



**HAL**  
open science

# Approches moléculaires et cellulaires des effets combinés du bisphénol A, du glyphosate et d'une toxine marine sur quatre modèles cellulaires humains

Mariem Laamari

## ► To cite this version:

Mariem Laamari. Approches moléculaires et cellulaires des effets combinés du bisphénol A, du glyphosate et d'une toxine marine sur quatre modèles cellulaires humains. Biologie cellulaire. Université de La Rochelle, 2016. Français. NNT : 2016LAROS027 . tel-01663066

**HAL Id: tel-01663066**

**<https://theses.hal.science/tel-01663066>**

Submitted on 13 Dec 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE**

**ÉCOLE DOCTORALE**

*Sciences pour l'Environnement Gay-Lussac*

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR

Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé (AMES)

THESE présentée par:

**Mariem Laamari**

Thèse soutenue le 16 décembre 2016

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Rochelle

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Approches moléculaires et cellulaires des effets combinés du bisphénol A, du glyphosate et d'une toxine marine sur quatre modèles cellulaires humains**

---

JURY:

Mr MESNIL Marc

Professeur, Université de Poitiers, Rapporteur

Mr COUMOULXavier

Professeur, Université Paris Descartes, Rapporteur

Mme LIAUDET COOPMAN

Professeur, Université Montpellier, Examinatrice

Emmanuelle

Mme RODRIGUES Ligia

Professeur, Université de Minho, Examinatrice

Mme FRUITIER-ARNAUDIN

Maître de conférences HDR, Université de la Rochelle,  
directrice de thèse

Ingrid

Mme BORDENAVE-

Maître de conférences HDR, Université de la Rochelle,  
directrice de thèse

JUCHEREAU Stéphanie

## *Remerciements*

Les travaux de cette thèse ont été menés au laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) de l'université de La Rochelle. Je tiens donc à remercier le professeur Olivier de Viron directeur du LIENSs pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie particulièrement mes directrices de thèse Dr. Ingrid Arnaudin Fruitier et Dr. Stéphanie Bordenave Juchereau pour avoir accepté de m'encadrer durant ce travail doctoral. Leurs conseils, leur disponibilité pour nos nombreuses discussions sur le déroulement des travaux et les problèmes rencontrés, leurs efforts pour assurer le bon financement du projet malgré leurs nombreuses occupations étaient des éléments puissants pour cette thèse.

Je veux remercier également les professeurs Marc Mesnil de l'Université de Poitiers, Xavier Coumoul de l'Université Paris Descartes qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi les membres de jury Emmanuelle Liaudet Coopman et Ligia Rodrigues.

J'adresse également mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

Messieurs Jean Michel Qiuyu Zhao et Antoine Bonnet qui m'ont aidé pour les analyses chromatographiques. Madame Yesmine Ben Henda collègue de bureau et amie depuis 4 ans, qui m'a aidé pour la partie biologie moléculaire. Leur grande participation a contribué à la réussite de ce travail. Je leur adresse mes plus sincères remerciements

Je remercie l'ensemble du personnel administratif du LIENSs: Viviane Biou, Laetitia Darre et Marie Chivaille ainsi la direction des études de l'école doctorale : Jennifer De La Corte Gomez et Isabelle Hirsch d'avoir facilité le déroulement des tâches administratives.

Un grand merci à tous mes collègues Floriant Lejibioux, Benjamin Le Bris, Nicolas Poupard et Valérie Sopéna.

Un grand merci à tous les doctorants tunisiens qui sont passés par ce laboratoire pour les bons moments partagés : Yesmine Ben henda, Oussema Achour et Rachida Mersni, ou des autres laboratoires de l'Université de La Rochelle : Rafika Lassoued, Dorsaf Hnain et Imene Moustafaoui (Algérienne).

Enfin, je tiens particulièrement à remercier mes parents Zayed et Anaya, mon frère Raouf, ma cousine Soumaya et mon mari Mourad pour leur soutien moral et physique durant mon parcours.

# ***TABLE DES MATIERES***

## Sommaire

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	4
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	9
Liste des figures .....	10
Liste des tableaux .....	13
<b>INTRODUCTION GENERALE,OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	14
<b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	18
I. Les micropolluants bisphénol A, glyphosate et acide okadaïque .....	19
I.1. Le bisphénol A- Généralités .....	19
I.1.1. Contamination du sol et de l'eau par BPA .....	20
I.1.2. Voies d'exposition humaine au bisphénol A .....	20
I.1.3. Bisphénol A et action sur le système endocrinien .....	21
I.1.3.1. Oestrogènes, récepteurs et mécanisme d'action du BPA .....	22
I.1. 4. Effets du bisphénol A sur la reproduction .....	24
I.1.5. Effets du bisphénol A sur le développement du système nerveux et immunitaire .....	26
I.1.8. Méthodes analytiques pour le dosage du bisphénol A .....	28
I.2. Le glyphosate- Généralités .....	30
I.2.1. Contamination du sol et de l'eau par le glyphosate .....	31
I.2.2. Exposition au GLP et effets sur la santé .....	32
I.2.3. Méthodes de détection et de dosage du GLP .....	33
I.3. L'acide okadaïque, toxine diarrhéique- Généralités .....	34
I.3.1. Mode d'action de l'acide okadaïque et toxicité .....	36
I.3.2. Rôle des phosphatases PP1 et PP 2A .....	37
I.3.2.1. La phosphatase 1 .....	37
I.3.2.2. La phosphatase 2A .....	38
I.3.3. Toxicité de l'AO .....	38
I. 3.3.1. AO et pertes fécales .....	38
I. 3.3.2. Effet neuro-toxique de l'AO .....	39
I.3.3.3. AO et mort cellulaire .....	39
I.3.3.5. AO et métabolisme lipidique .....	40
II. Obésité et polluants .....	42
II.1. Le tissu adipeux .....	42
II.1.1. Généralités .....	42
II.1.2. Adipogenèse .....	43
II.1.2.1. Etape de l'engagement .....	43
II.1.2.2. Etape de la différenciation terminale .....	43
II.1.3. Les facteurs transcriptionnels de la différenciation .....	44

II.1.3.1. Facteurs C/EBP .....	44
II.1.3.2. Les facteurs PPARs .....	45
II.2. Polluants environnementaux et tissu adipeux .....	46
III. Cancer du sein .....	47
III.1. Généralités .....	47
III.2. Histologie du sein.....	48
III.3. Modèles de lignées cellulaires de cancer du sein.....	49
III.4. Facteurs impliqués dans le cancer du sein .....	50
III.4.1. Facteurs impliqués dans le cancer du sein associés à l'obésité.....	50
III.4.1.1. Lien entre cancer et obésité ; hormones et facteurs de croissances : l'insuline .....	50
III.4.1.2. Les cytokines inflammatoires .....	50
III.4.1.3. Les adipokines, cancer et obésité.....	51
III.4.1.3.1. Leptine .....	51
III.4.1.3.2. Adiponectine .....	51
III.5. Polluants environnementaux et cancer.....	51
IV. Polluants, obésité, cancer.....	53
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES .....	55
I. Matériels biologiques.....	56
II. Réactifs et molécules.....	56
III. Conditions de culture des cellules.....	56
III.1. Mise en culture.....	57
III.2. Trypsination .....	57
III.3. Dénombrement cellulaire.....	57
III.4. Culture des préadipocytes humains.....	57
III.5. Culture des cellules cancéreuses MCF7 et MDA-MB 231 .....	59
III.6. Culture des cellules mammaires épithéliales HME1 .....	59
IV. Etude de l'effet des micropolluants sur la viabilité des cellules MCF7, MDA-MB 231, HME1 .....	59
IV.1. Mode d'action des polluants sur la viabilité cellulaire .....	60
IV.1.1. Cartographie protéomique comparative d'expression de protéines issues de cellules traitées par les micropolluants.....	60
IV.1.1.1. Culture et incubation des cellules avec polluants pour l'analyse 2D .....	61
IV.1.1.2. Extraction des protéines intracellulaires .....	62
IV.1.1.3. Electrophorèse bidimensionnelle (2D) .....	62
IV.1.1.3.1. La première dimension .....	62
IV.1.1.3.2. Deuxième dimension .....	63
IV.1.1.3.3. Analyse des gels 2D.....	64
IV.1.2. Analyse de l'expression de la protéine HSP70 par western blot .....	65

IV.1.3. Dosage de l'activité des protéines phosphatases .....	66
V. Méthodes de détection et de dosage de polluants .....	66
V.1. Détection et quantification du GLP dans le milieu de culture .....	67
V.1.1. Dérivation du GLP par le PITC: .....	67
V.1.2. Détection et Quantification du complexe PTC-GLP : .....	68
V.1.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	69
V.1.5. Validation de la méthode de dérivation .....	69
V.2. Détection et quantification du BPA dans le milieu de culture .....	70
V.3. Détection et Quantification de l'AO par UPLC/MS <sup>E</sup> .....	71
VI. Effets des polluants sur l'adipogenèse.....	72
VI.1. Influence des polluants sur la viabilité de la lignée HWP à différents stades de maturation .....	72
VI.2. Influence des polluants sur la lipogenèse .....	73
VI.3. Influence des polluants sur l'expression des marqueurs de la différenciation .....	74
VII. Etude de l'effet du sécrétome des préadipocytes sur la viabilité des cellules cancéreuses	75
<b>CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	77
<b>Partie 1 : Etude de l'effet des polluants seuls ou en mélange sur la viabilité cellulaire</b> ...	77
I. Influence des polluants sur la viabilité cellulaire .....	78
I.1. Influence des polluants sur la viabilité des cellules cancéreuses.....	78
I.1.1. Lignée cancéreuse MCF7 .....	78
I.1.1.1. Effet du BPA sur la viabilité cellulaire .....	78
I.1.1.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire .....	79
I.1.1.3. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire.....	80
I.1.1.4. Effet de mélange de polluants sur la viabilité cellulaire.....	80
I.1.2. Lignée cancéreuse MDA-MB 231 .....	82
I.1.2.1. Effet du BPA sur la viabilité cellulaire.....	82
I.1.2.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire .....	83
I.1.2.3. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire.....	83
I.1.2.4. Effet de mélange de polluants sur la viabilité cellulaire.....	84
I.2. Incidence des polluants sur la lignée saine HME1 .....	84
I.2.1. Effet du BPA sur la viabilité cellulaire.....	84
I.2.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire .....	85
I.2.3. Effet de l'AO sur la viabilité des cellules HME1 .....	86
I.2.4. Effet de mélange de polluants sur la viabilité des cellules HME1 .....	86
I.3. Analyse protéomique des cellules MCF7, MDA-MB 231 et HME1 exposées aux polluants .....	89
I.3.1. Analyse protéomique la lignée MCF7 exposée aux polluants.....	93
I.2.2. Analyse protéomique de la lignée MDA-MB 231.....	96

I.2.3. Analyse protéomique de la lignée HME1 .....	99
I.3. Effet de polluants sur l'activité des protéines phosphatases : Tyrosine phosphatase.....	103
<b>CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>108</b>
<b>Partie 2 : Elucidation du mécanisme d'action des polluants sur les cellules. Les polluants empruntent –ils la voie extra ou intracellulaire ? .....</b>	<b>108</b>
II. Dosage des polluants dans le milieu de culture cellulaire.....	109
II.1. Dérivation du glyphosate par le PITC, analyse UPLC/MS <sup>E</sup> et RMN du complexe GLP-PITC formé. ....	109
II.1.2. Détermination des limites de détection et de quantification de la dérivation du GLP par le PITC dans l'eau.....	113
II.1.3. Quantification du GLP dans le milieu de culture cellulaire .....	115
II.2. Quantification de l'AO dans le milieu de culture.....	118
II.3. Dosage du BPA dans le milieu de culture cellulaire .....	122
<b>CHAPITRE III:RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>130</b>
<b>Partie 3 : Polluants et obésité .....</b>	<b>130</b>
III. Influence des polluants sur les adipocytes humains blancs .....	131
III.1. Effets des polluants sur la viabilité des préadipocytes pendant la phase de prolifération .....	131
III.1.1. Effet sur BPA sur la viabilité cellulaire de la lignée HWP .....	131
III.1.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire de la lignée HWP .....	132
III.1.3. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire de la lignée HWP.....	133
III.1.4.Effet des polluants sur le profil protéomique des HWP.....	135
III.2. Effet des polluants sur la viabilité des préadipocytes en phase de différenciation .....	138
III.3. Effet des polluants sur la teneur de lipides résiduels des adipocytes matures .....	140
III.4. Effet des polluants sur l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire .....	142
IV. Etude de l'effet du sécrétome des préadipocytes sur la viabilité des cellules cancéreuses .....	148
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>151</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>156</b>

# ***TABLE DES ILLUSTRATIONS***

**Liste des figures**

Figure 1: Structure chimique du bisphénol A (BPA).....	19
Figure 2: Répartition des différentes applications du BPA dans les produits de consommation courants par rapport à la production mondiale.....	19
Figure 3: Structure chimique du bisphénol A et de l'œstradiol.....	22
Figure 4: Mécanisme d'action des récepteurs œstrogéniques (Le Grand, 2009). ....	23
Figure 5: Mécanisme d'action du BPA sur la lignée MDA-MB 231 (Castillo Sanchez et al., 2016b). ....	27
Figure 6: % BPA et de ses dérivés détectés dans l'urine et le sérum humain (Chunyang Liao, 2012). ....	29
Figure 7: Structure chimique du glyphosate. ....	30
Figure 8: Structures chimiques de l'acide okadaïque et de ses dérivés. ....	35
Figure 9: Mécanisme d'action de l'acide okadaïque et de ses dérivés sur les protéines (Baco, 2011). ....	37
Figure 10: Etapes de l'adipogenèse. ....	44
Figure 11: Mécanisme d'action des PPAR dans les adipocytes. ....	45
Figure 12: Les facteurs transcriptionnels de la régulation de l'expression du PPAR. ....	46
Figure 13: Anatomie du sein.....	48
Figure 14: Schéma des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse (Luch, 2005). ....	52
Figure 15: Mécanisme d'action du glyphosate sur la lignée T47D (Thongprakaisang et al., 2013). ....	53
Figure 16: Mécanisme d'action potentiel des polluants organiques persistants sur la progression tumorale (Reaves et al., 2015). ....	54
Figure 17: Observation microscopique du cycle de culture des HWP (G: 20X).....	59
Figure 18: Culture et incubation des cellules avec les polluants pour l'analyse protéomique. ....	61
Figure 19: Système de migration de protéines adaptées pour les grands gels (Biorad).....	64
Figure 20: Etapes d'analyse du profil protéomique des cellules par 2D couplée à MS/MALDI-TOF. ....	65
Figure 21: Extraction du BPA à partir du milieu de culture par di-éthyle éther.....	70
Figure 22: Gradient d'élution d'AO par UPLC/MS.....	72
Figure 23: Effet du BPA sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	79
Figure 24: Effet du GLP sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	80
Figure 25: Effet de mélange de polluants sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	81
Figure 26: Effet du BPA sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	82
Figure 27: Effet du GLP sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	83
Figure 28: Effet de mélanges de polluants sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.....	84
Figure 29: Effet du BPA sur la viabilité de la lignée HME 1 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	85
Figure 30: Effet du GLP sur la viabilité de la lignée HME1 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	86
Figure 31: Effet de mélange de polluants sur la viabilité de la lignée HME1 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	87

## Table des illustrations

Figure 32: Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules MCF-7 incubées avec les polluants. ....	90
Figure 33: Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules MDA-MB 231 incubées avec les polluants. ....	92
Figure 34: Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules HME 1 incubées avec les polluants. ....	93
Figure 35: Analyse de l'expression de la protéine HSP7C des cellules MDA-MB 231 par Western blot après 72h d'incubation avec le BPA, le GLP ou bien BPA + GLP. ....	98
Figure 36: Analyse de l'expression de la protéine HSP7C au niveau des cellules HME1 par Western blot après 72 d'incubation avec AO. ....	101
Figure 37: Effet des polluants sur l'activité des protéines phosphatases après 72h d'incubation des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) avec les polluants. ....	105
Figure 38: Effet des polluants sur l'activité des protéines phosphatases après 72h d'incubation des cellules HME1 avec les polluants. ....	106
Figure 39: Analyse du produit PTC-GLP. ....	110
Figure 40: Analyse du spectre proton $H^1$ (A, B) et du proton $13C$ du PTC-GLP. ....	112
Figure 41: Courbe étalon du GLP dérivé dans l'eau. ....	113
Figure 42: Gamme étalon du GLP préparée dans le milieu DMEM. ....	115
Figure 43: Chromatogramme obtenu après dérivation du GLP dans le milieu de culture DMEM. ....	117
Figure 44: Analyse de l'AO par UPLC/MS. ....	118
Figure 45: Gamme étalon de l'AO préparée dans le milieu DMEM. ....	119
Figure 46: Quantification de l'AO dans le milieu de culture des cellules MCF7 et MDA-MB 231. ....	120
Figure 47: Gamme étalon de l'AO préparée dans le milieu MEM. ....	120
Figure 48: Quantification de l'AO dans le milieu de culture des cellules HME1. ....	121
Figure 49: Chromatogramme relatif au BPA obtenu par UPLC. ....	122
Figure 50: Gamme étalon de BPA préparée dans le milieu DMEM. ....	123
Figure 51: Analyse UPLC du milieu de culture des cellules MCF7 incubées avec BPA à 80 $\mu$ M. ....	124
Figure 52: Analyse UPLC du milieu de culture des cellules MDA-MB 231 incubées avec BPA à 80 $\mu$ M. ....	126
Figure 53: Analyse UPLC du milieu de culture des cellules HME1 incubées avec BPA à 80 $\mu$ M. ....	128
Figure 54: Effet du BPA sur la viabilité des cellules HWP après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	132
Figure 55: Effet du GLP sur la viabilité cellulaire après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	133
Figure 56: Effet du mélange des polluants sur la viabilité des cellules HWP après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. ....	134
Figure 57: Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules HWP incubées avec les polluants. ....	136
Figure 58: Effet des polluants sur la viabilité des préadipocytes en phase de différenciation après 3, 4 et 9 jours d'incubation. ....	139
Figure 59: Observation microscopique (grossissement x 100) d'adipocytes blancs humains fixés et colorés à l'huile rouge. ....	140
Figure 60: Effet des polluants sur la teneur en lipides résiduelle des adipocytes matures. ....	142
Figure 61: Effet des polluants sur l'expression d'ARN m du PPAR- $\gamma$ . ....	144
Figure 62: Effet des polluants sur l'expression d'ARN m de l'aP2. ....	145
Figure 63: Effet des polluants sur l'expression d'ARN m de LPL. ....	147

*Table des illustrations*

Figure 64: Observation microscopique (G 20X) de HWP cultivés en milieu de croissance(A), gradient 90% milieu de croissance (B), et 90% milieu DMEM (C). ..... 148

Figure 65: Effet du sécrétome de HWP sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation avec sécrétome (S) HWP, S (HWP, AO), S (HWP,BPA), S (HWP, GLP), S (AO, BPA, GLP). ..... 149

Figure 66: Effet du sécrétome de HWP sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation avec sécrétome (S) HWP, , S (HWP, AO), S (HWP,BPA), S (HWP, GLP), S (AO, BPA, GLP). ..... 150

**Liste des tableaux**

Tableau 1: Effets du BPA sur la reproduction chez la souris (d'après plusieurs références).....	25
Tableau 2: Méthodes d'analyse du BPA utilisant différentes techniques et méthodes de préparation de l'échantillon .....	28
Tableau 3: Méthodes d'analyse de l'AO .....	41
Tableau 4: Classification moléculaire de cancer du sein .....	49
Tableau 5: Origine des molécules utilisées .....	56
Tableau 6: Composition des suppléments et leurs concentrations finales .....	58
Tableau 7: Programme de l'Iso-Electro-Focalisation (IEF).....	63
Tableau 8: Gradient d'élution pour l'analyse des dérivés GLP-PTC.....	68
Tableau 9: Gradient d'élution appliqué à la détection du BPA. ....	70
Tableau 10: Séquences des amorces primaires .....	75
Tableau 11: Gradient de culture de HWP en milieu : croissance/DMEM.....	75
Tableau 12 : Identification des protéines modulées après traitement de la lignée MCF7 par les polluants suite à une analyse MALDI-TOF .....	94
Tableau 13: Identification des protéines modulées après incubation de la lignée MDA-MB 231 avec les polluants suite à une analyse MALDI-TOF .....	96
Tableau 14: Identification des protéines modulées après incubation de la lignée HME 1 avec les polluants suite à une analyse MALDI-TOF .....	100
Tableau 15: Valeurs de LD pour certaines méthodes de dosage du GLP.....	114
Tableau 16: Identification des protéines modulées après incubation de la lignée HWP avec les polluants suite à une analyse MALDI-TOF .....	137

***INTRODUCTION GENERALE, OBJECTIFS DE  
LA THESE***

## *Introduction générale*

L'environnement influence notre santé. Il constitue une source d'exposition de l'homme à des facteurs de risques chimiques et biologiques parmi lesquels les polluants environnementaux.

Ces polluants peuvent être présents dans l'eau, l'air, le sol et l'alimentation sous forme libre ou conjuguée. De nombreuses enquêtes épidémiologiques ont étudié la présence des polluants et leur impact sur la santé de l'homme. La détection de polluants et de leurs métabolites secondaires dans les urines, le sérum, le sang et le foie humain a été faite et le développement de biomarqueurs a permis de mieux appréhender leur mode d'action dans l'organisme. Ces études ont démontré que certains polluants provoquaient l'apparition ou l'aggravation de nombreuses pathologies, notamment chroniques comme celles du diabète du le cancer ou de l'obésité. Les polluants agissent en modifiant le profil protéique de la cellule, perturbant le métabolisme glucidique et lipidique. Leurs effets sont médiés par des voies de signalisation propres à chacun et peuvent aller jusqu'à perturber des fonctions endocrines de l'organisme. C'est notamment le cas de polluants de la classe des xénobiotiques présentant des propriétés hormono-mimétiques. Le niveau de ces effets peut être dépendant de la dose du polluant ainsi de la durée de sa présence. Cette durée est déterminée par la voie de détoxification de l'organisme.

Malgré une littérature abondante démontrant les effets délétères de polluants sur la santé des humains et des animaux, il apparaît nécessaire de concentrer l'effort de recherche vers la caractérisation de biomarqueurs métaboliques d'effets d'expositions à des seuils variables notamment à faibles doses de contamination, d'ordre toxico-cinétique (compartiment de stockage tel que le tissu adipeux, le compartiment protéique...), ou d'ordre épigénétique et génétique (réparation des dommages), incluant les biomarqueurs de prédiction précoce de la transformation et de susceptibilité. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de recherche de cette thèse pendant laquelle nous nous sommes intéressés à trois micropolluants fortement présents dans notre environnement, deux polluants chimiques et un polluant biologique qui sont respectivement :

- Le bisphénol A (BPA), utilisé à l'échelle industrielle pour la fabrication des résines d'époxy, appartenant à la classe des perturbateurs endocriniens,
- Le glyphosate (GLP), utilisé dans la formulation des pesticides de type Roundup<sup>®</sup>,
- L'acide okadaïque (AO), toxine marine produite par les dinoflagellées, stockée notamment dans les glandes digestives des coquilles Saint Jacques.

## *Introduction générale*

La présence simultanée ou isolée de ces polluants dans le corps pourrait être corrélée à un risque accru de cancer du sein et d'obésité. Certaines études évoquent ce lien. Cependant, les effets de mélanges de ces polluants n'a pas été encore étudié.

L'objectif principal de ces travaux de thèse a donc consisté à étudier l'impact du bisphénol A, du glyphosate et de l'acide okadaïque sur le comportement de cellules cancéreuses mammaires. L'abondance de cellules graisseuses dans la partie externe du sein et leur communication croisée responsable de probables développements de cancers du sein, nous a conduit à inclure les adipocytes comme second modèle cellulaire de notre étude. Outre leur capacité à stocker/libérer des graisses, ils peuvent également représenter des unités de stockage de polluants lipophiles pouvant jouer un rôle dans la cancérogenèse.

Partant du constat que l'effet combiné de plusieurs perturbateurs endocriniens n'est pas prévisible à partir de l'effet de chacun d'eux, une comparaison des effets de ces polluants seuls ou en mélange a donc été menée dans ce travail sur quatre lignées cellulaires humaines :

Deux lignées de cellules cancéreuses du sein immortalisées ont été retenues pour leur différence de phénotype au niveau du récepteur aux oestrogènes de type alpha ( $\alpha$ ). MCF7 (ER  $\alpha$ +) et MDA-MB 231 (ER  $\alpha$ -) permettront de distinguer les effets dépendants ou indépendants de l'activation de ces récepteurs.

Une lignée de cellules humaines de l'épithélium mammaire 1 (HME1) immortalisée non cancéreuse.

Une lignée de préadipocytes humain blancs (HWP) non immortalisée.

Au cours de notre travail, nous avons exposé ces lignées cellulaires à un ou plusieurs de ces polluants. Dans une première partie, l'impact de ces composés sur la viabilité des quatre lignées cellulaires après 24 h et 72 h d'incubation a donc été étudiée. Pour comprendre leur mécanisme d'action et identifier des biomarqueurs « protéiques » dont l'expression a été modifiée, des approches moléculaires combinant électrophorèses bidimensionnelles (EF2D), analyses Western Blot (WB) et mesures d'activités enzymatiques clés ont été appliquées. L'impact des polluants a ensuite été évaluée sur la lipogenèse. Nous avons utilisé la coloration des lipides totaux par l'huile rouge pour estimer l'accumulation des graisses dans les adipocytes exposés aux polluants. Nous avons également mesuré l'expression de facteurs de la transcription et de la différenciation adipocytaire : le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes  $\gamma$  (PPAR-  $\gamma$ ), la lipoprotéine lipase (LPL) et la protéine adipocytaire 2 (aP2) par RT-QPCR.

## *Introduction générale*

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à apporter les preuves expérimentales pour répondre aux questions suivantes :

**Les effets des polluants observés sur nos modèles cellulaires sont-ils médiés par une action extracellulaire ou intracellulaire ? Sont-ils métabolisés sous une forme secondaire ?**

Pour cela, plusieurs méthodes de dosage ont été appliquées et pour le glyphosate, une nouvelle méthode a été développée au laboratoire permettant de le quantifier dans nos milieux de culture. Les dosages ont été faits après 6h et 24h d'exposition des cellules aux polluants par chromatographie ultra-performance (UPLC) couplée ou non à la spectrométrie de masse de type ESI.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons étudié les effets des polluants sur l'interaction préadipocytes-cellules cancéreuses. Nous avons exposé les cellules cancéreuses au sécrétome de préadipocytes traités pendant 24h par les polluants et évalué la viabilité des cellules cancéreuses après 24h et 72h d'incubation.

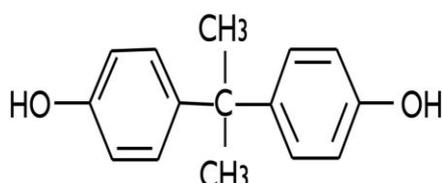
Ce manuscrit suit cette logique expérimentale et est organisé selon trois chapitres. Dans un premier temps, une synthèse bibliographique est effectuée. Elle porte sur les micropolluants, leur détection dans l'environnement et leurs mécanismes d'action décrits à l'échelle cellulaire et moléculaire. Puis, les matériels et méthodes utilisés au cours de cette thèse sont présentés à la suite de cet état de l'art. Suite à cela, la première partie du chapitre résultats-discussion présente les résultats expérimentaux visant à mesurer l'impact des polluants seuls ou en mélange sur la viabilité des cellules de l'étude. Dans ce chapitre sont également présentés les résultats des variations de phénotypes protéiques de chacune des lignées exposées. Les résultats de développement d'une nouvelle méthode de dosage du glyphosate, notamment dans le milieu biologique de cellules en culture, s'en suivent démontrant une action extracellulaire de ce polluant (article soumis). Enfin, les premiers résultats expérimentaux d'adipocytes exposés ou de sécrétomes d'adipocytes mis en contact avec des cellules cancéreuses mammaires font l'objet de la dernière partie de ce manuscrit.

# ***CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. Les micropolluants bisphénol A, glyphosate et acide okadaïque

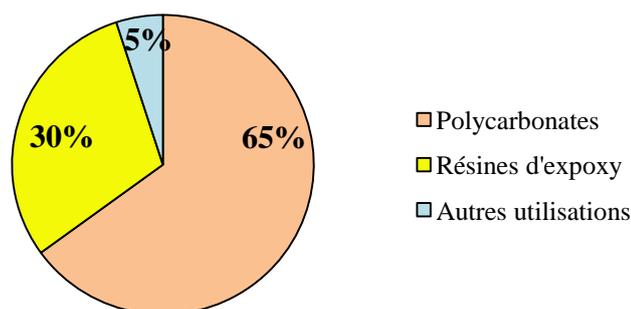
### I.1. Le bisphénol A- Généralités

Le bisphénol A [BPA, (2,2bis (4-hydroxydiphényl)propane),  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ ] (figure 1) est une petite molécule provenant d'une réaction de catalyse acide de deux phénols avec une acétone. Il s'agit d'un contaminant environnemental doué de propriétés oestrogéno-mimétiques décrites dans les années 1930 et à l'origine de dysfonctionnements du système hormonal de l'organisme (Dodds and Lawson, 1936).



**Figure 1:** Structure chimique du bisphénol A (BPA).

Le bisphénol A est un monomère issu d'une synthèse chimique, présentant une large gamme d'utilisation à l'échelle industrielle. C'est un intermédiaire de la fabrication de résines époxy utilisées comme revêtement pour les boîtes de conserves ou les canettes, du polycarbonate qui se trouve dans les biberons, les disques compacts les CD et dans les emballages de plusieurs produits alimentaires (Brotons et al., 1995). Sa répartition mondiale dans les produits de consommations courante est présentée figure 2.



**Figure 2:** Répartition des différentes applications du BPA dans les produits de consommation courants par rapport à la production mondiale.

Les tonnages de production mondiale du BPA sont très élevés. En 2003, sa production était de 2.2 millions de tonnes et connaissait une augmentation de 6 à 10% par an (Richter et al., 2007). De ce fait, le BPA est sous le coup de la réglementation européenne REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals).

### **I.1.1. Contamination du sol et de l'eau par BPA**

La combustion des déchets ménagers, la dégradation du plastique, les rejets d'effluents d'usines de traitement des eaux usées pourraient engendrer la contamination du sol et de l'eau par BPA.

Le BPA a déjà été détecté dans les eaux de surface et les eaux souterraines. Par exemple dans certaines rivières des pays industrialisés, le BPA a été détecté à des faibles doses inférieures ou égales à 8ng/ml, (Belfroid et al., 2002), (Kang et al., 2006a).

Par exemple une étude faite sur les eaux de surfaces de Malaisie a montré que BPA était dans 93% des échantillons à des concentrations de 1,3 ng/L à 215 ng/L, dans l'eau de robinet de 3,5 ng/L à 59,8 ng/L et dans l'eau minérale ( $3,3 \pm 2,6$  ng/L) (Santhi et al., 2012).

En Europe, il a été détecté dans les eaux de surface à 5,3 ng/L et à 2,97 ng/L dans les effluents (Corrales et al., 2015).

Également, le BPA a été détecté dans les sols traités par les boues d'épuration à des concentrations de 1 à 150µg/kg. Une fois dans le sol, BPA pourrait s'accumuler dans le sol sous forme de résidus non extractibles (Kinney et al., 2008). Son ionization pourrait se produire dans les sols ayant un pH proche de son pka ce qui pourrait engendrer son transport vers les eaux souterraines (Zeng et al., 2006).

Le BPA pourrait aussi être biodégradé par les micro-organismes distribués dans l'environnement. Il pourrait également être métabolisé par les enzymes existantes dans les plantes. En effet, il a été montré que les plantes pourraient absorber rapidement le BPA de l'eau, métabolisé par la suite en composés glycosidiques ( $\beta$ - glucoside) absorbés par les feuilles (Nakajima et al., 2002).

### **I.1.2. Voies d'exposition humaine au bisphénol A**

La large gamme d'utilisation du BPA à l'échelle industrielle implique un grand risque d'exposition de l'homme tout d'abord *via* les voies respiratoires. En effet, les travaux de Rudel et al., 2001 ont démontré que l'air était un réservoir de BPA avec des concentrations comprises entre 2 et 208 ng/m<sup>3</sup>. L'alimentation constitue également une voie de contamination à travers l'ingestion d'aliments mis en contact avec du BPA. Le BPA, comme constituant des emballages, est capable de migrer du contenant vers les contenus des boîtes alimentaires. En effet, durant l'étape de stockage des aliments, une partie du BPA pourrait être libérée après l'hydrolyse des liaisons esters liant les composants du revêtement. Cette réaction est favorisée en présence de chaleur lors de l'étapes de stérilisation ou également sous certaines conditions de pH (pH faible de certains fruits) (Le et al., 2008).

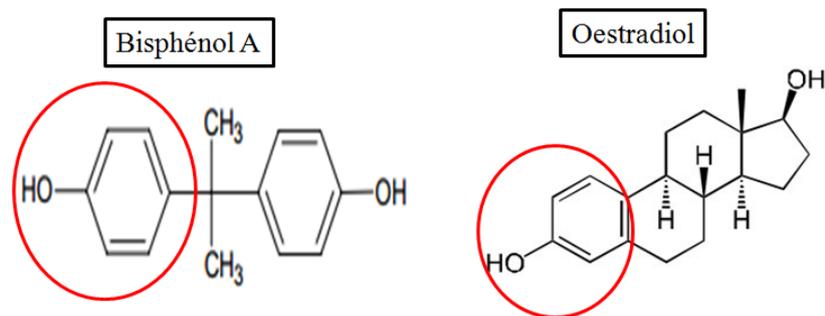
Le BPA peut contaminer le corps par inhalation de poussières, par contact cutané avec des matériaux en contenant (Kang et al., 2006b) (Brede et al., 2003) comme par exemple, les tickets de caisse contiennent du BPA. En présence de chaleur, il se transforme en une encre noire. A compter de 10 heures par jour ces tickets pourraient libérer une quantité de 71µg de BPA qui pourrait contaminer l'organisme par voie transcutanée (Biedermann et al., 2010). L'exposition journalière de l'homme à cette substance a été estimée de l'ordre de 1µg/kg/jour (Kubwabo et al., 2009).

### **I.1.3. Bisphénol A et action sur le système endocrinien**

Deux systèmes de communications sont présents dans le corps : le système endocrinien et le système nerveux qui maintiennent l'homéostasie de l'organisme. Le système endocrinien est formé d'un ensemble d'organes et de cellules qui sécrètent des hormones. La régulation de ce système est influencée par la présence de certains éléments exogènes qui interfèrent avec les hormones. Ces éléments sont regroupés sous le nom de perturbateurs endocriniens.

Plusieurs définitions sont proposées pour « perturbateur endocrinien » : En 1997, un groupe de travail sur la perturbation endocrinienne (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) de l'Agence de Protection Américaine de l'Environnement (EPA) a précisé les modes d'action au regard de la littérature, avec la définition suivante : «Un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la fixation, l'action, ou l'élimination des hormones naturelles du corps humain responsables de l'entretien ou de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement ». Une deuxième définition proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (2002), étend le principe de perturbation endocrinienne aux populations : « Les perturbateurs endocriniens sont des substances exogènes qui modifient la(les) fonction(s) du système endocrinien et qui ont pour conséquences de provoquer des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, ou sa descendance, ou (sous-) populations ».

Comme le montre la figure 3, le BPA présente une structure proche de celle de l'œstradiol. Cette structure confère au BPA ses propriétés oestrogéno-mimétique et sa capacité à se lier aux récepteurs aux œstrogènes RE  $\alpha$  et RE  $\beta$ , activant une cascade de réactions à l'origine d'une perturbation de l'équilibre hormonal de l'organisme.



**Figure 3:** Structure chimique du bisphénol A et de l'œstradiol.

La demi-vie du BPA est estimée à 6 heures (Völkel et al., 2002). Différentes données toxicologiques indiquent que le BPA est à l'origine de certaines pathologies (Rochester, 2013). Le BPA présente en effet une activité oestrogénique et est considéré comme un perturbateur endocrinien. Une fois sous forme conjuguée BPA-glucoronide (BPA-G), il perd cette activité et n'est plus capable de se lier aux récepteurs oestrogéniques. C'est par cette réaction de conjugaison que l'organisme assure la détoxification du BPA (Matthews et al., 2001). Cependant, cette réaction est réversible. En effet, il existe une voie favorisant la dissociation de la forme conjuguée BPA-G libérant du BPA dans les urines. Elle nécessite la présence de la  $\beta$ -glucuronidase, exprimée au niveau de certains tissus comme le placenta et le foie fœtal (Ginsberg and Rice, 2009).

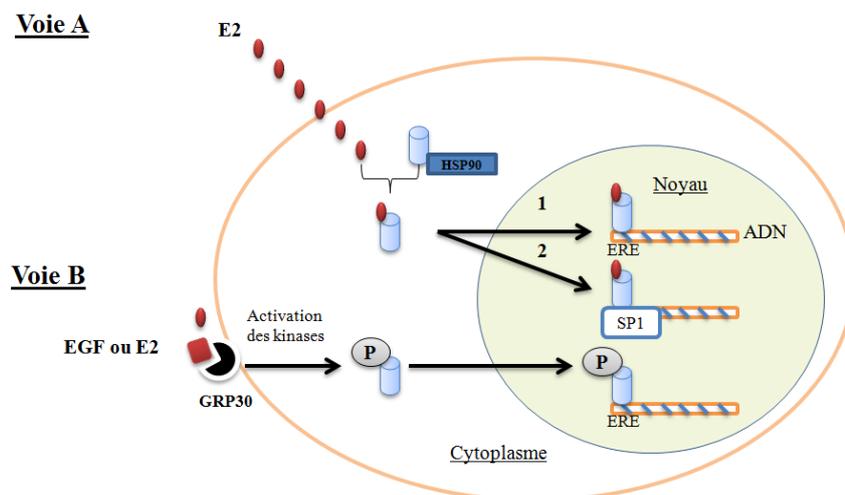
### I.1.3.1. Oestrogènes, récepteurs et mécanisme d'action du BPA

Les récepteurs œstrogéniques sont divisés en deux classes : le récepteur œstrogénique de type alpha (RE  $\alpha$ ) et le récepteur œstrogénique bêta (RE  $\beta$ ). Un troisième récepteur œstrogénique membranaire couplé aux protéines G a été aussi identifié : le récepteur GRP30 dans un modèle de cellule cancéreuse (Filardo et al., 2000). Les œstrogènes stimulent la transcription de leurs gènes via l'activation de leurs récepteurs qui, suite à une fixation, subissent une translocation du cytoplasme vers le noyau. Il s'agit de la voie liée aux effets génomiques (Fig. 4 voie A). A ce niveau, le complexe RE- œstrogène peut exercer son effet sur les gènes cibles. En effet, le récepteur œstrogénique dans le cytoplasme se trouve lié à des protéines chaperonnes (HSP). L'entrée du ligand dans le cytoplasme et sa fixation sur le RE déclenche la dissociation des HSP. Ceci a pour conséquence une dimérisation du récepteur induisant sa translocation dans le noyau. Ce récepteur peut se fixer sur l'ADN sur des régions spécifiques dites les éléments de réponse œstrogénique (ERE) où il va stimuler la transcription de gènes spécifiques (Fig.4 voie A-1) (Shiau et al., 1998). Il a été montré que le complexe « œstrogène- RE » était capable de se fixer

sur l'ADN avec un mécanisme indépendant des éléments de réponses œstrogénique. En effet, les travaux de Li et al (2001) ont montré que ce complexe était capable de se fixer sur l'ADN par l'intermédiaire d'une interaction avec un facteur de transcription actif : Sp1 stimulant ainsi la fixation sur la séquence promotrice du gène codant pour le récepteur des lipoprotéines à faible densité (Li et al., 2001). Cette voie d'action de l'estrogène implique les gènes qui n'ont pas des séquences d'ERE (Fig.4 voie A-2).

En plus des effets génomiques, il existe la voie des effets non génomiques qui traduit les effets rapides de l'E2 sur la cellule. Cette voie s'effectue via le récepteur GRP30 (Fig.4 voie B). Plusieurs travaux se sont intéressés à la caractérisation des effets du complexe E2-RE sur les voies de signalisation qui se trouvent dans le cytoplasme. Des effets rapides sont observés comme l'activation de la voie PI3kinase/Akt des MAP kinases (protéines kinases activées par le mitogène), et de la p38 (Egloff et al., 2009).

L'activation du récepteur peut avoir lieu même en absence de son ligand (E2). Les travaux de Egloff AM et al (2009) ont rapporté que RE  $\alpha$  présente de l'affinité pour le facteur de croissance endothélial (EGF) et que la formation du complexe RE  $\alpha$  – EGF active la voie MAP Kinase augmentant l'invasion des cellules cancéreuses (Egloff et al., 2009).



**Figure 4:** Mécanisme d'action des récepteurs œstrogéniques (Le Grand, 2009).

Plusieurs recherches se sont orientées vers la caractérisation des effets de la fixation de l'œstrogène sur les récepteurs exprimés sur certaines lignées cancéreuses du sein. Parmi ces lignées, la plus étudiée est la lignée MCF7. Elle exprime les trois classes de RE : ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  et GRP30.

Il semblerait que l'augmentation du taux d'œstrogène dans l'organisme soit un facteur de risque du cancer du sein. En effet, il a été démontré que l'hormone stimule la prolifération de la lignée MCF7. L'œstrogène agit via l'activation de la cascade MAP kinase impliquée dans la phosphorylation de protéines du contrôle de la prolifération cellulaire. Les travaux de Migliaccio et al (1996) ont montré que le  $17\beta$  œstradiol activait cette cascade en stimulant la phosphorylation de la protéine Shc, l'activité de la protéine p21 ras, l'association entre p21 ras-GTP ainsi que la stimulation de la phosphorylation des protéines ERK2. Ces effets stimulent l'expression de certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Migliaccio et al., 1996). La stimulation de la prolifération de cette lignée par l'oestradiol a été aussi liée à une réduction de l'apoptose cellulaire en stimulant l'expression du facteur anti-apoptotique (gène BCL2) dans ces cellules.

Le BPA en mimant l'action de l'estrogène active les voies de transcription des gènes ciblés par cette hormone et les voies cytoplasmiques. Plusieurs recherches ont été conduites sur la caractérisation des effets de BPA : il présente de l'affinité pour les trois classes des récepteurs œstrogéniques. Il a été montré que BPA présentait de l'affinité pour RE. Son affinité relative de liaison au RE a été calculée comme étant la concentration nécessaire pour réduire à 50% la liaison de l'E2. Elle est de 0,05 nM pour RE  $\alpha$  et de 0,33nM pour ER  $\beta$  (Kuiper et al., 1997). Des effets de BPA sur l'organisme ont été observés à des doses équivalentes à l'E2.

#### **I.1. 4. Effets du bisphénol A sur la reproduction**

Les effets du BPA sur la reproduction de souris à différents stades d'exposition ont été étudiés et rassemblés dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Effets du BPA sur la reproduction chez la souris (d'après plusieurs références).

Type de l'exposition	Dose du BPA Appliquée	Effets sur l'organisme	Référence
Exposition prénatale Souris mâle	2-20µg/kg/jour chez la mère) pendant la gestation	*Développement anormal de la prostate *Diminution du poids des épидидymes et de la production spermatique journalière	Timms et al., 2005  (vom Saal et al., 1998)
Souris femelle	1 à 1 000 µg/kg/jour dans l'utérus	*Lésions au niveau des ovaires et de l'utérus	Newbold et al., 2009
Souris femelle	0,025 et 0,25 µg/kg/jour	*Altérations de la morphologie ovarienne *Diminution du volume de l'endomètre *Hyper-prolifération cellulaire de l'épithélium glandulaire de l'utérus *Expression plus importante des récepteurs ER α et la progestérone dans l'épithélium utérin	Markey et al., 2005
Exposition périnatale	4-400mg/kg/jour administrés aux mères gestantes et allaitantes.  20 et 200 µg/kg/jour	*Déséquilibre dans l'homéostasie de la testostérone (male)  *Diminution du nombre des spermatozoïdes	Watanabe et al., 2003  Howdeshell et al., 2008

### **I.1.5. Effets du bisphénol A sur le développement du système nerveux et immunitaire**

Il a été montré que l'administration du BPA à des doses journalières de 25 et 250  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$  chez les rats induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour les récepteurs ER  $\beta$  au niveau de l'aire préoptique de l'hypothalamus avec altération de la sécrétion de certaines hormones telles que la prolactine (Ramos et al., 2003).

Outre le changement du niveau de l'expression des récepteurs, le BPA à forte concentration induisait également l'activation de la caspase- 3, marqueur de mort cellulaire par apoptose, notamment sur les neurones chez la souris (Miyatake et al., 2006).

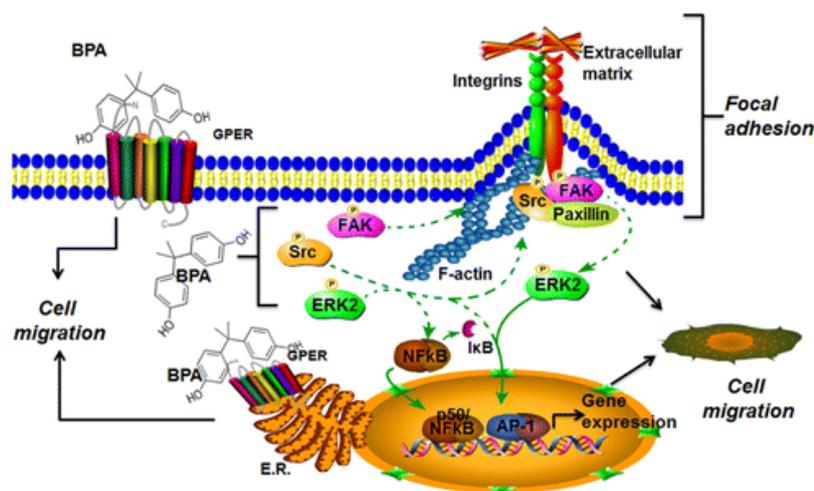
Les perturbateurs endocriniens affecteraient aussi le fonctionnement du système immunitaire. En effet, il a été démontré que la présence du BPA serait liée à un dysfonctionnement du système immunitaire entraînant l'apparition du cytomégalo virus détecté dans le sérum d'une population exposée au BPA. De plus, certains individus de la population testée ayant du BPA dans leur urine ont présenteraient aussi des problèmes d'allergies (Rees Clayton et al., 2011).

### **I.1.6. Effets du bisphénol A sur le cancer du sein**

Différents modèles de cellules de cancer ont été utilisés pour caractériser les effets d'une contamination par le BPA. Il a été démontré qu'il stimulait la prolifération de certaines lignées de cancer du sein : MCF7 et SKBR3. Par exemple, il agirait en stimulant la phosphorylation de la voie ERK1/ERK2 médiée par activation de la protéine GRP30 exprimée dans les cellules SKBR3. Concernant la lignée MCF7 une stimulation de l'expression de la protéine STAT3 par la voie EGFR a été observée (Dong et al., 2011), (Zhang et al., 2012).

Dans le cas d'autres lignées n'exprimant pas les récepteurs oestrogéniques telle que la lignée MDA-MB 231, aucun effet du BPA sur la prolifération n'a été observé, suggérant la spécificité de cet effet médié par la voie du récepteur oestrogénique (Zhang et al., 2012), (Pupo et al., 2012).

Cependant, il a été montré que l'activation du récepteur GRP30 (ou GPER) de la lignée MDA-MB 231 par le BPA induisait une stimulation de la migration et de l'invasion. Comme illustrée sur la figure 5, l'activation du récepteur GRP30 par le BPA stimulerait la voie Src et ERK2 favorisant la fixation du facteur Nfkb et Ap 1 sur l'ADN. Ces effets activant l'invasion des cellules MDA-MB 231 (Castillo Sanchez et al., 2016).



**Figure 5:** Mécanisme d'action du BPA sur la lignée MDA-MB 231 (Castillo Sanchez et al., 2016b).

### I.1.7. Effet lié du bisphénol A sur l'obésité

Le potentiel obésogène du BPA a été montré *in vivo* pour la première fois par les travaux de Rubin et al en 2001. L'effet de l'exposition périnatale des rats au BPA dans l'eau potable à faible et forte dose respectivement de 0,1 mg / kg de poids corporel (pc) / jour et de 1,2 mg / kg (pc) / jour a été étudié. Les auteurs ont constaté que les rats exposés au BPA produisaient une descendance de plus haut poids que les rats témoins (non exposés). Ce phénotype a persisté à l'âge adulte (Rubin et al., 2001). Sa détection dans les urines de filles de 9 ans a été corrélée à une augmentation de l'indice de masse corporelle (Harley et al., 2013).

Les expériences *in vitro* ont démontrées d'autres effets du BPA sur le métabolisme lipidique des cellules graisseuses. Une réduction de l'accumulation de triglycérides *via* la diminution de l'expression du gène relatif à la lipoprotéine lipase (LPL) a été observée après incubation de cellules souches humaines avec 80µM de BPA (Linehan et al., 2012a).

Une stimulation de l'accumulation de triglycérides *via* l'augmentation de l'expression de gènes impliquées dans la synthèse des graisses : PPAR-γ, C/EBPα et Ap2 a été montré lors d'expériences avec des préadipocytes murins (lignée 3T3L1) exposés à 10<sup>-3</sup>M de BPA (Ariemma et al., 2016).

Les effets du BPA sur le métabolisme lipidique pourraient donc être dépendants de la lignée cellulaire utilisée (homme, souris...) ainsi que de la dose testée.

### I.1.8. Méthodes analytiques pour le dosage du bisphénol A

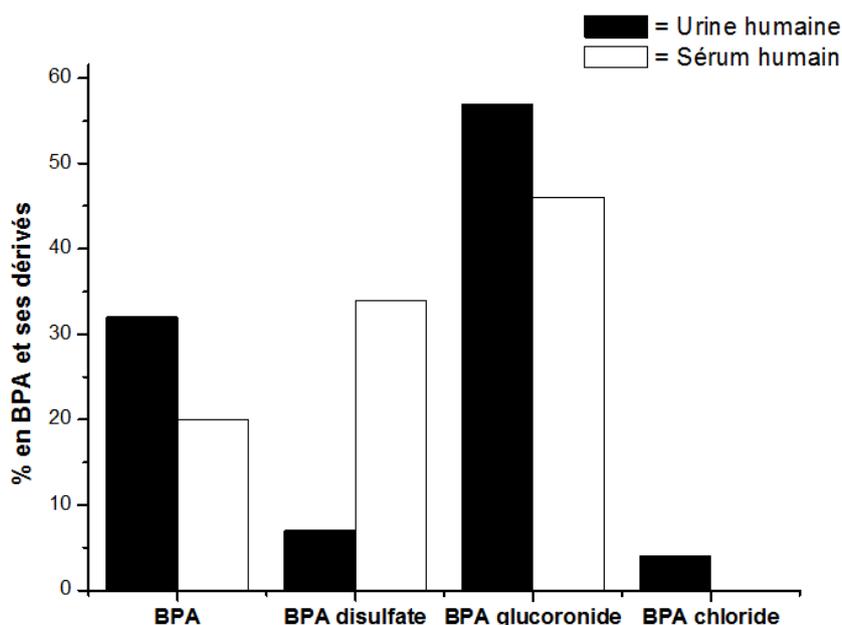
De nombreuses méthodes ont été développées pour détecter le BPA. Elles nécessitent une préparation de l'échantillon et sont couplées à divers techniques analytiques. L'extraction du BPA par chromatographie en phase solide (SPE) et la dérivation améliorant son ionisation ou volatilité du BPA ont augmenté la sensibilité de l'analyse.

Le tableau 2 répertorie quelques méthodes analytiques courantes, employant tour à tour la chromatographie liquide ou gazeuse et la spectrométrie de masse. Le BPA est dérivé et/ou extrait.

