



HAL
open science

Exploration de l'impact de l'exposition chronique et faibles doses de facteurs environnementaux sur les cellules pré-cancéreuses mammaires MCF10AT1

Myriam El Helou

► **To cite this version:**

Myriam El Helou. Exploration de l'impact de l'exposition chronique et faibles doses de facteurs environnementaux sur les cellules pré-cancéreuses mammaires MCF10AT1. Cancer. Université de Lyon; Université Libanaise, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1173 . tel-01839222

HAL Id: tel-01839222

<https://theses.hal.science/tel-01839222>

Submitted on 14 Jul 2018

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 Libanaise

École Doctorale
Sciences et Technologies

Doyen

N°d'ordre NNT : 2017LYSE1173

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
(Ecole Doctorale Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Discipline : Cancérologie

Soutenance prévue le 20/09/2017 par :

Myriam El Helou

**Exploration de l'impact de l'exposition chronique et faibles doses de facteurs
environnementaux sur les cellules pré-cancéreuses mammaires MCF10AT1**

Devant le jury composé de :

Mme. Rimokh Ruth, Directrice de recherche, INSERM, Université Lyon 1
M. Roux Pierre, Directeur de recherche, CRBM, CNRS, Montpellier
M. Hilal George, Professeur, Université Saint Joseph, Beirut
M. Blaha Didier, Maître de conférences, Université Lyon 1
M. Hussein Nader, Professeur, Université Libanaise
Mme Cohen Pascale, Professeur, Université Lyon
Mme Diab-Assaf Mona, Professeur, Université Libanaise
Mme Ghayad Sandra, Professeur associé, Université Libanaise

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

Mes *CHOUKRANS*

Je souhaite remercier en premier temps, l'Université Libanaise avec tous ses responsables de me donner l'opportunité de faire ma thèse et de m'avoir financé pendant ces trois ans. J'aime bien adresser un grand merci au Recteur le Pr Adnan El Sayed Hussein ainsi qu'au Doyen le Pr Fawaz Al Omar.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse en France le Professeur Pascale Cohen de m'avoir acceptée en thèse. Egalement, pour son bon encadrement, ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. En fournissant des directives riches et pertinentes, qui ont contribué à améliorer la qualité de mon travail. Enfin, j'ai été sensible à vos qualités humaines, et je vous remercie d'avoir pensé à moi.

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse au Liban le Professeur Mona Diab Assaf pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, sa bienveillance et son soutien. Je la remercie également pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements.

Je remercie chaleureusement ma co-directrice de thèse le Docteur Sandra Ghayad pour son intérêt, son soutien et ses encouragements, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils surtout durant la rédaction de ma thèse.

J'exprime ma gratitude au Docteur Caterina Donini qui m'a aidé de manière bénévole et qui m'a fourni l'accompagnement précieux pour avancer dans cette recherche.

Je remercie également le Professeur Pierre Roux ainsi que le Professeur George Hilal pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et de juger mon travail.

Je souhaite remercier le Docteur Ruth Rimokh d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse pour deux ans et ainsi d'avoir fait partie de mon jury de thèse.

Un grand merci aux Docteurs Nader Hussein et Didier Blaha d'avoir fait partie de mon jury de thèse, Merci pour vos conseils et votre soutien tout au long de ces 3 années.

Je remercie tous les membres de l'équipe Le Romancer au CRCL pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Merci donc à Muriel, Laura, Hubert, Chang, Hanine, Ali, Diana, Lucy, Henri-Philippe et Julien.

Ayant mon bureau, au sein du site Rockefeller, je remercie ma maman de France Evyyy mes deux chères collègues Maeva et Sophie, qui m'ont entouré, m'ont conseillé et m'ont fourni toutes aides nécessaires, je vous aime; ainsi que mes collègues le Dr Aurélie et le Dr Boyan pour m'avoir apporté l'encouragement depuis plusieurs années. Vous êtes tous devenus des amis à qui je souhaite tout le courage que vous m'avez apporté.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble de l'équipe de Dr Raya Saab : Dr Raya, Ghina, Farah, Mohamad et Hasan, à l'Université Américaine de Beyrouth pour m'avoir accueilli dans leur unité de recherche et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Mention spéciale à Tony, Rami, Nathalie, Nagham, Isabelle, Eddy et Khalil mes chers amis Libanais à Lyon, je voudrais vous dire merci pour tout soutien pendant mes périodes de doute et pour vos multiples encouragements répétés, vous m'avez permis d'avoir le cœur léger et l'esprit tranquille tout au long de mon séjour. Enfin, j'adresse mille mercis à Nathalie pour son aide précieuse, elle a toujours fait tout son possible pour m'aider. Je voudrais exprimer toute mon amitié à mes deux meilleurs amis à Lyon, Tony « ebn Zgharta » et Rami pour leur gentillesse, leur compétence et leur humour.

Toutes mes pensées particulières au coach Luciana pour ses conseils ergonomiques et son bon humeur, nous avons partagé de bons moments.

J'exprime ma gratitude à tous les amis qui m'ont permis de m'échapper de temps en temps de stress du travail: Claudia, Khalil «khello», Joëlle, Georges, et Boutros merci pour votre soutien pendant mes périodes de doute et pour vos multiples motivations et encouragements répétés.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille et en particulier à mon papa « Fatherr » et ma maman « Motherr el doudou », mon adorable téta Maria, mes sœurs Pamela et Noha, mes précieux frères Maurice et Charbel «Charboul l habboul » bien sur atteindre mes objectifs n'aurait pas été possible sans l'aide de la famille. Heureusement que vous avez cru en moi, maintenant j'y suis! Sans votre support, vos encouragements et vos prières rien n'aurait été possible. Je vous aime sans limites...

Pour terminer mes remerciements, une pensée pour mon fiancé, mon amour pour toujours, my Vannouciiii, malgré mon éloignement depuis trois années, ton intelligence, ta confiance, ta tendresse et ton amour m'ont porté et m'ont guidé tous les jours.

Je dédie cette thèse à mon Cher papa sans lequel je n'en serais pas là aujourd'hui

Je t'aime papa chéri

إلى ببي زورع يند بي
از بشا لله ت كون و جور ف بي

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des abréviations.....	8
INTRODUCTION.....	16
A. LE CANCER DU SEIN	17
1. LA GLANDE MAMMAIRE	17
2. EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN	17
3. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DU CANCER DU SEIN	20
3.1 Le carcinome <i>in situ</i>	20
3.2 Le carcinome invasif.....	21
4. CLASSIFICATION MOLECULAIRE DU CANCER DU SEIN	21
5. LES ETAPES DE LA CANCEROGENESE	22
6. LES FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU SEIN.....	25
6.1 Les facteurs gynéco-obstétriques	25
6.1.1. La grossesse.....	25
6.1.2. L'allaitement naturel.....	26
6.1.3. L'âge des premières règles et de la ménopause	26
6.1.4. La densité mammaire.....	26
6.2 Les facteurs génétiques.....	27
6.2.1. Histoire familiale et mutations génétiques au niveau des gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	27
6.2.2. Les radiations	28
6.3 Les facteurs hormonaux.....	28
6.3.1. Les hormones endogènes.....	28
6.3.2. Les hormones exogènes.....	31
B. CANCER ET ENVIRONNEMENT.....	32
1. FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX EN TANT QUE FACTEURS DE RISQUE DU CANCER	32
1.1 Le tabagisme.....	32
1.2 La consommation d'alcool.....	33
1.3 Le stress oxydatif.....	34
1.3.1. Le mécanisme d'action des ROS dans le cancer.....	35
1.3.2. Le mécanisme d'action des RNS dans le cancer.....	36
1.4 Le régime alimentaire.....	36
1.5 Obésité et sédentarité.....	37
1.6 Les pesticides.....	38
1.7 La pollution de l'air.....	39
2. LES DIFFERENTS MECANISMES D'ACTION CANCEROGENES DES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX.....	41
2.1 Les modifications épigénétiques.....	41
2.1.1. La méthylation de l'ADN et la cancérogenèse	43
2.1.2. La modification des histones et la cancérogenèse.....	44
2.1.3. L'expression des microRNA et la cancérogenèse.....	45
2.2 Les mécanismes génotoxiques (GTX).....	47
2.2.1. Les types et le mode d'action des molécules environnementales génotoxiques.....	47
2.2.1.2 Les dommages à l'ADN.....	48
2.2.1.3 Les mutations au niveau de l'ADN	49
2.2.2. Les mécanismes GTX et la cancérogenèse	50
2.2.3. Classification des molécules génotoxiques induisant un cancer	51
2.3 Les mécanismes non-génotoxiques	54
2.3.1. Les perturbateurs endocriniens	54

2.3.1.1	Les sources et la durée d'exposition aux perturbateurs endocriniens	54
2.3.1.2	Le mode d'action des perturbateurs endocriniens	55
2.3.1.3	Les grands groupes de perturbateurs endocriniens environnementaux.....	57
2.3.1.4	Les perturbateurs endocriniens et la cancérogénèse	60
2.3.1.4.1	Les PE, progression tumorale et métastases dans le cancer du sein	62
2.3.1.4.2	Les PE et le microenvironnement tumoral dans le cancer du sein	63
2.3.2.	Le polymorphisme des cytochromes P450	66
2.3.2.1	Le polymorphisme des CYP et la cancérogénèse	66
C.	LES RECEPTEURS CELLULAIRES.....	68
1.	LES RECEPTEURS CELLULAIRES ET L'ENVIRONNEMENT	68
1.1	Les récepteurs nucléaires.....	69
1.1.1.	Classification des récepteurs nucléaires	71
1.1.2.	Les récepteurs nucléaires et les enzymes de métabolisation des xénobiotiques	72
1.1.3.	Les récepteurs PXR et CAR	73
1.1.4.	Le récepteur de l'Aryl hydrocarbure (AhR).....	73
1.1.4.1	Le récepteur AhR et son implication dans le cancer	75
1.1.4.2	Le récepteur AhR et les cellules souches cancéreuses (CSC)	78
1.2	Les récepteurs membranaires.....	80
1.2.1.	Le récepteur GPR30 ou GPER1	82
1.2.1.2	Les voies de signalisation intracellulaires initiées par le GPR30 favorisent le développement d'un cancer	83
1.2.1.2.1	Cross-talk entre GPR30 et les récepteurs ErbB.....	84
1.2.1.2.2	L'activation des kinases par GPR30.....	86
1.2.1.2.3	La production de l'AMPc	86
1.2.1.2.4	Transcription de gènes médiée par la voie GPR30-dépendante.....	87
1.2.1.2.5	Cross talk entre GPR30 et IGF-IR (Insulin-like growth factor-I Receptor)	88
1.2.1.3	GPR30: biomarqueur du cancer	90
D.	UN PERTURBATEUR ENDOCRINIEN: LE BISPHEENOL A (BPA).....	92
1.	IMPLICATION DU BPA DANS LE CANCER	92
1.1	Activité œstrogénique du BPA	92
1.2	L'effet du BPA sur le microenvironnement de la glande mammaire	96
	97
1.3	Effet du BPA sur la glande mammaire.....	98
1.4	Les effets épigénétiques du BPA	98
1.5	BPA et cellules souches	99
1.6	Le BPA et son implication dans la progression du cancer et la métastase	100
E.	UN HYDROCARBURE AROMATIQUE POLYCYCLIQUE : LE BENZO[A]PYRENE (B[A]P).....	103
1.	LE METABOLISME DU B[A]P	103
2.	L'IMPLICATION DU B[A]P DANS LES CANCERS.....	105
2.1	L'initiation d'un cancer et le B[a]P	105
2.2	La promotion d'un cancer et le B[a]P.....	106
2.3	Les effets épigénétiques du B[a]P	107
	OBJECTIFS DE THESE	108
	TRAVAUX PERSONNELS	113
A.	ARTICLE.....	114
B.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE	166
1.	VALIDATION DE L'IMPLICATION DES RECEPTEURS AHR ET GPR30 DANS LE PHENOTYPE OBSERVE DANS LES CELLULES MCF10AT1 PAR DES SIRNA SPECIFIQUES	166
2.	CINETIQUE DE L'EXPRESSION DE CYP1A1 EN RT-QPCR.....	168

3. G15, L'ANTAGONISTE DE GPR30, INDUIT L'EXPRESSION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE D'AHR EN GENE RAPPEUR ET L'EXPRESSION DE <i>CYP1A1</i> EN RT-QPCR	169
4. IMPACT DE L'AGONISTE DE GPR30 (G1) SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE LA LIGNEE MCF10AT1	170
5. IMPACT DES ANTAGONISTES DES RECEPTEURS DANS LA PREVENTION DES EFFETS ASSOCIEES A L'EXPOSITION CHRONIQUE ET FAIBLE DOSE (BPA+B[A]P).....	171
6. LIGNEE MCF10AT1: LIGNEE MAMMAIRE HER2 OU ERBB2 NEGATIVE	173
C. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	174
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	185

Liste des figures

Figure 1 : Coupe du sein à l'état adulte (INCA)	18
Figure 2 : L'estimation des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en 2012 (Globocan 2012).....	19
Figure 3 : La cancérogenèse, un processus de trois phases (Liu <i>et al.</i> 2015)	23
Figure 4 : Les voies de signalisation des ER (Le Romancer <i>et al.</i> 2011)	29
Figure 5 : Les mécanismes épigénétiques (Lee <i>et al.</i> 2014)	42
Figure 6 : Les modifications des histones et la transcription des gènes (Duygu <i>et al.</i> 2013) ..	46
Figure 7 : Les systèmes endocriniens cibles des PE, la signalisation endocrine normale, l'action agoniste et antagoniste des PE (Schug <i>et al.</i> 2016).....	56
Figure 8 : Effets de PE sur le processus de l'EMT dans la métastase cancéreuse (Lee <i>et al.</i> 2016).....	65
Figure 9 : Structure générale des domaines communs des récepteurs nucléaires (Nagy <i>et al.</i> 2004).....	70
Figure 10 : Rôle du PXR et CAR dans le cancer (Banerjee <i>et al.</i> 2015).	74
Figure 11 : Mode d'activation du récepteur AhR (Mackowiak <i>et al.</i> 2016).....	76
Figure 12 : Schéma structural des récepteurs membranaires (http://rcpg.chez.com/partie4.html).....	81
Figure 13 : Les voies de signalisation activées par GPR30 (Maggiolini <i>et al.</i> 2010).....	85
Figure 14 : Cross-talk entre GPR30 et les récepteurs ErbB et IGF-IR (Lappano <i>et al.</i> 2013). 89	
Figure 15 : Structure chimique du Bisphenol A comparée à celle de l'œstradiol.....	93
Figure 16 : Activité œstrogénique du BPA <i>via</i> les différents récepteurs cellulaires (Wang <i>et al.</i> 2017).....	95
Figure 17 : Les effets du BPA sur le microenvironnement des cellules épithéliales mammaires (Wang <i>et al.</i> 2017).....	97
Figure 18 : Les effets du BPA sur la glande mammaire	102
Figure 19 : Le métabolisme du benzo[a]pyrène (Shiizaki <i>et al.</i> 2017)	104
Figure 20 : Le modèle humain MCF10 de la progression tumorale du cancer du sein.....	109
Figure 21: Les effets des siRNA-AhR et siRNA-GPR30 sur la capacité à former des mammosphères.....	167
Figure 22 : Etude de la cinétique de l'expression du <i>CYP1A1</i> par RT-qPCR	168

Figure 23 : L'activité transcriptionnelle d'AhR en présence du G1 à 10^{-6} M et le G15 aux différentes concentrations indiquées	169
Figure 24 : L'expression du <i>CYP1A1</i> par RT-qPCR en présence de l'antagoniste de GPR30 (G15).	170
Figure 25 : La prolifération cellulaire des cellules MCF10AT1 en présence du G1 10^{-6} M et 10^{-10} M.....	171
Figure 26 : La prévention des effets délétères de (BPA+B[a]P) avec les antagonistes d'AhR et/ou GPR30.....	172
Figure 27 : Détection de la protéine HER2 / ErbB2 par western blot dans la lignée MCF10AT1.....	173

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes classes de molécules génotoxiques (Felton <i>et al.</i> 2002; Belpomme <i>et al.</i> 2007; Liu <i>et al.</i> 2015).....	53
Tableau 2 : Les PE les plus communs trouvés dans l'environnement, leurs sources et leurs conséquences.....	59

Liste des abréviations

2-AAF	2-Acetylamino-fluorene
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanine
AAF	Nacetyl-2- aminofluorène
AF	2-aminofluorène
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AKT	Protein kinase B
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
AMPc	Cyclic adenosine monophosphate
AP	Apurinic/apyrimidinic
AR	Androgen receptor
ARNT	Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator
ATF3	Activating transcription factor 3
B[a]P	Benzo[a]pyrene
BBN	N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine
BBP	Butyl benzyl phtalate
BCRP	Breast cancer resistance protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPA	Bisphenol A
BPDE	B[a]P-diol-epoxyde
CAF	Cancer Associated Fibroblasts

CAR	Constitutive Androstane Receptor
CNV	Copy number variation
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
CpG	Cytosine -phosphate -Guanine
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CSC	Cancer Stem Cells
CTFG	Connective Tissue Growth Factor
CYP450	Cytochromes P450
DBD	DNA Binding Domain
DBP	Dibutyle phthalate
DCIS	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
DDD	Dichlorodiphényldichloroéthane
DDE	Dichlorodiphényldichloroethylene
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP	Phtalate de di-2-éthylhexyle
DEP	Diéthyle phthalate
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthracene
DMFS	Distant metastasis-free survival
DNMT	DNA methyltransferase
DRE	Dioxin response element
E1	Estrone
E2	17- β -estradiol

ECL	Extracellular loop
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGR1	Early growth response-1
EMT	Epithelial mesenchymal transition
EPA	Environmental Protection Agency
ERR	Estrogen related receptor
ER	Estrogen receptors
ERE	Estrogen-response-elements
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ER α	Estrogen receptor α
ER β	Estrogen receptor β
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FGF	Fibroblast growth factor
FOX	Fork-head box protein
GADD45B	Growth arrest and DNA damage-inducible beta
GEN	Genistein
GPCR	G Protein-Coupled Receptors
GPR30	G-protein coupled receptor 30
GR	Glucocorticoid receptor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSTP1	Glutathione S-transferase P
GDP	Guanosine diphosphate

GTP	Guanosine triphosphate
GTX	Génotoxique
HAH	Halogenated Aromatic Hydrocarbons
HAT	Histone Acetyl Transferase
HB-EGF	Heparin-bound EGF
HCA	Heterocyclic amine
HDAC	Histone deacetylase
HDMS	Histone Demethylases
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
hESC	Human embryonic stem cells
HMTS	Histone Methyltransferase
HR	Hormones receptors
HSP	Heat shock protein
IARC	International Agency for Research Cancer
ICL	Intracellular loop
IFNγ	Interferon gamma
IGF-IR	Insulin-like growth factor-I Receptor
IL	Interleukine
INCA	Institut national du cancer
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline
JNK	Jun N-terminal kinases
KBrO3	Bromate de potassium

KLF	Kruppel-like factor
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
Kyn	Kynurenine
LAMP3	Lysosomal-associated membrane protein 3
LBD	Ligand Binding Domain
LCIS	Lobular carcinoma <i>in situ</i>
LEF	Lymphoid enhancer binding factor
LH	Luteinising hormone
LINE	Lignelong Interspersed Nuclear Element
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MaSC	Mammary stem cells
Mdm2	Murine double minute 2
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MEC	Matrice extra-cellulaire
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline
MEP	Monoethyl phtalate
mER	Membrane-bound ER
miRNA	MicroRNA
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPT	Modifications post-traductionnelles
MR	Mineralocorticoïd receptor
MSC	Mesenchymal Stromal /Stem Cells

N2-alkylG	N2-alkyl guanine
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NDMA	N-Nitrosodimethylamine
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NGTX	Non Génotoxique
NR	Nuclear receptor
NNK	(4-methylnitrosamino) -1-(3-pyridyl)-1-butanone
NO	Nitric oxyde
Notch1,2	Neurogenic locus notch homolog protein 1, 2
O, p -DDE	Ortho, para-dichlorodiphényldichloroéthylène
p,p'-DDT	p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PAK1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PBDEs	Polybrominated diphenyl esters
PCB	Polychlorinated biphenyls
PE	Perturbateurs endocriniens
PhIP	Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protein Kinase A
PKG	Protein kinase B

PKC	Protein Kinase C
PMD	Percent mammographic density
Pou5F1/Oct4	POU Class 5 Homeobox 1/octamer-binding transcription factor 4
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptors
PR	Progesterone receptor
PVC	Polychlorure de vinyle
PXR	Pregnane X receptor
RAR	Retinoic acid receptor
KBrO3	Potassium bromate
Kyn	Kynurenine
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma virus
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RVD	Receptor vitamin D
RXR	Retinoic X receptor
SHC	SHC adaptor protein
Snai1	Zinc finger protein SNAI1
Snai2	Zinc Finger Protein SNAI2
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOX	Sex Determining Region Y-Box
SP	Side population
TAZ	Tafazzin

TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-pdioxin
TCF	T-cell factor
TDO2	Tryptophane 2,3-Dioxygénase
TF	Transcription factor
TGF-β	Transforming growth factor β
TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinases-3
TM	Transmembrane
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNF	Tumor necrosis factor
TNFα	Tumor necrosis factor- α
TR	Thyroid receptor
Twist1,2	Twist Family BHLH Transcription Factor 1,2
UDP	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
Vim	Vimentin
XR	Xenobiotic receptor
XAP2	Hepatitis B virus X-associated protein 2
XRCC3	X-ray repair cross-complementing group 3
ZNF 217	Zinc Finger Protein 217
β-AR	β -Adrenergic Receptor

Introduction

A. Le cancer du sein

1. La glande mammaire

Le sein est un organe rattaché au muscle grand pectoral, comprenant une glande mammaire entourée par du tissu adipeux. C'est une glande exocrine un peu unique, qui se développe en différentes étapes séparées dans le temps au cours de la vie et. à l'âge adulte, la glande mammaire est formée d'un compartiment mésenchymateux composé de vaisseaux sanguins et de nerfs, et d'un compartiment épithélial contenant des lobules (des groupes de glandes qui produisent le lait) liés aux canaux galactophores qui débouchent au niveau du mamelon (**figure 1**) INCA (Institut National Du Cancer).

La glande mammaire réagit aux changements hormonaux et commence à se développer au moment de la puberté; des changements mammaires apparaissent lors des menstruations, de la grossesse, des lactations et de la ménopause en fonction des taux d'œstrogène, de progestérone et de prolactine. Ces changements mammaires, au cours de la vie d'une femme, impliquent des phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire qui peuvent rendre la glande mammaire plus sensible à la cancérogenèse (Ingthorsson *et al.* 2016).

2. Epidémiologie du cancer du sein

Les dernières statistiques mondiales sur le cancer ont montré que le cancer du sein est la maladie maligne la plus fréquente et le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde chez les femmes (Ferlay *et al.* 2015) (**Figure 2**). Selon les données GLOBOCAN 2012, le cancer du sein est en forte hausse de manière globale dans le monde entier. En effet, environ 1,7 million de nouveaux cas de cancer du sein sont diagnostiqués chez les femmes dans le monde en 2012 (25% de tous les cancers). Cette incidence a augmenté de plus de 20% depuis les dernières estimations en 2008. Ces taux d'incidence divergent entre les pays développés qui présentent des taux plus élevés que les pays en développement. Ces variations peuvent aller de 27 pour 100 000 en Afrique Centrale et en Asie de l'Est à 92 pour 100 000 en Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest (Ferlay *et al.* 2015).

Par ailleurs, le cancer du sein est la deuxième cause la plus fréquente de mortalité par cancer chez les femmes après le cancer du poumon, et a atteint 522 000 décès en 2012 (Ferlay *et al.* 2015). Les taux de mortalité varient entre les régions du monde notamment en raison de la survie plus favorable en présence de diverses thérapies anti-cancéreuses et de l'amélioration

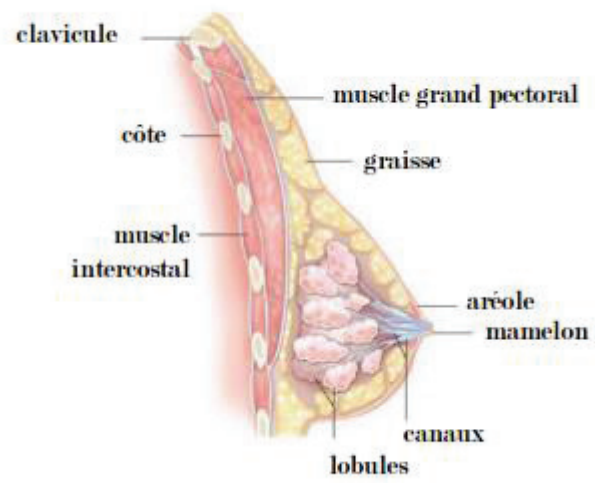


Figure 1 : Coupe du sein à l'état adulte (INCA)

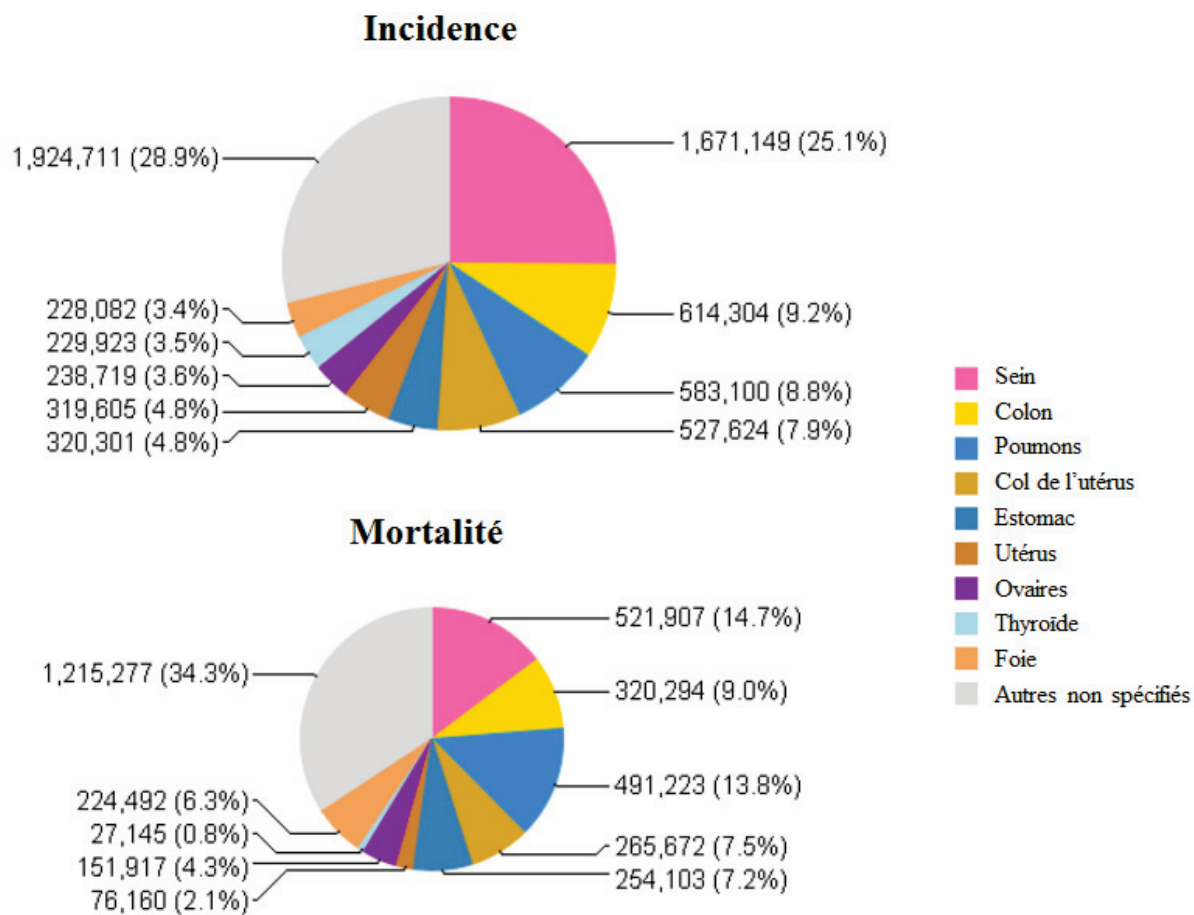


Figure 2 : L'estimation des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en 2012 (Globocan 2012)

des étapes du parcours de soins. Dans les régions les plus développées 198 000 patientes décèdent de leur maladie (15,4% du total) *versus* 324 000 décès (soit 14,3% du total) dans les pays moins développés (Ferlay *et al.* 2015).

3. Classification histologique du cancer du sein

La classification histologique du cancer du sein basée sur des critères morphologiques et cytologiques permet de distinguer deux types de carcinome du sein; le carcinome *in situ* et le carcinome invasif.

3.1 Le carcinome *in situ*

Nous pouvons distinguer différents types de carcinome *in situ* :

- Le carcinome canalaire *in situ* ou ductal carcinoma *in situ* (DCIS) est l'état où les cellules épithéliales normales des canaux galactophores des seins sont remplacées par des cellules anormales et sont capables d'élargir la taille des canaux et des lobules. Le DCIS est considéré comme une forme non invasive de cancer du sein parce que ces cellules anormales n'ont pas infiltré au-delà de la couche de cellules d'où elles proviennent. C'est le type le plus courant de cancer du sein *in situ*, il représente environ 83% des cas diagnostiqués *in situ* entre 2008 et 2012 (DeSantis *et al.* 2016). Le DCIS peut progresser, ou non, vers un cancer invasif. Les femmes ayant des antécédents de DCIS sont 8 à 10 fois plus susceptibles de développer un cancer du sein invasif que les femmes sans DCIS (Lopez-Garcia *et al.* 2010).
- Le carcinome lobulaire *in situ* (LCIS), aussi connu sous le nom de néoplasie lobulaire, est caractérisé par des cellules qui ressemblent à des cellules cancéreuses qui prolifèrent dans les lobules du sein. Le LCIS est beaucoup moins fréquent que le DCIS, il représente environ 13% des cancers féminins du sein diagnostiqués au cours de la période 2008-2012 (DeSantis *et al.* 2016). De manière générale, le LCIS présente de fort risque de développer un cancer invasif : les femmes ayant eu un LCIS sont 7 à 12 fois plus susceptibles de développer un cancer invasif du sein que les femmes sans LCIS (Harris *et al.* 2010).
- D'autres carcinomes *in situ* présentent les caractéristiques des carcinomes canaux et lobulaires ou sont d'origines inconnues (DeSantis *et al.* 2016)

3.2 Le carcinome invasif

Le carcinome invasif, est également appelé carcinome infiltrant. Dans ce type de cancer, les cellules cancéreuses ont traversé la membrane basale des lobules ou des canaux, d'où elles sont issues, et ont déjà commencé à envahir le tissu mammaire environnant. La plupart des cancers du sein sont infiltrants (Society 2015).

4. Classification moléculaire du cancer du sein

On distingue quatre grands sous-types moléculaires du cancer du sein. Ils sont classés selon la présence (+) ou l'absence (-) des récepteurs hormonaux (HR) aux œstrogènes (ER) ou à la progestérone (PR) et des récepteurs de facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2). Ils diffèrent essentiellement par leur réponse aux traitements (Anderson *et al.* 2014; Kohler *et al.* 2015).

