubles, les matelas, les appareils électroniques etc. Ils sont manufacturés sous trois différentes formules que l'on nomme PentaBDE, OctaBDE et DecaBDE (Shoeib *et al.*, 2012). Cependant, la production commerciale du PentaBDE et OctaBDE a cessée en 2004 en Amérique du Nord et en Europe due à leur persistance, bioaccumulation et toxicité potentielle. Par contre, la production et l'utilisation du DecaBDE persistent (Jinhui *et al.*, 2015). Les PBDE sont des composés aromatiques bromés qui contiennent deux groupes phényles reliés par une liaison éther (Figure 1.9). La position ainsi que le nombre d'atomes de brome permet 209 différents composés que l'on nomme congénères de PBDE (Linares *et al.*, 2015). Plusieurs congénères de PBDE sont toujours retrouvés dans les produits domestiques (Jinhui *et al.*, 2015).

La formule PentaBDE était majoritairement utilisée pour le traitement de mousses de polyuréthane employée dans le rembourrage d'ameublement ou encore dans l'isolation des murs (Hale *et al.*, 2002). La distribution approximative du PentaBDE est de 36% dans l'industrie du transport (voitures, avions, etc.), 60% en ameublement et 4% en articles divers (Jinhui *et al.*, 2015). À titre d'exemple, on retrouve du PentaBDE dans des articles tels que le tissu de rembourrage de chaises ou de sièges de voitures. La formule OctaBDE était surtout utilisée dans les polymères thermoplastiques nommés acrylonitrile butadiène styrène (ou ABS). L'ABS est principalement retrouvée dans les boîtiers ou les revêtements d'équipement électrique ou électronique comme par exemple une photocopieuse ou une imprimante de bureau (Jinhui *et al.*, 2015). Finalement, le DecaBDE, qui est la seule formule non-bannie, est utilisée afin de produire du plastique avec des propriétés de retardateurs de flammes. 70% du DecaBDE est utilisé dans de l'équipement électrique ou électronique comme des ordinateurs, télévisions, machines à lessives, pièces de réfrigérateurs etc. De plus, 10% est utilisé pour le recouvrement de fils/cables électriques, 10% dans le secteur du transport et le dernier 10% est retrouvé dans du plastique utilisé dans le domaine de la construction ou de l'exploitation minière (Jinhui *et al.*, 2015).

En 2013, la production d'un autre BFRs majeur, le HBCD, a également été bannie (Ryan *et al.*, 2014). Contrairement au PBDE qui est retrouvé sous formes de 209 différents congénères, l'HBCD est retrouvé sous formes de quelques diastéréoisomères. Par contre, le produit commercial contient l'isomère gamma à 98% (Figure 1.9)(Ryan *et al.*, 2014). L'application principale de l'HBCD est dans la mousse polystyrène utilisée comme isolation rigide de panneaux et de planches pour la construction de bâtiments. L'HBCD est aussi ajouté au coton ou au mélange coton/synthétique composant le rembourrage d'ameublement ou l'habillage des fenêtres, murs et planchers. Ainsi, l'HBCD se retrouve dans l'ameublement résidentiel ou commercial, dans les sièges d'automobiles, dans les matelas, la draperie, les tapis et la tapisserie sur les murs, entre autres (Stubblings *et al.*, 2014). En 2001, on estimait la demande annuelle pour HBCD à environ 16 700 tonnes (Shoeib *et al.*, 2012).

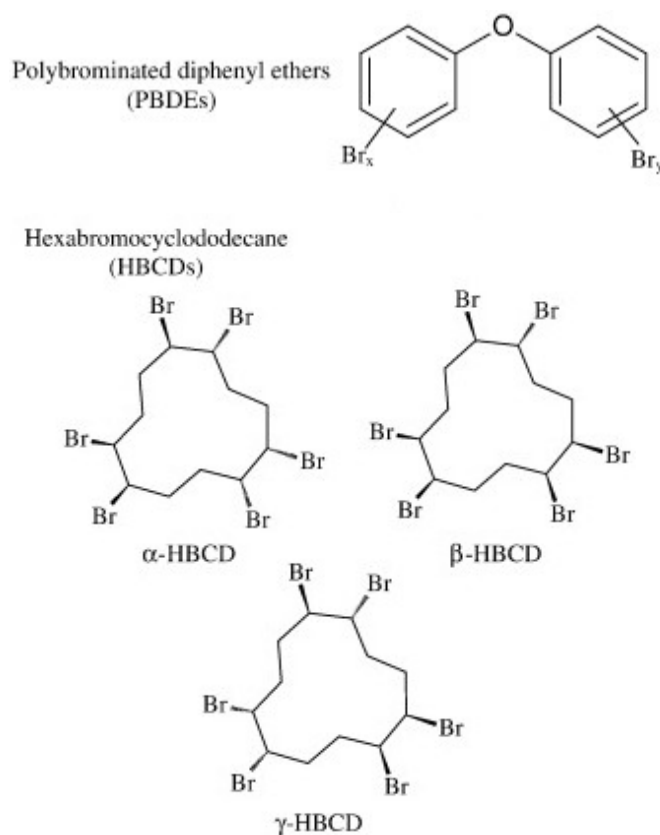


Figure 1.9. Structure des molécules majeures de la famille des BFRs. Il existe 209 congénères de PBDE selon la localisation et la quantité d'atomes de brome (Br) présentes. Il existe trois isoformes d'HBCD. Cependant, l'isoforme γ est le plus commun. Modifiée de (Gorga *et al.*, 2013)

Les PentaBDE, OctaBDE et HBCD sont tous classifiés comme polluants organiques persistants (POP) selon le programme environnemental des nations unies (UNEP), tandis que l'ajout du DecaBDE à cette liste est présentement en débat (Stubbings *et al.*, 2014). Leur persistance provient de leur capacité à résister à la dégradation chimique, biologique ou photolytique ainsi que leur capacité à s'accumuler dans les tissus animaux et humains (Darnerud *et al.*, 2001). Cette persistance leur permet d'être transportés sur de grandes distances. Pour cette raison, ils sont retrouvés dans l'air, l'eau, le sol, des sédiments et des biotes terrestres ou marins (Darnerud *et al.*, 2001). Des BFRs ont même été détectés dans des échantillons biotiques ou abiotiques provenant de régions polaires (Hendriks *et al.*, 2015). Dans les biotes marines, les concentrations les plus fortes sont retrouvées chez les prédateurs majeurs de l'écosystème ce qui suggère la biomagnification des composés (Darnerud *et al.*, 2001, Kuo *et al.*, 2010). La persistance dans l'environnement ou dans les

tissus humains dépend de la structure chimique et de la demi-vie du composé. Par exemple, la demi-vie du DecaBDE dans du serum est d'environ 18 jours tandis que celle de l'OctaBDE est d'environ 10 jours et que le PentaDBE peut avoir une demi-vie allant jusqu'à 26 ans (Den Hond *et al.*, 2015). Des études comparant les taux de PentaBDE dans la poussière de maisons canadiennes avant (2003) et après (2008) l'interdiction de son utilisation n'ont observé aucune diminution, ce qui suggère que le PentaBDE est toujours relâchés dans l'environnement (Shoeib *et al.*, 2012).

Les molécules de BFRs peuvent être relâchés dans l'environnement facilement puisqu'ils ne forment pas de liaisons chimiques avec le produit auxquels ils sont ajoutés. De cette façon, les PBDE et le HBCD sont relâchés tout au long de la vie d'un produit et même après, lors de sa décomposition dans les sites d'enfouissement (Jinhui *et al.*, 2015). Le HBCD et les PBDE peuvent se volatiliser à la température de la pièce, ce qui suppose une exposition prolongée et prononcée provenant d'articles ou de structures que l'on cotoie dans la vie de tous les jours (Jinhui *et al.*, 2015).

Des BFRs ont été retrouvés dans de nombreux échantillons abiotiques et biotiques. Chez les humains, ils ont été détectés dans le sang, le sérum et le tissu adipeux (Stasinska *et al.*, 2014). Les PBDE ont aussi été retrouvés dans des échantillons de cheveux, reins, foie et poumons (Jinhui *et al.*, 2015). Leur présence dans le sang du cordon ombilical, dans le placenta ainsi que dans le lait maternel a également été démontrée (Stasinska *et al.*, 2014). En fait, les concentrations de PBDE et de HBCD mesurées dans le lait maternel de femmes canadiennes sont parmi les plus élevée mondialement (Ryan *et al.*, 2014).

Les voies d'expositions humaines pour les BFRs incluent l'ingestion de poussière et de nourriture et, à plus petite échelle, l'inhalation de poussière. Les aliments contenant des BFRs comprennent les poissons huileux, la viande et les produits laitiers (Stubbings *et al.*, 2014). Le fœtus et les nourrissons ont des voies d'exposition supplémentaires via le placenta et le lait maternel, respectivement (Berger *et al.*, 2014). Les enfants, surtout les jeunes enfants, ont une exposition supérieure à celle des adultes à cause de leur proximité au sol qui contient une grande quantité de poussière (Shoeib *et al.*, 2012). Le comportement des jeunes enfants les rend également vulnérables à l'exposition au BFRs. Ces comportements incluent, entre autres, le fait de ramper sur le sol ou de mettre des objets ou encore leurs mains dans leur bouche. Conséquemment, les enfants ont de plus grandes concentrations de BFRs dans le sérum. Par exemple, les niveaux de PBDE mesurés chez les enfants sont 2-10 fois supérieurs aux taux mesurés chez les adultes

(Rose *et al.*, 2010).

1.7.2 Les propriétés de perturbateurs endocriniens des BFRs

Plusieurs types de BFRs ainsi que certains de leurs métabolites agissent comme des perturbateurs endocriniens. Les perturbateurs endocriniens sont des composés exogènes qui miment, bloquent ou modifient l'activité d'hormones endogènes (Fenton *et al.*, 2012). Plusieurs BFRs possèdent une structure semblable à celle d'hormones. Ainsi, des études *in vitro* démontrent que certains BFRs peuvent mimer certaines hormones ainsi qu'inhiber leur transport, leur liaison aux récepteurs ou encore intervenir au niveau de leur régulation (Gosavi *et al.*, 2013). De plus, les divers BFRs semblent agir de façon synergique lorsqu'ils exercent leurs effets sur le système endocrinien (Gosavi *et al.*, 2013).

L'axe hormonal qui semble le plus affecté par les BFRs agissant comme perturbateurs endocriniens est l'axe hypothalamo-hypophyso thyroïdien. Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que certains types de BFRs interviennent dans la régulation des hormones thyroïdiennes (Bloom *et al.*, 2008, Chevrier *et al.*, 2010, Chevrier *et al.*, 2011, Eggesbo *et al.*, 2011, Gascon *et al.*, 2011, Herbstman *et al.*, 2008, Oulhote *et al.*, 2016, Stapleton *et al.*, 2011, Zota *et al.*, 2011). Plus spécifiquement, un lien a été établi entre une exposition à certains congénères de PBDE et un taux augmenté de thyroïdostimuline (TSH) chez des femmes enceintes, (Chevrier *et al.*, 2010, Stapleton *et al.*, 2011, Zota *et al.*, 2011) ou encore chez des nouveau-nés (Herbstman *et al.*, 2008). Ce lien fut également démontré chez des rattes gestantes exposées au PBDE209 (T. H. Kim *et al.*, 2009), au DE-71, ou encore au HBCD ainsi que chez leur progéniture (Kodavanti *et al.*, 2010).

De plus, une exposition à différents PBDE et au HBCD fut associée à des niveaux inférieurs de thyroxine (T4) dans le sérum, chez le rat (Ernest *et al.*, 2012, Kodavanti *et al.*, 2010, van der Ven *et al.*, 2006). Les études épidémiologiques sont toutefois moins concluantes. Chez des nouveau-nés, la présence de divers PBDE dans le cordon ombilical a été associée à des niveaux inférieurs de T4 circulant (Herbstman *et al.*, 2008). Par contre, une étude a plutôt associé un taux élevé de T4 à une exposition au BDE47, 99 et 100, chez des femmes enceintes ainsi que leur progéniture (Stapleton *et al.*, 2011). De plus, quelques études ont rapporté qu'il n'y avait pas de lien entre les taux de PBDE dans le sérum et les taux d'hormones thyroïdiennes circulant chez des pêcheurs, chez des nouveau-nés ou chez des enfants de 4 ans (Bloom *et al.*, 2008, Chevrier *et al.*, 2011, Eggesbo *et al.*, 2011).

Les mécanismes proposés pour la baisse du taux circulant de T4, en réponse au PBDE, incluent la glucoronidation mais aussi la déiodination, le transport actif et la sulfation (Szabo *et al.*, 2009). Aussi, des études *in vitro* ont identifiés une compétition entre certains BFRs et T4 pour la liaison à la transthyréine (TTR), la protéine de transport de la T4 dans le sang (Hamers *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2000). Ceci pourrait potentiellement expliquer la diminution des taux de T4.

Les BFRs peuvent aussi exercer leurs effets de perturbateur endocrinien au niveau de d'autres voies de signalisation (Ceccatelli *et al.*, 2006, Haave *et al.*, 2011, Hamers *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2001, Stoker *et al.*, 2005, Suvorov *et al.*, 2009). Il a été démontré dans des expériences réalisées avec des ostéoblastes humains (Hamers *et al.*, 2006) et lors d'une expérience réalisée chez des rats exposés à des BFRs de façon périnatale (Stoker *et al.*, 2005), que certains BFRs exercent une action antagoniste sur AR. Une exposition périnatale à un mélange de BFRs a aussi été associée à une augmentation de la transcription de la protéine de liaison du facteur de croissance ressemblant à l'insuline (« insulin like growth factor binding protein » ou Igf2b) au niveau du cerveau (Haave *et al.*, 2011). La modulation de cette protéine de liaison peut altérer la signalisation avec IGF-1.

Au niveau de la signalisation oestrogénique, un mécanisme impliquant une sulfotransférase a été proposé pour expliquer l'effet des TBBPA et de certains métabolites de PBDE (Gosavi *et al.*, 2013). En temps normal, la sulfotransférase est une enzyme clé de la régulation du taux circulant d'oestradiol. Elle engendre la sulfation de l'oestradiol, ce qui induit la perte de sa liaison avec ER et augmente le taux d'oestradiol disponible pour l'excrétion rénale (Gosavi *et al.*, 2013). Certains BFRs ou encore leurs métabolites viendraient ainsi inhiber la sulfotransférase et augmenteraient le taux d'oestrogène dans le sang. Cette hypothèse fut corroborée lors d'une étude épidémiologique qui a établi une association entre le niveau de PBDE dans la poussière domestique et un taux élevé d'oestradiol dans la circulation sanguine chez l'homme (Johnson *et al.*, 2013).

Il a aussi été suggéré que des BFRs pourraient interagir directement au niveau de ER puisqu'ils régulent la transcription de gènes oestrogène-dépendant (Ceccatelli *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2001). Une étude réalisée avec des cellules T47D a permis de définir un rôle agoniste pour certains BFRs, et leurs métabolites, sur les récepteurs ER α et ER β grâce à des dosages de la luciférase (Meerts *et al.*, 2001). En fait, les PBDE contenant peu d'atomes de brome activaient le récepteur tandis que les PBDE contenant plusieurs atomes de brome agissaient comme antagonistes du ER (Meerts *et al.*, 2001).

Les perturbateurs endocriniens peuvent avoir des répercussions d'autant plus importantes lorsque l'exposition est périnatale, c'est-à-dire durant la gestation et/ou la lactation. Plusieurs études associent une exposition périnatale à des perturbateurs endocriniens et un risque augmenté de cancer du sein à l'âge adulte (Soto *et al.*, 2013). L'exemple le plus connu est le cas du Diethylstilboestrol (DES), un composé administré chez les femmes enceintes dans les années 1948-1971 afin de prévenir les avortements spontanés. Des études épidémiologiques chez les femmes ayant reçu ce composé ainsi que chez leurs filles, exposées *in utero*, montrent que l'incidence de cancer du sein est plus élevée chez les deux groupes (Calle *et al.*, 1996, Palmer *et al.*, 2006). De façon similaire, une exposition périnatale au Bisphénol A (BPA) augmente la sensibilité aux hormones mammothrophiques au moment de la puberté et à l'âge adulte (Ayyanan *et al.*, 2011, Munoz-de-Toro *et al.*, 2005), tout comme l'incidence d'hyperplasie mammaire et de cancer du sein (Murray *et al.*, 2007, Palmer *et al.*, 2006). Ainsi, si la maturation des voies de signalisation hormonales est affectée suite à une exposition périnatale, les conséquences plus tard dans la vie peuvent être multiples (Fenton *et al.*, 2012).

1.7.3 Autres effets néfastes connus

Plusieurs études *in vitro*, *in vivo* ou encore épidémiologiques ont démontré les effets néfastes d'une exposition à des BFRs. Divers types de BFRs ou mélanges de BFRs semblent affecter le développement du système nerveux, la maturation pubertaire, les systèmes reproducteurs mâle et femelle, le développement de la glande mammaire et semblent également augmenter les risques de développer plusieurs cancers (Den Hond *et al.*, 2015, Ernest *et al.*, 2012, Hendriks *et al.*, 2015, Kodavanti *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2012, Windham *et al.*, 2015). Il est important de retenir cependant que chaque congénère ou mélange spécifique de BFRs peut avoir des effets sensiblement différents.

Système nerveux

L'effet au niveau du développement neuronal peut être expliqué en partie par le déséquilibre des hormones thyroïdiennes qui sont critiques pour la fonction cérébrale normale (Linares *et al.*, 2015). L'effet préférentiel des PBDE sur le taux de T4 a des implications neurologiques importantes puisque 80% des hormones thyroïdiennes dans le cerveau sont dérivées de la T4 de la circulation systémique (Silva *et al.*, 1984). Les effets neurodéveloppementaux les plus importants incluent les déficits de l'attention, les troubles de coordination motrice et les troubles cognitifs (Bradman *et al.*, 2012, Eskenazi *et al.*, 2013).