**Tableau 2:** Méthodes d'analyse du BPA utilisant différentes techniques et méthodes de préparation de l'échantillon

Instrument	Echantillon	Préparation de l'échantillon	Référence
LC/ESI-MS	Solution standard BPA	Dérivation par pyridine 3-sulfonyl chloride	(Regueiro et al., 2015)
LC-MS	Sperme	SPE	(Inoue et al., 2002)
GC-MS	Eaux de surface	SPE+ dérivation par MSTFA	(Selvaraj et al., 2014)
LC/MS/MS	Urine	SPE	(Gerona et al., 2016)

Les travaux de Chunyang Liao (Chunyang Liao, 2012), ont identifié du BPA dans du sang et des urines humaines. Sa détection ainsi que son dosage dans ces liquides ont montré qu'il pouvait se présenter sous deux formes. Une forme libre, le BPA et des formes conjuguées : le BPA di sulfate, BPA glucuronide (BPA-G) et BPA chloride (BPA-C) (Kim et al., 2003). Comme indiqué dans la figure 6, les analyses ont montré que la fraction majoritaire présente dans le corps humain était la forme conjuguée glucuronide.



**Figure 6:** % BPA et de ses dérivés détectés dans l'urine et le sérum humain (Chunyang Liao, 2012).

Une étude menée en Amérique par Calafat et al., 2008 sur une population de 2517 individus de plus de 6 ans, a révélé la présence du BPA dans les urines de 93% des individus avec des doses plus importantes chez les enfants par rapport aux individus âgés.

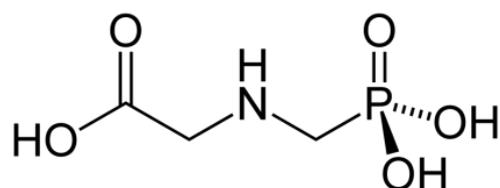
Le BPA est donc susceptible de contaminer l'organisme humain à travers certaines voies (respiratoires, cutanées...). Ce xénobiotique subit un ensemble de modifications suite à sa métabolisation expliquant la détection de ses formes conjuguées. La dégradation du BPA fait intervenir une voie principale : la voie de la glucuronidation et conduit à la formation du BPA-G à partir du BPA. L'enzyme responsable de cette réaction est l'UDP-glucuronosyl-transférase ayant comme cofacteur l'acide UDP-glucuronique (UDPGA). Cette voie se déroule principalement au niveau du foie et de l'intestin (Völkel et al., 2002), (Yokota et al., 1999).

Le BPA serait un perturbateur endocrinien capable d'affecter le développement et le fonctionnement normal et anormal de l'organisme.

## I.2. Le glyphosate- Généralités

Le glyphosate (GLP) ou N-phosphono-methyl-glycine est un herbicide organophosphoré commercialisé entre autre sous le nom de « Round-Up ® ». C'est une molécule de synthèse, dite analogue de la glycine, sur laquelle a été substitué un groupement phosphonométhyle sur la fonction amine primaire. Il a été découvert en 1970 par l'entreprise Monsanto et a été commercialisé pour la première fois en 1974 sous l'appellation Roundup ® (Williams et al., 2000). Son utilisation a dépassé largement le cadre de l'agriculture et touche l'entretien d'espaces verts ou jardins, de routes et des voies ferrées. Le volume utilisé est très important : il est passé de 1 million de litres en 1991 à 180 millions en 2007 en Argentine (Binimelis et al., 2009).

Sa formule chimique est présentée dans la figure 7.



**Figure 7:** Structure chimique du glyphosate.

L'usage du GLP est très répandu pour le contrôle des adventices. Cet herbicide est non sélectif. Il est capable de pénétrer dans la « mauvaise » herbe après son absorption par les feuilles. Il est ensuite véhiculé par la sève jusqu'aux organes de croissance : les racines et les rhizomes (Smith and Oehme, 1992). Sa phytotoxicité provient de l'inhibition de l'activité enzymatique de la 3-phosphate 5-enolpyruvylshikimate synthase (EPSP synthase) située en majorité dans les chloroplastes (Blackburn and Boutin, 2003) et responsable de la synthèse des acides aminés aromatiques nécessaire à l'élaboration des protéines (Baylis, 2000). Une fois présent dans sa cible, il induit une diminution de la concentration des acides aminés aromatiques ainsi qu'une diminution de la synthèse de la chlorophylle ce qui provoque la nécrose des tissus aboutissant par la suite à la mort de la plante (Solomon and Thompson, 2003). Cette voie n'est pas transférable à l'homme.

L'utilisation du GLP à forte concentration réduit son effet herbicide. En effet, à fortes doses, il est capable de tuer les tissus avec lesquels il est en contact avant d'atteindre sa cible. Alors qu'à faible concentration, il maintient sa voie de transport interne dans les plantes intactes assurant son transport vers les racines (Blackburn and Boutin, 2003).

Certaines plantes (soja, colza, maïs...) ont été manipulées génétiquement pour résister à des doses mortelles de GLP ce qui rend possible d'éliminer l'ensemble des mauvaises herbes sans nuire aux cultures.

Dans la formulation commercialisée « Round-Up® », le GLP se trouve sous forme d'un sel d'isopropylamine afin d'accroître sa solubilité dans l'eau qui passe alors de 12g/L à 1050 g/L à 25°C.

### **I.2.1. Contamination du sol et de l'eau par le glyphosate**

De nombreuses études ont évalué la contamination du sol et des eaux par le GLP et ses interactions avec les éléments de l'environnement. Il a été montré que le GLP était capable d'interagir avec certains constituants comme les particules d'argiles. Ces interactions ralentissent, mais n'empêchent pas sa future solubilisation notamment en présence de phosphates (Shushkova et al., 2010), (Simonsen et al., 2008).

Les ions métalliques du sol sont également capables d'interagir avec le GLP affectant potentiellement leur disponibilité (Eker et al., 2006).

Dans les milieux marins (eaux de surface) et les eaux souterraines, le GLP et son métabolite, l'acide amino-méthyl-phosphonique (AMPA), sont parmi les pesticides les plus détectés. Les études d'Ifen et al (2005) ont montré que l'AMPA était détecté, à des doses plus élevées que le GLP dans les eaux souterraines. Ce fait semble dépendant de la météorologie. En effet, il a été montré que, par temps sec, les concentrations en AMPA sont plus élevées que celles du GLP. A l'inverse, par temps de pluie, ce sont les concentrations du GLP qui deviennent les plus élevées. La dégradation du GLP en AMPA semblerait favorisée par l'augmentation de la température. Dans les eaux de surface, le GLP est souvent dosé à des concentrations supérieures à la norme européenne fixée à 0,1 µg/L pour l'eau potable.

GLP atteint les eaux de surface à travers les pluies et le ruissellement. Les concentrations maximales détectées après les pluies dans la rivière Orge située en France étaient de 75 à 90 µg/L. Cela pose un problème de qualité de l'eau potable en région parisienne où les eaux de

surface constituent 60 % de la ressource destinée à la consommation humaine (Botta et al., 2009).

La concentration en GLP peut atteindre les valeurs limites de  $50,721 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  à  $67,628 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  dans les eaux usées provenant du rinçage de conteneurs d'herbicides (Manassero et al., 2010).

Pour le Canada, la limite réglementaire en GLP des eaux de surface est de  $65 \mu\text{g/L}$ . La concentration maximale en GLP détectée dans les eaux de surfaces était de  $40,8 \mu\text{g/L}$  (Struger et al., 2008). Concernant les eaux souterraines, des concentrations supérieures à  $24 \mu\text{g/L}$  en GLP ont été détectées en Europe et de  $4,7 \mu\text{g/L}$  en Amérique.

Les concentrations détectées mentionnées précédemment sont inférieures à la limite maximale établie pour la protection de la santé et fixée par l'agence de la protection de l'environnement (EPA) qui est de  $700 \mu\text{g/L}$ .

Les conséquences de la contamination de l'être humain sont précisées ci-après.

### **I.2.2. Exposition au GLP et effets sur la santé**

Le GLP peut contaminer humains et animaux. La contamination de l'organisme s'effectue à travers les voies respiratoires, la voie cutanée ainsi que la voie alimentaire.

L'homme peut être directement exposé aux résidus de Roundup ® ainsi qu'au GLP lors de pratiques agricoles. En effet, il a été détecté dans 70% des urines d'agriculteurs le jour de son application à une dose moyenne de  $3 \mu\text{g/L}$  (Acquavella et al., 2004), et dans le sang suite à une intoxication accidentelle ou suicide (Zouaoui et al., 2013)

Le GLP est source de problèmes de santé chez les animaux et chez l'homme. En effet, il a été montré qu'à une forte dose de  $10^4 \mu\text{g/L}$ , le GLP diminuerait la production des œufs chez le poisson et entrainerait une augmentation du taux de mortalité de ses embryons (Uren Webster et al., 2014) . Le GLP est aussi susceptible de stimuler la prolifération de certaines cellules cancéreuses. Ceci a été montré par les travaux de Thongprakaisang et al (2013) : cet herbicide, *via* sa fixation sur le récepteur ostrogénique ( $\text{ER}\alpha$ ) des cellules cancéreuses du sein T47D, induirait la stimulation de la prolifération de ces dernières. Cet effet n'est pas observé sur les cellules MDA-MB 231 n'exprimant pas ce récepteur (Thongprakaisang et al., 2013). Ces travaux suggèrent un lien entre GLP, RE et promotion tumorale. Toutefois, Li et al (2013) ont montré que le GLP, en tant qu'analogue de la glycine présentait un effet antiprolifératif ainsi qu'une induction de l'apoptose sur certaines cellules cancéreuses. Cet effet antiprolifératif serait principalement dû à l'inhibition de la synthèse de la glycine dans ces cellules via une inhibition

de l'activité de la sérine hydroxyméthyle transférase. De plus, ces auteurs ont montré que l'incubation avec GLP à 50mM stimulerait l'activité de la caspase 3. Ces travaux ont également souligné que cet effet antiprolifératif était absent sur des cellules saines (non cancéreuses) (Li et al., 2013).

Les études concernant l'effet du GLP sur le métabolisme lipidique ne sont pas nombreuses. Parmi ces études, les travaux de Martini et al 2012, ont démontré que des formulations à base de GLP inhiberaient la prolifération des cellules fibroblastiques 3T3L1 via l'activation de la caspase 3 (Martini et al., 2012a). Ces auteurs ont de plus indiqué, que le GLP inhiberait l'expression du gène PPAR- $\gamma$  et induirait l'installation d'un stress oxydatif perturbant le déroulement de la différenciation adipocytaire (Martini et al., 2016).

Suite aux effets observés du GLP sur la santé, de nombreux développements méthodologiques ont permis de le détecter et de le quantifier dans différents milieux biologiques, notamment dans des échantillons environnementaux.

### **I.2.3. Méthodes de détection et de dosage du GLP**

En raison de sa structure ionique, de sa faible volatilité et de sa masse moléculaire de 169,07 g/mol, l'analyse de GLP par des méthodes chromatographiques s'avère difficile. Pour ces raisons, sa détection est faite souvent suite à une dérivation. La chromatographie gazeuse (CG) ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (SM) sont souvent employées.

Concernant la détection par GC, l'anhydride trifluoroacétique et le trifluoroéthanol ont été utilisés en mélange pour transformer le GLP en dérivés volatiles détectables par CG couplée à la SM. La limite de détection était alors de  $9 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/L}$  dans l'eau (Stalikas et Pilidis, 2000) .

Cette méthode a été aussi utilisée pour la détection de résidus de GLP dans le sable utilisant une étape d'extraction par le  $\text{NH}_4\text{OH}$  avant dérivation. La limite de détection était de  $9 \cdot 10^{-6}$   $\mu\text{g}$  (Hu et al., 2011).

La ninhydrine et le molybdate de sodium ont été aussi utilisés pour la quantification du GLP dans l'eau après une extraction par chromatographie échangeuse d'ion. La réaction du GLP avec la ninhydrine en présence du molybdate de sodium forme un complexe coloré ayant une absorption maximale à 570 nm. La limite de détection était alors de  $93 \cdot 10^{-6}$   $\mu\text{g/L}$ .

La dérivation post-colonne avec l'o-phthaldéhyde (OPA) a été proposée pour la première fois par l'agence de la protection de l'environnement (EPA) pour le GLP dans l'eau. Cette méthode basée sur l'injection directe d'eau filtrée dans une colonne échangeuse de cations est suivie

d'une étape d'oxydation par l'hypochlorite de calcium. Cette étape transforme le GLP en glycine (GLY). GLY est ensuite couplé à l'OPA et le mercaptoéthanol produisant un composé fluorescent avec une absorbance caractéristique de 455 nm. La limite de détection, était de  $9 \cdot 10^3$  µg/L pour l'eau souterraine et de  $6 \cdot 10^3$  µg/L pour l'eau de surface.

Concernant la dérivation avant la séparation sur colonne, elle peut être réalisée par le 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl). Cette dérivation est basée sur la formation d'un composé fluorescent (GLP-FOMC) détectable par HPLC couplé à un détecteur de fluorescence. La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray (LC-ESI-MS/MS) est utilisée pour ce type de dérivation. La limite de détection était de  $5 \cdot 10^3$  µg/L et 5 µg/kg respectivement dans l'eau et le sable. La détection en UV a été aussi utilisée pour ce type de dérivation avec une mesure d'absorbance à 265 nm. La limite de détection était alors de  $0,84 \cdot 10^2$  µg/L (Waiman et al., 2012).

L'utilisation de pesticides à base de GLP a été considérée comme un moyen d'augmenter les rendements et d'optimiser les cultures agricoles. Cependant, son utilisation devient limitée par sa classification en tant que substance toxique par certaines études. Le GLP est en effet capable de stimuler la croissance de cellules cancéreuses, de perturber le métabolisme lipidique...

Toutefois, son mode d'action sur les cellules cancéreuses et les cellules graisseuses n'est pas encore très bien connu.

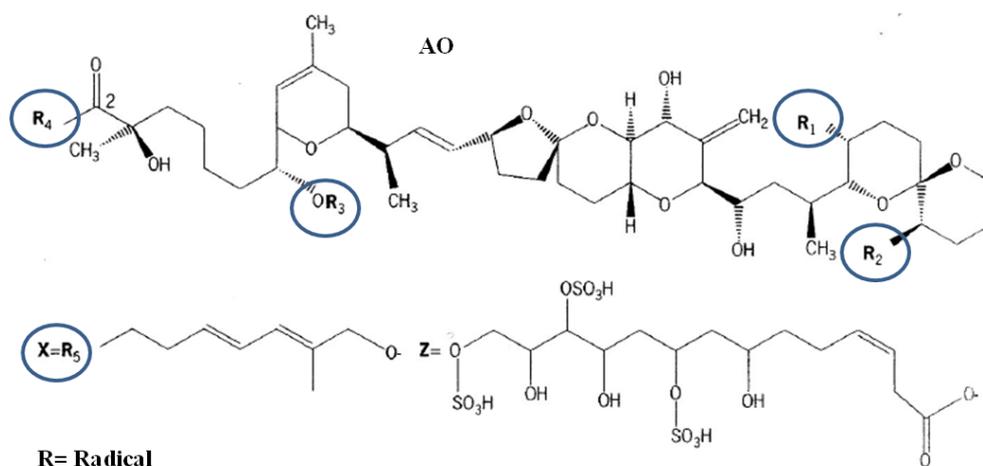
### **I.3. L'acide okadaïque, toxine diarrhéique- Généralités**

Les intoxications provenant de la consommation des produits de la mer notamment les huîtres, sont devenues de plus en plus courantes dans le monde entier. Ces intoxications peuvent être dues à des toxines diarrhéiques produites par les dinoflagellés. Celles ci peuvent s'accumuler dans les hépatopancreas des bivalves provoquant des intoxications alimentaires chez les consommateurs de ces coquillages. Ce type d'intoxication est connu sous la dénomination d'Intoxication Diarrhéique par Fruit de Mer. (I.D.F.M). Des contrôles sanitaires sur la qualité des coquillages sont des préliminaires indispensables garantissant la bonne qualité des produits à la vente au consommateur. Parmi ces toxines, la plus répandue en France est l'acide okadaïque (AO).

L'Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a classé ces toxines selon leurs propriétés physicochimiques en 8 familles :

- Famille de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines
- Famille des saxitoxines
- Famille des pecténotoxines
- Famille des yessotoxines
- Famille des brevétoxines
- Famille des azaspiracides
- Famille des imines cycliques.

L'AO un poly-éther d'acide gras dont la formule chimique est :  $C_{44}H_{50}O_{13}$ . Il est produit par deux types d'organismes : les dinoflagellés (*Dinophysis spp* et *Prorocentrum spp*) et les éponges (*Halichondria okadaï* et *H. melanodocia*), provenant respectivement des côtes du Japon et de Floride. Ses dérivés sont des dinophysistoxines (DTX1, DTX2, DTX3, DTX4 et le diol ester d'AO), toutes liposolubles. La structure de l'AO et de ses dérivés est illustrée figure 8. Son effet toxique aigu apparaît au dessus de  $120\mu\text{g}/\text{kg}$  ce qui prouve bien la toxicité de cette substance et sa dose létale chez la souris est de  $192\mu\text{g}/\text{kg}$  et (Kazuo Tachibana, 1980).



	R1	R2	R3	R4	R5
A OK	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	-
DTX1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH	-
DTX2	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	-
DTX3	CH <sub>3</sub> ou H	CH <sub>3</sub>	Acyl	OH	-
DTX4	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> ou H	H	X	Z
Diol ester d'AO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> ou H	H	X	OH

**Figure 8:** Structures chimiques de l'acide okadaïque et de ses dérivés.

Les toxines diarrhéiques sont les produits du système photosynthétique des dinoflagellés.

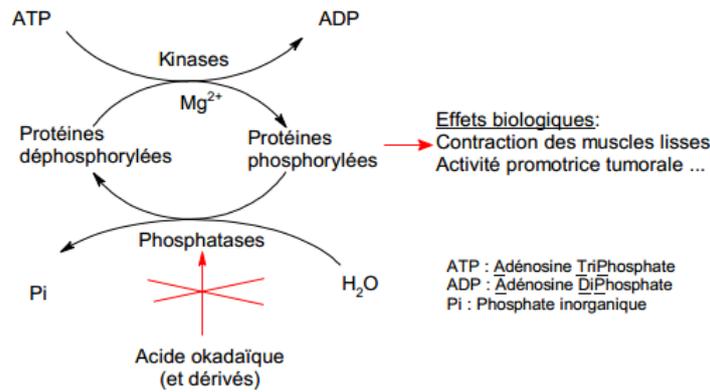
Les travaux de Hu et al (1995) indiquent que la biosynthèse de l'AO peut être réalisée suite à une réaction enzymatique dont le substrat est la toxine DTX4. Il a été montré que l'extraction de toxines des coquillages, se produit une réaction d'hydrolyse de la DTX 4 en dérivés diol-ester qui s'hydrolysent à leur tour en AO après une lyse cellulaire via une estérase. L'AO sous forme DTX4-sulfate est non toxique. Cette forme est considéré comme un moyen de protection des dinoflagellés contre la toxicité des toxines diarrhéiques (Hu et al., 1995), (Windust et al., 2000)

La production de toxines est dépendante de plusieurs facteurs : géographiques, environnementaux, génétiques et cellulaires. Par exemple, l'AO et ses analogues sont répartis un peu partout dans le monde. L'Europe (H. P Van Egmond, 1993) et le Japon (Suzuki et al., 1996) sont les pays les plus touchés par les intoxications pour ces biotoxines et notamment la France. En Irlande la DTX-2 est la toxine la plus commune. Au Japon et en Amérique du Nord la DTX-1 (Zouher Amzil, 2001). La production des toxines polyéthers est aussi dépendante du cycle de vie des micro algues. Cette production commence pendant la phase de croissance des algues, se prolonge jusqu'au début de la phase stationnaire où elle atteint son maximum de toxicité.

Cette toxine diarrhéique provoque chez l'homme des troubles gastro intestinaux aigus, vomissements, des nausées, provenant de la consommation des produits de la mer (moules, huîtres, coquilles Saint Jacques) contaminés. Les symptômes apparaissent environ 30 minutes après l'ingestion de la toxine.

### **I.3.1. Mode d'action de l'acide okadaïque et toxicité**

La toxicité de l'acide okadaïque et de ses dérivés est due principalement à l'inhibition des phosphatases, enzymes responsables de la déphosphorylation des protéines. L'état d'hyper phosphorylation de protéines provoquée entraîne alors des altérations cellulaires causant deux phénomènes : la production de tumeurs et la contraction des muscles lisses. Ce dernier phénomène explique les symptômes observés de l'intoxication (Cohen et al., 1990). La figure 9 illustre le mécanisme d'action de l'acide okadaïque.



**Figure 9:** Mécanisme d'action de l'acide okadaïque et de ses dérivés sur les protéines (Baco, 2011).

Il existe trois classes de phosphatases : les protéines phosphatases dépendantes des métaux, les protéines phosphatases à tyrosine et les protéines phosphatases à sérine et thréonine. Ces dernières sont classées en 4 groupes : PP1, PP2A, PP 2B et PP2C. L'AO inhibe spécifiquement l'activité des protéines phosphatase de type 1 (PP1) et de type 2A (PP2A) (Cohen and Cohen, 1989). PP1 et PP2A existent dans la fraction cytosolique des cellules mammaires. Elles sont responsables de la déphosphorylation des protéines au niveau des résidus sérine et thréonine. Ces deux phosphatases présentent une similarité de 50% dans leur séquence d'acides aminés. La PP2A semble être plus sensible à l'AO que la PP1. En effet, il a été montré qu'à une concentration d'AO de 1nM, la PP 2A, était complètement inhibée alors que la PP 1 n'était pas affectée (IC50 10-15nM).

### I.3.2. Rôle des phosphatases PP1 et PP 2A

Les voies de signalisation cellulaire sont toutes régulées par des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines. Les phosphatases sont donc les enzymes clés de ces régulations.

#### I.3.2.1. La phosphatase 1

PP1 est une sérine/thréonine phosphatase qui régule divers processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire et la synthèse des protéines. La modulation de son activité fait intervenir des sous unités de ciblage. Ces sous unités ciblent spécifiquement la sous unité catalytique de type 1C de la PP1A permettant de la localiser à proximité de substrats spécifiques ainsi que de diminuer son affinité vis-à-vis à d'autres substrats (Aggen et al., 2000). La modulation de l'activité de la PP1 s'effectue aussi par des protéines inhibitrices telles que :

l'inhibiteur 1 (I-1) et la dopamine- cAMP régulateur des phosphoprotéines 32 (DARPP-32) (Cohen, 2002).

### **I.3.2.2. La phosphatase 2A**

La protéine phosphatase 2A joue un rôle très important dans le cycle de vie des cellules eucaryotes. Elle intervient dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction. Elle est constituée de trois sous unités : C catalytique de 36 kda, B régulatrice et une sous unité de structure : A de 65 kda (Janssens et al., 2008).

La régulation de son activité se fait par des réactions de phosphorylation, de méthylation ou par des inhibiteurs endogènes nommés « I1<sup>PP2A</sup> et I2<sup>PP2A</sup> ». En effet, la phosphorylation de la sous unité catalytique C inhibe l'activité de la PP 2A, alors que sa méthylation est responsable de son activation. PP2A passe donc par des cycles d'activation et d'inactivation selon les besoins de la cellule (Janssens et al., 2008).

En tant qu'inhibiteur spécifique de la PP1 et de la PP 2A, AO s'est avéré être très utile pour caractériser les mécanismes biologiques régulés par la phosphorylation des protéines et comprendre sa toxicité.

### **I.3.3. Toxicité de l'AO**

#### **I.3.3.1. AO et pertes fécales**

Les diarrhées constituent les premiers symptômes liés à une intoxication par l'AO. Il a été suggéré que l'hyper phosphorylation des protéines contrôlant la sécrétion de sodium entraînerait ces effets (Cohen et al., 1990). Cette suggestion a été réfutée par les travaux de Tripuraneni et al (1997). En effet, ces auteurs ont pu démontrer que cette toxine ne présentait aucun effet sur les courants ioniques au niveau des monocouches des cellules intestinales. *In vitro*, elle agit en augmentant la perméabilité para-cellulaire dans les monocouches et au niveau du colon de rat. C'est cet effet qui serait à l'origine d'une accumulation de liquides dans l'intestin, et donc des diarrhées (Tripuraneni et al., 1997), (Okada et al., 2000), (Hosokawa et al., 1998).

Pour mieux élucider l'effet de l'AO sur la perméabilité des cellules intestinales, une étude protéomique a été menée sur les cellules intestinales de souris. Cette étude a permis d'identifier 58 protéines autres que les phosphatases dont l'expression avait été altérée après administration d'AO. Parmi ces dernières, TNF  $\alpha$ , cytokine, surexprimée par AO, joue un rôle dans

l'augmentation de la perméabilité para-cellulaire des cellules épithéliales (Wang et al., 2012a), (Fujiki et al., 1997), (Marano et al., 1998).

### **I. 3.3.2. Effet neuro-toxique de l'AO**

Certaines études ont montré que l'AO présentait un effet néfaste sur les cellules neuronales, il serait responsable de l'induction d'une neuro-toxicité/neuro-dégénération. Ceci a été montré sur des cellules neuronales primaires ainsi que sur des neuroblastomères (Leira et al., 2002). Cet effet de neuro-dégénération a été corrélié à une stimulation de la phosphorylation de la protéine Tau via l'activation des canaux sensibles au calcium. Tau, dans les conditions physiologiques normales, s'associe aux microtubules pour maintenir leur organisation spatiale ainsi que leur assemblage. Des études antérieures, ont montré que l'installation d'un phénomène d'hyper phosphorylation de la protéine Tau chez les malades d'Alzheimer était également observé après à une incubation des cellules avec AO ainsi qu'après une injection ou micro infusion de cette toxine chez les rats. Les travaux de Liu et al (2005) ont montré que l'hyper phosphorylation de la protéine Tau serait due à une inhibition de l'activité de la PP2A. L'état hyper phosphorylé de Tau induirait une réduction de son affinité vis-à-vis des microtubules ainsi que son détachement, ce qui induirait l'apoptose cellulaire (M L Caillet-Boudin, 1997), (Liu et al., 2005).

### **I.3.3.3. AO et mort cellulaire**

L'AO est peut induire la mort cellulaire, pour différentes types de cellules et notamment des cellules cancéreuses. L'administration de 50 nM d'AO à des cellules fibroblastiques de rat cultivées a provoqué la mort cellulaire. En effet, à cette concentration l'AO stimulerait l'installation une hyper-phosphorylation de la protéine p53 corrélée à la fonction apoptotique. Il induirait également l'apparition de mitoses aberrantes chez des cellules ayant un p53 non fonctionnel (Milczarek et al., 1999).

L'effet apoptotique de l'AO serait aussi lié à l'activation de certaines caspases comme la caspase 2 dans les cellules MCF7 et les caspases 2, 3, 7 dans des cellules HeLa S3 (Rossini et al., 2001). Enfin, il a été aussi montré que l'inhibition de la PP2A par l'AO réduisait l'expression d'ER  $\alpha$  des cellules MCF7 et T47D via la dégradation de son ARN m (Keen et al., 2005).

L'AO en tant qu'inhibiteur des protéines phosphatases présenterait des effets controversés sur la promotion tumorale. Classé en tant qu'un promoteur tumoral, il agissait aussi comme inhibiteur de la prolifération cancéreuse. Ces effets liés à la dose appliquée resteraient mal connus jusqu'à présent.

### **I.3.3.5. AO et métabolisme lipidique**

Il semblerait que l'AO stimule la lipolyse en augmentant la phosphorylation de plusieurs protéines dans l'adipocyte. Par exemple, il a été montré que l'incubation d'adipocytes de rat avec 10 $\mu$ M d'AO stimulait la lipolyse. Cet effet a été corrélé à une stimulation de la phosphorylation du complexe périlipin A et B, induisant sa dissociation et son détachement de la surface lipidique. Ceci favoriserait effets favorisant la translocation de la lipase sensible aux hormones (HSL) vers la vacuole lipidique et déclencherait ainsi la lipolyse (Chang et al., 2013), (He et al., 2006).

### **I.3.4. Méthodes de détection et de dosage de l'AO**

Des analyses chimiques et biologiques ont été développées pour la détection et le dosage de l'AO. En 1978, Yasumoto et al ont développé le premier test biologique d'analyse de toxines lipophiles des algues utilisant des souris. La toxicité de l'AO était exprimée en unité de souris : masse minimale d'AO pour tuer une souris de 20g, 24h après injection (Yasumoto et al., 1978). L'inconvénient majeur de ce test biologique était la présence d'interférences entre l'AO, les autres toxines et les acides gras.

De plus certains problèmes de reproductibilité ont été observés tout comme une faible sensibilité due à l'utilisation du vivant.

Le tableau 3 rassemble d'autres méthodes d'analyses de l'AO.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-SM) a été utilisée pour palier aux inconvénients dus à l'utilisation du vivant. D'autres méthodes de détection de l'AO par fluorescence ont été développées. Elles sont basées sur une étape de dérivation de l'AO par composés fluorescents suivie de la détection de la forme dérivée de l'AO par HPLC couplée à un détecteur de fluorescence (HPLC-FLD).

**Tableau 3:** Méthodes d'analyse de l'AO

Méthodes de dosage	Echantillon	Préparation de l'échantillon	Références
Colorimétrie (UV, 405nm)	Mollusques	Extraction au méthanol	(Smienk et al., 2013)
HPLC-MS/MS	Muscles, glandes digestives et pancréas de crustacés	Extraction au méthanol	(Zhang et al., 2013a)
HPLC- FLD	Extraits de moule	Extraction au méthanol + dérivaison avec le 9-anthryldiazomethane	( Kacem et al., 2009)
HPLC-FLD	Extraits de phytoplancton	Extraction au méthanol + dérivaison par le 9-Chloromethylanthracene ou le romomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2 (1H)-quinoxalinone + SPE	(Nogueiras et al., 2003)

L'AO présente des effets néfastes sur la santé. Il est capable de se comporter comme une substance cancérigène en stimulant la prolifération de certaines lignées cancéreuses à faible dose. A forte dose, il agirait comme substance antiproliférative. Son mode d'action sur les cellules cancéreuses reste mal connu.

Les polluants environnementaux constituent une menace pour la santé et notamment BPA, GLP et AO qui peuvent contaminer l'organisme dans un même temps. Selon la dose d'exposition, BPA, AO et GLP sont capables de perturber certaines fonctions impliquées dans l'homéostasie ce qui pourrait favoriser l'apparition de cancer et/ ou d'obésité. Cancer et obésité sont liés. En

effet, des données historiques ont montré que l'obésité était une cause d'environ 14% des décès par cancer chez les hommes et jusqu'à 20% chez les femmes (Calle et al., 2003).

Le tissu adipeux et le lien avec les polluants précédemment décrits font l'objet des paragraphes suivants.

## II. Obésité et polluants

### II.1. Le tissu adipeux

#### II.1.1. Généralités

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif constitué principalement de cellules nommées « adipocytes » qui jouent le rôle d'une réserve énergétique. Ils stockent les lipides sous formes de triglycérides (TG) dans une grande vacuole. Ces TG sont ensuite hydrolysés et libèrent des acides gras libres (Lafontan, 2003). Outre les adipocytes, le tissu adipeux contient les cellules épithéliales, les macrophages, les vaisseaux sanguins et des fibroblastes.

Il existe deux types de tissus adipeux qui diffèrent par leur fonction et localisation. **Le tissu adipeux brun** disparaît vite après la naissance. Il renferme des adipocytes de forme polygonale avec des gouttelettes lipidique multiloculaires, riches en mitochondries donnent une coloration brune. Ce tissu contrôle le processus de thermorégulation.

**Le tissu adipeux blanc** est sous divisé en deux catégories : le tissu adipeux intra abdominal (ou viscéral), responsable de l'apparition de l'obésité, et le tissu adipeux sous cutané localisé entre les muscles et la peau. Les adipocytes ont une forme sphérique, avec une grosse gouttelette lipidique uniloculaire. Ce tissu sécrète un ensemble hétérogène de facteurs (hormones) impliqués dans de nombreux processus physiologiques: la régulation de l'appétit, la réponse inflammatoire, l'angiogenèse (Lefterova and Lazar, 2009).

Les adipocytes du tissu viscéral expriment d'avantages de facteurs de transcription favorisant l'adipogenèse, comme la *CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$*  (C/EBP- $\alpha$ ), et plus de gènes du système WNT, comme *Frizzled7*, associés avec la répression de la différenciation, que les adipocytes du tissu sous-cutané. Il a été rapporté que la sécrétion de l'adiponectine, la protéine réactive C (CRP), le facteur de nécrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-6 (IL-6), la protéine monocyte chimioattractrice-1 attractante (MCP-1), l'angiotensinogène et l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène-1 (PAI-1) étaient plus fortement exprimés dans le tissu intra-

abdominal que dans le tissu sous-cutané. Ainsi, le tissu adipeux viscéral semblerait donc être plus actif que le tissu adipeux cutané (Ravussin and Galgani, 2011), (Ibrahim, 2010).

### **II.1.2. Adipogenèse**

L'adipogenèse désigne la transformation d'une cellule fibroblastique en adipocyte mature. Elle conduit à des changements morphologiques importants : une cellule fibroblastique fusiforme devient une grosse cellule empilée d'une vacuole lipidique. Ces changements morphologiques sont liés à des modifications de l'expression génique et à l'apparition de précurseurs adipocytaires. Elle se déroule en deux étapes : l'étape de l'engagement et l'étape de la différenciation (précoce et tardive). La différenciation précoce comprend une expansion clonale puis les adipocytes subissent l'étape de la différenciation terminale (tardive) qui aboutit à la formation d'un adipocyte mature capable de stocker la matière grasse sous forme de triglycérides (Arner, 2005).

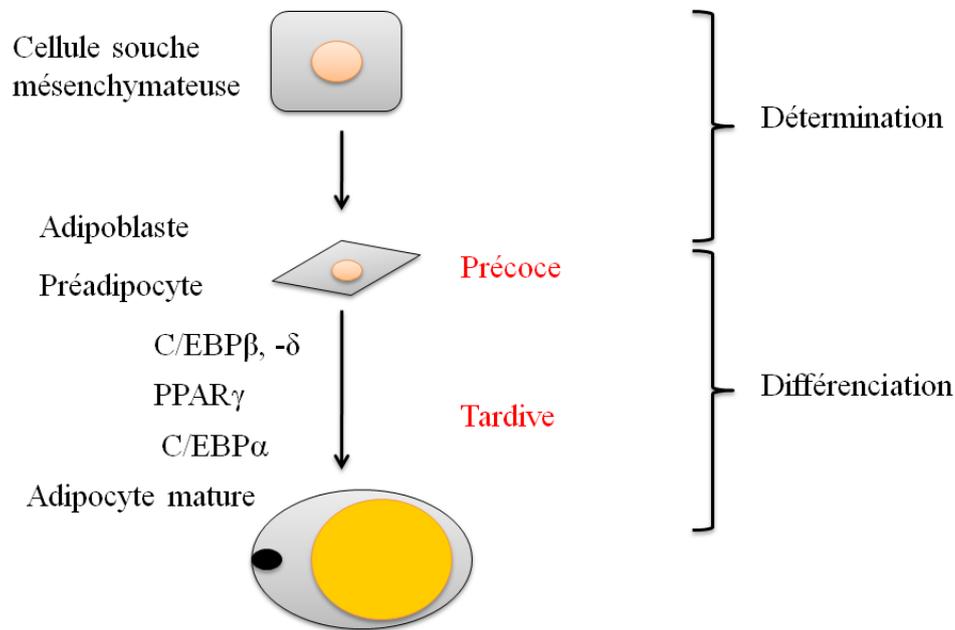
#### **II.1.2.1. Etape de l'engagement**

L'étape de l'engagement désigne le passage des cellules souches méchantymateuses en préadipocytes. La formation de préadipocytes commence durant la partie tardive de la gestation jusqu'à l'adolescence (Tang et al., 2008). Lors de cette étape, la cellule n'est pas complètement différenciée, dans le cas des préadipocytes blancs, ça nécessite encore une étape de stimulation adipogénique par des facteurs spécifiques pour compléter la différenciation terminale formant un adipocyte mature. La régulation de l'étape de l'engagement fait intervenir un ensemble de modulateurs : la composition/la rigidité de la matrice extracellulaire, les voies de signalisation du gène WNT, les voies de signalisation de la superfamille de facteur de croissance de transformation  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) qui inhibaient le processus de l'adipogenèse (Cristancho and Lazar, 2011).

#### **II.1.2.2. Etape de la différenciation terminale**

Le préadipocyte, après avoir subi une phase d'expansion clonale, se dirige vers l'étape de la différenciation proprement dite. Cette étape nécessite l'expression de certains marqueurs de différenciation, qui vont induire l'apparition des changements morphologiques favorisant la transformation des préadipocytes en adipocytes matures. Les principaux facteurs de transcription qui stimulent le mécanisme de la différenciation sont le peroxydase activator-1 (PPAR- $\gamma$ ), C/EBP- $\alpha$ , C/EBP- $\beta$  et C/EBP- $\delta$  (Lefterova et al., 2008). Les changements morphologiques sont couplés à la transcription des gènes codant pour ces protéines : l'adipocyte protein 2 (AP2) (appelée aussi fatty acid-binding protein 4, FABP4) qui est un transporteur des

acides gras, le transporteur du glucose (GLUT4), la leptine, l'adiponectine... (Cristancho and Lazar, 2011). La figure 10 illustre les étapes de l'adipogenèse.



**Figure 10:** Etapes de l'adipogenèse.

### II.1.3. Les facteurs transcriptionnels de la différenciation

Plusieurs facteurs de transcription régulant le mécanisme de la différenciation adipocytaire ont été identifiés. C/EBP- $\alpha$  et le PPAR- $\gamma$  sont responsables de l'activation de certains gènes de l'adipocyte et de l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire pour la différenciation adipocytaire (Mandrup and Lane, 1997).

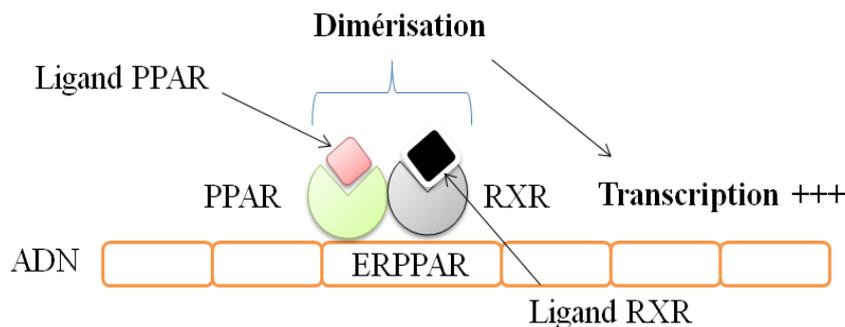
#### II.1.3.1. Facteurs C/EBP

La famille des facteurs de transcription C / EBP joue un rôle essentiel dans le développement des adipocytes ainsi que l'accumulation des lipides. Des études ont démontré que la perte d'un ou de plusieurs de ces facteurs pouvait conduire à une diminution de la masse adipeuse chez, les souris. En plus ces facteurs peuvent influencer directement la lipogenèse en contrôlant l'induction précoce de l'enzyme lipogénique diacylglycérol acyltransférase 2 (DGAT2) au cours de l'adipogenèse (Tanaka, 1997), (Payne et al., 2007).

### II.1.3.2. Les facteurs PPARs

Les facteurs de la famille PPARs font partie de la classe des récepteurs nucléaires. Ils participent à la régulation de plusieurs processus physiologiques tels que le métabolisme du glucose, de lipides et la différenciation cellulaire.

Leur extrémités N-terminale est indépendante de la voie de régulation par le ligand, appelé fonction d'activation 1 (AF1). Cette région est suivie par deux groupements de zinc comprenant un domaine de liaison à l'ADN. L'extrémité C-terminale contient la région de liaison au ligand jouant le rôle d'un domaine de trans-activation majeur dépendant du ligand appelé AF2. Cette extrémité est également responsable de la dimérisation avec le récepteur rétinol X (RXR) (Christodoulides et Vidal-Puig, 2010). PPARs activent la transcription en se fixant sur les éléments de réponses de PPAR (ERPPAR) au niveau de l'ADN. Cette fixation est suivie d'une hétéro-dimérisation avec le facteur RXR favorisant la transcription de gènes impliqués dans l'adipogenèse (Fig.11).



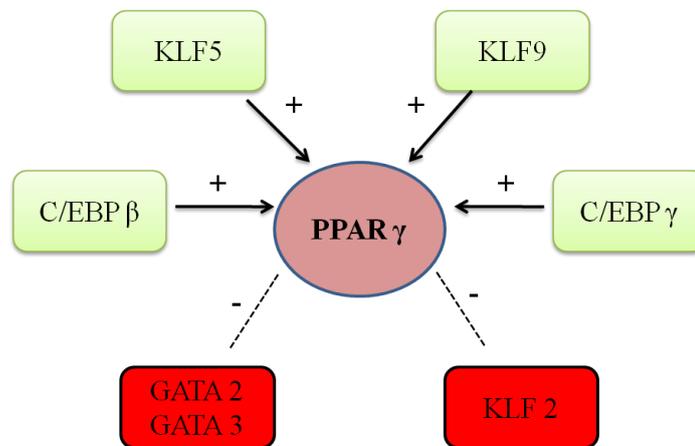
**Figure 11:** Mécanisme d'action des PPAR dans les adipocytes.

Chez les mammifères, trois isoformes de PPARs ont été identifiées :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ils sont codés par des gènes spécifiques exprimés dans divers tissus et ayant des rôles spécifiques durant le développement du corps. De nombreuses études ont démontré que PPAR  $\gamma$  était fortement exprimé surtout dans les adipocytes. Son expression serait stimulée durant l'adipogenèse (Lee and Ge, 2014) par un ensemble de facteurs transcriptionnels.

L'activation du PPAR-  $\gamma$  par son ligand stimulerait à son tour l'expression des gènes de la synthèse lipidique ainsi ceux liés à la différenciation : CD 36, LPL, AP2 et C/EBP- $\alpha$  (Tontonoz and Spiegelman, 2008). La régulation de l'expression du PPAR-  $\gamma$  s'effectuerait par certains facteurs transcriptionnels indiqués figure 12. Parmi ces derniers, , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , Krox-20,

KLF5, EBF, ZNF453, TCF7L2 et ADD1/SREBP1c (Park et al., 2008), (Cristancho and Lazar, 2011), (Gesta et al., 2007). D'autres facteurs agisseraient pour inhiber l'expression du PPAR- $\gamma$  ainsi que la différenciation adipocytaire tel que : le facteur KLF2 et GATA 2/3 (Banerjee et al., 2003) (Xu et al., 2009).

De plus, PPAR- $\gamma$  subit certaines modifications post traductionnelles. En effet, une phosphorylation au niveau de la sérine 122 sous le contrôle de la voie des ERK1/2 et P38/JNK kinases induirait son inactivation et serait suivie d'un arrêt de la différenciation adipocytaire (van Beekum et al., 2009).



**Figure 12:** Les facteurs transcriptionnels de la régulation de l'expression du PPAR.

## II.2. Polluants environnementaux et tissu adipeux

La détoxification des polluants présent dans notre organisme s'effectue par métabolisation. Les récepteurs, des enzymes, des transporteurs empêchent l'absorption de polluants et augmentent leur solubilité et leur excrétion (Barouki, 2010).

Certains polluants hydrophobes résistent aux mécanismes de la détoxification et tendent à s'accumuler dans les compartiments lipophiliques. Par exemple, le BPA a été détecté dans les tissus adipeux des animaux. Il pourrait donc être un lieu d'accumulation de certains polluants (Nunez et al., 2001).

Certains polluants pourraient être obésogènes alors que d'autres seraient capables de stimuler la lipolyse. Par exemple, Hugo et al 2008 ont montré qu'à des doses de 0,1 nM et 1nM le BPA inhiberait la sécrétion de l'adiponectine par les adipocytes et stimulerait celle des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF  $\alpha$  et Il-6. Une augmentation de l'accumulation des lipides a été

aussi observée chez les préadipocytes 3T3-L1 exposés à 1 $\mu$ M de BPA (Sargis et al., 2010). Cependant, une baisse de l'accumulation du gras des adipocytes de rat a été observée suite à une exposition à 1  $\mu$ M d'AO (Chang et al., 2013). Également, il a été montré que l'incubation de préadipocytes 3T3-L1 avec GLP induisait une diminution de l'accumulation du gras. Cette diminution était accompagnée par une surexpression de la superoxyde dismutase (SOD) et donc un stress oxydatif (Martini et al., 2016). Cependant, vu le caractère hydrophile du GLP, il ne semblerait pas s'accumuler dans le tissu adipeux. Les effets du GLP sur les cellules adipocytaires pourraient être liés à un mécanisme d'action extracellulaire mal connu.

L'accumulation des polluants dans le tissu adipeux pourrait jouer un rôle de détoxification de l'organisme en cas de contamination par les polluants environnementaux par séquestration.

Toutefois, la dégradation s'avérerait difficile. La présence de polluants comme BPA, GLP, AO pourrait perturber le métabolisme des cellules graisseuses : modifier l'expression des gènes contrôlant l'adipogenèse et la lipogenèse.

Les études portant sur l'existence d'un lien directe entre le cancer du sein, l'accumulation des polluants, et l'obésité ne sont pas nombreuses.

### **III. Cancer du sein**

L'étude présentée ici porte également sur le cancer du sein. Cette pathologie semble avoir un lien étroit avec le tissu adipeux. Elle est décrite ci-après.

#### **III.1. Généralités**

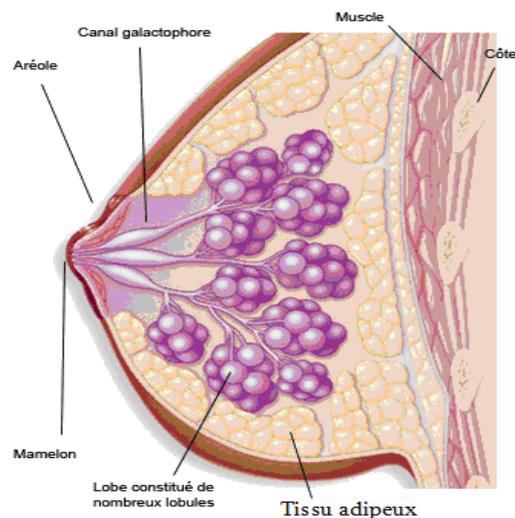
Le terme cancer définit une prolifération anarchique et indéfinie d'un clone de cellule susceptible de détruire le tissu original et d'induire la métastase : c'est à dire aptitude de cellules cancéreuses à migrer vers des sites distants de la tumeur primaire et d'y proliférer.

En France, la lutte contre le cancer constitue une priorité gouvernementale depuis une dizaine d'années. Selon le rapport de l'édition des cancers en France réalisé en 2014, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine entre 2010 et 2012 était estimé à 355 000 dont 200 000 chez l'homme et 155 000 chez la femme. Chez l'homme, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate (56 841 cas), du poumon (28 211 cas) et du côlon-rectum (23 266). De même, chez la femme, il s'agit des cancers du sein (48 763 cas), du côlon-rectum (18 926 cas) et du poumon (11 284 cas). Le cancer du sein est le premier cancer féminin. Sa détection à un stade précoce est associée généralement à un bon pronostic alors que sa détection à un stade tardif de métastase est d'un mauvais pronostic.

### III.2. Histologie du sein

Le sein est composé d'une glande mammaire entourée d'un tissu conjonctif et d'un tissu adipeux. Le tissu conjonctif est formé par des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et des canaux lymphatiques reliés aux ganglions lymphatiques. La glande mammaire renferme 15 à 20 lobes possédant de lobules. Les lobes et les lobules sont connectés par des tubes minces appelés conduites. Les lobes sont drainés par le canal galactophore vers le mamelon. Le type le plus commun de cancer du sein est le cancer canalaire. Il se localise dans les cellules des conduites. Il existe aussi le cancer lobulaire qui débute dans les lobes ou les lobules. Il est le plus souvent retrouvé dans les deux seins que les autres types de cancer du sein. Le cancer est souvent classé en deux catégories : le cancer non-invasif (*in situ*) et le cancer invasif. Le cancer *in situ*, désigne le cancer qui ne dépasse pas au de la zone où il s'est initialement développé , alors que le cancer du sein invasif a tendance à se propager vers d'autres tissus ou organes (Andarawewa et al., 2005).

Comme l'indique la figure 13, le tissu adipeux représente la majeure partie du stroma mammaire.



**Figure 13:** Anatomie du sein.

Les études portant sur le cancer du sein ont été facilitées par la conception et la caractérisation de lignées tumorales qui sont présentées ci-après.

### III.3. Modèles de lignées cellulaires de cancer du sein

Différents types de cancer du sein ont été caractérisés. Leur classification a été basée sur certains paramètres : le type histologique, le niveau de la tumeur, l'état des ganglions lymphatiques et la présence de marqueurs prédictifs tels que les récepteurs aux œstrogènes (RE) ou de progestérone (PR), le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2(HER2) et le récepteur du facteur de croissance endothéliale (EGFR).

La lignée de cancer du sein la plus couramment utilisée à l'échelle expérimentale est la lignée MCF7 identifiée par la Fondation Michigan du Cancer en 1973 (Soule et al., 1973).

C'est une lignée de tumeur hormono-dépendante issues d'une métastase d'adénocarcinome mammaire humain. Elle est caractérisée par la présence de récepteurs oestrogéniques ainsi d'autres récepteurs spécifiques pour une large gamme d'hormones telles que : les androgènes, la progestérone, l'insuline et les facteurs de croissance épidermiques

Il s'agit donc d'un modèle de référence pour étudier les effets hormonaux.

En se basant sur l'expression de ces récepteurs, 5 sous-types de cancer du sein ont été identifiés. Ils sont présentés dans le tableau 4 (Holliday and Speirs, 2011), (Subik et al., 2010).

**Tableau 4:** Classification moléculaire de cancer du sein

Classification	Profil immunologique	Exemples de lignées d'étude
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2-, EGFR +	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER+, PR+, HER2+, EGFR+	BT474
Basal	ER-, PR-, HER2-, EGFR+	MDA-MB-468, SUM190, MDA-MB 231
Non classé	ER-, PR-, HER2-, EGFR-	BT549, Hs578T, SUM1315, SKBR3
HER 2	ER-, PR-, HER2+, EGFR-	MDA-MB-453

### **III.4. Facteurs impliqués dans le cancer du sein**

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle dans laquelle interviennent des facteurs héréditaires, génétique, la masse corporelle, l'alimentation, l'environnement.

#### **III.4.1. Facteurs impliqués dans le cancer du sein associés à l'obésité**

La genèse du cancer est souvent liée à une modification du taux des hormones dans l'organisme. Ce changement dans le profil sécrétoire peut être lié au surpoids. L'obésité est souvent associée à une augmentation de la sécrétion d'hormones telles que l'insuline, les œstrogènes et les adipokines.

##### **III.4.1.1. Lien entre cancer et obésité ; hormones et facteurs de croissances : l'insuline**

L'augmentation du taux d'insuline est associée à une augmentation du taux des facteurs de croissance de l'insuline (IGFs).

Plusieurs types de cellules de cancer du sein surexpriment les récepteurs de type IGF-1R et 2R. L'activation du récepteur IGF-1R par son ligand stimule la migration et la survie cellulaire. Celle d'IGF-2R stimule la formation de métastases via l'augmentation de l'expression des cadhérines de type E,  $\alpha$  et  $\beta$  impliquées dans la liaison intercellulaire (Chan and Lee, 2008).

Il a été également montré que la sursécrétion de l'insuline entraîne aussi une augmentation de la sécrétion d'œstrogène favorisant l'apparition de cancer du sein (Khan et al., 2013).

##### **III.4.1.2. Les cytokines inflammatoires**

L'activation de la sécrétion du facteur NF $\kappa$ b par le tissu adipeux induit une stimulation de l'expression de facteurs pro-inflammatoires. Parmi ces derniers : la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) responsable de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine impliqué dans l'adhésion et la croissance cellulaire, le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-1 $\beta$  responsables de l'activation de l'expression de l'aromatase impliquée dans la synthèse de l'œstrogène.

L'activation de l'expression de ces facteurs entraîne à l'installation de la carcinogénèse (Aggarwal and Gehlot, 2009), (Morris et al., 2011).