- Le luminal A (ER+/PR+/HER2-): les cellules tumorales expriment le récepteur aux œstrogènes (ER+) et/ou le récepteur à la progestérone (PR+) mais pas le récepteur HER2 (HER2-). Ce sous-type représente 50-60 % des cancers du sein (Mailliez 2014). La croissance des tumeurs lumineales A est lente et moins agressive que les autres sous-types. Cette classification est considérée comme facteur de bon pronostic pour le cancer du sein. En effet, les patientes appartenant à ce sous-type répondent très bien à l'hormonothérapie grâce à la présence des récepteurs hormonaux (Blows *et al.* 2010; Anderson *et al.* 2014).
- Le luminal B (ER+/PR+/HER2+): La différence majeure entre le sous-type luminal A et le luminal B, est que les tumeurs du sous-type luminal B expriment le récepteur d'HER2. Ce sous-type représente environ 10% des cancers du sein (Mailliez 2014). Les tumeurs lumineales B ont tendance à être plus agressives que celles du luminal A dû à l'expression d'HER2 qui stimule des voies de signalisation telles que les voies RAS-RAF-ERK et PI3K-AKT impliquées dans la régulation de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire (Moasser 2007; Parise *et al.* 2014; Takegawa *et al.* 2017).
- Le type HER2 (ER-/PR-/HER2+): Ce type exprime très fortement le récepteur HER2 mais n'exprime pas les deux récepteurs hormonaux. Il représente environ 15-20 % des cancers du sein (Mailliez 2014). Ces cancers ont tendance à croître et à se répandre de manière plus agressive que les autres cancers du sein et sont associés à

un facteur de mauvais pronostic par rapport aux cancers du sein ER+ (Blows *et al.* 2010). Cependant, l'utilisation récente de thérapies ciblées contre les cancers HER2+ tel que le Trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal qui cible directement la protéine HER2, a nettement permis d'améliorer ce pronostic défavorable. En effet, lorsque cette molécule est combinée à la chimiothérapie elle peut réduire de 52% le risque de récurrence et de 33% le risque de décès (Romond *et al.* 2005; Hernandez-Blanquist *et al.* 2016).

- Le triple négatif (ER-/PR-/HER2-): Ces tumeurs sont appelées triple négatives parce qu'elles sont ER-, PR- et HER2-. Environ 10-20 % des cancers du sein sont triple négatifs (Mailliez 2014). Cependant, aux États-Unis ces cancers sont presque deux fois plus fréquents chez les femmes noires que chez les femmes blanches. Ils sont également plus fréquents chez les femmes pré-ménopausées et chez celles qui ont une mutation au niveau du gène *BRCA1* (Perou *et al.* 2011). La majorité des cancers du sein triple négatifs font partie du sous-type basal-like qui possède des profils d'expression similaires à ceux des cellules épithéliales basales et des cellules normales myoépithéliales du sein (Perou *et al.* 2000). Les cancers du sein triple négatifs représentent le facteur de plus mauvais pronostic parmi tous les sous-types moléculaires, en particulier parce qu'il n'existe toujours pas de thérapie ciblée pour ces tumeurs (Blows *et al.* 2010; Adrada *et al.* 2014).

5. Les étapes de la cancérogenèse

La cancérogenèse est un processus complexe et se déroule en trois principales étapes: l'initiation, la promotion et la progression (**Figure 3**). Chacune de ces étapes est caractérisée par un phénotype cellulaire différent.

L'initiation est la première étape dans le développement d'un cancer. Une exposition répétée aux initiateurs tels que le stress oxydatif, des carcinogènes chimiques et des xénobiotiques augmente la fréquence de mutation génétique. Ces mutations peuvent induire l'activation de proto-oncogènes (ex : *Ras*, *Erb*, *Myc*) et/ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur (ex : *TP53*) entraînant ainsi une instabilité du génome et une modification des

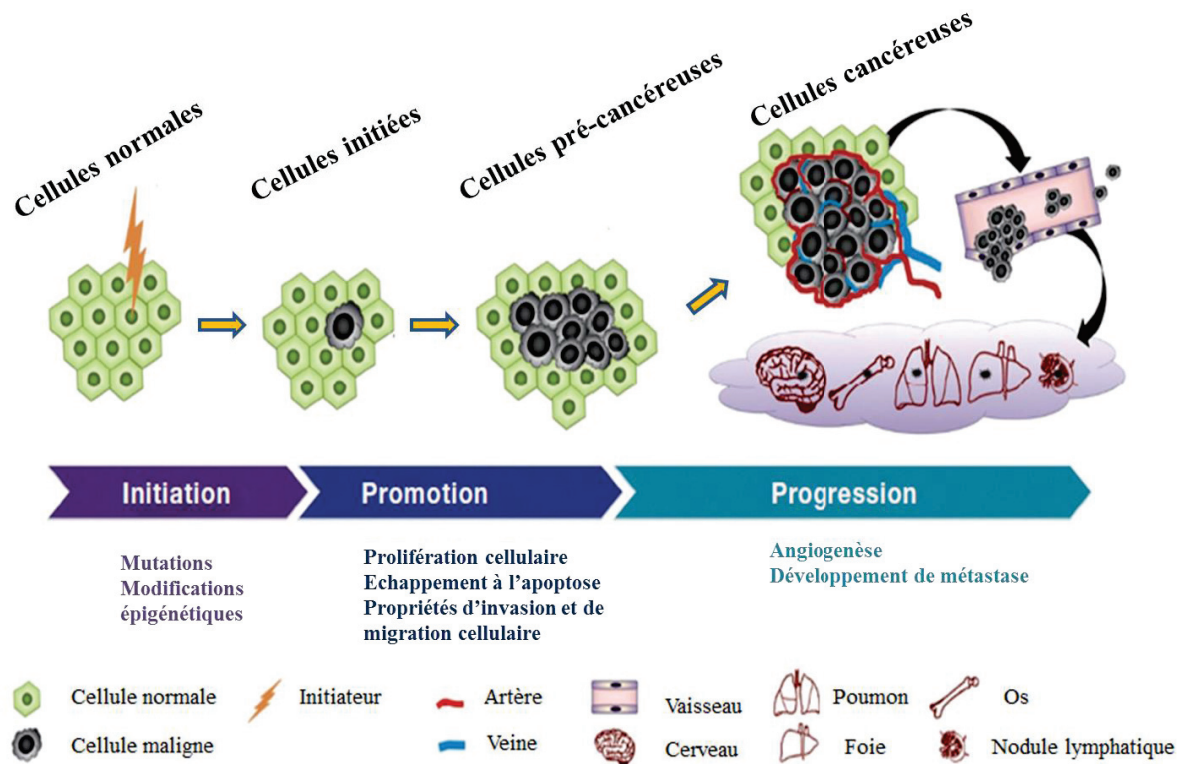


Figure 3 : La cancérogenèse, un processus de trois phases (Liu *et al.* 2015)

processus de mort cellulaire programmée, de prolifération cellulaire et de réparation de l'ADN (Fearon *et al.* 1990; Benigni *et al.* 2013). Les modifications épigénétiques, qui sont des changements dans l'expression des gènes mais pas dans la séquence des gènes, peuvent également être des événements déclencheurs de la cancérogenèse. Comme par exemple l'hyperméthylation de l'ADN, qui est souvent associée à une répression de la transcription, peut être retrouvée dans la région promotrice des gènes suppresseurs de tumeurs (Jones *et al.* 2002). Cette étape est irréversible: une fois qu'une cellule est mutée par un initiateur, elle devient sensible à la promotion. Puisque l'initiation est causée par des modifications génétiques permanentes, les cellules filles dérivées de la division de la cellule mutée porteront également la mutation (Liu *et al.* 2015).

La promotion est la deuxième étape de la cancérogenèse qui se produit sur les cellules ayant été initiées (Trosko 2001). Les substances capables de favoriser la prolifération de ces cellules initiées sont des promoteurs de tumeurs (Verma *et al.* 1980). Les promoteurs agissent seulement lorsque les cellules ont été exposées précédemment à un initiateur. Ils affectent les voies intra-cellulaires responsables de la prolifération cellulaires (Klaunig *et al.* 2000). Parmi les agents qui ont montré des propriétés favorisant la promotion des tumeurs on cite le dichlorophényltrichloroéthane (DDT), les biphényles polychlorés (PCB), les œstrogènes (Yuspa *et al.* 1988). Il existe également des composés capables d'être à la fois des initiateurs et des promoteurs de tumeur. Ils sont reconnus pour être des carcinogènes complets tels que le benzo[a]pyrène (B[a]P) et le 4-aminobiphényle (Weston 2003). Cette étape est considérée comme une étape réversible de la cancérogenèse et donne naissance à des cellules précancéreuses et transformées. Cette transformation implique l'évolution des cellules pré-néoplasiques en cellules qui expriment un phénotype malin caractérisé par une acquisition de caractéristiques cancéreuses telles que tels que la migration et l'invasion cellulaire, la prolifération cellulaire, et la résistance à l'apoptose (Combes *et al.* 1999).

La troisième étape implique l'acquisition d'un comportement tumoral plus agressif dans la cancérogenèse. Cette étape permet le passage des cellules pré-cancéreuses aux cellules cancéreuses. Les cellules à cette étape possèdent de multiples modifications héréditaires génétiques et épigénétiques, y compris l'activation de proto-oncogènes (*myc*, *raf*, *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2), et *jun*) et la perte fonctionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*) (Weston 2003). Le développement métastatique apparaît au

cours de cette étape grâce au processus d'angiogenèse avec la croissance de nouveaux capillaires sanguins dans la tumeur renforcée par la sécrétion de facteurs de croissance spécifiques et de récepteurs de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF (Platelet-derived growth factor) , le récepteur PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor), le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF (Vascular endothelial growth factor) et le récepteur VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor), le tout conduisant à une prolifération et à une propagation de la tumeur (Niu *et al.* 2010)

6. Les facteurs de risque du cancer du sein

Un facteur de risque peut être un élément favorisant l'apparition de la pathologie dans l'historique du patient. Cependant, en aucun cas, le ou les facteur(s) de risque ne constitue(nt) la (les) seule(s) explication(s) au développement du cancer. De nombreux facteurs sont connus pour augmenter le risque du cancer du sein. Parmi ces facteurs, nous distinguons certains facteurs non modifiables, comme l'âge, l'histoire familiale, et l'exposition du tissu mammaire aux hormones (la ménarche précoce et la ménopause tardive). D'autres facteurs sont considérés comme modifiables tels que l'obésité post-ménopausique, l'administration d'œstrogènes exogènes (contraceptives oraux et traitement hormonal substitutif), la consommation d'alcool et de tabac, l'allaitement maternel, etc....(Liu *et al.* 2015).

6.1 Les facteurs gynéco-obstétriques

6.1.1. La grossesse

Le fait de ne pas avoir d'enfants ou bien d'en avoir mais à un âge tardif a été associé à un risque accru de cancer du sein tandis que le fait d'avoir un premier enfant à un âge jeune et en avoir plusieurs a été associé à une diminution de ce risque (DeSantis *et al.* 2016). Ceci semble être dû aux facteurs hormonaux. En effet, les nullipares sont plus sujets à développer un cancer car la durée d'exposition aux œstrogènes augmente et les taux plasmatiques de prolactine sont élevés. Comme pour les œstrogènes, des taux élevés de prolactine pourraient avoir un effet promoteur pour le développement du cancer du sein notamment en induisant l'activation de la voie *ERK1/2* (Gutzman *et al.* 2005) et en exerçant avec les œstrogènes une activation synergique d'ER alpha (ER- α) *via* la phosphorylation de la serine/thréonine kinase PAK1 (Oladimeji *et al.* 2016). Les facteurs de risque associés à la reproduction semblent être fortement liés aux cancers du sein ER+ (Anderson *et al.* 2014).

6.1.2. L'allaitement naturel

L'allaitement maternel a été associé à une réduction du risque de développer un cancer du sein. Une étude sur 30 pays montre que le risque de cancer du sein a été réduit de 4% pour chaque année d'allaitement (Lancet 2002). L'explication qui a été donnée est que l'allaitement maternel inhibe la menstruation et donc réduit le nombre de cycles menstruels pendant la vie de la femme (Britt *et al.* 2007). Une autre hypothèse concerne les changements structuraux qui se produisent dans le sein suite à la lactation et au sevrage, dont notamment l'augmentation des canaux lobulaires terminaux qui semble avoir un effet protecteur contre le cancer du sein (Milanese *et al.* 2006) en particulier pour le type basal-like (Faupel-Badger *et al.* 2013).

6.1.3. L'âge des premières règles et de la ménopause

Le risque de cancer du sein semble être 20% plus élevé chez les femmes dont la ménarche a commencé avant l'âge de 11 ans par rapport à celles dont la ménarche a débuté à l'âge de 13 ans. Par ailleurs, les femmes en ménopause à l'âge de 55 ans ou plus ont environ 12% de risque en plus de développer un cancer par rapport à celles ménopausées à l'âge de 50-54 (Lancet 2012). Ce risque accru peut être dû à l'exposition prolongée aux hormones reproductives au cours de leur vie. De plus, il semble être fortement lié aux cancers du sous-type ER+ et non aux autres sous-types (Anderson *et al.* 2014).

6.1.4. La densité mammaire

La densité mammaire est une notion radiologique, constatée à la mammographie. C'est une hypertrophie progressive du tissu glandulaire du sein (tissu dense) accompagnée par une diminution du tissu adipeux (tissu radiotransparent) entraînant l'augmentation de la densité mammaire. Les variations du pourcentage de la densité mammographique (PMD) reflètent les variations des quantités de collagène et du nombre de cellules épithéliales et non épithéliales dans le sein. Une densité élevée est associée à un risque nettement accru de cancer du sein invasif (Boyd *et al.* 2011). Les tissus mammaires denses ont montrés: i) des taux élevés de collagène et de l'inhibiteur tissulaire métalloprotéase 3 (TIMP-3) qui est impliqué dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Guo *et al.* 2001). ii) une augmentation de l'activité de l'aromatase en immunoréactivité (Vachon *et al.* 2011), et iii) des taux élevés de la proteoglycane lumican qui est impliquée dans la migration des cellules épithéliales (Alowami *et al.* 2003). La densité mammaire est influencée par de nombreux facteurs, elle diminue avec

l'âge, la grossesse, la ménopause et avec certains médicaments comme le tamoxifène (Boyd *et al.* 2011). D'autres facteurs tels que des facteurs génétiques, l'hormonothérapie combinée à la ménopause ou encore la consommation d'alcool augmentent cette densité (Boyd *et al.* 2011; Trinh *et al.* 2015).

6.2 Les facteurs génétiques

6.2.1. Histoire familiale et mutations génétiques au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Le risque de cancer du sein est majoré en cas d'antécédent dans la famille maternelle, surtout ceux du premier degré (mère, sœur, ou fille). Comparé aux femmes sans antécédents familiaux, le risque du cancer du sein est environ 2 fois plus élevé pour les femmes ayant une personne de premier degré qui a été diagnostiquée, près de 3 fois plus élevé chez les femmes ayant deux personnes et près de 4 fois plus élevé chez les femmes ayant trois personnes ou plus (Sorlie *et al.* 2001). Il est important de savoir que la majorité des femmes ayant une ou plusieurs personnes du premier degré touchées peuvent ne jamais développer un cancer du sein. Inversement, une femme ne présentant aucune histoire familiale de la maladie peut développer un cancer du sein.

Parmi les cancers du sein, 5 à 10% sont héréditaires et sont donc d'origine génétique (Turnbull *et al.* 2008; Schwartz *et al.* 2009). Deux gènes majeurs de prédisposition héréditaire au cancer du sein ont pu être identifiés : les gènes suppresseurs de tumeur *BRCA1* et *BRCA2*. En moyenne, le risque d'avoir des mutations au niveau de *BRCA1* et *BRCA2* est respectivement estimé entre 57% à 65% et 45% à 55%. (Antoniou *et al.* 2003; Mavaddat *et al.* 2013). Lorsqu'une personne est atteinte du cancer du sein à un âge précoce, cela indique l'existence d'un facteur de prédisposition génétique (Armaou *et al.* 2009).

Ce type de cancer du sein suit un modèle héréditaire autosomique dominant et tend à se manifester précocement, en forte intensité et bilatéralement (Mehrgou *et al.* 2016). Ainsi, ce cancer possède une fréquence mitotique plus élevée et une pénétrance lymphatique plus accentuée que le cancer du sein sporadique (Musolino *et al.* 2005). Dans ce type de cancer, les cellules ont une mutation somatique dans le gène *TP53* (Musolino *et al.* 2005) et le plus souvent n'expriment pas les récepteurs ER, PR et HER2 (Musolino *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009).

6.2.2. Les radiations

Un lien entre l'exposition au rayonnement et le cancer du sein a été mis en avant notamment dans des études protégées sur les survivants de bombe atomique ou encore sur des femmes qui ont suivi une radiothérapie à forte dose au niveau de la poitrine et en particulier lorsqu'elles ont été exposées à un jeune âge (Preston *et al.* 2002; Travis *et al.* 2003). Cela est possiblement dû au fait que les tissus mammaires ne sont pas complètement différenciés et sont donc plus sensibles aux radiations (Russo *et al.* 2000). Les effets négatifs des radiations se manifestent par des dommages à l'ADN et une inflammation accrue (Haston 2012). Song YZ *et al* ont révélé une association entre les radiations et la présence de polymorphismes nucléotidiques du gène *XRCC3* (X-ray repair cross-complementing group 3). Or, la protéine du gène *XRCC3* est connue pour jouer un rôle important dans la réparation des ruptures d'ADN double brin soulevant ainsi l'effet nocif des radiations sur l'ADN (Song *et al.* 2015).

6.3 Les facteurs hormonaux

6.3.1. Les hormones endogènes

Les œstrogènes font partie des facteurs de risque les plus importants du cancer du sein considéré comme cancer hormono-dépendant. Les œstrogènes naturels sont principalement le 17- β -œstradiol (E2), l'œstrone (E1) et l'œstriol. Les œstrogènes jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie osseuse et favorisent le développement des caractères sexuels secondaires comme les seins mais également dans la promotion de la croissance des cancers hormono-dépendants dont de nombreux cancers du sein (Heldring *et al.* 2007). L'action des œstrogènes est médiée par les récepteurs aux œstrogènes (ER) qui font partie de la famille des récepteurs nucléaires surtout présents dans le cytoplasme dans un état inactif sous forme de complexes avec les protéines de choc thermique HSP (Heat shock protein). On distingue le récepteur ER- α codé par le gène *ESR1* et le récepteur ER- β codé par le gène *ESR2* (Mangelsdorf *et al.* 1995). Les œstrogènes activent différentes voies de signalisation connues pour jouer un rôle important dans le développement tumoral (**figure 4**). Il existe 4 voies de signalisation des ER : la voie A, appelée voie génomique classique, lorsque E2 se lie à ER, ER se dimérise et change de conformation afin d'être délocalisé dans le noyau. Celui-ci se lie alors directement aux séquences appelées « éléments de réponse aux œstrogènes » ERE et recrute des co-activateurs afin d'activer la transcription de gènes cibles. La voie B, ou voie génomique non classique, après dimérisation d'ER et sa translocation dans le noyau, le complexe ER

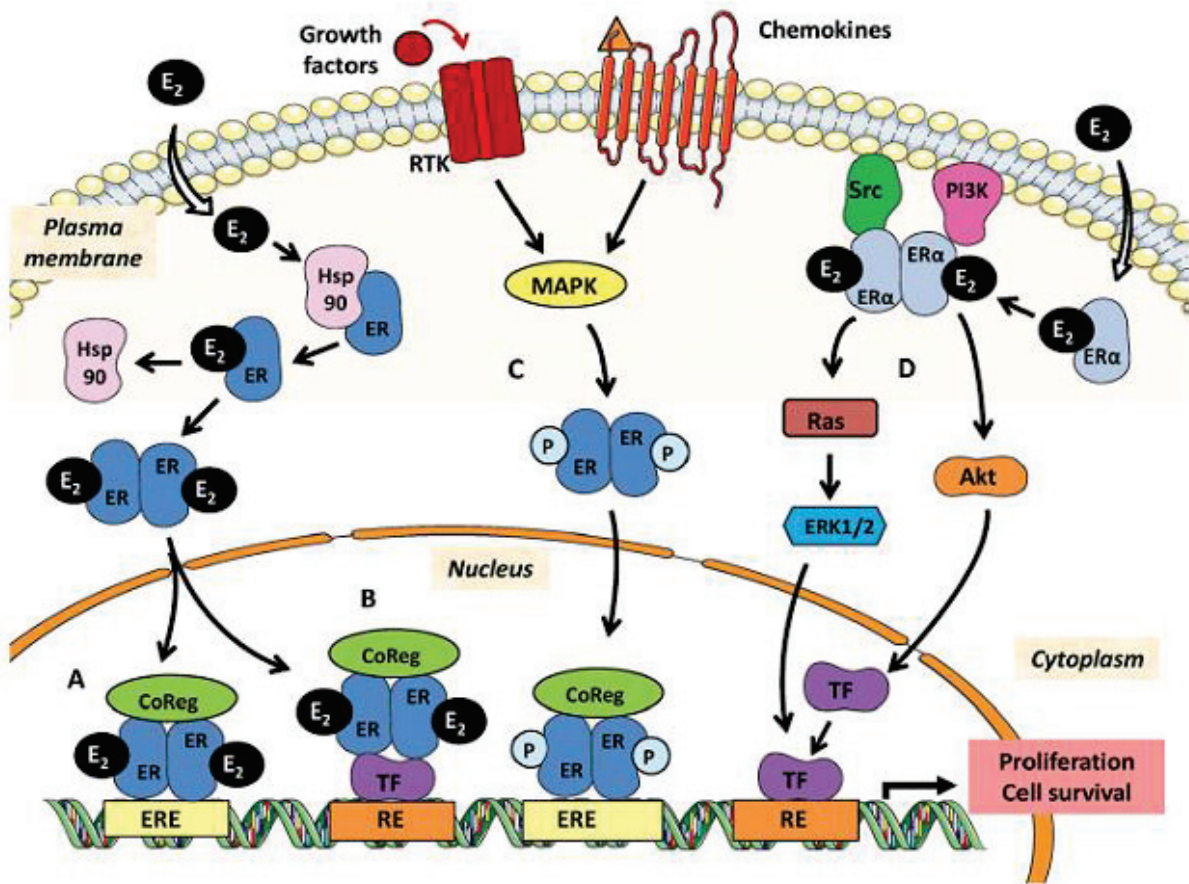


Figure 4 : Les voies de signalisation des ER (Le Romancer *et al.* 2011)

interagit avec d'autres facteurs de transcription tels que l'AP1 (Activator protein 1) ou le Sp1 (Specificity protein 1); ces derniers se lient à l'ADN. La voie C, indépendante des ER: l'activation d'ER peut également être activée par des facteurs de croissance ou des chimiokines entraînant des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation des ERs. ER peut alors se dimériser et se transloquer dans le noyau afin d'activer ses gènes cibles. De manière intéressante, les modifications post-traductionnelles augmentent l'affinité du récepteur pour les séquences ERE. La voie D ou voie non-génomique, implique un petit pool d'ER qui recrute différentes protéines kinases et qui activent ensuite des cascades de signalisation permettant l'activation des gènes cibles grâce à des facteurs de transcription. L'activation de ces voies de signalisation permettent d'activer des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Le Romancer *et al.* 2011).

D'autre hormone comme la progestérone est également impliquée dans le contrôle de la reproduction, du système cardio-vasculaire et du système nerveux (Schumacher *et al.* 2008). Elle est aussi capable de stimuler la prolifération cellulaire et l'activation des cellules progénitrices (Briskin 2013).

Des cycles menstruels prolongés en raison de la ménarche précoce et/ou de la ménopause tardive et un excès de production d'hormones chez les femmes obèses post-ménopausées représentent un facteur de risque pour le cancer du sein due à une exposition prolongée aux hormones ovariennes (Finlay-Schultz *et al.* 2015). La plupart des théories sont centrées sur l'action pro-proliférative des hormones féminines sur les cellules épithéliales mammaires. Il a également été découvert que les hormones influencent les populations de cellules souches présentes dans le sein. Par ailleurs, une augmentation de ces cellules souches favorise le développement du cancer du sein (Finlay-Schultz *et al.* 2015). *In vitro*, un traitement à la progestérone augmente la population de cellules ALDH⁺ (un marqueur de cellules souches) dans les cellules cancéreuses T47D (Vares *et al.* 2013). D'autre part, les œstrogènes et la progestérone augmentent le nombre de cellules CD44⁺ (une protéine de surface cellulaire impliquée dans la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'angiogenèse) dans des lignées du cancer du sein (Cittelly *et al.* 2013; Finlay-Schultz *et al.* 2015). Les œstrogènes sont capables d'influencer la capacité tumorigène des cellules souches cancéreuses via l'activation de GPR30 (G-protein coupled receptor 30) qui régule la voie de signalisation HIPPO (impliquée dans la signalisation de la prolifération cellulaire et l'apoptose) à travers l'activation de la phospholipid transacylase tafazzin (TAZ) (Wei *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2015). De plus, cet effet ostrogénique a été démontré non seulement *in*

vitro par la capacité des cellules souches à former des mammosphères et à exprimer le marqueur CD44+ (Cordenonsi *et al.* 2011). mais également *in vivo* dans l'induction du processus métastatique par des cellules souches cancéreuses (Bartucci *et al.* 2015). Tout cela nous indique que les hormones stéroïdiennes favorisent la capacité tumorigène des cellules souches cancéreuses dans le cancer du sein.

6.3.2. Les hormones exogènes

Récemment, une étude a souligné le fait que l'utilisation des traitements hormonaux substitutifs, qui combinent les œstrogènes et la progestérone, augmente le risque de développer un cancer du sein avec un risque plus élevé associé à une utilisation plus longue. (Chlebowski *et al.* 2013; Manson *et al.* 2013).

B. Cancer et environnement

1. Facteurs environnementaux en tant que facteurs de risque du cancer

Les facteurs environnementaux comprennent tous les facteurs non génétiques: l'air, l'eau, le sol, l'alimentation, ainsi que le mode de vie, le régime alimentaire, les infections et les expositions professionnelles.

Des expositions aux polluants environnementaux peuvent moduler de nombreux procédés biologiques et moléculaires tels que l'expression des gènes, les mécanismes de réparation des gènes, la production ainsi que la fonction d'hormones et l'inflammation ; conduisant à des effets néfastes sur la santé humaine, notamment l'apparition et le développement de différents types de cancers (Diamanti-Kandarakis *et al.* 2009; Rudel *et al.* 2009). Les facteurs liés au mode de vie jouent un rôle important dans la cancérogenèse, comme par exemple la consommation d'alcool et de tabac, l'obésité et le stress... Par ailleurs, les changements environnementaux (guerre et industrie) au cours du temps ont favorisé l'accumulation de nombreux nouveaux facteurs cancérogènes tels que la présence de produits chimiques dans les aliments, l'air ou l'eau. Leurs effets cancérogènes ou mutagènes ont été mis en avant dans des cellules humaines aboutissant à une incidence croissante des cancers.(Belpomme *et al.* 2007). Ainsi, la pollution de notre environnement est très certainement l'une des principales causes du cancer (Hanahan *et al.* 2011).

1.1 Le tabagisme

Le tabagisme est un facteur de risque majeur contribuant à la cancérogenèse humaine. La fumée de tabac et le goudron contiennent des substances mutagènes, principalement des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des nitrosamines qui sont classés comme cancérogènes pour l'homme par l'IARC (International Agency for Research Cancer). Le tabagisme est un facteur de risque de plusieurs types de cancers, principalement le cancer du poumon et le cancer du tractus aéro-digestif supérieur (y compris les cancers des cavités buccale, nasals, des sinus, du pharynx et du larynx), mais aussi, à une certaine mesure, des cancers de l'œsophage, de l'estomac, du pancréas, du foie, de la vessie, des reins, du col de l'utérus, et de la leucémie myéloïde (IARC 2004). Les premières observations cliniques et épidémiologiques montrant l'association entre le tabagisme et le cancer du poumon datent des années 1950 (Wynder *et al.* 1950).

Dans le corps, la métabolisation des carcinogènes présents dans le tabac se fait dans un premier temps par les enzymes de la famille CYP450, intervenant dans la biodégradation de nombreuses molécules exogènes dites « xénobiotiques », et par les mono-oxygénases qui transforment les substances carcinogènes en des intermédiaires génotoxiques qui peuvent induire des adduits sur l'ADN (Condoluci *et al.* 2016). Dans un deuxième temps, la détoxification de ces intermédiaires génotoxiques se fait par conjugaison formant des composants solubles dans l'eau et excrétés par la cellule (Hukkanen *et al.* 2005). Ce système de détoxification enzymatique responsable de la détoxification cellulaire peut être altéré chez les fumeurs, accumulant ainsi les molécules génotoxiques. L'enzyme CYP2A6 métabolise de nombreux xénobiotiques, y compris la nicotine, qui forme aussi un composant principal du tabac. Au cours de la consommation du tabac, le CYP2A6 convertit la nicotine en méthylnitrosamine et en nornicotine à travers la voie de N-déméthylation, le métabolisme continue ensuite par glucuronidation et excrétion urinaire (Hukkanen *et al.* 2005; von Weymarn *et al.* 2012; Park *et al.* 2016). Le gène *CYP2A6* est hautement polymorphique, ce qui influence le métabolisme de la nicotine. Un polymorphisme génétique du *CYP2A6*, est souvent associé à un grand risque du cancer des poumons (Tantcheva-Poor *et al.* 1999; Zevin *et al.* 1999; Petsalo *et al.* 2008). Les métabolites de la nicotine peuvent accélérer la croissance de la tumeur pulmonaire en activant le récepteur β -AR (β -Adrenergic Receptor) qui va stimuler les voies de signalisation sous-jacentes, notamment l'activation de la voie de survie cellulaire AKT et l'inhibition de l'apoptose en inactivant les protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2-associated X) et Bad (bcl-associated death) (Schein 1995; Warren *et al.* 2013). Les nitrosamines dérivés de la nicotine causent des mutations au niveau du gène suppresseur de tumeur *TP53* et de l'oncogène *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma virus) (Schuller 2008).

1.2 La consommation d'alcool

La consommation de boissons alcoolisées a été classée comme cancérigène pour l'Homme par l'IARC depuis 1988. Plus récemment, en 2010, l'éthanol en tant que constituant majeur de boissons alcoolisées et son métabolite l'acétaldéhyde, capable de se lier à l'ADN, ont également été classés comme cancérigènes pour l'Homme (Seitz *et al.* 2007; Pflaum *et al.* 2016). Les boissons alcoolisées sous forme de mélanges à plusieurs composants peuvent en outre contenir des substances cancérigènes humaines connues ou suspectées comme des constituants ou des contaminants, comme par exemple l'acétaldéhyde, l'acrylamide, les aflatoxines (Lachenmeier *et al.* 2015; Pflaum *et al.* 2016).

Il existe une relation étroite entre la consommation d'alcool et le risque d'apparition d'un cancer: en effet plus l'alcool est consommé, plus le risque de cancer devient élevé (Parry *et al.* 2011; Shield *et al.* 2013). Même une consommation légère ou modérée d'alcool a été démontrée comme facteur de risque pour le développement d'un cancer (Bagnardi *et al.* 2013). Le risque devient élevé chez les personnes qui présentent une déficience de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase, ce qui conduit à l'accumulation de l'acétaldéhyde et provoque donc un risque accru de développer des tumeurs œsophagiennes malignes (IARC 2010).

Par ailleurs, l'éthanol peut également être métabolisé par le CYP450 2E1 en acétaldéhyde, procédé qui produit des espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) et qui peuvent conduire à la peroxydation lipidique et la production de radicaux libres mutagènes (Seitz *et al.* 2007). L'éthanol et l'acétaldéhyde peuvent également conduire à l'hypométhylation de l'ADN, ce qui modifie l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur (comme le *TP 53*) aboutissant à des mécanismes tels que des diminutions des taux de l'acide rétinolique, l'augmentation des niveaux d'œstrogène et l'induction de la maladie du reflux gastro-œsophagien conduisant à une hyperprolifération de la muqueuse œsophagienne (Seitz *et al.* 2007). Enfin, l'éthanol peut agir comme solvant pour divers cancérigènes ou pro-cancérigènes trouvés dans les boissons alcoolisées ou d'autres produits co-ingérés tel que le tabac, ce qui facilite l'entrée de ces composés dans les cellules, en particulier dans la muqueuse des voies aérodigestives supérieures (Lachenmeier 2008).

1.3 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est caractérisé par la production dérégulée d'espèces réactives de l'oxygène, ROS ou de radicaux libres d'oxygène et de l'azote RNS (Reactive Nitrogen Species) (Schroder *et al.* 2009). Les ROS peuvent avoir des origines endogènes et exogènes. Les ROS sont principalement générés dans les mitochondries lors de la différenciation des MSC (Mesenchymal Stromal /Stem Cells) (Boonstra *et al.* 2004; Indo *et al.* 2015). Il existe également d'autres sources endogènes comme le métabolisme du CYP450, les peroxyosomes et l'activation des cellules inflammatoires (Inoue *et al.* 2003). Les sources exogènes ont notamment des agents environnementaux, tels que les cancérigènes non génotoxiques, divers xénobiotiques, l'échographie, certaines radiations et le rayonnement micro-ondes (Valko *et al.* 2006).