Un mécanisme impliquant la perturbation de voies de signalisation intracellulaire a été proposé pour expliquer l'effet d'une exposition aux PBDE sur le neurodéveloppement. Les PBDE agiraient au niveau de la protéine kinase C et au niveau de l'équilibre calcique des neurones, deux facteurs impliqués dans le développement du système nerveux (Coburn *et al.*, 2008, Kodavanti *et al.*, 2005). Une étude *in vitro*, réalisée avec des cellules neuronales progénitrice humaine (hPNCs), a démontré que certains PBDE peuvent altérer le développement des hPNCs en perturbant la signalisation avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes. Les effets néfastes sur la migration et la différenciation des cellules hPNCs suite à une exposition aux PBDE disparaissaient quand les récepteurs aux hormones thyroïdiennes étaient activés par l'administration d'un agoniste, la triiodothyronine (T3) (Schreiber *et al.*, 2010).

Puberté

Un autre effet important des BFRs, modulé par leur action sur le système endocrinien, est le délai de la maturation pubertaire. Une étude épidémiologique basée sur une cohorte d'enfants aux Pays-Bas suggère que le développement des seins chez les jeunes filles, et la première éjaculation chez les jeunes garçons, sont tous deux retardés par une exposition prénatal aux PBDE (Windham *et al.*, 2015). De façon similaire, plusieurs études avec des modèles animaux démontrent un délai de la maturation pubertaire chez les femelles suite à une exposition péripubertal ou prénatal a des BFRs (Kodavanti *et al.*, 2010). Cet effet a été mesuré à la fois chez le rat femelle, en utilisant la première ouverture vaginale, et chez l'humain, en se basant sur l'apparition des seins et de la pilosité pubienne (Kodavanti *et al.*, 2010, Windham *et al.*, 2015).

Système reproducteur

Plusieurs études ont démontré un lien entre un exposition à des BFRs et des effets néfastes au niveau du système reproducteur mâle. Des études *in vivo* ont démontré, grâce au compte des spermatides et des spermatozoïdes, que la spermatogénèse était affectée par une exposition périnatale aux PBDE chez le rat (Kuriyama *et al.*, 2005). Une diminution du poids de la prostate ventrale ainsi que de la vésicule séminale a aussi été observé chez le rat après une exposition à une forte dose de DE-71 (Stoker *et al.*, 2005). De façon similaire, des études épidémiologiques ont observé une association entre des niveaux sanguins élevés de PBDE et un risque accru d'hypo-fertilité mâle, défini grâce à la mesure de la motilité des spermatozoïdes (Den Hond *et al.*, 2015). Chez des rats femelles, une exposition périnatale à de faibles concentrations de PBDE a été associée à un faible poids

ovarien et des changements au niveau de la folliculogénèse (Talsness *et al.*, 2008). Des études épidémiologiques réalisées chez la femme ont également pu démontrer une association entre des taux élevés de PBDE dans le sérum et une diminution significative de la fécondité (Harley *et al.*, 2010).

Cancer

Peu d'études ont étudié les liens entre une exposition aux BFRs et le cancer. *In vivo*, un lien a été établi entre une exposition au deca-BDE et des nodules néoplasmiques du foie et un nombre plus élevé d'adénomes dans le pancréas lors d'expériences réalisées avec des rats dans le cadre du National Toxicology Program (NTP, 1986) (Y. R. Kim *et al.*, 2014). *In vitro*, une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et des cellules du cancer du col de l'utérus a été observée suite aux traitements avec PBDE-209 (Li *et al.*, 2012). Ainsi, le risque de développer certains types de cancers pourrait être augmenté suite à une exposition à des BFRs.

Glande mammaire

Jusqu'à présent, une seule étude s'est intéressée aux effets des BFRs sur le développement de la glande mammaire. Un délai dans le développement des glandes mammaires a été observé chez des femelles rats traitées avec une mixture de PBDE *in utéro* et via l'allaitement. Plus spécifiquement, les chercheurs ont observé une diminution de la croissance de l'épithélium des glandes mammaires, un développement limité au niveau des bourgeons terminaux et un faible taux d'embranchement au moment de la puberté (Kodavanti *et al.*, 2010). Il a été démontré que tout facteur pouvant prolonger le développement ou ralentir la maturation de l'épithélium mammaire, comme c'est le cas pour certains BFRs, peut rendre la glande mammaire vulnérable à l'effet de carcinogènes (Fenton *et al.*, 2012). C'est pourquoi il est primordial de déterminer les effets d'une exposition à des BFRs sur les marqueurs du cancer du sein.

1.8 Problématique

De ces études, quelques points importants ressortent et ils constituent la base de ce projet :

- Le développement de la glande mammaire est hautement régulé par les hormones;
- ER, PR, HER2 et TR sont impliqués à la fois dans le développement normal des glandes mammaires et dans le cancer du sein;
- La TEM est un processus important de la progression tumorale et entraîne une dérégulation des jonctions cellulaires;
- Plusieurs BFRs sont des perturbateurs endocriniens qui agissent, entre autres, au niveau des hormones thyroïdiennes;
- L'effet d'une exposition à des BFRs sur le développement mammaire et le développement du cancer du sein a été très peu étudié.

En somme, peu d'études portent sur les effets des BFRs sur les glandes mammaires et sur le cancer du sein. Par contre, vu leurs effets au niveau du système endocrinien et vu que l'humain y est exposé de façon chronique, il est crucial de déterminer l'effet d'une exposition à un mélange de BFRs sur les glandes mammaires.

1.9 Hypothèse

Plusieurs retardateurs de flammes bromés (BFRs) ainsi que leurs métabolites sont des perturbateurs endocriniens connus. Puisque le développement des glandes mammaires est induit et étroitement régulé par des hormones et que certains BFRs sont des polluants environnementaux qui miment l'action des hormones, nous supposons qu'une exposition à un mélange de BFRs augmente les risques de développement anormal des glandes mammaires et de cancer du sein. De plus, puisque des changements dans l'expression normale des protéines de jonctions intercellulaires ont été associés à des anomalies développementales et au cancer du sein, nous émettons l'hypothèse que le mécanisme de toxicité des retardateurs de flammes bromés implique une dérégulation des jonctions intercellulaires.

1.10 Objectifs

1. Évaluer les effets d'une exposition périnatale à un mélange de BFRs représentatif de l'exposition réelle (Annexe 1) sur le développement des glandes mammaires et sur des marqueurs du cancer de sein.
2. Déterminer les mécanismes de toxicité d'un mélange de BFRs en portant une attention particulière au rôle des jonctions intercellulaires.

CHAPITRE 2 :

PERINATAL EXPOSURE TO BROMINATED FLAME RETARDANTS SUPPRESSES E-CADHERIN AND THYROID HORMONE RECEPTOR α EXPRESSION IN MAMMARY GLANDS AT PUBERTY

Traduction du titre en français : Une exposition périnatale aux retardateurs de flammes bromés réprime l'expression de E-cadhérine et du récepteur α aux hormones thyroïdiennes dans les glandes mammaires, au moment de la puberté

Auteurs

Mélanie Lavoie, étudiante à la maîtrise en sciences expérimentales de la santé, INRS, Institut Armand-Frappier

Elham Dianati, étudiante au doctorat en biologie, INRS, Institut Armand Frappier

Mike Wade, Santé Canada

Barbara Hales, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology & Therapeutics, McGill University

Isabelle Plante, Directrice de recherche, INRS, Institut Armand Frappier

Contribution des auteurs

Toutes les expériences et analyses contribuant au développement de cet article ont été réalisées par la première auteure, Mélanie Lavoie, à l'exception de la dissection des glandes mammaires qui a été réalisée par Elham Dianati. L'article a été rédigé par Mélanie Lavoie, en collaboration avec Isabelle Plante. La directrice de recherche, Isabelle Plante, a supervisé l'avancement du projet de recherche. Mike Wade et Barbara Hales ont contribué à l'élaboration du projet et du design expérimental. Ils ont également participé à la révision du manuscrit en vue de sa publication. Les rats ont été hébergés et traités sous la supervision de Mike Wade. Les coûts associés à l'hébergement des rats ont été financés par une subvention des IRSC accordée à Barbara Hales.

Résumé de l'article

Les retardateurs de flammes bromés (BFRs) sont une famille de molécules omniprésentes dans les produits domestiques et industriels afin de ralentir leur combustion. L'utilisation de certaines molécules, notamment le hexabromocyclododécane (HBCD) et certains éthers diphényles polybromés (PBDE), est désormais restreinte en raison de leur persistance, leur bioaccumulation et leur toxicité. Par contre, l'exposition humaine subsiste car des BFRs sont toujours libérés d'items existants. Il a été démontré que les BFRs sont des perturbateurs endocriniens. Cependant, leurs effets sur le développement des glandes mammaires et sur le cancer du sein ne sont toujours pas connus.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets d'une exposition périnatale à un mélange de BFRs sur le développement de la glande mammaire et sur des marqueurs du cancer du sein, et de déterminer les mécanismes toxicologiques de ce mélange de BFRs.

Des rattees ont été exposées oralement à trois différentes doses d'un mélange de BFRs deux semaines avant l'accouplement, durant la grossesse et durant la lactation. Les filles de ces femelles ont été sacrifiées 21, 46 et 208 jours après la naissance.

Les traitements n'ont eu aucun effet significatif, que ce soit au niveau du poids des animaux et des glandes mammaires, ou encore sur le développement ductal. Par contre, l'expression d'E-cadhérine est inhibée au moment de la puberté (jour 46) dans le groupe ayant reçu la plus faible dose du mélange de BFRs. Cependant, l'expression protéique de N-cadhérine et Vimentine, deux marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, et des protéines jonctionnelles β -caténine, connexine 26 et connexine 43 n'est pas significativement affectée. De façon similaire, le traitement n'affecte pas l'expression de récepteurs hormonaux majeurs, soit le récepteur aux hormones thyroïdiennes β , le récepteur à l'œstrogène (α et β) et le récepteur à la progestérone (A et B), mais inhibe l'expression du récepteur aux hormones thyroïdiennes α (TR α). Nos résultats suggèrent qu'une exposition périnatale à un mélange de BFRs peut affecter le système endocrinien et l'adhésion entre les cellules au moment de la puberté.

Article

Perinatal Exposure to Brominated Flame Retardants Suppresses E-cadherin and Thyroid Hormone Receptor α Expression in Mammary Glands at Puberty

Mélanie Lavoie¹, Elham Dianati¹, Mike Wade², Barbara Hales³ and Isabelle Plante¹

1 : INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec

2 : Health Canada, Ottawa, Ontario

3 : Faculty of Medicine, Department of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec

* For correspondence : Isabelle Plante

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, QC

H7L 5S1

isabelle.plante@iaf.inrs.ca

Abstract

Brominated flame retardants (BFRs) are chemicals widely used in consumer products including electronics, vehicles, plastics and textiles to reduce ignition rates. Even though usage of some BFRs has been restricted in many countries, mainly due to their persistence, bioaccumulation and potential toxicity, human exposure continues as BFRs are still released from existing items. Also, the role of BFRs in breast development and cancer, as well as the mechanisms implicated in the compounds' toxicity, remain poorly understood. This project aimed to assess the effects of a perinatal exposure to a mixture of BFRs on mammary gland development and various breast cancer markers, and to determine mechanisms involved in BFRs' toxicology. Female rats were exposed through diet to an environmentally relevant mixture of BFRs two weeks prior to mating, during gestation and during lactation. Female offspring were sampled at critical stages of mammary gland development including post-natal day 21 (PND21), 46 (PND46) and 208 (PND208). BFRs treatment had no significant effect on total body weight or mammary gland weight nor did it affect the epithelial surface area or the elongation of the lactiferous ducts. The protein expression of E-cadherin, a protein involved in adherence junctions and down-regulated during epithelial to mesenchymal transition (EMT), was significantly down-regulated in the rats that received the lowest dose at PND46. The expression of other markers of the EMT, namely vimentin and N-cadherin, and of the junctional proteins β -catenin, connexin26 and connexin43, were not significantly affected by BFRs treatment. No effects were observed on the estrogen or the progesterone receptors. However, the thyroid hormone receptor alpha (TR α) was significantly down-regulated at puberty (PND46) in the rats that received the lowest dose of the BFRs mixture. These results suggest that a perinatal exposure to a mixture of BFRs can affect protein regulation later on during puberty, a sensitive period of life for mammary development and breast cancer.

Introduction

Unlike most organs, mammary gland development is a multiple stages process, which occurs mainly after birth. At birth, only a rudimentary tree-like ductal structure is present (Hinck *et al.*, 2005). Development resumes at the time of puberty as the ovaries produce a surge of estrogens (Mallepell *et al.*, 2006). A second phase of development occurs during pregnancy, with the development of the milk-secreting structures, the alveoli (Hurley, 1989, Sternlicht *et al.*, 2006). At weaning, the gland goes through an important phase of apoptosis and regression, named involution (Hughes *et al.*, 2012, Hurley, 1989). Importantly, throughout adult life, the gland undergoes cycles of proliferation-regression with every menstrual cycle (Briskin, 2002).

The human breast contains two major types of tissues: the epithelial tissue, a ramified tree-like structure, and the stroma, mainly composed of extracellular matrices and adipocytes (Hassiotou *et al.*, 2013). Two layers of epithelial cells are present in the former. The luminal cells form the inner layer that encapsulates the ductal lumen while the basal layer, mainly composed of contractile myoepithelial cells, surround the luminal cells and lie on a basal membrane (Hassiotou *et al.*, 2013). A bidirectional cross-talk between these two layers of cells is required for the proper development of the mammary gland, and dysregulation of these interactions has been linked to breast cancer (Bissell *et al.*, 1999, Briskin *et al.*, 2010, Hinck *et al.*, 2005)

Cell-cell interactions involve various mechanisms, including gap junctional intercellular communication (GJIC). Gap junctions (GJ) are specialized transmembrane channels made of a family of proteins named connexins (Cxs). They allow direct communication between adjacent cells (El-Saghir *et al.*, 2011). In rodent mammary gland, Cx26, Cx30 and Cx32 are present between luminal cells in a phase-dependent manner, while Cx43 is mainly expressed between myoepithelial cells at all stages (McLachlan *et al.*, 2007). Down-regulation of GJIC or dysregulation of Cxs has been associated with delayed development and impaired function of mammary gland, as well as increased breast carcinogenesis (Naus *et al.*, 2010). GJ are also closely associated with adherens junctions, which mediate cell-cell adhesion in epithelial cells. Adherens junctions are composed of transmembrane proteins, the cadherins, and cytoplasmic proteins, the catenins (Lien *et al.*, 2006). Down-regulation of E-cadherin is one of the hallmarks of the epithelial to mesenchymal transition (EMT), a process by which epithelial cells acquire mesenchymal characteristics that enable them to migrate towards surrounding tissues (Eger *et al.*, 2000)

EMT causes the epithelial cells to lose their polarity and helps them to gain motility during breast cancer progression (Kalluri *et al.*, 2003).

Since hormones tightly regulate mammary gland development, this organ is especially vulnerable to the effects of endocrine disruptors (EDs). EDs are molecules that mimic or block the effects of endogenous hormones (Rice *et al.*, 2003). Accordingly, a perinatal exposure to various EDs has been associated with developmental defect and increased risk of breast cancer at adulthood (Fenton *et al.*, 2012). Similarly, in human, epidemiological studies have demonstrated that exposure to EDs increases the risk for breast cancer (Jenkins *et al.*, 2012). The odds of developing breast cancer are even more important if women are exposed during vulnerable periods involving important remodelling of the mammary glands, such as pregnancy, lactation or early life (Fenton *et al.*, 2012).

Brominated flame retardants (BFRs) are chemicals widely used in consumer products to reduce flame propagation and ignition rates (Berger *et al.*, 2014). They can be found in electronics, vehicles, plastics and textiles, amongst others. Evidence suggests that many BFRs act as EDs, having anti-androgenic and estrogenic properties (Y. R. Kim *et al.*, 2014). Also, studies have shown that some BFRs may interfere with thyroid hormone regulation (Y. R. Kim *et al.*, 2014). However, the role of BFRs in mammary gland development and breast cancer, as well as the mechanisms implicated in the compound's toxicity, are poorly understood.

This study aimed to evaluate the impact of BFRs exposure on mammary gland. More specifically, the goals were to 1) assess the effects of perinatal exposure to a mixture of BFRs on mammary gland development and on various breast cancer markers in the female offspring, and 2) determine mechanisms implicated in BFRs' toxicology.

Materials and methods

Animals

Animals and treatment methods was described previously (Lefevre *et al.*, 2016). Briefly, virgin female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories. Animals were housed individually at Health Canada in rooms maintained at 20°C on a 12L: 12D photoperiod. Food and water were provided ad libitum. All animal studies were conducted in accordance with the procedures and principles outlined in the Guide to the Care and Use of Experimental Animals prepared by the Canadian Council on Animal Care under protocol 4456. Following one week of acclimatization to the control diet, female rats were randomly

assigned to one of four experimental conditions (N = 35-38 per group) and fed a BFRs supplemented diet for 2-4 weeks before mating. During this period, estrous cyclicity was evaluated by analyzing vaginal cytology as previously described (Goldman *et al.*, 2007). Females in proestrus were caged with proven breeder male Sprague-Dawley rats (maintained on the control diet) overnight.

Sample collection

Pups were euthanized with CO₂ immediately followed by heart puncture at post-natal day 21 (PND21), PND46 and PND208, which correspond to the pre-puberty, puberty and adult phases, respectively. Mammary glands #4 and #5 (abdominal and inguinal, respectively) were removed and weighed. Both left and right inguinal mammary glands as well as left abdominal mammary glands were snap frozen immediately after excision and stored at -80°C. Right abdominal mammary glands were immediately transferred onto large slides then fixed in Carnoy and stained. Mammary glands #2 and #3 (upper-thoracic and thoracic, respectively) were excised (right side only). They were embedded in tissue-tek O.C.T compound (VWR) on dry ice and stored at -80°C.