### **III.4.1.3. Les adipokines, cancer et obésité**

#### **III.4.1.3.1. Leptine**

Dans plusieurs modèles cellulaires de cancer du sein, il a été montré que la leptine agissait pour stimuler la prolifération cellulaire. Ces effets sont médiés par son récepteur OBRL. Sa fixation stimule l'activation de l'expression de protéines : Jak 2, PI3K, STAT3, cox 2, VEGF, ERK1 / 2. Ces dernières stimulent l'expression de la cycline D1, l'hyper-phosphorylation des protéines de la famille du rétinoblastome (RB) et l'angiogenèse (Garofalo and Surmacz, 2006), (Frankenberry et al., 2006), (Ray et al., 2007). Les protéines du rétinoblastome jouent le rôle de suppresseur de tumeur. Elles sont le plus fréquemment inactivées dans le cancer par leur phosphorylation (Sherr and McCormick, 2002).

La leptine agit aussi comme ligand activateur du RE exprimé par les cellules MCF7 (Yom et al., 2013). Elle stimule l'expression et l'activité de l'aromatase dans ces cellules, enzyme de biosynthèse des oestrogènes (Catalano et al., 2003).

#### **III.4.1.3.2. Adiponectine**

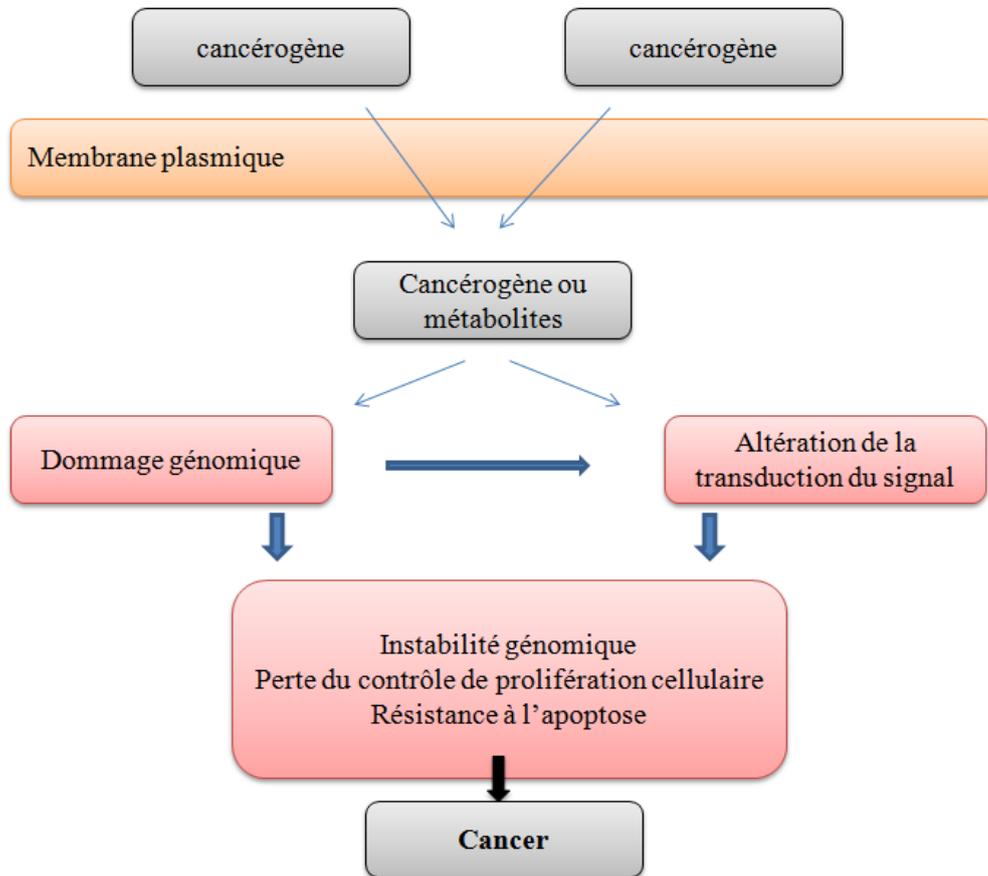
Contrairement à la leptine, l'adiponectine semble avoir plusieurs effets bénéfiques et protecteurs. Bien que son rôle n'a pas été définitivement établi, l'adiponectine a été démontré comme étant anti-inflammatoire et anti-diabétiques. Il a été montré que la diminution de son taux plasmatique est associée à un risque accru de cancer du sein (Mantzoros et al., 2004). Elle agit directement sur les cellules cancéreuses. En effet, ces récepteurs Adipo R1 et Adipo R2 sont révélés être exprimés dans certaines cellules de cancer du sein. Plusieurs études ont montré que l'adiponectine diminue la croissance cellulaire dans diverses lignées cellulaires de cancer du sein telles que les cellules MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 (Arditi et al., 2007), (Grossmann et al., 2008).

### **III.5. Polluants environnementaux et cancer**

Plus de 200 composés chimiques sont reconnus comme cancérogènes mammaires (Rudel et al., 2007). Selon leur mode d'action cellulaire, les polluants sont classés en deux catégories : les polluants gènotoxiques et les polluants non gènotoxiques.

Un polluant cancérogène gènotoxique agit sur les chromosomes en provoquant lui-même ou par l'intermédiaire de ses métabolites des lésions ou des mutations au niveau de l'ADN.

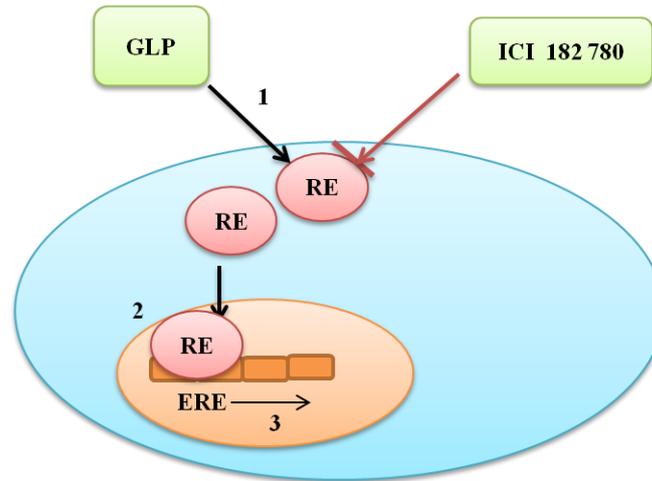
Alors qu'un polluant cancérigène non génotoxique agit en provoquant des modifications au niveau de l'expression des gènes sans toucher à la structure d'ADN (Luch, 2005). La figure 14 illustre ces deux mécanismes d'actions.



**Figure 14:** Schéma des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse (Luch, 2005).

Des études *in vitro* ont identifié plus de 250 composés, appelés perturbateurs endocriniens comme le BPA, qui imitent ou interfèrent avec les œstrogènes naturels et qui peuvent stimuler la prolifération des cellules mammaires cancéreuses.

De plus, il a été montré que certains pesticides tels que le GLP pourraient mimer l'action de l'œstrogène. La figure 17 propose un mécanisme d'action du GLP suite à son interaction avec le RE (Fig 15, étape 1), il active la fixation de ce dernier sur les ERE ainsi que leur expression (Fig 15, étape 3). Ceci stimulerait la prolifération de la lignée 747D. Cette voie d'activation est inhibée par l'antagoniste du RE : ICI 182 780 (Thongprakaisang et al., 2013) .



**Figure 15:** Mécanisme d'action du glyphosate sur la lignée T47D (Thongprakaisang et al., 2013).

L'obésité induit un ensemble de modifications au niveau du microenvironnement tissulaire susceptible d'engendrer l'apparition d'autres maladies telles que le cancer du sein. Les adipokines sécrétés par les adipocytes constituent des intermédiaires pour ce type de communication. Des études se sont orientées vers la caractérisation des interactions entre ces deux types cellulaires dans le cadre de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour le cancer.

Toutefois, aucune preuve n'existe à ce jour sur la corrélation directe entre ces trois facteurs: polluants, obésité et cancer du sein.

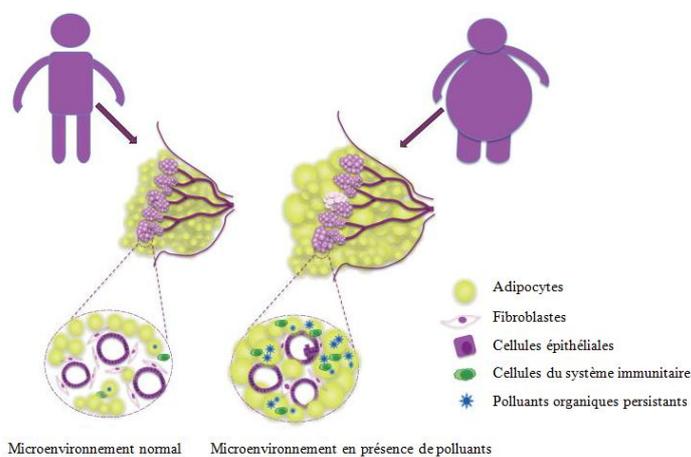
#### IV. Polluants, obésité, cancer

L'hypothèse de l'existence d'une communication entre les adipocytes et les cellules cancéreuses a été ensuite vérifiée par une étude réalisée par Elliot et al (1992). Il a été montré que l'injection de cellules cancéreuses murines (lignée SP1) n'induisaient pas de métastase après leur injection sous cutanée. En revanche, une co-transplantation de ces cellules avec des fragments de tissu adipeux mammaires ou ovariens stimulait la croissance tumorale et la formation de métastases (Elliott et al., 1992). D'autres expériences de co-cultures d'adipocytes humain matures avec des cellules cancéreuses ont montré que les adipocytes étaient capables d'induire la croissance tumorale. En effet, il a été montré que l'incubation de cellules MCF7 avec un milieu issu de coculture d'adipocytes matures stimulait leur invasivité par rapport à leur incubation avec le milieu issu de la culture d'adipocytes seuls. L'augmentation de l'invasion serait liée à une stimulation de l'expression de la métallo protéinase matricielle- 2 (MMP-2) de la lignée MCF7

par le milieu issu de la co-culture. Des changements phénotypiques ont été également observés sur les adipocytes cultivés dans ce milieu. Une baisse de l'accumulation du gras a été observée, liée à une dédifférenciation adipocytaire suite à une réduction de l'expression du facteur PPAR- $\gamma$  (Wang et al., 2015).

Ces effets ne sont pas clairs. En effet, il a été montré que la coculture des préadipocytes avec les cellules MCF7 inhiberait leur prolifération par rapport aux cellules MCF7 cultivées seules (Ragerdi Kashani et al., 2006).

La promotion de la prolifération des cellules cancéreuses via leur interaction avec les adipocytes notamment par l'intermédiaire d'adipokines a été validée *in vitro*. L'impact des polluants sur la genèse de l'obésité a été aussi confirmé. L'hypothèse que la bioaccumulation de certains polluants tels que les polluants organiques persistants à la détoxification dans le tissu adipeux influencerait l'apparition de cancer du sein semble plausible (Reaves et al., 2015). La figure 16 montre que dans le tissu adipeux, les polluants sont susceptibles d'altérer l'adipogenèse par exemple en stimulant la différenciation adipocytaire et l'accumulation du gras. Ces effets seraient également liés à une altération de la sécrétion d'adipokines : l'augmentation de la sécrétion de leptine favoriserait donc la genèse du cancer du sein.



**Figure 16:** Mécanisme d'action potentiel des polluants organiques persistants sur la progression tumorale (Reaves et al., 2015).

## ***CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES***

### I. Matériels biologiques

Les cellules utilisées au cours de ces travaux sont : deux lignées de cancer du sein « MCF7 » (Michigan Cancer Foundation-7) et « MDA-MB 231 » (M.D. Anderson- Metastatic Breast), une lignée de préadipocytes humains blancs « HWPC » (Human white preadipocytes subcutaneous) fournie par Promocell et une lignée de cellules mammaires épithéliales fournies par LONZA, « HME1 » (human mammary epithelial cells).

### II. Réactifs et molécules

Nous avons utilisé trois micropolluants afin d'évaluer leurs effets sur la viabilité de cellules cancéreuses mammaires et adipocytaires. Les solvants utilisés ont été filtrés, et l'eau est de qualité milliQ.

Le tableau 5 représente les différents produits commerciaux utilisés dans notre projet.

**Tableau 5:** Origine des molécules utilisées

Substances	N° de classification	Formule brute	Masse molaire	Pureté	Fournisseurs
Bisphénol A	80-05-7	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228,29	≥99	Sigma
Glyphosate	1071-83-6	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P	169,07		Sigma
Acide okadaïque	155716-06-6	C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub> .NH <sub>3</sub>	822,03	≥90	Sigma

### III. Conditions de culture des cellules

La manipulation des différentes lignées a été réalisée en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Les milieux de culture ont été filtrés après préparation sur des membranes à 0,22µm (Millex, Millipore).

Leur culture a été effectuée dans des grandes flasques de 75 cm<sup>3</sup> durant les étapes de l'amplification, maintenue à 37°C sous une atmosphère à 5% CO<sub>2</sub>.

### **III.1. Mise en culture**

Le cryotube de chaque lignée a été décongelé dans un bain marie à 37°C. Une étape de lavage par ajout de 5 ml de culture a été effectuée. Cette étape permet d'enlever le DMSO. Le culot cellulaire obtenu après une étape de centrifugation à 1200 rpm a été resuspendu dans 1 ml de milieu de culture. La suspension a été ensuite mise en culture dans une flasque. La remise en culture permet d'amplifier les cellules avant de les stocker à l'azote liquide à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml.

### **III.2. Trypsination**

La formation d'un tapis cellulaire est suivie d'une étape de trypsination. Les cellules, ont été lavées avec du tampon PBS stérile (pH 7,4) avant l'ajout de la trypsine/ EDTA (2X). Après 5 à 10 minutes d'incubation à 37°C, l'action de la trypsine a été inhibée par ajout de 4 ml de milieu de culture. Les cellules ont été récupérées suite à une étape de centrifugation pendant 5 min à 1200 rpm, suspendues dans le milieu de culture

### **III.3. Dénombrement cellulaire**

Les cellules ont été dénombrées par observation microscopique sur cellule de Malassez. Le bleu de trypan a été utilisé pour déterminer la viabilité cellulaire. 20µl de la suspension cellulaire ont été ajoutés à 80µl de bleu de trypan. Après homogénéisation du mélange, 40µl ont été déposés sur la cellule de Malassez.

### **III.4. Culture des préadipocytes humains**

La lignée HWP (Promocell) a été isolée à partir de la graisse sous cutanée de l'abdomen de femme caucasienne à l'âge de 59 ans. Il s'agit d'une lignée non immortalisée. La maturation des préadipocytes humains s'effectue en trois étapes : croissance, différenciation et maturation. Trois milieux de culture ont été respectivement utilisés : un milieu de croissance, un milieu de différenciation et un milieu de nutrition. Ces différents milieux ont été supplémentés chacun par le supplément correspondant et par 1% antibiotique « Streptomycine/ Pénicilline ».

#### Croissance des pré-adipocytes

Les cellules ont été mises en culture dans du milieu de croissance pendant 10 à 12 jours. Le milieu de culture a été renouvelé chaque 2 jour.

### Différenciation des pré-adipocytes

A l'état de confluence cellulaire (jour 0), le milieu de croissance (MC) de pré-adipocytes est remplacé par le milieu de différenciation pendant 6 jours afin d'induire la différenciation des préadipocytes en adipocytes différenciés (jour 6). Il s'agit d'une cellule plus au moins ronde avec apparition de quelques gouttelettes lipidiques.

### Maturation des adipocytes

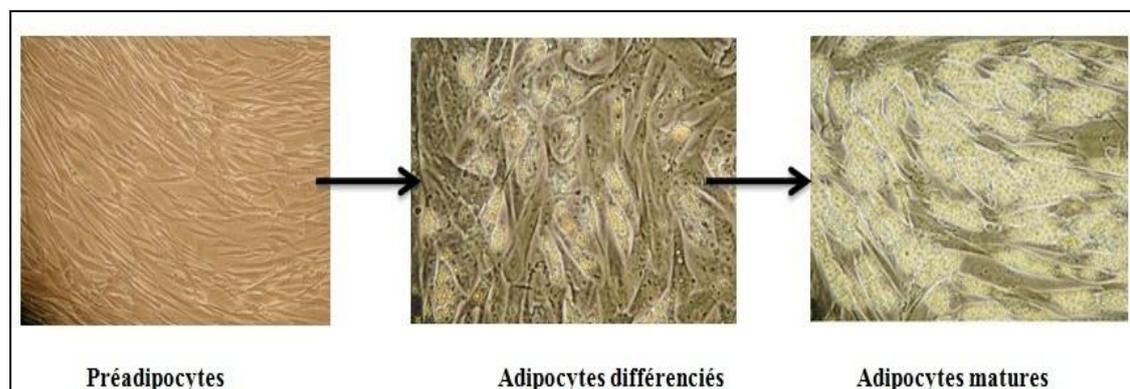
Après la phase de différenciation, le milieu de différenciation (MD) est remplacé par du milieu de nutrition (MN). Durant cette étape, les adipocytes différenciés entrent en phase de maturation aboutissant après 12 jours à la formation d'un adipocytes mature (apparition d'une vacuole lipidique). Le milieu a été renouvelé tous les 2 jours.

Le tableau 6 illustre la composition finale des suppléments après l'addition dans le milieu de culture.

**Tableau 6:** Composition des suppléments et leurs concentrations finales

Supplément	Milieu de Croissance	Milieu de différenciation	Milieu de nutrition
Sérum de veau foetal	0,05 ml / ml	-	0,03 ml / ml
Facteur de croissance endothéliale	0,004 ml / ml	-	-
Facteur de croissance épidermique (recombinant humain)	10 ng / ml	-	-
Hydrocortisone	1 µg / ml	-	-
d-Biotin	-	8 µg / ml	8 µg / ml
Insuline	-	0,5 µg / ml	0,5 µg / ml
Dexamethasone	-	400 ng / ml	400 ng / ml
3-Isobutyl-1-methylxanthine	-	44 µg / ml	-
L-Thyroxine	-	9 ng / ml	-
Ciglitazone	-	3 µg / ml	-
Heparine	90 µg / ml		

La figure 17 illustre le changement morphologique des HWPc d'un stade à un autre.



**Figure 17:** Observation microscopique du cycle de culture des HWP (G: 20X).

### III.5. Culture des cellules cancéreuses MCF7 et MDA-MB 231

Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco/ Vogt modified Eagle's minimal essential medium) fournie par Gmb biotech, supplémenté par 1% d'antibiotiques Streptomycines/Pénicilline et 10% du sérum de veau fœtale (SVF). Lors d'une première utilisation, le SVF a été décomplémenté suite à un chauffage au bain marie à 56°C pendant 30 minutes. Le surnageant a été conservé à -20°C.

### III.6. Culture des cellules mammaires épithéliales HME1

La lignée HME1 (LONZA) a été isolée à partir de l'épithélium de la glande mammaire d'une femme saine de 53 ans. Cette lignée a été modifiée génétiquement pour être immortalisée par le HTERT. Ces cellules ont été cultivées dans leur milieu MEBM supplémenté à 1% d'antibiotiques Streptomycines/Pénicilline et des additifs du kit.

## IV. Etude de l'effet des micropolluants sur la viabilité des cellules MCF7, MDA-MB 231, HME1

L'effet de bisphénol A (BPA), acide okadaïque (AO) et glyphosate (GLP) a été étudié sur la viabilité de quatre lignées cellulaires humaines.

Dans cette première partie, les cellules cancéreuses MCF7, MDA-MB 231 et les cellules épithéliales mammaire (HME1) ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits respectivement à des concentrations de 1000 cellules/ puits et 7000 cellules/puits pour les cellules cancéreuses. Après 24 h de culture dans les conditions normales, les cellules ont été traitées par les polluants seuls ou sous forme de cocktail. Les concentrations testées sont : BPA de  $10^{-6}$  à  $4.10^{-6}$ M ; GLP de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}$ M ; AO une seule concentration testée de  $10^{-9}$ M.

Le BPA et l'AO ont été dissous dans le DMSO et le GLP dans l'eau MilliQ.

La viabilité cellulaire a été mesurée via le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) (Mosmann, 1983). Il est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan formant un précipité violet dans les mitochondries. La quantité du formazan formée est donc proportionnelle à la viabilité cellulaire.

25µl de MTT (0,5%) ont été ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 4 h à 37°C, le milieu de culture a été retiré, 200µl de DMSO ont été ajoutés pour dissoudre le précipité de formazan pendant 5 minutes à 37°C. Le pourcentage de la viabilité cellulaire a été mesuré selon l'équation 1 après une mesure de la densité optique à 550 nm.

Chaque condition de culture a été testée sur 16 puits et les cellules contrôles ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules traitées (% DMSO).

$$(\%) \text{ la viabilité cellulaire} = \frac{\text{densité optique des cellules traitées}}{\text{densité optique des cellules contrôles}} * 100 \pm \text{écartype}$$

#### **IV.1. Mode d'action des polluants sur la viabilité cellulaire**

Trois approches ont été menées dans cette partie pour comprendre comment les polluants agissaient sur la viabilité cellulaire. L'électrophorèse bidimensionnelle, le dosage d'activité des protéines Tyrosine phosphatases et le dosage de polluants dans le milieu de culture.

##### **IV.1.1. Cartographie protéomique comparative d'expression de protéines issues de cellules traitées par les micropolluants**

La protéomique consiste en l'analyse de l'ensemble de protéines produit par une cellule en mesurant la variation d'expression de protéome dans des conditions de culture cellulaires données, à l'identification des types d'interactions entre protéine- protéine, à l'analyse post-traductionnelles des protéines. Le développement des analyses bio-informatique ainsi que spectrométriques a permis de rendre la protéomique plus facile à mener. L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) a été bien mise au point pour l'analyse de nos extraits protéiques.

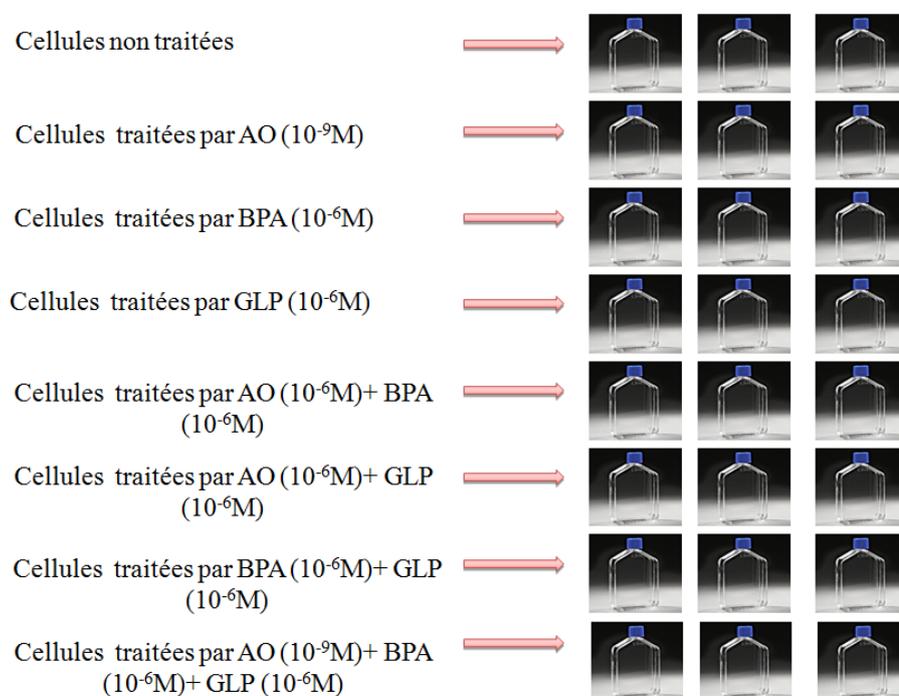
Cette approche repose sur deux étapes de séparation de protéines sur gel selon deux paramètres indépendants. Durant la première dimension, les protéines sont séparées selon leur pH isoélectrique sur des strips où le gel est à gradient de pH. Selon la seconde dimension, elles sont séparées selon leur masse par PAGE au sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). Cette approche présente une haute résolution.

La mise au point de ces deux étapes de séparation a été menée sur certains paramètres. Ces paramètres seront détaillés dans la partie suivante.

#### IV.1.1. Culture et incubation des cellules avec polluants pour l'analyse 2D

Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées dans les grandes flasques de 75 cm<sup>2</sup> afin d'avoir une quantité de protéines suffisante pour l'analyse du protéome. À 50% de confluence, les cellules ont été traitées par les polluants comme est indiqué sur la figure 18.

La durée d'incubation est de 72h. Des cellules contrôles ont été aussi mises en culture dans les mêmes conditions de culture que les cellules contrôles (3 flasques par condition de culture). 10 ml de milieu de culture ont été mis dans chaque flasque.



**Figure 18:** Culture et incubation des cellules avec les polluants pour l'analyse protéomique. Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup>. À 50% confluence, les cellules ont été incubées avec les polluants. AO (10<sup>-9</sup>M), BPA (10<sup>-6</sup>M), GLP (10<sup>-6</sup>M) seuls ou en mélange.

#### **IV.1.1.2. Extraction des protéines intracellulaires**

Après 72h d'incubation avec les polluants, les cellules adhérentes, ont été lavées deux fois par du tampon PBS (1X, 4°C) avant d'être gratter par les grattoirs dans 4 ml de PBS (4°C) et transférer dans des tubes flacons de 15ml. Une étape de centrifugation a été réalisée pendant 5 minutes à 1200g. Le culot cellulaire a été ainsi récupéré et resuspendu dans 1 ml de tampon de lyse (Tris HCL 10 mM pH 8.3, 1% CHAPS, 7M Urée, 2M Thio-urée, 1Mm EDTA) supplémenté en anti-protéases (80-6501-23, GE Healthcare).

La lyse cellulaire par le tampon a été couplée à une série de pipetage et refoulement. Après 10 minutes d'incubation dans la glace, le lysat cellulaire a été transféré dans des tubes eppendorf. Une centrifugation à 20.000g pendant 30 minutes (4°C) a été effectuée afin de récupérer le surnageant contenant la fraction cytosolique de protéines. La fraction membranaire était sous forme d'un film blanchâtre. Les extraits ont été ainsi conservé à -80°C.

La quantité en protéines des échantillons a été mesurée selon la méthode de Bradford (Sigma). 230µl du réactif de Bradford ont été ajouté à 25µl d'échantillon. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la densité optique a été mesurée à 595 nm.

#### **IV.1.1.3. Electrophorèse bidimensionnelle (2D)**

##### **IV.1.1.3.1. La première dimension**

500µg de protéines ont été précipités par le kit ReadyPrep 2D Cleanup (Bio-rad). Le culot protéique a été solubilisé dans 300µl de tampon de réhydratation (8M Urée, 2% Chaps, 50mM DTT, trace de bleu de Bromophénol, 2M Thio-urée) supplémenté par 0.5% Tampon IPG pH3-11 (GE Healthcare) et 0.2% Biolyte (Bio-rad). Les échantillons ont été maintenus sous agitation pendant 2 heures pour assurer une bonne solubilisation.

Les protéines solubilisées ont été coulées dans la cassette gouttière (Bio-Rad) et dessus ont été fixés les strips de 17 cm à pH non linéaire 3-10 (Biorad). Après une heure d'incubation à température ambiante, la réhydratation active a été maintenue à 50V durant une nuit tout en couvrant les strips avec 1 ml de l'huile minérale.

L'étape de focalisation a été lancée juste après l'étape de la réhydratation selon le programme illustré dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Programme de l'Iso-Electro-Focalisation (IEF)

Etape	Voltage	Gradient	Durée (HH : min)
1	250	Rapide	00.15
2	250	Graduel	00.15
3	500	Rapide	00.30
4	500	Graduel	00.30
5	8000	Rapide	07.30

Durant cette étape, un problème de résistance des strips au courant a été souvent observé. Cette résistance a été principalement due à une mauvaise solubilisation des extraits protéiques dans le tampon de réhydratation. L'ajout de la thio-urée à 2 M a assuré la solubilisation des protéines.

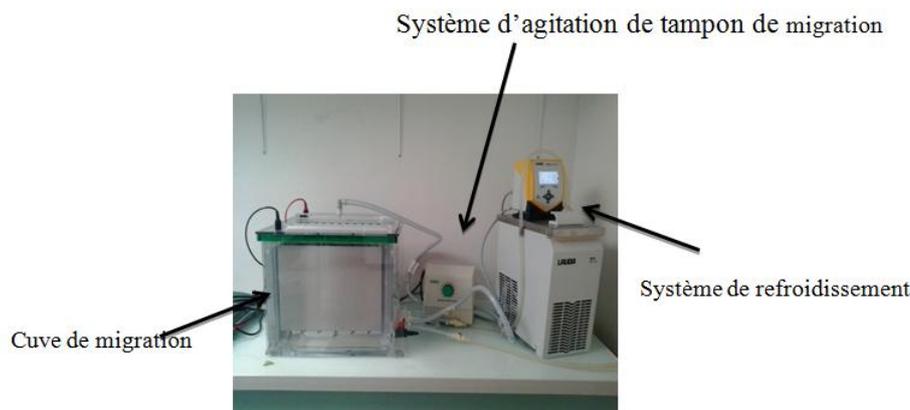
#### IV.1.1.3.2. Deuxième dimension

Après la première dimension, les strips ont été équilibrés deux fois dans 6 ml de tampon d'équilibration (6M Urée, 2% SDS, 0.375M Tris HCl pH 8.8, 20% glycerol) pendant 10 minutes, sous agitation. Le dithiothréitol (130mM) et l'iodoacétamide (135mM) ont été ajoutés respectivement au tampon d'équilibrations 1 et 2.

Une fois, équilibré, les strips ont été lavés dans le tampon de migration Tris-glycine 1X (Tris base, Glycine, SDS, pH8.8) avant d'être déposés sur les grands gels (22cm, 18 cm) à 11% Acrylamide- bisacrylamide.

1 ml d'Agarose à 1% (+ traces de bleu de Bromophénol) a été coulé sur les strips pour assurer leur fixation sur le gel d'Acrylamide ainsi enlever les bulles d'air.

La migration a été menée à 200V durant 13h à 20°C sous agitation du tampon de migration (cuve, générateur Biorad), la figure 19 présente le système de migration utilisée. Le bleu de coomassie (Thermofischer) a été utilisé pour la coloration des gels durant 48h. La décoloration a été effectuée aussi pendant 48h dans des bains d'eau distillée.



**Figure 19:** Système de migration de protéines adaptées pour les grands gels (Biorad). La migration a été maintenue à 15°C sous agitation de tampon pendant 12h.

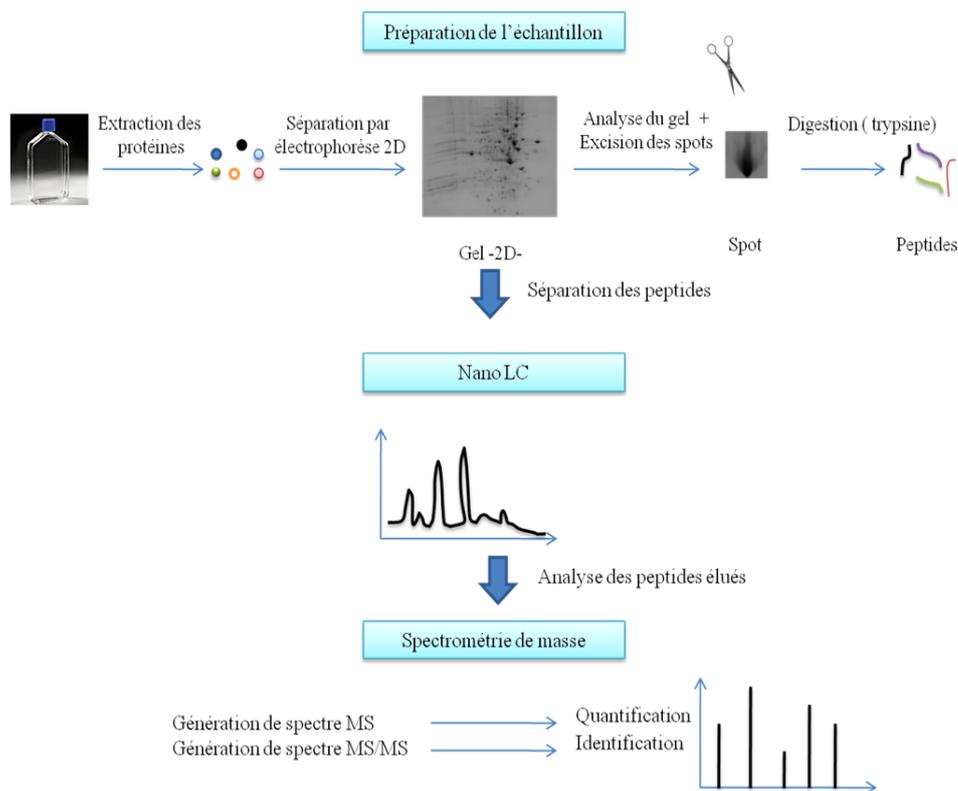
#### IV.1.1.3.3. Analyse des gels 2D

Après la décoloration, les images de gels ont été directement prises par le système Chemi-doc EZ system (Bio-rad). Bien couvert dans des sacs de congélation, les gels ont été conservés à 4°C.

L'analyse a été menée par le logiciel PDQuest (Bio-rad). La détection des spots sur les images a été faite automatiquement par le logiciel. Les spots présentant un taux d'expression deux fois plus ou deux fois moins par rapport aux mêmes spots présents sur les gels issus de cellules contrôles ont été sélectionnés pour identification. La présence d'un spot sur un gel n'ayant pas subi une modification d'expression a été prise comme un référent.

L'excision des spots d'intérêts a été faite manuellement. Ils ont été conservés dans de l'eau MilliQ à -20°C avant d'être analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'identification des spots a été réalisée au sein de la Plateforme Protéomique/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod après digestion à la trypsine. Le système et la masse peptidique obtenue ont été obtenus a été examiné par MASCOT.

La figure 20 illustre toutes les étapes pour l'analyse du profil protéomique des cellules.



**Figure 20:** Etapes d’analyse du profil protéomique des cellules par 2D couplée à MS/MALDI-TOF.

Les spots d’intérêts ont été identifiés après analyse des gels par PDQuest. L’excision a été suivie d’une identification par MS/MALDI-TOF.

#### IV.1.2. Analyse de l’expression de la protéine HSP70 par western blot

Les cellules MDA-MB 231 ont été traitées pendant 72h par BPA, GLP seuls ou en mélange. Les cellules ont été lavées deux fois et grattées dans le PBS. Le culot cellulaire récupéré après une centrifugation de 5 min à 1200 rpm a été resuspendu dans 1 ml de tampon de lyse (0,1 M de NaCl, 0,05 M de NaF, et 0,005 M d'EDTA, 1 X de Triton et 0,05 M de Tris (pH 7,5)) et de l'inhibiteur de protéase a été ajouté. Les cellules ont été incubées 30 minutes à 4°C suivie d’une centrifugation à 12 000 g pendant 30 min à 4 ° C. Le surnageant a été récupéré.

La concentration des protéines du lysat cellulaire a été déterminée par le test DC (Biorad). Les protéines totales (15 µg) de chaque échantillon de lysat de cellules ont été séparées sur 11% de SDS-PAGE, transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec du tampon de saturation (lait en poudre 10% dégraissé dans une solution salée tamponnée au Tris avec du Tween 20 (TBS-T)) pendant 1 h à température ambiante. Elles ont été ensuite incubées avec les anticorps primaires pour HSP70 et de bêta actines diluées dans une solution de saturation pendant une nuit à 4 ° C sous agitation. Après un lavage avec du TBST 1X, les

membranes ont été incubées pendant 1 h avec la peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à des anticorps secondaires pendant 1 h à température ambiante. Après lavage avec TBST 1X, 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de 500 µL de révélateur ont été ajoutés. Les signaux ont été quantifiés par le logiciel chemidoc (Biorad).

#### **IV.1.3. Dosage de l'activité des protéines phosphatases**

Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> et traitées par les polluants dans les mêmes conditions décrites que l'analyse protéomique.

Après 72h d'incubation, les protéines intracellulaires ont été extraites par le tampon de lyse cellulaire du kit pPNP sensolyte kit. Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford.

La mesure de l'activité de protéines phosphatases a été réalisée dans les plaques de 96 puits. Il s'agit d'une réaction colorimétrique durant laquelle le substrat pPNP est dégradé en PNP à 37°C. Ce dernier présente une coloration jaune ayant une absorption caractéristique à 405 nm.

40µg de l'extrait protéique issus de cellules traitées et contrôles, ont été utilisés comme enzyme réactionnelle. Après 30 minutes d'incubation à 37°C en présence du substrat pPNP (préparé selon le kit), la densité optique a été mesurée. L'activité spécifique (µmol/L.min .µg) a été ainsi mesurée en se référant à une gamme étalon du PNP.

#### **V. Méthodes de détection et de dosage de polluants**

Après avoir étudié l'effet des polluants sur l'expression de protéines intracellulaires ainsi que sur l'activité de protéines phosphatases, les analyses chromatographiques ont été mises au point pour la détection et le dosage de polluants dans le compartiment extracellulaire (milieu de culture) et intracellulaire (lysate cellulaire). Celles-ci ont été réalisées dans le but de comprendre si ces polluants agissaient par voie extracellulaire ou s'ils étaient capables de franchir la membrane cellulaire et de se stocker dans la cellule voir même de libérer des métabolites secondaires. Comme les trois polluants possèdent chacun des propriétés structurales propres (polarité, masse moléculaire), une méthode d'analyse chromatographique a été adaptée pour chacun.

Dans cette partie, les différentes lignées cellulaires ont été cultivées dans des plaques de 6 puits. A 80% de confluence, elles ont été traitées par les polluants seuls à des concentrations de 80.10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-4</sup>M, 10<sup>-9</sup>M respectivement pour BPA, GLP et AO.

### V.1. Détection et quantification du GLP dans le milieu de culture

Le GLP étant une substance très hydrophile, sa détection par les techniques chromatographiques s'avère être impossible. Souvent, la dérivation de cette molécule avec le 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC) a été la méthode la plus utilisée. Cette dérivation contribue à la formation d'un dérivé (FMOC-GLP) permettant de réduire la polarité et d'augmenter la rétention du GLP sur la colonne. L'inconvénient majeur de cette méthode est l'utilisation d'un détecteur à fluorescence. Pour résoudre ce problème, nous avons testé d'autres molécules pour la dérivation du GLP sans utiliser de détecteur de fluorescence.

Ainsi, une nouvelle dérivation a été mise au point dans notre laboratoire dans le cadre de ce projet. Cette méthode basée sur la dérivation du GLP sur sa fonction amine par le phénylthiocarbamyle (PITC) aboutissant à la formation du complexe PTC-GLP bien détectable sur la colonne. La figure 18 illustre la réaction de la dérivation.

#### V.1.1. Dérivation du GLP par le PITC:

La réaction de dérivation a été réalisée dans des tubes en verre de 400 $\mu$ l. Une gamme étalon de GLP a été préalablement préparée dans l'eau à partir d'une solution mère à 1mg/ml : de  $5 \cdot 10^{-6}$  à  $10^{-4}$  M.

10 $\mu$ l de chaque échantillon ont été placés dans les tubes en verre et ont été déshydratés sous vide jusqu'à 100mtor. Après la déshydratation, 10 $\mu$ l d'un mélange de Triéthylamine (TEA), Ethanol et Eau (2 :2 :1) ont été ajoutés aux échantillons. Après agitation, une deuxième déshydratation sous vide a été réalisée.

La réaction de dérivation a eu lieu à température ambiante en ajoutant 40 $\mu$ l d'un mélange de TEA, éthanol, eau et PITC (1 :7 :1 :1). Après 30 minutes d'incubation, une troisième étape de déshydratation sous vide a été effectuée pendant 2 heures à 65 millitorr.

Enfin, 200 $\mu$ l d'un mélange d'eau, éthanol (95% :5%) ont été ajoutés pour solubiliser le produit de la réaction de dérivation : PTC-GLP. Les échantillons ont été par la suite conservés à 4°C avant de procéder à l'analyse par UPLC.

### V.1.2. Détection et Quantification du complexe PTC-GLP :

La détection a été menée en utilisant l'UPLC couplée à la spectrométrie de masse d'ionisation électrospray (ESI) en mode négatif.

➤ Conditions de l'UPLC

L'UPLC H-Class (Waters, Milford, MA, USA) a été donc utilisé pour l'analyse des dérivés GLP-PTC. La séparation a été menée avec une ACQUITY UPLCr Protein BEH C4 (4.6\*150 mm) où la température de la colonne a été maintenue à 40°C.

La phase mobile utilisée est constituée d'eau 0.01% acide formique (solvant A) et de d'acétonitrile 0.01% acide formique (solvant B) avec un débit d'injection de 0.4 ml/min et un volume d'injection de 5µl. Les échantillons ont été placés dans une chambre à 7°C.

Le tableau 8 illustre le gradient de séparation utilisé.

**Tableau 8:** Gradient d'élution pour l'analyse des dérivés GLP-PTC.

temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
t= 0	100	0
t= 1	30	70
t= 4	30	70
t= 4.05	20	80
t= 6	20	80
t= 6.5	100	0
t= 10	100	0

➤ Conditions MS<sup>E</sup>

L'analyse MS a été menée avec un spectromètre de masse de type Xevo G2 S Q-TOF (Waters, Manchester, United Kingdom) équipé d'une source d'ionisation fonctionnant en mode électrospray (ESI, Waters, Manchester, United Kingdom) où sa température a été maintenue à 120°C, la température de dé solvation à 500°C et le débit du gaz est de 50L.h<sup>-1</sup>. La gamme de détection des ions a été fixée entre 150 et 1200 m/z.

L'analyse des données a été élaborée en mode négatif avec des chromatogrammes obtenus en mode centroïde. L'énergie de collision a été fixée à 6V en fonction type 1 et entre 20 à 30V en fonction de type 2.

La leucine enképhaline (MW = 555,62 Da) (1 ng.µL<sup>-1</sup>) a été utilisé comme un référent pour la correction de décalage de masse.

L'erreur de masse entre les ions parents et les fragments théoriques et expérimentaux a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Mass Error} = \left( \left| \text{experimental } \frac{m}{z} - \text{theoretical } \frac{m}{z} \right| \div \text{theoretical } \frac{m}{z} \right) \times 10^6 \text{ (ppm)}$$

#### V.1.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés à 400 MHz sur un spectromètre JEOL JNM-LA 400 à 25°C dans des tubes de 5 mm de diamètre. La sonde utilisée est une sonde liquide multi-noyau équipée d'une bobine de gradients de champs sur l'axe z. Les échantillons ont été solubilisés dans de l'acétone D6 avant d'effectuer les séquences suivantes : <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMQC.

#### V.1.5. Validation de la méthode de dérivation

La méthode de dérivation a été testée pour la détection et le dosage du GLP dans un milieu biologique à structure complexe tel que le cas du milieu de culture des cellules étudiées dans ce projet.

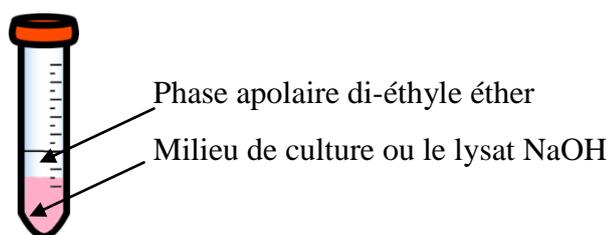
Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées dans des plaques de 6 puits. A 70% de confluence, les cellules ont été traitées par le GLP à une concentration de 10<sup>-4</sup>M. Après 0h, 6h et 24h d'incubation, 1 ml de milieu de culture a été collecté. La réaction de dérivation du GLP ainsi que l'analyse par UPLC couplé à la spectrométrie de masse ont été menée comme a été décrit précédemment. Le milieu de culture des cellules contrôles a été utilisé comme un témoin négatif.

La mesure de l'aire du pic relatif au complexe PTC-GTP a été réalisée par le logiciel MassLynx® ( extraction d'ions et intégration ).

## V.2. Détection et quantification du BPA dans le milieu de culture

Après 6h et 24h d'incubation avec BPA à  $80.10^{-6}M$ , le milieu de culture a été récupéré et la lyse cellulaire a été faite suite à un grattage des cellules dans une solution de NaOH à 1M pour extraire les métabolites intracellulaires.

Une solution de di-éthyl-ether (V/V) a été utilisée pour l'extraction du BPA (Fig. 21). Après 20 minutes d'agitation à une vitesse de 600g, la phase apolaire a été récupérée et filtrée avant l'analyse chromatographique.



**Figure 21:** Extraction du BPA à partir du milieu de culture par di-éthyle éther.

Cette analyse a été conduite sur la chromatographie liquide à haute performance (UPLC-ACQUITY) en utilisant une détection UV à 280nm par un détecteur PDA. Ce dernier présente l'avantage de détection de molécules à très faible doses. La colonne utilisée est une C18 (2.1mm\*50mm, 1.7 $\mu$ m) avec un débit d'injection de 0.5 ml et un volume d'injection de 10 $\mu$ l. L'eau (Eluant A) et l'Acétonitrile (Eluant B) ont été utilisés comme phase mobile.

Le gradient optimisé d'élution de BPA est présenté dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Gradient d'élution appliqué à la détection du BPA.

Temps en minutes	Eluant A (%)	Eluant B (%)
0	100	0
10	50	50
15	100	0

La détection du pic relatif au BPA a été confirmée par la dérivée seconde du pic. Des extraits intracellulaires et extracellulaires issus de cellules contrôles ont été utilisés dans le but de comparer les spectres issus de 2 conditions de culture (+/- BPA) comme étant un contrôle.

Le pic relatif au BPA a été identifié en procédant à sa dérivée seconde c'est-à-dire en transformant le spectre d'absorption du bisphénol A en spectre de dérivée seconde. Il s'agit donc d'un enregistrement du gradient de l'absorbance ( $A$ ) par rapport à la longueur d'onde ( $\lambda$ ). Le rapport ( $dA/d\lambda$ ) reste proportionnelle à la concentration. Cette intégration a été réalisée par le logiciel Empower (extraction et intégration du pic relatif au BPA).

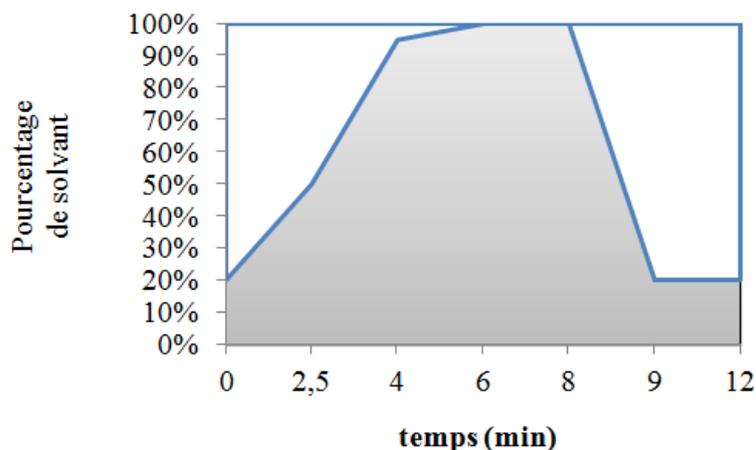
Une gamme étalon de bisphénol A a été également préparée dans le milieu de culture suivie d'une extraction au di-éthyle éther.

### **V.3. Détection et Quantification de l'AO par UPLC/MS<sup>E</sup>**

Les cellules ont été incubées avec l'AO à une concentration de  $10^{-9}$ M ( $t_0$ ). Un prélèvement du milieu de culture à 6h et 24h a été réalisé pour doser l'AO. Ainsi, nous avons préparé une gamme étalon de l'AO de 0,62 nM à 15,5 nM préparée dans le milieu de culture adéquat pour chaque lignée.

Sa détection dans le milieu de culture a été dirigée avec spectrométrie de masse Xevo G2 S Q-TOF (Waters, Manchester, United Kingdom) menée d'une source d'ionisation electrospray (ESI; Waters, Manchester, United Kingdom). La colonne utilisée est une C 18 ( $1.7\mu\text{m} \times 2.1\mu\text{m} \times 50$  mm) avec une phase mobile constitué de l'eau (solvant A) et l'acétonitrile (solvant B) supplémenté chacun à 0.01% d'acide formique. Le débit d'injection est de 0.4ml/min avec une température de la colonne maintenue à 25°C. La figure 22 illustre le gradient d'élution utilisé pour la détection de l'AO.

Nous avons ainsi injecté les échantillons de la gamme étalon (0,62 nM à 15,5 nM), les prélèvements  $t_0$ ,  $t_6h$  et  $t_{24h}$  pour sa quantification en fonction du temps. 5 injections ont été analysées pour chaque échantillon.



**Figure 22:** Gradient d'élution d'AO par UPLC/MS.

## VI. Effets des polluants sur l'adipogénèse

### VI.1. Influence des polluants sur la viabilité de la lignée HWP à différents stades de maturation

Les préadipocytes humains blancs (HWPC) ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits respectivement à des concentrations de 5000 cellules/puits. Après 24 h de culture dans les conditions normales, les cellules ont été traitées par les polluants seuls ou sous forme de cocktail. Les concentrations testées sont : BPA de  $10^{-6}$  à  $4.10^{-6}$ M ; GLP de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}$ M ; AO une concentration testée de  $10^{-9}$ M. La viabilité cellulaire a été mesurée par le Test MTT après 24h et 72h d'incubation. Cette expérimentation est limitée au stade de préadipocyte.

Pour le stade de différenciation, les HWPC ont été cultivées dans des plaques de 96 puits sans incubations avec les polluants. Une fois à confluence, la différenciation a été induite par le milieu de différenciation avec les polluants. La viabilité cellulaire des adipocytes a été mesurée par le test MTT après 3,4 et 9 jours d'incubation.

## **VI.2. Influence des polluants sur la lipogenèse**

Les préadipocytes ont été cultivées dans des plaques de 6 puits à raison de  $10^5$  cellules/ puits. A confluence (J0), les cellules ont été traitées par les polluants du J4 au J22 du stade de la différenciation.

La quantité du gras stockée dans les adipocytes matures a été mesurée suite à une coloration à l'huile rouge. Il s'agit d'un colorant capable de se fixer sur la matière grasse présentant une absorbance caractéristique à une longueur d'onde de 540nm.

0.3g de poudre Oil Red O (Sigma Aldrich) ont été solubilisés dans 100 ml d'isopropanol. Cette solution est la solution mère. A partir de cette solution, une solution de travail a été préparée dans l'eau (6/4). La solution de travail a été par la suite filtrée (filtres de 22 $\mu$ m) et conservé à 4°C.

Après incubation des adipocytes avec les polluants, le milieu de nutrition a été retiré, et les adipocytes chargés en gras ont subi deux étapes de lavage par le PBS. Les cellules ont été fixées pendant une heure par 10% de formaldéhyde dilué dans le PBS. Après l'étape de la fixation, les cellules ont été lavées deux fois par l'eau avant d'être incubé 5 minutes dans une solution d'isopropanol à 60% dilué dans l'eau.

200 $\mu$ l de la solution de travail ont été ensuite ajoutées sur les cellules pour la coloration de la matière grasse. Après 20 minutes, l'huile rouge non fixé a été enlevé et les cellules ont été lavées 3 fois par l'eau pour enlever les traces de l'huile rouge non fixé. Des observations microscopiques ont été faites pour s'assurer de la bonne fixation de l'huile rouge.

250  $\mu$ l d'isopropanol 100% ont été ajoutées dans chaque puits pour la solubilisation de l'huile rouge fixé. Les plaques ont été mises sur un agitateur pendant 10 minutes favorisant la dissolution de l'huile rouge.

La densité optique a été ainsi mesurée à 540 nm.

### VI.3. Influence des polluants sur l'expression des marqueurs de la différenciation

La RT-QPCR a été menée afin d'étudier l'influence des polluants sur l'expression des marqueurs adipogéniques. 3 marqueurs ont été choisis : PPAR $\gamma$ , LPL et AP2.

Les adipocytes ont été traités par les polluants du J4 au J11 de la différenciation. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le Kit ARN nucleospin II (Macherey- Nagel, Düren, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Les échantillons d'ARN ont été traités par le kit Ambion sans ADN (Life Technologies, Carlsbad, États-Unis) pour la digestion de l'ADN.

L'ARN a été quantifié à 260 nm en utilisant un NanoDrop 2000 UV -Vis spec-trophotomètre (Thermo Scientific, États-Unis).