Un taux élevé de ROS produit par un stress oxydatif provoque des dommages aux composants cellulaires tels que les métabolites, les organites et l'ADN, qui pourraient causer

des maladies liées au stress oxydatif y compris le cancer (Boonstra *et al.* 2004; Valko *et al.* 2004; Indo *et al.* 2015). En effet, un faible niveau basal est nécessaire pour maintenir la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Kobayashi *et al.* 2012; Atashi *et al.* 2015).

Des antioxydants non-enzymatiques et enzymatiques sont chargés d'équilibrer les effets nocifs des ROS (Bose *et al.* 2012). Une perturbation de l'équilibre oxydants/antioxydants dans le corps joue un rôle causal dans la cancérogenèse. Un taux élevé des ROS et/ou RNS en même temps qu'une diminution des antioxydants sont retrouvés dans divers cancers y compris le cancer de la tête et du cou (Bose *et al.* 2012).

1.3.1. Le mécanisme d'action des ROS dans le cancer

Les ROS sont impliqués dans les trois étapes de la cancérogenèse: l'initiation, la promotion et la progression. L'effet du stress oxydatif dans les différentes étapes de la cancérogenèse est directement proportionnel au type et à la réactivité des radicaux impliqués. L'initiation du cancer par les ROS se manifeste par la présence de modifications oxydatives d'ADN dans les tissus cancéreux (Shinohara *et al.* 2010). Pendant l'étape de la promotion, les ROS stimulent l'expansion des clones cellulaires mutés en modulant les gènes impliqués dans la prolifération ou la mort cellulaire. Ceci se fait en régulant l'activité de certains facteurs de transcription tels que NFkB, Nrf2, HIF, et Tp53 qui contrôlent la croissance cellulaire et l'oncogenèse ainsi qu'en induisant des gènes codant pour des protéines qui inhibent l'apoptose (Trueba *et al.* 2004; Trachootham *et al.* 2008). Le stress oxydatif peut activer les voies de signalisation ERK / MEK et PI3K / AKT ; ce qui pourrait entraîner une inactivation des protéines pro-apoptotiques et une régulation positive des gènes anti-apoptotiques (McCubrey *et al.* 2007). De plus, il a été démontré que le radical hydroxyle est capable d'activer certains oncogènes, tels que K-ras et C- Raf- 1 (Jackson 1994). Les ROS contribuent également à la dernière étape de la cancérogenèse, la progression. A ce stade, la génération de grandes quantités de ROS peuvent contribuer à muter ou inhiber des anti-protéases et surexprimer des métalloprotéinases matricielles (MMP) (Mori *et al.* 2004; Shinohara *et al.* 2010). Des niveaux élevés de modifications oxydatives des bases d'ADN peuvent contribuer à une instabilité génétique et à un potentiel métastatique des cellules tumorales (Schmielau *et al.* 2001). Les ROS sont signalés comme étant cruciaux pour le déclenchement de l'angiogenèse qui est un événement crucial dans le processus métastatique du cancer (Maulik 2002). Finalement, les ROS endommagent les composants cellulaires et contribuent ainsi à la transformation néoplasique (Khandrika *et al.* 2009; Wells *et al.* 2009).

1.3.2. Le mécanisme d'action des RNS dans le cancer

La plus importante des molécules de signalisation biologique oxydative est le radical réactif d'oxyde nitric (NO). A des concentrations élevées et sur des périodes prolongées, il devient génotoxique et mutagène. La réaction du NO avec l'oxygène ou avec d'autres radicaux libres génère des RNS qui provoquent de multiples effets biologiques (Patel *et al.* 1999). Le NO peut endommager l'ADN par la formation de nitrosamines cancérigènes par la génération de RNS et par l'inhibition des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (Choudhari *et al.* 2013). Il peut ainsi être considéré comme un agent initiateur du cancer. Il peut aussi avoir un impact sur d'autres étapes de la cancérogenèse en inhibant l'apoptose, en favorisant l'angiogenèse, en modulant les mécanismes de défense de l'hôte et en interagissant avec les MMP (Choudhari *et al.* 2013). Le NO est également impliqué dans la carcinogenèse orale (Patel *et al.* 2008). Les RNS ont été trouvés à des doses élevées dans le sang et les tissus de patients atteints du cancer de la bouche ainsi que dans le sérum de patients ayant un pré-cancer oral et chez les personnes tabagiques sains (Patel *et al.* 2009; Korde *et al.* 2011). Par conséquent, le NO peut servir comme un marqueur pour estimer le risque de cancer de la bouche.

1.4 Le régime alimentaire

Un apport alimentaire déséquilibré, riche en calories et graisses animales et pauvre en fibres, en d'autres termes riche en viande rouge et pauvre en fruits et légumes, est un facteur qui favorise l'apparition de certains cancers comme le cancer du côlon, de la prostate, de l'endomètre et du sein (Weisburger 2002). A l'inverse, un apport riche en fruits et légumes semble avoir un effet protecteur anti-cancéreux (Weisburger 2002).

En effet, un apport élevé en graisse animale est riche en acides gras polyinsaturés qui peuvent générer des radicaux libres mutagènes en augmentant le stress oxydatif (Bartsch *et al.* 2004), alors que les régimes alimentaires riches en fruits et légumes contiennent des antioxydants naturels qui jouent un rôle protecteur anti-cancéreux (IARC *et al.* 2003; Borek 2004). Les grillades sont connues comme étant une source de HAP formés à partir de la combustion incomplète de la matière organique. Les HAP sont bien connus pour avoir des effets sur la famille des enzymes du CYP450, y compris le CYP1A, et pour avoir un effet mutagène capable de jouer un rôle dans l'initiation de la cancérogenèse (Elshehbiny *et al.* 2011). Il est conseillé de (i) limiter ou éviter les produits laitiers pour limiter les graisses saturées et le cholestérol qui s'y trouvent afin de réduire le risque de cancer de la prostate; (ii)

d'éviter les viandes cuites en friture et grillées, surtout la viande rouge afin de réduire le risque de cancers du côlon, du rectum, du sein, de la prostate, du rein et du pancréas (Gonzales *et al.* 2014).

De plus, des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien. Ces substances ont été référencées comme perturbateurs endocriniens (PE) (Schug *et al.* 2016). De nombreux PE sont présents dans nos cuisines tels que les contenants, la vaisselle et les aliments eux-mêmes. Les emballages alimentaires, notamment en matière plastique forment une source de PE surtout les phtalates qui peuvent migrer dans les aliments lors d'un passage au micro-onde et sont classés comme une substance cancérigène (Giulivo *et al.* 2016). Le PE le plus répandu dans le plastique, est le bisphénol A (BPA), un composé connu pour sa grande résistance et sa durabilité. Il est présent dans certaines bouilloires, canettes, canalisations d'eau potable, boîtes de conserve et vaisselle en plastique. Des études scientifiques suspectent de plus en plus l'existence de liens entre le BPA et le cancer du sein de par son activité œstrogénique (Giulivo *et al.* 2016). De plus, certains aliments contiennent eux-mêmes des PE, par exemple, les aliments qui contiennent le polychlorobiphényles (PCB) un polluant organique industriel fabriqué dans les années 1970 et utilisé comme isolant électrique. Le PCB est un polluant persistant qui se dégrade très peu dans l'environnement et qui est classé comme un cancérigène probable par l'IARC. Le PCB est retrouvé dans les produits de la pêche notamment les poissons gras comme le saumon puisque le PCB se loge surtout dans les graisses. Le PCB présent dans le sol est absorbé par les plantes et contamine aussi les herbivores (vache, chèvre, volaille...), il se trouve par conséquent dans la viande, le lait et les œufs (Grimm *et al.* 2015). Malgré le fait que les PCB soient interdits dans l'industrie depuis 1987, leur très grande stabilité explique leur présence encore massive, présentant un facteur de risque des cancers du sein qui sont majoritairement des cancers hormono-dépendants, des stérilités, des anomalies de croissance et des dérèglements de la fonction immunitaire (Cohn *et al.* 2012; Sweeney *et al.* 2015).

1.5 **Obésité et sédentarité**

L'obésité et la sédentarité sont également connus pour être des facteurs de risque pour le cancer. Ainsi, l'obésité est associée à une incidence accrue de plusieurs types de cancer (Rodriguez *et al.* 2001; Petrelli *et al.* 2002) à l'exception du lymphome (Willett *et al.* 2005) et des cancers infantiles (Uauy *et al.* 2005). Néanmoins, il n'a jamais été démontré que le poids

et l'obésité pouvaient être initiateurs du cancer. Ils peuvent cependant, contribuer indirectement à une cancérogenèse à travers une accumulation progressive de produits chimiques carcinogènes dans le tissu adipeux. Il a été clairement démontré que des xénomolécules organiques lipophiles, qui sont en majorité des molécules mutagènes, sont capables de modifier l'expression de certains gènes et de favoriser le cancer (Irigaray *et al.* 2006). Notamment, le benzo[a]pyrène (B[a]P), les dioxines et les PCB peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux qui deviendront alors un réservoir pour les xénomolécules lipophiles. Celles-ci pourront alors être libérées dans le plasma et ainsi capables d'induire leurs effets nocifs de façon continue (Hutcheon *et al.* 1983; Irigaray *et al.* 2005).

La sédentarité affecte l'équilibre énergétique en augmentant les possibilités de surpoids et d'obésité qui pourraient, elles-mêmes, augmenter le taux de facteurs inflammatoires connus comme des indicateurs de risque du cancer tels que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF α), l'interleukine-6 (IL6) et la leptine (van Kruijsdijk *et al.* 2009). De plus, une hypothèse suggère qu'une longue période passée en position assise pourrait augmenter le risque du cancer de la prostate en influençant les hormones sexuelles qui pourraient affecter la fonction immunitaire (Lynch *et al.* 2011). Enfin, une méta-analyse faite par Dong Shen *et al.* suggère qu'un comportement sédentaire prolongé est associé à une incidence accrue de risque de cancer de l'endomètre, du côlon, du sein et des poumons (Shen *et al.* 2014).

1.6 Les pesticides

Les pesticides comprennent principalement les insecticides, les herbicides et les fongicides.

Il a été montré que les insecticides organophosphorés, comme le chlorpyrifos, qui ciblent l'acétylcholinestérase chez les insectes, ont aussi des effets sur le système nerveux de l'Homme (Thany *et al.* 2013). Outre le système nerveux, certains pesticides ont été associés au développement de certains cancers en induisant, comme les PE, un stress oxydatif et en possédant un effet génotoxique (Thany *et al.* 2013).

L'insecticide « Chlorpyrifos » et le fongicide « Captane » sont capables d'augmenter de manière significative le risque de cancer du sein post-ménopausé chez les femmes dont les maris utilisent ces pesticides, avec un risque plus élevé lorsque leur résidence était proche de la zone d'utilisation des pesticides (Ventura *et al.* 2016).

Par ailleurs, en plus de leur capacité à inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase dans le système nerveux central et périphérique, les chlorpyrifos possèdent une activité androgénique, capable de moduler la prolifération des cellules mammaires et ceci en augmentant l'expression des récepteurs à la progestérone et en induisant la phosphorylation d'ERK 1/2 (Ventura *et al.* 2016).

Une étude récente faite par João F.S. Silva *et al.* indique une association positive entre le développement du cancer de la prostate et l'exposition aux pesticides et/ou les professions agricoles (Silva *et al.* 2016).

L'atrazine est présent dans les herbicides de type triazine et est associé à un risque accru de cancer de l'ovaire chez les femmes exposées (Del Pup *et al.* 2016). L'action herbicide de l'atrazine sur les follicules ovariens se manifeste par une sécrétion d'œstrogènes longue et soutenue qui empêche les follicules d'ovuler en raison du déséquilibre de la balance hormonale (Del Pup *et al.* 2016). Son mécanisme cancérigène le plus probable est son interaction avec les récepteurs de ces hormones, induisant des effets agonistes partiels pour les œstrogènes et antagonistes pour les androgènes (Thany *et al.* 2013). De plus, l'atrazine est capable d'induire des tumeurs mammaires. En effet, une alimentation supplémentée en atrazine conduit à un début précoce et/ou une augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires par rapport aux témoins (Wetzel *et al.* 1994). Ces composés peuvent agir comme les PE en modifiant la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et la prolactine au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, en augmentant la production d'œstradiol et de progestérone et, par conséquent, avoir un effet indirect sur la promotion ou la progression d'une tumeur épithéliale ovarienne ou mammaire (Del Pup *et al.* 2016). Finalement, il a été démontré que l'herbicide glyphosate, même à faibles concentrations, possède une activité œstrogénique et est capable de modifier l'expression des deux récepteurs œstrogéniques, ER α et ER β (Thongprakaisang *et al.* 2013).

1.7 La pollution de l'air

La pollution de l'air représente un important facteur de risque environnemental dans les sociétés urbanisées (Munzel *et al.* 2016). Elle constitue un facteur primaire de stress environnemental par rapport à la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (Stansfeld 2015). L'air urbain contient un mélange complexe de gaz oxydants et de particules de différentes tailles et compositions. Un ensemble considérable de preuves suggère que l'exposition aux constituants de la pollution de l'air peut endommager les biomolécules des humains et des

animaux, ce qui peut provoquer diverses maladies telles que les maladies cardiovasculaires traditionnelles, un dysfonctionnement vasculaire, un déséquilibre du système nerveux, une légère inflammation et un stress oxydatif qui pourrait aboutir à un cancer (Munzel *et al.* 2016).

Les sources d'émission des particules polluantes de l'air peuvent inclure des processus naturels tels que les incendies de forêts, les éruptions volcaniques et l'érosion éolienne des sols par le vent. Par ailleurs, les particules polluantes formées artificiellement englobent les processus de combustion utilisés pour le chauffage, la production d'énergie, l'industrie et la circulation des véhicules. Ces particules représentent un grand problème environnemental et sanitaire, en particulier les émissions de particules diesel qui ont été classées récemment comme cancérogènes pour l'Homme par l'IARC.

Aujourd'hui, les préoccupations sanitaires portent sur les particules fines, notamment d'origine automobile, pour leur capacité à pénétrer profondément dans les poumons et provoquer des effets nocifs. A court terme, l'impact de ces particules sur la santé se manifeste par une augmentation d'hospitalisation pour maladies respiratoires, des crises d'asthme, et une augmentation de la mortalité liée aux pathologies cardio-respiratoires (Knaapen *et al.* 2004). Une exposition chronique à ces particules montre une réduction de l'espérance de vie, une augmentation du risque de développer des maladies chroniques cardiovasculaires et respiratoires et un risque de développer des cancers (Kasai 1997; Collins 2004).

Des données obtenues à partir des expériences faites sur des animaux indiquent que des expositions aux particules diesel sont associées à la production de ROS et à des dommages oxydatifs de l'ADN tels que des niveaux élevés des bases guanines oxydées dans divers tissus comme l'épithélium du côlon, le foie et les poumons (Moller *et al.* 2008). Lors d'une exposition chronique, il semble y avoir une modification de l'effet du système de réparation de l'ADN, résultant en un taux élevé de réactions d'oxydation dans les tissus; d'où les propriétés mutagènes et carcinogènes des particules diesel respirables. Un lien a été établi entre les produits d'excrétion urinaire de guanines oxydées et un risque plus élevé de cancer du poumon (Moller *et al.* 2008).

2. Les différents mécanismes d'action cancérigènes des polluants environnementaux

Le cancer est l'une des principales maladies causées par des facteurs environnementaux. La cancérogenèse est un processus multi-factoriels et multi-étapes. Dans l'environnement, l'Homme est exposé aux substances cancérigènes de plusieurs façons soit par voie orale, soit par inhalation ou soit par voie cutanée. Ces substances jouent un rôle au niveau des trois étapes de la cancérogenèse: l'initiation, la promotion et la progression.

Les mécanismes d'action des cancérigènes environnementaux peuvent être divisés en trois catégories: épigénétique, génotoxique (GTX), et non-génotoxique (NGTX). Les altérations épigénétiques, sont des changements héréditaires, sans incidence sur la séquence d'ADN, pouvant conduire à des défauts au niveau de la croissance et de la différenciation cellulaire (Berger *et al.* 2009). Les événements GTX peuvent endommager l'ADN par interactions directes (Enoch *et al.* 2010) tandis que les cancérigènes NGTX sont capables de provoquer une transformation cellulaire causant de multiples altérations au niveau des voies de transduction du signal cellulaire (Oliveira *et al.* 2007).

2.1 Les modifications épigénétiques

L'accumulation des mutations génétiques est considérée comme la principale cause de la formation des tumeurs (Hanahan *et al.* 2011). Cependant, ce paradigme a été élargi et la recherche a révélé que l'épigénétique participe également à la cancérogenèse (Feinberg *et al.* 2004; Baylin *et al.* 2011).

Le terme «épigénétique» se réfère à tous les changements héréditaires dans un phénotype cellulaire qui sont indépendants des modifications dans la séquence de l'ADN (Berger *et al.* 2009). Donc, les altérations épigénétiques représentent des mécanismes de cancérogenèse non-génotoxiques qui peuvent se produire de manière indépendante ou concomitante avec des aberrations génotoxiques. Les altérations épigénétiques sont classées en trois types majeurs: la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'expression des microRNA (miRNA). Par ailleurs, les modifications épigénétiques peuvent influencer directement le potentiel génotoxique d'un produit chimique. Par exemple, des études ont montré l'existence d'une liaison préférentielle des produits chimiques aux régions d'ADN qui présentent des modifications épigénétiques (Hu *et al.* 2003; O'Hagan *et al.* 2011) (**Figure 5**).

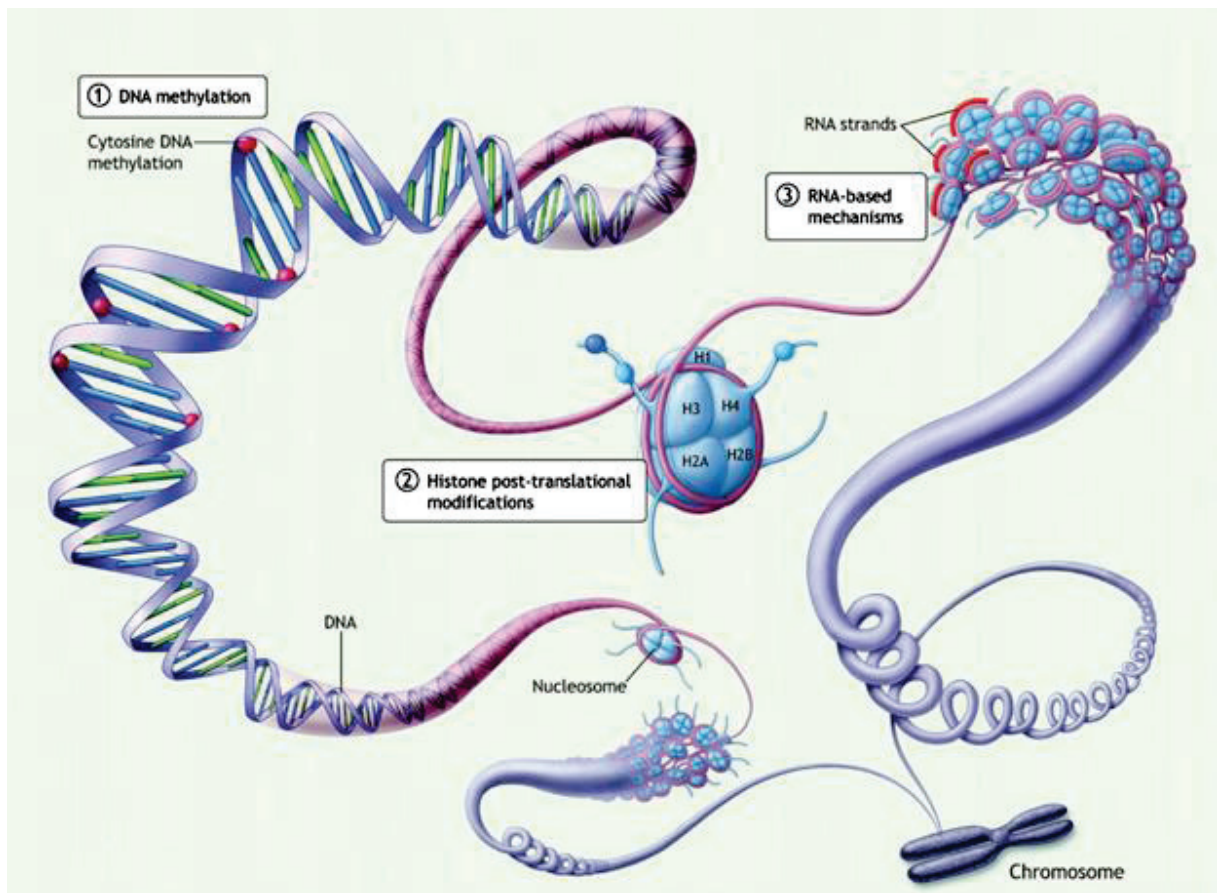


Figure 5 : Les mécanismes épigénétiques (Lee *et al.* 2014)

2.1.1. La méthylation de l'ADN et la cancérogenèse

Les études les plus importantes faites en recherche sur l'épigénétique liée au cancer concerne la méthylation de l'ADN. Plusieurs modifications de la méthylation de l'ADN ont été observées dans les cellules cancéreuses, y compris la perte de la méthylation de l'ADN (hypométhylation) et l'augmentation de la méthylation de l'ADN (hyperméthylation) (Herceg *et al.* 2013; Pogribny *et al.* 2013). La méthylation de l'ADN est une addition d'un groupement méthyl sur l'extrémité 5' du dinucléotide cytosine-phosphate-guanine (CpG); par les ADN méthyltransférases DNMT3 (DNMT3A et DNMT3B); elle est maintenue pendant la réplication de l'ADN par l'ADN méthyltransférase DNMT1 (Chappell *et al.* 2016). Une hypométhylation des îlots CpG des gènes peut aussi se produire. Elle est généralement associée à l'activation de certains gènes oncogéniques et ainsi favoriser la cancérogenèse. En effet, une corrélation entre l'augmentation de l'expression des gènes et la fréquence des régions hypométhylés a été mise en évidence (Garzon *et al.* 2009; Hovestadt *et al.* 2014).

Des altérations de méthylation au niveau des promoteurs des îlots CpG est retrouvée dans divers cancers (Feinberg *et al.* 2004; Dawson *et al.* 2012; Sandoval *et al.* 2012). La méthylation de ces îlots dans les promoteurs de gènes joue un rôle important dans la régulation de la transcription de ces derniers. En effet, des études ont montré que l'hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs aboutit généralement à l'inhibition de l'expression des gènes fonctionnels, tels que *RB*, *BRCA1 / 2*, *PTEN*, *MGMT*, *CDKN2B*, *P16*, *RASSF1A*, *MLH1*, *GSTP1*, *APC*, et *E-cadhérine* (Feinberg *et al.* 2004; Baylin *et al.* 2011; Sincic *et al.* 2011). Ces gènes sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, des voies de signalisation, de la stabilité génomique et de l'adhésion cellulaire. L'altération de l'expression de ces gènes favorise le développement et la progression du cancer. Le séquençage des tumeurs de cerveau (medulloblastome) indique un niveau faible d'îlots CpG non-méthylés comparé aux tissus normaux (Hovestadt *et al.* 2014). En plus de la méthylation des promoteurs de gènes, une méthylation à l'intérieur de la séquence du gène peut également affecter l'expression de ce gène et a été démontrée comme impliquée dans la cancérogenèse (Kulis *et al.* 2012).

Les relations entre la méthylation de l'ADN et les molécules environnementales PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) ont été fréquemment étudiées *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, une exposition aux PAH induit une hyperméthylation des sites CpG du gène suppresseur de tumeur *p16(INK4a)* (Yang *et al.* 2012). Une étude a démontré qu'une exposition des

embryons pendant la grossesse aux PAH ainsi qu'une exposition de lignées cancéreuses de poumon à un traitement au B[a]P, qui appartient à la famille PAH, augmente l'hyperméthylation du promoteur du gène de l'*IFN γ* (Interféron gamma) qui est impliqué dans l'activation des macrophages; et ensuite réduit son expression respectivement *in vivo* et *in vitro* (Tang *et al.* 2012). *In vitro* des cellules épithéliales bronchiques humaines traitées avec du B[a]P ont montré des altérations de méthylation de l'ADN, y compris des hypométhylation et hyperméthylation résultant en des altérations au niveau de l'expression des gènes (Damiani *et al.* 2008; Liu *et al.* 2010; Huang *et al.* 2014). De plus, des cellules cancéreuses mammaires, exposées au B[a]P *in vitro*, montrent également des perturbations au niveau de la méthylation de l'ADN (Sadikovic *et al.* 2007).

Les modifications de la méthylation de l'ADN peuvent être utilisées en tant que biomarqueur d'exposition aux facteurs environnementaux. Les cancérigènes environnementaux peuvent induire une "signature épigénétique" caractéristique dans le génome (Herceg *et al.* 2011). Par exemple, des modifications de la méthylation de l'ADN peuvent être observées dans des cellules cultivées après traitement aux agents cancérigènes à faible dose tels que les PAH (Herceg *et al.* 2011). La méthylation de l'ADN est considérée comme un biomarqueur d'une exposition au fumée de tabac à long terme (Belinsky *et al.* 2007; Shenker *et al.* 2013). A ce jour, le mécanisme par lequel les cancérigènes environnementaux induisent une hyper ou hypométhylation spécifique d'un gène reste largement inconnu.

2.1.2. La modification des histones et la cancérogenèse

Au niveau génomique, une dérégulation de la chromatine est associée à l'apparition et à la progression d'un cancer. Les octamères d'histones forment avec l'ADN les nucléosomes, qui forment l'unité de base de la chromatine. Les modifications post-traductionnelles (MPT) des histones impliquent la méthylation de l'arginine, l'acétylation, l'ubiquitination, et la sumoylation des résidus d'acides aminés spécifiques au niveau des «tails» des histones. Ces modifications sont contrôlées par des enzymes spécifiques telles que les histones acétyltransférase (HAT), les histones méthyltransférase (HMTS) et les kinases histones qui sont respectivement responsables d'ajouter les groupes acétyle, méthyle et phosphoryle sur les histones (Weber *et al.* 2014). Les histones désacétylases (HDAC), les histones déméthylases (HDMS) et les histones phosphatases retirent respectivement les groupe acétyle, méthyle et phosphoryle (Torres *et al.* 2015). Ces MPT peuvent également inhiber ou faciliter la liaison de

divers protéines-non-histones à la chromatine (**Figure 6**) (Kouzarides 2007; Ahuja *et al.* 2016).

Les MPT des histones semblent jouer un rôle dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose. L'acétylation des histones par l'HAT affaiblit l'interaction entre les histones et l'ADN, rendant la chromatine accessible aux enzymes, et provoquant l'activation de la transcription des gènes concernés (Witt *et al.* 2009). Au contraire, la méthylation des histones par l'HMTS peut conduire à l'activation ou à la répression de la transcription en fonction du nombre de groupes méthyles ajoutés et de la position du résidu de lysine modifié (Witt *et al.* 2009). Les HDAC, en éliminant les groupes acétyles des histones inhibent l'expression des gènes concernés (Witt *et al.* 2009). Dans le contexte du cancer, des mutations ont été trouvées surtout dans les gènes codant pour les HMTS, les HDMS et les HAT (Garraway *et al.* 2013). Les HDAC semblent être surexprimées dans le cancer de la prostate (Burdelski *et al.* 2015) et le cancer du sein (Shan *et al.* 2017). Des traitements anti-HDAC, en cours de développement, visent à contrer l'inhibition de certains gènes suppresseurs de tumeur, qui permettront de favoriser l'apoptose et l'arrêt de la croissance cellulaire. *In vitro*, le traitement des cellules du médulloblastome et des cellules leucémiques par un inhibiteur HDAC induit respectivement la mort cellulaire (Yuan *et al.* 2017) et l'apoptose (Yuan *et al.* 2017).

Les MPT jouent un rôle important dans la toxicité des cancérogènes en influençant l'activité transcriptionnelle (Venkatesh *et al.* 2015) et les mécanismes de réparation de l'ADN (O'Hagan 2014; Waters *et al.* 2015).

2.1.3. L'expression des microRNA et la cancérogenèse

Les miRNA sont des courtes séquences d'ARN non-traduites qui régulent l'expression des gènes en se liant à différentes régions de l'ARNm en induisant sa dégradation ou en bloquant sa traduction (Garzon *et al.* 2006). Certains miRNA peuvent affecter directement l'expression d'un gène au niveau transcriptionnel. En effet, ils peuvent se lier aux régions promotrices et ainsi moduler directement leur transcription. De plus certains miRNA ont également la capacité de réguler l'expression des gènes par l'induction de l'activité de l'ARN polymérase. Enfin des miRNA sont capables de recruter d'autres modificateurs de la chromatine entraînant ainsi l'inhibition transcriptionnelle des gènes (Iorio *et al.* 2010; Fabbri *et al.* 2013; Malumbres 2013). Cependant, les miRNA ne font pas seulement partie des mécanismes épigénétiques, mais peuvent également être modifiés épigénétiquement par la méthylation de l'ADN et la modification des histones comme tout autre gène codant pour une

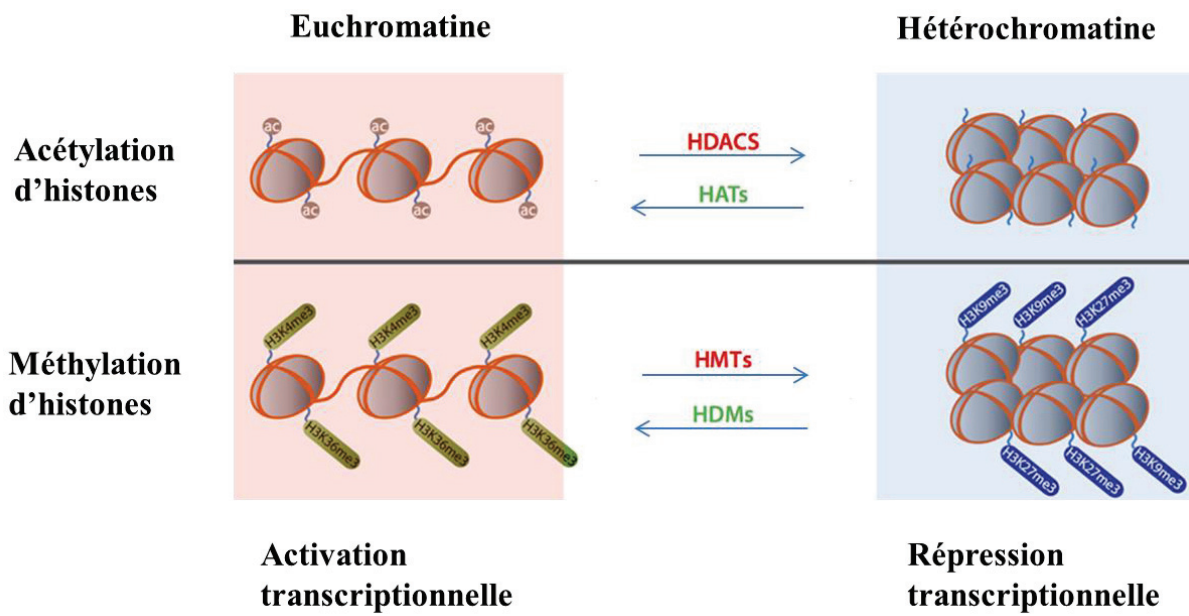


Figure 6 : Les modifications des histones et la transcription des gènes (Duygu *et al.* 2013)

protéine (Piletic *et al.* 2016). L'hyper et l'hypométhylation des promoteurs des miRNA est liée à de nombreux états pathologiques tels que les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, auto-immunes et le cancer (Piletic *et al.* 2016). Une hyperméthylation des promoteurs des îlots CpG peut déréguler l'expression des miRNA suppresseurs de tumeurs et contribuer à la cancérogenèse (Lopez-Serra *et al.* 2012; Baer *et al.* 2013). Par ailleurs, l'expression des miRNA est également régulée par la modification des histones, telles que la méthylation des histones et la surexpression des HDAC, qui peuvent activer ou réprimer l'expression des miRNA (Malumbres 2013). Par conséquent, il existe un lien fort entre l'épigénome et le miRNome; et toute dérégulation de ce système peut aboutir à différentes conditions pathologiques, surtout le cancer (Iorio *et al.* 2010).