Brominated Flame Retardants Formulation

Formulation of the BFRs mixture was described previously (Ernest *et al.*, 2012). Briefly, three technical PBDE mixtures (DE-71, DE-79 and BDE 209) and one HBCD mixture were combined to yield a ratio of PBDE congeners and HBCD comparable to the median levels observed in Boston house dust (Allen *et al.*, 2008, Stapleton *et al.*, 2008). This BFRs mixture was incorporated into an isoflavone-free diet (Teklad Global 2019 diet; Harlan Laboratories, Madison, WI) with 4.3g/kg corn oil. Diets were formulated to contain 0, 0.75, 250 or 750 mg of BFRs mixture/kg. The diet formulations were intended to deliver nominal doses of 0, 0.06, 20 and 60mg/kg body weight/day. The lowest dose was estimated to be a close approximation of maximum human exposure, based on a dust ingestion rate of 100mg/day in children (16.5kg body weight) and the scaling of dose from humans to rodents (1:6.9, human to rat body surface area ratio) (Allen *et al.*, 2008, Stapleton *et al.*, 2008).

Masson Trichromatic Staining

Sections of 10µm of thickness were obtained by cryosection at -35°C from mammary glands embedded in tissue-tek O.C.T compound (VWR) and transferred onto slides. Slides were fixed in Bouin's solution overnight and rinsed with tap water (10 minutes). Slides were incubated in Weigert's iron hematoxylin (10 minutes), in Biebrich scarlet-acid fuchsin (15

minutes), in phosphomolybdic-phosphotungstic acid (20 minutes), submerged in aniline blue solution (5 minutes) and in 1% acetic acid (5 minutes). Slides were dehydrated in 95% ethyl alcohol (5 minutes), absolute ethyl alcohol (5 minutes) and xylene (5 minutes). Slides were mounted with resinous mounting medium (permount).

Ductal elongation and surface area measurements

Ductal elongation and surface area were measured using pictures of mammary gland whole mounts and Image J software. Ductal elongation was measured by tracing a line from the proximal lymph node to the end of the longest branch. Surface area was measured by tracing the best-adjusted contour of the mammary epithelium.

Protein extraction

500 mg sections of snap-frozen mammary gland were cut and mechanically transformed into a powder on dry ice. Powdered samples, once weighed, were snap frozen in liquid nitrogen. RIPA buffer (1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0.5% NP-40) supplemented with 100 mM NaF; 100 mM sodium orthovanadate; 100mM Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce, Rockford, IL) adjusted to pH 7.4) was added to each sample. Each sample, dissolved in lysis buffer, was sonicated after a 30 minute incubation at 4°C. After a 20 minute centrifugation at 4°C, supernatants were aliquoted and stored at -80°C until further processing. All steps were performed on ice.

Western Blot

Protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo scientific #23227). For each sample, 30 µg of protein was separated onto SDS-PAGE gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 10%, BioRad, Mississauga, ON) and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1 % Tween 20 containing 3 % bovine serum albumin (BSA) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (B-catenin (1/1000), Cell Signaling (8480); E-cadherin (1/1000), Cell signaling (14472); Cx43 (1/5000), Sigma Aldrich (C6219); Cx26 (1/750), Invitrogen (33-5800); ERα (1/400), Abcam (Ab75635); ERβ (1/500) Santa Cruz (SC-8974); PR-A/B (1/500), Abcam (ab16661); STAT1 (1/1000), Cell signaling (9172); N-cadherin (1/1000), Cell signaling (4061); Vimentin (1/1000), Cell signaling (5741); Thyroid Hormone Receptor α (TRα) (1:500), Abcam (Ab53729); TRβ (1/1000), Abcam (Ab196484)). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (goat-anti-rabbit (1/10 000), Cell signaling (7074); horse-anti-mouse (1/10 000), Cell signaling (7076)) were used. Chemiluminescent signals

were detected using the Clarity western ECL substrate (BioRad) and analysed using ChemiDoc MP System and ImageLab software (BioRad). Protein expressions were normalised on total lane protein.

Statistic

Data were analyzed using GraphPad (6th edition) using a Student *t* test or ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test when conditions of applications were respected. Otherwise, a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test were used.

Results

BFRs exposure has no significant effect on global mammary gland development

In order to assess global toxicity of the BFRs mixture, we first measured total body weights and mammary gland weights at time of sacrifice (Figure 1). At all time points, treatment with BFRs did not significantly alter body weights. Similarly, mammary gland weights were not affected by the treatments (Figure 1B, D, F).

Next, to assess the impact of the BFRs treatment on mammary gland morphogenesis, we further assessed mammary gland development by measuring the elongation and surface area of the epithelium. Consistent with normal development of the mammary gland, at PND21, ducts and branches from control mice were elongated away from the lymph node, and terminal end buds (TEBs) were numerous (Figure 2A, B). At PND46, ducts reached toward the periphery of the fat pad and side branches were abundant (Figure 2C, D).

Finally, at PND208, the ductal system was well implanted in the fat pad with numerous side branches with little or no evidence of TEBs (Figure 2E, F). Whole mounts showed similar epithelial growth for the control and the treated groups (Figure 2). TEBs were also counted at PND46, the time of puberty, to assess normal development but also normal timing of development. Once again, this marker was not significantly affected by perinatal exposure to the BFRs mixture (Figure 2G).

We then examined the effect of BFRs on mammary gland structure using Masson Trichrome staining on mammary gland tissue sections. As expected, the sections of mammary gland at PND46 showed a few ducts, surrounded by many adipocytes (Figure 3). The luminal cells delimit the lumen and the myoepithelial cell layer is surrounded by

extracellular matrix that contains a lot of collagen and fibroblasts (Figure 3). Lymph nodes are also observed encompassed in extracellular matrix (Figure 3). No significant differences were observed in the treated groups when compared to control. Together, our results showed that a perinatal exposure to a mixture of BFRs did not affect global mammary gland development. However, some developmental markers could still be affected by the treatment.

BFRs-induced E-cadherin down-regulation is not associated with modulation of other markers of the epithelial to mesenchymal transition (EMT)

After ruling out large-scale anatomical effects with whole mount techniques, we proceeded with western blot in order to identify changes in protein expression. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a hallmark of cancer. Because it has been suggested that a perinatal exposure to EDs is linked to breast cancer later on in adulthood (Fenton *et al.*, 2012), we first wanted to determine if BFRs could promote EMT in rat mammary gland. Cells undergoing this transition can be identified by their downregulation of epithelial markers such as E-cadherin and their upregulation of mesenchymal markers such as N-cadherin and Vimentin. Our results showed that E-cadherin expression was down-regulated at puberty (PND46) in the group that received the lowest dose of the BFRs mixture (Figure 4B), but not at PND21 and PND208 (Figure 4A, B).

We next evaluated the expression of two mesenchymal markers, namely Vimentin (Figure 5A) and N-cadherin (Figure 5B) by western blot in the PND46 rats. Our results showed that while the epithelial marker E-cadherin was significantly down-regulated in the group that received the lowest dose (Figure 4A), neither of the mesenchymal markers were up-regulated in treatment groups when compared to the control group (Figure 5), indicating that EMT is not occurring in response to BFRs treatment.

BFRs treatment has an impact on adherence junction, but not on gap junctions

Because E-cadherin was decreased but other markers of EMT were not modified by the treatment (Figures 4, 5), we then speculated that the cell-cell interactions nexus rather than EMT was affected by the treatment. We thus determined the effect of BFRs on β -catenin, and Cx43 and Cx26, components of adherens junctions and GJ, respectively. We showed that while Cx43 protein expression seems to be down-regulated in rats that received the lowest dose of the BFRs mixture, Cx43 and Cx26 protein expression were not significantly affected by BFRs treatment (Figure 6A, B, E, F). Similarly, we found that β -

catenin was not significantly affected by the treatment (Figure 6 C, G)

STAT1, a developmental marker, is unaffected by treatment with the BFRs mixture at PND46

STAT1 is known to be present in mammary gland in virgin rodents. While its function during mammary gland development is poorly understood, dysregulation of STAT1 has been linked to tumor suppression in breast cancer (Koromilas *et al.*, 2013). We thus next assessed STAT1 levels. The protein expression of STAT1 was not significantly altered by treatment with BFRs (Figure 7A). STAT1 is a transcription factor that undergoes dimerization and nuclear translocation when phosphorylated. Phospho-STAT1 could not be detected in both control and treated animals (Figure 7B), suggesting that STAT1 was not activated in our tissue samples.

Thyroid Hormone Receptor alpha (TR α) is down-regulated by BFRs treatment at puberty whereas Estrogen and Progesterone receptors are not affected

While intercellular junctions are known to play a role in mammary gland development, hormones and their receptors are essential to normal development, especially during puberty. At this time point, the two most important hormones are estrogen and progesterone and their receptors, ER α and PR-B, ensure proper signalling. Since BFRs are known EDs, it was crucial to verify whether the treatment affects hormone receptor's expression. ER α (Figure 8A, E) and PR-A/B receptors (Figure 8B, F), as well as ER β (data not shown), were not affected by perinatal BFRs exposure.

In previous studies with BFRs, the systemic level of thyroid hormones was significantly reduced by BFRs treatment. While thyroid hormones are not essential for mammary gland development, dysregulation of their receptors has been linked to breast cancer (Conde *et al.*, 2006). For these reasons, we investigated the thyroid hormone receptors present in the mammary gland: TR α and TR β . TR α protein expression was significantly down-regulated in rats that received the lowest dose of the BFRs mixture (Figure 8C, G). While TR β protein expression seems to follow the same pattern, these changes were not statistically significant (Figure 8D, H).

Discussion

BFRs are chemicals widely used in consumer products to reduce ignition rates. Although use of particular congeners has been restricted for a few years now, their concentrations remain high in various human tissues and matrices, including milk and

mammary gland (Stasinska *et al.*, 2014). Studies have demonstrated that many BFRs have endocrine disruptive properties. Thus, this study aimed to determine whether a perinatal exposure to a mixture of BFRs could affect mammary gland development or promote breast cancer. Our results showed that gross mammary gland development was not affected by BFRs. Similarly, markers of EMT and components of the gap junctions studied were not affected at puberty. However, the treatment down-regulated E-cadherin and TR α expression at a dose which is considered a close approximation to human exposure. Together, our results showed that while little effects were observed, a perinatal exposure to a mixture of BFRs at an environmentally relevant dose could affect protein expression later on, at puberty.

Mammary gland development is not affected by a perinatal exposure to BFRs

Very few studies have considered the impact of BFRs exposure on mammary gland development. One study, conducted with rats, sought to determine the effects of a perinatal exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71, on neurobehavioral, hormonal and reproductive outcomes (Kodavanti *et al.*, 2010). The authors found that there was a significant delay in mammary gland development in the female offsprings of rats treated during pregnancy and lactation. Outgrowth of the epithelium was suppressed at post-natal day 21 (PND21) as assessed by carmine staining and subsequent scoring. There was also fewer TEBs and branches at the time of puberty (Kodavanti *et al.*, 2010). Our results, however, suggest that gross epithelial growth was not affected by perinatal exposure to a BFRs mixture. This discrepancy could be due to the difference in the composition of the BFRs mixture used. DE-71 is a widely used Penta-PBDE while our mixture was composed of three technical PBDE (DE-71, DE-79 and BDE 209) and one HBCD, combined to yield a ratio of PBDE congeners and HBCD comparable to the median levels observed in Boston house dust (Allen *et al.*, 2008, Stapleton *et al.*, 2008). While using DE-71 alone can inform us on the direct impact of this mixture, the BFRs mixture used in this study allows us to better characterize the impact of BFRs in terms of current exposures.

Another possible explanation for this discrepancy is the different strains of rats that were used. Studies have shown that mammary tumour formation following Atrazine exposure was strain dependant as Sprague-Dawley and F344 rats responded differently (Eldridge, 1998). Others have compared mammary gland development following Atrazine prenatal exposure in Sprague-Dawley and Long-Evans rats and have identified significant differences (Wolf, 2010). This may explain why Kodavanti *et al.* (2010) observed significant

delay in mammary gland development in Long-Evans rats exposed to BFRs while we did not observe these effects in our Sprague-Dawley rats.

A perinatal exposure to BFRs had no effect on chosen markers of EMT or gap junctions

Few studies have assessed the impact of BFRs on breast cancer development or progression and the limited data available is not very conclusive. One in vitro study has shown that PBDE-209 stimulates breast cancer cell proliferation in the MCF-7 cell line (Li *et al.*, 2012). Another study with MCF-7 cells showed PBDE (congeners 47, 99, 153, 183 or 209) were capable of damaging cell genome (Barber *et al.*, 2006). However, a case-control study, that assessed the link between adipose tissue concentrations of PBDE and breast cancer risk in California, found no such association (Hurley, 1989).

It has been shown, in lung cancer cells as well as liver carcinoma cells, that both HBCD and hydroxylated PBDE (a common PBDE metabolite) can promote cancer cell migration and invasion through the activation of EMT (Qu *et al.*, 2015, Zhong Y, 2014). More specifically, 6-OH-BDE-47 induction of EMT in lung cancer cells was confirmed by down regulation of epithelial markers (E-cadherin and Zona Occludin-1 (ZO-1)) as well as up regulation of mesenchymal markers (Vimentin and N-cadherin) (Qu *et al.*, 2015). E-cadherin down-regulation was also detected in human mammary stem cells in response to BPA, another endocrine disrupting chemical that has been studied more extensively (Yang *et al.*, 2013). Based on these results, we assessed the effects of our BFRs mixture on various EMT markers in mammary glands. We found that E-cadherin was significantly down-regulated at the time of puberty in the group that received the lowest dose. Despite that, the other epithelial and mesenchymal markers were unaffected which suggests that EMT was not likely activated in our tissues. However, we assessed a very limited amount of markers: E-cadherin, β -catenin, Vimentin and N-cadherin. In order to confidently rule out the activation of EMT, it would be necessary to assess different EMT markers such as snail or slug, two transcription factors that are upregulated during EMT (Kokudo *et al.*, 2008, Medici *et al.*, 2008).

E-cadherin is a major component of adherens junctions. Many studies have demonstrated that components of adherens junctions interact, co-localize and immunoprecipitate with components of GJ (Talhouk *et al.*, 2013, Talhouk *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2001) Moreover, E-cadherin and Cxs down-regulate concomitantly in

many tumors, and can be regulated through common pathways (Plante *et al.*, 2006, Plante *et al.*, 2005). This is why a down-regulation in E-cadherin protein expression led us to believe that BFRs exposure might affect GJ proteins Cx26 and Cx43. Very limited data exists on the impact of BFRs exposure on GJ. Tetrabromobisphenol A (TBBPA), one of the main BFRs, has been shown to inhibit GJIC in an epithelial liver cell line (Samuelsen, 2014). In the present study, we found that Cx26 was unaffected by a perinatal exposure to a mixture of BFRs. While there seems to be downregulation of Cx43 expression in rats that received the lowest dose, this effect was not statistically significant. Nevertheless, it would be important to study protein localization as Cxs can only participate in GJIC when they are located at the plasma membrane (Xie *et al.*, 1997).

ER and PR are not affected by a perinatal exposure to BFRs

It has been demonstrated that many BFRs have estrogenic properties and affect progesterone signalling (Ceccatelli *et al.*, 2006). However, to our knowledge, this is the first study to assess the effect of BFRs exposure on mammary ER and PR expression. One *in vitro* study has described the PR antagonistic activity of different BFRs, including some PBDE and HBCD (Hamers *et al.*, 2006). A few studies have described an interaction between some types of BFRs and estrogen signalling (Ceccatelli *et al.*, 2006, Hamers *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2001). Meerts *et al.* (2001) used luciferase assays to determine that the higher-brominated PBDE had an antagonistic effect on ER while the lower brominated PBDE had an agonistic effect. These findings were later corroborated by Hamers *et al.* (2006) during an *in vitro* study with other PBDE congeners. Moreover, it has been suggested that these BFRs can exert their estrogenic effect by increasing the bioavailability of endogenous estrogens (Kester *et al.*, 2002). The inhibition of estradiol sulfotransferase enzymes led to decreased sulfation and excretion of estradiol (Kester *et al.*, 2002). Similarly, rats injected with PBDE99 showed dysregulation of estrogen target genes in uterus, including a downregulation in PR levels, while ER α and ER β uterine mRNA levels were increased (Ceccatelli *et al.*, 2006). On the opposite, our results indicate that BFRs do not affect ER α or PR protein expression in the mammary gland. This discrepancy between our results and the ones obtained by Ceccatelli *et al.* (2006) could be explained by the differences in tissues (uterus versus mammary gland) or markers (protein versus mRNA) used. It could also be explained by the method of exposure (injection versus dietary intake) or by the specific BFRs used. As previously described by Meerts *et al.* (2001), some congeners have an antagonistic effect while others have an agonistic effect. Thus, although

the estrogenic effect is lost using a mixture of BFRs, it is more representative of human exposure.

TR α is down-regulated at puberty by a perinatal exposure to BFRs

Many studies have demonstrated an effect of various BFRs on thyroid hormone homeostasis including decreases in thyroxine (T4) levels and increases in thyroid stimulating hormone (TSH) levels in both exposed pregnant rats and their female offsprings (Ernest *et al.*, 2012, T. H. Kim *et al.*, 2009, Kodavanti *et al.*, 2010, van der Ven *et al.*, 2006). Decreased serum T4 levels could be linked to a competition between some BFRs and T4 for binding to human transthyretin, the T4-transporting protein in plasma, as demonstrated *in vitro* (Hamers *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2000).

The effect of many BFRs on TRs signaling has been studied. The association between PBDE and TR β , was assessed *in vitro*. No direct interaction between the two could be identified. Also, the BDE-47 did not compete with T3 for binding to the TR (Suvorov *et al.*, 2011). This same *in vitro* study failed to find a role for BDE-47 in the regulation of TR β transcriptional activity (Suvorov *et al.*, 2011). However, they reported a differential expression of thyroid responsive genes in liver and brain following a BDE-47 exposure (Suvorov *et al.*, 2011). Interestingly, it has been shown that T3 responsive genes display a marked preference for one of the two receptors (TR α or TR β) and that these two receptors can exert different functions (Chatonnet *et al.*, 2013). This could explain the differential expression of thyroid responsive genes in the liver and the brain despite the lack of *in vitro* effect on TR β transcriptional activity.

To the best of our knowledge, the effect of BFRs on the TR protein expression in mammary gland has never been assessed. Our results show a significant downregulation of TR α , but not TR β , at the time of puberty in female offsprings exposed perinatally to the BFRs mixture. Thyroid hormones are involved in mammary gland development and differentiation. Specifically, they have been shown to regulate tertiary epithelial branching and lobulo-alveolar development in mice (Hovey *et al.*, 2002). They also influence mammary development through their activation of growth hormone (GH) secretion (Meites *et al.*, 1964) and through their upregulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) (Vonderhaar *et al.*, 1986). Given these roles for TRs in mammary development, we would expect a downregulation in TR protein expression to restrict breast development. In breast cancer, the expression and localization of TRs are altered, which suggests that a dysregulation at this level might promote mammary tumor development (Conde *et al.*, 2006).