La réverse transcription de l'ARN (250 ng) a été réalisée avec le kit cloned AMV first strand synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) avec des amorces primaires aléatoires selon les instructions du fournisseur.

La PCR en temps réel a ensuite été réalisée sur les échantillons de l'ADNc pour évaluer l'expression de l'ARN m des gènes humains PPAR- $\gamma$ , aP2 et LPL. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme une référence endogène.

La réaction PCR a été réalisée dans un système Mx3000P en temps réel (Stratagene, La Jolla, CA, USA) en utilisant le kit du SYBR Green brillant ultra Fast III (Applied Biosystems) avec un volume final de 20 $\mu$ l. Les conditions de la PCR sont : 1 cycle à 95°C pendant 3 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 10 s et 60°C pendant 20s. Chaque réaction a été réalisée en duplicat avec 5  $\mu$ l de l'ADNc (dilué 10 fois) et 15  $\mu$ l du Mix de SYBER Green avec une concentration en amorces primaires spécifique de gènes de 400nM.

Les amorces ont été validées par des tests d'efficacité PCR en utilisant des courbes standard ( $95\% \leq \text{Efficacité} \leq 105\%$ ). La spécificité du produit de la PCR a été évaluée en générant une courbe de dissociation suivante les recommandations du fournisseur. Le tableau 10 illustre la séquence des amorces utilisées.

**Tableau 10:** Séquences des amorces primaires

Amorces	Séquences (5' vers 3')
PPAR $\gamma$ - R	GGCGGTCTCCACTGAGAATA
PPAR $\gamma$ - F	GAGCCAAGTTTGAGTTTGC
LPL-R	CTGGCATTGCAGGAAGTCTG
LPL-F	GCATCATCAGGAGAAAGACGA
aP 2-R	TCTCTTTATGGTGGTTGATTTT
aP 2-F	CAGTGTGAATGGGGATGTG
H1 $\beta$ - actin –F	ATCTCTTCCAGCCTTCCTTCC
H1 $\beta$ - actin –R	CGTACAGGTCTTTGCGGATG

## VII. Etude de l'effet du sécrétome des préadipocytes sur la viabilité des cellules cancéreuses

La caractérisation de l'interaction entre les cellules cancéreuses et les préadipocytes a été étudiée en exposant les cellules cancéreuses aux sécrétions des HWP.

Dans une première partie, les préadipocytes ont été cultivés dans un gradient de milieux : croissance /DMEM. Nous avons procédé au changement de milieu de culture chaque deux jours en augmentant le pourcentage de DMEM à chaque fois comme indiqué sur le tableau 11. Ceci a été mené dans le but d'étudier l'interaction entre les deux lignées dans le même milieu de culture.

**Tableau 11:** Gradient de culture de HWP en milieux : croissance/DMEM

% de milieu de croissance	% de milieu DMEM
100	0
70	30
50	50
10	90
0	100

## *Chapitre II : Matériel et méthodes*

Dans une deuxième partie, nous avons cultivé les cellules cancéreuses dans le milieu de croissance. Pour étudier l'interaction, les HWP ont été cultivées dans des plaques de 96 puits (5000 cellules/puits). Après 24h de culture normale, elles étaient incubées avec les polluants. Également, nous avons gardé une condition de culture sans incubation. Parallèlement, nous avons cultivé les cellules cancéreuses dans des plaques de 96 puits (5000 cellules/puits). Après 24h de culture, le sécrétome des HWP a été récupéré et utilisé comme milieu de culture pour les cellules cancéreuses. La viabilité cellulaire des cellules cancéreuses a été mesurée après 24h et 72h d'incubation avec sécrétome HWP.

## ***CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION***

***Partie 1 : Etude de l'effet des polluants seuls ou en mélange sur la  
viabilité cellulaire***

## **I. Influence des polluants sur la viabilité cellulaire**

Au cours de cette expérimentation, nous avons étudié l'effet du BPA, GLP et AO seuls ou en mélange sur la viabilité des lignées cellulaires cancéreuses MCF7, MDA-MB 231 et d'une lignée saine HME1. Le test MTT a été utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire après 24h et 72h d'incubation. La significativité a été évaluée par le test t-student (origin 6) par rapport aux cellules contrôles (contrôle).

### **I.1. Influence des polluants sur la viabilité des cellules cancéreuses**

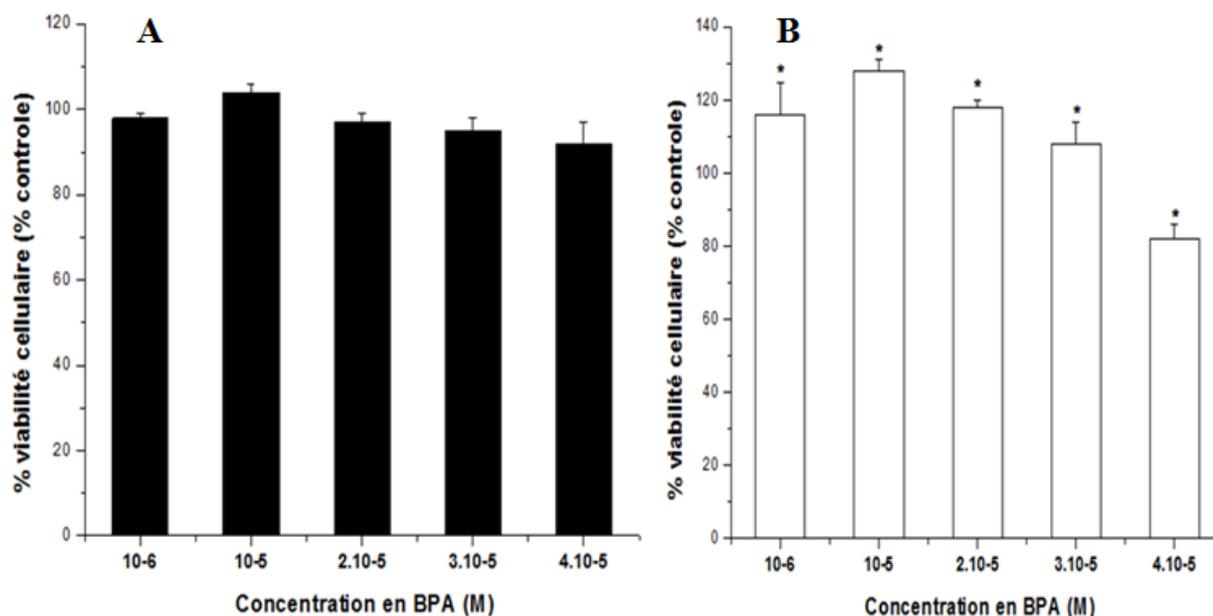
#### **I.1.1. Lignée cancéreuse MCF7**

##### **I.1.1.1. Effet du BPA sur la viabilité cellulaire**

La viabilité cellulaire des cellules MCF7 incubées avec BPA de  $10^{-6}$  à  $4.10^{-5}$  M est présentée figure 25. Après 24 h d'incubation (Fig. 23-A), aucune différence significative n'est observée entre la viabilité des cellules traitées et celle « contrôles » et ce, quelles que soient les concentrations testées.

En revanche, après 72h d'incubation (Fig. 23-B), le BPA semble stimuler la viabilité cellulaire : une augmentation significative est observée. Le pourcentage de la viabilité cellulaire était de 116% ( $\pm 9$ ) et 128% ( $\pm 3$ ) à des concentrations respectives en BPA de  $10^{-6}$ M et  $10^{-5}$ M. Ce résultat a déjà été obtenu lors des travaux de Wei Zhang et al (2012). Le BPA activerait l'expression de l'oncogène de STAT-3 et augmenterait ainsi la prolifération de la lignée MCF7 (Zhang et al., 2012).

Toutefois, à la plus forte concentration testée ( $4.10^{-5}$ M), une diminution significative de la viabilité des cellules MCF7 est observée. Le BPA exercerait cette fois un effet cytotoxique avec un pourcentage de mortalité de 20% ( $\pm 4$ ). Ce résultat est une fois de plus en accord avec la littérature. Il a été déjà montré qu'à forte concentration, le BPA présente un effet génotoxique en induisant des cassures au niveau de l'ADN.



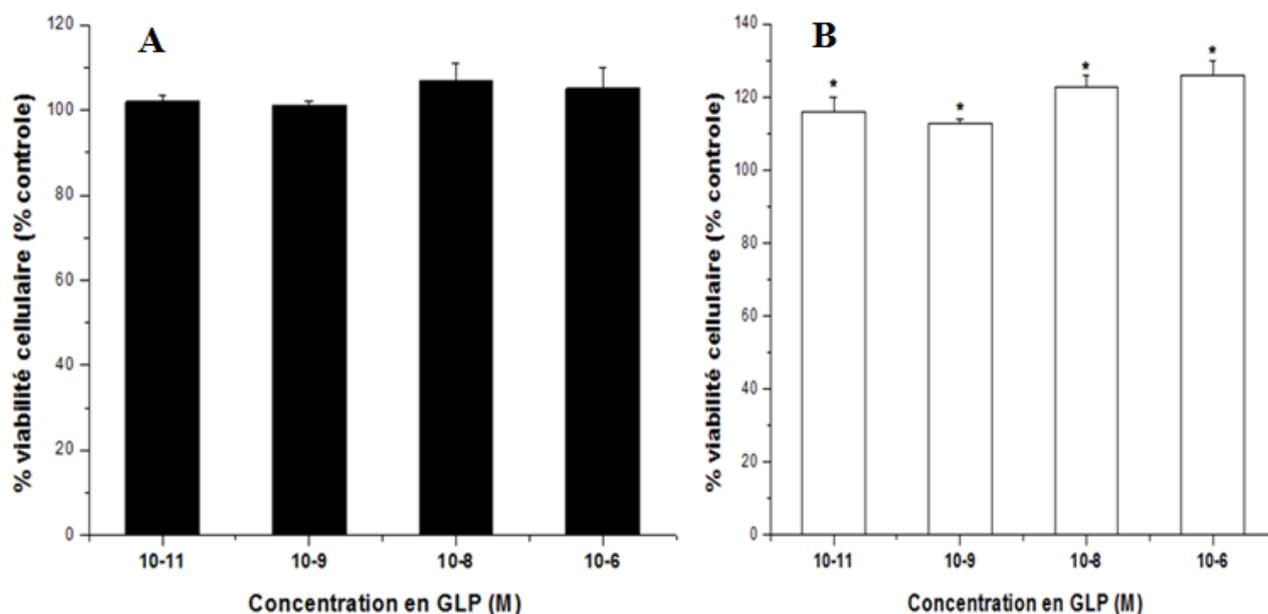
**Figure 23:** Effet du BPA sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

#### I.1.1.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules MCF7 ne semble pas être affectée par le GLP à des concentrations de  $10^{-11}$ M à  $10^{-6}$ M après 24h d'incubation (Fig.24-A). Aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles. Toutefois, après 72h d'incubation, le GLP semble stimuler leur viabilité. Elle augmente de 116% ( $\pm 4$ ) à 126% ( $\pm 3$ ) pour des concentrations en GLP respectivement de  $10^{-11}$  et  $10^{-6}$ M (Fig. 24-B). L'effet observé dépendrait donc de la dose de GLP à laquelle les cellules sont exposées.

Un résultat similaire a été obtenu avec la lignée de cancer du sein T47D. Le GLP stimulait la prolifération des cellules dans la gamme de concentration testée au cours de nos travaux. Les auteurs ont montré que cet effet était dépendant de la voie du RE- $\alpha$  (Thongprakaisang et al., 2013). La lignée MCF7 étant RE+, cela pourrait expliquer nos résultats.



**Figure 24:** Effet du GLP sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

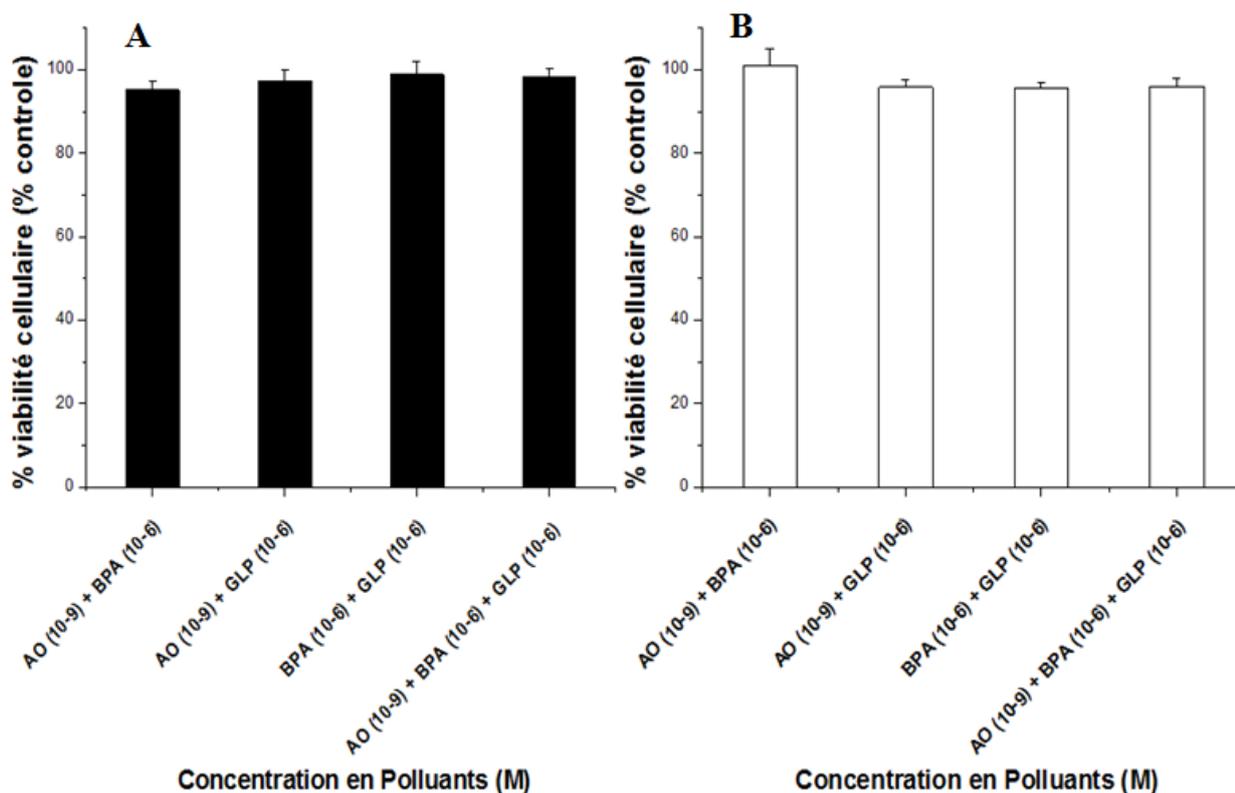
#### I.1.1.3. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire

L'AO ne semble pas exercer un effet sur la viabilité des cellules MCF7 à une concentration de  $10^{-9}$ M après 24h et 72h d'incubation. La viabilité cellulaire reste sensiblement proche de celle des cellules contrôles avec des valeurs respectives de 100% ( $\pm 5$ ) et 102% ( $\pm 7$ ) (résultats non présentés).

#### I.1.1.4. Effet de mélange de polluants sur la viabilité cellulaire

Les cellules MCF7 ont été ensuite exposées à un mélange de 2 ou 3 polluants afin d'évaluer l'effet combiné de polluants sur leur viabilité. Les concentrations finales dans le milieu de culture sont  $10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M et  $10^{-9}$  M respectivement pour le BPA, le GLP et l'AO. Nous avons délibérément choisi d'étudier les concentrations toxiques les plus faibles.

Les résultats obtenus sont présentés figure 25. La viabilité des cellules MCF7 ne semble pas être affectée quels que soient les mélanges testés. En effet, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux cellules contrôles et ce, indépendamment de la durée d'exposition aux polluants.



**Figure 25:** Effet de mélange de polluants sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

Les résultats obtenus montrent que les cellules MCF7 ne réagissent pas de la même manière si elles sont exposées à un seul polluant ou bien à plusieurs. L'incubation pendant 72h des cellules MCF7 par le BPA ou le GLP entraînait une augmentation de la viabilité cellulaire (Fig. 23-B ; Fig. 24-B), alors que l'incubation des cellules avec le mélange de ces polluants BPA et GLP ne présente aucun effet sur la viabilité cellulaire (Fig. 25-B). L'effet combiné de ces polluants ne serait ni additif ni synergique. En présence d'AO combiné avec BPA ou GLP, la viabilité cellulaire semble être sensiblement réduite par rapport à l'incubation avec BPA ou le GLP seuls. En effet, elle passe de 116% ( $\pm 9$ ) à 101% ( $\pm 4,5$ ) respectivement après 72 h d'incubation avec BPA seul et BPA combiné à l'AO.

Ces résultats suggèrent que l'AO réduit l'effet nocif du BPA ou du GLP sur la viabilité de la lignée MCF7. Il rendrait efficaces certaines voies de signalisation perturbées par le BPA et le GLP.

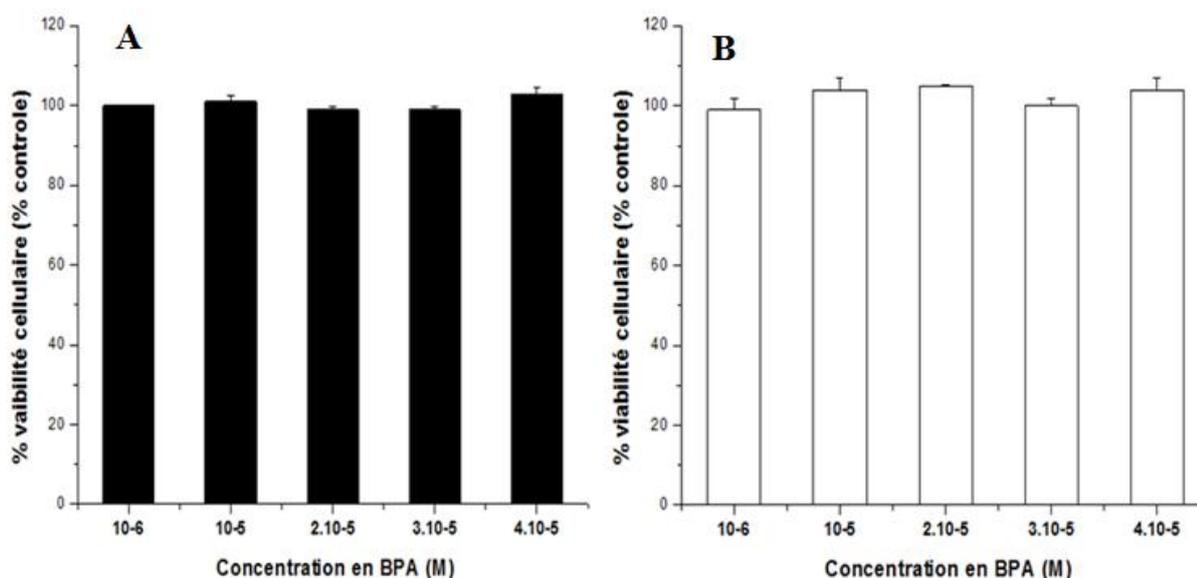
Ceci a déjà été observé lors de l'incubation de cellules MCF7. En contact avec le BPA seul, celui-ci stimulerait l'expression du RE- $\alpha$  alors qu'une co-incubation BPA-génistéine annule l'oestrogénicité du BPA en inhibant l'expression de l'ARNm du RE- $\alpha$ . Il a été suggéré que l'activation du RE- $\alpha$  par le facteur de croissance insulinique (IGF) par le BPA était inhibée par la génistéine (Hwang et al., 2013).

Une exposition simultanée de la lignée MCF7 aux polluants modifie donc la réponse cellulaire par rapport à celle observée lors d'une exposition à un seul polluant qu'il soit le BPA ou le GLP.

### I.1.2. Lignée cancéreuse MDA-MB 231

#### I.1.2.1. Effet du BPA sur la viabilité cellulaire

Les résultats de viabilité mesurés après une incubation des cellules de la lignée MDA-MB 231 avec le BPA sont présentés figure 26. Aucun effet significatif n'a été observé après une incubation de 24h et 72h. La viabilité cellulaire est restée sensiblement proche de celle des cellules contrôles et ce, quelles que soient les concentrations testées. Par exemple, à une concentration de  $10^{-6}$  M, la viabilité des cellules MDA-MB 231 est de 100,2% ( $\pm 4,6$ ) et 99% ( $\pm 3$ ) respectivement après 24h (Fig. 26-A) et 72h (Fig. 26-B) d'incubation. Le BPA ne semble pas avoir d'effet sur la viabilité cellulaire.



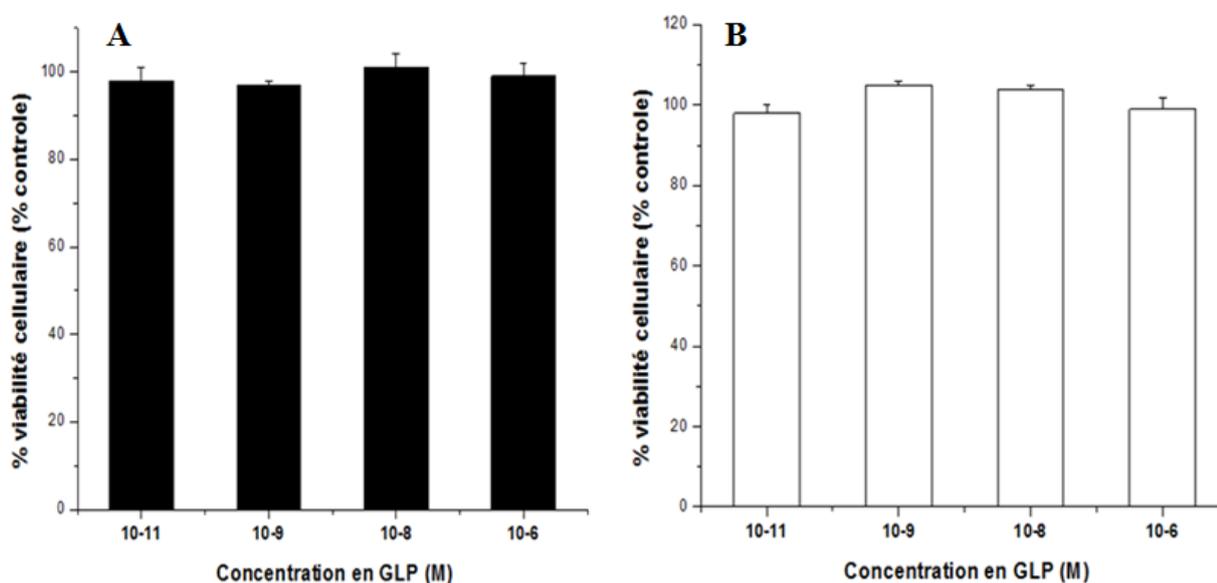
**Figure 26:** Effet du BPA sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

### I.1.2.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire

Comme le montre la figure 27, la lignée MDA-MB 231 incubée 24h et 72 h avec le GLP ne voit pas sa viabilité cellulaire affectée. Aucun effet significatif n'a été observé avec les différentes concentrations testées. La viabilité cellulaire reste, là aussi, sensiblement proche de celle des cellules contrôles. Par exemple, après 24h (Fig. 27-A) et 72h (Fig. 27-B) d'incubation avec GLP à  $10^{-6}$ M, la viabilité cellulaire est respectivement de 98% ( $\pm 3,2$ ) et 99% ( $\pm 2,9$ ).

Un résultat similaire a été obtenu lors des travaux de Thongprakaisang et al. (Thongprakaisang et al., 2013). Ces auteurs ont montré que le GLP n'affectait pas la viabilité des cellules MDA-MB 231 puisqu'il agissait via la voie RE et que les cellules de la lignée MDA-MB 231 sont RE-.



**Figure 27:** Effet du GLP sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

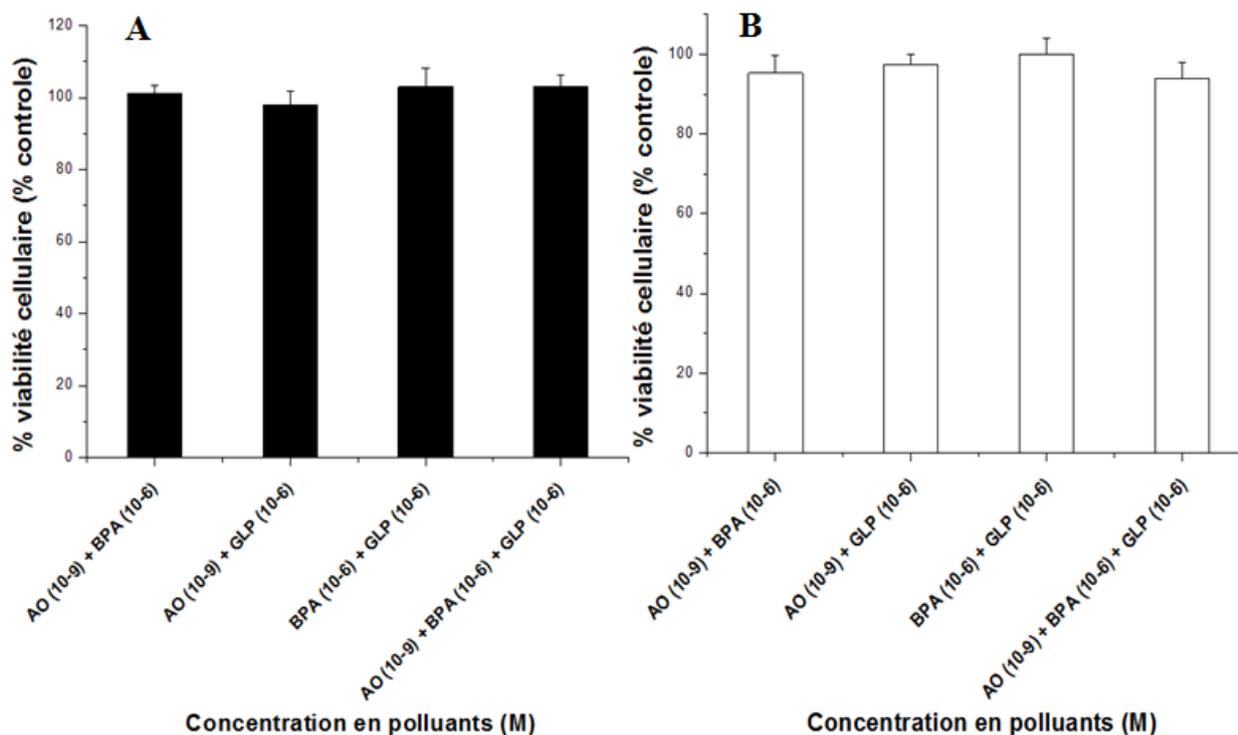
La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

### I.1.2.3. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire

Comme observé pour les cellules de la lignée MCF7, l'AO ne semble ne pas avoir un effet sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 à une concentration de  $10^{-9}$ M. En effet, le pourcentage de la viabilité cellulaire est de 99% ( $\pm 4,8$ ) et de 100% ( $\pm 2,3$ ) respectivement après 24h et 72h d'incubation, ce qui est sensiblement proche des cellules contrôles.

#### I.1.2.4. Effet de mélange de polluants sur la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules MDA-MB 231 exposées 24h et 72h à un mélange de polluants a été mesurée et est présenté figure 28. L'incubation des cellules avec les polluants n'affecte pas leur viabilité cellulaire. Aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles et ce, quels que soient les mélanges de polluants testés et le temps d'exposition.



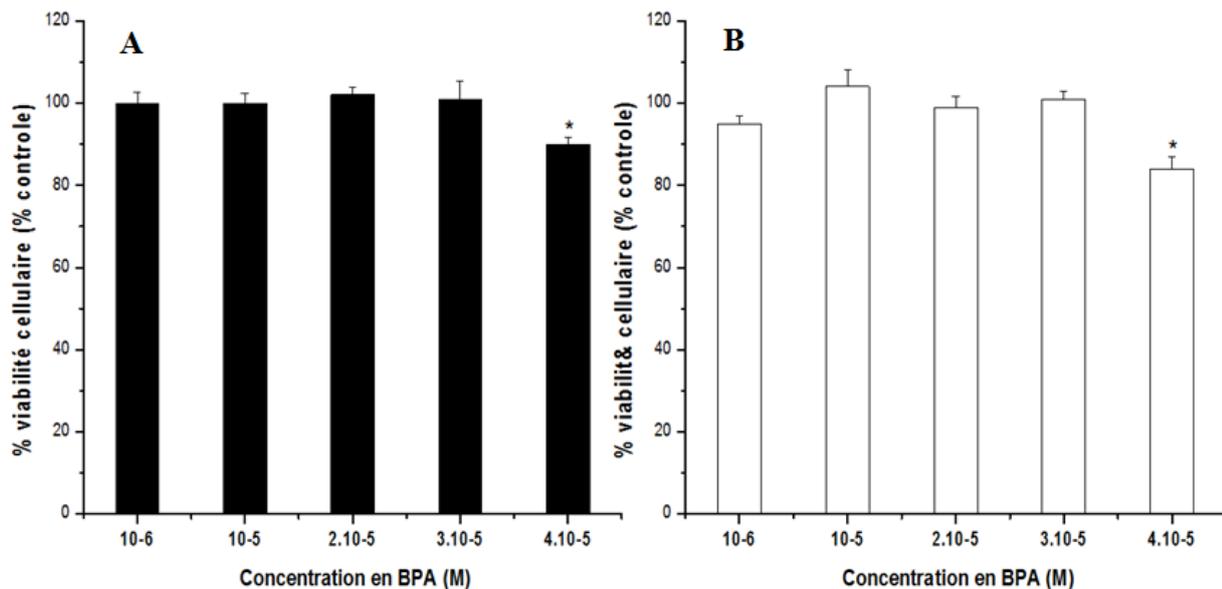
**Figure 28:** Effet de mélanges de polluants sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM),  $n=16$  répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p<0,01$ ).

## I.2. Incidence des polluants sur la lignée saine HME1

### I.2.1. Effet du BPA sur la viabilité cellulaire

L'incubation de la lignée HME1 avec le BPA de  $10^{-6}$  à  $3.10^{-5}$  M semble ne pas avoir affecté sa viabilité cellulaire. La figure 29 montre qu'après 24h (Fig. 29-A) et 72h (Fig. 29-B), aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles. Cependant, à la plus forte concentration testée ( $4.10^{-5}$  M) le BPA semble diminuer la viabilité cellulaire. Le pourcentage de viabilité cellulaire diminue significativement de 90% ( $\pm 1,54$ ) à 84% ( $\pm 2,95$ ) respectivement après 24h et 72h d'incubation.

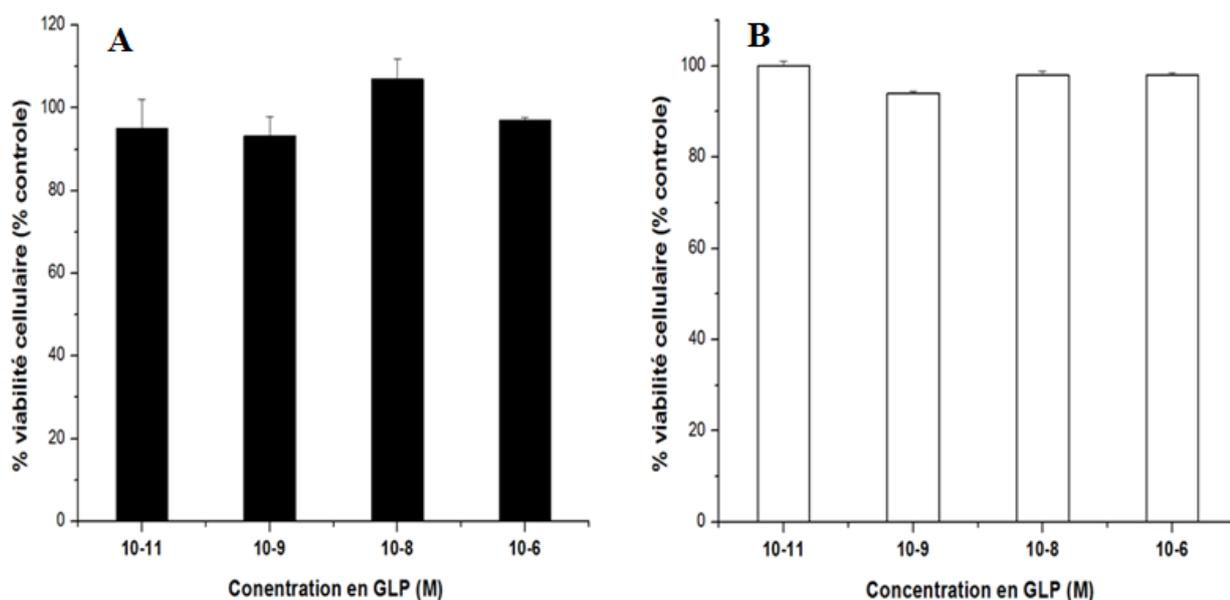


**Figure 29:** Effet du BPA sur la viabilité de la lignée HME 1 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

### I.2.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire

La figure 30 présente l'incidence d'une incubation des cellules HME1 après 24h (Fig. 30-A) et 72h (Fig. 30-B) avec  $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M de GLP sur la viabilité cellulaire. Le GLP n'exerce aucun effet sur la viabilité cellulaire. En effet, aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles et ce, quels que soient les concentrations testées.



**Figure 30: Effet du GLP sur la viabilité de la lignée HME1 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.**

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

### I.2.3. Effet de l'AO sur la viabilité des cellules HME1

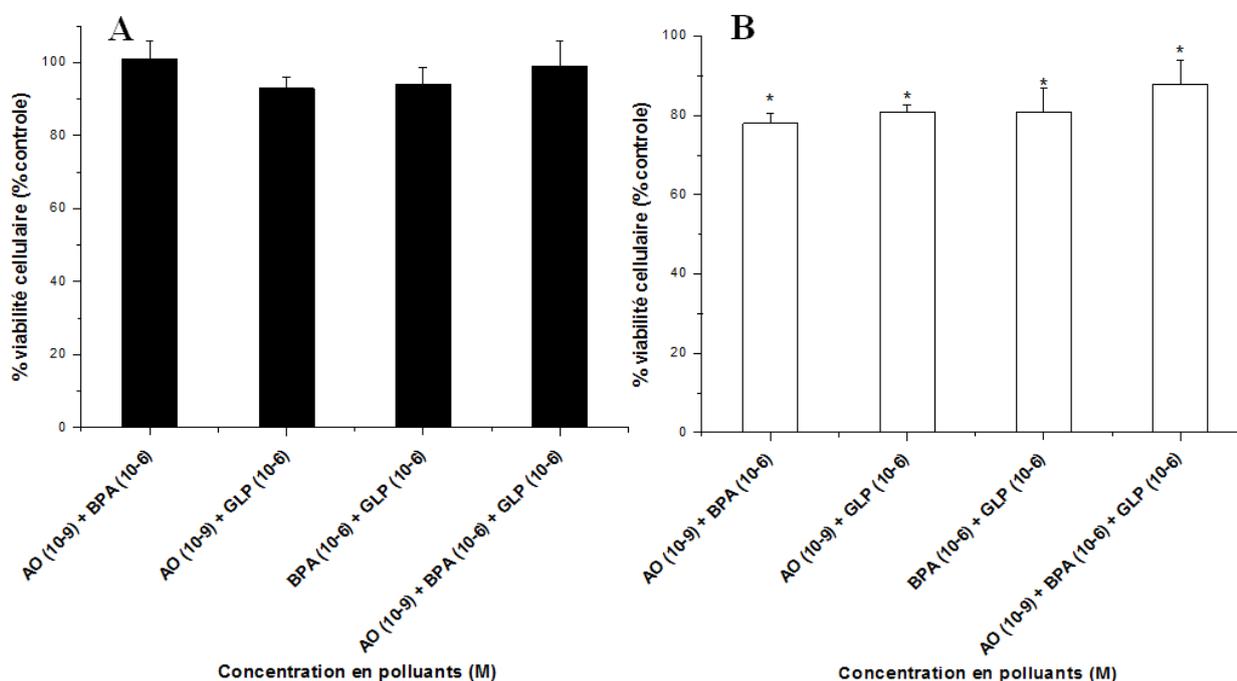
La viabilité des HME1 exposées à une concentration de 10<sup>-9</sup>M d'AO a été évaluée après 24h et 72h d'incubation (données non présentées). L'AO ne semble pas avoir un effet sur la viabilité de la lignée HME1. En effet, le pourcentage de la viabilité des cellules HME1 est de 93,5% ( $\pm 1,19$ ) et de 99% ( $\pm 5,9$ ).

### I.2.4. Effet de mélange de polluants sur la viabilité des cellules HME1

La viabilité des HME1 exposées à des combinaisons de polluants a été mesurée après 24 et 72h d'exposition. Les résultats sont présentés figure 31. Un mélange de deux ou trois polluants n'exerce aucun effet sur la viabilité de la lignée HM1 après 24h d'incubation. En effet, aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles (Fig. 31-A).

Cependant, après 72h d'incubation (Fig. 31-B), une diminution significative de la viabilité cellulaire est observée. Ceci est valable pour les quatre mélanges testés. Cette diminution est de 21% ( $\pm 2,5$ ), 18% ( $\pm 1,6$ ) et 18% ( $\pm 5,8$ ) respectivement après des incubations avec AO + BPA, GLP + AO et BPA + GLP. Elle n'a diminué que de 11,9 % ( $\pm 6$ ) en présence du mélange de 3 polluants ce qui est une diminution significative par rapport aux cellules contrôles.

Ainsi, combinés, BPA, GLP et AO présentent un effet antiprolifératif sur la lignée saine HME1. Cet effet n'est pas observé lorsque cette lignée est incubée avec un seul polluant.



**Figure 31:** Effet de mélange de polluants sur la viabilité de la lignée HME1 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

Dans cette première partie, nous avons étudié l'effet de GLP, BPA et AO seuls ou combinés sur la viabilité des cellules cancéreuses MCF7, MDA-MB 231 respectivement  $RE\alpha^+$  et  $RE\alpha^-$ . Une lignée saine, nous servant de témoin, HME1  $RE\alpha^-$ , a été également exposée. Le test MTT a permis d'évaluer la viabilité des cellules après 24h et 72h d'incubation avec les polluants.

Nos résultats ont montré que l'effet des polluants était dépendant de la lignée cellulaire et de la présence du RE. En effet, une augmentation de la viabilité cellulaire semble être provoquée par le BPA et le GLP uniquement sur la lignée MCF7, hormono-dépendante. Cette augmentation n'est pas observée sur les lignées MDA-MB 231 et HME1 n'exprimant pas le  $RE-\alpha$ . Le BPA, mais également le GLP semblent donc se comporter comme des perturbateurs endocriniens. Ils agiraient à travers un mécanisme dépendant du RE et stimuleraient la viabilité cellulaire.

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

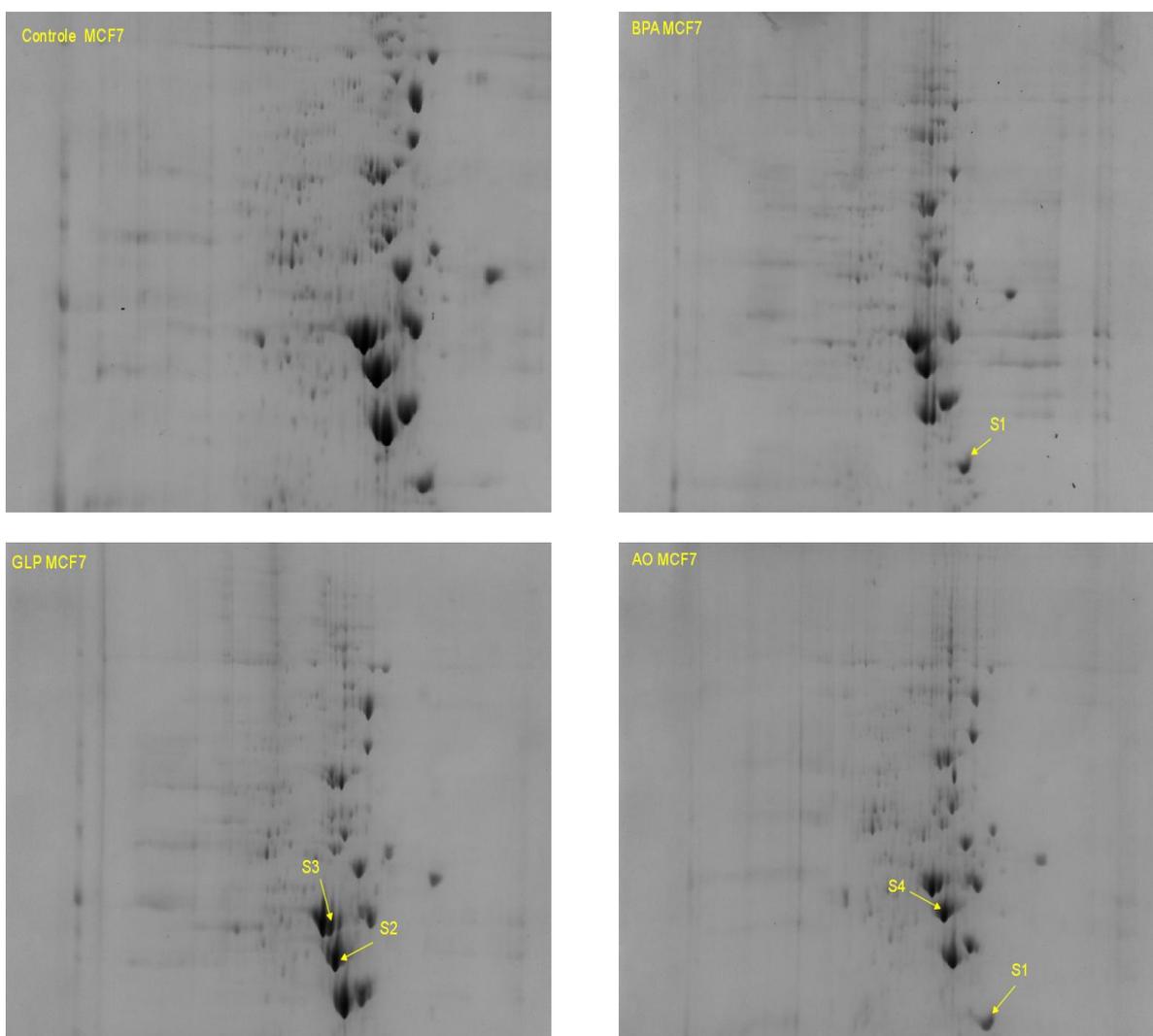
L'effet combiné de polluants engendre des effets différents d'une exposition à un seul polluant. Nous avons observé que l'AO réduisait l'effet stimulant de la viabilité cellulaire du BPA et du GLP pour la lignée MCF7. Combinés, le BPA et le GLP ne stimulent plus la multiplication des cellules MCF7 alors que cette stimulation est observée lorsqu'ils sont seuls. L'effet délétère du BPA et du GLP mesuré n'est donc ni additif ni synergique.

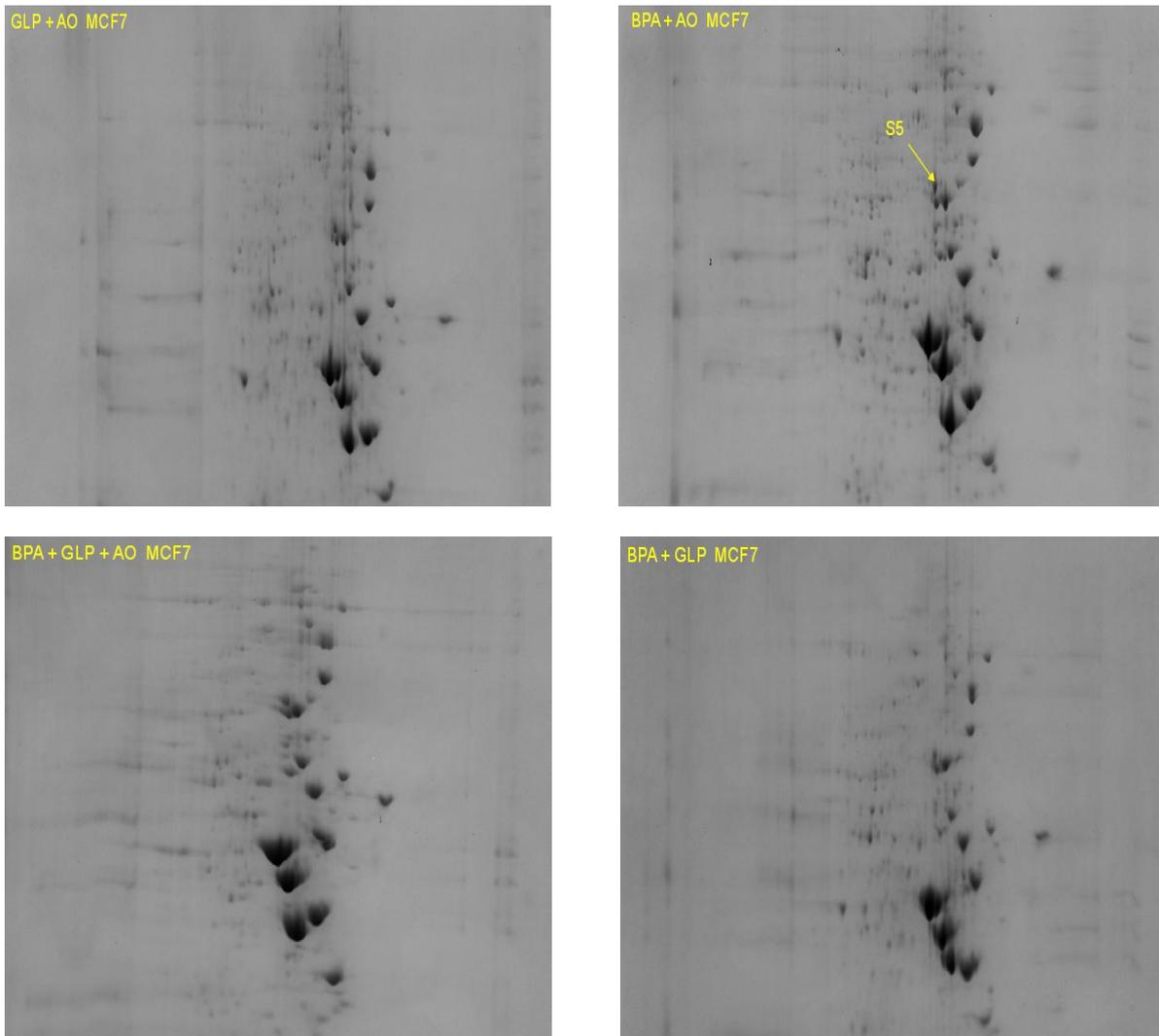
La lignée HME1 est, dans notre étude, considérée comme une lignée saine, témoin d'un fonctionnement normal. Nous avons observé que seul le mélange de deux ou trois polluants affectait la viabilité et entraînait un effet antiprolifératif. Il est donc montré que les polluants peuvent dégrader la viabilité de cellules normales de notre organisme.

Pour la première fois, un faisceau d'indices nous conduit à penser que les cellules cancéreuses exprimant le RE se multiplient davantage sous l'effet de polluants seuls. Afin de comprendre plus finement quelles sont altérations induites par des polluants, nous avons évalué le niveau d'expression des protéines intracellulaires de cellules MCF7, MDA-MB231 et HME1 contaminées par électrophorèse bidimensionnelle. L'identification des protéines potentiellement marqueurs de modifications a été réalisée par MS-MALDI TOF.

### I.3. Analyse protéomique des cellules MCF7, MDA-MB 231 et HME1 exposées aux polluants

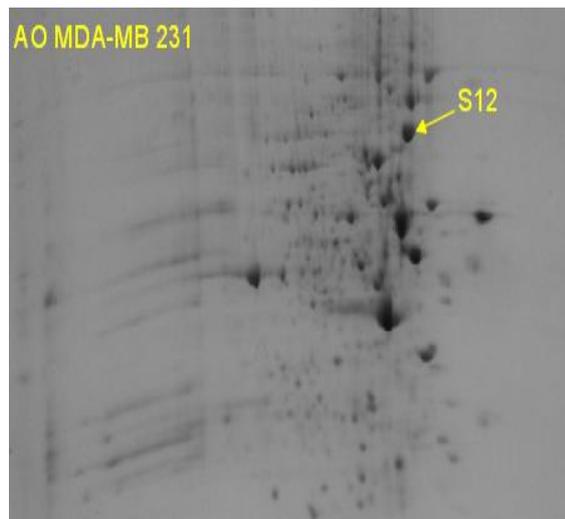
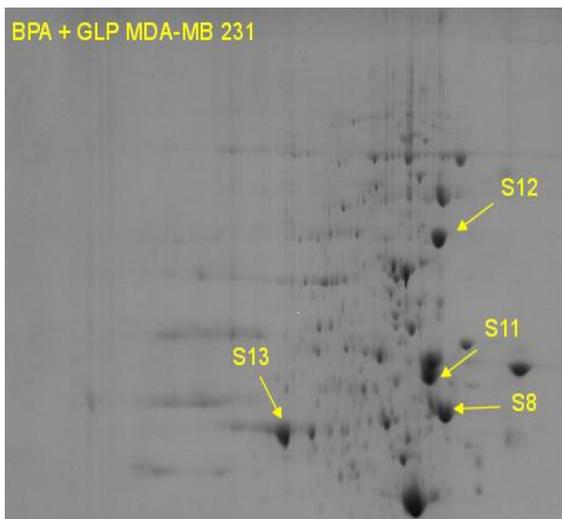
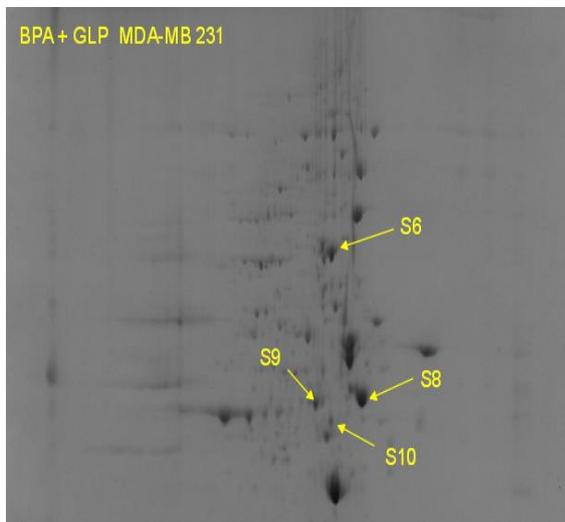
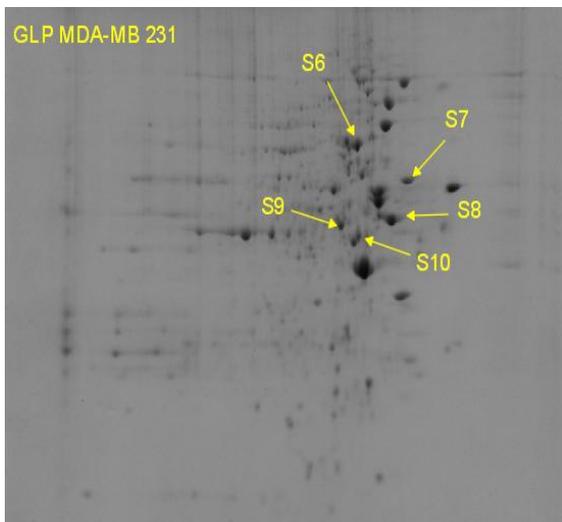
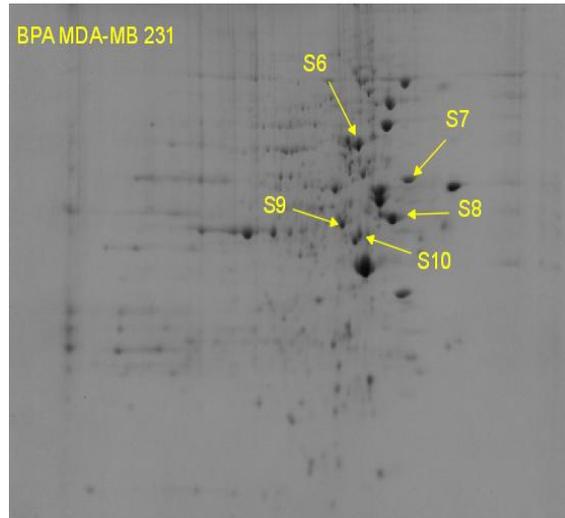
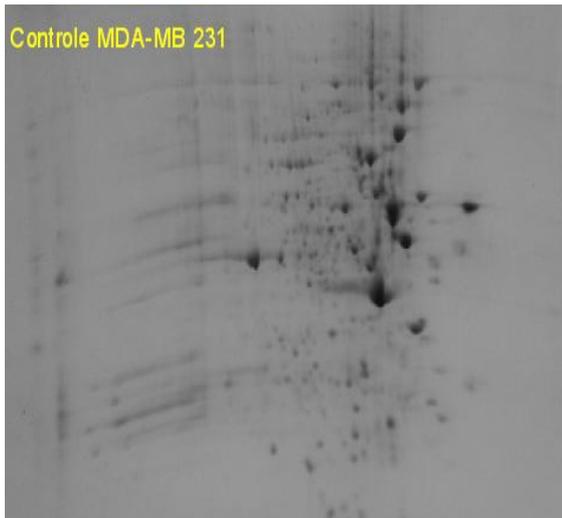
L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) couplée à la MS a été utilisée pour identifier les changements des niveaux d'expression de protéines intracellulaires après 72h d'incubation des cellules avec le BPA, l'AO et le GLP seuls ou en combinaison. Les spots détectés après la 2D ont été analysés par le logiciel PDQuest afin d'identifier ceux ayant subi une modification d'expression. Ils ont ensuite été excisés et les protéines contenues identifiées par MS- MALDI TOF couplé au logiciel MASCOT. Les images des gels 2D obtenus sont présentées sur figure 32 (MCF7), figure 33 (MDA-MB 231) et figure 34 (HME1).