Les miRNA sont impliqués dans de nombreux cancers humains tels que le lymphome (Kluiver *et al.* 2005), le cancer de poumon (Osada *et al.* 2011) et le cancer du pancréas (Ryu *et al.* 2010). Une exposition aux carcinogènes environnementaux tels que le B[a]P, les composés N-Nitroso et l'aflatoxine induit des changements au niveau de l'expression des miRNA (Pogribny *et al.* 2016). Par ailleurs, certains miRNA sont connus pour jouer un rôle dans l'inhibition de l'apoptose, la prolifération cellulaire et le mouvement cellulaire suggérant leur possible inhibition dans des thérapies anticancéreuses (Kala *et al.* 2013).

2.2 Les mécanismes génotoxiques (GTX)

2.2.1. Les types et le mode d'action des molécules environnementales génotoxiques

Le terme "génotoxique" se réfère à un agent qui induit des dommages à l'ADN ou à une mutation ou bien les deux (Sciences 1973).

Il existe deux types de génotoxicité: la génotoxicité primaire et la génotoxicité secondaire (Donaldson *et al.* 2010).

Génotoxicité primaire: c'est lorsque l'événement génotoxique se passe dans la cellule cible soit directement soit indirectement. La génotoxicité primaire directe peut être soit induite par la liaison de la molécule à l'ADN soit par la génération directe des ROS par la molécule induisant des lésions de l'ADN. En revanche, la génotoxicité primaire indirecte impacte de manière indirecte l'ADN *via* les interactions entre la molécule génotoxique et les protéines impliquées dans la

progression du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la réplication et la ségrégation des chromosomes.

Génotoxicité secondaire: c'est lorsque la génotoxicité est une conséquence d'un événement « off-target ». Par exemple, l'exposition à certaines molécules peut conduire à une réponse inflammatoire; ainsi l'activation des cellules phagocytaires conduit à la production des ROS qui peuvent induire des effets génotoxiques dans les cellules voisines.

2.2.1.1 Les dommages à l'ADN

Pendant des décennies, les dommages à l'ADN ont été considérés comme le pire événement susceptible d'induire le processus multi-étapes de la cancérogenèse. Les dommages à l'ADN, contrairement à la mutation, ne modifient pas la séquence linéaire des nucléotides ou des bases de l'ADN.

Les différentes formes de dommages à l'ADN causées par divers facteurs environnementaux, comme les radiations et les produits chimiques exogènes ou endogènes (exemple, la production du formaldéhyde et d'acétaldéhyde dans le corps) comprennent (Smith *et al.* 2016):

des adduits à l'ADN : une molécule qui se lie de manière covalente à l'ADN

des ruptures de l'ADN : rupture au niveau des liaisons phosphodiester

des cassures simple brin

des cassures double brin

des sites apuriques/apyrimidiniques (sites AP): où la base purine ou pyrimidine est manquante

des adduits volumineux : de gros groupes chimiques liés de manière covalente à des bases de l'ADN

des liaisons transversales intra-brin : comme la dimérisation des pyrimidines adjacentes

des liaisons transversales inter-brin : liaisons covalentes entre les deux brins de la double-hélice

des liaisons covalentes entre l'ADN et les protéines

Les mutagènes environnementaux affectent le génome en formant les dommages à l'ADN par diverses réactions chimiques (Liu *et al.* 2016):

L'alkylation: des agents d'alkylation conduisent à la formation de l'adduit «N2-alkylG» (N2-alkyl guanine)

L'oxydation: des agents oxydants peuvent produire la lésion «8-oxoG» (8-oxo-7,8-dihydroguanine) résultante de l'oxydation de l'atome C8 de G pour former un groupe hydroxyle. Cette lésion est considérée comme un biomarqueur du dommage oxydatif sur l'ADN et des niveaux élevés de 8-oxoG ont été trouvés dans les urines des personnes ayant divers cancers malins (cancer de la tête et du cou, du sein, du côlon, du poumon, de l'utérus, de l'ovaire, du testicule, de la prostate, et le cancer gastro-intestinal) comparées aux personnes saines (Roszkowski *et al.* 2011).

L'amination: des agents mutagènes conduisent à l'amination de l'atome C8 de la guanine et forment des adduits tels que les modèles 2-aminofluorène (AF-dG) et Nacetyl-2-aminofluorène (AAF-dG).

La coordination: des molécules qui peuvent former des «crosslinks» en coordonnant des liaisons ADN-ADN intra-brin et inter-brin.

La photo-addition: un rayonnement UV entraîne la formation des photoproduits tels que les dimères CPD (cyclobutane pyrimidine dimer) par la cycloaddition des doubles liaisons C5-C6 des bases de pyrimidine adjacentes.

L'hydrolyse: une enzyme ou des agents chimiques ou une réaction spontanée sont capables d'induire l'hydrolyse de la liaison N-glycosyle qui forme des sites AP qui entraîne par conséquent la perte de l'information génétique.

Ces différentes réactions qui endommagent l'ADN conduisent à des mutations pendant la réplication de l'ADN suite à une modification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs favorisant ainsi l'apparition des cancers (Liu *et al.* 2016).

2.2.1.2 Les mutations au niveau de l'ADN

Une mutation est un changement dans la séquence de l'ADN. Les mutations peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur emplacement ou de leur implication dans le génome (Smith *et al.* 2016).

Les mutations ponctuelles sont des changements dans la séquence nucléotidique au sein d'un même gène. Par exemple, des substitutions de bases, et de petites délétions/duplications.

Les mutations chromosomiques sont des changements dans la séquence nucléotidique qui peuvent toucher plusieurs gènes. Par exemple, des aberrations chromosomiques, des translocations, des délétions importantes, des duplications, des insertions, des inversions ou la formation des micronoyaux en raison des cassures chromosomiques.

Les mutations génomiques impliquent la duplication ou la suppression de séquences de nucléotides d'un chromosome entier dont un exemple est l'aneuploïdie ou la formation de micronoyaux qui contiennent un centromère.

2.2.2. Les mécanismes GTX et la cancérogenèse

Les cellules cancéreuses acquièrent leurs caractéristiques à différents moments au cours du développement tumoral. Il est de plus en plus reconnu que les variations phénotypiques sous-jacentes d'un cancer résultent d'une interaction chronique entre de nombreux facteurs environnementaux et facteurs génétiques (Thomas 2010). Des variations au niveau des séquences de gènes spécifiques (polymorphismes) peut prédisposer un individu à développer plusieurs maladies notamment le cancer (Ravegnini *et al.* 2015). La génotoxicité, qui présente une caractéristique-clé de la cancérogenèse, favorise les modifications au niveau des chromosomes qui peuvent être de nature structurelle (y compris des translocations, délétions, insertions, inversions, micro-noyaux, et changements dans la longueur des télomères) ou numérique c'est-à-dire en nombres de copies chromosomiques comme dans le cas de l'aneuploïdie et polyploïdie (IAEA 2011). Ces deux aberrations sont souvent observées dans les cancers. Le développement des cancers peut être médié génétiquement par l'altération des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur qui régulent des processus telles que la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, la différenciation cellulaire et la stabilité génomique. La plupart des oncogènes résultent des proto-oncogènes qui sont des gènes fonctionnels normaux. Quand un proto-oncogène subit une mutation au niveau de sa séquence d'ADN entraînant une augmentation de son expression, il devient alors oncogénique (Anderson *et al.* 1992). Ce processus est appelé activation d'un oncogène. Des exemples de proto-oncogènes comprennent le gène *RAS* régulant la signalisation de la prolifération cellulaire, et le gène *MYC*, un gène codant pour un facteur de transcription (Jang *et al.* 2006).

D'autre part, les gènes suppresseurs de tumeur sont des gènes normaux qui inhibent la croissance cellulaire, arrêtent la division cellulaire et induisent la réparation de l'ADN ou l'apoptose lorsque l'ADN d'une cellule est endommagée. Lorsque des mutations existent dans les gènes suppresseurs de tumeur, les cellules échappent au système de contrôle, ce qui peut conduire à un cancer (Robinson 1993). Les gènes suppresseurs de tumeur comprennent, par exemple, les gènes de réparation de l'ADN, les gènes *BRCA1* et *BRCA2* et le gène *TP53* qui est muté dans la plupart des cancers humains (Hollstein *et al.* 1991). De plus, une activation d'oncogènes associée à une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur favorise la cancérogenèse (Munoz *et al.* 2013). Les cancérigènes environnementaux considérés comme GTX agissent comme des électrophiles suite à leur métabolisation et peuvent se lier de manière covalente à l'ADN initiant ainsi des dommages à l'ADN et des anomalies chromosomiques (Neumann 1986; Williams 2001). Les substances cancérigènes GTX peuvent être considérées comme des initiateurs de tumeurs. Par exemple, le B[a]P est capable de former des adduits B[a]P-ADN ou encore de causer des dommages à l'ADN *via* les ROS ou *via* les métabolites produits pendant le métabolisme du B[a]P (Hassan *et al.* 2011).

En conclusion, la génotoxicité des molécules environnementales a été démontrée pour induire une instabilité génomique à travers les mutations et les dommages à l'ADN qui modifient le rapport oncogène/gènes suppresseur de tumeur et favoriser la cancérogenèse.

2.2.3. Classification des molécules génotoxiques induisant un cancer

Une grande variété de molécules génotoxiques environnementales ont été démontrées capables d'induire des cancers chez les animaux de laboratoire après des expositions prolongées (Belpomme *et al.* 2007). Ces molécules peuvent agir soit comme initiateur capables de provoquer des changements dans l'ADN et initier la cancérogenèse; soit comme promoteur capable d'augmenter l'expansion clonale des cellules initiées; soit comme un carcinogène complet capable d'induire un cancer sans la participation d'un agent supplémentaire puisqu'il fonctionne comme un initiateur et promoteur simultanément (Liu *et al.* 2016).

Nous pouvons classer ces molécules en 6 classes (**Tableau 1**):

Les composés N-Nitroso: Les nitrates sont présents dans la fumée de tabac et les aliments conservés, ils sont intensivement utilisés dans l'agriculture ; ainsi ils peuvent contaminer l'eau potable et la nourriture. Ils ne sont pas intrinsèquement cancérigène, mais peuvent être transformés par la microflore bactérienne de

l'appareil digestif en nitrites, alors que les nitrites peuvent encore être transformés par nitrosation en des composés N-Nitroso telles que les alkyl-nitrosamines et les nitrosamides (Tannenbaum *et al.* 1980; Ward *et al.* 2005). Les nitrites, les alkyl-nitrosamines et les nitrosamides sont des molécules très mutagènes.

Les amines hétérocycliques (HCA): Les viandes rouges, cuites à haute température et pendant de longues périodes, ont tendance à promouvoir plusieurs composés cancérigènes tels que les HCA. Un certain nombre de systèmes de dosage ont montré que les HCA sont de puissants agents mutagènes (Sugimura *et al.* 2004).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH): Les PAH sont générés pendant la cuisson de la viande, la torréfaction, et la combustion des substances organiques; ainsi ils se trouvent dans la fumée de tabac, la fumée des usines, les incinérateurs d'émission de déchets et les échappements des véhicules. Ils sont classés comme des agents mutagènes (Humans *et al.* 1989).

L'additif alimentaire bromate de potassium (KBrO₃): c'est un composé chimique inorganique utilisé comme adjuvant de la farine et qui est largement utilisé comme additif alimentaire dans le processus de fabrication du pain. C'est un oxydant puissant (Kurokawa *et al.* 1990; Wei *et al.* 2009).

Les biphényls polychlorés (PCB): sont une classe de cancérogènes de type dioxine, qui sont formés comme sous-produits industriels et connue sous le nom de contaminants environnementaux à grande échelle (Tehrani *et al.* 2014).

Les composés d'origine naturelle: produits par les bactéries ou bien trouvés dans la nature et possédant des propriétés mutagènes, comme par exemple l'aflatoxine et l'asbestose (Sichletidis *et al.* 2006; 2015).

Tableau 1 : Les différentes classes de molécules génotoxiques (Felton *et al.* 2002; Belpomme *et al.* 2007; Liu *et al.* 2015)

Classification	Lieu	Composés	Abbréviations	Mécanisme	Organes cibles
N-Nitroso	Eau contaminée	N-Nitrosodiméthylamine	NDMA	Initiateur	Foie
	Aliments conservés				Oesophage
Amines hétérocycliques	Fumée de tabac	N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine	NDMA	Carcinogène complet	Vessie
	Viande rouge cuite à haute température	2-Amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine	PhIP	Carcinogène complet	Sein Colon Prostate
		2-Amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline	MeIQx	Initiateur	Foie
Hydrocarbures Aromatiques		2-Amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline	IQ	Carcinogène complet	Poumon Foie
	Viande grillée, rôtie, fumée de tabac, combustion des substances organique	2-Acetylaminofluorene	2-AAF	Promoteur	Colon
Polycycliques		7,12-Diméthylbenzanthracene	DMBA	Carcinogène complet	Foie Sein Bouche Peau
				Initiateur	
Additif alimentaire					
Biphényles polychlorés	Adjuvant de la farine	Benzo[a]pyrene	B[a]P	Carcinogène complet	Poumon Estomac Colon
	Produits industriels	Bromate de Potassium	KBrO3	Carcinogène complet	Reins
Composés d'origine naturelle		2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-pdioxin	TCDD	Promoteur/initiateur	Foie
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasitus</i> Sols et roches	Aflatoxines Amiante		Promoteur	Poumon
				Carcinogène complet	Foie
				Carcinogène complet	Poumon Cavité pleurale

2.3 Les mécanismes non-génotoxiques

2.3.1 Les perturbateurs endocriniens

Le système endocrinien joue un rôle central chez tous les vertébrés et régule des fonctions biologiques critiques telles que le métabolisme, le développement, la reproduction et le comportement (WHO 2012). Selon la définition adoptée par l'Union Européenne, les perturbateurs endocriniens (PE) sont des produits chimiques exogènes d'origine naturelle ou artificielle qui peuvent interférer avec l'action des hormones. Ainsi, ils peuvent affecter la synthèse des hormones naturelles, leur libération et/ou leur transport. Ces substances sont fréquemment lipophiles et certaines s'accumulent dans les tissus adipeux (Commission 1996). Dans les tissus cibles, les PE peuvent réduire ou augmenter les effets des hormones naturelles sur leurs récepteurs et/ou ils peuvent changer les cascades de signalisation. Par conséquent, ils peuvent perturber le développement normal mammaire et celui des organes génitaux féminins ainsi que leurs fonctions et peuvent induire la carcinogenèse, en particulier lorsque l'exposition se produit en début de vie (Zoeller *et al.* 2012). Une exposition chronique aux PE peut modifier de façon permanente la signalisation physiologique de l'hormone, et provoquer des modifications épigénétiques et génétiques dans les cellules souches conduisant à l'apparition d'un cancer (Burgio *et al.* 2015; Patterson *et al.* 2015).

2.3.1.1 Les sources et la durée d'exposition aux perturbateurs endocriniens

L'exposition aux PE commence *in utero* et se produit tout au long de la vie, car ces produits chimiques sont présents dans une grande variété de produits quotidiens comme : l'eau, l'air, la poussière, la nourriture, les retardateurs de flamme, les bouteilles en plastique, les boîtes d'aliments en métal, les détergents, les jouets, la crème solaire, les papiers thermiques, les cosmétiques et les pesticides (Colborn *et al.* 1993; Harvey *et al.* 2004; Guo *et al.* 2014; Juhasz *et al.* 2014; Maipas *et al.* 2015).

Il est bien connu que l'exposition des tissus ou des organes à un environnement défavorable ou à un stimulus comme les PE pendant des périodes critiques du développement, peut augmenter la sensibilité à de nombreuses maladies à l'âge adulte telles que les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le cancer (Jirtle *et al.* 2007; Barker *et al.* 2012).

En outre, les PE sont des composés pseudo-persistants présents dans l'environnement à des niveaux très bas; cependant, ces faibles concentrations sont suffisantes pour causer des effets indésirables conduisant à une variété de problèmes de santé, tels que des troubles de la

reproduction, des troubles du développement, et le cancer chez les femmes et les hommes (Abaci *et al.* 2009; Nohynek *et al.* 2013). Finalement, les PE contribuent à la progression de certains troubles métaboliques comprenant l'obésité, qui favorise l'apparition d'un cancer, le diabète et l'endométriose (Diamanti-Kandarakis *et al.* 2009; Legler *et al.* 2015).

2.3.1.2 Le mode d'action des perturbateurs endocriniens

Il existe deux modes d'action pour les PE (Schug *et al.* 2016):

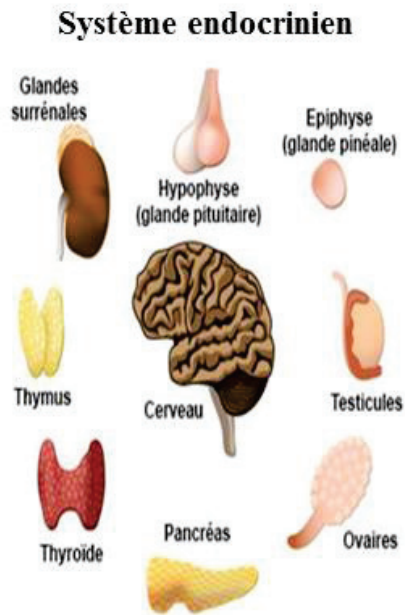
- L'action directe, en interagissant avec les récepteurs cellulaires :

Soit en imitant l'action d'hormones naturelles en se fixant sur le récepteur cellulaire de la molécule endogène (par exemple les œstrogènes sur le ER), d'où l'effet agoniste.

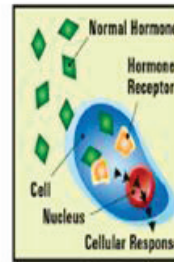
Soit en empêchant l'action des hormones naturelles en bloquant les récepteurs cellulaires, d'où l'effet antagoniste.

- L'action indirecte en modifiant la production, le transport, la diffusion, le stockage, et l'élimination des hormones naturelles.

Ces mécanismes d'action entraînent des signaux hormonaux anormaux qui peuvent augmenter ou inhiber le fonctionnement endocrinien normal des organes cibles des PE (**Figure 7**).



La signalisation endocrine normale



Les perturbateurs endocriniens

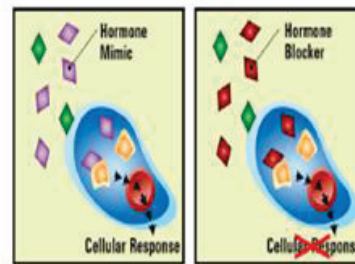


Figure 7 : Les systèmes endocriniens cibles des PE, la signalisation endocrine normale, l'action agoniste et antagoniste des PE (Schug *et al.* 2016).

2.3.1.3 Les grands groupes de perturbateurs endocriniens environnementaux

Nous pouvons classer les PE trouvés dans notre environnement en 5 groupes principaux:

- **Les produits industriels solvants** : Les organochlorés sont des molécules qui résultent soit de la combustion des matières organiques en contact avec du chlore soit d'une synthèse industrielle chimique. Par exemple, nous pouvons citer les dioxines, qui peuvent être produites à partir de l'incinération des matières plastiques halogènes [tels que le PVC (Polychlorure de vinyle)], ainsi que les Biphényles polychlorés (PCB), une famille de 209 composés organiques chlorés produits par l'industrie chimique utilisés dans les transformateurs électriques et dans les retardateurs de flamme (Belpomme *et al.* 2007). Des études ont clairement montré que ces molécules sont des perturbateurs endocriniens, qui peuvent interférer avec le processus du développement *in utero* et peuvent causer un cancer par leur effet promoteur ou carcinogène (Stohs 1990; Schiestl *et al.* 1997; Amaral Mendes 2002; Mandal 2005). En outre, il a été démontré que les PCB et les dioxines sont des agents mutagènes (Giri 1986; Schiestl *et al.* 1997). En 1997, l'IARC a inscrit le 2-3-7-8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) comme un cancérigène chez l'Homme.
- **Les phyto-œstrogènes**: certaines plantes contiennent naturellement des hormones; une fois dans le corps humain, les phyto-œstrogènes imitent l'activité des œstrogènes. Ils sont considérés comme des xéno-œstrogènes. Leurs structures et actions sont similaires aux œstrogènes des mammifères (Wise *et al.* 2011). Quatre classes de phyto-œstrogènes existent: les isoflavonoïdes, les lignanes, les stilbènes et les coumestans (Cornwell *et al.* 2004).
- **Les pesticides**: La plupart d'entre eux ont une structure moléculaire proche des œstrogènes (Repetto *et al.* 1997; Hayes *et al.* 2006). Dans cette catégorie, on peut citer les produits phytosanitaires comme les DDT / DDE / DDD (dichlorodiphényltrichloroéthane / dichlorodiphényldichloroéthane / dichlorodiphényldichloroéthylène) qui sont des produits organochlorés utilisés comme insecticides, fongicides, herbicides (McKinlay *et al.* 2008).

Les plastifiants et les plastiques: Parmi les plastifiants, on peut citer les phtalates qui sont produits dans l'industrie du plastique et utilisés pour apporter la flexibilité et l'élasticité au PVC; ils sont également utilisés dans des produits cosmétiques, pharmaceutiques et adhésifs (Sathyanarayana 2008). Le bisphénol A (BPA) est un composé chimique organique issu d'une réaction phénol/acétone, très utilisé dans l'industrie du plastique soit pour la polymérisation du plastique de type polycarbonate (plastiques durs et résistants), soit dans les résines époxy (revêtement de boîtes de conserve et canettes) (Erler *et al.* 2010).

Les produits pharmaceutiques, les produits de soins et les hormones de synthèse: La plupart des produits cosmétiques et produits de soins, ainsi que nombreux parfums sont constitués de phtalates DEP (Diethyl phthalate) et DBP (Dibutyl phthalate) qui sont utilisés comme plastifiants (Sathyanarayana 2008). En plus, les DEP et DBP, sont utilisés dans les enrobages pharmaceutiques, ce qui permet une libération des molécules ? lors de l'administration de médicaments (Hauser *et al.* 2004). Les hormones de synthèse sont produites spécifiquement pour agir sur le système endocrinien et le moduler comme les contraceptifs oraux et les traitements hormonaux substitutifs (Caldarola *et al.* 2010).

Les PE les plus communs trouvés dans l'environnement, leurs sources et les maladies développées suite à leur exposition sont présents dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Les PE les plus communs trouvés dans l'environnement, leurs sources et leurs conséquences.

Composé	Abbréviation	Description	Lieu/Sources	Maladies dues aux expositions	Références
Dichlorodiphényltri chloroéthane	DDT	Pesticide	Insecticides Acaricides	Cancers, toxicité pour le développement	(Mrema <i>et al.</i> 2013)
Bisphénol A	BPA	Plastifiant		Cancers notamment cancer du sein et de la prostate, maladies métaboliques, puberté, Comportement nerveux	(Prins <i>et al.</i> 2014) (Rochester 2013)
Tetrachlorodibenzodioxine	TCDD	Dioxine	Formé pendant la transformation industrielle, présents dans la poussière, sols et eaux	Cancers, qualité du sperme, fertilité, Comportement nerveux	(Lin <i>et al.</i> 2012) (Mrema <i>et al.</i> 2013)
Phthalate de dibutyle	DBP	Phthalate	Plastiques, parfums, produits cosmétiques et de soin	Oligospermie, maladies métaboliques, malformations congénitales, asthme, Comportement nerveux	(Martino-Andrade <i>et al.</i> 2010) (Meeker <i>et al.</i> 2009)
Phthalate de di-2-éthylhexyle	DEHP	Phthalate	Plastiques, parfums, produits cosmétiques et de soin	Oligospermie, maladies métaboliques, malformations congénitales, asthme, Comportement nerveux	(Martino-Andrade <i>et al.</i> 2010) (Meeker <i>et al.</i> 2009)

2.3.1.4 Les perturbateurs endocriniens et la cancérogenèse

Le cancer du sein et le cancer de la prostate sont des cancers favorisés par les PE (Diamanti-Kandarakis *et al.* 2009).

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes. Les hormones régulent la croissance et la fonction de la glande mammaire. Les PE modifient ces voies endocriniennes surtout quand ils agissent pendant des périodes vulnérables, telles que l'embryogenèse ou pendant la maturation du sein, ou bien la période de la puberté jusqu'à la première grossesse (Hilakivi-Clarke *et al.* 2013). Les PE sont capables de déréguler la signalisation des hormones et la fonction des cellules par le biais de multiples mécanismes moléculaires, cellulaires et biochimiques (Reaves *et al.* 2015). En 2015, Patterson AR *et al* ont démontré qu'une exposition chronique (traitement de 50 nM de PE sur plus de 70 passages cellulaires) de la lignée cellulaire mammaire œstrogène-dépendante MCF7 aux BPA ou GEN (Genistein) peut modifier de façon permanente la signalisation physiologique du ER en reprogrammant l'expression des gènes activés par l'œstrogène (Patterson *et al.* 2015). Ci-dessous des exemples de certains PE ayant des effets cancérogènes:

Les dioxines: À ce jour, les dioxines sont les PE ayant la plus grande incidence sur le cancer du sein chez les humains exposés (Brody *et al.* 2007). Les dioxines agissent par l'intermédiaire du récepteur Aryl hydrocarbure (AhR), qui est un facteur de transcription nucléaire activé par un ligand, et un médiateur intracellulaire des voies de signalisation des xénobiotiques (Denison *et al.* 2002). Les dioxines agissent comme un promoteur de tumeur en induisant la transcription des enzymes CYP450 à travers l'AhR subissant un stress oxydatif en altérant les voies de signalisation de l'apoptose Akt et ERK (Wu *et al.* 2004; Knerr *et al.* 2006; Chen *et al.* 2014). Les dioxines chez les femmes agissent comme des PE anti-œstrogéniques, puisque l'activation d'AhR conduit à une réduction de l'activité transcriptionnelle des ER qui est plus prononcée sur ER β que sur ER α (Brody *et al.*, 2007). La dioxine agit directement sur la différenciation du tissu mammaire en montrant un risque accru de cancer du sein, en liaison avec certains polymorphismes génétiques impliqués dans la cancérogenèse et le métabolisme des hormones stéroïdes (Brody *et al.*, 2007).

Les phtalates: Des données épidémiologiques suggèrent que le risque de cancer du sein augmente après l'exposition aux phtalates présents dans l'environnement. En 2010, López-Carrillo *et al* suggèrent pour la première fois que les concentrations urinaires de certains métabolites de phtalates, notamment le phtalate de monoéthyle (MEP), qui est le principal

métabolite du DEP, sont significativement associées à une incidence accrue de cancer du sein. Les phtalates exercent une activité oestrogénique sur les récepteurs stéroïdiens et ainsi augmente l'incidence du cancer du sein (Lopez-Carrillo *et al.* 2010). Une étude faite en 2014 démontre que, même à une concentration très faible, le phtalate de benzyle et de butyle (BBP), le DBP et le phtalate de Di-2-éthylhexyle (DEHP) sont capables d'induire un effet prolifératif par la voie de signalisation PI3K / AKT qui joue un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire, en régulant le cycle cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose (Chen *et al.* 2014).

Les bisphénols: L'exposition au BPA augmente la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses du sein et de la prostate, et le stress oxydatif (Wetherill *et al.* 2007). Des concentrations élevées de BPA sérique chez les femmes ménopausées ont été retrouvées en corrélation avec la densité mammographique du tissu mammaire (Sprague *et al.* 2013). Il est également suggéré que l'exposition professionnelle au BPA augmente l'incidence du cancer du sein (DeMatteo *et al.* 2012). Le BPA peut être l'un des facteurs qui contribuent au développement du cancer de la prostate (Tarapore *et al.* 2014). En effet en 2014, Tarapore *et al.* ont montré que les hommes atteints d'un cancer de la prostate présentent des concentrations beaucoup plus élevées de BPA urinaire par rapport au groupe témoin. D'autres études suggèrent que l'exposition au BPA pendant la gestation induit des altérations morphologiques dans le stroma et dans l'épithélium de la glande mammaire du fœtus et des lésions préneoplasiques et néoplasiques dans la glande mammaire chez le rat adulte (Dhimolea *et al.* 2014; Paulose *et al.* 2015).

Les parabènes: Il existe également de nombreuses données relatives à l'apparition du cancer du sein après une exposition aux parabènes. Depuis la première détection de parabènes dans le tissu de tumeur mammaire humaine en 2004, une étude plus récente a montré leur omniprésence dans toutes les régions du sein humain (Darbre *et al.* 2004; Barr *et al.* 2012). Il a clairement été démontré que les parabènes peuvent stimuler la croissance des cellules cancéreuses du sein humain par leurs propriétés œstrogéniques (Byford *et al.* 2002; Darbre *et al.* 2002; Darbre *et al.* 2003). Ils agissent principalement par un mécanisme médiée par l'ER (Macon *et al.* 2013). Bien que les parabènes soient appelés «weak-estrogens» à cause de leur faible affinité de liaison à l'ER, le niveau de réponse des cellules cancéreuses du sein humain *in vitro* à la prolifération traitées avec des parabènes peut être le même que celui obtenu avec le 17 β -œstradiol, lorsque des concentrations suffisantes sont utilisées (Charles *et al.* 2009).

En 2014, Wrobel *et al.* ont été les premiers à démontrer que les parabènes peuvent induire un phénotype transformé *in vitro* dans les cellules épithéliales mammaires humaines (MCF-10A) (Wrobel *et al.* 2014; Wrobel *et al.* 2014). Une autre étude a révélé que l'exposition à long terme (20 semaines) aux parabènes peut augmenter les propriétés migratoires et invasives des cellules de cancer du sein humain *in vitro* (Khanna *et al.* 2014).

2.3.1.4.1 Les PE, progression tumorale et métastases dans le cancer du sein

Les PE sont impliqués dans les métastases des cancers hormonaux-dépendants (Lee *et al.* 2013; Chen *et al.* 2015; In *et al.* 2015). Une métastase survient lorsque les jonctions intercellulaires se dissocient dans un site de tumeur primaire, les cellules passent alors dans le système sanguin ou lymphatique, et migrent vers un site secondaire (Gupta *et al.* 2006; Wen *et al.* 2011). Le processus qui est étroitement associé à la transformation maligne et à l'initiation des métastases cancéreuses est le processus de transition épithelio-mésenchymateuse EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) (Thiery *et al.* 2009; Chaffer *et al.* 2011). L'EMT est un processus biologique au cours duquel les cellules épithéliales perdent leur polarité cellulaire et leur jonction cellule-cellule et acquièrent des caractéristiques invasives et migratoires pour devenir des cellules mésenchymateuses (Lamouille *et al.* 2014).

Le processus de l'EMT est associé à la répression de l'expression de l'E-Cadhérine, qui est un marqueur des cellules épithéliales. Cette répression peut être réalisée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription (TF) tels que : Snail 1, Snail 2 (Communément appelé Slug), ZEB1, ZEB2, Kruppel-like factor 8 (KLF8), Twist, lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1), et fork-head box protein C2 (FOXC2) et Zinc Finger Protein 217 (ZNF217) qui peuvent se lier au promoteur de l'*E-Cadhérine* et réprimer sa transcription directement ou indirectement (Peinado *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008; Vendrell *et al.* 2012).

L'expression et la fonction des TF qui induisent l'EMT sont réglées par plusieurs voies de signalisation telles que la voie TGF- β (transforming growth factor β), la voie BMP (bone morphogenetic protein), la voie Wnt/ β -catenin, la voie Notch, la voie Hedgehog et les récepteurs tyrosine kinases (Gonzalez *et al.* 2014). Ces voies sont activées par des facteurs de croissance et des cytokines mais aussi par des microRNA du microenvironnement local (Lee *et al.* 2016).