A perinatal exposure to an environmental dose of BFRs alters protein expression at puberty

We observed protein expression dysregulation uniquely in the group that received the lowest dose. Interestingly, this dose is the one that best represents human exposure based on house dust levels and dust ingestion rates (Allen *et al.*, 2008, Stapleton *et al.*, 2008). Furthermore, our results suggest that perinatal exposure affects mammary glands later on at the time of puberty. Modifications, such as altered hormone signalling, at the time of puberty have been shown to increase the risk of breast cancer development (Boylan *et al.*, 1983). In this study, the timing of the observed effects could have important long-term consequences, as puberty is known to be a sensitive period for the development of breast cancer. To our knowledge, no association between E-cadherin and TR protein expression have been reported in literature, which indicates that the BFRs mixture could potentially affect mammary gland by two completely different mechanisms. Further analyses are needed to determine the mechanisms involved in TR α and E-cadherin down-regulation, and whether or not both are linked.

Conclusion

Overall, our results showed that while no effect were observed on global mammary gland development, expression of E-cadherin, a protein involved in adherens junctions and involved in breast cancer, and TR α are down-regulated in the rats that received the lowest dose at PND46. Thus, our results suggest that exposure to an environmentally relevant BFRs mixture can affect the endocrine system as well as cell-cell adhesion in the mammary gland during puberty. Importantly, our results showed that a perinatal exposure to BFRs could affect protein regulation later on during puberty, a sensitive period for mammary development and breast cancer. Whether or not other markers are affected and the long-term effects of those down-regulations remain to be determined.

Acknowledgements

Special thanks goes to Elham Dianati for her role in sampling mammary tissues. She and Martine Caplette are thanked for their technical assistance. This study was supported by: CRSNG and FRQS (IP), FUAFI (ML) and IRSC (ML, BH, MW).

References

- Allen JG, McClean MD, Stapleton HM & Webster TF (2008) Critical factors in assessing exposure to PBDEs via house dust. *Environment international* 34(8):1085-1091.
- Barber JL, Walsh MJ, Hewitt R, Jones KC & Martin FL (2006) Low-dose treatment with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) induce altered characteristics in MCF-7 cells. *Mutagenesis* 21(5):351-360.
- Berger RG, Lefevre PL, Ernest SR, Wade MG, Ma YQ, Rawn DF, Gaertner DW, Robaire B & Hales BF (2014) Exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants affects fetal development in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 320:56-66.
- Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, Wang F, Petersen OW & Schmeichel KL (1999) Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer research* 59(7 Suppl):1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
- Boylan ES, Calhoon RE & Vonderhaar BK (1983) Transplacental action of diethylstilbestrol on reproductive and endocrine organs, mammary glands, and serum hormone levels in two- and nine-month-old female rats. *Cancer research* 43(10):4872-4878.
- Briskin C (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):39-48.
- Briskin C & O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(12):a003178.
- Ceccatelli R, Faass O, Schlumpf M & Lichtensteiger W (2006) Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenylether PBDE 99 and PCB. *Toxicology* 220(2-3):104-116.
- Chatonnet F, Guyot R, Benoit G & Flamant F (2013) Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8):E766-775.
- Conde I, Paniagua R, Zamora J, Blanquez MJ, Fraile B, Ruiz A & Arenas MI (2006) Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 17(1):60-64.
- Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H & Foisner R (2000) Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *The Journal of cell biology* 148(1):173-188.
- El-Saghir JA, El-Habre ET, El-Sabban ME & Talhouk RS (2011) Connexins: a junctional crossroad to breast cancer. *The International journal of developmental biology* 55(7-9):773-780.
- Eldridge JM, RF; Wetzel, LT and Tisdell MO (1998) Appearance of Mammary Tumors in Atrazine-Treated Female Rats: Probable Mode of Action Involving Strain-Related Control of Ovulation and Estrous Cycle. *Triazine Herbicides: Risk Assessment* Ballantine LEA (Édit.) ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington DC.
- Ernest SR, Wade MG, Lalancette C, Ma YQ, Berger RG, Robaire B & Hales BF (2012) Effects of chronic exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame

- retardants on the reproductive and thyroid system in adult male rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 127(2):496-507.
- Fenton SE, Reed C & Newbold RR (2012) Perinatal environmental exposures affect mammary development, function, and cancer risk in adulthood. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52:455-479.
- Goldman JM, Murr AS & Cooper RL (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80(2):84-97.
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, Legler J & Brouwer A (2006) In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 92(1):157-173.
- Hassiotou F & Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26(1):29-48.
- Hinck L & Silberstein GB (2005) Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast cancer research : BCR* 7(6):245-251.
- Hovey RC, Trott JF & Vonderhaar BK (2002) Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):17-38.
- Hughes K, Wickenden JA, Allen JE & Watson CJ (2012) Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. *The Journal of pathology* 227(1):106-117.
- Hurley WL (1989) Mammary gland function during involution. *Journal of dairy science* 72(6):1637-1646.
- Jenkins S, Betancourt AM, Wang J & Lamartiniere CA (2012) Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 129(3-5):191-200.
- Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 112(12):1776-1784.
- Kester MH, Bulduk S, van Toor H, Tibboel D, Meinel W, Glatt H, Falany CN, Coughtrie MW, Schuur AG, Brouwer A & Visser TJ (2002) Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(3):1142-1150.
- Kim TH, Lee YJ, Lee E, Kim MS, Kwack SJ, Kim KB, Chung KK, Kang TS, Han SY, Lee J, Lee BM & Kim HS (2009) Effects of gestational exposure to decabromodiphenyl ether on reproductive parameters, thyroid hormone levels, and neuronal development in Sprague-Dawley rats offspring. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 72(21-22):1296-1303.
- Kim YR, Harden FA, Toms LM & Norman RE (2014) Health consequences of exposure to brominated flame retardants: a systematic review. *Chemosphere* 106:1-19.
- Kodavanti PR, Coburn CG, Moser VC, MacPhail RC, Fenton SE, Stoker TE, Rayner JL, Kannan K & Birnbaum LS (2010) Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71: neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 116(1):297-312.

- Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T & Miyazono K (2008) Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of cell science* 121(Pt 20):3317-3324.
- Koromilas AE & Sexl V (2013) The tumor suppressor function of STAT1 in breast cancer. *JAKSTAT* 2(2):e23353.
- Lefevre PL, Berger RG, Ernest SR, Gaertner DW, Rawn DF, Wade MG, Robaire B & Hales BF (2016) Exposure of Female Rats to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Targets the Ovary, Affecting Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Biology of reproduction* 94(1):9.
- Li ZH, Liu XY, Wang N, Chen JS, Chen YH, Huang JT, Su CH, Xie F, Yu B & Chen DJ (2012) Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environmental health perspectives* 120(4):541-546.
- Lien WH, Klezovitch O & Vasioukhin V (2006) Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Current opinion in cell biology* 18(5):499-506.
- Mallepell S, Krust A, Chambon P & Briskin C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2196-2201.
- McLachlan E, Shao Q & Laird DW (2007) Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *The Journal of membrane biology* 218(1-3):107-121.
- Medici D, Hay ED & Olsen BR (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Molecular biology of the cell* 19(11):4875-4887.
- Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der Burg B & Brouwer A (2001) In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives* 109(4):399-407.
- Meerts IA, van Zanden JJ, Luijckx EA, van Leeuwen-Bol I, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A & Brouwer A (2000) Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 56(1):95-104.
- Meites J & Kragt CL (1964) Effects of a Pituitary Homotransplant and Thyroxine on Body and Mammary Growth in Immature Hypophysectomized Rats. *Endocrinology* 75:565-570.
- Naus CC & Laird DW (2010) Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(6):435-441.
- Plante I, Charbonneau M & Cyr DG (2006) Activation of the integrin-linked kinase pathway downregulates hepatic connexin32 via nuclear Akt. *Carcinogenesis* 27(9):1923-1929.
- Plante I, Cyr DG & Charbonneau M (2005) Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 88(2):346-357.
- Qu BL, Yu W, Huang YR, Cai BN, Du LH & Liu F (2015) 6-OH-BDE-47 promotes human lung cancer cells epithelial mesenchymal transition via the AKT/Snail signal pathway. *Environ Toxicol Pharmacol* 39(1):271-279.

- Rice C, Birnbaum LS, Coglianò J, Mahaffey K, Needham L, Rogan WJ & vom Saal FS (2003) Exposure assessment for endocrine disruptors: some considerations in the design of studies. *Environmental health perspectives* 111(13):1683-1690.
- Samuelsen HPB (2014) *The effects of Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on the cell viability, gap junction intercellular communication and DNA damage in the epithelial liver cell line IAR20 in vitro*. Master (Norwegian University of Life Sciences).
- Stapleton HM, Allen JG, Kelly SM, Konstantinov A, Klosterhaus S, Watkins D, McClean MD & Webster TF (2008) Alternate and new brominated flame retardants detected in U.S. house dust. *Environmental science & technology* 42(18):6910-6916.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P & Werb Z (2006) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 74(7):365-381.
- Suvorov A, Bissonnette C, Takser L & Langlois MF (2011) Does 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether interact directly with thyroid receptor? *J Appl Toxicol* 31(2):179-184.
- Talhok RS, Fares MB, Rahme GJ, Hariri HH, Rayess T, Dbouk HA, Bazzoun D, Al-Labban D & El-Sabban ME (2013) Context dependent reversion of tumor phenotype by connexin-43 expression in MDA-MB231 cells and MCF-7 cells: role of beta-catenin/connexin43 association. *Experimental cell research* 319(20):3065-3080.
- Talhok RS, Mroue R, Mokalled M, Abi-Mosleh L, Nehme R, Ismail A, Khalil A, Zaatari M & El-Sabban ME (2008) Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Experimental cell research* 314(18):3275-3291.
- van der Ven LT, Verhoef A, van de Kuil T, Slob W, Leonards PE, Visser TJ, Hamers T, Herlin M, Hakansson H, Olausson H, Piersma AH & Vos JG (2006) A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 94(2):281-292.
- Vonderhaar BK, Tang E, Lyster RR & Nascimento MC (1986) Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands. *Endocrinology* 119(2):580-585.
- Wolf CS, J and Fenton, SE. (2010) Mammary gland development and response to prenatal atrazine exposure in the Sprague Dawley and Long-Evans rats. *Society of Toxicology 49th Annual meeting*. (Salt Lake City UT, March 07-11 2010).
- Wu JC, Tsai RY & Chung TH (2003) Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 88(4):823-835.
- Xie H, Laird DW, Chang TH & Hu VW (1997) A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *The Journal of cell biology* 137(1):203-210.
- Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, Thomas MP, Radice GL & Lo CW (2001) Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *The Journal of cell biology* 154(1):217-230.
- Yang L, Luo L, Ji W, Gong C, Wu D, Huang H, Liu Q, Xia B, Hu G, Zhang W, Zhang Q, Liu J, Zhang W & Zhuang Z (2013) Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. *Toxicology letters* 218(3):187-193.

Zhong Y CC, Wang X, Guo P, Zhang X, Yu Z and An J (2014) HBCD and PCBs Enhance HepG2 Migration and Invasion. *Toxicology Research* 10.1039/C4TX00108G.

Figure legends

Figure 1. A perinatal exposure to a BFRs mixture did not affect body and mammary gland weights. Female rats were exposed to BFRs perinatally and sampled at PND21 (A-B) PND46 (C-D) and PND208 (E-F) Body weights (A, C, E) and mammary gland weights were measured at time of sacrifice. Mammary gland weights were normalized to total body weights (B, D, F). Graphs represent mean $\pm$ SEM (N = 9-13).

Figure 2. Mammary gland morphogenesis is not affected by a perinatal exposure to BFRs. Female rats were exposed to BFRs perinatally and sampled at PND21 (A-B), PND46 (C-D, G) and PND208 (E-F). Whole mounts of mammary glands were analyzed with Image J software. Elongation was measured from the lowest lymph node to the end of the longest branch of the epithelium (A, C, E). Surface area was measured (B, D, F) and terminal end buds were counted on whole mount images (G). Graphs represent mean $\pm$ SEM (N = 7-13).

Figure 3. Perinatal exposure to BFRs mixture did not alter mammary gland structure. Female rats were exposed to BFRs perinatally and mammary glands were sampled at PND46. Sections of 10 μ m of thickness were obtained by cryosection at -35°C and stained with Masson Trichrome Staining. Mammary epithelium from control as well as low, medium and high doses treatment groups are shown at a magnification of 40X. The luminal cells delimit the lumen and the myoepithelial cell layer (in red) is surrounded by extracellular matrix that contains a lot of collagen (in blue) and fibroblasts (in blue with red nuclei). Lymph nodes are also observed (in pink) encompassed in extracellular matrix (in blue). Images show epithelial ducts (yellow arrow), adipocytes (black arrow), fibroblasts (white arrow), collagen (white arrowhead), blood vessels (red arrow) and lymph nodes (green arrow).

Figure 4. E-cadherin protein expression is only affected during puberty. Total cell lysates from control group (C) and low (L), medium (M) and high (H) dose treatment groups were analyzed by western blot (A-C). Protein expression for E-cadherin was measured at PND21 (A), PND46 (B) and PND208 (C). Total lane protein was used for normalization. Graphs (D-F) represent mean $\pm$ SEM (N = 9-13). ** P value < 0.01.

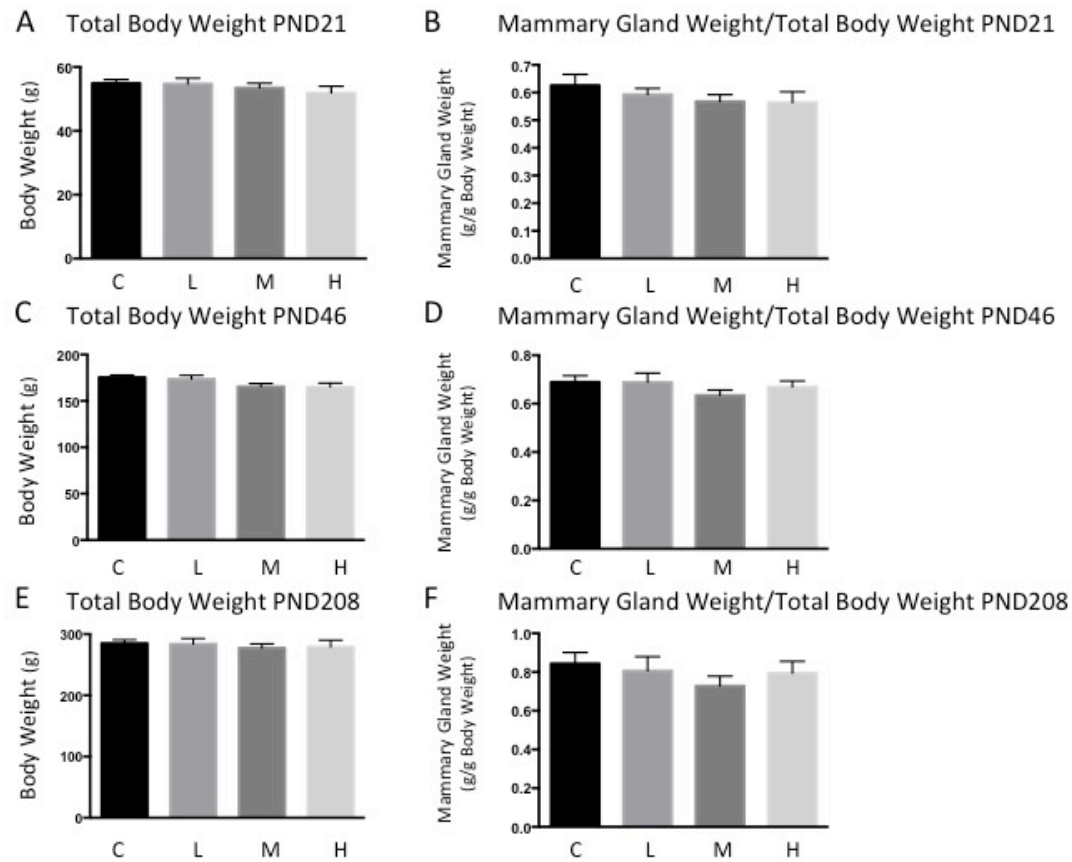
Figure 5. N-cadherin and Vimentin are not affected by a BFRs treatment at PND46. Total cell lysates from control group (C) and low (L), medium (M) and high (H) dose treatment groups were analyzed by western blot (A-B). Protein expression for N-cadherin (A, C) and Vimentin (B, D)) was measured. Total lane protein was used for normalization. Graphs (D-F) represent mean $\pm$ SEM (N= 9-13).

Figure 6. BFRs treatment has no impact on gap junctions. Total cell lysates from control group (C) and low (L), medium (M) and high (H) dose treatment groups were analyzed by western blot (A-D). Protein expression for Cx43 (A), Cx26 (B) and β -catenin (C) was measured. Total lane protein was used for normalization. Graphs (D-F) represent mean $\pm$ SEM (N= 9-13).

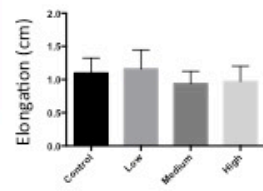
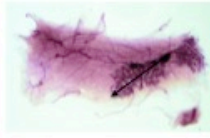
Figure 7. STAT1 is unaffected by treatment with the BFRs mixture at PND46. Total cell lysates from control group (C) and low (L), medium (M) and high (H) dose treatment groups were analyzed by western blot (A, B). Protein expression for STAT1 (A) and phospo-STAT1 (B) was assessed. Total lane protein was used for normalization. Graph (C) represent mean $\pm$ SEM (N = 9-13).

Figure 8. Thyroid Hormone Receptor alpha (TR α) is down-regulated by BFRs treatment whereas Estrogen and Progesterone receptors are not. Total cell lysates from control group (C) and low (L), medium (M) and high (H) dose treatment groups were analyzed by western blot (A-D). Protein expression for estrogen receptor α (A), progesterone receptor A and B (B), thyroid hormone receptor α (C) and β (D) was measured. Total lane protein was used for normalization. Graphs (E-H) represent mean $\pm$ SEM (N=9-13). ** P value < 0.01.