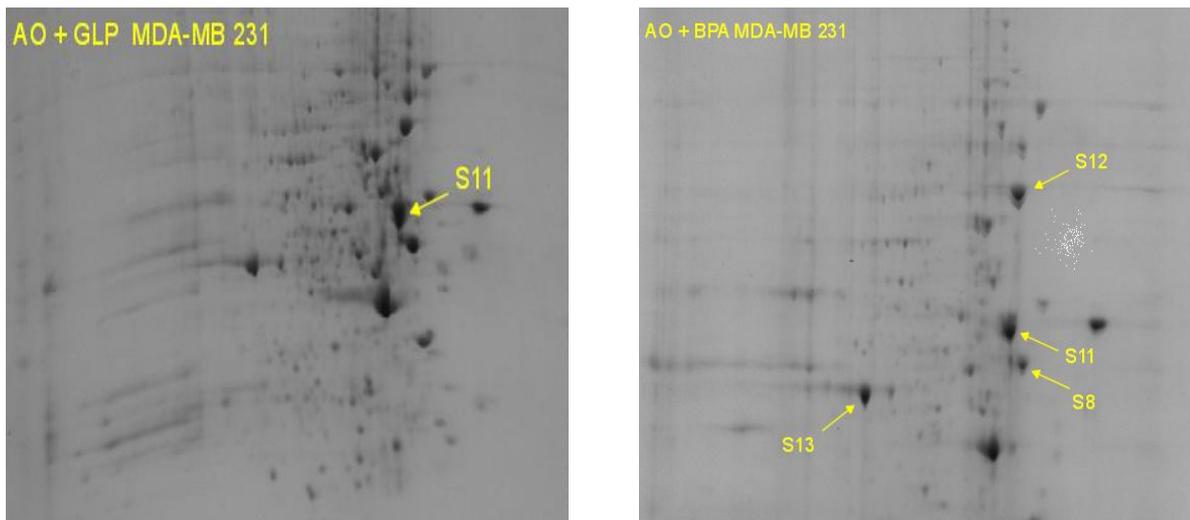




**Figure 32:** Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules MCF-7 incubées avec les polluants. Spots (S) montrant des différences de niveau d'expression sont numérotés et identifiés par MS/MALDI-TOF.

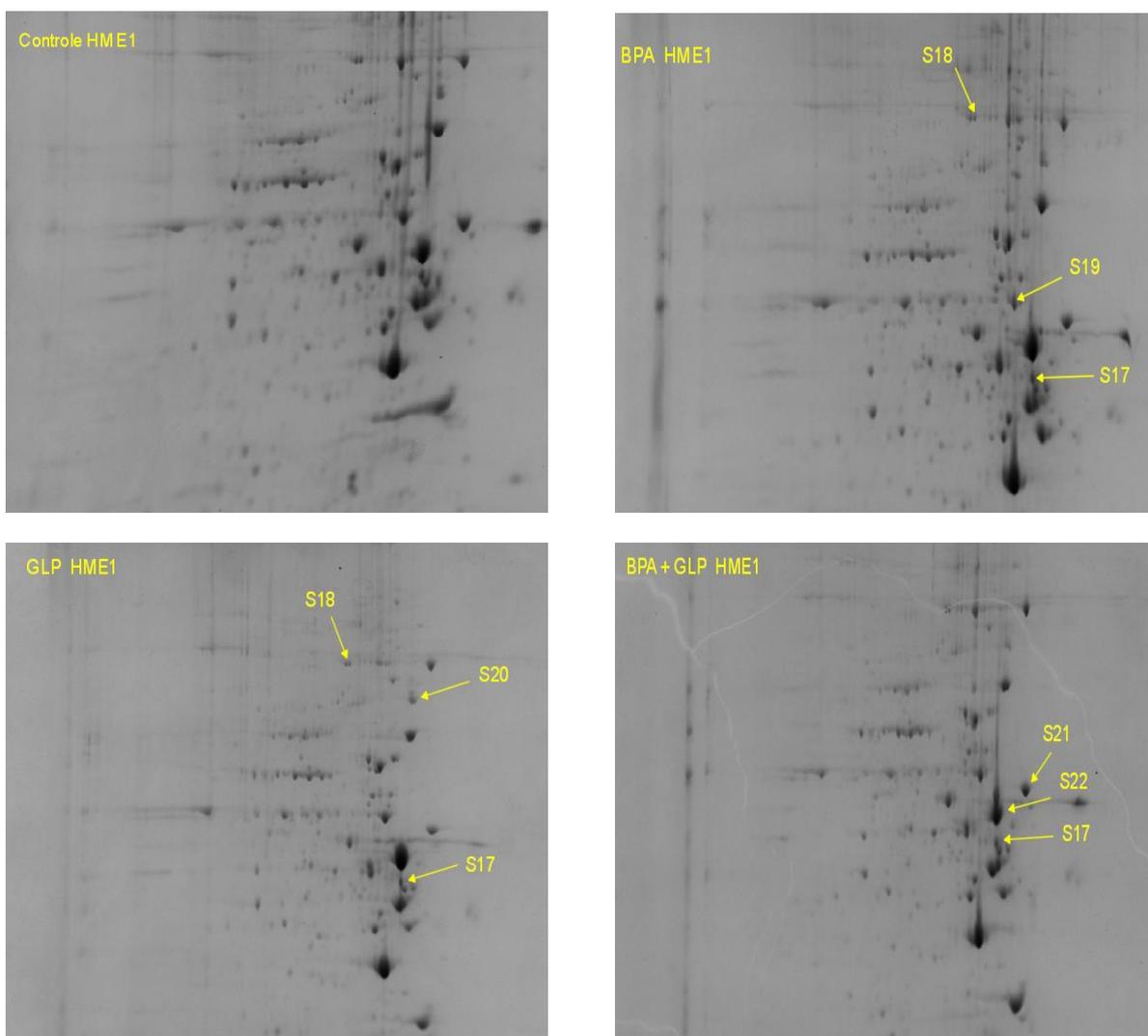
Chapitre III : Résultats et discussion

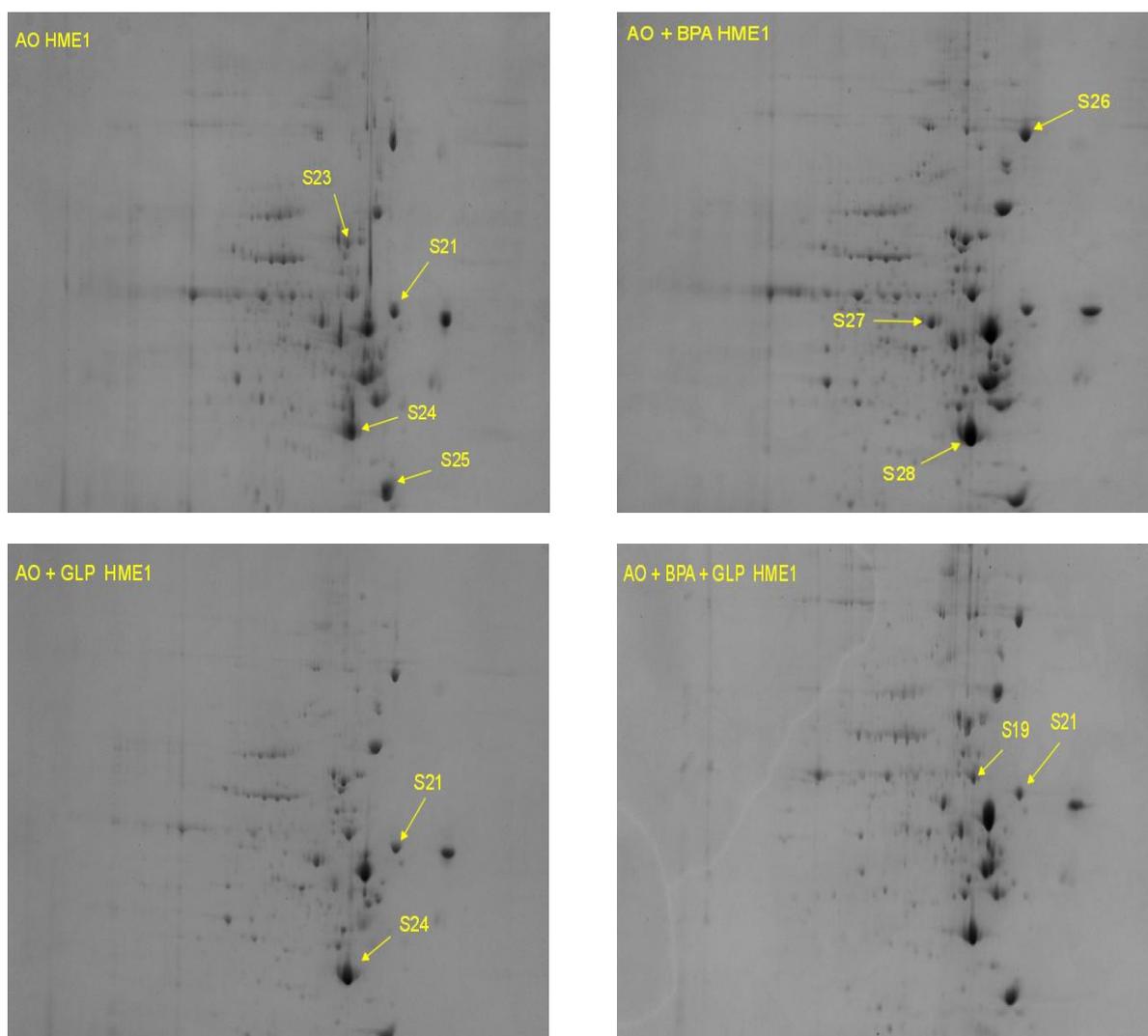




**Figure 33:** Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules MDA-MB 231 incubées avec les polluants.

Spots (S) montrant des différences de niveau d'expression sont numérotés et identifiés par MS/MALDI-TOF.





**Figure 34:** Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules HME 1 incubées avec les polluants.

Spots (S) montrant des différences de niveau d'expression sont numérotés et identifiés par MS/MALDI-TOF.

### I.3.1. Analyse protéomique la lignée MCF7 exposée aux polluants

La comparaison des gels 2D contenant les protéines extraites des lignées MCF7 témoin et exposées aux polluants montre un différentiel sur 5 spots surexprimés ou sous-exprimés d'au moins deux fois. Ceci uniquement après incubation des cellules MCF7 avec le BPA, l'AO ou le GLP. Le tableau 12 présente les résultats de leur identification.

**Tableau 12 :** Identification des protéines modulées après traitement de la lignée MCF7 par les polluants suite à une analyse MALDI-TOF

Polluants	Taux de variation	Spot	Protéine	Gène	Masse (Da)	Score de protéine
BPA	2 x +	S1	40S ribosomal protein SA (RSSA)	RSPA	32947	43
GLP	2 x +	S2	Keratin, type I cytoskeletal 18 (K1C18)	KRT 18	48029	249
GLP	2 x +	S3	Keratin, type II cytoskeletal 8 (K2C8)	KRT 18	53671	367
AO	2 x -	S4	Keratin, type I cytoskeletal 18 (K1C18)	KRT 18	48029	249
AO	2 x +	S1	40S ribosomal protein SA (RSSA)	RSPA	32947	43
BPA + AO	2 x -	S5	Stress-70 protein, mitochondrial (GRP75)	HSPA9	73920	76

(Score =  $-10\log(P)$  où P est la probabilité que l'évènement ne soit pas du au hasard).

Une exposition des cellules MCF7 au BPA et à l'AO a induit une surexpression du spot 1 (S1) identifié comme contenant la protéine RSSA.

La protéine RSSA fait partie de la famille des protéines ribosomales. En se liant à l'ARNm, elles régulent l'étape de la traduction. Il a été montré que ces protéines interviennent aussi dans la régulation de divers processus cellulaires tels que l'invasion, la migration, l'apoptose et la genèse tumorale (Xu et al., 2016). De plus, Fumagalli et al (2009) ont montré qu'une diminution de l'expression de la protéine 40S des hépatocytes de rats activait la voie p53 et entraînait l'apoptose. Dans notre et sur la lignée MCF7, sa surexpression inactiverait probablement la voie p53 et favoriserait ainsi la survie cellulaire (Fumagalli et al., 2009).

Les spots S2 et S3 correspondant respectivement aux protéines kératine type 1, cytosquelette 18 (K1C18) et kératine type 2 cytosquelette 18 (K2C18) sont également présents en intensité plus

importante, et ce, après incubation avec le GLP. Ces protéines K1C18 et K2C18 ont un rôle de cyto-protection de la structure protéique. Elles interviendraient aussi dans la protection des cellules soumises à des facteurs de stress mécaniques et non mécaniques (Karantza, 2011). Une surexpression de K1C18 et K2C18 pourrait favoriser l'invasivité des cellules MCF7 (Hendrix et al., 1997).

Toutefois, lorsque les cellules sont incubées avec l'AO seul, une diminution de 2 fois de l'expression de la protéine K1C18 est observée (S4). Il a été montré que l'exposition des souris à l'AO induisait une diminution de l'expression de protéines kératines au niveau des cellules intestinales (Wang et al., 2012b). Donc, probablement AO agissait pour diminuer l'expression de ces protéines. Il serait ainsi intéressant de caractériser la voie d'action de l'AO ainsi de GLP liée au changement de l'expression de kératine.

L'expression de cette protéine (S4) semble ne pas être affectée après exposition des cellules au BPA et à l'AO. Cette incubation a affecté l'expression d'un autre spot. Le spot 5 sous exprimé deux fois se révèle être une protéine de choc thermique (HSPA9, S5). Il est observé après incubation des cellules avec un mélange de BPA et AO. HSPA9 est une protéine chaperon localisée dans la mitochondrie et au niveau de la fraction nucléaire des cellules MCF7 (Schneider et al., 1994). Il a été montré que l'expression de cette protéine favorisait la carcinogénèse et la formation des métastases pour la lignée MCF7. Elle agirait en inactivant l'expression du gène p53 et conférerait aux cellules la capacité de supporter le stress oxydant (Ryu et al., 2014). Il est donc probable que la diminution de son expression par le mélange BPA/AO induise une réduction de la formation de métastases et une sensibilité accrue au stress oxydatif.

L'analyse PD-Quest n'a montré aucune différence du niveau d'expression des protéines des cellules traitées par un mélange de BPA et GLP, un mélange de GLP et AO, ou le mélange des trois polluants.

Lors des travaux précédents, nous avons montré que le BPA ou le GLP à  $10^{-6}$ M stimulaient la viabilité des cellules MCF7 (Fig. 25 et 26). Ceci pourrait donc être provoqué par la surexpression de RSSA par BPA ou K1C18 et K2C8 par GLP (tableau 12).

De plus, il a été montré qu'un mélange de BPA et de GLP n'affectait pas la viabilité cellulaire même en présence d'AO (Fig. 27). L'électrophorèse 2D n'a pas mis en évidence de

surexpression des protéines citées ci-dessus. Nous pouvons donc conclure que l'expression de RSSA, K1C18 et K2C8 est perturbée par l'AO.

### I.2.2. Analyse protéomique de la lignée MDA-MB 231

Le tableau 13 présente les résultats obtenus après analyse protéomique du contenu des cellules MBA-MB 231 contaminées. 8 spots (S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13) ont vu leur intensité affectée par les incubations.

**Tableau 13:** Identification des protéines modulées après incubation de la lignée MDA-MB 231 avec les polluants suite à une analyse MALDI-TOF

Polluants	Taux de variation	Spot	Protéine	Gène	Masse(Da)	Score de protéine
BPA	2 x +	S6	Heat shock cognate 71 kda protein (HSP7C)	HSPA8	70854	720
BPA	2 x +	S7	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	P4HB	57081	748
BPA	2 x +	S8	Tubulin beta chain (TBB5)	TUBB	49639	444
BPA	2 x +	S9	Keratin, type II cytoskeletal 8 (K2C8)	KRT8	53671	321
BPA	2 x +	S10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (HNRPF)	HNRNPF	45643	274
AO + GLP	2 x +	S11	Vimentin (Vime)	VIM	53676	405
AO	2 x +	S12	78 kDa glucose-regulated protein (GRP78)	HSPA5	72402	120
BPA + AO	2 x +	S13	Alpha-enolase (ENOA)	ENO1	47481	296
BPA + AO	2 x +	S11	Vimentin (Vime)	VIM	53676	405
BPA + AO	2 x -	S8	Tubulin beta chain (TBB5)	KRT8	50095	169
BPA + AO	2 x +	S12	78 kDa glucose-regulated protein (GRP78)	HSPA5	72402	120
GLP+/- BPA	2 x +	S6	Heat shock cognate 71 kda protein (HSP7C)	HSPA8	70854	720

(Score =  $-10\log(P)$  où P est la probabilité que l'évènement ne soit pas du au hasard).

Le spot S6 correspondant à la protéine de choc thermique 7C (HSP7C) a été surexprimé deux fois plus après que les cellules aient été incubées avec BPA ou GLP ou BPA et GLP. L'expression de cette protéine est connue comme étant un marqueur d'atteinte par le cancer du sein (Valle et al., 2011). Ainsi, la surexpression de cette protéine pourrait être aussi un marqueur d'exposition des lignées cancéreuses à ces polluants.

De plus, l'incubation de MDA-MB 231 avec le BPA stimulerait l'expression de 4 protéines qui sont respectivement :

- La protéine disulfide isomérase A1 (PDIA1 ; S7) composant majeur du réticulum endoplasmique. Elle catalyse la formation de liaisons disulfures, la réduction et l'isomérisation des protéines. Il a été montré que le stress induit par les xénobiotiques au niveau du réticulum endoplasmique pouvait affecter ses fonctions. L'expression de certaines protéines telles que PDI augmenterait suite à l'accumulation de protéines non fonctionnelles dans le réticulum endoplasmique. L'accumulation des PDI constituerait pour les cellules un moyen pour tolérer le stress engendré par les polluants (Lafleur et al., 2013).
- La chaîne beta tubuline 5 (TBB5 ; S8) impliquée dans la structuration des protéines, la prolifération et la survie cellulaire (Cortesi et al., 2009)
- La protéine K2C8 (S9),
- La ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène F (HNRPF ; S10). Les protéines appartenant à la famille de HNRNP jouent un rôle central dans la coordination des voies de réparation de l'ARNm en réponse à des conditions de stress. Il a été montré que l'accumulation de ces protéines en réponse à des conditions de stress ainsi que leur liaison à l'ARNm, constituerait une voie de protection et de maintien de la viabilité cellulaire (Guil et al., 2006).

L'incubation des cellules MDA-MB-321 avec le BPA et l'AO a affecté uniquement l'expression de la protéine TBB5. Elle a été deux fois plus exprimée. A ce jour, aucune explication n'est proposée pour expliquer ce phénomène.

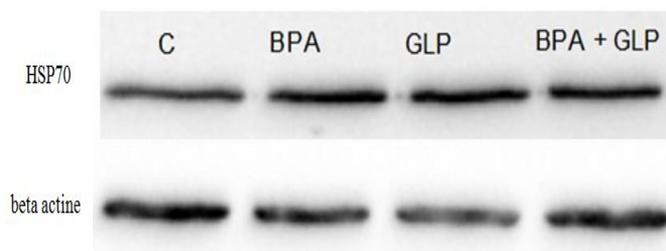
Nous avons également remarqué que la protéine Vime, (S11), voyait son expression augmenter après incubation des cellules avec AO et/ ou BPA, et avec GLP. Vime est un composant majeur des filaments intermédiaires constituant le cytosquelette. Son expression a été bien corrélée à une augmentation de la migration et de l'invasivité des cellules de cancer du sein (Satelli and Li, 2011).

De plus, une surexpression de la protéine GRP 78, (S12), a été observée après incubation des cellules avec AO seul ou AO et BPA. GRP78 est un régulateur central des fonctions du réticulum endoplasmique dans le repliement et l'assemblage des protéines. En raison de sa propriété anti-apoptotique, l'induction de son expression en condition de stress représente une voie de survie cellulaire et de progression tumorale. Considérant que les polluants entraînent un stress, il semble logique de la trouver surexprimée dans notre étude.

La protéine alpha enolase (ENOA, S13) est également surexprimée après une incubation avec AO et BPA. ENOA est une enzyme glycosidique impliquée dans l'anabolisme cellulaire et la génération d'énergie. Il a été montré que son expression favorisait la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Li and Lee, 2006),(Song et al., 2014).

Nous avons montré précédemment que les polluants seuls ou combinés n'affectaient pas la viabilité de la lignée MDA-MB 231. Cette viabilité a été mesurée via l'activité des mitochondries et leur capacité à convertir le MTT en formazan. Il s'agissait donc d'une vision globale de l'activité de la cellule. Les résultats de l'analyse du profil protéomique ont montré que l'expression de certaines protéines était bien affectée par les polluants. Nous pouvons donc conclure que les polluants testés entraînent des paramètres cellulaires indépendants de la viabilité cellulaire tels que : la migration et les capacités d'invasion.

Nous avons montré précédemment que la protéine HSP7C était surexprimée par les cellules MDA-MB 231. Nous avons choisi de valider ce résultat par western blot. La figure 35 illustre les résultats obtenus en Western blot sur les extraits cellulaires issus de la lignée MDA-MB 231.



**Figure 35:** Analyse de l'expression de la protéine HSP7C des cellules MDA-MB 231 par Western blot après 72h d'incubation avec le BPA, le GLP ou bien BPA + GLP.

Les résultats montrent bien une augmentation de l'intensité de la bande relative à la protéine HSP7C lorsque les cellules ont été incubées avec le BPA, le GLP ou bien BPA + GLP. Cette protéine restant exprimée normalement dans les cellules contrôles (C).

### **I.2.3. Analyse protéomique de la lignée HME1**

L'incubation des cellules non cancéreuses HME1 avec le BPA a entraîné une surexpression de 3 protéines respectivement notées S17, S18, S19 et présentées dans le tableau 14. Les protéines identifiées sont respectivement la protéine disulfide isomérase 6 (PDIA6), l'alpha glucosidase neutre AB (GANAB) et la protéine de stress thermique HSP60.

L'exposition de ces cellules au GLP a induit l'augmentation de l'expression des protéines PDIA6, GANAB et celle de Lamin B1 (MNB1 ; S20). MNB1 possède une fonction structurale et participe à l'assemblage des filaments lamine, au renforcement du cytosquelette et au contrôle de la transcription (Wilson and Foisner, 2010).

Nous avons également montré qu'une contamination des cellules HME1 au BPA et GLP réduisaient l'expression de la protéine Vime (S22) alors qu'une surexpression était observée pour les protéines PDIA6 et PDIA1.

Concernant l'exposition à l'AO des cellules, elle a provoqué une sous expression de 3 protéines par rapport aux cellules contrôle. Il s'agit de la protéine de stress thermique 7C (HSP7C ; S23), Kératine cytosquelette type 1 (K1C14 ; S24) et de la Nucléophosmine (NPM ; S25). La protéine NPM participe à la régulation de nombreux mécanismes cellulaires comme la réparation de lésions d'ADN, l'augmentation de la stabilité du génome, la régulation de l'apoptose et le transport de l'ARNm (Box et al., 2016). Son expression pourrait être stimulée dans les cellules cultivées en conditions de stress comme l'exposition aux UV, à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et aux antibiotiques (Wu and Yung, 2002) .

Une contamination des cellules HME1 par un mélange AO et BPA a entraîné une surexpression des protéines endopasme (ENPL ; S26), kératine 2 C7 (K2C7 ; S27).

En revanche, l'incubation avec l'AO et le GLP a augmenté l'expression de la protéine PDIA1 et la diminution de celle de K1C14.

Les protéines PDIA1 et HSP60 ont été surexprimées après incubation avec les 3 polluants.

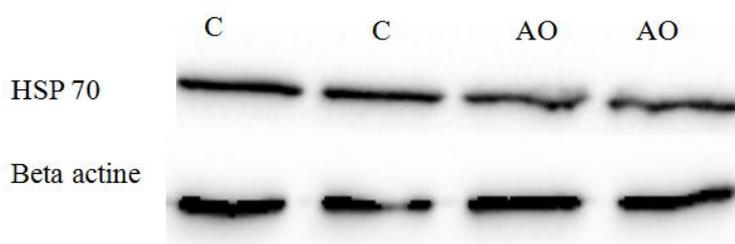
**Tableau 14:** Identification des protéines modulées après incubation de la lignée HME 1 avec les polluants suite à une analyse MALDI-TOF

Polluants	Taux de variation	Spot	Protéine	Gène	Masse (Da)	Score de protéine
BPA	2 x +	S17	Protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6)	PDIA6	57081	318
BPA	2 x +	S18	Neutral alpha-glucosidase AB (GANAB)	GANAB	107263	55
BPA	2 x +	S19	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP60)	HSPD1	61187	91
GLP	2 x +	S17	Protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6)	PDIA6	57480	226
GLP	2 x +	S18	Neutral alpha-glucosidase AB (GANAB)	GANAB	107263	55
GLP	2 x +	S20	Lamin-B1 (LMNB1)	LMNB1	66653	61
BPA + GLP	2 x +	S17	Protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6)	PDIA6	48490	161
BPA + GLP	2 x +	S21	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	P4HB	57480	226
BPA + GLP	2 x -	S22	Vimentin (Vime)	VIM	53676	378
BPA + GLP + AO	2 x +	S21	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	P4HB	57480	226
BPA + GLP + AO	2 x -	S19	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP60)	HSPD1	61187	91
AO	2 x -	S23	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C)	HSPA8	70854	250

AO	2 x -	S24	Keratin, type I cytoskeletal 14(K1C14)	KRT14	51529	725
AO	2 x -	S25	Nucleophosmin (NPM)	NPM1	32555	230
BPA + AO	2 x +	S26	Endoplasmin (ENPL)	HSP90B1	92411	91
BPA + AO	2 x +	S27	Keratin, type II cytoskeletal 7 (K2C7)	KRT7	51354	844
BPA + AO	2 x +	S28	Keratin, type II cytoskeletal 7(K2C7)	KRT7	51354	844
GLP + AO	2 x +	S21	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	P4HB	57081	318
GLP + AO	2 x -	S24	Keratin, type I cytoskeletal 14 (K1C14)	KRT14	51529	725

(Score =  $-10\log(P)$  où P est la probabilité que l'évènement ne soit pas du au hasard).

L'analyse par western blot de l'expression de la protéine HSP7C par les cellules HME1 incubées pendant 72h avec l'AO a également montré une sous-expression par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat est présenté figure 36. Une diminution de l'intensité de la bande de HSP7C dans les cellules traitées par AO a été montrée.



**Figure 36:** Analyse de l'expression de la protéine HSP7C au niveau des cellules HME1 par Western blot après 72 d'incubation avec AO.  
(C) extraits protéiques de cellules contrôles.

Lors de ces expérimentations, nous avons caractérisé le profil protéomique des cellules cancéreuses MCF7, MDA-MB 231 et des cellules épithéliales mammaires HME1 exposées aux polluants pendant 72h. Nous avons montré que ces polluants affectaient l'expression de plusieurs

protéines intracellulaires des lignées testées. Ces protéines sont impliquées dans divers mécanismes cellulaires qui sont :

- Les protéines de structure (K2 C8, K1C18, K2 C7, K1C14, TBB5) parmi lesquelles la protéine K2C8 a été surexprimée de 2 fois plus par rapport aux cellules contrôles au niveau des cellules MCF7 et MDA-MB 231 exposées respectivement au BPA et au GLP.
- Les protéines de stress (GRP 75, HSP7C, GRP 78, HSP60). HSP7C a été surexprimée dans la lignée MDA-MB 231 après incubation avec BPA ou GLP ou BPA et GLP. Alors que les cellules de la lignée HME incubées avec l'AO ont vu son expression diminuer.
- Les protéines chaperons (PDIA1, PDIA6). Leur expression a été surtout stimulée au sein de la lignée HME1.

Les polluants peuvent apparemment affecter de manière identique l'expression des protéines. Par exemple, l'expression de la protéine RSSA a été augmentée dans les cellules MCF7 traitées par le BPA ou l'AO. En revanche, pour d'autres protéines, l'effet sur l'expression est dépendant du polluant. Par exemple, une surexpression a été observée pour la protéine K1C18 après incubation des cellules MCF7 avec GLP. Cette même protéine est sous-exprimée si les cellules sont exposées à l'AO.

La combinaison de polluants module également l'expression des protéines. pourrait être non affecté en combiné avec un autre. Prenons l'exemple de l'incubation de la lignée MDA-MB 231 avec AO où l'expression de la protéine GRP 78 a été augmenté. Lorsque le polluant est le BPA seul, son expression n'était pas affectée. En combinaison AO+ BPA, l'effet d'AO sur l'expression était maintenu. La présence du BPA ne semble pas perturber l'action de l'AO sur la protéine GRP 78.

Concernant la lignée HME1, nous avons observé que le BPA seul stimulait l'expression de la protéine HSP 60, alors qu'après l'incubation avec un mélange BPA+AO+GLP, une diminution de son expression a été observée. AO et GLP ne présentaient pas d'effet sur son expression, leur présence semble donc inverser l'effet du BPA.

La lignée HME1 semble être la plus affectée par une exposition aux polluants. En effet, 12 protéines ont vu leur expression affectée suite aux différentes incubations, contre 8 protéines pour la lignée MDA-MB 231 et 5 protéines pour la lignée MCF7. Les différences observées au niveau de l'effet de polluants sur l'expression de protéines sont ainsi dépendantes de l'incubation (un ou plusieurs polluants) ainsi de la lignée cellulaire.

Nous avons observé que les polluants en mélange présentaient un effet antiprolifératif sur les cellules alors qu'une incubation avec un seul polluant n'avait pas affecté leur viabilité. Par exemple, seule l'incubation avec le mélange de 3 polluants a diminué l'expression de la protéine HSP60. Cette diminution pourrait être à l'origine de la diminution de la viabilité cellulaire observée précédemment. En effet, il a été montré que l'inhibition de l'expression de HSP60 par la protéine de liaison 7 au facteur de croissance ressemblant à l'insuline (IGFBP7) des cellules de cancer colorectal induisait une diminution de la prolifération cellulaire. L'incubation de ces cellules avec HSP60 recombinante a même été suivie d'une reprise de la prolifération (Ruan et al., 2010). Ainsi, la sous-expression de HSP60 des cellules HME1 diminuerait bien la viabilité cellulaire.

Nous avons aussi observé une diminution de la viabilité cellulaire après incubation des cellules HME1 avec un mélange BPA + GLP. L'analyse 2D a montré une diminution de l'expression de la protéine Vime lors de cette incubation. Il a été montré que certaines caspases dégradent la protéine Vime, favorisant l'apoptose par la destruction des filaments intermédiaires et amplification du signal de mort cellulaire par l'intermédiaire d'un produit de clivage pro-apoptotique. Ainsi, il est probable que l'incubation des cellules HME1 ait stimulé la voie d'action des caspases pour détruire la protéine Vime entraînant par conséquent la diminution de la viabilité cellulaire (Byun et al., 2001).

Afin de mieux cerner l'incidence d'une exposition aux polluants sur le métabolisme cellulaire, nous avons évalué leur action sur l'activité d'enzymes clé : les phosphatases.

### **1.3. Effet de polluants sur l'activité des protéines phosphatases : Tyrosine phosphatase**

Nous avons mesuré l'activité spécifique (AS) des tyrosines phosphatases (TP) après incubation des cellules avec les polluants pendant 72h. L'activité enzymatique a été comparée à celle mesurée dans les cellules contrôles.

La figure 37, illustre l'AS des TP intracellulaires des cellules MCF7 (Fig. 37-A), MDA-MB 231 (Fig. 37-B) et HME1 (Fig. 38).

Il semble que l'incubation avec les polluants des cellules MCF7 et MDA-MB 231 n'ait pas affecté l'AS des TP. Ceci est valable pour les différentes incubations testées. Aucune différence significative n'a été observée entre l'AS des TP de cellules traitées et celle des cellules contrôles.

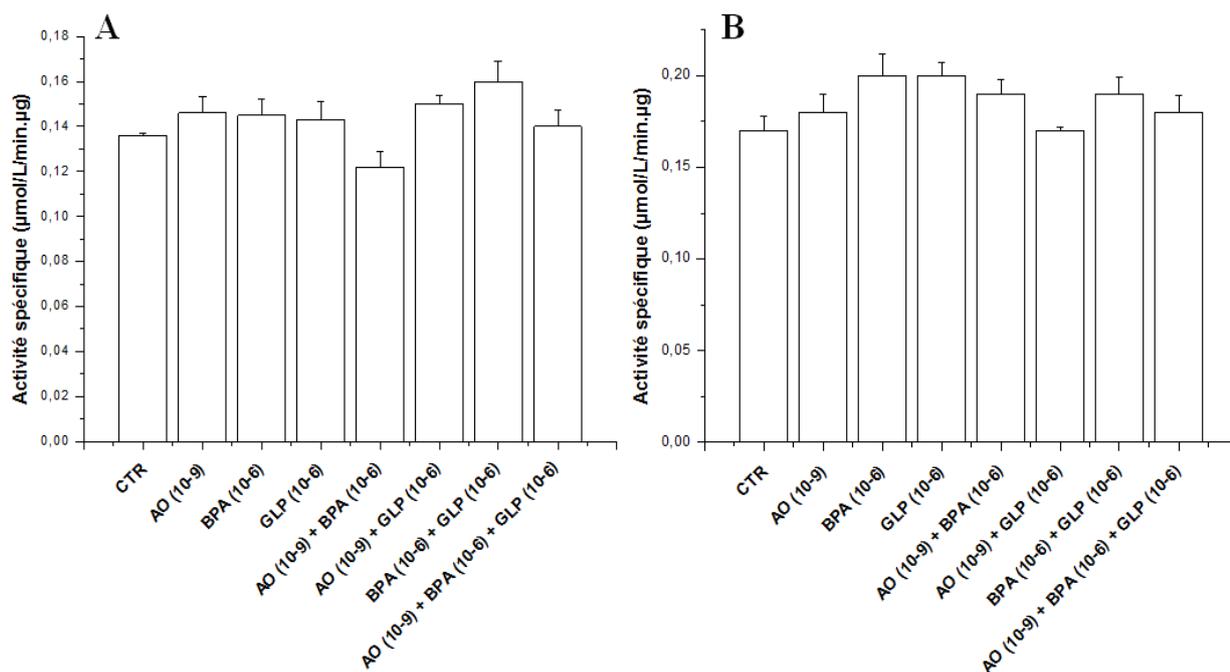
### *Chapitre III : Résultats et discussion*

Par exemple pour les cellules MCF7 (Fig. 37-A), l'AS des TP est de 0,13 ( $\pm 0,015$ )  $\mu\text{mol/L}/\text{min}.\mu\text{g}$ , 0,12 ( $\pm 0,007$ ) et 0,14 ( $\pm 0,007$ ) respectivement pour les cellules contrôles, cellules traitées par BPA et cellules traitées par AO.

L'AS est de 0,15 ( $\pm 0,004$ ) et de 0,16 ( $\pm 0,009$ ) respectivement en présence de GLP, AO et GLP, BPA.

Les travaux de Wenjie Liu et al (2015) ont montré que l'incubation des cellules MCF7 avec le BPA pendant 24h stimulait l'expression des TP. Ainsi, il est probable qu'après 72h d'incubation l'expression des TP serait non affectée par le BPA ce qui pourrait expliquer le résultat que nous avons obtenu. De plus, les auteurs ont cultivé les cellules MCF7 dans le milieu DMEM sans le rouge phénol, supplémenté à 1% SVF et contenant du charbon de bois. Ceci a été réalisé afin de diminuer le taux des hormones dans le milieu. Dans notre expérimentation, nous n'avons pas utilisé ces conditions de culture rendant nos expérimentations non comparables (Liu, 2015).

Pour la lignée MDA-MB 231 (Fig. 37-B), l'AS des TP est de 0,17 ( $\pm 0,01$ ), 0,19 ( $\pm 0,008$ ) et 0,18 ( $\pm 0,02$ ) respectivement pour les cellules contrôles, cellules traitées par BPA, AO et par le mélange de 3 polluants. BPA, AO et GLP seuls ou en mélange ne semblent pas présenter d'effet sur l'AS des TP des cellules MCF7 et MDA-MB 231 après 72h d'incubation.

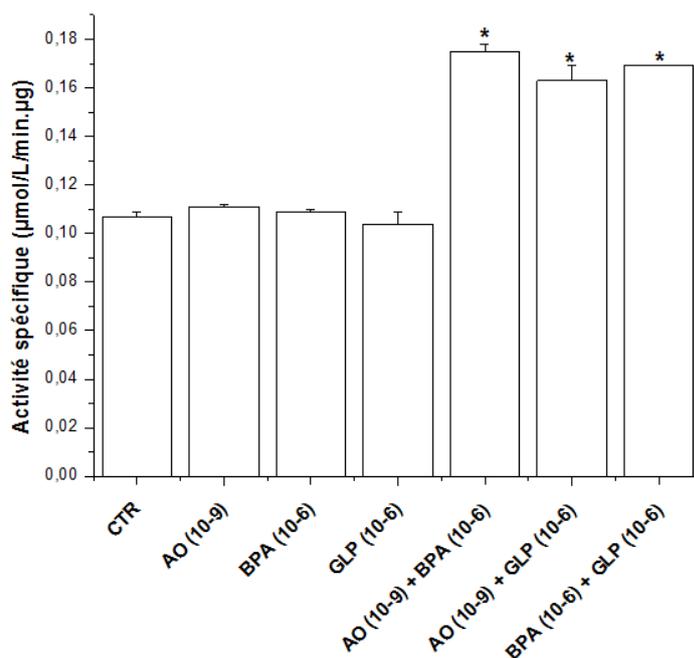


**Figure 37:** Effet des polluants sur l'activité des protéines phosphatases après 72h d'incubation des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) avec les polluants.

L'activité spécifique a été mesurée après mesure d'absorbance du produit PNP à 405 nm par unité de temps et µg de protéines. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n=3 répétitions. (\*) Indique une différence significative au groupe non traité (p<0,05).

Concernant la lignée HME1, l'incubation avec BPA ou GLP ou AO n'a pas affecté l'AS de TP. En effet, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux cellules contrôles comme le montre la figure 38.

L'effet significatif sur cette activité n'a été observé qu'après incubation avec deux polluants : AO, BPA ou AO, GLP ou BPA, GLP. En effet, l'AS a augmenté de 0,10 (±0,0016) µmol/L/min.µg (cellules contrôles) à 0,17 (±0,0028), 0,16 (±0,006) et 0,16 (±0,0002) µmol/L/min.µg respectivement pour le mélange AO +BPA ; AO + GLP et BPA + GLP.



**Figure 38:** Effet des polluants sur l'activité des protéines phosphatases après 72h d'incubation des cellules HME1 avec les polluants.

L'activité spécifique a été mesurée après mesure d'absorbance du produit PNP à 405 nm par unité de temps et µg de protéines. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n=3 répétitions. (\*) Indique une différence significative au groupe non traité (p<0,05).

D'après ces résultats, il semblerait que l'augmentation de l'activité des TP soit liée à la diminution de la viabilité cellulaire des cellules HME1. En effet, nous avons observé une diminution de la viabilité cellulaire uniquement lors d'une incubation avec le mélange de polluants. Il se peut que l'activation des TP diminue la viabilité des cellules HME1 comme cela a été montré sur les cellules de cancer du côlon par les travaux de (Balavenkatraman et al., 2006). En effet, ces auteurs ont montré que la re-expression de la protéine DEP1, une tyrosine phosphatase dans les cellules de cancer du côlon déficitaires à la base en cette protéine, induisait une inhibition de la prolifération des cellules ainsi que de leur migration. Ainsi, les polluants en mélange pourraient activer les protéines TP susceptibles de diminuer la viabilité cellulaire dans les cellules HME1 comme cela a été montré sur les cellules de cancer du côlon.

Dans cette première partie, nous avons étudié l'effet de polluants sur la viabilité cellulaire après 24h et 72h d'incubation. Par la suite, dans le but de comprendre comment ces polluants agissaient sur la viabilité cellulaire, nous avons utilisé dans un premier temps une analyse par électrophorèse 2D couplée à la MS pour analyser le profil protéomique dans les cellules incubées avec les polluants. Les protéines ayant une expression affectée ont été donc identifiées. Ensuite, nous avons mesuré l'AS des protéines phosphatases des cellules traitées. Ceci nous a

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

permis de déterminer quelles étaient les fonctions cellulaires susceptibles d'être perturbées par les conditions de stress générées par les polluants.

Le mode d'action des polluants lié aux effets observés sur la viabilité cellulaire, à l'expression des protéines et à l'activité phosphatasique reste mal connu. Les propriétés hydrophobiques de certains polluants suggèrent qu'ils sont capables de s'accumuler dans le tissu adipeux, ce qui représenterait une voie de détoxification de l'organisme. Dans ce contexte, nous avons procédé à la détection et la quantification de ces polluants dans le milieu de culture en vue de déterminer si sa voie d'action était extracellulaire ou intracellulaire. Ces dosages ont été menés pour mesurer la variation de la concentration du polluant en fonction du temps. Une absence de variation indiquerait que le polluant agirait probablement par voie extracellulaire sans pénétrer dans le compartiment intracellulaire.

Dans cette partie, nous avons développé une méthode de dosage du GLP dans le milieu de culture de cellules cancéreuses. Cette méthode constitue le sujet de notre premier article.

## ***CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION***

***Partie 2 : Elucidation du mécanisme d'action des polluants sur les cellules. Les polluants empruntent –ils la voie extra ou intracellulaire ?***

## II. Dosage des polluants dans le milieu de culture cellulaire

Au cours de nos travaux, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode permettant la détection et la quantification du GLP dans l'eau. Cette méthode devait également être applicable à la détection et à la quantification du GLP dans le milieu de culture de cellules cancéreuses. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur une nouvelle méthode utilisant la dérivation du GLP par du phényl iso-thiocyanate (PITC), réactif connu et utilisé pour dériver les acides aminés lors de leur analyse.

Une fois la méthode mise au point pour l'analyse du GLP dans l'eau, nous avons choisi de la valider sur un milieu plus complexe comme le milieu de culture de cellules MDA-MB 231 exposées pendant 6h et 24h à du GLP.

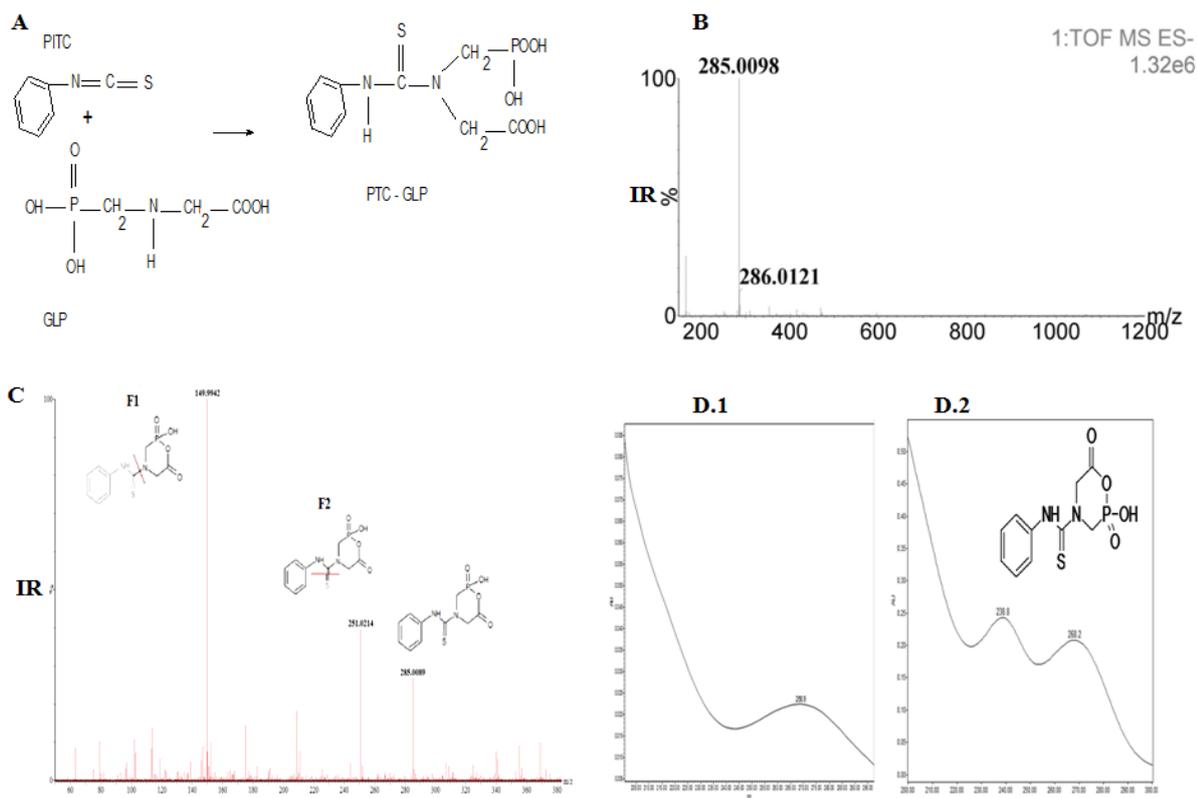
### II.1. Dérivation du glyphosate par le PITC, analyse UPLC/MS<sup>E</sup> et RMN du complexe GLP-PITC formé.

La réaction de dérivation du GLP par le PITC est illustrée figure 39-A. Il s'agit d'une dérivation via la fonction amine.

Le produit de la réaction : le PTC-GLP (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>PS) possède un maximum d'absorbance à 245 nm et une masse théorique estimée de 304g/mol.

L'analyse par UPLC/MS<sup>E</sup> en mode d'ionisation négative [M-H]<sup>-</sup>, a indiqué la présence d'un ion majoritaire de temps de rétention de 3.08 min et de masse de 285. 0098 *m/z* (Fig. 39-B). La masse attendue était de 303 *m/z*. Le spectre MS/MS obtenu en mode négatif a indiqué la présence de deux ions : 149,9 *m/z* et 251 *m/z* respectivement identifiés respectivement comme étant les fragments 1 (F1, Fig. 39-C) et (F2, Fig.39-C). Ainsi, nous pouvons déduire que l'ion à 285,0098 *m/z* est relatif au produit PTC-GLP mais possède une différence de 18 *m/z*.

Le spectre UV du PITC et du produit PTC-GLP est présenté figure 39-D (1,2). Deux absorbances sont visibles concernant PTC-GLP. La première à 268,2 nm correspondrait au cycle benzène du PITC ou du PTC (Fig. 39-D1). Le maxima d'absorption à 238,6 nm pourrait indiquer la formation d'une cyclisation intramoléculaire entre le PITC et le GLP (Fig.39-D2). Cette hypothèse est liée à la différence de 18 g / mol entre les deux masses qui pourrait être due à la perte d'une molécule d'H<sub>2</sub>O.



**Figure 39:** Analyse du produit PTC-GLP.

(A) réaction de dérivation du GLP par PITC sur sa fonction amine, (B) spectre UPLC/MS du complexe PTC-GLP obtenu en mode d'ionisation négatif (IR : intensité relative). Le pic majoritaire de l'ion à 285,0098 m/z, avec un gradient H<sub>2</sub>O/ Acétonitrile à 12 min, (C) spectre MS/MS : Fragment 1 (F1 : m/z 149,9) ; Fragment 2 (F2 : 251 m/z), (D1) spectre UV du PITC, (D2) spectre UV PTC-GLP

La RMN a été employée pour confirmer la structure issue de la cyclisation du GLP sur le PITC. Les spectres RMN relatifs au proton H<sup>1</sup> sont illustrés sur les figures Fig.40-A et 40-B. Les déplacements chimiques indiqués à 7.52 et 7.27 ppm correspondent aux 5 protons aromatiques du cycle benzénique du PTC (Fig.40-B.1.3). Le doublet à 4,09 ppm ayant une constante de couplage de 12 Hz (Fig. 40-B.1.1) appartient aux protons du groupe CH<sub>2</sub> -P. Le méthylène du groupe NCH<sub>2</sub>CO apparaît à 4,66 ppm (Fig.40-B.1.2).