Plusieurs PE ont montré un effet sur le processus de l'EMT, notamment en régulant les marqueurs EMT tels que la N-Cadherine, la fibronectine et la vimentine *via* la régulation des voies de signalisation associées à l'EMT déjà citées (Lee *et al.* 2016). Par exemple, dans les cellules de cancer du sein, les phthalates ont montré une augmentation de la vimentine associée à une diminution de l'E-cadhérine *via* la voie HDAC6-AKT/GSK-3 β (Hsieh *et al.* 2012). La TCDD augmente l'expression de SOX4 *via* la voie AhR-miR335 dans les cellules MDA-MB-231 et BT474 (Zhang *et al.* 2012). Le BPA a diminué l'expression de FOXA1 dans les cellules SKBR3 *via* la voie PI3K/AKT (Zhang *et al.* 2015). Le Triclosan a provoqué une diminution de l'E-cadhérine associée à une augmentation de la N-cadhérine, Snail et Slug dans les cellules MCF-7 (Lee *et al.* 2017). Ceci montre le potentiel des PE à induire des métastases, par la régulation des marqueurs de l'EMT et de la migration *via* plusieurs voies de signalisation associées aux processus de l'EMT (**Figure 8**).

2.3.1.4.2 Les PE et le microenvironnement tumoral dans le cancer du sein

Le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans la cancérogenèse, la prolifération et le développement métastatique. Dans le cancer du sein, la dérégulation des propriétés cellulaires du stroma et des composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) dans un tissu peut directement promouvoir la transformation cellulaire et former une niche pour soutenir la tumeur. Ce microenvironnement tumorigène facilite la croissance tumorale et l'invasion dans les tissus environnants, conduisant au développement métastatique (Burks *et al.* 2016).

Le microenvironnement stromal du cancer du sein joue un rôle important dans le maintien et la promotion de la progression tumorale (Valentino *et al.* 2013). Après exposition des cellules de cancer du sein aux PE, l'expression de l'aromatase dans les fibroblastes associés aux cellules cancéreuses a augmenté ce qui augmente la production des œstrogènes par les fibroblastes. De plus, les fibroblastes peuvent sécréter une variété de facteurs de croissance qui peuvent à leur tour induire la voie de signalisation des œstrogènes dans les cellules cancéreuses (Fisher *et al.* 2014).

D'autre part, la composition de la MEC influence la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire (Kourouklis *et al.* 2016; Subbiah *et al.* 2016; Rammensee *et al.* 2017). Des observations cliniques et expérimentales montrent que les œstrogènes ont un impact significatif sur la composition de la MEC. Les œstrogènes, en tant que traitement

substitutif pour la ménopause, sont associés à un épaissement cutané et à une augmentation du contenu en collagène (Zouboulis *et al.* 2007).

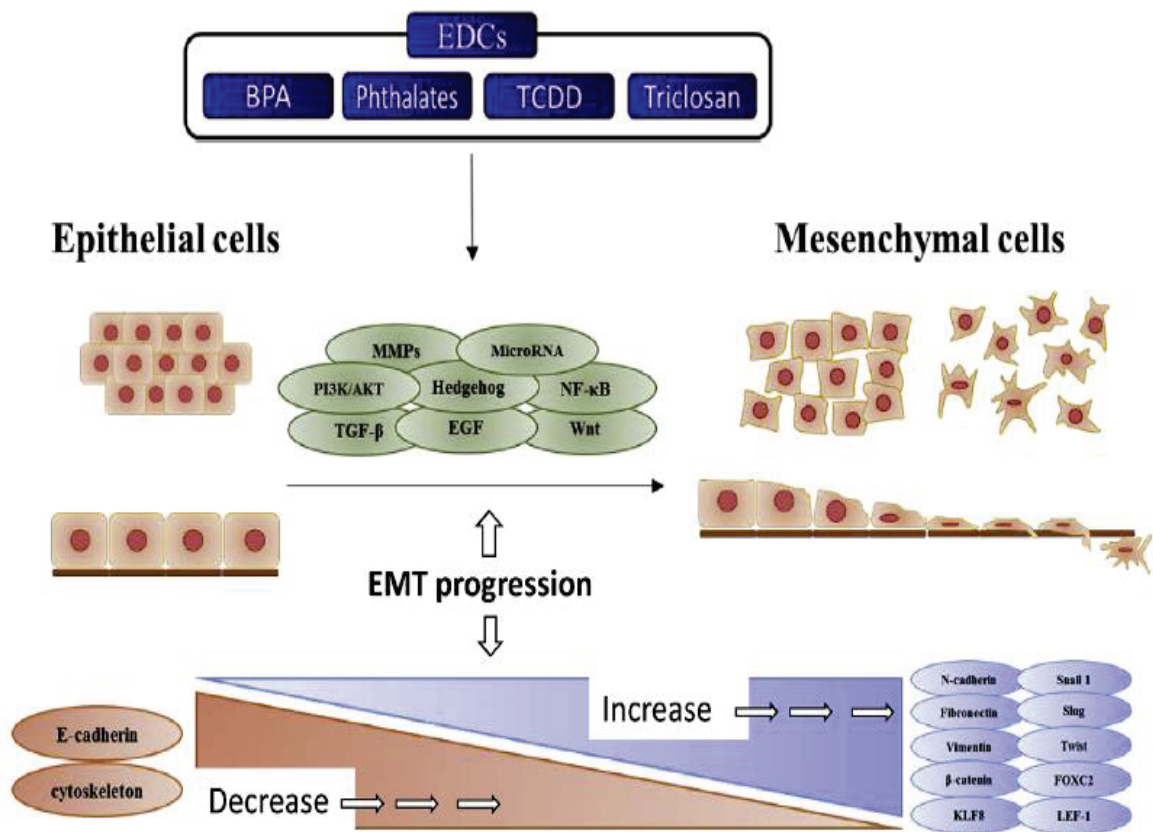


Figure 8 : Effets de PE sur le processus de l'EMT dans la métastase cancéreuse (Lee *et al.* 2016)

De plus, l'E2 augmente significativement l'expression des protéines matricielles telles que la fibronectine, la laminine et le collagène I dans les fibroblastes issues des biopsies de peaux avec sclérose et des peaux normales (Soldano *et al.* 2010). *In vivo*, le BPA augmente considérablement le niveau de collagène dans le stroma entre les conduits mammaires de la glande mammaire d'une souris ainsi qu'une augmentation significative de la prolifération cellulaire (Ibrahim *et al.*, 2016). En plus, le BPA augmente l'expression du collagène dans l'utérus et dans la matrice cardiaque de souris suggérant que ce PE peut réguler le remodelage matriciel dans ces organes (Belcher *et al.* 2015; Kendzioriski *et al.* 2015). Une augmentation de la tumorigénèse est associée à une abondance de collagène dans la MEC, et les œstrogènes sont capables de moduler le collagène et les intégrines ainsi que l'expression de MMP2 (Matrix Metalloproteinase-2) et MMP9 (Nilsson *et al.* 2007; Kousidou *et al.* 2008; Lesniewska *et al.* 2009). Ensemble, ces données démontrent le rôle important des œstrogènes manifesté par le pouvoir oncogénique des PE à remodeler la MEC.

2.3.2. Le polymorphisme des cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille de métalloenzymes qui catalysent une grande diversité de réactions enzymatiques ayant à la fois comme substrats des composés exogènes et endogènes (Ingelman-Sundberg 2005).

On distingue deux groupes de famille de CYP en fonction de leur spécificité de substrat (Aguilar *et al.* 2005):

Les familles CYP 1-3 sont principalement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (substances exogènes considérées comme toxiques), des médicaments et des substances cancérigènes. Ces CYP sont polymorphes en raison des SNP (polymorphismes nucléotidiques simples), des insertions/suppressions et des variations du nombre de copies (CNV) qui sont toujours fonctionnels et persistants. (Ingelman-Sundberg 2005).

Les autres familles de CYP sont impliquées dans le métabolisme des substances endogènes comme la vitamine D, l'acide rétinoïque, le cholestérol et les hormones stéroïdes (Aguilar *et al.* 2005).

2.3.2.1 Le polymorphisme des CYP et la cancérogenèse

Un polymorphisme génétique est défini comme une variation stable dans un locus de la séquence d'un gène. La plupart des membres des familles CYP sont polymorphes avec

beaucoup de variants alléliques (Wang *et al.* 2009). Ces variations peuvent être influencées par l'environnement tels que l'alimentation, le mode de vie et les polluants environnementaux (Rodriguez-Antona *et al.* 2010). Ces variations génétiques affectent l'expression des gènes CYP et leurs activités, modifiant alors le métabolisme des substrats (Ingelman-Sundberg *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2009). Une variabilité au sein des enzymes qui catalysent l'activation ou l'inactivation des pro-carcinogènes pourrait affecter la susceptibilité pour un cancer induit par l'environnement (Rodriguez-Antona *et al.* 2010; Chen *et al.* 2015). En général, les familles CYP 1-3 et leurs métabolites jouent un rôle important dans l'initiation et le développement d'un cancer, par exemple:

Le CYP1A1 métabolise les HAP et contribue à la fois à leur détoxification et à leur bioactivation en intermédiaires toxiques et mutagènes (Zhou *et al.* 2009). Son polymorphisme GSTM1 est associé à la formation d'adduits ADN-HAP dans les tissus mammaires (Rundle *et al.*, 2009). En revanche, des mécanismes épigénétiques (méthylation et modifications d'histones) affectent l'expression de *CYP1A1* dans le cancer de la prostate (Okino *et al.* 2006).

Le CYP1B1 est plus exprimé dans divers types de tumeurs par rapport aux tissus normaux (McFadyen *et al.* 2005). Une surexpression de CYP1B1 provoque une augmentation de la conversion de l'œstradiol en 4-hydroxyœstradiol qui joue un rôle important dans la cancérogenèse du tissu mammaire et de l'endomètre (Tsuchiya *et al.* 2005). Le polymorphisme CYP1B1*2 semble responsable d'une susceptibilité génétique aux cancers du sein et du poumon dans la population Japonaise (Watanabe 2000). Egalement, le CYP1B1 a été décrit comme étant régulé par des modifications épigénétiques; une hypométhylation de ces sites a été associée au cancer de la prostate (Tokizane *et al.* 2005).

Le CYP2A6 joue un rôle important dans le métabolisme de la nicotine et donc est lié à l'augmentation du risque de cancer du poumon chez les tabagiques (Ho *et al.* 2009). Il a été démontré que CYP2A6 est responsable de l'activation du carcinogène tabac-spécifique le (4-methylnitrosmino) -1-(3-pyridyl)-1-butanone (NKK) ainsi que d'autres substances toxiques des voies respiratoires (Rossini *et al.* 2008). Le gène *CYP2A6* est très polymorphe avec environ 40 variants alléliques, avec des séquences supprimées ou dupliquées, des conversions, des délétions et des insertions de nucléotides, ainsi des SNP codants et non-codants (Zanger *et al.* 2013). Par exemple, les polymorphismes *CYP2A6*7* et *CYP2A6*17* conduisent à une protéine avec une activité réduite alors que *CYP2A6*9* entraîne une transcription réduite du gène (Ingelman-Sundberg 2005).

C. Les récepteurs cellulaires

Les molécules environnementales tels que la TCDD, les PCB, les traitements hormonaux ont la capacité d'interagir avec les récepteurs cellulaires (nucléaires et membranaires) (Wallace *et al.* 2013). De manière générale, les effets médiés par ces interactions passent par deux types de mécanismes : 1) activation des récepteurs de la surface cellulaire qui induisent des voies de transduction du signal entraînant des réponses biologiques impliquant une variété de protéines kinases (Griner *et al.* 2007); 2) activation intracellulaire médiée par des récepteurs nucléaires agissant dans le noyau tels que des facteurs de transcription (Aranda *et al.* 2001). La plupart des agents exogènes agissent comme des agonistes et rentrent en compétition avec les ligands endogènes pour se lier à ses récepteurs. Cependant, il existe également des récepteurs pour lesquels peu ou pas de ligands endogènes ont été identifiés, tel que le récepteur de l'aryl d'hydrocarbone (AhR) (Ma 2011; Baek *et al.* 2014). L'activation des récepteurs entraîne le plus souvent des changements dans la transcription des gènes. Les voies moléculaires qui sont régulées par l'interaction ligand-récepteur et qui sont les plus pertinentes pour la cancérogenèse comprennent la prolifération cellulaire (par exemple, la stimulation des voies prolifératives normales, comme c'est le cas pour les tissus dépendants des œstrogènes et la thérapie hormonale), le métabolisme xénobiotique, et l'apoptose (Rushmore *et al.* 2002).

1. Les récepteurs cellulaires et l'environnement

Les molécules environnementales ont la capacité d'agir comme ligands (agonistes ou antagonistes) et/ou de modifier l'expression des récepteurs cellulaires (modulateurs). Ces effets peuvent donc avoir des synergies ou des inhibitions sur l'expression des enzymes et des transporteurs impliqués dans le métabolisme des molécules exogènes (Wang *et al.* 2003). Différentes études ont mis en évidence ou suggèrent fortement que les effets délétères induits par de nombreux facteurs environnementaux résultent de l'activation des récepteurs cellulaires, tels que les récepteurs aux œstrogènes (ER) alpha (ER α) ou beta (ER β), le récepteur AhR, et le récepteur de pregnane X (PXR) (Routledge *et al.* 2000; Mnif *et al.* 2007; Shi *et al.* 2009).

Nous pouvons distinguer deux grandes familles de récepteurs: les récepteurs nucléaires et les récepteurs membranaires.

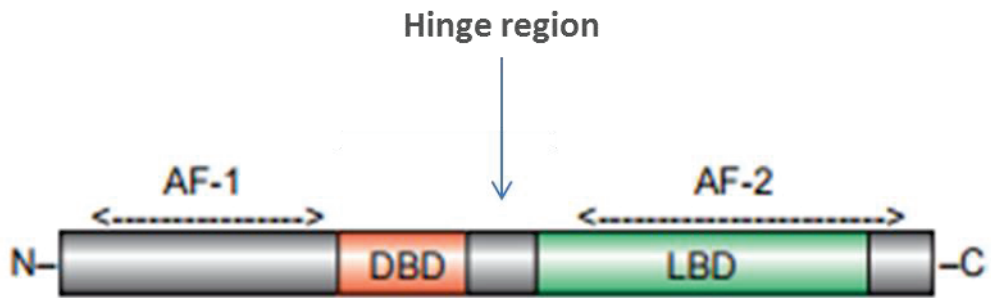
1.1 Les récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires (NR) code pour des facteurs de transcription qui détectent à la fois des signaux intra-cellulaires et extra-cellulaires et répondent en induisant la transcription de leurs gènes cibles. Parmi les gènes cibles nombreux sont impliqués dans divers processus cellulaires tels que la croissance et la différenciation cellulaire, le développement et le métabolisme (Rudraiah *et al.* 2016). Les ligands des NR comprennent à la fois des molécules endogènes et exogènes tels que des hormones, des acides gras, des acides biliaries, des médicaments, des toxines environnementales et les molécules intermédiaires du métabolisme (Arrese *et al.* 2010).

Même si l'impact cellulaire de chaque NR est différent, tous les NR partagent des structures caractéristiques, des domaines fonctionnels et des séquences homologues (**Figure 9**). En général, les NR comportent une région N-terminale variable avec un domaine d'activation de fonction 1 (AF-1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) hautement conservé est celui, une région « Hinge » et un domaine de liaison au ligand (LBD) qui contient le domaine d'activation de fonction-2 (AF-2) du côté de la région C-terminale. L'activation du domaine AF-1 du NR est indépendante du ligand tandis que l'activation du domaine AF-2 est ligand-dépendante (Nagy *et al.* 2004).

La région « Hinge » relie le DBD au LBD et lors de la liaison du ligand, les hélices dans cette région subissent un changement conformationnel aboutissant à la dissociation des co-represseurs et / ou l'association des co-activateurs, menant finalement à l'activation de la transcription du gène cible (Nagy *et al.* 2004). Ces événements contribuent à la régulation des voies de transduction du signal dans des conditions physiologiques et pathologiques (McKenna *et al.* 1999; Sladek 2003; Nagy *et al.* 2004).

Ces caractéristiques différencient les NR d'autres protéines régulatrices et leur permettent d'être des capteurs dynamiques aux divers stimuli et régulateurs des réponses cellulaires.



DBD: DNA binding domain

LBD: Ligand binding domain

AF-1: Activation function-1

AF-2: Activation function-2

N: N-terminal domain

C: C-terminal domain

Figure 9 : Structure générale des domaines communs des récepteurs nucléaires (Nagy *et al.* 2004)

1.1.1. Classification des récepteurs nucléaires

Nous distinguons plusieurs sous-familles des récepteurs nucléaires; dans ce manuscrit nous allons nous intéresser à celles qui sont les plus répandues:

- i) Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes ou les récepteurs endocriniens classiques comprenant les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes sont les premiers membres identifiés de la famille des NR (Evans 2004). Chacun de ces récepteurs est activé par un ligand unique de haute affinité. Parmi ses récepteurs on trouve le récepteur des androgènes (AR), le ER, le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur des minéralocorticoïdes (MR), le PR, le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR α / β / γ), le récepteur de la thyroïde (TR) et le récepteur de la vitamine D (RVD) (Mangelsdorf *et al.* 1995; Trauner *et al.* 2011).
- ii) Les récepteurs «orphelins» dont la majorité présente ont des caractéristiques structurales et des séquences similaires à celles des récepteurs nucléaires classiques et qui montre une activité transcriptionnelle constitutivement active. Cependant, leurs ligands physiologiques ne sont pas connus. C'est pour cette raison qu'ils ont été appelés récepteurs «orphelins» (Hummasti *et al.* 2008). Plusieurs d'entre eux jouent un rôle dans de multiples aspects biologiques, y compris la différenciation cellulaire, le métabolisme, l'inflammation, la réponse immunitaire et l'homéostasie (Hummasti *et al.* 2008; Riggins *et al.* 2010; Solt *et al.* 2012). Par exemple, il y a les récepteurs liés à l'œstrogène (ERR) qui partagent les mêmes gènes cibles et sites d'action que ceux des ER. Cependant, ils ne participent pas directement à la voie de signalisation classique de l'œstrogène et ne répondent pas aux œstrogènes naturels (Giguere 2008; Audet-Walsh *et al.* 2015). Par ailleurs, parmi les NR orphelins plusieurs ont été déplacés dans la sous-famille des récepteurs orphelins adoptés après avoir découverts leurs ligands (Willson *et al.* 2000; Roshan-Moniri *et al.* 2014). Par exemple, on peut citer les récepteurs rétinoïdes X et le récepteur «peroxisome proliferator-activated receptors» (PPAR) (Benoit *et al.* 2004; Shi 2007).
- iii) Les récepteurs aux xénobiotiques (XR) présentent un sous-ensemble de NR orphelins qui se lie à une large gamme de composés endogènes et à des xénobiotiques, souvent à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Ils jouent un rôle important au niveau des réponses cellulaires aux endotoxines accumulées

chez les humains ou à des concentrations élevées de produits chimiques et leurs métabolites (Wang *et al.* 2003). À ce jour, des études approfondies se focalisent sur trois principaux XR: le récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor), le récepteur PXR (Pregnane X Receptor), et le récepteur AhR, en raison de leur prédominance dans la régulation des réponses hépatiques soit aux médicaments soit aux produits chimiques environnementaux (Burbach *et al.* 1992). En outre, ces trois RX sont connus pour régler au niveau transcriptionnel l'UDP (Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase) 1A1 (enzyme impliquée dans le processus de détoxification et intervenant principalement dans la transformation de la bilirubine non conjuguée (ou libre) en bilirubine conjuguée), et le transporteur ABC de la protéine de résistance au cancer du sein ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) (fréquemment associé à la résistance aux thérapies dans les cancers) (Sugatani *et al.* 2001; Jigorel *et al.* 2006; Spitzwieser *et al.* 2016).

1.1.2. Les récepteurs nucléaires et les enzymes de métabolisation des xénobiotiques

Les enzymes responsables de la plupart des réactions de biotransformation sont regroupées en deux catégories: les enzymes de phase I et les enzymes de phase II. Les enzymes de phase I conduisent à l'inactivation de la plupart des xénobiotiques (Vaz 2001). Cependant, dans certains cas, cette transformation métabolique des xénobiotiques peut également produire des métabolites actifs ou des intermédiaires toxiques (Ghanayem *et al.* 2000). Une des plus importantes et prédominantes superfamilles d'enzymes impliquées dans les réactions de phase I est la famille du CYP.

Plusieurs NR (xénobiotiques ou bien orphelins) sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des CYP; et un seul peut être impliqué dans la régulation transcriptionnelle de multiples gènes des CYP. De plus, un gène CYP spécifique est régulé par plusieurs récepteurs différents, c'est ce que nous appelons «crosstalk» entre les RN (Wang *et al.* 2003). D'où l'intérêt des récepteurs nucléaires dans l'interaction des mécanismes physiologiques-environnement.

Les enzymes de phase II sont principalement impliquées dans la conjugaison des molécules toxiques vierges ou bien des métabolites de la phase I; et ceci se fait majoritairement soit par la glucuronidation, soit par la sulfatation et soit par la conjugaison du glutathion (Kumar *et al.* 2001).

1.1.3. Les récepteurs PXR et CAR

Les RX, PXR et CAR induisent l'expression des enzymes CYP de la phase I, tels que le CYP3A et le CYP2B (Yan *et al.* 2016). PXR et CAR jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des enzymes métabolisant les médicaments et de la biotransformation des xénobiotiques. De plus, ils jouent un rôle dans les maladies humaines tel que le cancer (**Figure 10**). L'activation de PXR, conduit à une régulation positive de la transcription du *CYP3A4* et/ou de la protéine de la multirésistance aux médicaments MDR1 (multidrug resistance *protein* 1), contribuant potentiellement à la chimiorésistance (Synold *et al.* 2001; Chen *et al.* 2007). Par ailleurs, PXR est capable d'induire la transcription du facteur de croissance des fibroblastes FGF19 (Fibroblast growth factor 19) qui peut favoriser la progression de la tumeur, contribuant ainsi au développement du cancer (Wang *et al.* 2011). Le récepteur CAR affecte des facteurs physiologiques et pathophysiologiques tels que l'obésité, le diabète et le développement de tumeurs en modulant l'homéostasie de l'énergie hépatique, la signalisation de l'insuline et la prolifération cellulaire (Huang *et al.* 2005; Dong *et al.* 2009). Le récepteur CAR peut se lier à la protéine anti-apoptotique GADD45B (growth arrest and DNA damage-inducible beta) pour inhiber l'apoptose et contribuer au développement du cancer (Yamamoto *et al.* 2010).

1.1.4. Le récepteur de l'Aryl hydrocarbure (AhR)

AhR est un récepteur nucléaire cytoplasmique, après interaction avec un ligand il se déplace dans le noyau et agit comme un facteur de transcription. Il a été démontré que son activation peut provoquer des effets toxiques et cancérigènes (Schmidt *et al.* 1996). À ce jour, la grande majorité de ligands à l'AhR ont été identifiés comme des toxines environnementales constituant des activateurs puissants (Denison *et al.* 2003). Les activateurs xénobiotiques de l'AhR dérivent principalement de deux classes de composés: les PAH et les HAH (Halogenated Aromatic Hydrocarbons) illustrés par la TCDD qui a une haute affinité pour l'AhR, et qui représente son activateur prototype (Denison *et al.* 2002). AhR est connu pour avoir un rôle majeur dans le métabolisme des composés toxiques et la promotion des tumeurs (Schmidt *et al.* 1996). Lors de son activation, l'AhR stimule l'expression de ses gènes cibles tels que le *CYP1A1*, le *CYP1A2* et le *CYP1B1*, ainsi que le gène codant la protéine ABCG2. Cette protéine fonctionne comme un transporteur de xénobiotique et peut jouer un rôle dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques (Abel *et al.* 2010; Tompkins *et al.* 2010).

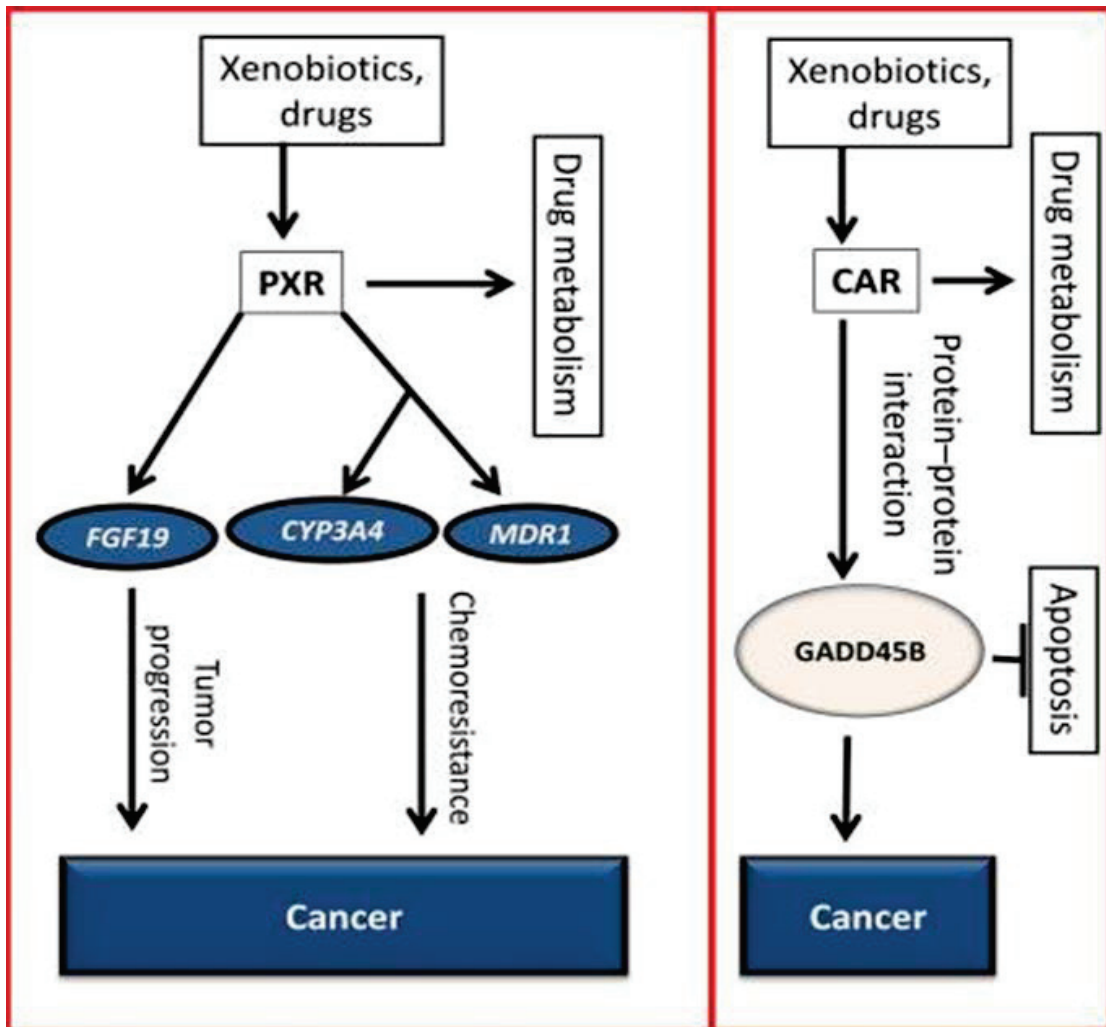


Figure 10 : Rôle du PXR et CAR dans le cancer (Banerjee *et al.* 2015).

Le B[a]P est un activateur connu de l'AhR et induit l'expression de *CYP1A1*, qui à son tour augmente la biotransformation du B[a]P, un procancérogène, en B[a]P-diol-époxyde (BPDE), le mutagène ultime (Tarantini *et al.* 2011).

De manière générale, le récepteur AhR dans son état inactif est exprimé dans le cytoplasme de presque tous les tissus et toutes les lignées cellulaires immortalisées (Rowlands *et al.* 1997). En absence de stimulation, AhR est séquestré dans le cytoplasme par un complexe protéique contenant la protéine HSP90 (heat shock protein 90), la protéine XAP2 (Hepatitis B virus X-associated protein 2) et la protéine p23 (**Figure 11**). L'activation par un ligand, induit la dissociation de XAP2 et de p23; et le complexe AhR/HSP90 est transloqué vers le noyau formant la première étape essentielle de l'activation de l'AhR (Ikuta *et al.* 2000; Kazlauskas *et al.* 2001; Tsuji *et al.* 2014). Une fois dans le noyau, l'AhR se détache de HSP90 et s'hétérodimérise avec ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), permettant au complexe AhR/ARNT de se lier à des éléments de réponse appelés XRE (Xenobiotic Responsive Element) localisés dans les promoteurs des gènes cibles pour induire leur transcription (Dolwick *et al.* 1993; Fukunaga *et al.* 1995; Whitlock 1999).

1.1.4.1 Le récepteur AhR et son implication dans le cancer

Il existe une interaction entre le récepteur AhR et les protéines kinases (Puga *et al.* 2009). Plusieurs études ont montré que la PKC (Protein Kinase C) est impliquée dans l'activation de l'AhR au niveau de la liaison à l'ADN et l'induction de l'expression des gènes (Pongratz *et al.* 1991; Carrier *et al.* 1992; Park *et al.* 2000). L'inhibition de PKC bloque la liaison du complexe AhR/ARNT au niveau de l'ADN et supprime par conséquent l'expression du gène *CYP1* (Carrier *et al.* 1992; Ikegwonu *et al.* 1999). Des ligands d'AhR comme la TCDD et le B[a]P sont capables d'activer les sous-familles des MAPK, JNK (c-Jun N-terminal kinases) et ERK (Extracellular signal-regulated kinases) dans des cellules tumorales hépatiques de souris et des cellules tumorales pulmonaires humaines suggérant que les MAPK stimulées par les ligands semblent être critiques pour l'induction de la transcription des gènes dépendants de l'AhR et de l'expression du *CYP1A1* (Tan *et al.* 2002).

AhR joue un rôle dans la dérégulation du cycle cellulaire. Weiss *et al.* ont constaté que le traitement par la TCDD d'une lignée cellulaire hépatique, conduit à l'activation du facteur de transcription JUN-D et à l'induction transcriptionnelle de la cycline A (protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire) (Weiss *et al.* 2008). Avec les mêmes cellules, des résultats similaires ont été obtenus en utilisant le B[a]P (Andrysik *et al.* 2007).