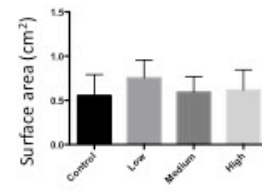
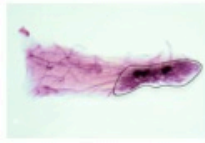
Figures



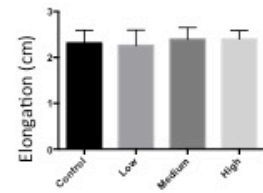
A PND21



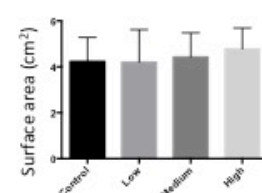
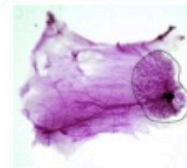
B PND21



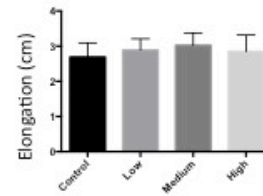
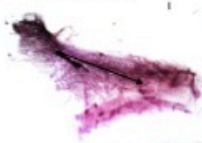
C PND46



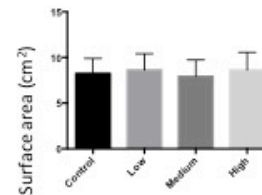
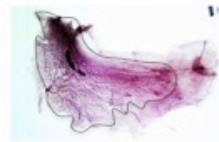
D PND46



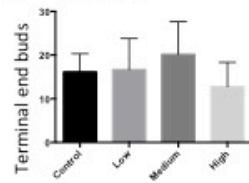
E PND208



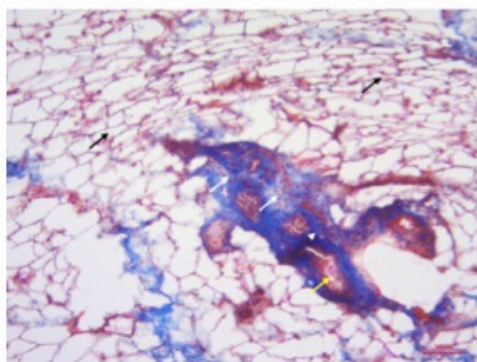
F PND208



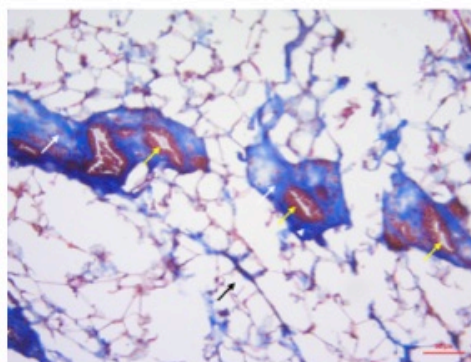
G PND46



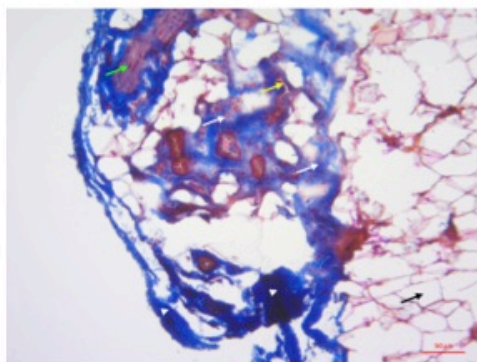
A



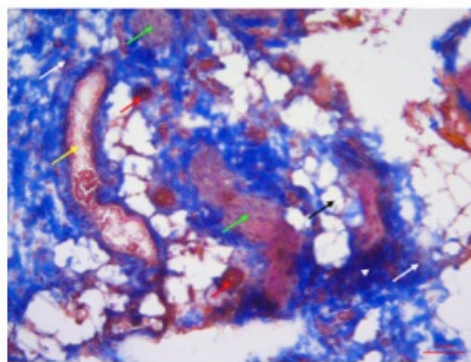
Control



Low

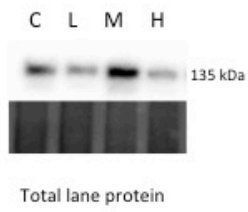


Medium

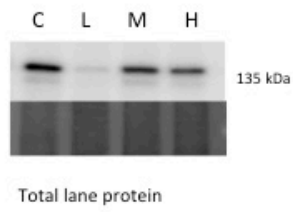


High

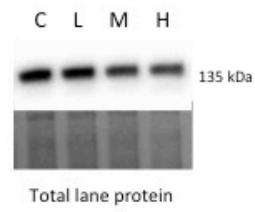
A Western Blot PND21



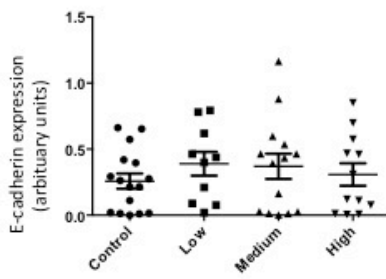
B Western Blot PND46



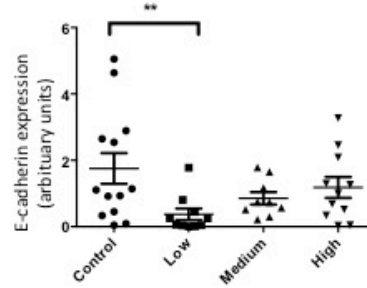
C Western Blot PND208



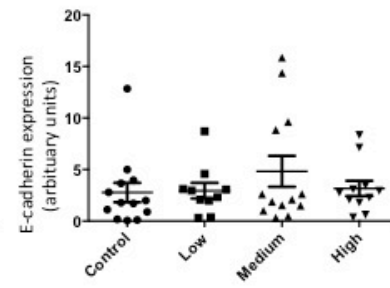
D Protein Expression PND21



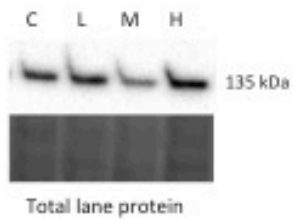
E Protein Expression PND46



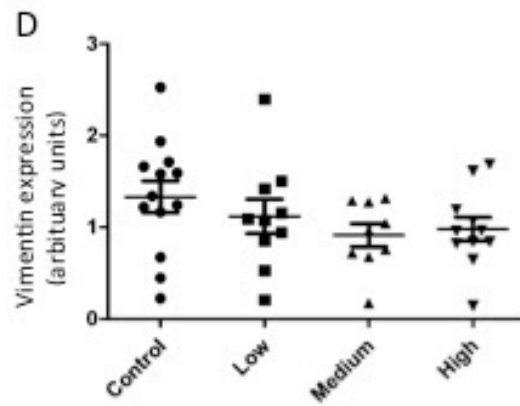
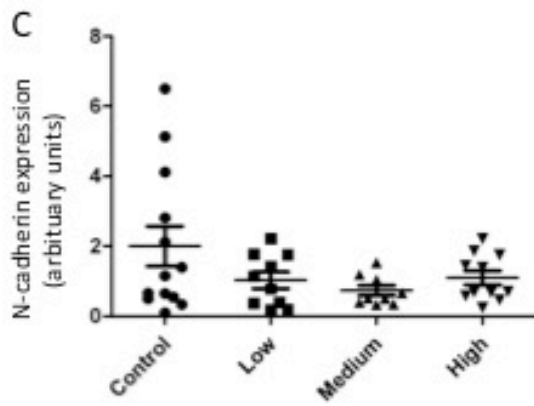
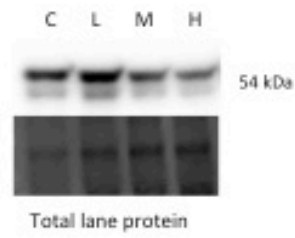
F Protein Expression PND208

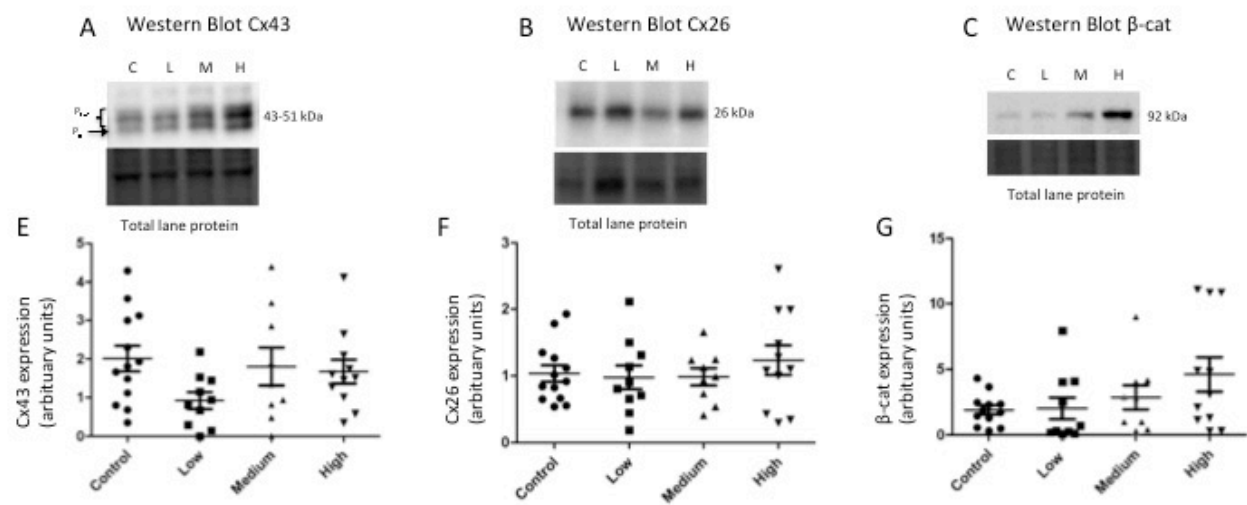


A Western Blot N-cadherin

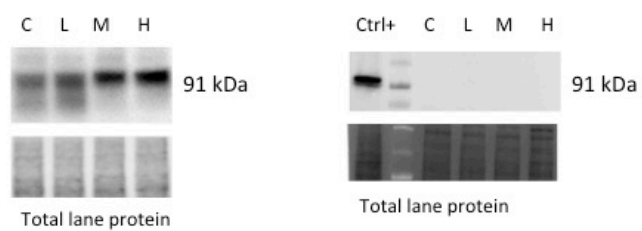


B Western Blot Vimentin

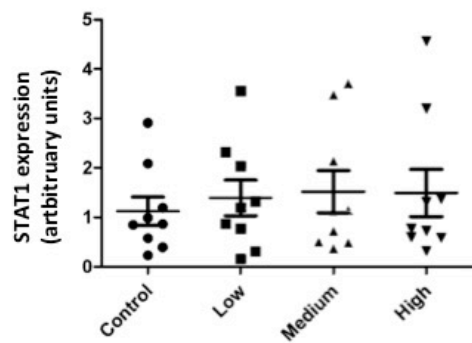


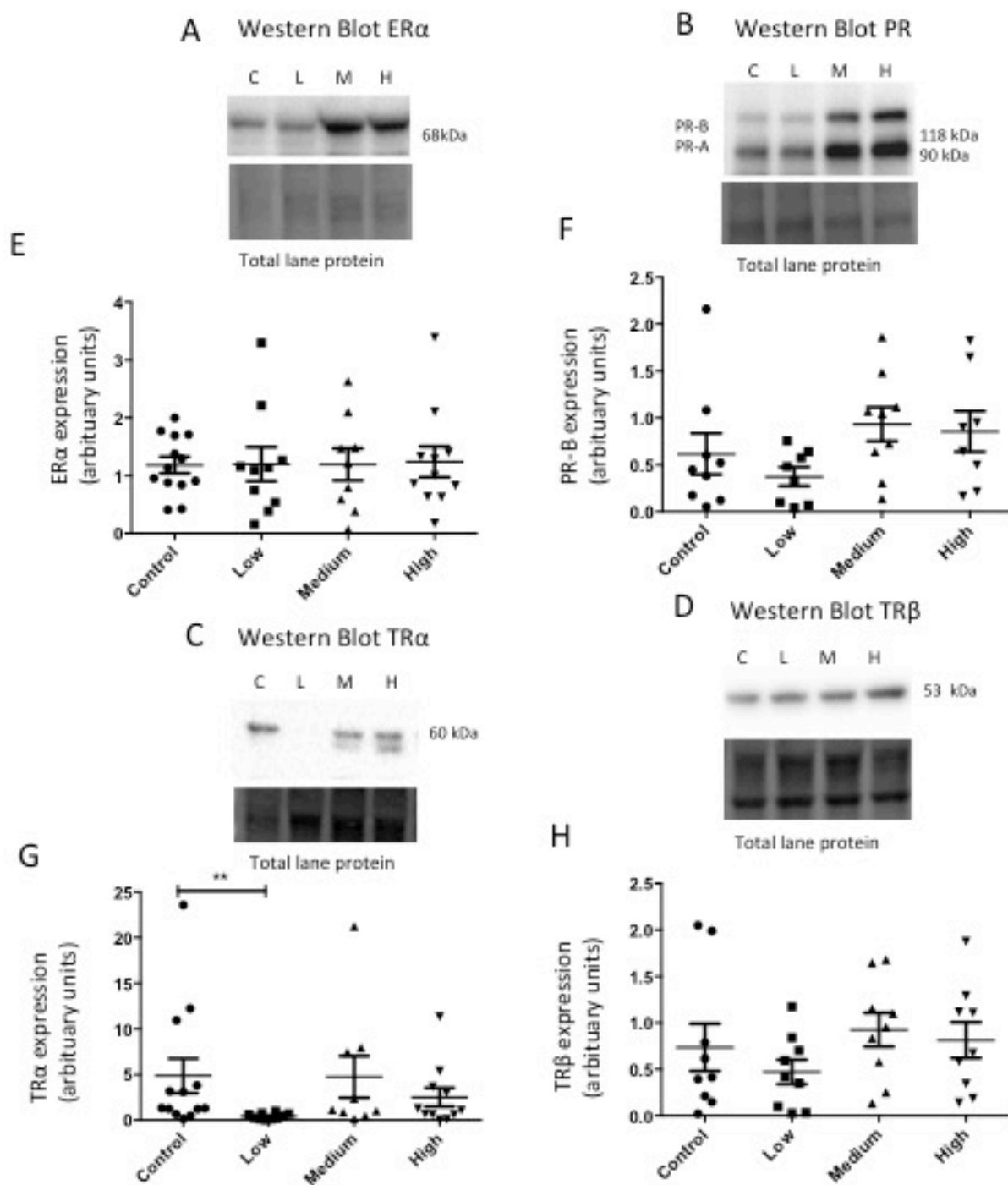


A Western Blot STAT1 B Western Blot Phospho-STAT1



C





CHAPITRE 3 :

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les BFRs sont une classe majeure de retardateurs de flammes couramment utilisée à cause de leur efficacité en tant que retardateurs de flammes, leur stabilité thermique et leur coût modeste (Darnerud *et al.*, 2001). Leur abondance, leur persistance et leur large distribution ont soulevé des inquiétudes et menés à leur réglementation. Malgré cela, on les retrouve toujours dans des échantillons abiotiques et biotiques un peu partout dans le monde (Darnerud *et al.*, 2001, Fromme *et al.*, 2014, Gorga *et al.*, 2013, Kuo *et al.*, 2010, Ryan *et al.*, 2014, Shoeib *et al.*, 2012, Stasinska *et al.*, 2014)

À l'aide d'études épidémiologiques, d'études *in vivo* et/ou *in vitro*, plusieurs effets néfastes ont été identifiés pour les divers BFRs. Par exemple, leur rôle comme perturbateurs endocriniens a été démontré par plusieurs groupes (Asnake *et al.*, 2015, Blake *et al.*, 2011, Chevrier *et al.*, 2010, Chevrier *et al.*, 2011, Ernest *et al.*, 2012, Gosavi *et al.*, 2013, Hamers *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2001, Meerts *et al.*, 2000, Stoker *et al.*, 2005, van der Ven *et al.*, 2006). Par contre, très peu de gens ont investigué l'effet des BFRs au niveau du développement de la glande mammaire et du cancer du sein. Considérant le taux élevé de cancer du sein au Canada et un peu partout dans le monde, il est important de déterminer si notre exposition chronique à certains polluants environnementaux augmente nos risques de développer le cancer du sein. Puisque le développement mammaire et le cancer du sein sont hautement régulés par les hormones, nous avons émis l'hypothèse qu'ils seraient affectés par une exposition à une mixture de BFRs contenant des perturbateurs endocriniens connus.

Nos résultats démontrent que malgré l'absence d'effets au niveau du développement mammaire globale, l'expression d'une protéine des jonctions adhérentes, E-cadhérine, ainsi que celle du récepteur aux hormones thyroïdiennes α (TR α) sont réduites, au moment de la puberté, chez les rats ayant reçu la dose la plus faible d'un mélange de BFRs. On peut donc conclure qu'une exposition périnatale à un mélange de BFRs qui est représentatif de l'exposition humaine peut affectée le système endocrinien ainsi que l'adhésion entre les cellules dans la glande mammaire, au moment de la puberté.

Modèle expérimental

Puisque notre objectif était d'étudier l'impact d'une exposition périnatale à un mélange de BFRs sur le développement des glandes mammaires et sur des marqueurs du cancer du sein, plusieurs contraintes éthiques ou autres s'imposaient en ce qui a trait aux études chez l'humain. Afin de réaliser nos expériences, nous avons choisi d'utiliser un modèle animal : les rats Sprague-Dawley. Ce modèle a été choisi pour plusieurs raisons. Premièrement, il y a une grande ressemblance entre la composition des glandes mammaires murines et humaines, ce qui permet d'extrapoler les résultats obtenus chez le rat à l'humain. De plus, les glandes mammaires murines sont de bons modèles pour l'étude de la cancérogénicité des polluants environnementaux puisqu'il a été démontré que celles-ci développent des tumeurs en réponse à divers agents chimiques (I. H. Russo *et al.*, 1996). Aussi, le rat possède six paires de glandes mammaires ce qui nous permet de réaliser plusieurs expériences différentes chez chaque sujet exposé (J. Russo *et al.*, 1990). Malgré toutes les similitudes entre les glandes mammaires murines et humaines, il faut être prudent lorsque l'on tente d'extrapoler des résultats obtenus chez un modèle animal. Par exemple, au niveau des jonctions intercellulaires, les glandes mammaires des rats expriment deux connexines supplémentaires qui peuvent potentiellement modifier l'impact des BFRs sur les jonctions communicantes (Bry *et al.*, 2004).