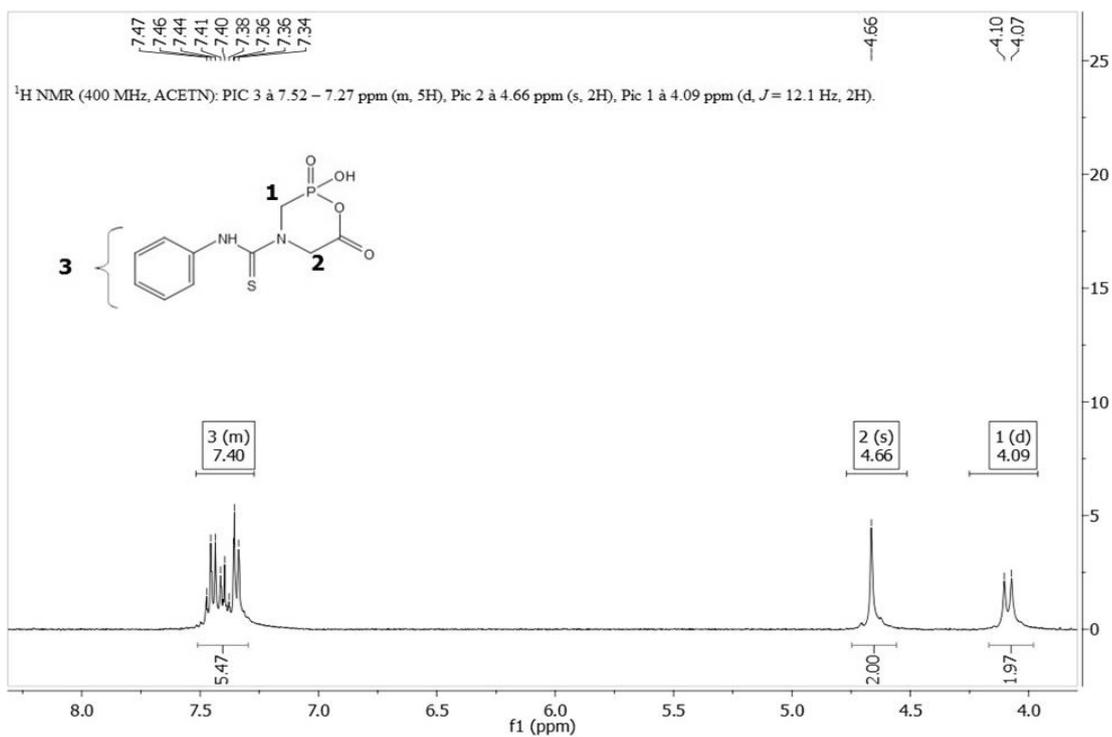
Le spectre RMN C<sup>13</sup> représenté sur la figure 38 est conforme à la structure proposée. Les constantes de couplage  $\delta$  de 183,1 et 171,1 pourraient être attribuées à l'atome de C du groupe C = O et C = S. Le doublet apparu à 46,4 ppm de constante de couplage J de 145,6 Hz (Fig. 40-B.3. a), caractérise l'atome de carbone du groupe CH<sub>2</sub> -P et celle à 53,84 ppm correspondrait au groupement N du CH<sub>2</sub> (Fig.40-B.3.b). Les atomes de C sur le groupe phényle sont observés à

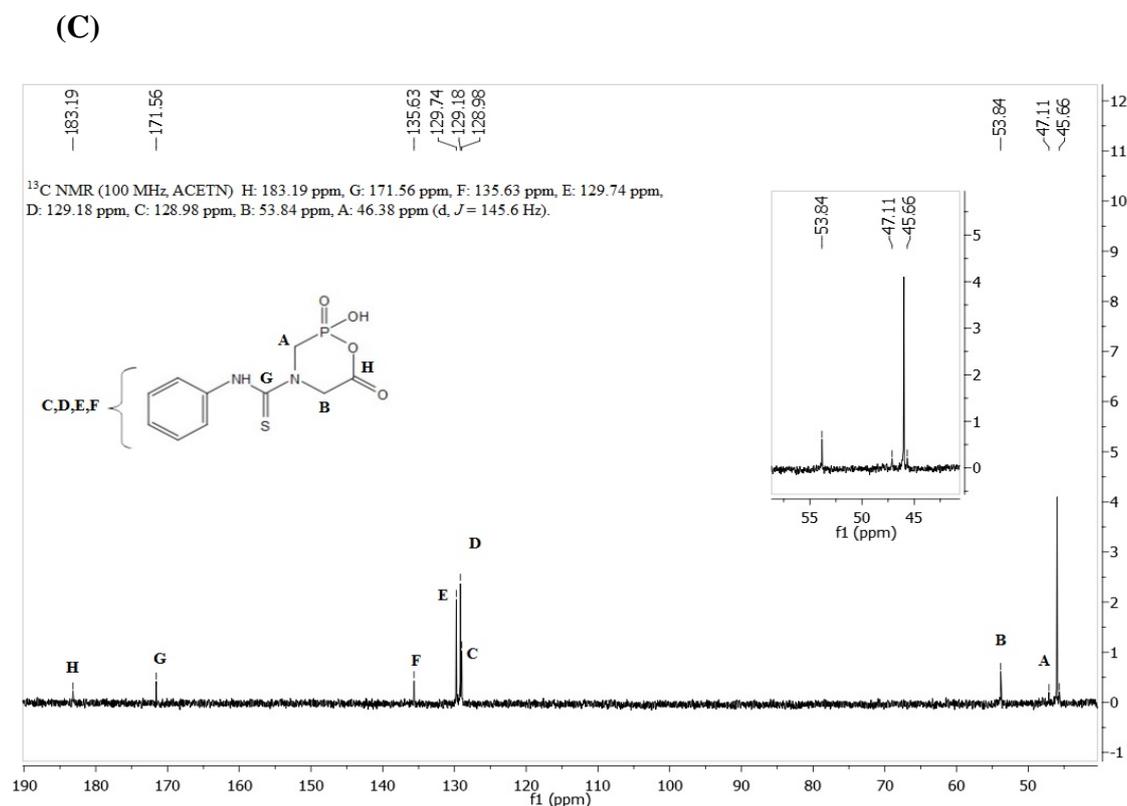
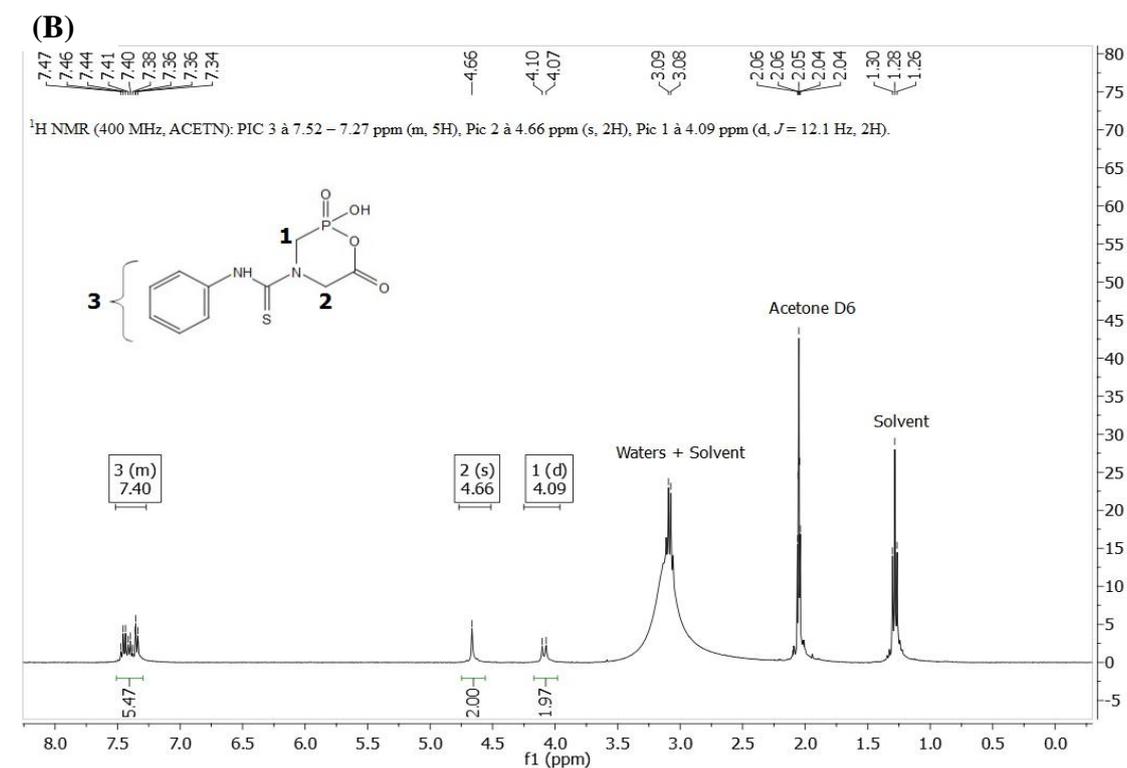
### Chapitre III : Résultats et discussion

128,98 ppm (Fig. 40-B.3.c) ; 129,18 ppm (Fig. 40- B.3.d) ; 129,74 ppm (Fig. 40-B.3.E) ; 135,63 ppm (Fig. 40-B.3.F).

Les résultats analytiques des spectres RMN  $H^1$  et  $C^{13}$  sont donc conformes à la structure proposée du produit réactionnel GLP-PTC.

(A)



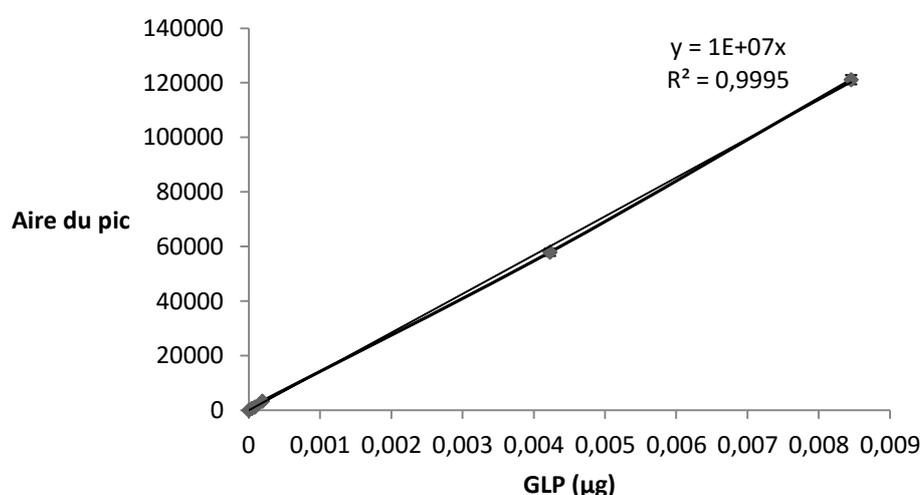


**Figure 40:** Analyse du spectre proton  $H^1$  (A, B) et du proton  $^{13}C$  du PTC-GLP.

Il indique la présence de différentes parties du GLP (atome C) et PITC (groupe benzène) avec les solvants utilisés pour l'analyse.  $\square_H$  (400 MHz, CD<sub>6</sub>O) : (5H, m, Ar **H**), 4.66 (2H, s, NCH<sub>2</sub>CO), 4.09 (2H, d,  $J = 12.0$  Hz, NCH<sub>2</sub>PO);  $\square_C$  (100 MHz, CDO6) 183.1 (C=O), 171.1 (C=S), 135.6 (=C-N), 129.7 (C<sub>atom.</sub>), 129.1 (C<sub>arom.</sub>), 128.8 (C<sub>atom.</sub>), 53.8 (NCH<sub>2</sub>CO), 46.4 (NCH<sub>2</sub>PO, d,  $J = 145.6$ Hz).

### II.1.2. Détermination des limites de détection et de quantification de la dérivation du GLP par le PITC dans l'eau.

Différentes concentrations de GLP ont été préparées dans l'eau MilliQ. Elles ont ensuite été dérivées par le PITC et injectées pour construire une gamme standard (Fig. 41). Cinq injections ont été réalisées par échantillon. La courbe obtenue représente la quantité en fonction de l'aire du pic. Nous avons obtenu une fonction linéaire  $y=10^7 X$  avec un coefficient de corrélation très significatif  $r = 0,99$  pour une gamme allant de  $10^{-5} \mu\text{g}$  à  $0,008\mu\text{g}$ , ce qui montre une bonne corrélation entre la quantité injectée et le signal généré par l'équipement. La limite de détection et de quantification étaient respectivement de  $1,4 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  et  $4,22 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ .



**Figure 41:** Courbe étalon du GLP dérivé dans l'eau.

Différentes quantités de GLP préparées dans l'eau ultra-pure ont été dérivées par PITC et quantifiées par UPLC/MS.

Notre méthode présente des avantages par rapport à d'autres méthodes de détection et de quantification du GLP. En effet, la dérivation par le PITC ne nécessite aucune étape de pré-traitement de l'échantillon avant la dérivation comme une extraction ou une concentration de l'échantillon. Par exemple, la dérivation du GLP avec du p- toluène sulfonyle nécessite une étape d'extraction du GLP par une résine anionique ou une extraction en phase solide (SPE) après dérivation avec Fmoc -Cl. Cette méthode nécessite, de plus, un détecteur de fluorescence. Il est à noter que le complexe PTC-GLP est stable au moins 13 jours à  $4^\circ\text{C}$  (données non présentées).

De plus, la limite de détection de notre méthode est de  $3\mu\text{g/L}$ . Cette valeur semble être plus intéressante que les méthodes précédemment publiées utilisant la détection UV. Le tableau 15 présente quelques valeurs de limite de détection pour les méthodes de dosage du GLP. Nous

remarquons que la détection par fluorescence présente une limite de détection inférieure à 6.63µg /L (tableau 15).

**Tableau 15:** Valeurs de LD pour certaines méthodes de dosage du GLP

Échantillons	Méthodes de dérivation	Détection	LD (µg/L)	Références
<b>Eaux souterraines</b>	Fmoc-Cl + extraction SPE	HPLC avec un détecteur de fluorescence	0.24	(Olivo et al., 2015)
<b>Eaux souterraines ou de surface</b>	Extraction avec résine anionique + p-toluenesulphonylchloride	HPLC- 240nm	200	(Delmonico et al., 2014)
<b>Soja</b>	3,6-dimethoxy-9-phenyl-9H-carbazole-1-sulfonyl chloride	HPLC avec un détecteur de fluorescence 440 nm.	0.02	(Zhang et al., 2013b)

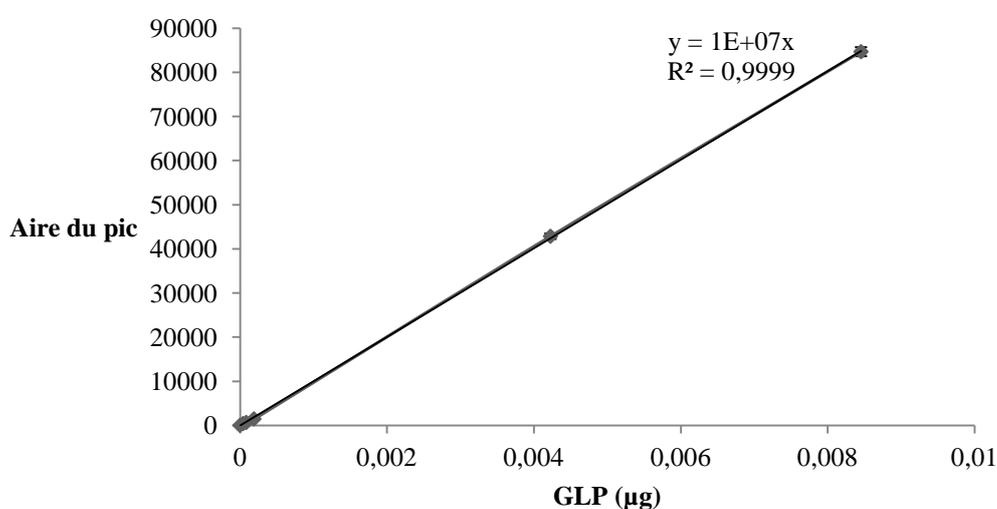
La séparation réalisée avec l'UPLC/MS a réduit le temps total d'analyse. La durée de la réaction de dérivation est de 30 min, tandis que certaines méthodes de dérivation, par exemple avec Fmoc exigent 15 heures d'incubation (Todorovic et al., 2013). La durée de l'injection est de 12 min. Entre le début et la fin de l'analyse, il s'écoule moins de 3h avec la méthode développée au cours de nos travaux.

La réaction entre le GLP et le PITC a abouti à la formation d'une cyclisation intra- moléculaire. Cette cyclisation n'a pas lieu avec des acides aminés tels que GLY (Wilson et al., 2011). Ceci est probablement dû à l'absence du groupe phosphonate sur la structure de la GLY. Ainsi, notre méthode crée un dérivé du GLP- PITC bien spécifique facilement détectable en spectrométrie de masse.

### II.1.3. Quantification du GLP dans le milieu de culture cellulaire

Après avoir validé la réaction de dérivation du GLP par le PITC dans de l'eau, nous avons par la suite appliquée cette réaction pour la détection et la quantification du GLP dans un milieu plus complexe : le milieu de culture des cellules MDA-MB 231 comprenant du DMEM supplémenté à 10% par le SVF et une concentration élevée en protéines secrétées par les cellules.

L'analyse de différentes concentrations de GLP préparées dans ce milieu de culture, dérivées par le PITC a permis d'obtenir une gamme étalon linéaire et fonction de la quantité injectée ( $4.2 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  à  $0.008 \mu\text{g}$ ). Le coefficient de corrélation était de  $r=0,99$  (Fig. 42).



**Figure 42:** Gamme étalon du GLP préparée dans le milieu DMEM.

Différentes quantités en GLP ont été solubilisées dans le milieu de culture DMEM et dérivées par PITC. Une analyse UPLC/MS a été menée pour détecter le produit PTC-GLP.

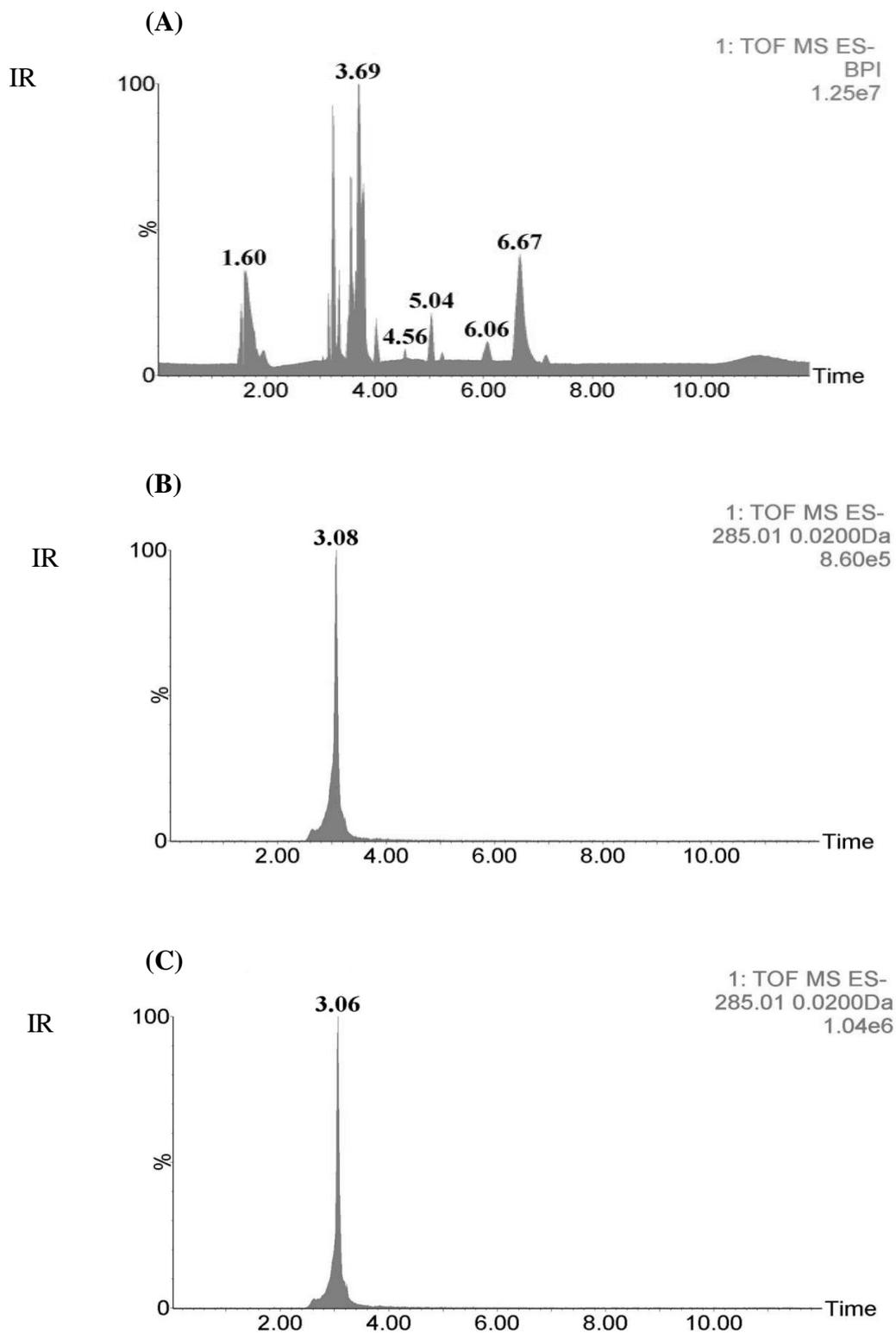
En comparant les deux gammes étalon de GLP préparées dans l'eau et le milieu de culture, nous avons constaté que l'équation était approximativement la même.  $Y = 10^7 X$  où Y est l'aire du pic et X est la quantité de GLP. Cependant, une différence au niveau de l'aire du pic a été observée pour la même quantité de GLP entre les deux gammes. Par exemple, pour une quantité de GLP de  $4,22 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}$ , l'aire du pic est de 668 ( $\pm 3.49\%$ ) et de 403 ( $\pm 3.8\%$ ) respectivement dans l'eau et dans le milieu de culture DMEM. Donc, pour assurer une quantification précise du GLP, il faut que l'échantillon à doser et la gamme étalon soient préparés dans la même solution.

Pour tester notre protocole de détection du GLP dans le milieu de culture des cellules cancéreuses, une concentration  $16,907 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  a été choisie et déposée avec les cellules. Dans le but de vérifier l'absence d'interférences du GLP et de la dérivation avec les composants de

l'échantillon, nous avons dérivé le milieu de culture provenant de cellules non contaminées avec du GLP. La figure 43 A montre l'absence du pic relatif au produit PTC-GLP dans le milieu de culture de cellules contrôles. Aucune perturbation de composants du milieu de culture n'est observée, certainement en raison de la grande spécificité de notre méthode. L'analyse UPLC / MS<sup>E</sup>, indique seulement la présence de l'ion relatif au produit GLP-PTC à 0h, 6 h (Fig. 43-B) et 24 h (Fig. 43-C) d'incubation.

Dans le but de déterminer si le GLP peut pénétrer dans le compartiment intracellulaire de la lignée MDA-MB 231 cellules, la concentration de GLP-PTC a été déterminée dans le milieu de culture. Les résultats obtenus indiquaient qu'il n'y a eu aucun changement dans la quantité de GLP entre 6h et 24h par rapport à t0. La quantité de GLP était 0,0051µg (+/- 11%) et 0,0053µg (+/- 5%), respectivement après 6h et 24h d'incubation. Sachant que pour t0, la concentration en GLP est de  $16,907 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ , après la dérivation de 10µl, la quantité analysée était de 0,0042µg.

Ce résultat indique que le GLP ne rentre pas dans les cellules et agit probablement par le biais d'une voie extracellulaire sur les cellules MDA-MB 231. Cela n'est pas le cas pour d'autres polluants. Par exemple, il a été montré que le bisphénol A sulfaté utilisé pour la production de résine époxy est capable de pénétrer dans les cellules du cancer du sein MCF7 via une réaction de désulfatation détectée dans les lysats des cellules MCF7.

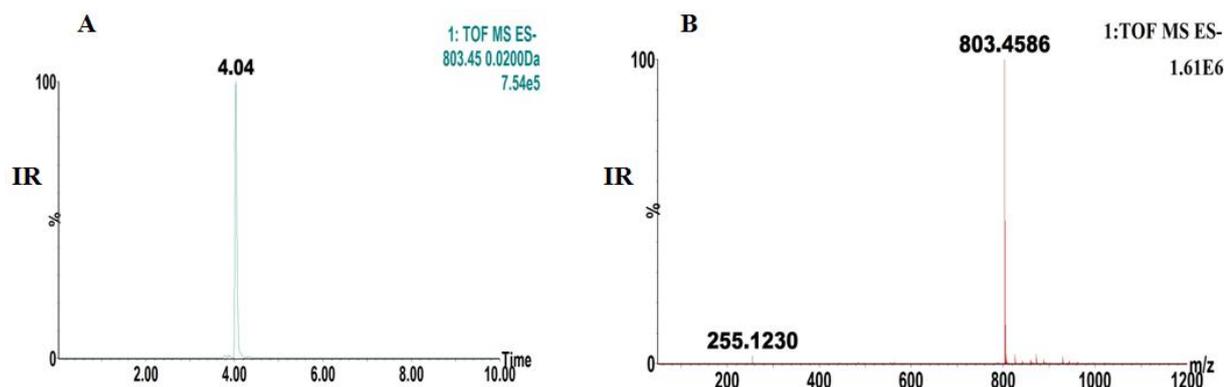


**Figure 43:** Chromatogramme obtenu après dérivation du GLP dans le milieu de culture DMEM. (A) milieu de culture des cellules contrôles, (B) milieu de culture après 6h d'incubation avec GLP, (C) milieu de culture après 24h d'incubation avec GLP, (IR= intensité relative).

## II.2. Quantification de l'AO dans le milieu de culture

Nous avons déterminé par UPLC/MS l'aire du pic relative à l'AO dans le milieu de culture des cellules (MCF7, MDA-MB 231, HME1) après t0h, t6h et t24h d'incubation à  $10^{-9}$ M.

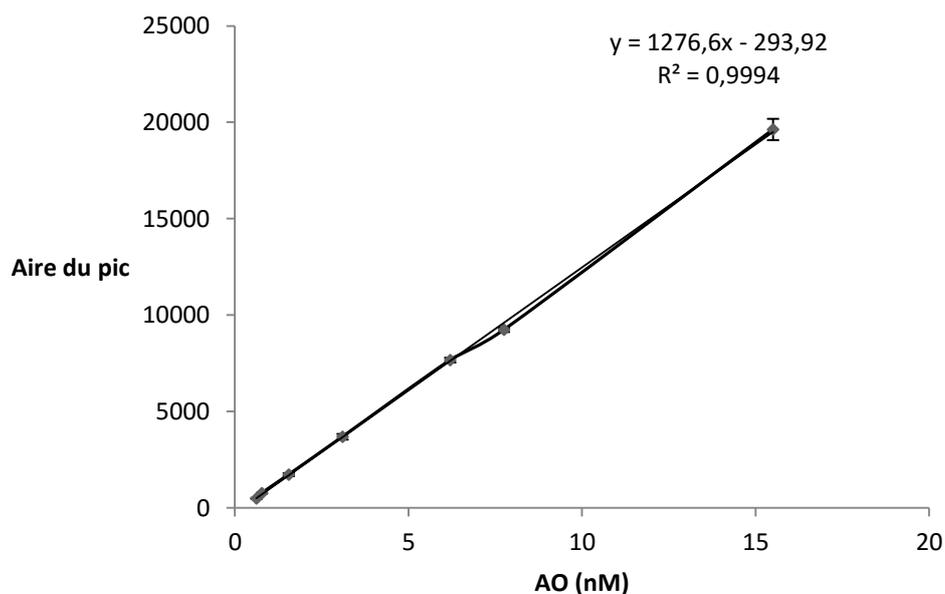
L'analyse par UPLC/MS<sup>E</sup> en mode d'ionisation négative  $[M-H]^{-}$  de la solution t0, a indiqué la présence d'un ion majoritaire avec un temps de rétention de 4,04 min (Fig. 44-A) et une masse de 803,4586  $m/z$  (Fig. 44-B) correspondant à la masse théorique de l'AO.



**Figure 44:** Analyse de l'AO par UPLC/MS.

(A) chromatogramme obtenue d'AO avec un temps de rétention de 4,04 min, (B) spectre UPLC/MS d'AO obtenu en mode d'ionisation négatif (IR= intensité relative).

Différentes concentrations de l'AO ont été préparées dans le milieu DMEM. Elles ont ensuite été injectées pour construire une gamme standard (Fig. 45). La courbe obtenue représente la concentration en fonction de l'aire du pic une gamme allant de 0,62 nM à 15,5 nM avec un coefficient de corrélation de 0,99 ce qui montre une bonne corrélation entre la concentration injectée et le signal généré par l'équipement.



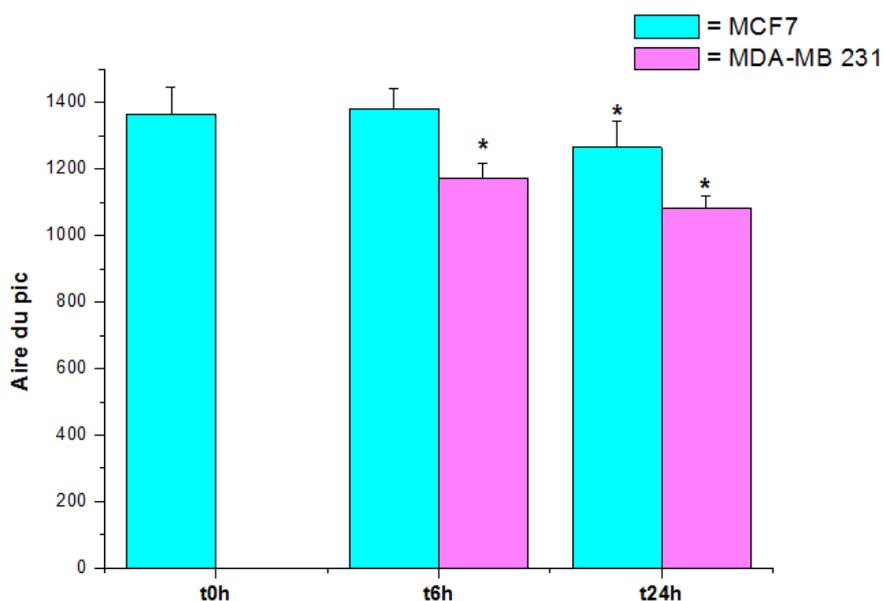
**Figure 45:** Gamme étalon de l'AO préparée dans le milieu DMEM.

La figure 46 présente les mesures de l'aire du pic de l'AO pour la lignée MCF7 et MDA-MB 231 après t0h, t6h et t24h d'incubation. L'intégration du pic a été réalisée par le logiciel MassLynx®.

Après 6h d'incubation, l'aire du pic relatif à l'AO semble ne pas être affectée pour la lignée MCF7. En effet, par rapport à t0 aucune différence significative n'a été observée. Cependant, une diminution significative a été observée pour la lignée MDA-MB 231 révélant donc une diminution de concentration de l'AO par rapport à t0. L'aire du pic a diminué de 1366,6 ( $\pm 5\%$ ) pour t0 à 1174 ( $\pm 3\%$ ) après 6h d'incubation.

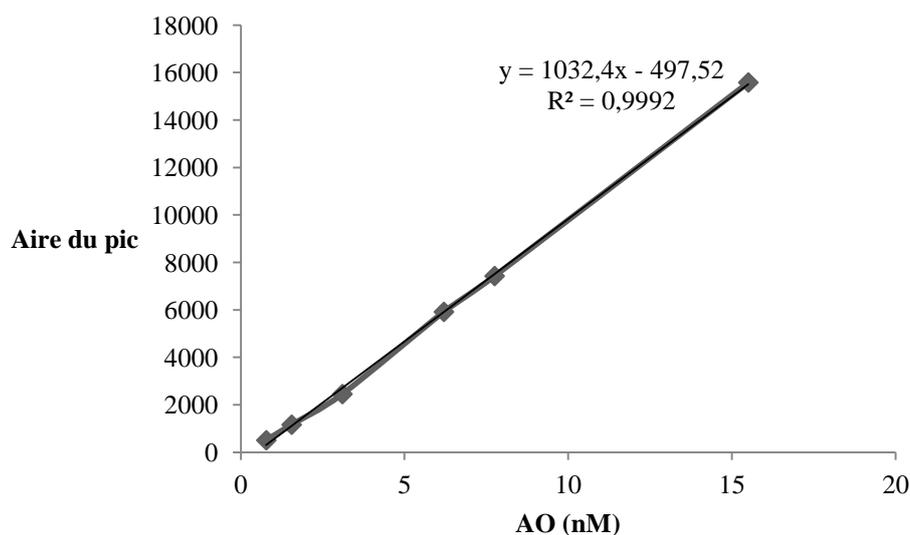
Après 24h d'incubation, nous avons aussi observé cette diminution pour la lignée MCF7 et davantage pour la lignée MDA-MB 231. Comme le montre la figure 46, la différence par rapport à t0 (1366 $\pm 5\%$ ), est significative. L'aire du pic est de 1265 ( $\pm 6\%$ ) et 1085 ( $\pm 3\%$ ) respectivement pour les lignées MCF7 et MDA-MB 231.

D'après ces résultats, l'AO semble pénétrer dans le compartiment intracellulaire puisque sa concentration a diminué en fonction du temps pour les deux lignées cancéreuses surtout après 24h d'incubation.



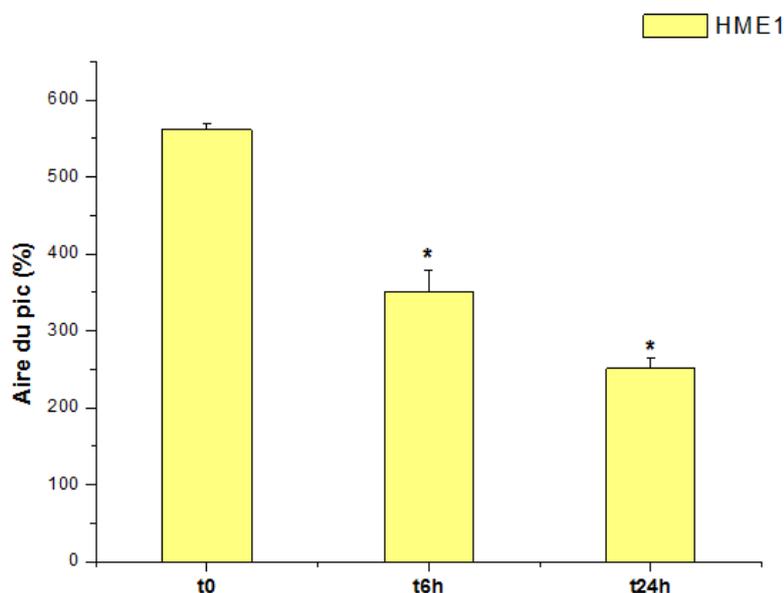
**Figure 46:** Quantification de l'AO dans le milieu de culture des cellules MCF7 et MDA-MB 231. t0h, concentration initiale de l'AO ; t6h, prélèvement après 6h d'incubation ; t24h, prélèvement après 24h d'incubation. (\*) Indique une différence significative par rapport à t0h.

Concernant la lignée HME1, nous avons aussi préparée une gamme standard de l'AO dans le milieu MEBM de 0,62nM à 15,5 nM. La figure 47 indiquée la courbe de la gamme étalon obtenue après analyse UPLC/MS, qui montre aussi une bonne corrélation entre la concentration injectée et l'aire du pic.



**Figure 47:** Gamme étalon de l'AO préparée dans le milieu MEBM.

L'analyse UPLC/MS a montré que l'aire du pic d'AO variait au cours du temps révélant donc une variation de concentration. La figure 48 montre que l'aire du pic relatif à l'AO a diminué significativement par rapport à t0 (562 ±1,5%). En effet, elle est de 350 (±8%) et 251 (±5%) respectivement après 6h et 24h d'incubation.



**Figure 48:** Quantification de l'AO dans le milieu de culture des cellules HME1. t0h, concentration initiale de l'AO ; t6h, prélèvement après 6h d'incubation ; t24h, prélèvement après 24h d'incubation. (\*) Indique une différence significative par rapport à t0h.

Selon ces résultats, l'AO semble pénétrer dans le compartiment intracellulaire des cellules MCF7, MDA-MB 231 et HME1. En effet, une diminution de sa concentration extracellulaire a été observée en fonction du temps.

Notre étude, basée sur le dosage de l'AO dans le compartiment cellulaire a démontré qu'en fonction du temps sa concentration a diminué. Ainsi, nous suggérons que cette diminution de concentration est liée à une perméabilité membranaire pour ce polluant.

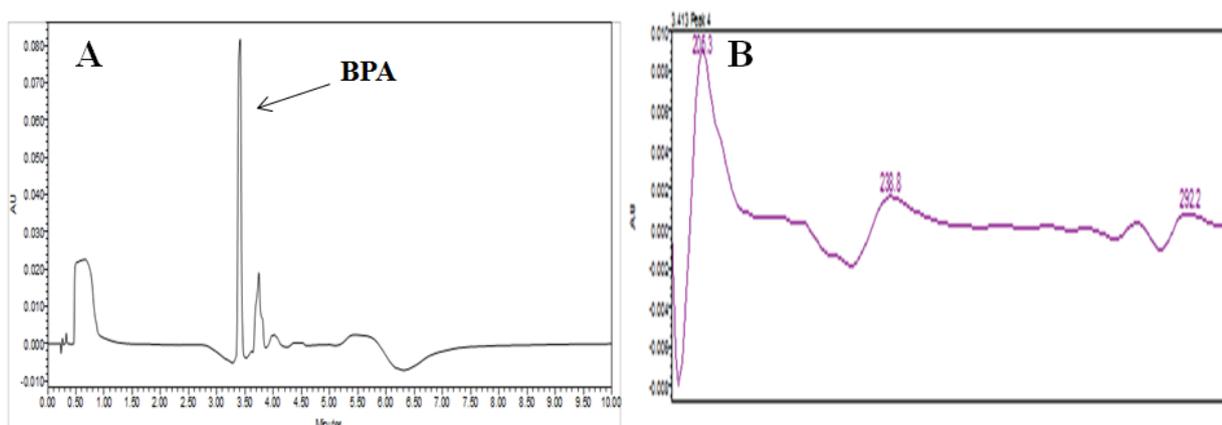
Les propriétés de perméabilité cellulaire de l'AO sont mal connues. Certaines études ont émis l'hypothèse que l'AO pourrait pénétrer dans la cellule. Du fait de la forte liaison de l'AO aux PP1 et PP2A, sa pénétration dans les cellules pourrait être mesurée via les activités de PP1 et PP2A dans des extraits acellulaires. IL a été montré que l'incubation des cellules MCF7 avec 1µM AO avait diminué de 50% l'activité de ces phosphatases. Ceci pourrait être donc lié à une voie d'action intracellulaire (Favre et al., 1997). De plus, il a été rapporté que LB 100,

l'inhibiteur des PP1/2A était capable de pénétrer dans la cellule et d'augmenter par la même la perméabilité cellulaire à certains agents.

### II.3. Dosage du BPA dans le milieu de culture cellulaire

Nous avons évalué la variation de la concentration du BPA dans le milieu de culture de cellules en fonction du temps par détection à 280 nm en UPLC. Pour cela, nous avons utilisé l'éther diéthylique pour l'extraction du BPA du milieu de culture à t0, t6h et t24h d'incubation à  $80.10^{-6}M$ .

La figure 49 illustre le chromatogramme relatif au BPA (Fig. 49-A) obtenu par UPLC à 280nm ainsi la dérivée seconde de son pic (Fig.49-B). Son temps de rétention est de 3,49 min.

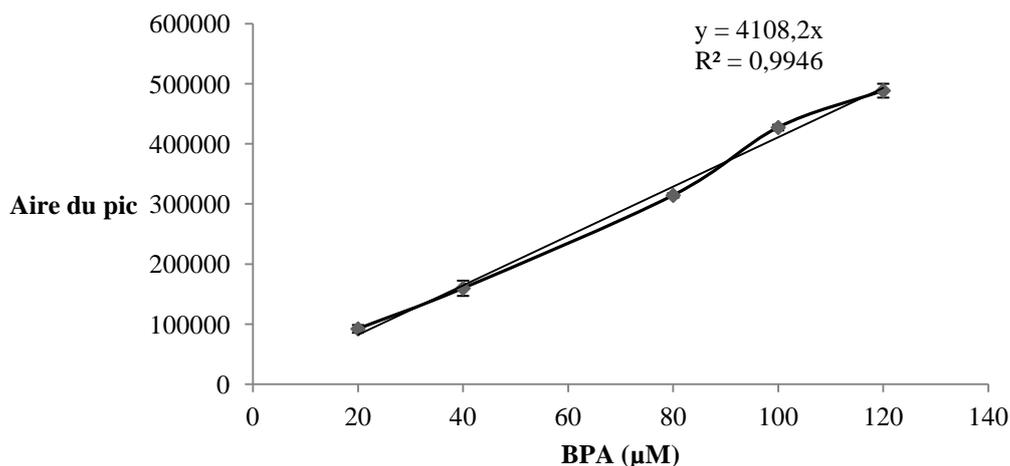


**Figure 49:** Chromatogramme relatif au BPA obtenu par UPLC.

(A) chromatogramme du BPA préparé dans le milieu de culture suivie d'une extraction par l'éther di éthylique avec un temps de rétention de 3,49 min. (B) dérivée seconde du pic relatif au BPA. AU (unité d'absorbance).

Différentes concentrations en BPA ( $20.10^{-6}M$  à  $120.10^{-6}M$ ) préparées dans le milieu DMEM ont été injectées en UPLC après extraction par l'éther di éthylique. L'intégration du pic relatif au BPA a été réalisée par le logiciel Empower pour mesurer l'aire du pic.

La figure 50 illustre la courbe de la gamme étalon obtenue. C'est une fonction linéaire avec un coefficient de corrélation 0,99, ce qui indique une bonne corrélation entre la concentration injectée et l'aire du pic.

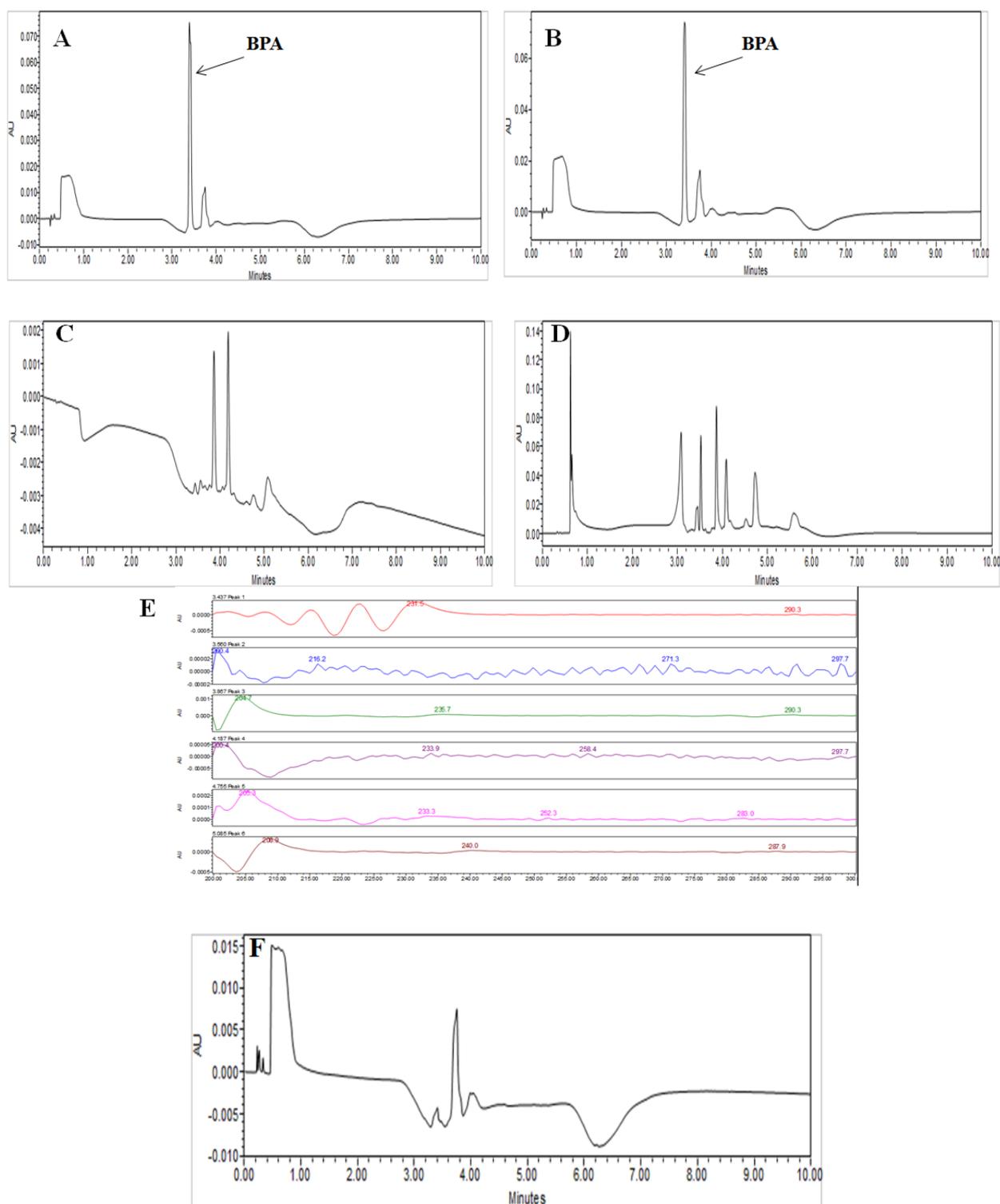


**Figure 50:** Gamme étalon de BPA préparée dans le milieu DMEM.

Nous avons également injecté en UPLC le milieu de culture des cellules contrôles après l'étape d'extraction par l'éther. Ceci nous a permis de confirmer l'absence d'interférent au BPA dans le milieu de culture DMEM (Fig. 51-F).

L'analyse UPLC du BPA extrait par l'éther du milieu de culture des cellules MCF7 après prélèvement à t0, t6h et t24h a montré que la concentration du BPA n'a pas été variée. En effet, comme le montre la figure 51, l'analyse UPLC a révélé la présence du BPA dans le milieu de culture après 6h (Fig. 51-A) et 24h (Fig. 51-B) sans diminution significative de l'absorbance par rapport au t0h (Fig. 49-A). L'aire du pic relative au BPA est de 314359 µV.sec ( $\pm 1,2\%$ ), 312913 µV. sec ( $\pm 1,8\%$ ), 310638µV.sec ( $\pm 2,11\%$ ) respectivement pour t0h, t6h et t24h.

Pour confirmer le résultat obtenu, nous avons analysé l'extrait du compartiment intracellulaire des cellules traitées par le BPA. Comme le montre la figure 51, le BPA ne semble pas pénétrer dans le compartiment intracellulaire. En effet, la dérivée seconde relative au BPA n'a pas été détectée. Ceci est valable pour 6h (Fig. 51-C, E) et 24h (Fig. 51-D, E) d'incubation.

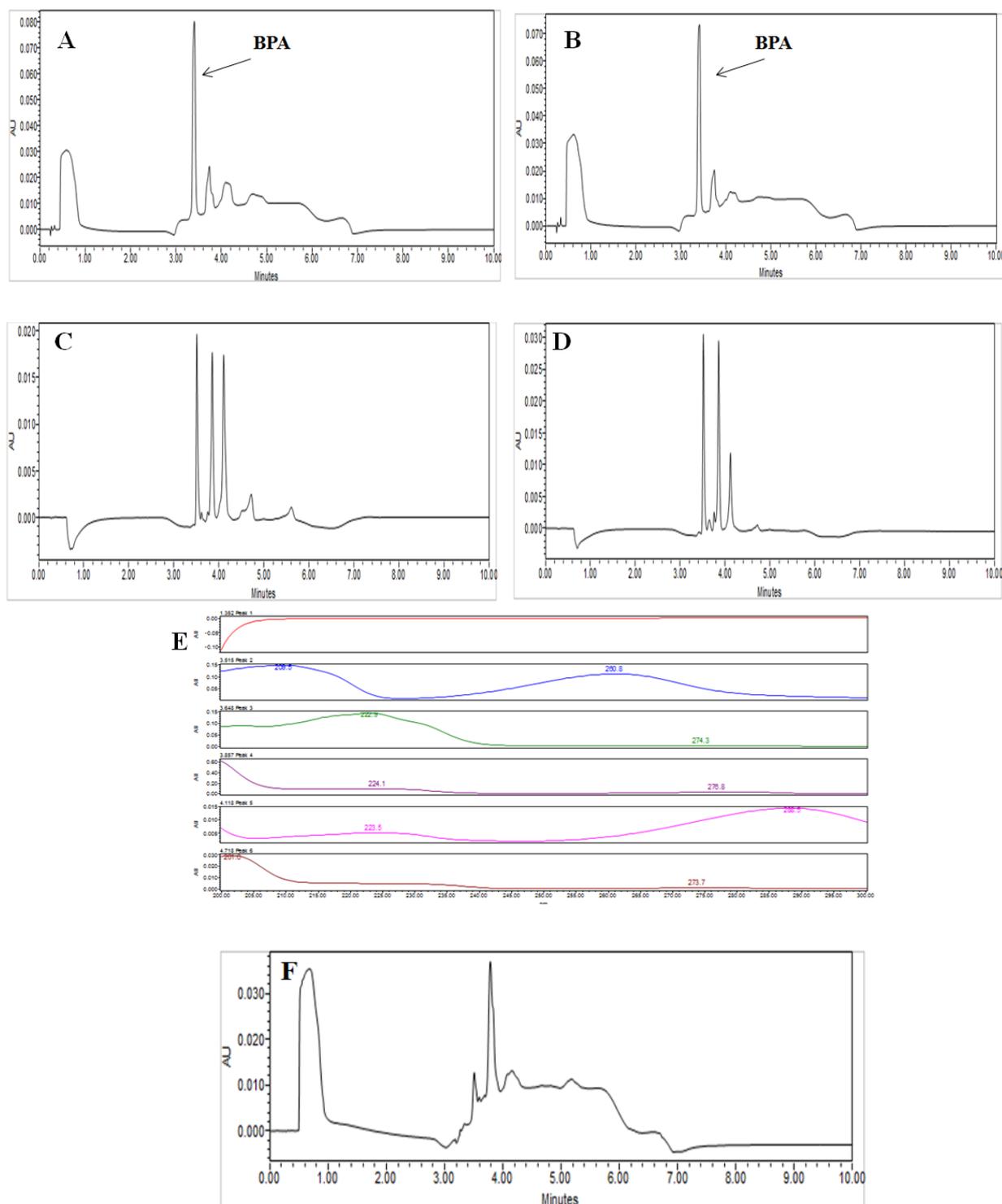


**Figure 51:** Analyse UPLC du milieu de culture des cellules MCF7 incubées avec BPA à 80 $\mu$ M. (A) extrait du milieu de culture après 6h d'incubation des cellules avec BPA. (B) extrait du milieu de culture après 24h d'incubation des cellules avec BPA. (C) extrait du compartiment intracellulaire après 6h d'incubation des cellules avec BPA. (D) extrait intracellulaire après 24h d'incubation des cellules avec BPA. (E) dérivée seconde des pics issus d'analyse du compartiment intracellulaire. AU (unité d'absorbance). (F) milieu de culture des cellules contrôles.

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

Concernant la lignée MDA-MB 231, les résultats d'analyse du BPA dans le milieu de culture sont illustrés figure 48. Nous avons observé que le pic relatif au BPA était visible sur le chromatogramme obtenu en UPLC. Ceci est valable pour les deux temps d'incubation 6h (Fig. 52-A) et 24h (Fig. 52-B). Par rapport au t<sub>0</sub>, aucune variation significative n'a été observée. L'aire du pic relative au BPA est de 312952  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  ( $\pm 1,7\%$ ) et de 309753  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  ( $\pm 2,36\%$ ) après 6h et 24h d'incubation.

L'analyse de l'extrait du compartiment intracellulaire a également confirmé l'absence du BPA dans les cellules après 6h (Fig. 52-C) et 24h (Fig. 52-D) d'incubation. La dérivée seconde du pic n'a pas été observé (Fig. 52-E).



**Figure 52:** Analyse UPLC du milieu de culture des cellules MDA-MB 231 incubées avec BPA à 80 $\mu$ M.

(A) extrait du milieu de culture après 6h d'incubation des cellules avec BPA. (B) extrait du milieu de culture après 24h d'incubation des cellules avec BPA. (C) extrait du compartiment intracellulaire après 6h d'incubation des cellules avec BPA. (D) extrait intracellulaire après 24h d'incubation des cellules avec BPA. (E) dérivée seconde des pics issus d'analyse du compartiment intracellulaire. AU (unité d'absorbance). (F) milieu de culture des cellules contrôles.