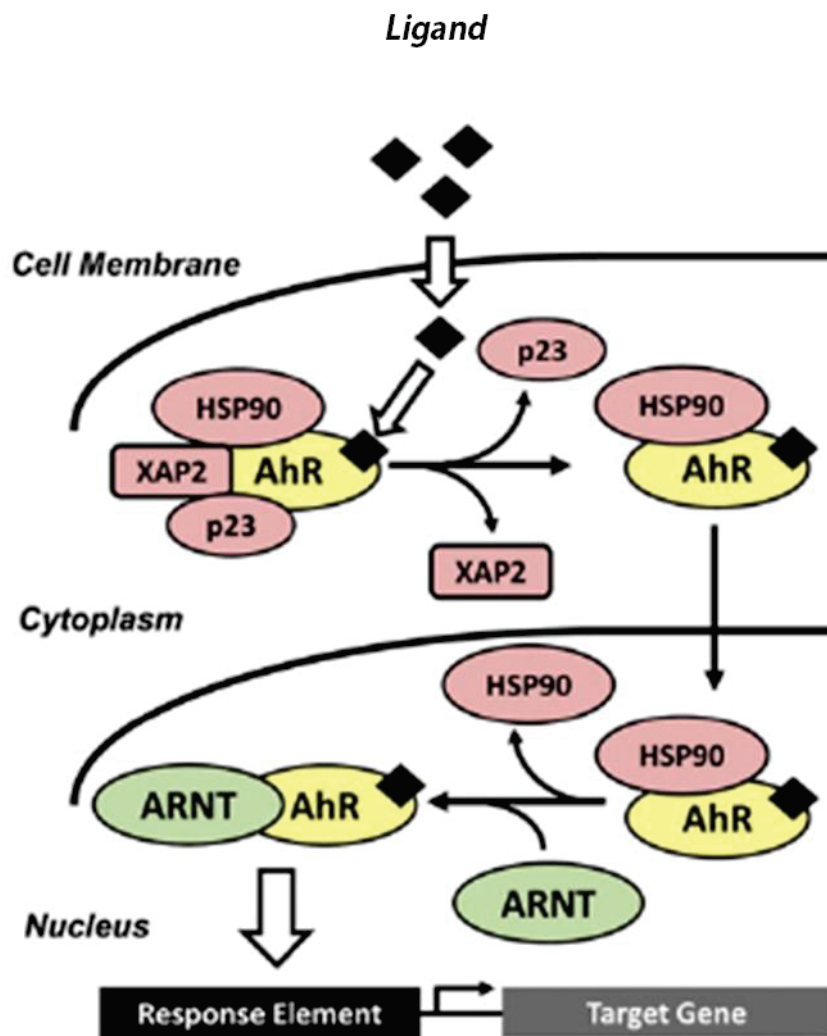


Figure 11 : Mode d'activation du récepteur AhR (Mackowiak *et al.* 2016)

L'inhibition de l'apoptose est également un facteur de promotion/progression tumorale (Roberts *et al.* 1997). l'AhR possède des fonctions pro-proliférative et anti-apoptotique susceptibles de jouer un rôle majeur durant la promotion/progression tumorale (Puga *et al.* 2009). Dans un modèle d'étude de l'hépatocarcinogénèse, la TCDD stimule l'expansion clonale des cellules initiées en inhibant l'apoptose (Bock *et al.* 2005). Une autre étude montre que l'AhR contribue à la prolifération des cellules tumorales mammaires en inhibant l'apoptose tout en favorisant la transition vers un phénotype invasif et métastatique (Schlezniger *et al.* 2006). Ceci avait été également démontré *in vivo* dans des souris AhR-déficientes (Gonzalez *et al.* 1998). *In vitro*, dans des lignées cellulaires de lymphomes, l'utilisation d'un antagoniste de l'AhR abolit la résistance à l'apoptose induite par la TCDD (Vogel *et al.* 2007). De plus, l'inhibition de l'AhR dans des fibroblastes des souris (MEFs) entraîne une augmentation de la protéine E2F1; en revanche l'activation de l'AhR réprime l'induction des gènes cibles pro-apoptotiques de E2F1, *Tap73* et *Apaf1* (*Apoptotic protease activating factor 1*) (Marlowe *et al.* 2008). D'Amato et ses collègues ont récemment démontré que la voie TDO2-AhR joue un rôle crucial dans la résistance à l'anoikis et la métastase des lignées TNBC (D'Amato *et al.* 2015). Les cellules épithéliales normales sont programmées pour subir l'apoptose lorsqu'elles se détachent de la MEC. Ce procédé est appelé anoikis (Frisch *et al.* 1994). Le TDO2 catalyse le métabolisme de l'acide aminé tryptophane et aboutit à des métabolites intermédiaires tels que la kynurénine (Kyn) (Metz *et al.* 2007). La Kyn est connue pour être un ligand endogène d'AhR, capable de supprimer les réponses immunitaires anti-tumorales et de favoriser la survie et la mobilité des cellules tumorales (Opitz *et al.* 2011). Les cellules TNBC régulent l'enzyme TDO2 (Tryptophane 2,3-Dioxygénase) de manière NF- κ B-dépendante (nuclear factor-kappa B) et génèrent la substance Kyn provoquant ainsi l'activation d'AhR. De plus, l'inhibition de TDO2 et de l'AhR diminue la résistance des TNBC à l'anoikis, la prolifération, la migration et l'invasion (D'Amato *et al.* 2015). *In vivo*, l'inhibition de TDO2 réduit la capacité des cellules TNBC à métastaser dans les poumons (D'Amato *et al.* 2015). *In silico*, l'expression du TDO2 est plus importante dans les tumeurs TNBC et est corrélée à un mauvais pronostic par rapport aux tumeurs ER+ (D'Amato *et al.* 2015).

De plus, un effet d'AhR sur la plasticité cellulaire a été démontré après un traitement prolongé des cellules épithéliales à la TCDD ou au 3-méthylcholanthrene (un autre ligand de l'AhR). Cette étude a mis en avant une activité pro-migratoire issue de l'augmentation des

interactions cellulaires avec la MEC médié par l'activation de JNK et cela de manière réversible. (Diry *et al.* 2006).

Enfin, Romangolo *et al.* ont montré que l'expression d'AhR est associée à l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène *BRCA1*, et ceci pourrait servir de biomarqueur pour le développement tumoral des cancers du sein ER α négatif (Romagnolo *et al.* 2015).

En conclusion, AhR semble être impliqué dans divers processus contribuant à la cancérogenèse.

1.1.4.2 Le récepteur AhR et les cellules souches cancéreuses (CSC)

Les CSC (Cancer Stem Cells) forment un sous-type de l'ensemble des cellules cancéreuses et entraînent l'initiation, la progression et le développement de métastases dans la cancérogenèse. Une hypothèse suppose que les tumeurs sont maintenues par une population de CSC auto-renouvelable, qui est également capable de se différencier en des populations de cellules non auto-renouvelables qui constituent la masse de la tumeur (McDermott *et al.* 2010). Les CSC ont été identifiées dans différents cancers, tels que le cancer du sein (Al-Hajj *et al.* 2003), du cerveau (Singh *et al.* 2003), des poumons (Ho *et al.* 2007), du côlon (Ricci-Vitiani *et al.* 2007) et la leucémie (Bonnet *et al.* 1997).

Les CSC sont caractérisées par leur capacité à former des sphères (mammosphères) et à exprimer très fortement la protéine ATP-binding cassette (ABC), en particulier l'ABCG2. Ces propriétés leur confèrent une résistance à la chimiothérapie et par conséquent augmente la récurrence du cancer et le taux de mortalité des patients dû à l'échec du traitement. (Bomken *et al.* 2010; Abdullah *et al.* 2013). L'identification et l'isolement des CSC se fait en se basant sur l'activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase-1 (ALDH) au niveau des cellules, et par le phénotype de SP (Side Population) qui permet de distinguer dans une population des caractéristiques biologiques distinctives en se basant sur des marqueurs spécifiques (Ginestier *et al.* 2007). De plus, les CSC peuvent être définies par l'expression des gènes associés aux cellules souches d'un tissu sain tels que *Notch1,2* (Neurogenic locus notch homolog protein 1, 2) *Sox2* (Sex Determining Region Y-Box 2), *Pou5F1/Oct4* (POU Class 5 Homeobox 1/octamer-binding transcription factor 4), à l'invasion et à la migration tels que *Twist1,2* (Twist Family BHLH Transcription Factor 1,2), *Vim* (Vimentin), *Snai1* (Zinc finger protein SNAI1), *Snai2* (Zinc Finger Protein SNAI2) (Bolos *et al.* 2009; Chiou *et al.* 2010). Le

développement et la maintenance des CSC sont contrôlés par plusieurs voies de signalisation telles que les voies Wnt et Notch. Du point de vue mécanistique, la voie Wnt est connue pour médier l'auto-renouvellement des CSC par la modulation du facteur de transcription β -Catenin/ TCF (T-cell factor), alors que la maintenance et la différenciation des CSC sont gérées par la voie Notch/Hes (hairy and enhancer of split-1) (Reya *et al.* 2001).

Stanford EA *et al.* ont montré que l'activation de l'AhR augmente le développement des CSC et leurs caractéristiques dans des cellules cancéreuses du sein triple négatives ER⁻/PR⁻/HER2⁻ [TNBC (Triple Negative Breast Cancer)]. Ils ont trouvés que les cellules ALDH⁺ expriment des niveaux élevés d'AhR, de CYP1A1 et de CYP1B1. Par ailleurs, une hyperactivation d'AhR par des ligands environnementaux, dont la molécule environnementale B[a]P, augmente l'activité d'ALDH et l'expression des gènes associés aux cellules souches et aux processus de migration/invasion cellulaire tels que *Snail*, *Twist 1*, *Twist2*, *Tgfb1*, et *Vim*. De plus, l'activation de l'AhR par un ligand augmente l'interaction avec *Sox2*, un gène régulateur de l'auto-renouveaulement, en induisant la translocation de SOX2 dans le noyau. En revanche, l'inhibition d'AhR inhibe ces caractéristiques, et diminue la résistance à la chimiothérapie des cellules ALDH⁺. *In vivo*, les cellules ALDH⁺ ont montré une capacité à initier des tumeurs. Ces données suggèrent que l'AhR joue un rôle important dans le développement des cellules ayant des propriétés de CSC et que les ligands environnementaux d'AhR peuvent accroître la progression du cancer du sein (Stanford *et al.* 2016).

En outre, la voie de signalisation PI3K/Akt joue un rôle dans la régulation de plusieurs gènes impliqués dans la cancérogenèse comme β -Catenin, *p21*, *p27*, *Mdm2* (murine double minute 2) ou les facteurs de transcription FOX (Forkhead box) (Diehl *et al.* 1998). Des études ont montré une interaction entre la voie Wnt / β -Catenin et la voie PTEN-PI3K/Akt dans le contrôle de l'auto-renouveaulement et de l'expansion des CSC (Bleau *et al.* 2009; Perry *et al.* 2011). Enfin, ces voies de régulation des CSC ont été démontrées comme pouvant interagir avec plusieurs facteurs de transcription et voies de signalisation tel que le récepteur AhR (Schneider *et al.* 2014). Récemment, Al-Dhfyhan *et al.* ont démontré que la voie de signalisation AhR/CYP1A1 contrôle le développement, la maintenance et l'auto-renouveaulement des CSC du cancer du sein *via* les mécanismes PTEN/Akt et β -catenin. Une forte expression des gènes cibles de la voie AhR, *CYP1A1* et *CYP1B1* a été détectée dans les populations CSC comparées aux populations non-CSC. Dans la lignée MCF-7, une activation de la voie AhR/CYP1A1 par son ligand TCDD augmente la présence de marqueurs CSC-spécifiques tels que la formation des mammosphères, l'activité ALDH, le pourcentage des SP.

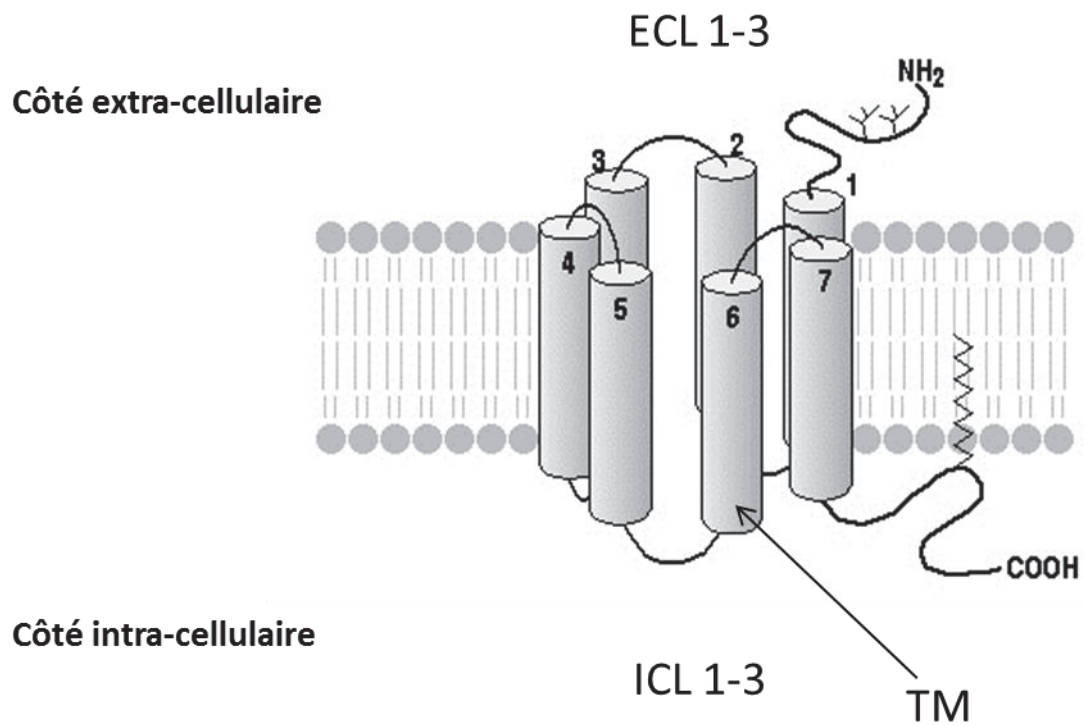
L'inhibition de cette voie permet de diminuer significativement la présence de ces marqueurs et augmente significativement la sensibilité des CSC à l'agent chimiothérapeutique, la doxorubicine. Par ailleurs, l'induction d'AhR/CYP1A1 induit l'expression de la β -catenin et par conséquent la Cyclin D (cible de la β -catenin (Lin *et al.* 2000)) associée à une inhibition de l'expression de PTEN et l'activation de l'expression d'Akt. L'inhibition de la voie PI3K/Akt inhibe l'effet de la TCDD sur les cellules. Tout ceci suggère fortement l'implication d'AhR/CYP1A1 dans la régulation des CSC (Al-Dhfyan *et al.* 2017).

En conclusion, l'activité d'AhR est capable de maintenir les capacités de CSC et par conséquent leur implication dans la cancérogenèse.

1.2 Les récepteurs membranaires

Les récepteurs membranaires sont des protéines membranaires qui servent d'interface de communication entre les cellules et leurs environnements externe et interne. L'une des plus grandes et des plus diversifiées familles de protéines membranaires est celle des récepteurs couplés aux protéines G « GPCR » (G Protein-Coupled Receptors), qui sont codés par plus de 800 gènes (Venkatakrishnan *et al.* 2013). Ces récepteurs sont activés par un large spectre de stimuli, y compris des photons, des ions, des neurotransmetteurs, des lipides, des hormones et des molécules environnementales. Après la liaison du ligand, les GPCR subissent des changements conformationnels, ils se couplent aux protéines G et déclenchent une cascade de transduction de signaux aboutissant à divers processus physiologiques et pathologiques (Venkatakrishnan *et al.* 2013). Les GPCR sont impliqués dans de nombreuses maladies humaines tels que des maladies inflammatoires, les déséquilibres métaboliques, les maladies cardiaques et le cancer (Schlyer *et al.* 2006).

Les GPCR (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) partagent une architecture globale imilaire qui consiste en une partie transmembranaire (TM) canonique formées de sept hélices α (7TM) avec des séquences diverses qui servent de lien de communication entre les ligands et la région de couplage à la protéine G. La partie extracellulaire se compose de trois boucles extracellulaires (ECL1-3) contenant l'extrémité N-terminale. La partie intracellulaire est constituée de trois boucles intracellulaires (ICL1-3) dont l'extrémité C-terminale. Ces similarités structurales indiquent des mécanismes de transduction de signaux similaires entre les différents GPCR (Lu *et al.* 2016).



ECL1-3: Extracellular loop 1-2-3

ICL 1-3: Intracellular loop 1-2-3

TM: Transmembrane

NH₂: N-terminal domain

COOH: C-terminal domain

Figure 12 : Schéma structural des récepteurs membranaires
 (<http://rcpg.chez.com/partie4.html>)

Le récepteur GPR30 est un membre de la famille des GPCR. Ce récepteur est en partie responsable des actions rapides non-génomiques de l'E2 avec qui il possède une haute affinité. En se basant sur cette capacité de liaison, le GPR30 a été renommé comme récepteur d'œstrogène couplé aux protéines G (GPER) (Vrtacnik *et al.* 2014).

1.2.1. Le récepteur GPR30 ou GPER1

Le GPR30 ou GPER1 a été identifié et largement caractérisé par son implication dans la signalisation des œstrogènes (Prossnitz *et al.* 2015). Parmi tous les récepteurs couplés à la protéine G, le GPR30 est le seul récepteur exprimé majoritairement au niveau du reticulum endoplasmique avec également une expression au niveau de la membrane plasmique (Cheng *et al.* 2011). Le récepteur GPR30 s'est avéré être impliqué dans l'activation cellulaire médiée par les œstrogènes dans les cellules qui n'expriment pas les récepteurs nucléaires classiques aux œstrogènes (Filardo *et al.* 2000). Un grand nombre de molécules qui se lient aux ER classiques peuvent également se lier au GPR30. Parmi ces ligands, nous distinguons:

Les œstrogènes et les stéroïdes : Le 17 β -estradiol (E2) se lie au GPR30 avec une forte affinité (6nM), tandis que le 17 α -estradiol ne se lie pas à ce récepteur. En outre, d'autres formes physiologiques d'œstrogènes, comme l'estrone montre une faible affinité pour le GPR30 tandis que d'autres stéroïdes, y compris la progestérone, le cortisol et la testostérone, ne se lient pas au GPR30 (Thomas *et al.* 2005).

Les anti-œstrogènes : il a été démontré que le tamoxifène et l'ICI 182780 utilisés en hormono-thérapie se lient fortement au GPR30 (Thomas *et al.* 2005). Cependant, contrairement aux propriétés antagonistes de ces deux composés sur les récepteurs classiques d'œstrogènes, les deux agissent comme agonistes sur le GPR30 (Filardo *et al.* 2000; Revankar *et al.* 2005).

Les phyto-œstrogènes : La génistéine isoflavone phénolique, trouvée dans les produits de soja, montre une forte affinité et une sélectivité pour ER β mais démontre également une liaison et une activité significative pour GPR30 (Maggiolini *et al.* 2004; Thomas *et al.* 2006). La quercétine trouvée dans les plantes médicinales et la génistéine ont également démontré une régulation positive de l'expression de l'oncogène *c-fos* qui est GPR30-dépendante. En outre, la génistéine joue un rôle dans la phosphorylation d'ERK dans les cellules cancéreuses du sein et la prolifération des

cellules du cancer de la thyroïde via GPR30 (Maggiolini *et al.* 2004; Vivacqua *et al.* 2006).

Les xéno-œstrogènes: L'activité œstrogénique du pesticide dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) est connue depuis longtemps (Tiemann 2008). Les xénoœstrogènes halogénés p,p'-DDT, ortho, para-dichlorodiphényldichloroéthylène (O, p -DDE) et le képone possèdent une affinité, faible mais significative, pour le GPR30. Ils se comportent comme des agonistes pour ce récepteur (Thomas *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2006). Des xénoœstrogènes phénoliques révèlent également une affinité pour GPR30 y compris le BPA et le nonylphénol (Thomas *et al.* 2006). Les pesticides methoxychor et atrazine montrent également une liaison limitée à GPR30 (Thomas *et al.* 2006). L'atrazine induit l'expression de *c-fos* de manière GPR30-dépendante dans les cellules du cancer du sein. Dans les cellules de cancer de l'ovaire, l'atrazine a un effet prolifératif ER- α et GPR30-dépendant (Albanito *et al.* 2008).

1.2.1.1 Les voies de signalisation intracellulaires initiées par le GPR30 favorisent le développement d'un cancer

La localisation du GPR30 dans la membrane favorise le couplage de ce dernier avec des protéines G hétérotrimériques composées des sous-unités Gas et G β/γ (Filardo *et al.* 2000; Thomas *et al.* 2005). Suite à l'activation du GPR30 par un ligand, il adopte une conformation active qui aboutit à un échange de GDP (guanosine diphosphate) par du GTP (guanosine triphosphate) au niveau de la protéine G et à une dissociation de la sous-unité α des sous-unités β/γ . L'activation de la tyrosine kinase Src se fait *via* la sous-unité G β/γ et par conséquent elle enclenche une série d'événements de signalisation intracellulaire (Quinn *et al.* 2009). Quant à la sous-unité Gas, elle va activer l'adénylate cyclase, et par suite elle produit de l'AMPc (Filardo 2002; Kanda *et al.* 2003; Thomas *et al.* 2005; Filardo *et al.* 2007).

L'activation du GPR30 par un ligand stimule des voies de signalisation comportant le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR (Epidermal growth factor receptor), qui appartient à la famille ErbB/HER des récepteurs tyrosine kinase, des voies intracellulaire cruciales comme la voie PI3K /Akt, la voie MAPK/ERK, la mobilisation du calcium, une augmentation de l'AMPc (cyclic adenosine monophosphate) dans les cellules normales et les cellules malignes (Maggiolini *et al.* 2010). La mobilisation du calcium est une réponse très rapide à l'activation du GPR30. Il n'a pas été déterminé ce qui déclenche l'augmentation du

calcium et si la phospholipase C (PLC) est impliquée dans cette augmentation ou pas. Par ailleurs, l'activation de GPR30 déclenche une signature particulière de gènes impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses, la migration et l'angiogenèse (Madeo *et al.* 2010; Maggiolini *et al.* 2010) (**Figure 13**).

1.2.1.1.1 Cross-talk entre GPR30 et les récepteurs ErbB

Les œstrogènes déclenchent la voie de signalisation GPR30-dépendante *via* l'activation de l'EGFR (Filardo *et al.* 2000). À cet égard, Filardo et ses collègues ont démontré que l'activation de la voie MAPK par l'EGFR est protéine G-dépendante. En effet, l'activation de GPR30 entraîne la dislocation de la protéine G β/γ qui va stimuler la tyrosine kinase Src entraînant ainsi l'activation des MMP (Filardo *et al.* 2000). Les MMP vont ensuite libérer l'EGF lié à l'héparine (HB-EGF) (heparin-bound EGF) de la surface cellulaire. L'EGF va alors se lier à son récepteur, l'EGFR, et ainsi activer les voies de signalisation sous-jacentes MAPK et/ou PI3K.

Ce cross-talk entre les œstrogènes et les récepteurs ErbB contribue à la résistance à la thérapie endocrinienne et à la progression du cancer dans les tumeurs sensibles aux hormones, y compris le cancer du sein (Gee *et al.* 2005; Hart *et al.* 2005; Osborne *et al.* 2005). La surexpression de l'EGFR était démontrée comme associée à la résistance au tamoxifène (Giltane *et al.* 2007; Massarweh *et al.* 2008). Ces données suggèrent que l'activation de GPR30 pourrait avoir un impact sur la croissance et la survie des tumeurs mammaires ER- en permettant aux œstrogènes d'activer la voie EGFR (Filardo 2002). De plus, dans des cellules tumorales de l'endomètre ER+ et dans des cellules du cancer du sein résistantes au tamoxifène, l'activation de l'EGFR est également régulée par GPR30 (Vivacqua *et al.* 2009). Ces données peuvent suggérer que l'EGFR pourrait aussi contribuer à l'échec de la thérapie au tamoxifène par la régulation de GPR30, ce qui facilite l'action des œstrogènes. En outre, A. Ignatov *et al.* ont montré que les taux de GPR30 ont été significativement augmentés chez les patientes atteintes d'un cancer du sein résistant au tamoxifène avec une réduction du temps de survie (Ignatov *et al.* 2011). Conformément à ces observations, les œstrogènes ont stimulé les effets de prolifération chez les cellules du cancer du sein ER+ résistantes au tamoxifène grâce à une augmentation de l'expression de GPR30 et à l'activation d'EGFR médiée par GPR30 (Ignatov *et al.* 2010) (**Figure 13**).

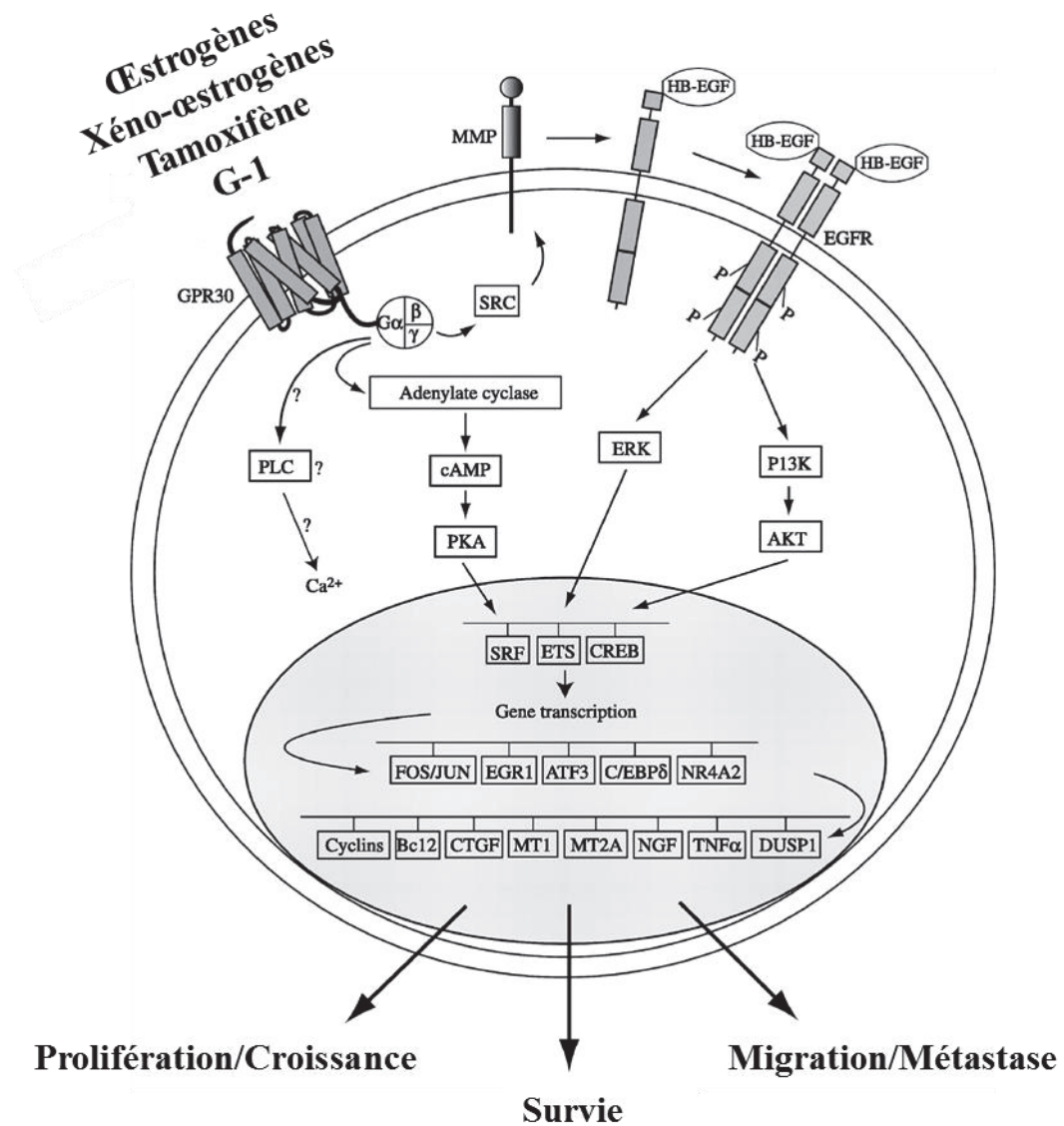


Figure 13 : Les voies de signalisation activées par GPR30 (Maggiolini *et al.* 2010).

1.2.1.1.2 **L'activation des kinases par GPR30**

Filardo *et al.* ont démontré que l'activation de la voie ERK (MAPK) par GPR30 se fait *via* l'activation de l'EGFR (Filardo *et al.* 2000). Pour la voie PI3K, les œstrogènes stimulent la voie PI3K dans les cellules exprimant soit ER- α soit GPR30; un inhibiteur de PI3K en inhibant la voie PI3K révèle la capacité des deux récepteurs à médier cette voie. En outre, l'inhibiteur d'EGFR (AG1478) bloque l'activation de PI3K médiée par GPR30 mais pas par ER- α démontrant que l'activation de PI3K par les œstrogènes se fait selon deux voies différentes en fonction du récepteur utilisé. De manière intéressante, la stimulation de la voie PI3K par le 4-hydroxytamoxifène entraîne une activation de PI3K dans des cellules exprimant le GPR30 mais pas dans des cellules exprimant l'ER (Revankar *et al.* 2005).

La voie MAPK activée par la famille ErbB conduit à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire, et l'angiogenèse (Olayioye *et al.* 2000; Yarden *et al.* 2001). La voie PI3K/Akt intervient également dans les mêmes processus cellulaires mais cette voie est surtout connue dans les mécanismes de survie cellulaire (Engelman *et al.* 2006). En conséquence, la dérégulation de la signalisation d'ErbB est implicitement impliquée dans la croissance tumorale et le développement métastatique. De plus, cette dérégulation est associée à une mauvaise réponse à la thérapie endocrinienne et à une survie réduite des patientes (Holbro *et al.* 2004; Roskoski 2004).

En conclusion, l'activation des kinases ERK (MAPK) et/ou PI3K médiée par GPR30 se produit par l'activation de l'EGFR (Prossnitz *et al.* 2009).

1.2.1.1.3 **La production de l'AMPc**

Les œstrogènes ont la capacité d'activer la production d'AMPc *via* GPR30 dans les cellules du cancer du sein SKBR3 qui n'expriment ni ER α ni ER β . Cette production d'AMPc peut être liée à l'activité du GPR30 (Filardo *et al.* 2002; Thomas *et al.* 2005; Filardo *et al.* 2007). En effet, l'activation du GPR30 entraîne la dislocation de la protéine Gas qui va stimuler l'adénylate cyclase entraînant ainsi la production d'AMPc. L'AMPc va alors inhiber l'oncogène Raf-1 qui à son tour va diminuer l'activité MAPK (Filardo *et al.* 2002). Ces résultats suggèrent que les œstrogènes sont capables à la fois d'activer et d'inhiber l'activité MAPK suggérant ainsi l'existence d'une auto-régulation de cette voie à travers GPR30. Par ailleurs, des études antérieures ont également montré que de nombreux phyto- et xéno-

œstrogènes peuvent également stimuler la production d'AMPc *via* GPR30 (Thomas *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2006).

1.2.1.1.4 **Transcription de gènes médiée par la voie GPR30-dépendante**

La signalisation des événements médiés par GPR30 peut conduire à l'activation de la machinerie transcriptionnelle. Dans ce contexte, Kanda et Watanabe ont démontré que l'E2 est capable d'induire l'expression du *c-fos* par l'AMPc dans les macrophages *via* GPR30 (Kanda *et al.* 2003). Les mêmes auteurs ont démontré que l'E2 induit, également *via* GPR30, l'expression de la *cycline D2* (impliquée dans la prolifération) et de *Bcl-2* (impliqué dans la survie cellulaire) *via* la kinase A qui induit à son tour la phosphorylation de CREB (C-AMP Response Element-binding protein) dans les kératinocytes (Kanda *et al.* 2003; Kanda *et al.* 2004). Ceci a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action des œstrogènes par des voies indépendantes de l'ER telle que la voie GPR30-dépendante (**Figure 7**). Dans les cellules SKBR3, la stimulation du GPR30 soit par des œstrogènes soit par le tamoxifène entraîne l'induction d'un certain nombre de gènes tels que les *CTFG* (Connective Tissue Growth Factor), l'*EGR1* (early growth response-1), l'*ATF3* (Activating transcription factor 3), *FOS*, et *TNF* (tumor necrosis factor) qui contribuent à la prolifération et la migration cellulaire. Ce même résultat a été obtenu en traitant les fibroblastes obtenus à partir de biopsies de tumeur du sein avec le tamoxifène (Pandey *et al.* 2009).

Il a été démontré que dans les cellules de cancer du sein MCF7 (ER+) et les SKBR3 (ER-) l'expression de l'oncogène *c-fos* est également médiée par la voie GPR30-dépendante activée par l'E2 (Maggiolini *et al.* 2004). Cette étude a révélé que la signalisation de GPR30 nécessite l'EGFR et se manifeste par une phosphorylation ERK1/2 pour déclencher la réponse génomique aux œstrogènes, notamment dans les cellules tumorales dépourvues d'ER (Maggiolini *et al.* 2004). De plus l'E2, la génistéine et le tamoxifène induisent l'expression de *c-fos* à travers la voie de signalisation GPR30/ EGFR /ERK qui induise la prolifération cellulaire dans plusieurs types de cellules cancéreuses dont des cellules tumorales thyroïdiennes dépourvues de ER ou des cellules exprimant une variante transcriptionnellement inactive de l'ER (Vivacqua *et al.* 2006). Par ailleurs, le G1 agoniste chimique sélective du GPR30, induit *c-fos*, la *cycline A*, *D1* et *E*; alors qu'il n'induit pas l'expression du gène cible de l'ER, le *PR*, qui répond seulement à l'E2 et cela a été confirmé dans les cellules SKBR3 (ER-, GPR30+) (Albanito *et al.* 2007). Ceci montre la sélectivité de G1 pour GPR30. D'autre part, il a été démontré que le BPA induit l'expression des gènes

cibles de GPR30 ainsi que la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein et des fibroblastes associés aux cellules cancéreuses CAF (Cancer Associated Fibroblasts) (Albanito *et al.* 2008; Pupo *et al.* 2012).