Afin d'étudier les effets d'une exposition aux BFRs, nous avons choisi d'utiliser un mélange de PBDE et HBCD qui représente les taux retrouvés dans la poussière de maisons nord-américaines (Stapleton *et al.*, 2008). La majorité des études d'expositions s'intéressant aux effets des BFRs utilisent un seul mélange commercial de PBDE tel que DE-71, ou encore un seul congénère tel que BDE-99, BDE-209 ou BDE-47 (Blake *et al.*, 2011, T. H. Kim *et al.*, 2009, Kodavanti *et al.*, 2010, Lilienthal *et al.*, 2006, Stull *et al.*, 2007, Szabo *et al.*, 2009). Par contre, dans notre environnement, nous sommes exposés à un mélange beaucoup plus complexe, incluant plusieurs congénères de PBDE ainsi que d'autres familles de BFRs (Batterman *et al.*, 2010, Basis *et al.*, 2012, Fromme *et al.*, 2014, Harrad *et al.*, 2006, Stapleton *et al.*, 2008). On sait que les différents polluants environnementaux, incluant les perturbateurs endocriniens, peuvent agir de façon synergique, ce qui peut amplifier ou annuler certains effets. Par exemple, il a été démontré, à quelques reprises, que les PBDE contenant plusieurs atomes de bromes sont des antagonistes du récepteur à l'œstrogène tandis que les PBDE contenant peu d'atomes de bromes sont des agonistes du même récepteur (Hamers *et al.*, 2006, Meerts *et al.*, 2001). Donc, les résultats obtenus lors d'études *in vivo* avec un seul congénère ne représentent pas nécessairement les effets observés chez l'humain exposé à un mélange plus complexe. C'est

pourquoi nous considérons l'utilisation d'une formulation de BFRs représentative de l'exposition nord-américaine comme étant une des forces fondamentales de cette étude.

Notre formulation contient trois mélanges majeurs de PBDE (DE-71 52.1%, DE-79 0.4% et BDE-209 44.2%) et un HBCD (3.3%) afin de reproduire les ratios observés dans la poussière de maisons Nord-Américaines (Allen *et al.*, 2008, Stapleton *et al.*, 2008). À partir d'un estimé de Santé Canada suggérant une consommation quotidienne de poussière de 100 mg/jour pour un enfant de 16.5kg, plusieurs calculs ont été réalisés pour déterminer les doses appropriées à utiliser (Ernest *et al.*, 2012). Pour tenir compte des différences entre le rat et l'humain, nous avons utilisé le ratio de surface corporelle (1 : 6.3, humain : rat), comme le recommande la « Food and Drug Administration » (FDA) (Center for Drug Evaluation and Research, 2002).

Afin de confirmer l'exposition réelle il serait pertinent de performer une analyse chimique des glandes mammaires des rats. Puisque le transfert de contaminants organiques est un processus hautement sélectif, de telles analyses nous permettront de déterminer si les différents congénères sont acheminés à la progéniture lors de la gestation et/ou lors de l'allaitement. L'analyse des tissus mammaires va également nous permettre de déterminer si les divers congénères sont métabolisés ou excrétés avant même d'atteindre la glande mammaire. Ces analyses n'ont pas encore eu lieu. Par contre, de telles analyses ont été réalisées par d'autres groupes ayant utilisés un désign expérimental similaire. Les concentrations de PBDE et de HBCD ont été mesurées dans le sérum des femelles gestantes ainsi que dans le foie des rats PND21 et PND46 (Lefevre *et al.*, 2016, Tung *et al.*, 2016). De façon importante, ces analyses confirment que les concentrations présentes dans le sérum maternel ou encore dans le foie de la progéniture augmentent de manière dose-dépendante (Lefevre *et al.*, 2016, Tung *et al.*, 2016).

Plusieurs composés et surtout plusieurs perturbateurs endocriniens ont un impact d'autant plus important lorsqu'ils sont administrés à l'organisme lors de périodes dites vulnérables. Parmi les périodes les plus vulnérables, on retrouve le développement fœtal et périnatal puisque c'est à ce moment qu'a lieu le développement de la plupart des organes (Fenton *et al.*, 2012). Par exemple, une exposition périnatale à des perturbateurs endocriniens, tel que la 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), est associée à des anomalies développementales et à un risque augmenté de cancer du sein à l'âge adulte (Brown *et al.*, 1998). C'est pourquoi nous avons choisi d'exposer des ratte deux semaines avant l'accouplement et jusqu'à la fin de l'allaitement afin d'étudier les effets d'une exposition périnatale chez leur progéniture (F1).

Résultats

Nos résultats suggèrent que la croissance épithéliale globale n'est pas significativement affectée par une exposition périnatale à notre mélange de BFRs. Cependant, la seule étude *in vivo* à avoir investigué l'effet des BFRs sur le développement mammaire démontre le contraire. Kodavanti et al (2010) ont décrit un délai développemental au niveau des glandes mammaires chez les rats de la F1, ayant été exposés *in utero* et durant l'allaitement à un mélange de PBDE (DE-71). Dans leur étude, ils ont observé que la croissance de l'épithélium était inhibée au jour post-natal 21 (PND21) (Kodavanti *et al.*, 2010). Selon leur système de pointage, le développement au niveau des bourgeons terminaux ainsi que l'embranchement de l'épithélium étaient réduits au moment de la puberté (Kodavanti *et al.*, 2010). Ces observations contradictoires peuvent potentiellement être dues à la composition variable des mélanges de BFRs. DE-71 est un mélange de PentaPBDE tandis que notre mélange contient trois sortes de PBDE ainsi qu'un HBCD, tel que décrit précédemment (Allen *et al.*, 2008, Stapleton *et al.*, 2008).

Nos résultats suggèrent également que notre mélange de BFRs entraînent une perte des jonctions adhérentes de l'épithélium mammaire au moment de la puberté. Ces jonctions sont importantes lors du développement mammaire et leur perte menace l'intégrité de l'épithélium (Daniel *et al.*, 1995, Lanigan *et al.*, 2007, Strumane *et al.*, 2004). Par exemple, une perte d'E-cadhérine a été associée à la présence de cellules luminales flottant dans le lumen ainsi qu'à une inhibition de la synthèse d'ADN et de la croissance cellulaire (Daniel *et al.*, 1995). E-cadhérine (*CDH1*) est également un gène suppresseur de tumeur donc son inhibition pourrait favoriser le développement et la progression du cancer du sein (Yoshida *et al.*, 2001).

Enfin, en réponse à une exposition périnatale à un mélange de BFRs, nos résultats démontrent également une diminution de TR α au moment de la puberté. Vu l'effet connu de certains BFRs sur le taux de T4 circulant, nous ne sommes pas surpris d'observer un effet au niveau de la signalisation avec les hormones thyroïdiennes (Chevrier *et al.*, 2010, Ernest *et al.*, 2012, T. H. Kim *et al.*, 2009, Zota *et al.*, 2011). Par contre, les répercussions qu'entraîne la perte de ce récepteur spécifique au niveau de la glande mammaire demeurent inconnues.

Perspectives

Les résultats obtenus lors de cette étude ajoutent aux connaissances limitées sur les effets d'une exposition aux BFRs au niveau des glandes mammaires. Cependant, ils soulèvent

également des questions supplémentaires. Par exemple, existe-t'il un lien entre l'inhibition de l'expression protéique de TR α et les niveaux de thyroxine dans le sérum? Est-ce que l'inhibition de TR α et celle d'E-cadhérine sont liées?

Afin de répondre à ces questions, il serait important de procéder au dosage des différentes hormones présentes dans le plasma sanguin des rats de la F1, plus particulièrement les taux de T4 chez les rats PND46. Des études *in vitro* nous permettraient également d'élucider si un mécanisme impliquant à la fois TR α et E-cadhérine est potentiellement impliqué dans la toxicologie des BFRs. A l'aide de lignées cellulaires mammaires telle que MCF-7 ou T47D, on pourrait procéder à l'activation de TR α avec T3 et investiguer l'effet sur l'expression protéique de E-cadhérine. Aussi, il serait intéressant de procéder à l'inactivation de TR α grâce à un antagoniste connu (Schapira *et al.*, 2003) et d'analyser encore une fois l'expression protéique d'E-cadhérine suite aux traitements au T3. De cette façon, on pourrait s'assurer que l'effet soit réellement modulé par le récepteur TR α .

D'autres questions importantes surviennent suite aux résultats de cette étude, notamment la suivante : est-ce que les jonctions intercellulaires sont fonctionnelles? Lors de notre étude, une diminution a été observée pour l'expression protéique de Cx43 au moment de la puberté, bien que, cette baisse n'était pas statistiquement significative. Malgré l'absence d'effet significatif au niveau de l'expression protéique des Cxs, il serait important d'étudier leur localisation, à l'aide d'expériences d'immunofluorescence, afin d'analyser leur fonction. Il a été démontré que la localisation membranaire des connexines est requise afin de permettre la GJIC (Xie *et al.*, 1997). En fait, une corrélation a été observée entre l'inhibition de la GJIC et une relocalisation de Cx43 au niveau du cytoplasme (Xie *et al.*, 1997).

Les jonctions adhérentes devraient également être étudiées à l'aide d'un microscope confocal et de techniques d'immunofluorescence. La diminution de l'expression protéique d'E-cadhérine, chez le groupe ayant reçu la dose la plus faible, nous indique que les jonctions adhérentes sont affectées. Par contre, l'effet d'une exposition à un mélange de BFRs sur l'expression protéique de β -caténine, une autre protéine majeure des jonctions adhérentes, n'était pas statistiquement significatif. Nous émettons l'hypothèse que c'est plutôt la localisation de β -caténine qui est affectée chez les groupes traités. En fait, β -caténine possède deux rôles majeurs selon sa localisation. Elle doit être présente au niveau de la membrane plasmique afin de participer à la formation des jonctions adhérentes (H. Yao *et al.*, 2011). Par contre, lorsqu'elle est retrouvée au niveau du noyau, elle agit en tant que facteur de transcription et stimule, entre autres, la prolifération cellulaire et la capacité d'invasion (Hatsell *et al.*, 2003).

La poursuite de cette étude impliquerait l'étude des effets d'une exposition périnatale à la mixture de BFRs à un âge plus avancé. La puberté est une étape majeure du développement des glandes mammaires et une perturbation de l'expression protéique à cette étape peut influencer le devenir de la glande mammaire à l'âge adulte. Pour cette raison, il serait important d'étudier les différents marqueurs chez les rats sacrifiés au jour post-natal 208 (PND208). Lors de cette étude, nous avons observé que l'inhibition de l'expression protéique d'E-cadhérine n'était présente qu'au moment de la puberté puisqu'elle n'était pas observable chez les rats PND21 et PND208. Par contre, les autres marqueurs de la TEM ou encore les autres protéines jonctionnelles pourraient potentiellement être modulés à l'âge adulte.

Enfin, puisque qu'une partie importante du développement de la glande mammaire se déroule lors de cycles grossesse-allaitement-involution (PLC « Pregnancy Lactation Cycle »), le modèle utilisé était limitant. Afin d'étudier l'effet d'une exposition périnatale à un mélange de BFRs lors d'un PLC, il faudrait laisser des rattes de la première génération filiale (F1) se reproduire. On pourrait ensuite analyser leurs glandes mammaires à différents moments lors de la grossesse, de l'allaitement et de l'involution. Ces analyses nous permettraient d'identifier si une exposition périnatale à des BFRs peut engendrer des conséquences fonctionnelles au niveau de la glande mammaire qui, après tout, a comme rôle principal la production et la sécrétion du lait.

Évaluation du risque

L'évaluation du risque est le processus qui nous informe sur les dangers d'un composé et sur les mesures que l'on devrait prendre afin de s'en protéger. En se basant uniquement sur les résultats de cette étude, il serait difficile de faire une évaluation du risque pour les BFRs étudiés. L'évaluation doit tenir compte des avantages d'utiliser des retardateurs de flammes bromés, c'est-à-dire leur efficacité à prévenir les blessures et/ou mortalités ainsi que leur coût modeste (Jinhui *et al.*, 2015). Cependant, elle doit aussi tenir compte des désavantages tels que la persistance, la bioaccumulation et tous les effets néfastes observés lors d'études *in vitro*, *in vivo* et/ou épidémiologiques.

Nous n'avons pas observé d'effets majeurs au niveau du développement mammaire. En effet, l'analyse du poids, de l'élongation et l'aire de l'épithélium et finalement, de l'histologie de la glande mammaire, n'ont pas démontré de différences significatives entre les groupes exposés et le groupe témoin. Par contre, notre étude a démontré quelques effets au niveau de

l'expression protéique. Certains effets n'étaient pas statistiquement significatifs probablement à cause de la grande variabilité de l'expression protéique à l'intérieur des groupes (ex : Cx43). Il est aussi possible que cette variabilité soit due au mode d'exposition des animaux. Nous avons choisi d'exposer les rattes gestantes en ajoutant notre mixture à leur nourriture. Ainsi, l'exposition réelle dépend de la consommation quotidienne des rattes et de leur poids. Ce mode d'exposition reflète mieux l'exposition humaine, mais amène plus de variabilité. La surveillance de la consommation quotidienne des rats femelles ainsi que l'analyse chimique des tissus mammaires chez la progéniture nous permettrait de déterminer si la variabilité est effectivement due au mode d'exposition.

L'évaluation du risque pour les BFRs a déjà mené au bannissement et à des restrictions au niveau de la production de plusieurs membres de cette grande famille (Jinhui *et al.*, 2015). Dans le futur, il est primordial de continuer à surveiller les taux présents dans notre environnement et dans les divers échantillons humains (lait maternelle, sérum, etc.) afin d'évaluer les tendances suite à cette réglementation et ajuster les recommandations en conséquence.

Conclusion

En somme, les résultats de cette étude démontrent que malgré l'absence d'effets au niveau du développement mammaire globale, il y a une atteinte des jonctions adhérentes ainsi que du récepteur aux hormones thyroïdiennes α au moment de la puberté chez le groupe ayant reçu la plus faible dose d'un mélange de BFRs. Les résultats obtenus lors de cette étude sont d'autant plus importants puisque c'est une des premières études à investiguer l'effet des BFRs au niveau de la glande mammaire et à utiliser un mélange de BFRs représentatif de l'exposition humaine. Aussi, les effets observés démontrent qu'une exposition périnatale à des BFRs peut affecter la régulation des protéines plus tard dans la vie de l'organisme, plus spécifiquement au moment de la puberté, qui est une période sensible pour le développement de la glande mammaire et pour le cancer du sein. D'autres analyses seraient nécessaires afin de déterminer l'impact à long terme de cette dérégulation au moment de la puberté.

RÉFÉRENCES

- Albergaria A, Ribeiro AS, Vieira AF, Sousa B, Nobre AR, Seruca R, Schmitt F & Paredes J (2011) P-cadherin role in normal breast development and cancer. *The International journal of developmental biology* 55(7-9):811-822.
- Ali S & Coombes RC (2000) Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5(3):271-281.
- Allen JG, McClean MD, Stapleton HM & Webster TF (2008) Critical factors in assessing exposure to PBDEs via house dust. *Environment international* 34(8):1085-1091.
- Allison KH (2012) Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *American journal of clinical pathology* 138(6):770-780.
- Anderson TJ, Ferguson DJ & Raab GM (1982) Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *British journal of cancer* 46(3):376-382.
- Angelousi AG, Anagnostou VK, Stamatakis MK, Georgiopoulos GA & Kontzoglou KC (2012) Mechanisms in endocrinology: primary HT and risk for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 166(3):373-381.
- Antal MC, Krust A, Chambon P & Mark M (2008) Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7):2433-2438.
- Asnake S, Pradhan A, Kharlyngdoh JB, Modig C & Olsson PE (2015) The brominated flame retardants TBP-AE and TBP-DBPE antagonize the chicken androgen receptor and act as potential endocrine disruptors in chicken LMH cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 29(8):1993-2000.
- Ayyanan A, Laribi O, Schuepbach-Mallepell S, Schrick C, Gutierrez M, Tanos T, Lefebvre G, Rougemont J, Yalcin-Ozuysal O & Brisken C (2011) Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol Endocrinol* 25(11):1915-1923.
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO & Reis-Filho JS (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(2):157-167.
- Banka CL, Lund CV, Nguyen MT, Pakchoian AJ, Mueller BM & Eliceiri BP (2006) Estrogen induces lung metastasis through a host compartment-specific response. *Cancer research* 66(7):3667-3672.
- Barber JL, Walsh MJ, Hewitt R, Jones KC & Martin FL (2006) Low-dose treatment with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) induce altered characteristics in MCF-7 cells. *Mutagenesis* 21(5):351-360.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK & Clark GM (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of*

- clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21(10):1973-1979.
- Barlow JW, Voz ML, Eliard PH, Mathy-Harter M, De Nayer P, Economidis IV, Belayew A, Martial JA & Rousseau GG (1986) Thyroid hormone receptors bind to defined regions of the growth hormone and placental lactogen genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(23):9021-9025.
- Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q & Cheng SY (1999) Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology* 140(11):5267-5274.
- Batterman S, Godwin C, Chernyak S, Jia C & Charles S (2010) Brominated flame retardants in offices in Michigan, USA. *Environment international* 36(6):548-556.
- Berger RG, Lefevre PL, Ernest SR, Wade MG, Ma YQ, Rawn DF, Gaertner DW, Robaire B & Hales BF (2014) Exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants affects fetal development in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 320:56-66.
- Besis A & Samara C (2012) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor and outdoor environments--a review on occurrence and human exposure. *Environ Pollut* 169:217-229.
- Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, Wang F, Petersen OW & Schmeichel KL (1999) Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer research* 59(7 Suppl):1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
- Blake CA, McCoy GL, Hui YY & LaVoie HA (2011) Perinatal exposure to low-dose DE-71 increases serum thyroid hormones and gonadal osteopontin gene expression. *Exp Biol Med (Maywood)* 236(4):445-455.
- Bloom M, Spliethoff H, Vena J, Shaver S, Addink R & Eadon G (2008) Environmental exposure to PBDEs and thyroid function among New York anglers. *Environ Toxicol Pharmacol* 25(3):386-392.
- Bonnette SG & Hadsell DL (2001) Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds. *Endocrinology* 142(11):4937-4945.
- Boylan ES, Calhoon RE & Vonderhaar BK (1983) Transplacental action of diethylstilbestrol on reproductive and endocrine organs, mammary glands, and serum hormone levels in two- and nine-month-old female rats. *Cancer research* 43(10):4872-4878.
- Bradman A, Castorina R, Sjodin A, Fenster L, Jones RS, Harley KG, Chevrier J, Holland NT & Eskenazi B (2012) Factors associated with serum polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels among school-age children in the CHAMACOS cohort. *Environmental science & technology* 46(13):7373-7381.
- Brembeck FH, Rosario M & Birchmeier W (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16(1):51-59.
- Brennan K, Offiah G, McSherry EA & Hopkins AM (2010) Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010:460607.
- Brisken C (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):39-48.