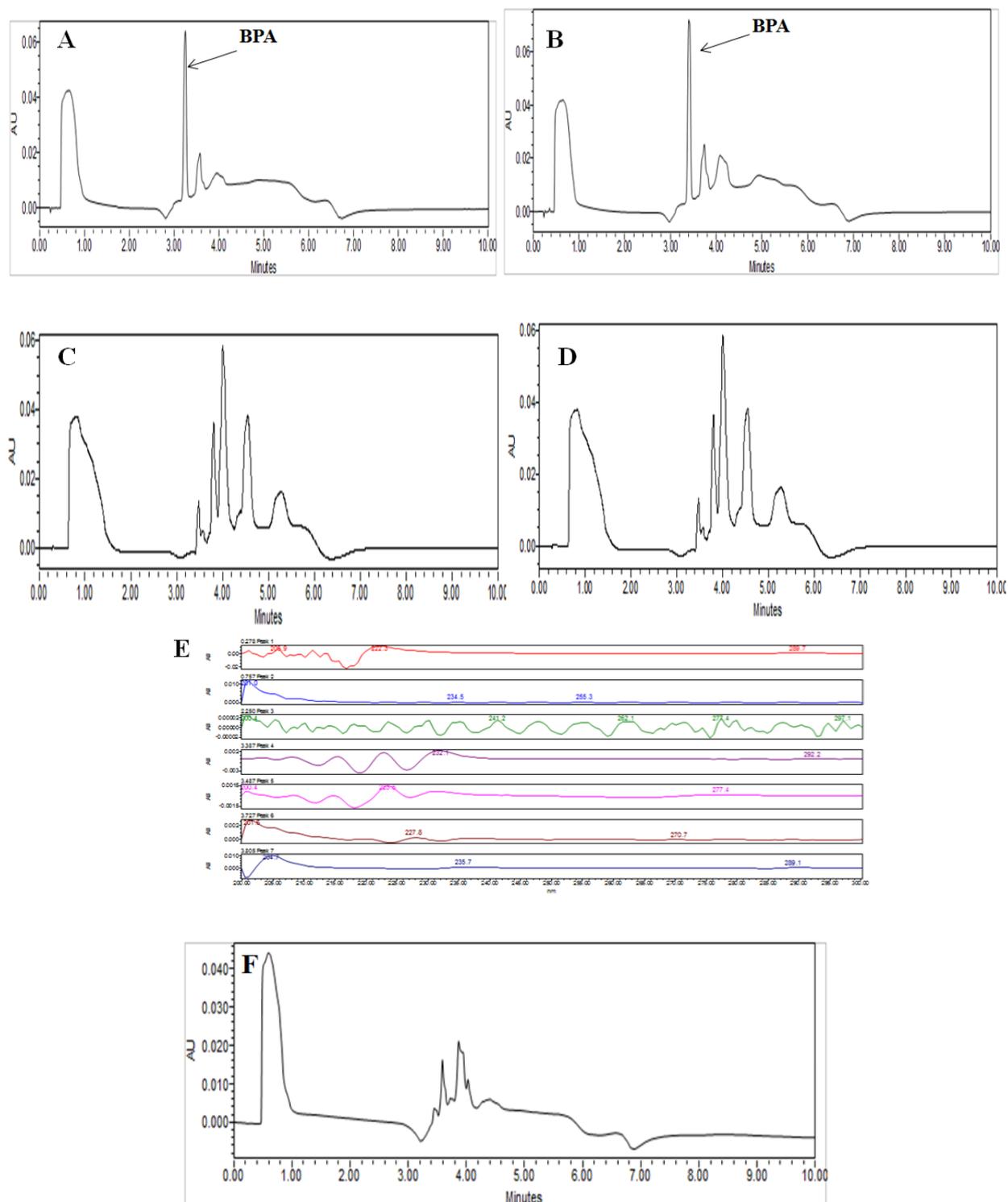
### *Chapitre III : Résultats et discussion*

Concernant la lignée HME1, l'analyse UPLC a montré que le BPA semblait aussi agir par voie extracellulaire.

Comme l'indique la figure 50, le pic relatif au BPA a été détecté uniquement dans le milieu de culture. Ceci est valable après 6h (Fig. 53-A) et 24h (Fig. 53-B) d'incubation. Par rapport au t0h aucune différence significative n'a été observée. L'aire du pic BPA est de 278657  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  ( $\pm 2,3\%$ ), 282710  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  ( $\pm 3,1\%$ ) et 292364 ( $\pm 4,7\%$ ) respectivement après 0h, 6h et 24h d'incubation.

Nous n'avons pas détecté BPA dans l'extrait intracellulaire des cellules après ces incubations (Fig. 53-C, Fig. 53-B). Ceci a été confirmé par l'absence de la dérivée seconde du BPA relatif au chromatogramme obtenu (Fig. 53-E).

Nous avons aussi vérifié l'absence d'interférences pour le dosage du BPA dans le milieu de culture MEBM (Fig. 53-F).



**Figure 53:** Analyse UPLC du milieu de culture des cellules HME1 incubées avec BPA à  $80\mu\text{M}$ . (A) extrait du milieu de culture après 6h d'incubation des cellules avec BPA. (B) extrait du milieu de culture après 24h d'incubation des cellules avec BPA. (C) extrait du compartiment intracellulaire après 6h d'incubation des cellules avec BPA. (D) extrait intracellulaire après 24h d'incubation des cellules avec BPA. (E) dérivée seconde des pics issus d'analyse du compartiment intracellulaire. AU (unité d'absorbance). (F) milieu de culture des cellules contrôles.

Selon ces résultats, il semblerait que le BPA agisse par voie extracellulaire sur les lignées MCF7, MDA-MB 231 et HME1. Nous avons détecté sa présence uniquement dans le milieu de culture et pas dans le compartiment intracellulaire. Les analyses UPLC ont également montré qu'en fonction du temps (entre t0h, 6h et 24h) n'y avait pas de différence au niveau de l'absorbance.

Cependant, (Stowell et al., 2006) ont rapporté que le BPA pourrait être présent dans le compartiment intracellulaire des cellules MCF7. En effet, après 36 h d'incubation des cellules MCF7 par BPA sulfaté (BPAS) à une concentration de 250µM, du BPA a été détecté par HPLC dans l'extrait intracellulaire. Ces auteurs ont rapporté que le BPAS a été désulfaté par l'estrone désulfatase exprimée dans les cellules MCF7, libérant ainsi du BPA dans le compartiment intracellulaire. Dans cette étude, le milieu de culture utilisé était le DMEM sans rouge du phénol supplémenté à 3% avec du SVF charcoal-stripped FBS (Hyclone).

Ainsi, par rapport à cette étude, il est probable que le temps d'incubation (6 et 24h), la concentration de SVF que nous avons testé (10%) limitent la pénétration du BPA dans le compartiment intracellulaire : par exemple, les hormones présentes dans le SVF limiteraient la translocation du BPA.

De plus, il est probable que la cellule ne présente pas de la perméabilité pour la forme libre du BPA et que seulement à travers l'activation de l'enzyme estrone désulfatase par BPAS, la cellule peut générer du BPA dans son compartiment intracellulaire. Pour mieux caractériser la voie d'action du BPA, il faudrait augmenter l'intervalle de temps de son dosage, le porter au-delà de 24h et augmenter sa concentration.

## ***CHAPITRE III:RESULTATS ET DISCUSSION***

### ***Partie 3 : Polluants et obésité***

### **III. Influence des polluants sur les adipocytes humains blancs**

Nous avons étudié l'effet *in vitro* des polluants sur la prolifération et la différenciation des pré-adipocytes blancs humains (HWP). Ceci a été mené afin d'identifier leurs potentiels sur l'accumulation du gras, facteur directement impliqué dans l'apparition de l'obésité. Différentes expérimentations ont été appliquées sur les préadipocytes et les adipocytes exposées aux polluants.

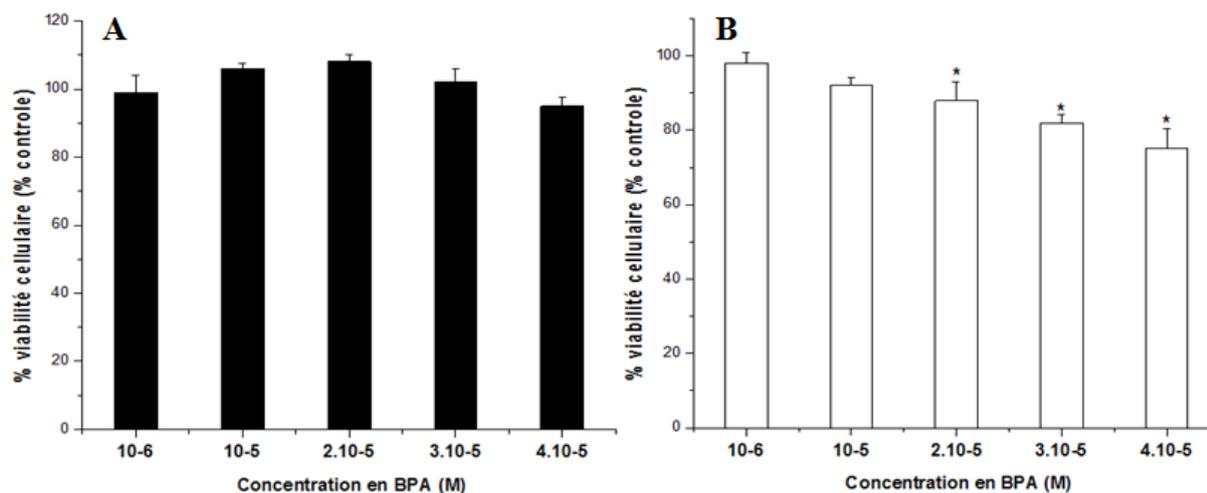
#### **III.1. Effets des polluants sur la viabilité des préadipocytes pendant la phase de prolifération**

Dans un premier temps nous avons évalué l'effet des polluants sur la viabilité cellulaire au cours de la phase de prolifération. Les cellules ont été traitées avec les polluants après un jour de culture en plaque à raison de 5000 cellules/puits. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé après 24 h et 72 h d'incubation par le test.

##### **III.1.1. Effet sur BPA sur la viabilité cellulaire de la lignée HWP**

L'incubation des cellules HWP avec BPA n'affecte pas la viabilité des cellules HWP après 24h d'incubation (Fig. 54-A). Ceci est valable pour les différentes concentrations testées.

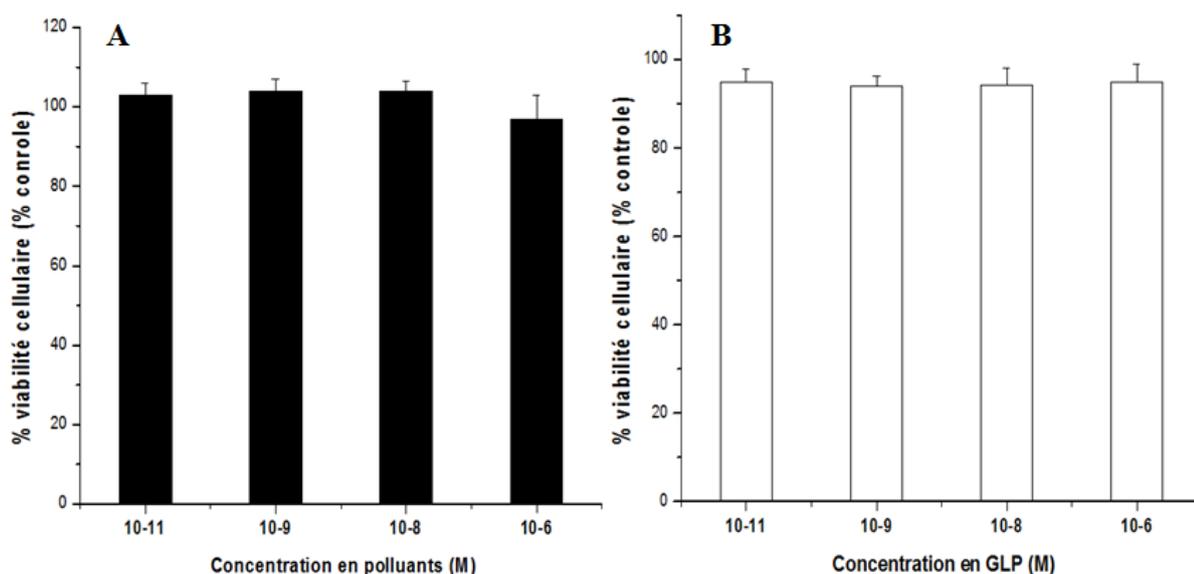
Cependant, après 72h d'incubation, BPA à des concentrations entre  $2.10^{-5}M$  et  $4.10^{-5}M$  présente un effet antiprolifératif. Cet effet est dépendant de la dose appliquée (Fig. 54-B). Par exemple, le pourcentage de la viabilité des cellules HWP diminue de 88,4% ( $\pm 5$ ) à 75,2% ( $\pm 5$ ) respectivement à  $2.10^{-5}M$  et  $4.10^{-5}M$ .



**Figure 54:** Effet du BPA sur la viabilité des cellules HWP après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

### III.1.2. Effet du GLP sur la viabilité cellulaire de la lignée HWP

Comme le montre la figure 56 l'incubation des HWP pendant 24h et 72h en présence du GLP n'affecte pas leur viabilité cellulaire. Ceci est valable pour les différentes concentrations testées. En effet, après 24h (Fig. 55-A) et 72h (Fig.55-B) d'incubation, aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles. Par exemple, le pourcentage de la viabilité cellulaire est de 97% ( $\pm 6,2$ ) et 95% ( $\pm 4,6$ ) respectivement après 24h et 72h d'incubation avec  $10^{-6}$ M GLP.

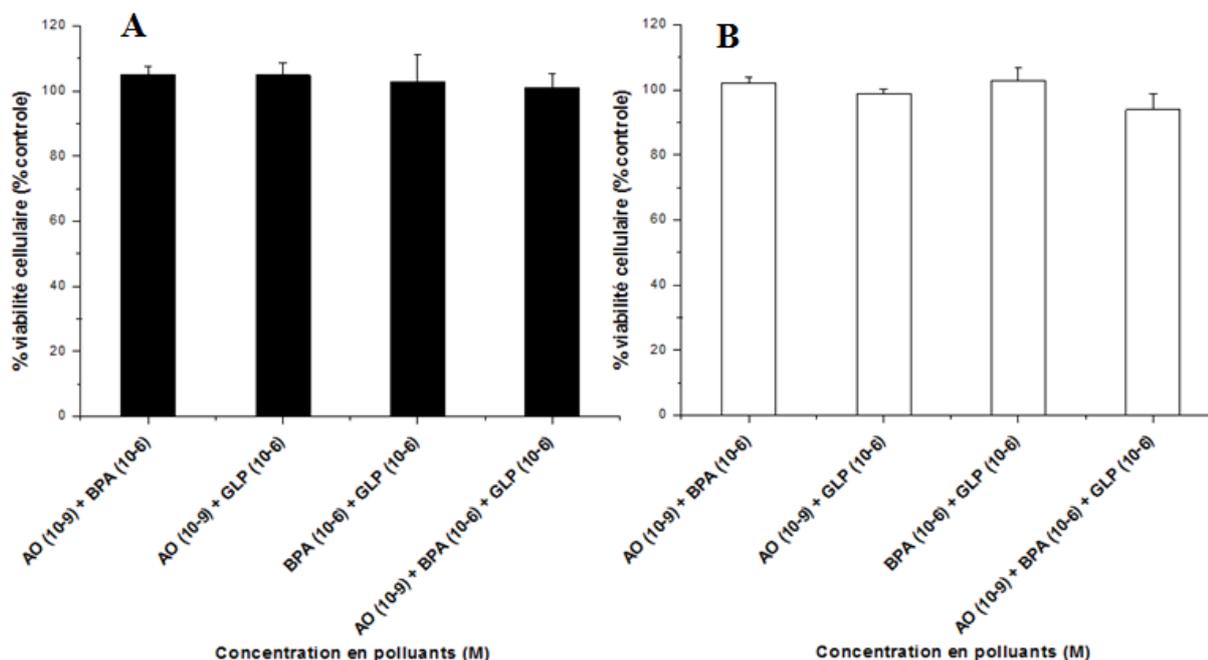


**Figure 55:** Effet du GLP sur la viabilité cellulaire après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

### III.1.3. Effet de l'AO sur la viabilité cellulaire de la lignée HWP.

L'incubation des HWP avec AO ( $10^{-9}$ M) n'a pas affecté la viabilité cellulaire. Nous avons obtenu un pourcentage de viabilité de 93% ( $\pm 2,05$ ) et 100% ( $\pm 6,4$ ) respectivement après 24h d'incubation. Ainsi, l'AO semble ne pas agir sur la viabilité des HWP.

Après avoir étudié l'effet de chaque polluant sur la viabilité de la lignée HWP, nous avons exposé les cellules à des combinaisons de polluants. Un mélange de 2 ou 3 polluants n'exerce aucun effet sur la viabilité des cellules HWP. Comme indiqué figure 56 aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles après 24h et 72h d'incubation. Prenons l'exemple d'incubation des HWP avec un mélange AO et BPA, la viabilité cellulaire est de 105% ( $\pm 2,7$ ) et de 102 ( $\pm 2$ ) respectivement après 24h et 72h d'incubation. Elle est de 101% ( $\pm 4,5$ ) et 94% ( $\pm 5$ ) après 24h et 72h d'incubation avec les 3 polluants.



**Figure 56:** Effet du mélange des polluants sur la viabilité des cellules HWP après 24h (A) et 72h (B) d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM),  $n=16$  répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p<0,01$ ).

Selon ces résultats, les polluants ne présentaient aucun effet sur la viabilité cellulaire. L'incubation avec un ou plusieurs mélanges n'affecte pas la viabilité des préadipocytes.

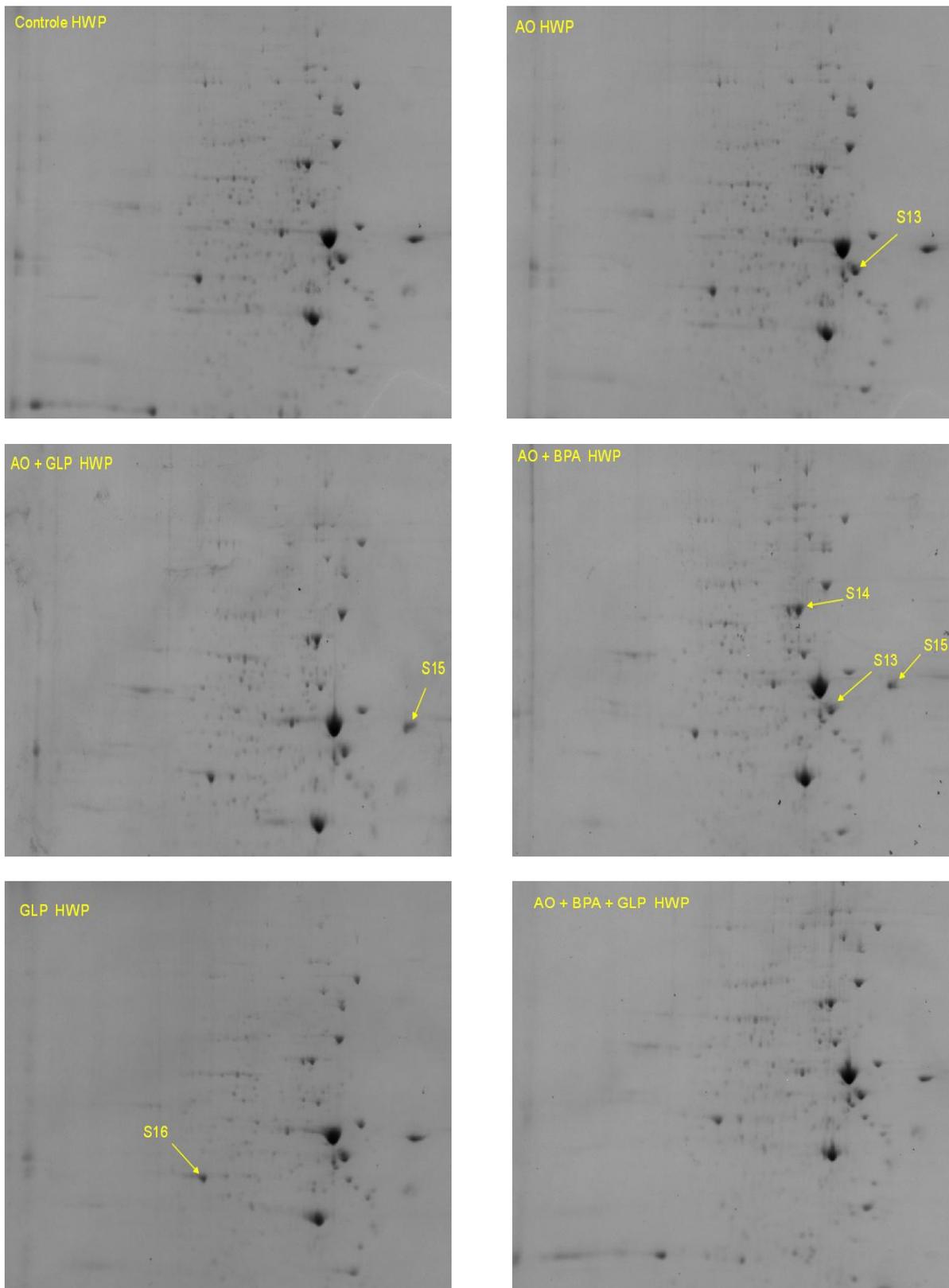
Dans ce contexte, il a été montré que l'incubation de la lignée de préadipocyte 3T3L1 (murine) avec BPA à 100 $\mu$ M provoquait l'apoptose. De l'ADN fragmenté a été révélé dans ces cellules. Également, des modifications morphologiques au niveau de ces cellules ont été observées. Ainsi, il est probable que le BPA déclenche l'apoptose dans les cellules HWP après 72h d'incubation à des concentrations au-delà de  $2 \cdot 10^{-5}$ M (Macis and Kostrominova, 2014).

Cependant, (Martini et al., 2012b) ont observé une diminution significative de la prolifération de préadipocytes 3T3L1 incubées avec une formulation commerciale de GLP pendant 48h. Cet effet antiprolifératif a été lié à une stimulation de l'activité de la caspase 3 impliquée dans l'apoptose. Aussi, une autre étude récente a montré que le GLP présentait un effet antiprolifératif sur la lignée 3T3-L1 (Martini et al., 2016).

Ainsi, l'effet du GLP sur la viabilité des préadipocytes pourrait être dépendant de l'origine de la lignée utilisée : humaine ou murine.

#### **III.1.4.Effet des polluants sur le profil protéomique des HWP**

Sachant que la viabilité cellulaire des HWP n'a pas été affectée par les polluants, nous avons analysé le profil protéomique des cellules après 24h d'incubation par les polluants. Ceci a été mené dans le but de vérifier si les polluants pouvaient affecter l'expression de protéines des HWP sans influencer sur la viabilité. L'analyse protéomique couplé à la MS/ MALDI-TOF a montré que certaines incubations avec les polluants ont affecté l'expression de certaines protéines. La figure 57 illustre les images de gels 2D obtenus pour la lignée HWP.



**Figure 57:** Images représentatives de gels 2-D (12% Acrylamide) des cellules HWP incubées avec les polluants.

Spots (S) montrant des différences de niveau d'expression sont numérotés et identifiés par MS/MALDI-TOF.

Les résultats de cette expérimentation sont illustrés sur le tableau 16. Nous avons observé que l'incubation des HWP avec AO+/- BPA stimulait l'expression de la protéine à fonction structurale TBB5 (S13) de deux fois plus par rapport aux cellules contrôles. Également, une augmentation au niveau de l'expression de la cal réticuline (CALR, S15) induite après incubation avec AO + GLP/BPA. La CALR est une protéine chaperon impliquée dans le maintien de protéines non totalement repliées dans le réticulum endoplasmique avant leur transport vers d'autres compartiments. Il a été rapporté que l'inhibition de l'expression de cette protéine stimule la différenciation de la lignée 3T3L1. En effet, il a été montré que la CALR pourrait diminuer l'expression des facteurs de transcription adipogénique (Michalak et al., 2009).

L'incubation de la lignée HWP avec AO+ BPA stimule l'expression de la protéine de stress HSP7C (S14). L'expression de la protéine ENOA (S16) est diminuée en présence du GLP.

**Tableau 16:** Identification des protéines modulées après incubation de la lignée HWP avec les polluants suite à une analyse MALDI-TOF

Polluants	Taux de variation	Spot	Protéine	Gène	Masse (Da)	Score de protéine
AO	2 x +	S13	Tubulin beta chain (TBB5)	TUBB	50095	189
GLP	2 x -	S16	Alpha-enolase (ENOA)	ENO1	47481	205
AO + GLP	2 x -	S15	Calreticulin (CALR)	CALR	48283	161
AO + BPA	2 x +	S13	Tubulin beta chain (TBB5)	TUBB	50095	189
AO + BPA	2 x +	S14	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C)	HSPA8	71082	83
AO + BPA	2 x -	S15	Calreticulin (CALR)	CALR	48283	161

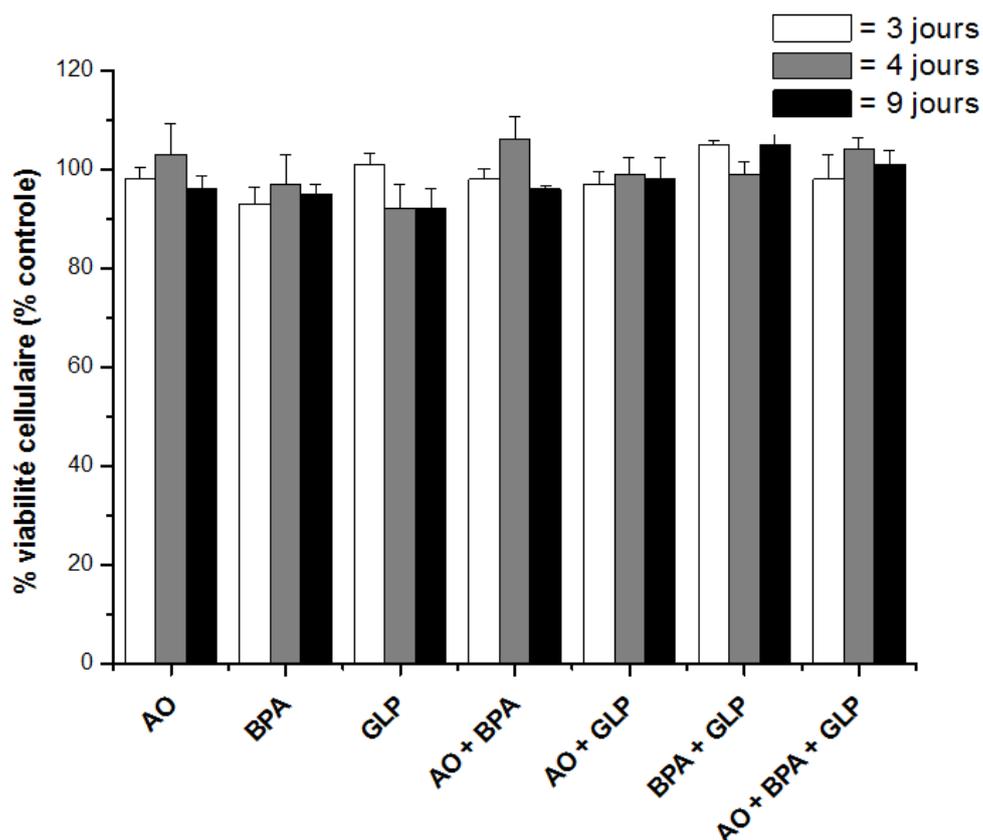
(Score =  $-10\log(P)$  où P est la probabilité que l'évènement ne soit pas du au hasard).

L'incubation avec les polluants, n'a pas affecté la viabilité cellulaire des HWP. Cependant, nous avons révélé une modification au niveau de l'expression de protéines après 24h d'incubation. Les protéines identifiées telles que TBB5, HSP7C, CARL, semble ne pas être impliquées dans la régulation de la prolifération des HWP. Ils pourraient probablement agir sur l'accumulation du gras durant l'adipogenèse sans affecter la viabilité des adipocytes.

### **III.2. Effet des polluants sur la viabilité des préadipocytes en phase de différenciation**

Les cellules après une phase de croissance dans les conditions de culture normales, ont été différenciées en présence des polluants seuls ou en mélange à des concentrations finales de : BPA ( $10^{-6}$ M), GLP ( $10^{-6}$ M) et AO ( $10^{-6}$ M). La mesure de la viabilité cellulaire par le test MTT a été réalisée après 3, 4 et 9 jours d'incubation. Les pourcentages de la viabilité obtenus sont illustrés sur la figure 58.

Les polluants ne présentent aucun effet sur la viabilité des adipocytes en différenciation. Ceci est valable après 3, 4 et 9 jours d'incubation avec les polluants. En effet, aucune différence significative n'est observée par rapport aux cellules contrôles. Prenons l'exemple d'une incubation des adipocytes avec un mélange de 3 polluants, la viabilité cellulaire est de 98 % ( $\pm 5$ ), 104% ( $\pm 2,4$ ) et de 101% ( $\pm 1,9$ ) respectivement après 3, 4 et 9 jours d'incubation. Elle est de 105% (3,9), 99% ( $\pm 3,4$ ) et de 92% ( $\pm 5,2$ ) après 3 et 9 jours d'incubation avec BPA + GLP.



**Figure 58:** Effet des polluants sur la viabilité des préadipocytes en phase de différenciation après 3, 4 et 9 jours d'incubation.

La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules contrôles (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), n= 16 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport au groupe non traité ( $p < 0,01$ ).

Nous avons démontré que le BPA, le GLP et l'AO seuls ou en mélange n'avaient aucun effet sur la viabilité des adipocytes durant la croissance et la différenciation respectivement à des concentrations de  $10^{-6}$ M,  $10^{-6}$ M et  $10^{-9}$ M.

Donc, ils n'affecteraient pas le cycle de vie des adipocytes. Il a été montré que le BPA à  $10^{-6}$ M n'affecte pas la viabilité des cellules stromales souches du tissu adipeux après 1, 2, 4 et 7 jours de différenciation. Alors qu'à cette concentration, une augmentation de l'expression du PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$  et LPL a été démontré par RT-PCR quantitative (Ohlstein et al., 2014).

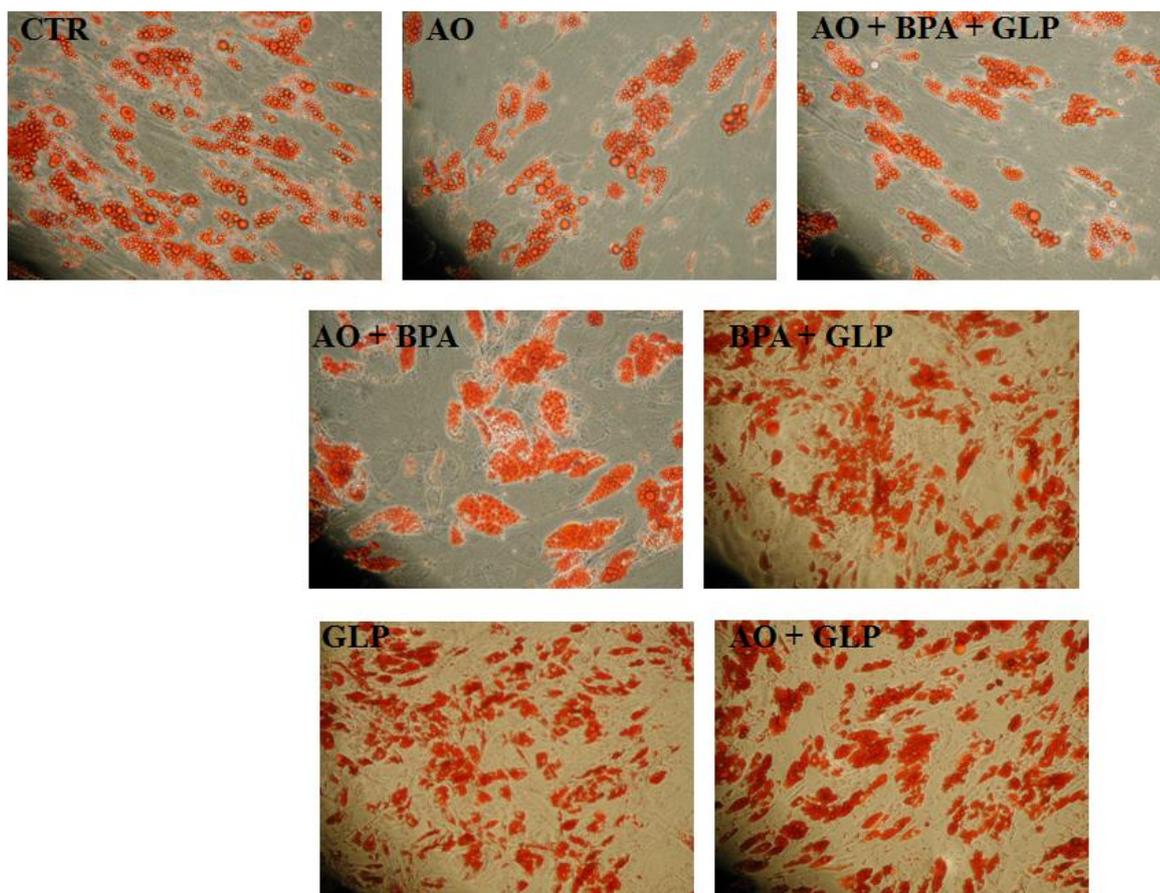
Également, certains produits naturels tels que le cas des cryptides marins peuvent agir sur le processus de la différenciation adipocytaire sans affecter la viabilité cellulaire mais en diminuant l'expression de certains marqueurs adipocytaires impliqués dans l'adipogenèse. Cette diminution pourrait induire une diminution de l'accumulation du gras et donc un ciblage de l'hyperplasie adipocytaire (Ben Henda et al., 2015).

Ainsi, les polluants pourraient agir sur l'expression de certains marqueurs adipocytaires impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique sans affecter la viabilité cellulaire.

### III.3. Effet des polluants sur la teneur de lipides résiduels des adipocytes matures

Les adipocytes en phase de différenciation ont été traités par les polluants pour évaluer leur effet sur la teneur en lipides finales. Les polluants seuls ou en mélange ont été ajoutés aux milieux de culture (Milieu de différenciation et milieu de nutrition) durant toute la phase de différenciation des pré-adipocytes humains blancs (J0 au jour J16). Les gouttelettes lipidiques accumulées dans le cytoplasme des cellules matures ont été colorées à l'huile rouge comme décrit dans le paragraphe VII.1 du chapitre II « Matériels et méthodes ». Nous avons observé par microscopie les cellules contrôles et les cellules incubées avec les polluants après coloration à l'huile rouge.

La figure 59 illustre les résultats de quantification de l'huile rouge fixée dans les adipocytes matures.



**Figure 59:** Observation microscopique (grossissement x 100) d'adipocytes blancs humains fixés et colorés à l'huile rouge.

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

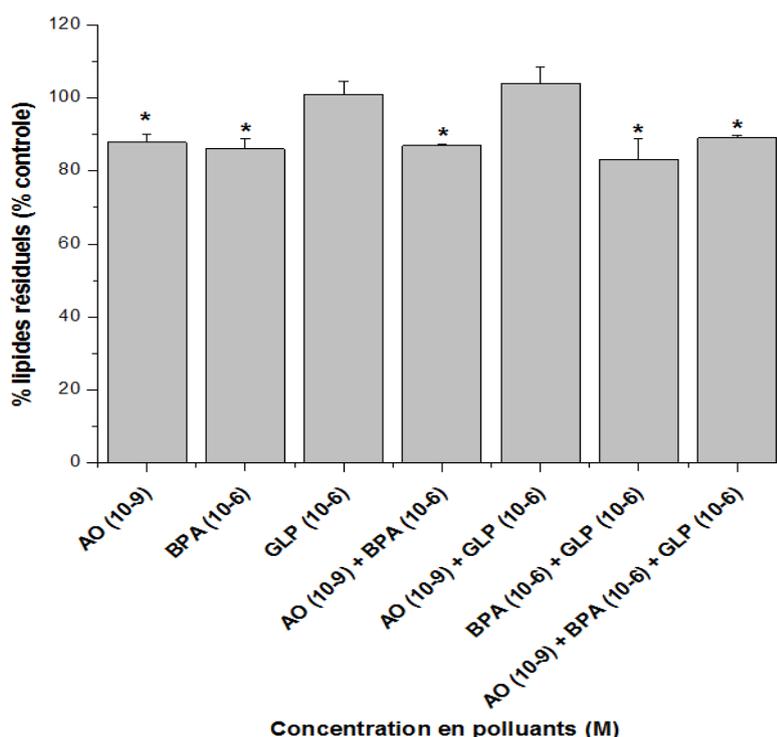
Selon les résultats illustrés sur la figure 60, il semblerait que l'incubation des adipocytes avec GLP seul ou plus l'AO n'affecterait pas la quantité de lipides accumulée par rapport aux cellules contrôles. En effet, le contenu lipidique est de 101% ( $\pm 3,49$ ) et 104% ( $\pm 4,5$ ) respectivement en présence de GLP seul ou avec l'AO.

Cependant, pour toutes les autres incubations testées, les observations microscopiques ont montré que les cellules traitées sont moins chargées en gouttelettes lipidiques que les cellules contrôles. Ces observations ont été confirmées par la mesure de la teneur lipidique. Par exemple, le contenu lipidique a diminué significativement de 14% ( $\pm 2,7$ ), 12,2% ( $\pm 2,4$ ) et de 13% ( $\pm 0,2$ ) respectivement après incubation des adipocytes en présence de BPA, AO et du mélange BPA+AO.

Ainsi, le BPA et l'AO agissaient pour diminuer l'accumulation des lipides. Sauf que selon les résultats obtenus, le caractère de l'effet combiné des 2 polluants sur la diminution de la teneur lipidique est ni additif ni synergique.

Comme nous avons indiqué que le GLP seul n'affecte pas la teneur lipidique des adipocytes, il semblerait que sa présence pourrait influencer l'effet de l'AO sur cette teneur. En effet, la quantification de la teneur lipidique résiduelle a montré qu'elle est de 87,8% ( $\pm 2,4$ ) et de 104% ( $\pm 4,5$ ) respectivement après incubation avec AO ou AO+GLP. Donc, l'effet anti-adipogénique de l'AO est atténué par la présence du GLP dans le milieu de culture. Cependant, ceci n'est pas valable pour le BPA où sa présence dans le milieu de culture avec le GLP n'affecte pas son effet anti-adipogénique. La teneur lipidique est de 86% ( $\pm 2,7$ ) après incubation des adipocytes par le BPA seul, et de 83% ( $\pm 5,8$ ) avec incubation par le BPA + AO qui reste une différence non significative.

Le mélange de 3 polluants a aussi diminué la teneur en lipides résiduelles de 11% ( $\pm 0,89$ ), diminution significative par rapport aux cellules contrôles. Nous n'avons pas observé ni effet additif ni synergique des polluants sur la diminution de quantité de lipides. En effet, les pourcentages de diminution sont de 14% ( $\pm 2,7$ ), 12% ( $\pm 2,4$ ) et 13% ( $\pm 0,2$ ) respectivement après incubation avec BPA, AO et BPA+ AO.



**Figure 60:** Effet des polluants sur la teneur en lipides résiduelle des adipocytes matures. Les cellules ont été traitées pendant la phase de différenciation (du jour 0 au jour 16) avec les polluants : seuls ou en mélange. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), avec  $n=6$  répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport aux cellules contrôles ( $p < 0,05$ ).

#### III.4. Effet des polluants sur l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire

Nous avons montré précédemment que l'incubation des adipocytes durant la phase de différenciation avec les polluants induisait une diminution significative de la teneur en lipides totaux. Dans le but de confirmer ces résultats et caractériser les éléments responsables de cette diminution, nous avons mesuré l'expression du facteur de transcription pro-adipogénique PPAR- $\gamma$  et de gènes spécifiques de la régulation de la différenciation adipocytaire (LPL, aP 2) par PCR quantitative. Comme nous avons décrit dans le chapitre I, PPAR- $\gamma$  contrôlait l'expression des gènes LPL et aP2

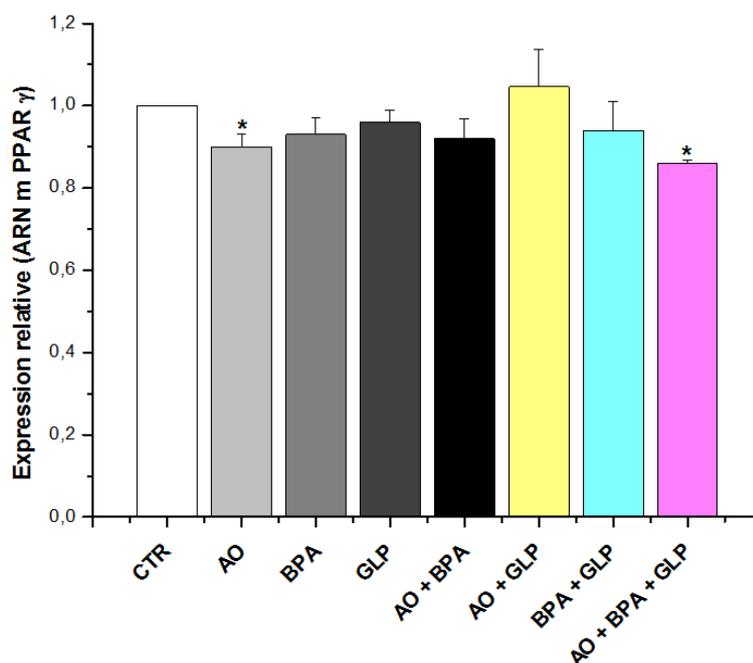
La figure 61 illustre l'effet des polluants sur l'expression relative de l'ARN m du PPAR- $\gamma$ . Comme est indiqué, le niveau d'expression du gène PPAR- $\gamma$  semble être affecté uniquement après incubation des adipocytes avec AO ou le mélange de 3 polluants. En effet, le niveau de l'expression de l'ARN m a diminué respectivement de 8,3% ( $\pm 0,03$ ) et de 26% ( $\pm 0,078$ ) par rapport au contrôle.

Pour les autres incubations testées, aucune différence significative n'est observée entre les cellules traitées et les cellules contrôles. Par exemple, le niveau d'expression de l'ARN m est de 0,93 ( $\pm 0,04$ ), 0,91 ( $\pm 0,03$ ) et 1,04 ( $\pm 0,09$ ) respectivement après incubation des adipocytes avec BPA ou AO et BPA+AO.

Selon ces résultats, la diminution de la quantité de lipides résiduels dans les adipocytes exposés aux polluants pourrait être dépendante /indépendante de la voie de régulation de l'expression du gène PPAR- $\gamma$ . Par exemple, l'AO a diminué la quantité de lipides résiduels de 13% (Fig. 60) qui est due à la diminution de l'expression du gène PPAR- $\gamma$  de 8% (Fig. 58). Donc, AO agissait sur l'adipogenèse par voie PPAR- $\gamma$  dépendante.

Alors que pour le BPA, une diminution de la quantité de lipides résiduels a été aussi observée (Fig. 60) sauf qu'aucun effet n'a été observé sur l'expression du gène PPAR- $\gamma$  (Fig. 61). Ainsi, l'effet anti-adipogénique du BPA est indépendant de la voie du PPAR- $\gamma$ . Les travaux de Linehan et al (2012) ont rapporté que le BPA présentait un effet anti-adipogénique sur la lignée 3T3-L1. Ils ont démontré par RT-PCR quantitative et Western blot que cet effet a été le résultat d'une diminution au niveau l'expression de l'ARN m relatif au gène C/EBP  $\alpha$  sans affectée celle du gène PPAR- $\gamma$  (Linehan et al., 2012b).

Ainsi, probablement l'effet du BPA sur l'accumulation des lipides dans les adipocytes humains est dépendant de la voie C/EBP  $\alpha$  et non pas de PPAR- $\gamma$ .



**Figure 61:** Effet des polluants sur l'expression d'ARN m du PPAR- $\gamma$ .

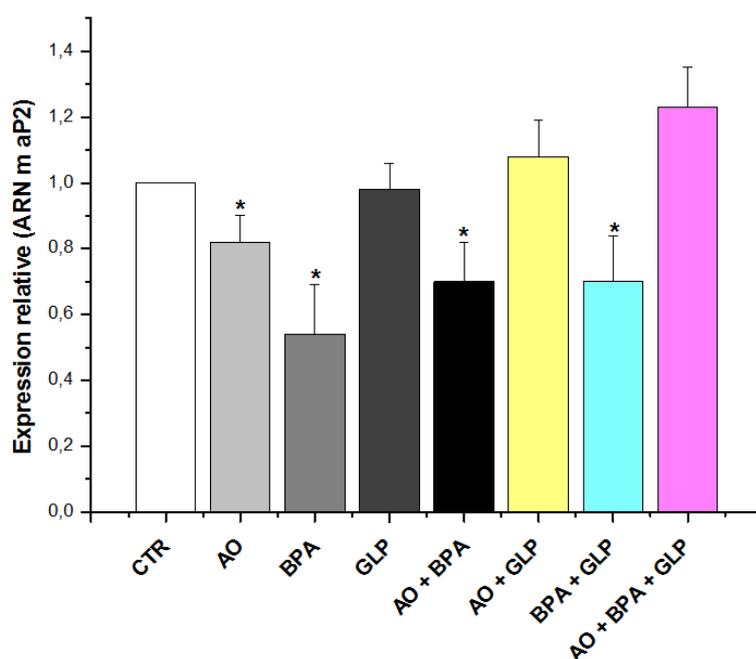
Les cellules ont été traitées au cours de la différenciation du jour 0 au jour 16, en présence d'un ou plusieurs polluants. Les niveaux d'expression relatifs d'ARN m ont été mesurés par PCR quantitative par rapport aux niveaux d'expression des ARN m dans les cellules contrôles (=1,0), après normalisation à l'aide du niveau d'expression de l'ARN m de la  $\beta$ -actine. Les valeurs sont exprimées en  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), avec n= 4 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport aux cellules contrôles.

Afin de mieux évaluer l'effet des polluants sur le déroulement de l'adipogenèse, nous avons cherché à mesurer le niveau d'expression de l'ARN m de deux marqueurs de la différenciation adipocytaire : aP 2 et LPL.

Comme le montre la figure 62, l'expression du gène aP2 a diminué significativement par rapport aux cellules contrôles. Ceci est valable pour les différentes incubations testées. Sauf pour le GLP+/-AO l'expression de l'ARN de l'aP2 n'est pas affectée. En effet, suite à une incubation avec BPA, une réduction d'expression d'environ deux fois du gène aP2 ( $0,54 \pm 0,15$ ) par rapport aux cellules contrôles est observée. Cette réduction semble être la plus importante par rapport aux autres incubations ayant affectées l'expression relative à ce gène. Cette diminution d'expression est aussi observée en ajoutant le GLP au BPA avec un niveau d'expression de l'ARN m de  $0,7 (\pm 0,14)$ . Sachant que le GLP seul ne présente aucun effet sur l'expression du gène aP2 ( $0,98 \pm 0,08$ ), combiné au BPA, il n'altère pas l'effet de ce dernier sur l'expression de ce gène. Donc, nous avons confirmé que GLP n'affecte pas l'effet anti-adipogénique observé du BPA.

Cependant ceci n'est pas valable pour l'AO. En effet l'incubation avec l'AO a diminué significativement l'expression du gène aP2 dans les adipocytes de 17% ( $\pm 0,08$ ). Cet effet semble être affecté par le GLP : comme le montre la figure 62 l'incubation avec GLP+ AO n'a pas affecté cette expression. Ceci a été également confirmé avec les résultats précédents. GLP affecte donc l'effet anti-adipogénique de l'AO : l'expression de l'ARN m a diminué de 1,08 ( $\pm 0,11$ ) après incubation avec AO+ GLP à 0,82 ( $\pm 0,08$ ) en présence d'AO seul.

Nous avons observé que AO+BPA+GLP, ensemble n'affecte pas l'expression du gène aP2. Le niveau d'expression est de 1,25 ( $\pm 0,2$ ), non significative par rapport aux cellules contrôles. Cependant, dans les résultats précédents nous avons montré que cette incubation diminuait significativement le contenu lipidique des adipocytes de 11% ( $\pm 0,8$ ) (Fig. 60) et l'expression de l'ARN m de PPAR- $\gamma$  (Fig.61). Donc, probablement l'effet anti-adipogénique de cette incubation affectait l'expression d'un autre facteur de transcription adipocytaire.



**Figure 62:** Effet des polluants sur l'expression d'ARN m de l'aP2.

Les cellules ont été traitées au cours de la différenciation du jour 0 au jour 16, en présence d'un ou plusieurs polluants. Les niveaux d'expression relatifs d'ARN m ont été mesurés par PCR quantitative par rapport aux niveaux d'expression des ARN m dans les cellules contrôles (=1,0), après normalisation à l'aide du niveau d'expression de l'ARN m de la  $\beta$ -actine. Les valeurs sont exprimées en  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), avec n= 4 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport aux cellules contrôles.

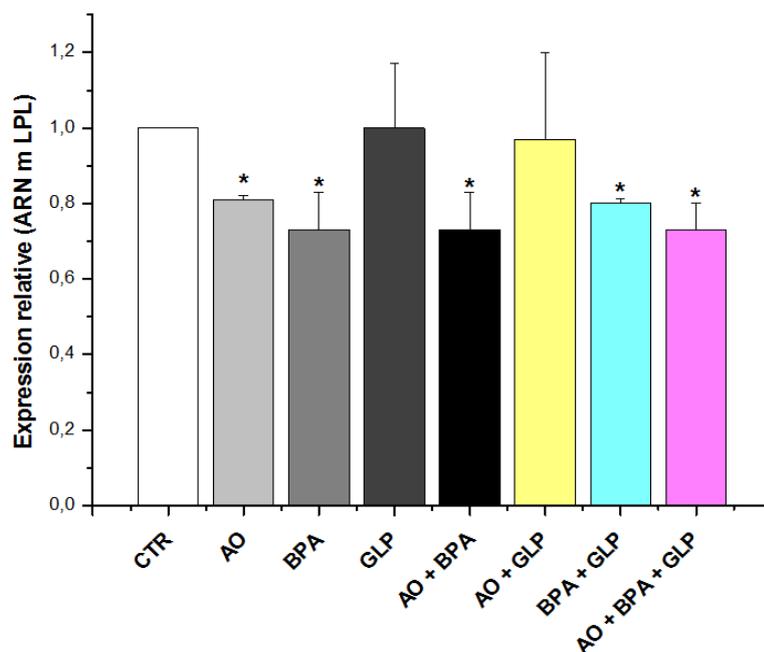
### *Chapitre III : Résultats et discussion*

Concernant le niveau d'expression de l'ARN m relatif au gène LPL, l'incubation des adipocytes en présence du GLP +/- AO n'a pas eu d'incidence sur l'expression de ce gène (Fig. 63). En effet, le niveau d'expression de l'ARN m est respectivement de 1,06 ( $\pm 0,17$ ) et 0,97 ( $\pm 0,23$ ).

Pour les autres incubations testées, le niveau d'expression du gène LPL a diminué significativement par rapport aux cellules contrôles. Par exemple, suite à une incubation par un mélange BPA + AO/GLP, le niveau d'expression du gène a diminué : il est respectivement de 0,73 ( $\pm 0,1$ ) et 0,8 ( $\pm 0,1$ ).

Nous avons également observé que GLP affectait l'effet de l'AO sur l'expression du gène LPL. En effet, l'exposition des cellules à un mélange AO, GLP n'a pas diminué l'expression du gène, sachant qu'avec AO seul, l'expression de l'ARN m du LPL a diminué dans les adipocytes. Elle est de 0,81 ( $\pm 0,02$ ). Une diminution de l'expression de ce gène est aussi observée après exposition des adipocytes au BPA seul. Pour le BPA, nous avons aussi observé une diminution significative de l'expression de ce gène. Cette diminution n'est pas affectée par l'AO. Le niveau d'expression de l'ARN m LPL est de 0,73 ( $\pm 0,1$ ) et 0,73 ( $\pm 0,1$ ) respectivement avec BPA et le mélange BPA, AO.

Concernant l'incubation avec les 3 polluants, le niveau d'expression a diminué de 26% ( $\pm 0,07$ ) par rapport aux cellules contrôles.



**Figure 63:** Effet des polluants sur l'expression d'ARN m de LPL.

Les cellules ont été traitées au cours de la différenciation du jour 0 au jour 16, en présence d'un ou plusieurs polluants. Les niveaux d'expression relatifs d'ARN m ont été mesurés par PCR quantitative par rapport aux niveaux d'expression des ARN m dans les cellules contrôles (=1,0), après normalisation à l'aide du niveau d'expression de l'ARN m de la  $\beta$ -actine. Les valeurs sont exprimées en  $\pm$  écart à la moyenne (SEM), avec n= 4 répétitions. (\*) Indique une différence significative par rapport aux cellules contrôles.

Le tissu adipeux constitue une source d'énergie pour l'organisme. La dérégulation de ses fonctions pourrait aboutir à l'apparition de l'obésité, résultat d'une suraccumulation des lipides ayant un risque d'atteinte par d'autres maladies.

Nous avons étudié l'impact de BPA, AO et GLP sur le cycle de vie des pré-adipocytes. Les résultats ont montré que ces 3 polluants seuls ou en mélange n'ont pas d'incidence sur la viabilité des pré-adipocytes, à l'exception du BPA ayant un effet antiprolifératif à des doses supérieures à  $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Le test de coloration à l'huile rouge utilisé pour quantifier la teneur en lipides résiduels a démontré que ces polluants diminuent l'accumulation du gras. Sauf, l'incubation avec GLP+/- AO n'affecte pas la quantité de lipides.