Ces résultats suggèrent des rôles possibles de GPR30 dans le développement de métastases du cancer du sein et dans la résistance aux anti-œstrogènes.

1.2.1.1.5 **Cross talk entre GPR30 et IGF-IR (Insulin-like growth factor-I Receptor)**

L'expression élevée de l'IGF-IR est associée à de multiples caractéristiques biologiques de la progression tumorale, tels que le développement des métastases et la résistance aux chimiothérapies (Knowlden *et al.* 2008). L'interaction entre la voie du récepteur IGF-IR et la signalisation médiée par GPR30 est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques et dans divers cancers (Kisfalvi *et al.* 2009; Young *et al.* 2010). En effet, la coopération entre l'IGF-I et les agonistes de GPR30 favorise la réplication de l'ADN, la prolifération et la croissance indépendante de l'ancrage dans les cellules pancréatiques tumorales (Kisfalvi *et al.* 2009). Il a également été démontré que l'association physique entre IGF-IR et la protéine G contribue à la migration des cellules cancéreuses du sein (Akekawatchai *et al.* 2005). Par ailleurs, les ligands d'IGF-IR induisent la phosphorylation du récepteur et le recrutement de nombreuses protéines dont les membres de la famille IRS (Insulin receptor substrate) (IRS-1, IRS-2) et les molécules adaptatrices comme SHC et Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (White 1998). Ces nombreuses protéines sont connues pour être impliquées dans l'activation des voies de transduction comme les voies MAPK et PI3K qui aboutissent à la survie, la prolifération cellulaire, et l'inhibition de l'apoptose (Belfiore *et al.* 2008; Bartella *et al.* 2012).

Dans les cellules du cancer du sein ER- α +, il a été démontré que l'IGF-I est capable de réguler l'expression et la fonction de GPR30 à travers la voie de signalisation IGF-IR/PKC/MAPK (**Figure 14**). De plus, l'inhibition des niveaux protéiques du GPR30 induits par l'IGF-I et l'inactivation de son promoteur par un inhibiteur d'ER- α (ICI 182 780) suggèrent que l'ER est également impliqué dans ce cross-talk (De Marco *et al.* 2013). L'activation de GPR30 *via* l'IGF-IR est impliqué à la fois dans la migration cellulaire grâce à son gène cible CTGF et à la fois dans la prolifération cellulaire grâce à l'activation de la cycline D1 (De Marco *et al.* 2013).

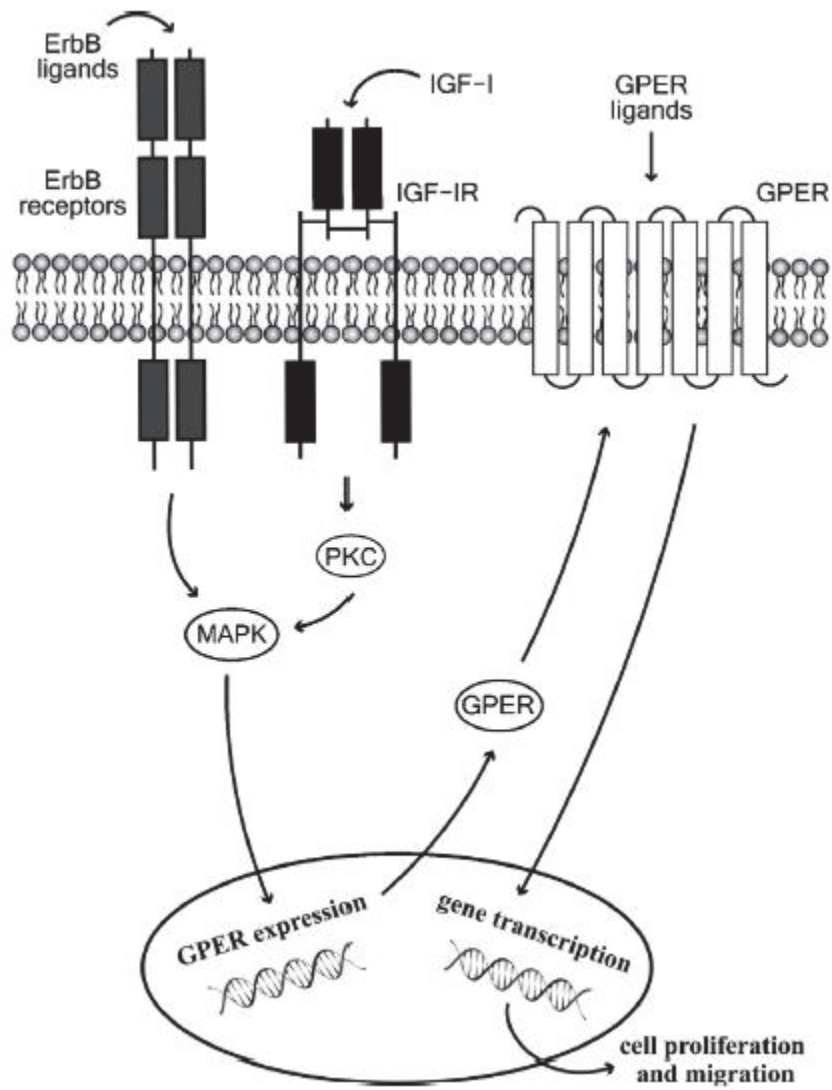


Figure 14 : Cross-talk entre GPR30 et les récepteurs ErbB et IGF-IR (Lappano et al. 2013)

En plus de GPR30, l'IGF-IR agit également sur la signalisation et les réponses biologiques médiées par d'autres protéines membranaires comme l'EGFR (van der Veecken *et al.* 2009). Par exemple, des études *in vitro* et *in vivo* ont indiqués que les interactions entre IGF-IR et EGFR peuvent conduire à la résistance aux molécules qui ciblent EGFR et par conséquent avoir des implications pertinentes dans les thérapies anti-cancéreuses (Knowlden *et al.* 2005; Jones *et al.* 2006).

1.2.1.2 GPR30: biomarqueur du cancer

GPR30 semble être impliqué dans les mécanismes cellulaires de nombreuses lignées cancéreuses telles que les cellules de cancer du sein MCF7 et SKBR3, les cellules cancéreuses de l'endomètre Hec1A et Hec50, les cellules JEG du chorio-carcinome, les cellules du cancer de l'ovaire BG-1 (Carmeci *et al.* 1997; Filardo *et al.* 2000; Revankar *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2005; Vivacqua *et al.* 2006; Albanito *et al.* 2007). De plus, il a été démontré que GPR30 est exprimé dans des cancers primitifs tels que le cancer du sein et de l'endomètre (Filardo *et al.* 2006; Smith *et al.* 2007). D'un point de vue fonctionnel, nous avons vu que GPR30 est capable d'induire l'expression de gènes non seulement impliqués dans la prolifération, mais également dans la survie et la migration cellulaire. Tout ceci suggère fortement que l'expression et/ou l'activation de GPR30 peut jouer un rôle majeur dans le processus de la cancérogenèse.

Plusieurs études ont d'ailleurs mis en avant l'utilisation de GPR30 comme un biomarqueur du cancer. En effet, dans une cohorte de 361 tumeurs du sein, une surexpression de GPR30 a été positivement corrélée à la taille de la tumeur, à la présence de métastases et à la surexpression de HER-2/ neu. De même chez les patientes atteintes de cancer du sein résistant au tamoxifène, les niveaux de GPR30 ont été significativement augmentés avec une réduction marquée du taux de survie (Ignatov *et al.* 2011). Cette étude laisse entrevoir l'utilisation de GPR30 comme un indicateur d'agressivité du cancer du sein (Filardo *et al.* 2006). Dans une autre étude, de fort niveaux d'expression de GPR30 ont été corrélés avec un phénotype plus agressif des tumeurs ovariennes associés à de faibles taux de survie (Smith *et al.* 2009).

In silico, Yang *et al.*, ont montré qu'une forte expression de GPR30 est corrélée à une diminution des taux de survie sans récurrence dans les cancers du sein du type HER2+. Cependant, dans les cancers du type HER2- cette expression est associée à une augmentation des taux de survie sans métastases et sans récurrence. Par ailleurs, une

surexpression d'HER2 dans les cellules MDA-MB231 (ER-) aboutit à une augmentation de l'expression de GPR30, cette induction pourrait en partie expliquer l'effet cancérigène de GPR30 dans les tumeurs HER2+. Ces résultats suggèrent que les valeurs pronostiques de l'expression du GPR30 diffèrent entre les tumeurs HER2 positives et HER2 négatives (Yang *et al.* 2016).

Enfin, Fahlén *et al.* ont également démontré qu'une forte expression de GPR30 est retrouvée dans les tumeurs malignes du sein contrairement aux tumeurs bénignes. Ceci démontre une fois de plus l'implication du GPR30 dans le cancer du sein et son utilisation potentielle en tant que biomarqueur (Fahlen *et al.* 2016).

D. Un perturbateur endocrinien: Le Bisphenol A (BPA)

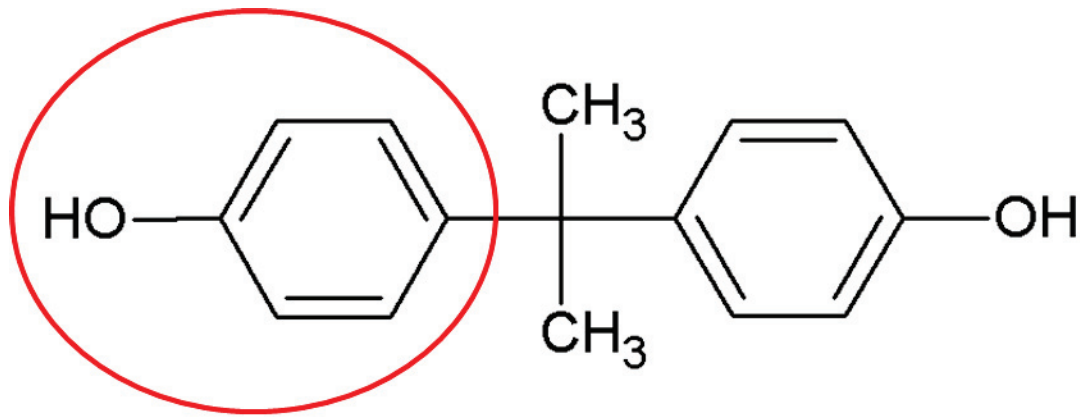
Le BPA est un monomère synthétique utilisé dans la production des plastiques en polycarbonate, les revêtements de boîtes de conserve en résine époxyde, les bouteilles de boissons, les biberons, les produits dentaires, le papier thermique etc... Cette molécule est également retrouvée dans l'environnement. En effet, l'EPA (Environmental Protection Agency) a estimé qu'aux Etats-Unis plus d'un million de tonnes de BPA sont dispersés chaque année dans l'environnement. Par conséquent, plus de 90% des Hommes testés ont montré dans leurs systèmes des niveaux détectables de BPA avec des niveaux encore plus élevés retrouvés chez les nourrissons et les enfants (Kuroda *et al.* 2003; Calafat *et al.* 2005). Le BPA est un PE ayant des propriétés œstrogéniques. Il est métabolisé dans le foie par glucuronidation via les enzymes UDP-glucuronosyl-transférases qui produisent le principal métabolite du BPA: le BPA-glucuronide qui possède une activité œstrogénique plus réduite (Vandenberg *et al.*, 2009).

La forte présence du BPA dans l'environnement, semble être concomitante à la prévalence accrue des cancers hormono-dépendants, d'où les nombreuses études évaluant le rôle du BPA dans la cancérogenèse, surtout la cancérogenèse mammaire.

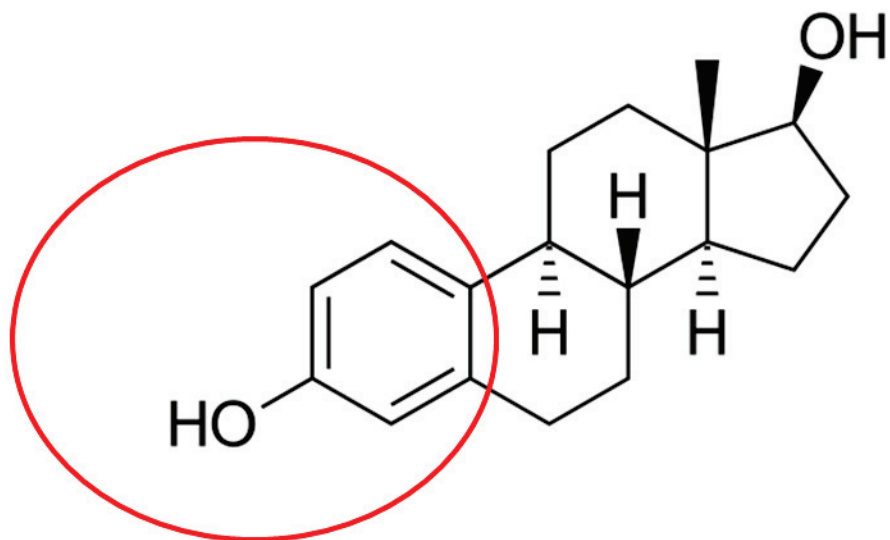
1. Implication du BPA dans le cancer

1.1 Activité œstrogénique du BPA

La structure chimique du BPA ressemble à celle de l'œstradiol avec la présence du groupement aromatique hydroxyle (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe compatible avec la poche de liaison hydrophobe des ERs (Brzozowski *et al.* 1997) (**Figure 15**). Le BPA possède deux groupements aromatiques hydroxyles capables d'interagir avec ER qui lui confèrent des propriétés œstrogéniques. Ces propriétés sont également renforcées par la présence de deux groupements méthyles. En effet, une étude a démontré qu'une substitution de ces groupements méthyles par des groupements hydrophiles induit une diminution de la force d'interaction avec la partie hydrophobe du récepteur et par conséquent une diminution de l'activité œstrogénique (Kitamura *et al.* 2005).



Structure du Bisphenol A



Structure de l'œstradiol

Figure 15 : Structure chimique du Bisphenol A comparée à celle de l'œstradiol

Le BPA possède une activité œstrogénique induisant la prolifération en se liant aux récepteurs nucléaires ER mais également aux récepteurs membranaires aux œstrogènes mER (membrane-bound ER) et GPR30 avec une affinité beaucoup plus importante pour les récepteurs membranaires (**Figure 16**) (Kuiper *et al.* 1998; Thomas *et al.* 2006; Vandenberg *et al.* 2009; Rezg *et al.* 2014). Des études de liaison ligand-récepteur ont identifié que le BPA est capable de se lier à ER- α et à ER- β avec une affinité de liaison dix fois plus forte pour ER- α que pour ER- β . Néanmoins, cette affinité reste 2000 fois inférieure à celle de l'E2 (Kuiper *et al.* 1997). De la même manière que les œstrogènes, le BPA influe sur les voies génomiques et non-génomiques. En effet, il a été démontré que le BPA utilisé à des doses de 10^{-12} M induit l'augmentation du calcium intracellulaire, la sécrétion de la prolactine ainsi que la phosphorylation des ERK grâce à son interaction avec les mER (Watson *et al.* 2007). De plus, une étude montre que le BPA est capable d'activer et d'induire la voie de signalisation GPR30-dépendante en se liant à GPR30 (Thomas *et al.* 2006). La capacité du BPA à se lier aux récepteurs membranaires et à activer les voies non-génomiques pourrait expliquer ses effets rapides même à faibles doses (Talsness *et al.* 2009).

Le BPA agit sur différentes voies de signalisation et dans différents types cellulaires. Par exemple, le BPA induit la prolifération cellulaire et la migration *via* la voie GPR30/EGFR/ERK dans les cellules ER- et SKBR3 (Pupo *et al.* 2012). Récemment, une étude a montré que le BPA augmente l'expression de *HOXB9*. Cette protéine est impliquée directement dans le développement de la glande mammaire et est associée au cancer *via* l'ER de façon ERE-dépendante (estrogen-response-elements) *in vitro* et *in vivo* dans les glandes mammaires des rates ovariectomisées. En présence du BPA, ER et ses régulateurs, telles que les histones méthylases et acétylases, se lient au promoteur ERE de *HOXB9*, modifient la chromatine et induisent l'activation du gène (Deb *et al.* 2016). A une dose de 10^{-9} M, le BPA est capable de stimuler la prolifération des cellules de cancer de la prostate (LNCaP) (Vandenberg *et al.* 2009). A des doses de 10^{-9} à 10^{-12} M, le BPA a un effet prolifératif sur les cellules de cancer du testicule (JKT-1) en activant les voies de signalisation impliquant les kinases PKA et PKG via le récepteur GPR30 (Bouskine *et al.* 2009). Ainsi, par ses effets œstrogéniques, le BPA joue un rôle dans le développement du cancer du sein en se liant à divers récepteurs œstrogène-dépendants. Dans les MCF7, le BPA se lie sur les ER (α et β) exerce ses effets œstrogéniques et induit la prolifération cellulaire en modulant les protéines associés au cycle cellulaire les CDK1 / 2 et l'activité de la p38 MAPK (Lee *et al.* 2014). Après une courte exposition de 24 heures le BPA à faible dose de 10^{-9} M induit

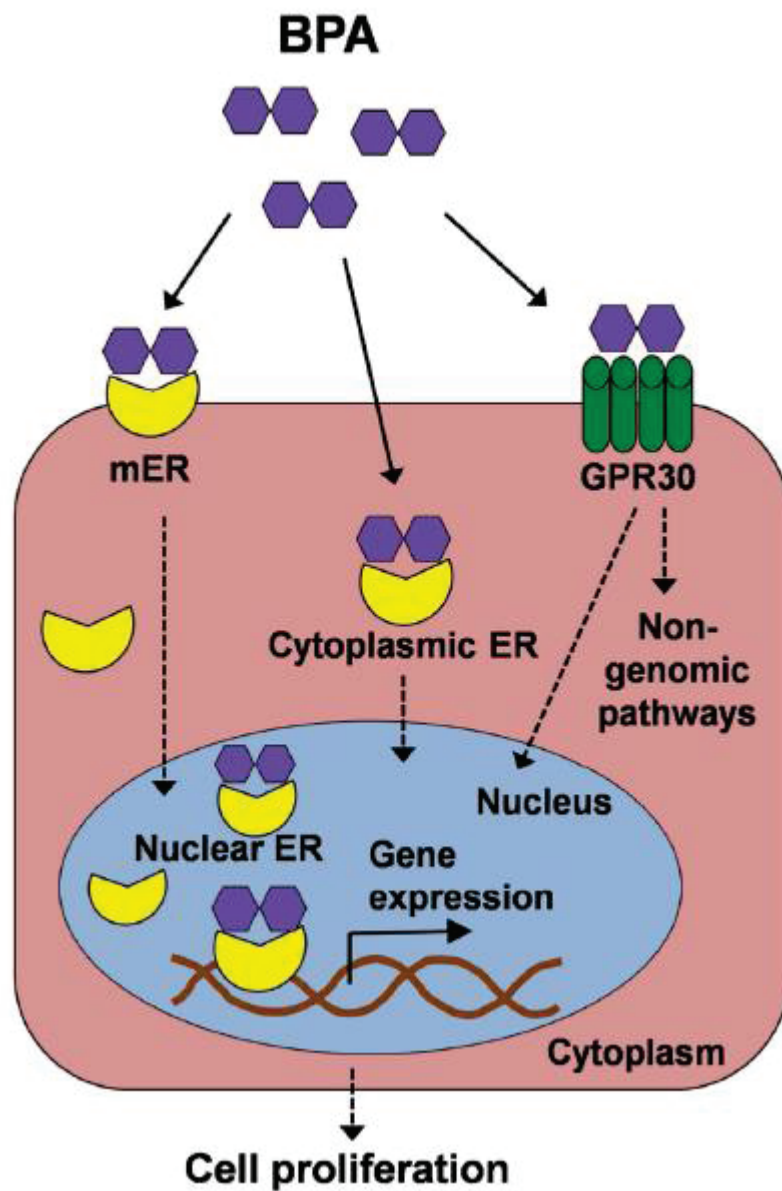


Figure 16 : Activité œstrogénique du BPA *via* les différents récepteurs cellulaires (Wang *et al.* 2017).

l'augmentation du niveau d'ARNm d'ER- α et des niveaux d'expressions protéique de la cycline D1 et de la cycline A2 (Mlynarcikova *et al.* 2013). Le BPA contribue également à la prolifération des cellules MCF7 de manière STAT3-dépendante (joue un rôle dans la mitose et la croissance cellulaire) (Zhang *et al.* 2012).

En plus des voies œstrogène-dépendantes, le BPA interagit également avec les récepteurs aux androgènes et les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Wetherill *et al.* 2007).

1.2 L'effet du BPA sur le microenvironnement de la glande mammaire

Le microenvironnement du sein qui entoure les structures épithéliales, est formé de la MEC, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des adipocytes, des cellules immunitaires et des cytokines (Polyak *et al.* 2010). Le BPA peut influencer le microenvironnement de la glande mammaire en exerçant des effets sur les composants de la MEC et sur sa densité, ainsi que sur les cellules stromales et les cellules immunitaires (**Figure 17**). Une réduction de l'expression des composants de la MEC et une diminution de la densité des fibres de collagène ont été observées dans le compartiment stromal des glandes mammaires des fœtus de souris exposées au BPA (Vandenberg *et al.* 2007; Wadia *et al.* 2013). Le BPA affecte la différenciation et la maturation des adipocytes qui produisent les adipokines responsables du développement de la glande mammaire (Vandenberg *et al.* 2007; Chamorro-Garcia *et al.* 2012). Les changements dans la MEC et dans le développement de la graisse perturbent les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules stromales, entraînant une altération du phénotype épithélial mammaire et des lésions néoplasiques. Par ailleurs, le BPA exerce des effets cancérogènes en perturbant les cellules immunitaires (Casey *et al.* 2015). De faibles doses de BPA activent la production des chemokines et de la cytokine IL-10 (Interleukin 10) aboutissant à des réponses allergiques (Guo *et al.* 2010). Ils stimulent également la sécrétion de plusieurs cytokines dans les macrophages de souris en influençant leurs fonctions immunitaires (Yamashita *et al.* 2005). De plus, une étude a révélé un rôle du BPA dans l'augmentation de la sécrétion du BMP (Bone Morphogenic Protein) en présence de l'IL-6, aboutissant à l'initiation de la transformation des cellules souches mammaires (Chapellier *et al.* 2015). De manière intéressante, le BPA semble stimuler la sécrétion des cytokines par le tissu adipeux. Ainsi, l'accumulation du BPA dans le tissu adipeux du sein induit un microenvironnement immunosuppresseur qui favorise l'émergence et la progression d'un cancer.

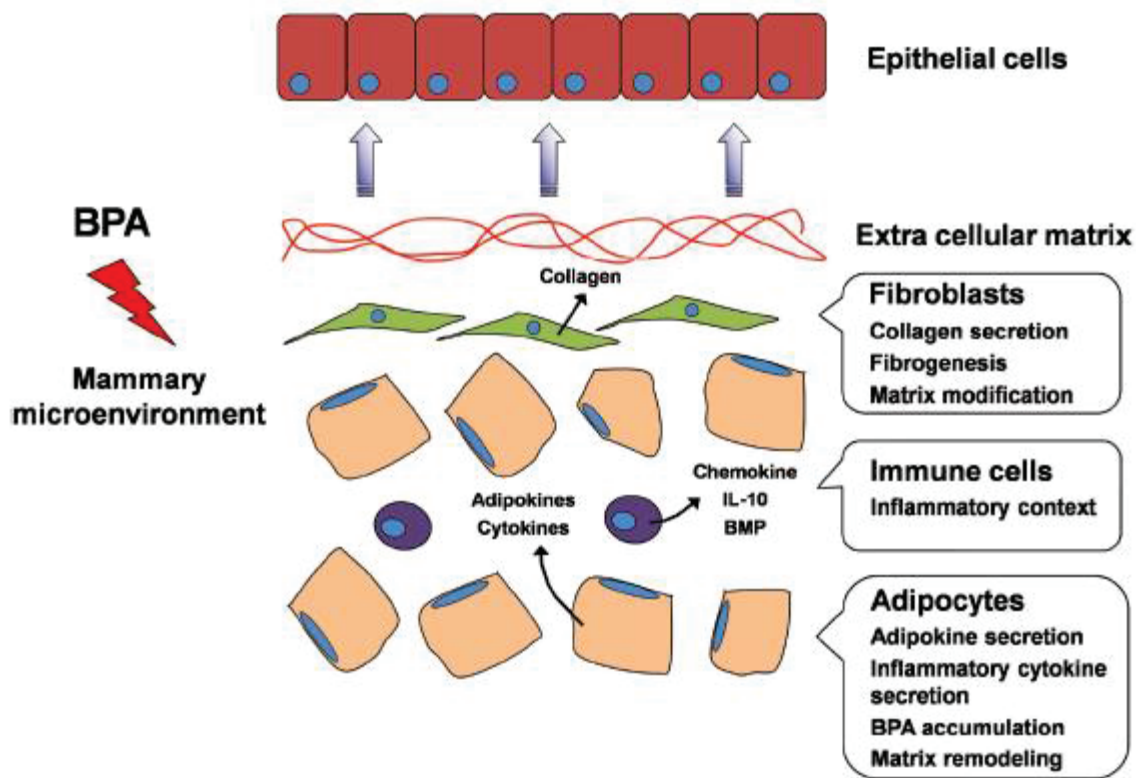


Figure 17 : Les effets du BPA sur le microenvironnement des cellules épithéliales mammaires (Wang *et al.* 2017)

1.3 Effet du BPA sur la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire est un événement à régulation hormonale. Plusieurs facteurs peuvent déréguler sa croissance et rendre la glande mammaire plus sensible à la transformation cellulaire. Parmi ces facteurs, l'exposition périnatale aux xénoœstrogènes comporte un risque accru de développer un cancer du sein. Récemment Gomez *et al.*, ont exposés des rates gestantes au BPA par voie orale pendant leur période gestationnelle. Leurs descendantes ont été ovariectomisées et traitées à l'E2 pour trois mois afin de voir l'effet d'un traitement hormonal substitutif aux œstrogènes après une exposition périnatale au BPA sur la glande mammaire. Après 3 mois de traitement, les descendantes ont développé une forte hyperplasie ductale et lobulaire comparées à celles qui ont subi le traitement substitutif seul (Gomez *et al.* 2017). En conclusion, l'exposition périnatale au BPA augmente la susceptibilité de la glande mammaire à développer des lésions hyperplasiques lorsqu'elles sont confrontées à un traitement hormonal plus tard dans la vie.

De même, Mandrup *et al.* ont trouvé qu'une exposition périnatale à de faibles doses de BPA induit une augmentation de la croissance de la glande mammaire chez les descendants mâles et une hyperplasie intraductale chez les descendantes femelles. L'hyperplasie intraductale observée chez les rates pourrait être associée à un risque accru de développer des lésions hyperplasiques, qui sont parallèles aux premiers signes de néoplasie mammaire chez les femmes (Mandrup *et al.* 2016).

Finalement, les connaissances actuelles sur les effets du BPA à faibles doses sur la glande mammaire indiquent que les Hommes ne sont pas suffisamment protégés de cette exposition par rapport aux risques qu'ils ont de développer un cancer du sein.

1.4 Les effets épigénétiques du BPA

Des études indiquent que la régulation épigénétique est un mécanisme crucial dans les effets cancérogènes du BPA. Le traitement par de faibles doses de BPA aboutit à une augmentation de l'expression de l'histone méthyltransferase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) qui participe à la méthylation de l'ADN et donc à la répression transcriptionnelle dans les cellules cancéreuses du sein (Doherty *et al.* 2010). De même, une exposition à de faibles doses de BPA induit une augmentation de la méthylation de l'ADN dans les régions promotrices des *LAMP3* (lysosomal-associated membrane protein 3) et donc une diminution de son expression dans les cellules épithéliales primaires et les cellules cancéreuses du sein (Weng *et al.* 2010). *LAMP3* est connu pour son rôle dans l'immunité adaptative. Par ailleurs,

il a été suggéré que les changements induits par le BPA dans les niveaux d'expression des miRNA dans les cellules placentaires pourrait expliquer l'effet du BPA sur la glande mammaire après une exposition périnatale (Avissar-Whiting *et al.* 2010). De plus, les effets épigénétiques observés après une exposition au BPA des cellules de l'hypothalamus, qui contrôlent les niveaux d'hormones ovariennes, pourrait également contribuer aux effets néfastes du BPA sur le développement de la glande mammaire (Warita *et al.* 2013). Une autre étude a démontré que le BPA pourrait provoquer de nombreux changements de méthylation au niveau de l'ADN génomique en augmentant les niveaux de l'histone méthyltransférase dans le promoteur de l'alpha-lactalbumine dans les glandes mammaires de rates néonatales (Dhimolea *et al.* 2014).

Les changements épigénétiques à grande échelle liés à l'exposition au BPA peuvent conduire à des modifications au niveau de l'expression des gènes, des hyperplasies intraductales, et par conséquent des carcinomes canauxiaux *in situ* chez les adultes.

1.5 BPA et cellules souches

Une étude a montré que le BPA, à des doses aussi faibles que 1 nM, est capable d'altérer la différenciation précoce des cellules souches embryonnaires hESC (Human embryonic stem cells) en cellules épithéliales mammaires. Les effets néfastes du BPA sur la différenciation des hESC se sont manifestés par des niveaux accrus de marqueurs moléculaires de pluripotence (Nanog et Oct4) ainsi que des niveaux réduits de marqueur des cellules épithéliales mammaires (E-cadhérine). De plus, ces modifications semblent avoir un rôle de promoteur du cancer dans les cellules épithéliales mammaires (Yang *et al.* 2013). Une autre étude indique qu'un retard de maturation des alvéoles et une modification dans la composition des protéines de lait ont été trouvés chez des rats exposés périnatalement au BPA suggérant ainsi que le BPA a le potentiel d'affecter la différenciation des cellules souches mammaires MaSCs (Mammary stem cells) (Altamirano *et al.* 2015). En complément, Wang et ses collègues ont également constaté que le BPA administré à une faible dose orale quotidienne modifie la fonction des MaSC dérivés de souris adultes et est associé à un profil génétique de lésions néoplasiques précoces. *In vivo*, la transplantation de MaSC préalablement exposées au BPA dans le tissu graisseux du sein provoque une hyperplasie canalaire dans les glandes régénérées. Ainsi, les modifications générées par le BPA sur les MaSC ou sur les cellules progénitrices contribuent fortement à la carcinogenèse mammaire (Wang *et al.* 2014).

Par ailleurs, des cellules MCF-7 (ER-) traitées avec des doses physiologiques de BPA (10 nM) acquièrent l'expression d'un marqueur spécifique aux cellules souches, ALDH1, et une augmentation de la capacité à former des mammosphères de plus grandes tailles (Lillo *et al.* 2017). Ces effets n'ont pas été observés chez les MDA-MB-231 (ER-). D'un point de vue mécanistique dans les mammosphères des MCF-7, l'effet du BPA passe par la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) qui va alors se lier à l'activateur de *SOX2* (marqueur moléculaire de pluripotence) et ainsi induire son expression ARNm et protéine. Cette étude suggère que cette signalisation est médiée par les récepteurs non-classiques aux œstrogènes les mER. En conclusion, des doses physiologiques de BPA renforcent les cellules cancéreuses ER+ en stimulant leur activité stem-like par la régulation de la transcription de *SOX2* (Lillo *et al.* 2017).