- Briskin C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA & Ormandy CJ (1999) Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Developmental biology* 210(1):96-106.
- Briskin C & O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(12):a003178.
- Briskin C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW & Weinberg RA (1998) A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9):5076-5081.
- Brown NM, Manzillo PA, Zhang JX, Wang J & Lamartiniere CA (1998) Prenatal TCDD and predisposition to mammary cancer in the rat. *Carcinogenesis* 19(9):1623-1629.
- Bry C, Maass K, Miyoshi K, Willecke K, Ott T, Robinson GW & Hennighausen L (2004) Loss of connexin 26 in mammary epithelium during early but not during late pregnancy results in unscheduled apoptosis and impaired development. *Developmental biology* 267(2):418-429.
- Buhimschi CS (2004) Endocrinology of lactation. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 31(4):963-979, xii.
- Burstein HJ (2005) The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *The New England journal of medicine* 353(16):1652-1654.
- Butt S, Borgquist S, Anagnostaki L, Landberg G & Manjer J (2009) Parity and age at first childbirth in relation to the risk of different breast cancer subgroups. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 125(8):1926-1934.
- Calle EE, Mervis CA, Thun MJ, Rodriguez C, Wingo PA & Heath CW, Jr. (1996) Diethylstilbestrol and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of US women. *American journal of epidemiology* 144(7):645-652.
- cancer CcdIscd (2015) Statistiques canadiennes sur le cancer. in *Sujet particulier: Prévisions concernant le fardeau du cancer au Canada* (Toronto, Canada).
- cancer Scd (2016) *Anatomie et physiologie du sein.*, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/anatomy-and-physiology/?region=on>
- Cavallaro U & Christofori G (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4(2):118-132.
- Ceccatelli R, Faass O, Schlumpf M & Lichtensteiger W (2006) Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenylether PBDE 99 and PCB. *Toxicology* 220(2-3):104-116.
- Center for Drug Evaluation and Research CfBEaR (2002) Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Édit Administration USFaD Rockville, Maryland, USA).
- Cestari SH, Figueiredo NB, Conde SJ, Clara S, Katayama ML, Padovani CR, Brentani MM & Nogueira CR (2009) Influence of estradiol and triiodothyronine on breast cancer cell lines proliferation and expression of estrogen and thyroid hormone receptors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(7):859-864.
- Chatonnet F, Guyot R, Benoit G & Flamant F (2013) Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8):E766-775.
- Chevrier J, Harley KG, Bradman A, Gharbi M, Sjodin A & Eskenazi B (2010) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and thyroid hormone during pregnancy. *Environmental health perspectives* 118(10):1444-1449.

- Chevrier J, Harley KG, Bradman A, Sjodin A & Eskenazi B (2011) Prenatal exposure to polybrominated diphenyl ether flame retardants and neonatal thyroid-stimulating hormone levels in the CHAMACOS study. *American journal of epidemiology* 174(10):1166-1174.
- Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A & Investigators WHI (2003) Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Jama* 289(24):3243-3253.
- Clarke RB, Howell A, Potten CS & Anderson E (1997) Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer research* 57(22):4987-4991.
- Coburn CG, Curras-Collazo MC & Kodavanti PR (2008) In vitro effects of environmentally relevant polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners on calcium buffering mechanisms in rat brain. *Neurochemical research* 33(2):355-364.
- Conde I, Paniagua R, Zamora J, Blanquez MJ, Fraile B, Ruiz A & Arenas MI (2006) Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 17(1):60-64.
- Cooper A (1840) *The Anatomy of the Breast*. Longman, Orme, Green, Brown and Longmans, London
- Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, Bevers T, Strom S, Patangan M, Hsu L, Krishnamurthy S, Theriault RL & Hortobagyi GN (2005) Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer* 103(6):1122-1128.
- Curtis Hewitt S, Couse JF & Korach KS (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast cancer research : BCR* 2(5):345-352.
- Cyr DD, PJ; Plante, I. (2016) Immunohistochemistry and Female Reproductive Toxicology: The Ovary and Mammary Glands. *Technical Aspects of Toxicological Immunohistochemistry*, S.A. Aziz RM (Édit.) Springer Science + Business Media New York 10.1007/978-1-4939-1516-3_7.
- Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA & Cheng S (2000) Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16):8985-8990.
- Daniel CW, Silberstein GB & Strickland P (1987) Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer research* 47(22):6052-6057.
- Daniel CW, Strickland P & Friedmann Y (1995) Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Developmental biology* 169(2):511-519.
- Darnerud PO, Eriksen GS, Johannesson T, Larsen PB & Viluksela M (2001) Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental health perspectives* 109 Suppl 1:49-68.

- Dellovade TL, Zhu YS & Pfaff DW (1995) Potential interactions between estrogen receptor and thyroid receptors relevant for neuroendocrine systems. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53(1-6):27-31.
- Den Hond E, Tournaye H, De Sutter P, Ombelet W, Baeyens W, Covaci A, Cox B, Nawrot TS, Van Larebeke N & D'Hooghe T (2015) Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environment international* 84:154-160.
- Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR & Aaronson SA (1987) erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237(4811):178-182.
- Dinda S, Sanchez A & Moudgil V (2002) Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells. *Oncogene* 21(5):761-768.
- Dong H, Yauk CL, Rowan-Carroll A, You SH, Zoeller RT, Lambert I & Wade MG (2009) Identification of thyroid hormone receptor binding sites and target genes using ChIP-on-chip in developing mouse cerebellum. *PloS one* 4(2):e4610.
- Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H & Foisner R (2000) Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *The Journal of cell biology* 148(1):173-188.
- Eggesbo M, Thomsen C, Jorgensen JV, Becher G, Odland JO & Longnecker MP (2011) Associations between brominated flame retardants in human milk and thyroid-stimulating hormone (TSH) in neonates. *Environmental research* 111(6):737-743.
- El-Saghir JA, El-Habre ET, El-Sabban ME & Talhouk RS (2011) Connexins: a junctional crossroad to breast cancer. *The International journal of developmental biology* 55(7-9):773-780.
- Eldridge JM, RF; Wetzel, LT and Tisdell MO (1998) Appearance of Mammary Tumors in Atrazine-Treated Female Rats: Probable Mode of Action Involving Strain-Related Control of Ovulation and Estrous Cycle. *Triazine Herbicides: Risk Assessment* Ballantine LEA (Édit.) ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington DC.
- Environment and Climate Change C (2013) Flame Retarding Chemicals - A Cause for Environmental Concern.).
- Ernest SR, Wade MG, Lalancette C, Ma YQ, Berger RG, Robaire B & Hales BF (2012) Effects of chronic exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants on the reproductive and thyroid system in adult male rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 127(2):496-507.
- Eskenazi B, Chevrier J, Rauch SA, Kogut K, Harley KG, Johnson C, Trujillo C, Sjodin A & Bradman A (2013) In utero and childhood polybrominated diphenyl ether (PBDE) exposures and neurodevelopment in the CHAMACOS study. *Environmental health perspectives* 121(2):257-262.
- Estourgie SH, Nieweg OE, Olmos RA, Rutgers EJ & Kroon BB (2004) Lymphatic drainage patterns from the breast. *Annals of surgery* 239(2):232-237.
- Fenton SE, Reed C & Newbold RR (2012) Perinatal environmental exposures affect mammary development, function, and cancer risk in adulthood. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52:455-479.

- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D & Birchmeier W (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 113(1):173-185.
- Fromme H, Hilger B, Kopp E, Miserok M & Volkel W (2014) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and "novel" brominated flame retardants in house dust in Germany. *Environment international* 64:61-68.
- Gabos Z, Sinha R, Hanson J, Chauhan N, Hugh J, Mackey JR & Abdulkarim B (2006) Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24(36):5658-5663.
- Gallego MI, Binart N, Robinson GW, Okagaki R, Coschigano KT, Perry J, Kopchick JJ, Oka T, Kelly PA & Hennighausen L (2001) Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Developmental biology* 229(1):163-175.
- Gascon M, Vrijheid M, Martinez D, Fornis J, Grimalt JO, Torrent M & Sunyer J (2011) Effects of pre and postnatal exposure to low levels of polybromodiphenyl ethers on neurodevelopment and thyroid hormone levels at 4 years of age. *Environment international* 37(3):605-611.
- Geddes DT (2007) Inside the lactating breast: the latest anatomy research. *Journal of midwifery & women's health* 52(6):556-563.
- Gilbert ME, Rovet J, Chen Z & Koibuchi N (2012) Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* 33(4):842-852.
- Goldman JM, Murr AS & Cooper RL (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80(2):84-97.
- Gorga M, Martinez E, Ginebreda A, Eljarrat E & Barcelo D (2013) Determination of PBDEs, HBB, PBEB, DBDPE, HBCD, TBBPA and related compounds in sewage sludge from Catalonia (Spain). *The Science of the total environment* 444:51-59.
- Gosavi RA, Knudsen GA, Birnbaum LS & Pedersen LC (2013) Mimicking of estradiol binding by flame retardants and their metabolites: a crystallographic analysis. *Environmental health perspectives* 121(10):1194-1199.
- Graham JD & Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18(4):502-519.
- Haave M, Folven KI, Carroll T, Glover C, Heegaard E, Brattelid T, Hogstrand C & Lundebye AK (2011) Cerebral gene expression and neurobehavioural development after perinatal exposure to an environmentally relevant polybrominated diphenylether (BDE47). *Cell Biol Toxicol* 27(5):343-361.
- Hahnel R, Woodings T & Vivian AB (1979) Prognostic value of estrogen receptors in primary breast cancer. *Cancer* 44(2):671-675.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey E & Mainor TM (2002) Potential role of fire retardant-treated polyurethane foam as a source of brominated diphenyl ethers to the US environment. *Chemosphere* 46(5):729-735.

- Hall LC, Salazar EP, Kane SR & Liu N (2008) Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109(1-2):57-66.
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MH, Andersson PL, Legler J & Brouwer A (2006) In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 92(1):157-173.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Harley KG, Marks AR, Chevrier J, Bradman A, Sjodin A & Eskenazi B (2010) PBDE concentrations in women's serum and fecundability. *Environmental health perspectives* 118(5):699-704.
- Harrad S, Hazrati S & Ibarra C (2006) Concentrations of polychlorinated biphenyls in indoor air and polybrominated diphenyl ethers in indoor air and dust in Birmingham, United Kingdom: implications for human exposure. *Environmental science & technology* 40(15):4633-4638.
- Haslam SZ & Shyamala G (1979) Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship with lactation. *The Biochemical journal* 182(1):127-131.
- Hassiotou F & Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26(1):29-48.
- Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M & Cowin P (2003) Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8(2):145-158.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L & Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology* 148(4):779-790.
- Hendriks HS & Westerink RH (2015) Neurotoxicity and risk assessment of brominated and alternative flame retardants. *Neurotoxicology and teratology* 10.1016/j.ntt.2015.09.002.
- Henrichs J, Ghassabian A, Peeters RP & Tiemeier H (2013) Maternal hypothyroxinemia and effects on cognitive functioning in childhood: how and why? *Clinical endocrinology* 79(2):152-162.
- Herbstman JB, Sjodin A, Apelberg BJ, Witter FR, Halden RU, Patterson DG, Panny SR, Needham LL & Goldman LR (2008) Birth delivery mode modifies the associations between prenatal polychlorinated biphenyl (PCB) and polybrominated diphenyl ether (PBDE) and neonatal thyroid hormone levels. *Environmental health perspectives* 116(10):1376-1382.
- Hinck L & Silberstein GB (2005) Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast cancer research : BCR* 7(6):245-251.
- Hovey RC, Trott JF & Vonderhaar BK (2002) Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7(1):17-38.
- Hughes K, Wickenden JA, Allen JE & Watson CJ (2012) Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. *The Journal of pathology* 227(1):106-117.

- Hurley WL (1989) Mammary gland function during involution. *Journal of dairy science* 72(6):1637-1646.
- Hutson SW, Cowen PN & Bird CC (1985) Morphometric studies of age related changes in normal human breast and their significance for evolution of mammary cancer. *Journal of clinical pathology* 38(3):281-287.
- Itoh M & Bissell MJ (2003) The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8(4):449-462.
- Jenkins S, Betancourt AM, Wang J & Lamartiniere CA (2012) Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 129(3-5):191-200.
- Jinhui L, Yuan C & Wenjing X (2015) Polybrominated diphenyl ethers in articles: a review of its applications and legislation. *Environmental science and pollution research international* 10.1007/s11356-015-4515-6.
- Johnson PI, Stapleton HM, Mukherjee B, Hauser R & Meeker JD (2013) Associations between brominated flame retardants in house dust and hormone levels in men. *The Science of the total environment* 445-446:177-184.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D & Gray JW (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(12):5321-5325.
- Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 112(12):1776-1784.
- Kalluri R & Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119(6):1420-1428.
- Kanczuga-Koda L, Sulkowska M, Koda M, Reszec J, Famulski W, Baltaziak M & Sulkowski S (2003) Expression of connexin 43 in breast cancer in comparison with mammary dysplasia and the normal mammary gland. *Folia Morphol (Warsz)* 62(4):439-442.
- Kang NJ, Shin SH, Lee HJ & Lee KW (2011) Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics* 130(3):310-324.
- Kariagina A, Aupperlee MD & Haslam SZ (2007) Progesterone receptor isoforms and proliferation in the rat mammary gland during development. *Endocrinology* 148(6):2723-2736.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H & Chambon P (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal* 9(5):1603-1614.
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO & Gelmon K (2010) Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(20):3271-3277.
- Kester MH, Bulduk S, van Toor H, Tibboel D, Meinel W, Glatt H, Falany CN, Coughtrie MW, Schuur AG, Brouwer A & Visser TJ (2002) Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(3):1142-1150.

- Kim TH, Lee YJ, Lee E, Kim MS, Kwack SJ, Kim KB, Chung KK, Kang TS, Han SY, Lee J, Lee BM & Kim HS (2009) Effects of gestational exposure to decabromodiphenyl ether on reproductive parameters, thyroid hormone levels, and neuronal development in Sprague-Dawley rats offspring. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 72(21-22):1296-1303.
- Kim YR, Harden FA, Toms LM & Norman RE (2014) Health consequences of exposure to brominated flame retardants: a systematic review. *Chemosphere* 106:1-19.
- Kleinberg DL, Feldman M & Ruan W (2000) IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5(1):7-17.
- Kodavanti PR, Coburn CG, Moser VC, MacPhail RC, Fenton SE, Stoker TE, Rayner JL, Kannan K & Birnbaum LS (2010) Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71: neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 116(1):297-312.
- Kodavanti PR, Ward TR, Ludewig G, Robertson LW & Birnbaum LS (2005) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) effects in rat neuronal cultures: 14C-PBDE accumulation, biological effects, and structure-activity relationships. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 88(1):181-192.
- Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T & Miyazono K (2008) Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of cell science* 121(Pt 20):3317-3324.
- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP & Sukumar S (2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22(13):2021-2033.
- Koromilas AE & Sexl V (2013) The tumor suppressor function of STAT1 in breast cancer. *JAKSTAT* 2(2):e23353.
- Kuo YM, Sepulveda MS, Hua I, Ochoa-Acuna HG & Sutton TM (2010) Bioaccumulation and biomagnification of polybrominated diphenyl ethers in a food web of Lake Michigan. *Ecotoxicology* 19(4):623-634.
- Kuriyama SN, Talsness CE, Grote K & Chahoud I (2005) Developmental exposure to low dose PBDE 99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environmental health perspectives* 113(2):149-154.
- Laird DW, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh HT, Carystinos GD & Alaoui-Jamali MA (1999) Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer research* 59(16):4104-4110.
- Lange CA & Yee D (2008) Progesterone and breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)* 4(2):151-162.
- Lanigan F, O'Connor D, Martin F & Gallagher WM (2007) Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(24):3159-3184.
- Lavialle F, Rainteau D, Massey-Harroche D & Metz F (2000) Establishment of plasma membrane polarity in mammary epithelial cells correlates with changes in prolactin trafficking and in annexin VI recruitment to membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1464(1):83-94.

- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R & Thompson EW (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology* 172(7):973-981.
- Lefevre PL, Berger RG, Ernest SR, Gaertner DW, Rawn DF, Wade MG, Robaire B & Hales BF (2016) Exposure of Female Rats to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants Targets the Ovary, Affecting Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Biology of reproduction* 94(1):9.
- Li ZH, Liu XY, Wang N, Chen JS, Chen YH, Huang JT, Su CH, Xie F, Yu B & Chen DJ (2012) Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environmental health perspectives* 120(4):541-546.
- Lien WH, Klezovitch O & Vasioukhin V (2006) Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Current opinion in cell biology* 18(5):499-506.
- Lilienthal H, Hack A, Roth-Harer A, Grande SW & Talsness CE (2006) Effects of developmental exposure to 2,2 ,4,4 ,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environmental health perspectives* 114(2):194-201.
- Linares V, Belles M & Domingo JL (2015) Human exposure to PBDE and critical evaluation of health hazards. *Archives of toxicology* 89(3):335-356.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM & O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & development* 9(18):2266-2278.
- Mallepell S, Krust A, Chambon P & Briskin C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2196-2201.
- Masters JR, Drife JO & Scarisbrick JJ (1977) Cyclic Variation of DNA synthesis in human breast epithelium. *Journal of the National Cancer Institute* 58(5):1263-1265.
- McLachlan E, Shao Q & Laird DW (2007) Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *The Journal of membrane biology* 218(1-3):107-121.
- Medici D, Hay ED & Olsen BR (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Molecular biology of the cell* 19(11):4875-4887.
- Medina D (1996) The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1(1):5-19.
- Medina D, Kittrell FS, Shepard A, Contreras A, Rosen JM & Lydon J (2003) Hormone dependence in premalignant mammary progression. *Cancer research* 63(5):1067-1072.
- Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der Burg B & Brouwer A (2001) In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental health perspectives* 109(4):399-407.
- Meerts IA, van Zanden JJ, Luijckx EA, van Leeuwen-Bol I, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A & Brouwer A (2000) Potent competitive interactions of some brominated flame

- retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 56(1):95-104.
- Meites J & Kragt CL (1964) Effects of a Pituitary Homotransplant and Thyroxine on Body and Mammary Growth in Immature Hypophysectomized Rats. *Endocrinology* 75:565-570.
- Meniel V & Clarke AR (2003) Wnt-cadherin connections in normal and neoplastic mammary epithelium. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8(4):435-447.
- Moffat DF & Going JJ (1996) Three dimensional anatomy of complete duct systems in human breast: pathological and developmental implications. *Journal of clinical pathology* 49(1):48-52.
- Momiyama M, Omori Y, Ishizaki Y, Nishikawa Y, Tokairin T, Ogawa J & Enomoto K (2003) Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer science* 94(6):501-507.
- Monaghan P, Clarke C, Perusinghe NP, Moss DW, Chen XY & Evans WH (1996) Gap junction distribution and connexin expression in human breast. *Experimental cell research* 223(1):29-38.
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ & Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(17):9744-9749.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP & Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289(5485):1751-1754.
- Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R & Leder P (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54(1):105-115.
- Munoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C & Soto AM (2005) Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146(9):4138-4147.
- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C & Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23(3):383-390.
- Naus CC & Laird DW (2010) Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(6):435-441.
- Neve RM, Lane HA & Hynes NE (2001) The role of overexpressed HER2 in transformation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 12 Suppl 1:S9-13.
- Nguyen DA, Parlow AF & Neville MC (2001) Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *The Journal of endocrinology* 170(2):347-356.
- Nogueira CR & Brentani MM (1996) Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 59(3-4):271-279.
- Obr AE & Edwards DP (2012) The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology* 357(1-2):4-17.

- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S & Kemler R (1999) E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of cell science* 112 (Pt 8):1237-1245.
- Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, 3rd & McGuire WL (1980) The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46(12 Suppl):2884-2888.
- Oulhote Y, Chevrier J & Bouchard MF (2016) Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hypothyroidism in Canadian Women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101(2):590-598.
- Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M & Hoover RN (2006) Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15(8):1509-1514.
- Pang WW & Hartmann PE (2007) Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 12(4):211-221.
- Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F & Schmitt FC (2005) P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(16):5869-5877.
- Paredes J, Milanezi F, Viegas L, Amendoeira I & Schmitt F (2002) P-cadherin expression is associated with high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *Virchows Arch* 440(1):16-21.
- Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL & Leitman DC (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer research* 64(1):423-428.
- Peralta Soler A, Knudsen KA, Salazar H, Han AC & Keshgegian AA (1999) P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival. *Cancer* 86(7):1263-1272.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-752.
- Pitelka DR, Hamamoto ST, Duafala JG & Nemanic MK (1973) Cell contacts in the mouse mammary gland. I. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. *The Journal of cell biology* 56(3):797-818.
- Plante I, Charbonneau M & Cyr DG (2006) Activation of the integrin-linked kinase pathway downregulates hepatic connexin32 via nuclear Akt. *Carcinogenesis* 27(9):1923-1929.
- Plante I, Cyr DG & Charbonneau M (2005) Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 88(2):346-357.
- Plante I & Laird DW (2008) Decreased levels of connexin43 result in impaired development of the mammary gland in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Developmental biology* 318(2):312-322.

- Pollmann MA, Shao Q, Laird DW & Sandig M (2005) Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast cancer research : BCR* 7(4):R522-534.
- Potten CS, Watson RJ, Williams GT, Tickle S, Roberts SA, Harris M & Howell A (1988) The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *British journal of cancer* 58(2):163-170.
- Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R & et al. (1993) Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer research* 53(20):4960-4970.
- Qu BL, Yu W, Huang YR, Cai BN, Du LH & Liu F (2015) 6-OH-BDE-47 promotes human lung cancer cells epithelial mesenchymal transition via the AKT/Snail signal pathway. *Environ Toxicol Pharmacol* 39(1):271-279.
- Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M & Hynes RO (1997) Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *The Journal of cell biology* 139(4):1025-1032.
- Reeves GK, Beral V, Green J, Gathani T, Bull D & Million Women Study C (2006) Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *The Lancet. Oncology* 7(11):910-918.
- Reynolds AB & Carnahan RH (2004) Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 15(6):657-663.
- Rice C, Birnbaum LS, Coglianò J, Mahaffey K, Needham L, Rogan WJ & vom Saal FS (2003) Exposure assessment for endocrine disruptors: some considerations in the design of studies. *Environmental health perspectives* 111(13):1683-1690.
- Rose M, Bennett DH, Bergman A, Fangstrom B, Pessah IN & Hertz-Picciotto I (2010) PBDEs in 2-5 year-old children from California and associations with diet and indoor environment. *Environmental science & technology* 44(7):2648-2653.
- Russo IH & Russo J (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental health perspectives* 104(9):938-967.
- Russo J, Calaf G, Roi L & Russo IH (1987) Influence of age and gland topography on cell kinetics of normal human breast tissue. *Journal of the National Cancer Institute* 78(3):413-418.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR & van Zwieten MJ (1990) Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62(3):244-278.
- Russo J & Russo IH (2004) Development of the human breast. *Maturitas* 49(1):2-15.
- Ryan JJ & Rawn DF (2014) The brominated flame retardants, PBDEs and HBCD, in Canadian human milk samples collected from 1992 to 2005; concentrations and trends. *Environment international* 70:1-8.
- Samuelsen HPB (2014) *The effects of Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on the cell viability, gap junction intercellular communication and DNA damage in the epithelial liver cell line IAR20 in vitro*. Master (Norwegian University of Life Sciences).
- Saraiva PP, Figueiredo NB, Padovani CR, Brentani MM & Nogueira CR (2005) Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Brazilian journal of medical and*

- biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 38(5):761-765.
- Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS & Horwitz KB (1994) A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8(10):1347-1360.
- Schapira M, Raaka BM, Das S, Fan L, Totrov M, Zhou Z, Wilson SR, Abagyan R & Samuels HH (2003) Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12):7354-7359.
- Schreiber T, Gassmann K, Gotz C, Hubenthal U, Moors M, Krause G, Merk HF, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J, Rose CR & Fritsche E (2010) Polybrominated diphenyl ethers induce developmental neurotoxicity in a human in vitro model: evidence for endocrine disruption. *Environmental health perspectives* 118(4):572-578.
- Shao ZM, Sheikh MS, Rishi AK, Dawson MI, Li XS, Wilber JF, Feng P & Fontana JA (1995) Thyroid hormone enhancement of estradiol stimulation of breast carcinoma proliferation. *Experimental cell research* 218(1):1-8.
- Shi Y & Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6):685-700.
- Shoeib M, Harner T, Webster GM, Sverko E & Cheng Y (2012) Legacy and current-use flame retardants in house dust from Vancouver, Canada. *Environ Pollut* 169:175-182.
- Silva JE & Matthews P (1984) Thyroid hormone metabolism and the source of plasma triiodothyronine in 2-week-old rats: effects of thyroid status. *Endocrinology* 114(6):2394-2405.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A & McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235(4785):177-182.
- Smyth PP (1997) The thyroid and breast cancer: a significant association? *Ann Med* 29(3):189-191.
- Smyth PP, Smith DF, McDermott EW, Murray MJ, Geraghty JG & O'Higgins NJ (1996) A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81(3):937-941.
- Soto AM, Brisken C, Schaeberle C & Sonnenschein C (2013) Does cancer start in the womb? altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 18(2):199-208.
- Soyal S, Ismail PM, Li J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM & Lydon JP (2002) Progesterone's role in mammary gland development and tumorigenesis as disclosed by experimental mouse genetics. *Breast cancer research : BCR* 4(5):191-196.
- Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MR & Hanby AM (2004) Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. *The Lancet. Oncology* 5(3):174-181.
- Stapleton HM, Allen JG, Kelly SM, Konstantinov A, Klosterhaus S, Watkins D, McClean MD & Webster TF (2008) Alternate and new brominated flame retardants detected in U.S. house dust. *Environmental science & technology* 42(18):6910-6916.
- Stapleton HM, Eagle S, Anthopolos R, Wolkin A & Miranda ML (2011) Associations between polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants, phenolic metabolites, and

- thyroid hormones during pregnancy. *Environmental health perspectives* 119(10):1454-1459.
- Stasinska A, Heyworth J, Reid A, Callan A, Odland JO, Trong Duong P, Van Ho Q & Hinwood A (2014) Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in plasma of pregnant women from Western Australia. *The Science of the total environment* 493:554-561.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P & Werb Z (2006) Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 74(7):365-381.
- Stewart MK, Plante I, Bechberger JF, Naus CC & Laird DW (2014) Mammary gland specific knockdown of the physiological surge in Cx26 during lactation retains normal mammary gland development and function. *PloS one* 9(7):e101546.
- Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H & Foisner R (2001) E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of cell biology* 154(6):1185-1196.
- Stoker TE, Cooper RL, Lambright CS, Wilson VS, Furr J & Gray LE (2005) In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicology and applied pharmacology* 207(1):78-88.
- Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J & Gustafsson JA (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(6):1566-1571.
- Strumane K, Berx G & Van Roy F (2004) Cadherins in cancer. *Handbook of experimental pharmacology* 10.1007/978-3-540-68170-0_4(165):69-103.
- Stubbings WA & Harrad S (2014) Extent and mechanisms of brominated flame retardant emissions from waste soft furnishings and fabrics: A critical review. *Environment international* 71:164-175.
- Stull MA, Pai V, Vomachka AJ, Marshall AM, Jacob GA & Horseman ND (2007) Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(42):16708-16713.
- Suvorov A, Battista MC & Takser L (2009) Perinatal exposure to low-dose 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether affects growth in rat offspring: what is the role of IGF-1? *Toxicology* 260(1-3):126-131.
- Suvorov A, Bissonnette C, Takser L & Langlois MF (2011) Does 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether interact directly with thyroid receptor? *J Appl Toxicol* 31(2):179-184.
- Szabo DT, Richardson VM, Ross DG, Diliberto JJ, Kodavanti PR & Birnbaum LS (2009) Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 107(1):27-39.
- Talhok RS, Fares MB, Rahme GJ, Hariri HH, Rayess T, Dbouk HA, Bazzoun D, Al-Labban D & El-Sabban ME (2013) Context dependent reversion of tumor phenotype by connexin-43 expression in MDA-MB231 cells and MCF-7 cells: role of beta-catenin/connexin43 association. *Experimental cell research* 319(20):3065-3080.
- Talhok RS, Mroue R, Mokalled M, Abi-Mosleh L, Nehme R, Ismail A, Khalil A, Zaatari M & El-Sabban ME (2008) Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap

- junction-dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Experimental cell research* 314(18):3275-3291.
- Talsness CE, Kuriyama SN, Sterner-Kock A, Schnitker P, Grande SW, Shakibaei M, Andrade A, Grote K & Chahoud I (2008) In utero and lactational exposures to low doses of polybrominated diphenyl ether-47 alter the reproductive system and thyroid gland of female rat offspring. *Environmental health perspectives* 116(3):308-314.
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6):442-454.
- Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K & Schaff Z (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast cancer research : BCR* 7(2):R296-305.
- Tosovic A, Bondeson AG, Bondeson L, Ericsson UB, Malm J & Manjer J (2010) Prospectively measured triiodothyronine levels are positively associated with breast cancer risk in postmenopausal women. *Breast cancer research : BCR* 12(3):R33.
- Tung EW, Yan H, Lefevre PL, Berger RG, Rawn DF, Gaertner DW, Kawata A, Rigden M, Robaire B, Hales BF & Wade MG (2016) Gestational and Early Postnatal Exposure to an Environmentally Relevant Mixture of Brominated Flame Retardants: General Toxicity and Skeletal Variations. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 107(3):157-168.
- van der Geer P, Hunter T & Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251-337.
- van der Ven LT, Verhoef A, van de Kuil T, Slob W, Leonards PE, Visser TJ, Hamers T, Herlin M, Hakansson H, Olausson H, Piersma AH & Vos JG (2006) A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 94(2):281-292.
- van Roy F & Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(23):3756-3788.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW & McDonnell DP (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7(10):1244-1255.
- Velasco LF, Togashi M, Walfish PG, Pessanha RP, Moura FN, Barra GB, Nguyen P, Rebong R, Yuan C, Simeoni LA, Ribeiro RC, Baxter JD, Webb P & Neves FA (2007) Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *The Journal of biological chemistry* 282(17):12458-12466.
- Venta LA, Dudiak CM, Salomon CG & Flisak ME (1994) Sonographic evaluation of the breast. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 14(1):29-50.
- Visvader JE (2009) Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development* 23(22):2563-2577.
- Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W & van Roy F (1991) Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66(1):107-119.
- Vonderhaar BK, Tang E, Lyster RR & Nascimento MC (1986) Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands. *Endocrinology* 119(2):580-585.

- Vorherr H (1987) Thyroid function in benign and malignant breast disease. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23(3):255-257.
- Wang J, Jarrett J, Huang CC, Satcher RL, Jr. & Levenson AS (2007) Identification of estrogen-responsive genes involved in breast cancer metastases to the bone. *Clinical & experimental metastasis* 24(6):411-422.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U & Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383(5):725-737.
- Windham GC, Pinney SM, Voss RW, Sjodin A, Biro FM, Greenspan LC, Stewart S, Hiatt RA & Kushi LH (2015) Brominated Flame Retardants and Other Persistent Organohalogenated Compounds in Relation to Timing of Puberty in a Longitudinal Study of Girls. *Environmental health perspectives* 10.1289/ehp.1408778.
- Wolf CS, J and Fenton, SE. (2010) Mammary gland development and response to prenatal atrazine exposure in the Sprague Dawley and Long-Evans rats. *Society of Toxicology 49th Annual meeting*. (Salt Lake City UT, March 07-11 2010).
- Wu JC, Tsai RY & Chung TH (2003) Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 88(4):823-835.
- Xie H, Laird DW, Chang TH & Hu VW (1997) A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *The Journal of cell biology* 137(1):203-210.
- Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, Thomas MP, Radice GL & Lo CW (2001) Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *The Journal of cell biology* 154(1):217-230.
- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI & Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123(5):889-901.
- Yang L, Luo L, Ji W, Gong C, Wu D, Huang H, Liu Q, Xia B, Hu G, Zhang W, Zhang Q, Liu J, Zhang W & Zhuang Z (2013) Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. *Toxicology letters* 218(3):187-193.
- Yao F, Zhang C, Du W, Liu C & Xu Y (2015) Identification of Gene-Expression Signatures and Protein Markers for Breast Cancer Grading and Staging. *PloS one* 10(9):e0138213.
- Yao H, Ashihara E & Maekawa T (2011) Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Expert Opin Ther Targets* 15(7):873-887.
- Yoshida R, Kimura N, Harada Y & Ohuchi N (2001) The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *International journal of oncology* 18(3):513-520.
- Zhong Y CC, Wang X, Guo P, Zhang X, Yu Z and An J (2014) HBCD and PCBs Enhance HepG2 Migration and Invasion. *Toxicology Research* 10.1039/C4TX00108G.
- Zota AR, Park JS, Wang Y, Petreas M, Zoeller RT & Woodruff TJ (2011) Polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated polybrominated diphenyl ethers, and measures of thyroid function in second trimester pregnant women in California. *Environmental science & technology* 45(18):7896-7905.
- Zucca-Matthes G, Urban C & Vallejo A (2016) Anatomy of the nipple and breast ducts. *Gland Surg* 5(1):32-36.

ANNEXE I

Tableau 2. Composition chimique du mélange de BFRs. Comparaison avec les niveaux des différents congénères présents dans la poussière de maisons. Tiré de (Ernest *et al.*, 2012).

Diet Formulation						
Congener	House dust levels ^a		Congeners in component technical mixtures (%)			
	Median (ng/g)	Percentage (%)	DE-71 ^b (52.08%) ^c	DE-79 ^c (0.36%) ^c	BDE-209 ^d (44.18%) ^e	HBCT (3.38%) ^e
BDE-17	1.4	0.01	0.04			0.02
BDE-28	16.3	0.16	0.37			0.19
BDE-47	1865	17.93	33.93			17.19
BDE-49	29.6	0.28	0.77			0.40
BDE-66	17.2	0.17	1.02			0.53
BDE-85	124	1.19	3.18			1.66
BDE-99	2460	23.64	41.40	0.03		21.56
BDE-100	436.3	4.19	7.10			3.70
BDE-138	20.9	0.2	0.24	0.50		0.13
BDE-153	234.4	2.25	3.75	6.17		4.18
BDE-154	182.8	1.76	3.00	0.93		1.57
BDE-183	27.9	0.27	0.08	37.20		0.18
BDE-197	2.7	0.03		21.60		0.08
BDE-207	45.9	0.44		13.70		0.05
BDE-209	4502	43.27		1.81	98.00	43.30
HBCT		3.40				99.00

^aValues for PBDE congeners in dust are those reported by Allen *et al.* (2008), whereas total HBCT values are derived from the analyses of the same samples but reported by Stapleton *et al.* (2008)

^bCongener levels in technical DE-71 are those reported by Konstantinov *et al.* (2008).

^cCongener levels in technical DE-79 are those reported in the certificate of analysis provided by supplier.

^dCongener levels in BDE-209 are those reported in the certificate of analysis provided by supplier.

^eAmount in final mixture.