Afin de comprendre la voie impliquée dans cet effet, nous avons mesuré par RT-QPCR quantitative le niveau d'expression de l'ARN m du gène PPAR- $\gamma$ , et de deux facteurs transcriptionnels de la différenciation adipocytaire : LPL et aP2.

Les résultats ont montré que les polluants n'affectent pas l'expression du gène PPAR- $\gamma$  à l'exception d'une incubation avec AO+/- (BPA + GLP) diminuant l'expression de ce gène. Une diminution de l'expression des gènes relatifs à LPL et aP2 a été aussi démontrée.

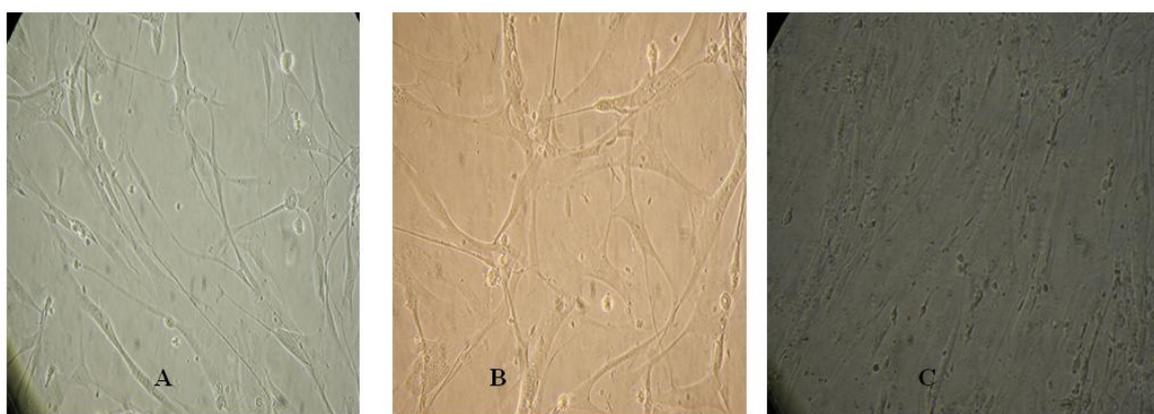
AO, BPA présentent **un effet anti-adipogénique** sur la lignée HWP, sont respectivement dépendant et indépendant de la voie de régulation du gène PPAR- $\gamma$ . Leur effet combiné est ni additif ni synergique. GLP affecte l'effet anti-adipogénique de l'AO mais pas celui de BPA.

La caractérisation de l'effet du GLP et AO sur les adipocytes n'est pas bien étudié jusqu'à présent. Ainsi, nous avons montré que pour la lignée HWP, GLP ne présente aucun effet sur l'adipogénèse. AO présente un effet anti-adipogénique.

Concernant le BPA, plusieurs études ont étudié son effet sur l'adipogénèse. Certaines ont caractérisé le BPA en tant qu'obésogène, d'autres ont démontré son effet anti-adipogénique. Ces effets sont dépendants des conditions expérimentaux liés à l'origine de la lignée de préadipocytes testée (humaine ou murine), concentrations testées...

#### IV. Etude de l'effet du sécrétome des préadipocytes sur la viabilité des cellules cancéreuses

Au niveau de cette partie, nous avons procédé à la culture de préadipocytes dans un gradient du milieu de croissance/DMEM pour adapter cette lignée au milieu de culture des cellules cancéreuses dans le but d'étudier l'interaction entre les deux lignées. Toutefois, selon les observations microscopiques effectuées nous avons remarqué que les préadipocytes ont été nécrosés en présence du DMEM comme l'indique la figure 64.

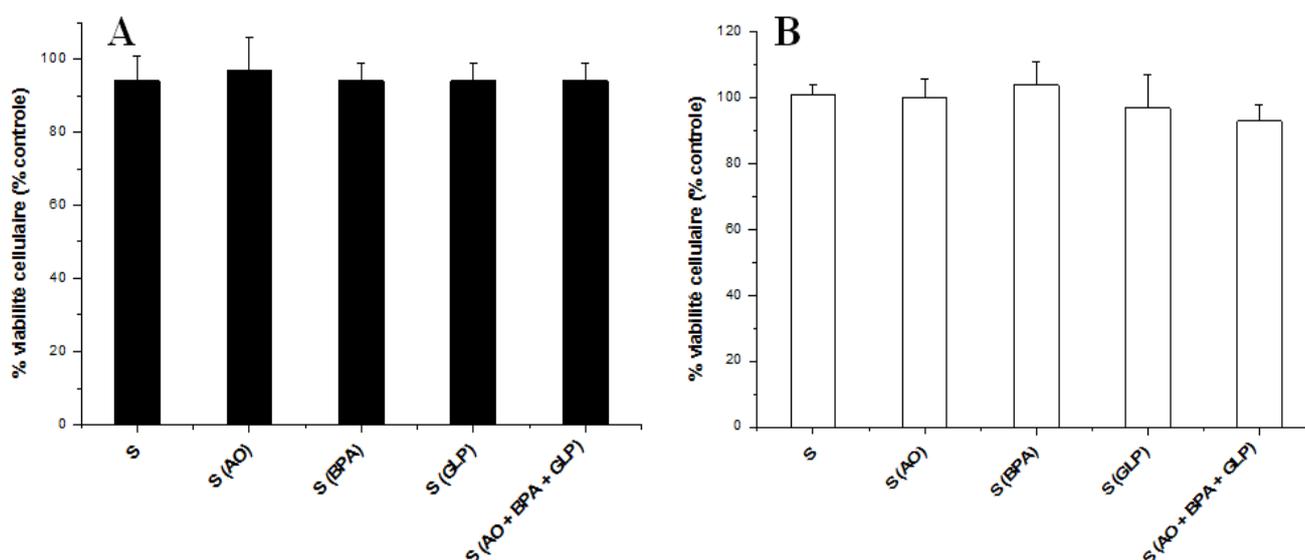


**Figure 64:** Observation microscopique (G 20X) de HWP cultivés en milieu de croissance(A), gradient 90% milieu de croissance (B), et 90% milieu DMEM (C).

Suite à ce résultat obtenu, nous avons procédé à la culture des cellules cancéreuses par le milieu de croissance et à leur incubation avec le sécrétome (S) de HWP (incubées pendant 24h avec les polluants).

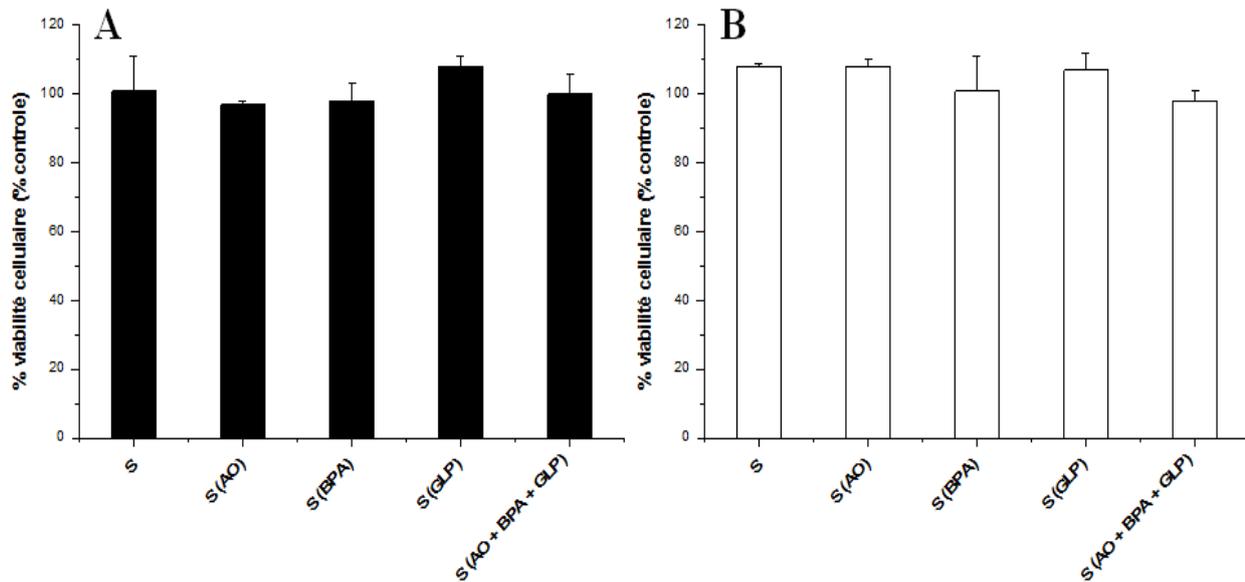
Selon les résultats illustrés sur les figures 65 et 66 les incubations des cellules cancéreuses avec le sécrétome (S) de HWP (incubées 24h avec les polluants) n'affectent la viabilité cellulaire après 24h (A) et 72h (B) d'incubation. Ceci est valable pour les 5 incubations testées (S, S(AO), S(BPA), S (GLP), S (AO, BPA, GLP)). En effet, par rapport aux cellules contrôles (incubées dans du milieu croissance), aucune différence significative n'est observé.

Par exemple, après 72h d'incubation avec S HWP, la viabilité cellulaire est 93% ( $\pm 5$ ) et 100% ( $\pm 1,8$ ) respectivement pour la lignée MDA-MB 231 (Fig. 65-B) et MCF7 (Fig. 66-B).



**Figure 65:** Effet du sécrétome de HWP sur la viabilité des cellules MDA-MB 231 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation avec sécrétome (S) HWP, S (HWP, AO), S (HWP,BPA), S (HWP, GLP), S (AO, BPA, GLP).

Les cellules MDA-MB 231 ont été incubées avec le sécrétome des cellules HWP (incubées 24h avec les polluants avant récupération du sécrétome).



**Figure 66:** Effet du sécrétome de HWP sur la viabilité des cellules MCF7 après 24h (A) et 72h (B) d'incubation avec sécrétome (S) HWP, S (HWP, AO), S (HWP,BPA), S (HWP, GLP), S (AO, BPA, GLP).

Les cellules MCF7 ont été incubées avec le sécrétome des cellules HWP (incubées 24h avec les polluants avant récupération du sécrétome).

Selon les résultats obtenus au niveau de cette partie, nous avons constaté que le sécrétome des HWP à différents stades de maturation n'a pas stimulé la prolifération des cellules cancéreuses. Ceci est probablement lié au fait que la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses par les adipokines nécessite l'établissement d'un contact direct entre les préadipocytes et les cellules cancéreuses pour stimuler la prolifération de ces dernières. En effet, les travaux de Béatrice et al (2011) ont montré que l'invasivité de la lignée du cancer de sein humain ZR- 75 1 est stimulée en présence du sécrétome issu de la coculture de cette dernière avec les adipocytes murins (3T3). Aucune stimulation n'a été observée suite à l'incubation des cellules ZR- 75-1 en présence du sécrétome d'adipocytes matures non cocultivés avec les cellules cancéreuses (Dirat et al., 2011).

Pour mieux étudier l'effet du sécrétome de HWP sur les lignées cancéreuses MCF7 et MDA-MB 231, il serait intéressant de procéder à la co-culture de ces dernières avec HWP et caractériser l'effet du sécrétome obtenu suite à la co-culture sur la viabilité des cellules MCF7 et des cellules MDA-MB 231 par exemple par l'utilisation de système de coculture favorisant un transfert membranaire entre les cellules.

*Conclusion générale*

## ***CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES***

## *Conclusion générale*

Les polluants environnementaux constituent une menace pour la santé humaine. Leur présence dans notre organisme pourrait modifier certaines fonctions dans les cellules. Ils sont capables de modifier l'expression de gènes et l'activité de certaines protéines. Certains d'entre eux sont susceptibles de mimer l'action d'hormones, regroupés sous le nom de perturbateurs endocriniens. Leur présence dans notre organisme (urine, sérum, sang) démontrée par plusieurs études épidémiologiques, a été corrélée à un risque d'atteinte par le cancer du sein et l'obésité. Ils étaient caractérisés par un effet cancérigène ou obésogène.

En tant que constituant majeur du microenvironnement tumoral, les cellules graisseuses pourraient interagir avec les cellules cancéreuses via les sécrétions cellulaires. L'effet de polluants environnementaux sur cette interaction reste mal connu.

L'objectif global de ce travail a consisté à étudier l'effet de polluants : BPA, GLP et AO seul ou en mélange sur l'aggravation de risque de cancer du sein en lien avec l'obésité. Deux modèles de cancer du sein : MCF7, MDA-MB 231, un modèle de cellules épithéliales mammaires HME1 et un modèle de préadipocytes humain HWP ont été utilisés.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'influence des polluants sur la viabilité cellulaire. Les cellules ont été incubées avec les polluants. Après 24h et 72h d'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test MTT. Cette étude a démontré que la stimulation de la viabilité cellulaire semble se produire par BPA ou GLP uniquement sur la lignée MCF7 qui est hormono-dépendante par rapport aux autres lignées testées. BPA en tant qu'un perturbateur endocrinien agissait à travers la voie RE, nous avons donc mis l'hypothèse que GLP pourrait jouer le rôle d'un perturbateur endocrinien. Nous avons également observé que l'effet sur la viabilité cellulaire pourrait être dépendant de l'incubation et de la lignée testée. Par exemple, combiné ensemble, GLP et BPA ne stimulait pas la viabilité cellulaire des cellules MCF7 donc l'effet de polluants est ni synergique ni additif. Ceci est valable pour toutes les lignées testées. Cependant, ce n'est pas le cas avec la lignée HME1 où nous avons montré que le mélange de polluants présentait un effet antiprolifératif sachant que l'incubation avec un seul polluant n'a pas affecté la viabilité cellulaire. Ainsi selon les incubations, les cellules saines tout comme les cellules cancéreuses réagissent différemment aux polluants.

## *Conclusion générale*

### ***Comment ces polluants agissaient sur la viabilité cellulaire ?***

Dans le but de répondre à cette question, deux approches ont été menées. Nous avons utilisé l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) couplée à une analyse MS/MALDI-TOF pour analyser le profil protéomique au niveau des cellules incubées avec les polluants.

Nous avons observé que les polluants affectaient le niveau d'expression de plusieurs protéines. Soit une surexpression ou une sous expression par rapport aux cellules contrôles. Ces protéines impliquaient dans divers mécanismes : protéines de structure (K2C8, TBB5...), protéines de stress (HSP60, HSP7C...), protéines chaperons (PDIA1, PDIA6). Pour la lignée MCF7 nous avons observé que l'incubation avec BPA ou GLP stimulait la viabilité cellulaire. L'analyse protéomique a montré une augmentation au niveau de l'expression de RSSA avec BPA et de K1C18 avec GLP. Donc, probablement l'augmentation de leur expression pourrait augmenter la viabilité cellulaire.

Toutefois, AO seul n'a pas stimulé la viabilité cellulaire de MCF7 alors que l'analyse protéomique a montrée une surexpression de RSSA avec une sous expression de K1C18. Donc, il est possible que la diminution de l'expression de K1C18 affecte l'effet de RSSA sur la viabilité cellulaire.

Ensemble, les polluants n'affectaient pas la viabilité cellulaire, nous n'avons pas observé sur le profil protéomique une augmentation de l'expression de ces protéines ce qui pourrait donc expliquer le résultat observé.

Également, pour les incubations où la viabilité cellulaire n'a pas été affectée, nous avons observé une modification au niveau de l'expression de certaines protéines. Comme réponse au stress généré par le polluant, il est probable que la modification de l'expression de ces protéines constituerait une voie d'adaptation ou de maintien de la viabilité cellulaire à la condition de stress. Par exemple, seul ou combiné les polluants n'affectaient pas la viabilité de la lignée MDA-MB 231. L'analyse protéomique a montré une modification au niveau de plusieurs protéines : surexpression (HSP7C, PDIA1, K2C8) ou sous expression (TBB5) qui pourraient favoriser le maintien de la viabilité cellulaire sans l'affecter.

Comme deuxième approche nous avons mesuré l'activité des protéines phosphatases, les résultats ont montré que les polluants n'affectaient pas leur activité. Cependant, seulement le mélange de polluant a stimulé leur activité avec la lignée HME1. Donc, nous avons suggéré que

## *Conclusion générale*

la stimulation de l'activité de ces protéines phosphatases pourrait jouer un rôle dans la diminution de la viabilité des cellules HME1.

Ainsi selon les résultats obtenus, les cellules saines tout comme les cellules cancéreuses agissaient différemment vis-à-vis aux polluants.

Au niveau de cette partie il serait donc envisagé d'utiliser des inhibiteurs pour les RE pour mieux caractériser le mécanisme d'action du BPA et GLP, analyser le profil protéomique par d'autres méthodes (Western blot, RT-QPCR) et étudier les effets sur d'autres paramètres outre que la viabilité cellulaire tels que la migration, l'invasion cellulaire et effet sur la chimiothérapie.

### ***Ces effets sont ils liés à un mécanisme d'action extra ou intra cellulaire ?***

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons utilisé l'analyse chromatographique pour détecter et quantifier les polluants dans le milieu de culture après 6h et 24h d'incubation. Les résultats ont montré que BPA et GLP agissaient par voie extracellulaire. En fonction du temps aucune variation de concentration n'a été observée, ceci est valable pour MCF7, MDA-MB 231 et HME1. Alors que pour AO, l'analyse UPLC/MS a montré que la concentration diminuait en fonction du temps. Cette diminution pourrait être liée à un mécanisme d'action intracellulaire : AO pourrait traverser la membrane cellulaire. Il serait donc intéressant de procéder à une analyse du compartiment intracellulaire en vu de détecter l'AO pour confirmer notre résultat.

En tant que constituant majeur du microenvironnement tumoral et composante susceptible d'interagir avec les cellules cancéreuses, les adipocytes pourraient être visés par les polluants.

### **Est-ce que ces polluants affecteraient le cycle de vie des adipocytes ? Leur fonction métabolique ? Leur interaction avec les cellules cancéreuses ?**

Dans cette dernière partie, nous avons étudié l'effet des polluants sur l'adipogenèse. Les résultats ont montré que les incubations n'ont pas affecté la viabilité des préadipocytes à différents stades de maturation. Cependant, l'analyse de profil protéomique a révélé une modification au niveau de l'expression de protéines de préadipocytes. Les protéines identifiées appartiennent à la famille des protéines de structure (TBB5), protéine chaperon (CARL), protéine de stress (HSP7C). La modification de l'expression de ces protéines n'a pas été liée à un changement au niveau de la viabilité cellulaire. Ils pourraient donc agir sur d'autres mécanismes cellulaires.

La coloration à l'huile rouge des adipocytes incubées avec les polluants durant la différenciation a montré une diminution de la quantité de gras. Uniquement l'incubation avec GLP+/-AO

## *Conclusion générale*

n'affectait pas la lipogenèse. Ces résultats ont été confirmés avec ceux obtenus de la RT-QPCR. L'incubation avec les polluants diminuait l'expression des marqueurs PPAR- $\gamma$ , aP2 et LPL. Sauf l'effet anti-adipogène observé pour BPA semblerait s'exercer à travers une autre voie outre que celle de PPAR- $\gamma$ . Nous n'avons pas observé ni des effets synergiques, ni additifs.

L'incubation des cellules MCF7 et MDA-MB 231 avec le sécrétome de HWP n'a pas affecté la viabilité cellulaire. Ceci est valable même après avoir exposé les HWP aux polluants.

Il conviendra de mieux caractériser les interactions éventuelles existant entre cellules cancéreuses et adipocytes en améliorant les protocoles d'incubation croisés. Par exemple, la co-culture des deux lignées cellulaires incubées ou non avec les polluants constituera une bonne approche pour déterminer ces interactions ainsi l'effet de polluants sur ce type de communication inter-cellulaire.

En conclusion, ce travail a tenté d'étudier l'effet de polluants sur les composantes du microenvironnement tumoral : cellules cancéreuses, cellules épithéliales et cellules graisseuses. Nous avons apporté ici des éléments montrant que les polluants sont susceptibles de modifier le profil protéomique de ces cellules, certaines activités enzymatiques telle que l'activité des protéines phosphatases des cellules épithéliales et de perturber le déroulement de l'adipogenèse en diminuant l'expression de marqueur adipocytaire. Ainsi les polluants pourraient affecter le fonctionnement normal d'une cellule saine/ cancéreuse ce qui provoquerait éventuellement des risques pour la santé dans certaines conditions.

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

## Références bibliographiques

Acquavella, J.F., Alexander, B.H., Mandel, J.S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., and Bleeke, M. (2004). Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environ. Health Perspect.* *112*, 321–326.

Aggarwal, B.B., and Gehlot, P. (2009). Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 351–369.

Aggen, J.B., Nairn, A.C., and Chamberlin, R. (2000). Regulation of protein phosphatase-1. *Chem. Biol.* *7*, R13–R23.

Andarawewa, K.L., Motrescu, E.R., Chenard, M.-P., Gansmuller, A., Stoll, I., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2005). Stromelysin-3 Is a Potent Negative Regulator of Adipogenesis Participating to Cancer Cell-Adipocyte Interaction/Crosstalk at the Tumor Invasive Front. *Cancer Res.* *65*, 10862–10871.

Arditi, J.D., Venihaki, M., Karalis, K.P., and Chrousos, G.P. (2007). Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* *39*, 9–13.

Ariemma, F., D'Esposito, V., Liguoro, D., Oriente, F., Cabaro, S., Liotti, A., Cimmino, I., Longo, M., Beguinot, F., Formisano, P., et al. (2016). Low-Dose Bisphenol-A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *PLOS ONE* *11*, e0150762.

Arner, P. (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *19*, 471–482.

Baco, E. (2011). Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur (Bordeaux 1).

Balavenkatraman, K.K., Jandt, E., Friedrich, K., Kautenburger, T., Pool-Zobel, B.L., Ostman, A., and Böhmer, F.D. (2006). DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene* *25*, 6319–6324.

Banerjee, S.S., Feinberg, M.W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R.L., Denking, D.J., Kawahara, R., Hauner, H., and Jain, M.K. (2003). The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *278*, 2581–2584.

Barouki, R. (2010). Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation. *Biochimie* *92*, 1222–1226.

Baylis, A.D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag. Sci.* *56*, 299–308.

van Beekum, O., Fleskens, V., and Kalkhoven, E. (2009). Posttranslational Modifications of PPAR- $\gamma$ : Fine-tuning the Metabolic Master Regulator. *Obesity* *17*, 213–219.

Belfroid, A., van Velzen, M., van der Horst, B., and Vethaak, D. (2002). Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* *49*, 97–103.

## Références bibliographiques

- Ben Henda, Y., Laamari, M., Lanneluc, I., Travers, M.-A., Agogué, H., Arnaudin, I., Bridiau, N., Maugard, T., Piot, J.-M., Sannier, F., et al. (2015). Di and tripeptides from marine sources can target adipogenic process and contribute to decrease adipocyte number and functions. *J. Funct. Foods* *17*, 1–10.
- Biedermann, S., Tschudin, P., and Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal. Bioanal. Chem.* *398*, 571–576.
- Binimelis, R., Pengue, W., and Monterroso, I. (2009). “Transgenic treadmill”: Responses to the emergence and spread of glyphosate-resistant johnsongrass in Argentina. *Geoforum* *40*, 623–633.
- Blackburn, L.G., and Boutin, C. (2003). Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup). *Ecotoxicol. Lond. Engl.* *12*, 271–285.
- Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuil, M., and Blanchoud, H. (2009). Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* *77*, 133–139.
- Box, J.K., Paquet, N., Adams, M.N., Boucher, D., Bolderson, E., O’Byrne, K.J., and Richard, D.J. (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol. Biol.* *17*, 19.
- Brede, C., Fjeldal, P., Skjevraak, I., and Herikstad, H. (2003). Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit. Contam.* *20*, 684–689.
- Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V., and Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* *103*, 608–612.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K.J., and Cryns, V.L. (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* *8*, 443–450.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., and Needham, L.L. (2008). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* *116*, 39–44.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M.J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1625–1638.
- Castillo Sanchez, R., Gomez, R., and Perez Salazar, E. (2016). Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Chem. Res. Toxicol.* *29*, 285–295.
- Catalano, S., Marsico, S., Giordano, C., Mauro, L., Rizza, P., Panno, M.L., and Andò, S. (2003). Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J. Biol. Chem.* *278*, 28668–28676.

## Références bibliographiques

Chan, B.T.-Y., and Lee, A.V. (2008). Insulin Receptor Substrates (IRSs) and Breast Tumorigenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *13*, 415–422.

Chang, N.-C., Lin, A.C.-M., Hsu, C.-C., Liu, J.-S., Tsui, L., Chen, C.-Y., Jayakumar, T., Fong, T.-H., Chang, N.-C., Lin, A.C.-M., et al. (2013). Okadaic Acid, a Bioactive Fatty Acid from *Halichondria okadai*, Stimulates Lipolysis in Rat Adipocytes: The Pivotal Role of Perilipin Translocation, Okadaic Acid, a Bioactive Fatty Acid from *Halichondria okadai*, Stimulates Lipolysis in Rat Adipocytes: The Pivotal Role of Perilipin Translocation. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* *2013*, *2013*, e545739.

Christodoulides, C., and Vidal-Puig, A. (2010). PPARs and adipocyte function. *Mol. Cell. Endocrinol.* *318*, 61–68.

Chunyang Liao, F.L. (2012). Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environ. Sci. Amp Technol.* *46*, 6860–6866.

Cohen, P.T.W. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J. Cell Sci.* *115*, 241–256.

Cohen, P.T., and Cohen, P. (1989). Discovery of a protein phosphatase activity encoded in the genome of bacteriophage lambda. Probable identity with open reading frame 221. *Biochem. J.* *260*, 931–934.

Cohen, P., Holmes, C.F., and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 98–102.

Corrales, J., Kristofco, L.A., Steele, W.B., Yates, B.S., Breed, C.S., Williams, E.S., and Brooks, B.W. (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment. *Dose-Response* *13*.

Cortesi, L., Barchetti, A., De Matteis, E., Rossi, E., Della Casa, L., Marcheselli, L., Tazzioli, G., Lazzaretti, M.G., Ficarra, G., Federico, M., et al. (2009). Identification of protein clusters predictive of response to chemotherapy in breast cancer patients. *J. Proteome Res.* *8*, 4916–4933.

Cristancho, A.G., and Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 722–734.

Delmonico, E.L., Bertozzi, J., Souza, N.E. de, and Oliveira, C.C. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid for assessing the quality tap water using SPE and HPLC. *Acta Sci. Technol.* *36*, 513–519.

Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Gonidec, S.L., et al. (2011). Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Res.* *71*, 2455–2465.

Dodds, E.C., and Lawson, W. (1936). Synthetic Estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* *137*, 996.

Dong, S., Terasaka, S., and Kiyama, R. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* *159*, 212–218.

## Références bibliographiques

Egloff, A.M., Rothstein, M.E., Seethala, R., Siegfried, J.M., Grandis, J.R., and Stabile, L.P. (2009). Cross-talk Between Estrogen Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 6529–6540.

Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V., and Cakmak, I. (2006). Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 10019–10025.

Elliott, B.E., Tam, S.P., Dexter, D., and Chen, Z.Q. (1992). Capacity of adipose tissue to promote growth and metastasis of a murine mammary carcinoma: effect of estrogen and progesterone. *Int. J. Cancer* *51*, 416–424.

Favre, B., Turowski, P., and Hemmings, B.A. (1997). Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J. Biol. Chem.* *272*, 13856–13863.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *14*, 1649–1660.

Frankenberry, K.A., Skinner, H., Somasundar, P., McFadden, D.W., and Vona-Davis, L.C. (2006). Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. *Int. J. Oncol.* *28*, 985–993.

Fujiki, H., Sueoka, E., Komori, A., and Suganuma, M. (1997). Tumor promotion and TNF- $\alpha$  gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. *J. Environ. Sci. Health Part C* *15*, 1–40.

Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* *11*, 501–508.

Garofalo, C., and Surmacz, E. (2006). Leptin and cancer. *J. Cell. Physiol.* *207*, 12–22.

Gerona, R.R., Pan, J., Zota, A.R., Schwartz, J.M., Friesen, M., Taylor, J.A., Hunt, P.A., and Woodruff, T.J. (2016). Direct measurement of Bisphenol A (BPA), BPA glucuronide and BPA sulfate in a diverse and low-income population of pregnant women reveals high exposure, with potential implications for previous exposure estimates: a cross-sectional study. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *15*, 50.

Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* *131*, 242–256.

Ginsberg, G., and Rice, D.C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ. Health Perspect.* *117*, 1639–1643.

Grossmann, M.E., Nkhata, K.J., Mizuno, N.K., Ray, A., and Cleary, M.P. (2008). Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling. *Br. J. Cancer* *98*, 370–379.

## Références bibliographiques

Guil, S., Long, J.C., and Cáceres, J.F. (2006). hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5744–5758.

H. P Van Egmond, T.A. (1993). Paralytic and Diarrheic Shellfish Poisons: occurrence in Europe, toxicity analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* *2*, 41–83.

Harley, K.G., Schall, R.A., Chevrier, J., Tyler, K., Aguirre, H., Bradman, A., Holland, N.T., Lustig, R.H., Calafat, A.M., and Eskenazi, B. (2013). Prenatal and Postnatal Bisphenol A Exposure and Body Mass Index in Childhood in the CHAMACOS Cohort. *Environ. Health Perspect.* *121*, 514–520.

He, J., Jiang, H., Tansey, J.T., Tang, C., Pu, S., and Xu, G. (2006). Calyculin and okadaic acid promote perilipin phosphorylation and increase lipolysis in primary rat adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1761*, 247–255.

Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Seftor, R.E., and Trevor, K.T. (1997). Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am. J. Pathol.* *150*, 483–495.

Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res. BCR* *13*, 215.

Hosokawa, M., Tsukada, H., Saitou, T., Kodama, M., Onomura, M., Nakamura, H., Fukuda, K., and Seino, Y. (1998). Effects of Okadaic Acid on Rat Colon. *Dig. Dis. Sci.* *43*, 2526–2535.

Howdeshell, K.L., Wilson, V.S., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., and Gray, L.E. (2008). A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *105*, 153–165.

Hu, J.-Y., Chen, C.-L., and Li, J.-Z. (2011). A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus. *J. Anal. Chem.* *63*, 371–375.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., and Wright, J.L.C. (1995). Two new water-soluble dsp toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Lett.* *36*, 9273–9276.

Hwang, K.-A., Park, M.-A., Kang, N.-H., Yi, B.-R., Hyun, S.-H., Jeung, E.-B., and Choi, K.-C. (2013). Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17  $\beta$ -estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor  $\alpha$  and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *272*, 637–646.

Ibrahim, M.M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *11*, 11–18.

Inoue, K., Wada, M., Higuchi, T., Oshio, S., Umeda, T., Yoshimura, Y., and Nakazawa, H. (2002). Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *773*, 97–102.

## Références bibliographiques

Janssens, V., Longin, S., and Goris, J. (2008). PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem. Sci.* 33, 113–121.

Kacem, I., Hajjem, B., and Bouaïcha, N. (2009). First Evidence of Okadaic Acid in *Mytilus galloprovincialis* Mussels, Collected in a Mediterranean Lagoon, Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 660–664.

Kang, J.-H., Kondo, F., and Katayama, Y. (2006a). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226, 79–89.

Kang, J.-H., Katayama, Y., and Kondo, F. (2006b). Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology* 217, 81–90.

Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30, 127–138.

Kazuo Tachibana, P.J.S. (1980). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*, J. J. Am. Chem. Soc. - J AM CHEM SOC 103.

Keen, J.C., Zhou, Q., Park, B.H., Pettit, C., Mack, K.M., Blair, B., Brenner, K., and Davidson, N.E. (2005). Protein Phosphatase 2A Regulates Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER) Expression through Modulation of ER mRNA Stability. *J. Biol. Chem.* 280, 29519–29524.

Khan, S., Shukla, S., Sinha, S., and Meeran, S.M. (2013). Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: Therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 503–513.

Kim, Y.-H., Kim, C.-S., Park, S., Han, S.Y., Pyo, M.-Y., and Yang, M. (2003). Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 441–448.

Kinney, C.A., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Burkhardt, M.R., Zaugg, S.D., Werner, S.L., Bossio, J.P., and Benotti, M.J. (2008). Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1863–1870.

Kubwabo, C., Kosarac, I., Stewart, B., Gauthier, B.R., Lalonde, K., and Lalonde, P.J. (2009). Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 26, 928–937.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.

Lafleur, M.A., Stevens, J.L., and Lawrence, J.W. (2013). Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. *Toxicol. Pathol.* 41, 235–262.

Lafontan, M. (2003). [Metabolic and secretory activities of adipocytes]. *Pathol. Biol. (Paris)* 51, 238–240.

## Références bibliographiques

Le, H.H., Carlson, E.M., Chua, J.P., and Belcher, S.M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* 176, 149–156.

Le Grand, A. (2009). Étude comparative de récepteurs aux œstrogènes : aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux œstrogènes et anti-œstrogènes impliqués dans les causes et thérapies du cancer du sein (Université européenne de Bretagne).

Lee, J.-E., and Ge, K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR $\gamma$  expression during adipogenesis. *Cell Biosci.* 4, 29.

Lefterova, M.I., and Lazar, M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 20, 107–114.

Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Liu, X.S., et al. (2008). PPAR $\gamma$  and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 22, 2941–2952.

Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J.M., Vieytes, M.R., and Botana, L.M. (2002). Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line. *Toxicol. In Vitro* 16, 23–31.

Li, J., and Lee, A.S. (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr. Mol. Med.* 6, 45–54.

Li, C., Briggs, M.R., Ahlborn, T.E., Kraemer, F.B., and Liu, J. (2001). Requirement of Sp1 and estrogen receptor  $\alpha$  interaction in 17 $\beta$ -estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 142, 1546–1553.

Li, Q., Lambrechts, M.J., Zhang, Q., Liu, S., Ge, D., Yin, R., Xi, M., and You, Z. (2013). Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. *Drug Des. Devel. Ther.* 7, 635–643.

Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., and O'Connor, L. (2012a). Bisphenol A-Mediated Suppression of LPL Gene Expression Inhibits Triglyceride Accumulation during Adipogenic Differentiation of Human Adult Stem Cells. *PLoS ONE* 7.

Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., and O'Connor, L. (2012b). Bisphenol A-Mediated Suppression of LPL Gene Expression Inhibits Triglyceride Accumulation during Adipogenic Differentiation of Human Adult Stem Cells. *PLOS ONE* 7, e36109.

Liu, W. (2015). Increased Cell Proliferation by Various Doses of Xenoestrogen in MFC-7 Cell Through Tyrosine Phosphatase Shp2. *Am. J. Biosci. Bioeng.* 3, 178.

Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.

Luch, A. (2005). Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 113–125.

## Références bibliographiques

M L Caillet-Boudin, A.D. (1997). Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport* 8, 307–310.

Macis, E., and Kostrominova, T. (2014). Effects of exposure to bisphenol A on hepatocytes and pre-adipocytes in vitro (1010.7). *FASEB J.* 28, 1010.7.

Manassero, A., Passalia, C., Negro, A.C., Cassano, A.E., and Zalazar, C.S. (2010). Glyphosate degradation in water employing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVC process. *Water Res.* 44, 3875–3882.

Mandrup, S., and Lane, M.D. (1997). Regulating adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 5367–5370.

Mantzoros, C., Petridou, E., Dessypris, N., Chavelas, C., Dalamaga, M., Alexe, D.M., Papadiamantis, Y., Markopoulos, C., Spanos, E., Chrousos, G., et al. (2004). Adiponectin and breast cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1102–1107.

Marano, C.W., Lewis, S.A., Garulacan, L.A., Soler, A.P., and Mullin, J.M. (1998). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Increases Sodium and Chloride Conductance Across the Tight Junction of CACO-2 BBE, a Human Intestinal Epithelial Cell Line. *J. Membr. Biol.* 161, 263–274.

Markey, C.M., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2005). Long-Term Effects of Fetal Exposure to Low Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A in the Female Mouse Genital Tract. *Biol. Reprod.* 72, 1344–1351.

Martini, C.N., Gabrielli, M., and Vila, M. del C. (2012a). A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 26, 1007–1013.

Martini, C.N., Gabrielli, M., and Vila, M. del C. (2012b). A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 26, 1007–1013.

Martini, C.N., Gabrielli, M., Brandani, J.N., and del C. Vila, M. (2016). Glyphosate Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and is able to Induce Oxidative Stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* n/a-n/a.

Matthews, J.B., Twomey, K., and Zacharewski, T.R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157.

Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417, 651–666.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15, 1292–1300.

Milczarek, G.J., Chen, W., Gupta, A., Martinez, J.D., and Bowden, G.T. (1999). Okadaic acid mediates p53 hyperphosphorylation and growth arrest in cells with wild-type p53 but increases aberrant mitoses in cells with non-functional p53. *Carcinogenesis* 20, 1043–1048.

## Références bibliographiques

Miyatake, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Narita, M., and Suzuki, T. (2006). Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 434–444.

Morris, P.G., Hudis, C.A., Giri, D., Morrow, M., Falcone, D.J., Zhou, X.K., Du, B., Brogi, E., Crawford, C.B., Kopelovich, L., et al. (2011). Inflammation and Increased Aromatase Expression Occur in the Breast Tissue of Obese Women with Breast Cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *4*, 1021–1029.

Nakajima, N., Ohshima, Y., Serizawa, S., Kouda, T., Edmonds, J.S., Shiraishi, F., Aono, M., Kubo, A., Tamaoki, M., Saji, H., et al. (2002). Processing of bisphenol A by plant tissues: glucosylation by cultured BY-2 cells and glucosylation/translocation by plants of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* *43*, 1036–1042.

Newbold, R.R., Jefferson, W.N., and Padilla-Banks, E. (2009). Prenatal Exposure to Bisphenol A at Environmentally Relevant Doses Adversely Affects the Murine Female Reproductive Tract Later in Life. *Environ. Health Perspect.* *117*, 879–885.

Nogueiras, M.J., Gago-Martínez, A., Paniello, A.I., Twohig, M., James, K.J., and Lawrence, J.F. (2003). Comparison of different fluorimetric HPLC methods for analysis of acidic polyether toxins in marine phytoplankton. *Anal. Bioanal. Chem.* *377*, 1202–1206.

Nunez, A.A., Kannan, K., Giesy, J.P., Fang, J., and Clemens, L.G. (2001). Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* *42*, 917–922.

Ohlstein, J.F., Strong, A.L., McLachlan, J.A., Gimble, J.M., Burow, M.E., and Bunnell, B.A. (2014). Bisphenol A enhances adipogenic differentiation of human adipose stromal/stem cells. *J. Mol. Endocrinol.* *53*, 345–353.

Okada, T., Narai, A., Matsunaga, S., Fusetani, N., and Shimizu, M. (2000). Assessment of the marine toxins by monitoring the integrity of human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Toxicol. In Vitro* *14*, 219–226.

Olivo, V.E., Tansini, A., Carasek, F., Cordenuzzi, D., Fernandes, S., Fiori, M.A., Fragoso, A., and Magro, J.D. (2015). Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. *Ambiente E Agua - Interdiscip. J. Appl. Sci.* *10*, 286–297.

Park, K.W., Halperin, D.S., and Tontonoz, P. (2008). Before They Were Fat: Adipocyte Progenitors. *Cell Metab.* *8*, 454–457.

Payne, V.A., Au, W.-S., Gray, S.L., Nora, E.D., Rahman, S.M., Sanders, R., Hadaschik, D., Friedman, J.E., O’Rahilly, S., and Rochford, J.J. (2007). Sequential Regulation of Diacylglycerol Acyltransferase 2 Expression by CAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) and C/EBP $\alpha$  during Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *282*, 21005–21014.

Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante, S., Rosano, C., and Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ. Health Perspect.* *120*, 1177–1182.

## Références bibliographiques

Ragerdi Kashani, I., Barbarestani, M., Etesam, F., Shokrgozar, M.A., Abdolvahabi, M.A., and Haddad, P. (2006). HUMAN PREADIPOCYTES INHIBIT PROLIFERATION OF MCF-7 BREAST CANCER CELL LINE. *Acta Med. Iran.* 291–298.

Ramos, J.G., Varayoud, J., Kass, L., Rodríguez, H., Costabel, L., Muñoz-de-Toro, M., and Luque, E.H. (2003). Bisphenol A Induces Both Transient and Permanent Histofunctional Alterations of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Prenatally Exposed Male Rats. *Endocrinology* 144, 3206–3215.

Ravussin, E., and Galgani, J.E. (2011). The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 33–47.

Ray, A., Nkhata, K., and Cleary, M. (2007). Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status. *Int. J. Oncol.*

Reaves, D.K., Ginsburg, E., Bang, J.J., and Fleming, J.M. (2015). Persistent organic pollutants and obesity: are they potential mechanisms for breast cancer promotion? *Endocr. Relat. Cancer* 22, R69–86.

Rees Clayton, E.M., Todd, M., Dowd, J.B., and Aiello, A.E. (2011). The Impact of Bisphenol A and Triclosan on Immune Parameters in the U.S. Population, NHANES 2003–2006. *Environ. Health Perspect.* 119, 390–396.

Regueiro, J., Breidbach, A., and Wenzl, T. (2015). Derivatization of bisphenol A and its analogues with pyridine-3-sulfonyl chloride: multivariate optimization and fragmentation patterns by liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 29, 1473–1484.

Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., and vom Saal, F.S. (2007). In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 24, 199–224.

Rochester, J.R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 42, 132–155.

Rossini, G.P., Sgarbi, N., and Malaguti, C. (2001). The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxinology* 39, 763–770.

Ruan, W., Wang, Y., Ma, Y., Xing, X., Lin, J., Cui, J., and Lai, M. (2010). HSP60, a protein downregulated by IGFBP7 in colorectal carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 29, 41.

Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C., and Soto, A.M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* 109, 675–680.

Rudel, R.A., Brody, J.G., Spengler, J.D., Vallarino, J., Geno, P.W., Sun, G., and Yau, A. (2001). Identification of Selected Hormonally Active Agents and Animal Mammary Carcinogens in Commercial and Residential Air and Dust Samples. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 51, 499–513.

## Références bibliographiques

Rudel, R.A., Attfield, K.R., Schifano, J.N., and Brody, J.G. (2007). Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer* 109, 2635–2666.

Ryu, J., Kaul, Z., Yoon, A.-R., Liu, Y., Yaguchi, T., Na, Y., Ahn, H.M., Gao, R., Choi, I.-K., Yun, C.-O., et al. (2014). Identification and functional characterization of nuclear mortalin in human carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 289, 24832–24844.

vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., and Welshons, W.V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health* 14, 239–260.

Santhi, V.A., Sakai, N., Ahmad, E.D., and Mustafa, A.M. (2012). Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Sci. Total Environ.* 427–428, 332–338.

Sargis, R.M., Johnson, D.N., Choudhury, R.A., and Brady, M.J. (2010). Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obes. Silver Spring Md* 18, 1283–1288.

Satelli, A., and Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3033–3046.

Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., and Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371, 768–774.

Selvaraj, K.K., Shanmugam, G., Sampath, S., Joakim Larsson, D.G., and Ramaswamy, B.R. (2014). GC–MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 99, 13–20.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.

Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927–937.

Shushkova, T., Ermakova, I., and Leontievsky, A. (2010). Glyphosate bioavailability in soil. *Biodegradation* 21, 403–410.

Simonsen, L., Fomsgaard, I.S., Svensmark, B., and Spliid, N.H. (2008). Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *J. Environ. Sci. Health B* 43, 365–375.

Smienk, H., Domínguez, E., Rodríguez-Velasco, M.L., Clarke, D., Kapp, K., Katikou, P., Cabado, A.G., Otero, A., Vieites, J.M., Razquin, P., et al. (2013). Quantitative determination of the okadaic acid toxins group by a colorimetric phosphatase inhibition assay: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 96, 77–85.

Smith, E.A., and Oehme, F.W. (1992). The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet. Hum. Toxicol.* 34, 531–543.

## Références bibliographiques

Solomon, K.R., and Thompson, D.G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 6, 289–324.

Song, Y., Luo, Q., Long, H., Hu, Z., Que, T., Zhang, X., 'an, Li, Z., Wang, G., Yi, L., Liu, Z., et al. (2014). Alpha-enolase as a potential cancer prognostic marker promotes cell growth, migration, and invasion in glioma. *Mol. Cancer* 13, 65.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416.

Stalikas, C.D., and Pilidis, G.A. (2000). Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. *J. Chromatogr. A* 872, 215–225.

Stowell, C.L., Barvian, K.K., Young, P.C.M., Bigsby, R.M., Verdugo, D.E., Bertozzi, C.R., and Widlanski, T.S. (2006). A Role for Sulfation-Desulfation in the Uptake of Bisphenol A into Breast Tumor Cells. *Chem. Biol.* 13, 891–897.

Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., and Marvin, C. (2008). Occurrence of glyphosate in surface waters of Southern Ontario. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 378–384.

Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., et al. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 4, 35–41.

Suzuki, T., Mitsuya, T., Imai, M., and Yamasaki, M. (1996). DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay, Japan. *J. Appl. Phycol.* 8, 509–515.

Tanaka, T. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.

Tang, W., Zeve, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R.E., Tallquist, M.D., and Graff, J.M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322, 583–586.

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., and Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 59, 129–136.

Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A., and vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7014–7019.

Todorovic, G.R., Mentler, A., Popp, M., Hann, S., Köllensperger, G., Rampazzo, N., and Blum, W.E.H. (2013). Determination of Glyphosate and AMPA in Three Representative Agricultural Austrian Soils with a HPLC-MS/MS Method. *Soil Sediment Contam. Int. J.* 22, 332–350.

Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289–312.

## Références bibliographiques

Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P., and Hecht, G. (1997). The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* *112*, 100–108.

Valle, A., Sastre-Serra, J., Pol, C., Miró, A.M., Oliver, J., and Roca, P. (2011). Proteomic Analysis of MCF-7 Breast Cancer Cell Line Exposed To Leptin. *Anal. Cell. Pathol. Amst.* *34*, 147–157.

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., and Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* *15*, 1281–1287.

Waiman, C.V., Avena, M.J., Garrido, M., Fernández Band, B., and Zanini, G.P. (2012). A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite. *Geoderma* *170*, 154–158.

Wang, C., Gao, C., Meng, K., Qiao, H., and Wang, Y. (2015). Human adipocytes stimulate invasion of breast cancer MCF-7 cells by secreting IGFBP-2. *PloS One* *10*, e0119348.

Wang, J., Wang, Y.-Y., Lin, L., Gao, Y., Hong, H.-S., and Wang, D.-Z. (2012a). Quantitative proteomic analysis of okadaic acid treated mouse small intestines reveals differentially expressed proteins involved in diarrhetic shellfish poisoning. *J. Proteomics* *75*, 2038–2052.

Wang, J., Wang, Y.-Y., Lin, L., Gao, Y., Hong, H.-S., and Wang, D.-Z. (2012b). Quantitative proteomic analysis of okadaic acid treated mouse small intestines reveals differentially expressed proteins involved in diarrhetic shellfish poisoning. *J. Proteomics* *75*, 2038–2052.

Watanabe, S., Wang, R., Miyagawa, M., Kobayashi, K., Suda, M., Sekiguchi, S., and Honma, T. (2003). Short Communication Imbalance of Testosterone Level in Male Offspring of Rats Perinatally Exposed to Bisphenol A.

Williams, G.M., Kroes, R., and Munro, I.C. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *31*, 117–165.

Wilson, K.L., and Foisner, R. (2010). Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000554.

Wilson, S.F., James, C.A., Zhu, X., Davis, M.T., and Rose, M.J. (2011). Development of a method for the determination of glycine in human cerebrospinal fluid using pre-column derivatization and LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *56*, 315–323.

Windust, A.J., Hu, T., Wright, J.L.C., Quilliam, M.A., and McLachlan, J.L. (2000). Oxidative metabolism by *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning. *J. Phycol.* *36*, 342–350.

Wu, M.H., and Yung, B.Y.M. (2002). UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. *J. Biol. Chem.* *277*, 48234–48240.

Xu, X., Xiong, X., and Sun, Y. (2016). The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci. China Life Sci.* *59*, 656–672.

## Références bibliographiques

Xu, Y., Takahashi, Y., Wang, Y., Hama, A., Nishio, N., Muramatsu, H., Tanaka, M., Yoshida, N., Villalobos, I.B., Yagasaki, H., et al. (2009). Downregulation of GATA-2 and overexpression of adipogenic gene-PPARgamma in mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia. *Exp. Hematol.* 37, 1393–1399.

Yasumoto, T., Oshima, Y., and Yamaguchi, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 44, 1249–1255.

Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., and Yuasa, A. (1999). Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* 340, 405–409.

Yom, C.K., Lee, K.-M., Han, W., Kim, S.-W., Kim, H.S., Moon, B.I., Jeong, K.-Y., Im, S.-A., and Noh, D.-Y. (2013). Leptin as a Potential Target for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 16, 138–145.

Zeng, G., Zhang, C., Huang, G., Yu, J., Wang, Q., Li, J., Xi, B., and Liu, H. (2006). Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China. *Chemosphere* 65, 1490–1499.

Zhang, H., Liu, W., He, X., Liang, L., Ding, W., and He, Z. (2013a). Determination of okadaic acid related toxins from shellfish (*&lt;i&gt;sinonovacula constricta&lt;/i&gt;*) by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Agric. Sci.* 4, 1–6.

Zhang, W., Fang, Y., Shi, X., Zhang, M., Wang, X., and Tan, Y. (2012). Effect of bisphenol A on the EGFR-STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 5, 41–47.

Zhang, Y., Zhang, Y., Qu, Q., Wang, G., and Wang, C. (2013b). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labeling reagent. *Anal. Methods* 5, 6465–6472.

Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J.M., Moesch, C., and Lachâtre, G. (2013). Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: about 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* 226, e20-25.

## Approches moléculaires et cellulaires des effets combinés du bisphénol A, du glyphosate et d'une toxine marine sur quatre modèles cellulaires humains

### Résumé :

L'apparition de l'obésité et du cancer du sein est influencée par l'exposition aux polluants environnementaux. Ces polluants interfèrent avec le fonctionnement normal de l'organisme causant des modifications dans le comportement cellulaire. Ils peuvent agir chacun seul ou sous forme de cocktail. Dans ce contexte, nous avons choisi trois polluants dans notre projet: le bisphénol A (perturbateur endocrinien), le glyphosate (dés herbant) et l'acide okadaïque (toxine marine). Nous avons étudié leur effet seul ou en cocktail sur les cellules de cancer du sein MCF7 et MDA-MB 231, les cellules épithéliale mammaire humaine HME1 et les préadipocytes humain HWP. Dans une première partie, nous avons étudié leur effet sur la viabilité cellulaire. L'électrophorèse 2D couplée à MS/MALDI-TOF, le dosage de l'activité des protéines phosphatases ont été menés pour comprendre le mécanisme d'action des polluants sur la viabilité cellulaire. La partie suivante a porté sur la détection et la quantification des polluants dans le milieu de culture afin de déterminer leur voie d'action : extra ou intra cellulaire. Finalement, nous avons étudié l'effet des polluants sur le cycle de vie des adipocytes et la lipogenèse. Également, l'effet de sécrétome des HWP (+/- polluants) sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses a été étudié.

**Mots clés :** Bisphénol A, Acide okadaïque, Glyphosate, Cancer du sein, Obésité.

## Molecular and cellular approaches to study the combined effects of bisphenol A, glyphosate and a marine toxin on four human cellular models

### Abstract

The development of obesity and breast cancer is influenced by exposure to environmental pollutants. These pollutants interfere with the normal body function causing changes in cells behavior. They can act each alone or as a cocktail. In this context, we have chosen three pollutants in our project: bisphenol A (endocrine disruptor), glyphosate (herbicide), okadaic acid (marine toxin). We have studied their effect of alone or in combination in cellular models: human breast cancer cells MCF7 and MDA-MB 231, human mammary epithelial cells HME1 and human preadipocytes HWP. In the first part, we have studied the effect of pollutants on cells viability. 2D electrophoresis coupled to MS/MALDI-TOF, measurement of proteins phosphatase activity were conducted to understand pollutants action mechanism on cells viability. In the following part we detected and quantified pollutants in culture medium to determine their pathway of action: extra or intra cellular. Finally, we studied the effect of pollutants on adipocytes life cycle and lipogenesis. Also, effect of secretome from HWP (+/- pollutants) on cancer cells viability was studied.

**Key words:** Bisphenol A, Okadaic Acid, Glyphosate, Breast cancer, Obesity.