1.6 Le BPA et son implication dans la progression du cancer et la métastase

De nombreuses études sur les animaux ont démontré que l'exposition prénatale au BPA provoque une perturbation du tissu mammaire et augmente la sensibilité au cancer du sein (pour revue (Rochester 2013)). Le BPA est également associé au processus de l'EMT et de la progression tumorale. En effet, Kim *et al.* ont démontré que le BPA a le potentiel d'induire le développement métastatique du cancer de l'ovaire en régulant les marqueurs de l'EMT et de la migration de manière ER-dépendante tout en réprimant l'E-cadhérine d'une part et en activant en activant Snail, la vimentine et la MMP-9 d'autre part (Kim *et al.* 2015). Le BPA à une dose environnementale (10^{-8} M) promeut la migration des cellules épithéliales normales du côlon (NCM460) en activant la voie de signalisation ER β /integrin β 1/MMP-9 suggérant que la présence du BPA dans le colon pourrait être un risque potentiel de cancer (Shi *et al.* 2016). Dans les cancers du sein ER-, le BPA est également impliqué dans la stimulation de l'EMT et dans l'augmentation du risque métastatique. Par exemple, *in vitro* dans les cellules SKBr3, le BPA à 10^{-8} M réprime FOXA1, dont la répression est essentielle pour l'induction de l'EMT, via l'activation de la voie PI3K/AKT et donc stimule la mobilité cellulaire de l'EMT (Song *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2015). De plus, l'effet du BPA est retrouvé dans les cellules cancéreuses de l'endomètre et dans les cellules cancéreuses colorectales en induisant (1) l'expression du gène *COX-2* par l'activation de la voie MAPK et (2) l'expression de la N-cadhérine et le facteur de transcription Snail par la voie AKT. (Chen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015). Une exposition chronique de 60 jours à de faibles doses au BPA (10^{-10} M) promeut la différenciation cellulaire des cellules épithéliales mammaires MCF10A vers un phénotype

myoépithélial. Ceci implique la voie de signalisation BMP via la phosphorylation des SMAD (Clement *et al.* 2017).

En conclusion, les effets du BPA médiés par ses récepteurs ($ER\alpha$, $ER\beta$, mER et GPR30) peuvent agir non seulement sur la prolifération cellulaire et la différenciation des cellules souches mais peuvent également induire des altérations épigénétiques et microenvironnementales de la glande mammaire promouvant ainsi la cancérogenèse mammaire (**Figure 18**).

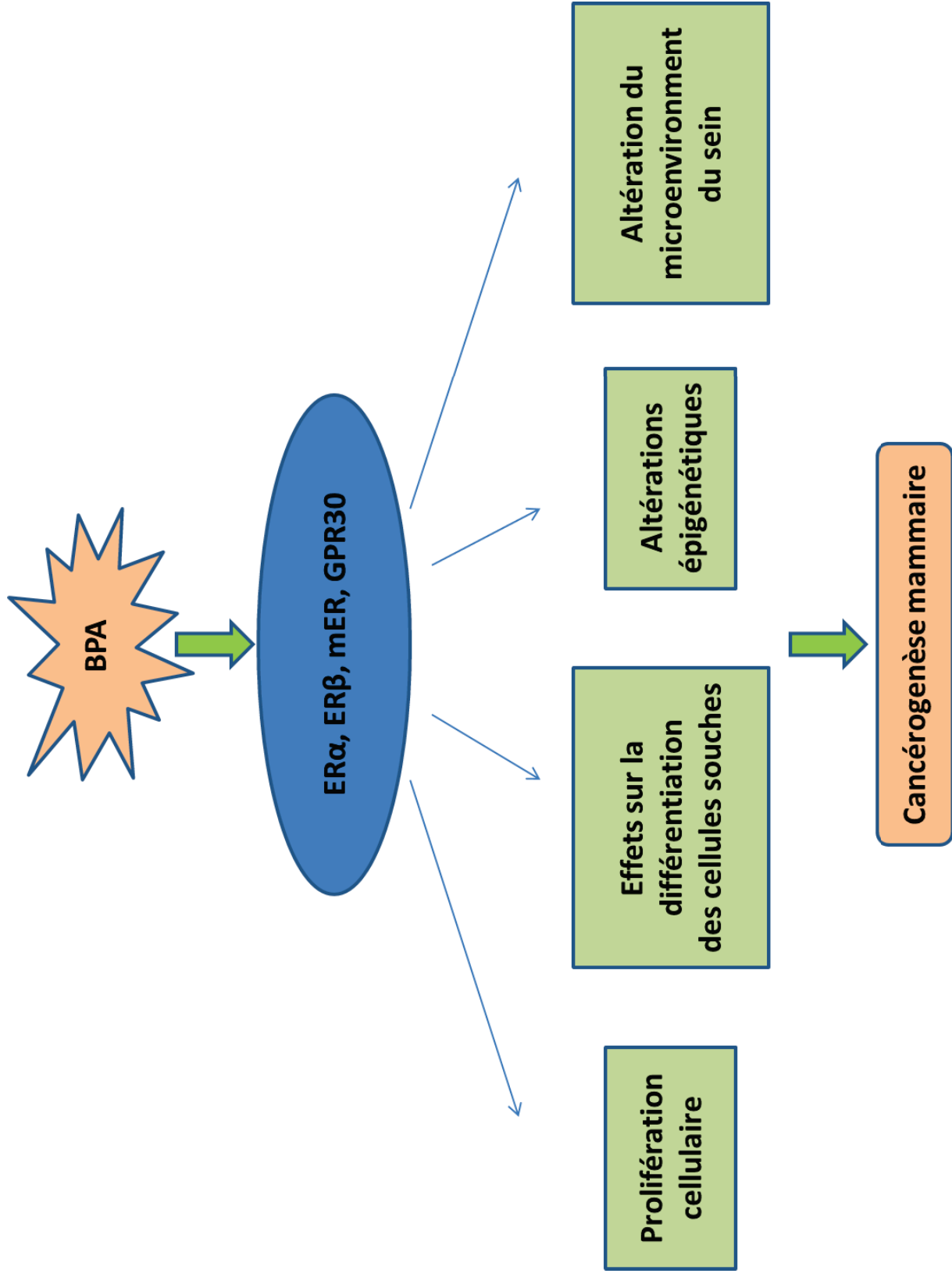


Figure 18 : Les effets du BPA sur la glande mammaire

E. Un hydrocarbure aromatique polycyclique : Le Benzo[a]pyrène (B[a]P)

Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est une molécule génotoxique pro-cancérogène trouvée dans la fumée de cigarette, les aliments cuits et diverses combustions des gaz, tels que les gaz d'échappements de véhicules (Gelboin 1980; Hecht 2002). Le B[a]P a été classé en 2010 comme un cancérogène pour l'Homme (IARC 2010). Le B[a]P est une molécule lipophile, capable de pénétrer dans le cytoplasme à travers la membrane et de s'accumuler dans divers organes (Sureau *et al.* 1990).

1. Le métabolisme du B[a]P

Le B[a]P est métabolisé dans le foie par les enzymes de la phase I et de la phase II.

Ces métabolites sont des cancérogènes, qui sont hautement réactifs et capables de former des adduits sur l'ADN par liaisons covalentes (Sims *et al.* 1974; Kapitulnik *et al.* 1978; Gelboin 1980). Le B[a]P se lie au récepteur nucléaire AhR qui est localisé dans le cytoplasme (Shimizu *et al.* 2000). Cette interaction provoque l'activation d'AhR qui se transloque dans le noyau et se lie aux éléments de réponse aux xénobiotiques des promoteurs des gènes cibles CYP1A1 et CYP1B1 pour induire leur expression (Fujii-Kuriyama *et al.* 2005; Ramadoss *et al.* 2005) (**Figure 19**). Les enzymes métaboliques CYP1A1 et CYP1B1 sont impliquées dans la phase I du métabolisme du B[a]P (Schrenk 1998). En effet, CYP1A1 et CYP1B1 transforment, grâce à des mécanismes complexes, le B[a]P en plusieurs métabolites. Ces différents métabolites passent ensuite par la phase de détoxification *via* les enzymes de la phase II afin d'être plus hydrophiles pour être excrétés par voie urinaire ou fécale. Parmi ces métabolites, certains ne sont pas conjugués par les enzymes de la phase II et sont nocifs pour l'organisme. L'un des métabolites le plus connu pour être nocif est l'intermédiaire cancérogène le BPDE ((±) -anti-benzo [a] pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde) provenant de plusieurs oxygénations successives du B[a]P. Cette molécule reste réactive et possède un fort pouvoir électrophile qui lui permet de former des adduits sur les sites nucléophiles de l'ADN, notamment sur les sites des guanines (Chiang *et al.* 2009). D'autres intermédiaires métaboliques telles que les quinones ne sont pas mutagènes mais sont capables de générer des ROS et d'induire des effets cytotoxiques (Wislocki *et al.* 1976; Zhu *et al.* 1995).

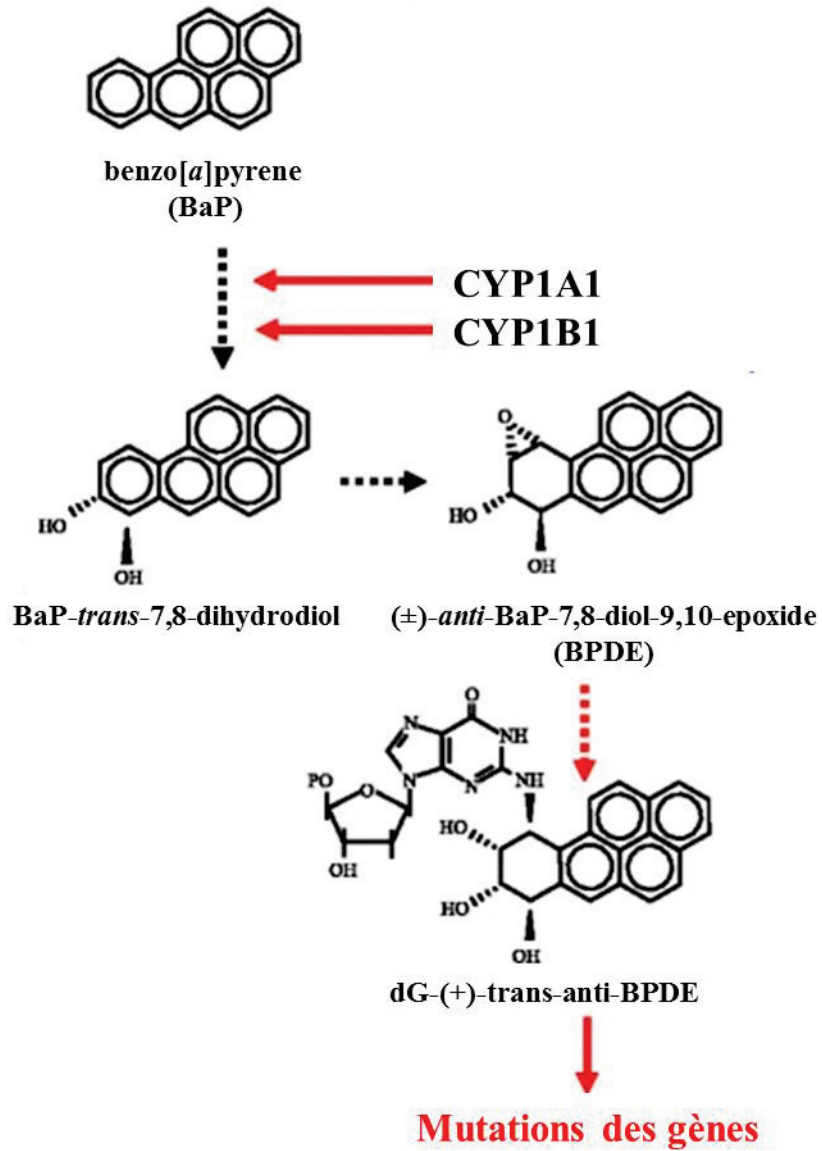


Figure 19 : Le métabolisme du benzo[*a*]pyrène (Shiizaki et al. 2017)

2. L'implication du B[a]P dans les cancers

L'effet cancérigène du B[a]P est principalement dû à la capacité de ses métabolites à former des adduits sur l'ADN qui provoquent des altérations cytogénétiques, des ruptures de l'ADN, des lésions de l'ADN, et des mutations spécifiques au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Morris *et al.* 1992; Rundle *et al.* 2000; IARC 2012). Outre son mécanisme génotoxique, le B[a]P semble également induire une cancérigénicité par plusieurs modes d'action tels que l'induction de la voie de signalisation de l'AhR, le stress oxydatif (ROS), et les modifications épigénétiques (IARC 2012). Le B[a]P a un effet cancérigène dans de multiples tissus et induit principalement le cancer du poumon, de la peau, du foie, de l'estomac et de la glande mammaire (IARC 2010).

2.1 L'initiation d'un cancer et le B[a]P

Les intermédiaires métaboliques du B[a]P sont capables d'induire des lésions à l'ADN qui peuvent aboutir à des mutations génétiques. De manière générale, les lésions génotoxiques favorisent l'initiation du cancer.

In vivo, dans des tumeurs pulmonaires des souris exposées aux B[a]P, des transversions G→T et des transitions G→A ont été observées au niveau du codon 12 de l'oncogène *K-Ras* ainsi qu'une présence élevée d'adduits à l'ADN (Mass *et al.* 1993). Des mutations similaires de *K-Ras* ont été retrouvées dans des tumeurs pulmonaires de personnes ayant été exposées aux fumées de combustion de charbon durant leur travail (IARC 2010). De plus, dans des cellules épithéliales bronchiques humaines normales, le BPDE est capable de se lier à la guanine ou à l'adénine dans les codons 12 et 14 de l'oncogène *K-ras*. Le BPDE va alors induire une mutation au sein de *K-ras* qui favorisera sa fonction oncogénique (Feng *et al.* 2002). Le B[a]P peut induire également une cancérogenèse pulmonaire (Kasala *et al.* 2015). Le B[a]P semble également jouer un rôle dans le cancer de la peau. En effet, des souris exposées aux B[a]P développent des papillomes et des lésions pré-néoplasiques cutanées dans lesquels sont retrouvés des mutations du proto-oncogène *Ha-Ras* (Wei *et al.* 1999; Chakravarti *et al.* 2008).

L'exposition au B[a]P ou au BPDE provoque des mutations identiques, *in vitro* et *in vivo*, au niveau du gène suppresseur de tumeur *TP53* soulignant ainsi le rôle du B[a]P dans cette pathologie (Ruggeri *et al.* 1993; Denissenko *et al.* 1996). Les mutations observées au sein du gène *TP53* sont également retrouvées dans les cancers pulmonaires humains induits

par le tabac (Shen *et al.* 2006). Par ailleurs, il a été démontré que l'inhalation des carcinogènes environnementaux tel que le B[a]P sur des souris transgéniques induit une mutation au niveau du gène suppresseur de tumeur *TP53* favorisant le développement d'un cancer (Aoki 2017).

Il a été démontré *in vitro* que le B[a]P joue un rôle important dans l'initiation de la tumeur du sein et dans la transformation des cellules non-cancéreuses en cellules précancéreuses, (Calaf *et al.* 1993; Siriwardhana *et al.* 2008). Une étude a démontré que des mutations induites par le B[a]P dans les cellules MCF-7 peut induire la formation de CSC (Shim *et al.* 2015). De plus, l'activation des voies de transduction du signal B[a]P-dépendants interfèrent dans les processus biologiques également impliqués dans la migration et l'invasion des cellules non-cancéreuses, des cellules cancéreuses et des cellules de cancer du sein TNBC (Castillo-Sanchez *et al.* 2013; Guo *et al.* 2015; Novikov *et al.* 2016)

2.2 La promotion d'un cancer et le B[a]P

En plus de son rôle d'initiateur de la cancérogenèse, le B[a]P joue aussi le rôle de promoteur d'où sa classification comme un cancérigène complet. L'immunotoxicité du B[a]P explique en partie son impact sur la cancérogenèse. En effet, les mutations observées sur le gène *TP53* aboutissent à une immunosuppression. De plus, le B[a]P pourrait déréguler les voies de signalisation du récepteur aux antigènes en augmentant le taux du calcium intracellulaire au niveau des globules blancs notamment les lymphocytes et les monocytes. Un lien existe entre la concentration du calcium et l'activation de la protéine kinase C qui est connue pour être impliquée dans la promotion du cancer. Par ailleurs, les tissus lymphoïdes périphériques expriment des niveaux faibles d'enzymes de la phase II, utiles pour la phase de détoxification dans le métabolisme du B[a]P comme vu précédemment. Cette défaillance pourrait affecter les lymphocytes en les exposant directement aux métabolites électrophiles non conjugués (IARC 2010). Une étude chez l'enfant a montré que l'exposition aux PAH atmosphériques est liée à une méthylation au niveau des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et qui, en conséquent, influence la fonction des cellules immunitaires (Walker *et al.*). D'autre part, les PAH ont la capacité de créer un environnement inflammatoire qui favorise la croissance tumorale.

Le B[a]P est également capable de déréguler le cycle cellulaire et d'altérer les jonctions gap affectant ainsi l'adhésion cellulaire au niveau des cellules de l'endomètre (IARC 2010). L'implication des ROS dans la cancérogénicité du B[a]P a été démontrée *in vivo* et *in vitro* en

induisant la migration et l'invasion des cellules du cancer du sein. En effet, après une exposition de ces cellules au B[a]P, une augmentation des niveaux de ROS a pu activer la voie de signalisation ROS/ERK/MMP9, suggérant un rôle de l'exposition cumulative au B[a]P dans la métastase de cancer du sein (Guo *et al.* 2015). Ainsi, l'environnement contenant un mélange de molécules environnementales pourrait augmenter l'effet inducteur et/ou promoteur du B[a]P lorsque ces molécules possèdent une forte affinité pour AhR capable d'influencer l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et de proto-oncogènes (Tarantini *et al.* 2011).

2.3 Les effets épigénétiques du B[a]P

Du côté épigénétique, le B[a]P diminue les niveaux globaux de méthylation de l'ADN de manière dose-dépendante dans divers systèmes *in vitro* (Wojciechowski *et al.* 1984; Huang *et al.* 2014). Ceci peut-être expliqué par l'inhibition de l'enzyme qui catalyse le transfert de groupes méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine en cytosine potentiellement causée par les adduits du B[a]P sur l'ADN (Wojciechowski *et al.* 1984). Dans des cellules épithéliales bronchiques humaines exposées au B[a]P, une hyperméthylation des îlots CpG ainsi qu'une régulation négative de l'expression du gène suppresseur de tumeur *p16INK4a* ont été observées (Yang *et al.* 2012). Toujours dans des cellules épithéliales bronchiques mais cette fois transformées suite à une exposition au BPDE, une surexpression de deux miRNA ayant des propriétés oncogéniques (le miR-22 et le miR-494) ont été mis en avant. Ces miRNA ciblent le gène suppresseur de tumeur *PTEN* et diminuent par conséquent son expression protéique (Liu *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010). L'induction de l'expression du miRNA-892a, connu pour cibler et réprimer le gène *CYP1A1*, entraîne une mort cellulaire suite à l'exposition au B[a]P. Dans les cellules MCF-7 du cancer du sein, ce miRNA est réprimé (Choi *et al.* 2012). Il a été démontré que l'exposition au B[a]P entraîne une activation de 27 miRNA différents, dont 7 (miR-25, miR-15a, miR-16, miR-92, miR-125b, miR-141 et miR-200a) qui sont connus pour inhiber l'expression du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Gordon *et al.* 2015).

En conclusion, le B[a]P est un puissant cancérogène en partie dû à ses mécanismes génotoxiques induisant non seulement des adduits sur l'ADN et des mutations génétiques mais également des modifications épigénétiques spécifiques.

Objectifs de thèse

Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés pour le cancer du sein, et une partie importante de ces facteurs est attribuée à l'environnement. Certaines molécules environnementales, telle que le B[a]P peut intervenir dans le processus de cancérogenèse en agissant comme un agent initiateur de part son effet génotoxique, et ainsi induisant des mutations et des modifications au niveau de l'expression de gènes. D'autres molécules comme le BPA, possédant une activité estrogénique-like (xéno-estrogènes) agissent comme perturbateur endocrinien.

Dans ce contexte, il est donc important de comprendre le rôle que peut jouer l'exposition environnementale qui est une exposition chronique, à faibles doses et multifactorielle dans la cancérogenèse mammaire.

Le premier objectif de ma thèse est d'explorer l'impact d'une exposition chronique à de faibles doses de BPA et/ou B[a]P sur l'agressivité d'une lignée cellulaire précancéreuse mammaire MCF10AT1 du modèle humain de progression tumorale MCF10.

Ce modèle humain de progression tumorale du cancer du sein, comprend trois lignées: la lignée cellulaire MCF10A immortelle, non transformée, et non tumorigénique (bénigne) ; la lignée MCF10AT1 immortelle, transformée, et pré-maligne dérivée de la transfection des MCF10A par l'oncogène *T24 Ha-ras* ; la lignée MCF10CA1a.c11 invasive, maligne et métastatique établie à partir de xéngreffes des cellules MCF10AT1 (**Figure 20**).

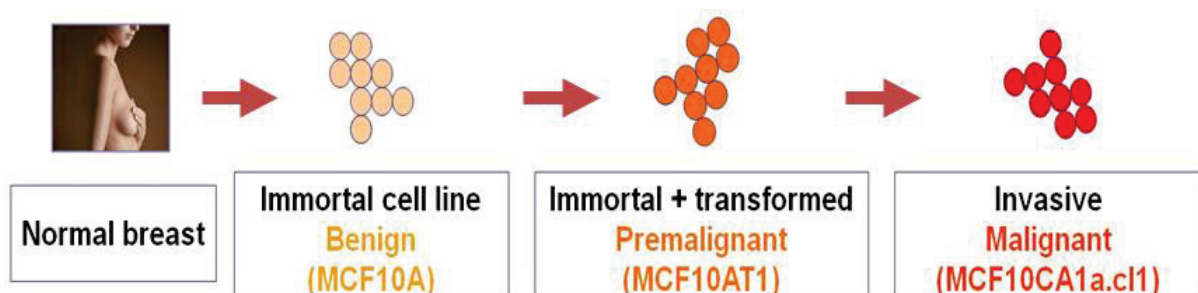


Figure 20 : Le modèle humain MCF10 de la progression tumorale du cancer du sein

Les cellules MCF10AT1 sont des cellules du sein immortelles, transformées, ER(-), PR(-), HER2(-) représentant un carcinome canalaire *in situ*, n'ayant pas encore développé une capacité à envahir les canaux ou lobules du tissu mammaire, ni à développer de métastases. Ces cellules représentent une forme pré-invasive de cancer du sein, souvent considérée

comme une forme transitoire dans l'histoire naturelle du cancer du sein. Les MCF10AT1 représentent donc des cibles potentielles pour l'étude de l'impact d'une exposition chronique à des carcinogènes environnementaux.

Dans ce programme de recherche, nous avons exposé les cellules précancéreuses MCF10AT1, au BPA et/ou B(a)P de façon à imiter au mieux l'exposition environnementale (exposition faible dose et chronique d'un mélange de molécules environnementales ayant des mécanismes d'action différents) afin d'explorer à divers niveaux (cellulaire, moléculaire) l'impact de cette exposition sur l'agressivité cellulaire.

Le deuxième objectif est d'explorer si la combinaison de ces deux molécules (possédant deux mécanismes d'action distincts), qui imite l'exposition environnementale multifactorielle, conduit à un effet potentialisé par rapport à l'exposition aux molécules seules.

Le troisième objectif est d'identifier et de prévenir les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à cette exposition.

Cette étude nous permet d'approfondir nos connaissances quant à l'impact de ces deux molécules largement dispersées dans notre environnement sur la cancérogenèse mammaire; et permet d'identifier des nouveaux biomarqueurs moléculaires associés à cette exposition qui pourrait être utilisé pour prévenir l'impact environnemental.

L'ensemble de ce travail a donné lieu à six communications écrites et à un article en cours de soumission.

Communications écrites :

CF. Donini*, M El Helou*, S Aires, A Escande, J Lachuer, S Ghayad, M Diab-Assaf, B Fervers, V Cavailles, V Maguer-Satta and PA. Cohen. Chronic and low doses exposure of a pre-cancerous mammary cell line by two distinct pollutants: identification of a strategy of prevention. The 3rd international Cancer Symposium *of the Cancer Research Center of Lyon, Lyon, 25-27 september 2017.*

CF Donini*, M El Helou*, E Grisard, V Maguer-Satta, P Balaguer, A Escande, ML Bayle, C Casellas, B Combourieu, J Lachuer, V Cavailles, T Philip, S Ghayad, M Diab-Assaf, B Fervers, PA Cohen. Identification of a receptor involved in the chronic deleterious effects of two environmental pollutants in a precancerous breast cell line. *2nd World Congress on Breast Cancer, Phoenix, Arizona, USA September 19-21, 2016.*

CF Donini*, M El Helou*, E Grisard, V Maguer-Satta, A Escande, ML Bayle, C Casellas, B Combourieu, J Lachuer, V Cavailles, T Philip, S Ghayad, M Diab-Assaf, B Fervers, PA Cohen. Deleterious effects of a chronic low-dose exposure to two environmental pollutants in precancerous breast cells: identification of a molecular target. *Forum annuel Société Française de Toxicologie et Génétique – Paris, France, 23-24 juin 2016.*

CF Donini*, M El Helou*, E Grisard, V Maguer-Satta, A Escande, ML Bayle, C Casellas, B Combourieu, J Lachuer, V Cavailles, T Philip, S Ghayad, M Diab-Assaf, B Fervers, PA Cohen. Identification of a molecular target to prevent the chronic deleterious effects of two environmental pollutants in precancerous breast cells. *BIT's 9th Annual World Cancer Congress, Shanghai, China, 14-16 may 2016.*

CF Donini*, M El Helou*, E Grisard, V Maguer-Satta, P Balaguer, A Escande, ML Bayle, C Casellas, B Combourieu, J Lachuer, V Cavailles, T Philip, S Ghayad, M Diab-Assaf, B Fervers, PA Cohen. Chronic, environmental exposure of two environmental pollutants affects tumorigenic progression in a precancerous breast cell line. *4th Scientific Day of the Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France, 2 may 2016*

CF Donini*, M El Helou*, E Grisard, V Maguer-Satta, P Balaguer, A Escande, ML Bayle, C Casellas, B Combourieu, J Lachuer, V Cavailles, T Philip, S Ghayad, M Diab-Assaf,

B Fervers, PA Cohen. Identification of a molecular target to prevent the chronic deleterious effects of two environmental pollutants in a precancerous breast cell line. *The 2nd Symposium of the Cancer Research Center of Lyon, Lyon, 21-23 september 2015.*

Travaux personnels

A. Article

Chronic and low-dose exposure to Bisphenol-A and/or Benzo(a)pyrene of precancerous mammary cells enhances their aggressiveness via an AhR/GPR30 interplay

Caterina F. Donini^{1,2,3*}, Myriam El Helou^{1,2,4*}, Sophie Aires^{1,2}, Balazs Gyorffy⁵, Aurélie Escandé⁶, Joël Lachuer^{1,2}, Sandra Ghayad⁴, Mona Diab-Assaf⁴, Béatrice Fervers^{1,2,3†}, Vincent Cavailles^{7†}, Véronique Maguer-Satta^{2†} and Pascale A. Cohen^{1,2,3}

¹Université Lyon 1, Lyon, France

²CRCL-Inserm U1052-CNRS U5286, Lyon, France

³Département Cancer et Environnement, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴Lebanese University, Beirut, Lebanon

⁵MTA TTK Lendület Cancer Biomarker Research Group, Budapest, Hungary

⁶UMR5569 (UMI UMII IRD CNRS), Montpellier, France

⁷Inserm U896, Montpellier, France

^{*},[†] Equal contributors

Corresponding author : Professor Pascale A. COHEN

ISPBL - Faculté de Pharmacie de Lyon, 8 avenue Rockefeller - F69373 LYON Cedex 08
France. Phone: (33) 4 78 77 28 94

FAX: (33) 4 78 77 72 49

E-mail: pascale.cohen@univ-lyon1.fr

Running Title: BPA and B(a)P impact on breast cancer progression

Acknowledgments including grant information

The authors thank the Centre de Ressources Biologiques of the Centre Léon Bérard and B. Manship for editing. CFD was funded by the ANR (2011 ANR-CESA-018-01, Agence Nationale de la Recherche, France) and the University of Lyon 1. MEH was funded by a PhD grant from the Lebanese University. This work was funded by the ANR (2011 ANR-CESA-018-01), Lyon Biopôle, and supported by grants from the Ligue nationale contre le cancer LNCC (71, 42). We thank Dr Balaguer for providing the HG5LN PXR cell line and the XRE-luc plasmid.

Competing financial interests declaration

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract

Background:

It is of most importance to decipher the role of chronic and low-dose exposure of environmental carcinogens in the tumor progression of breast cancer. Bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor, and Benzo[a]pyrene (B[a]P), a genotoxic agent, represent a real issue among the environmental risk factors for breast cancer.

Objectives:

We aimed at (i) investigating the impact of chronic and low doses exposures of the mammary pre-cancerous MCF10AT1 cell line to BPA and/or B[a]P (ii) exploring whether the combination of two molecules with two distinct mechanisms of action has a greater impact than the molecules tested alone; (iii) identifying the associated molecular mechanisms.

Methods:

Impact of long-term and cumulative exposures of MCF10AT1 cells to BPA and/or B[a]P (10^{-10} M) was tested on the following cancerous properties: (i) anchorage independent growth (ii) cancer stem-like properties. Involvement of the AhR and GPR30 receptors was investigated using agonists (G1, ITE), antagonists (G15, GNF351) and siRNA, gene reporter or RT-qPCR approaches.

Results:

BPA and/or B[a]P chronic exposure of MCF10AT1 cells induces in a time-dependent manner increased cellular aggressiveness, with a greater effect observed for the (BPA + B[a]P) combination. A new functional interplay between AhR and GPR30 was revealed as their inhibition can both block the deleterious effects of BPA and/or B[a]P. The *GPR30/AhR* gene expression signature is of poor prognosis in breast cancer, whereas *GPR30* or *AhR* mRNA levels were poorly informative.

Conclusion:

This study may allow to identify potential targets for the development of new preventive strategies capable of blocking mammary carcinogenesis due to chronic exposure to BPA and/or B[a]P.

Introduction

Tumor progression of human breast epithelial cells from non-cancerous to pre-malignant and of precancerous mammary cells to malignant stages is a multiyear, multistep, and multipath disease process. More than 85% of breast cancers are sporadic and attributable to long-term exposure to environmental factors, such as chemical carcinogens (Guengerich 2000; DeBruin *et al.* 2002; Hecht 2002; Kelloff 2005; Roukos *et al.* 2007). Given the emerging evidence that common environmental carcinogens play a significant role in cancer (Leffall L 2009) increased attention has been paid to molecular mechanisms through which pollutants affect tumor formation, invasion and/or progression (Benigni *et al.* 2011; Rudel *et al.* 2011; Williams 2012). The identification of such molecular mechanisms would have several social and environmental consequences, as it would allow the identification of human biomarkers of environmental carcinogen exposure that could be used for breast cancer prevention. While most of previous studies investigated carcinogens at high doses of micro- to milli-molar concentrations (Guengerich 2000; Mehta 2000; Caruso *et al.* 2001; DeBruin *et al.* 2002; Jaiswal *et al.* 2013), it is imperative to take a chronic, low-dose approach to reveal environmental mammary carcinogens, at physiologically-achievable levels, capable of inducing human breast cell tumor progression. As the combination of several environmental molecules may induce an additive/synergistic effect or a greater adverse effect than the use of individual compounds, preclinical studies mimicking natural environmental exposure by assessing combination of individual environmental factors possessing distinct mechanisms of action are of utmost interest. Finally, the choice of a relevant cellular model is crucial for *in vitro* studies, and previous investigation have been conducted on human mammary epithelial cells or on human breast cancer, thus investigating the impact of environmental factor on the earlier and later stages of carcinogenesis (Siriwardhana *et al.* 2008; Hall *et al.* 2010; Song *et*

al. 2010; Jaiswal *et al.* 2013; Rathore *et al.* 2013; Clement *et al.* 2016; Al-Dhfyhan *et al.* 2017). Few is known on the impact of environmental exposure to the breast precancerous stage.

Benzo[a]pyrene (B[a]P), a family member of poly-cyclic aromatic hydrocarbons (PAH), is considered a tobacco, environmental, and dietary chemical carcinogen (Morris *et al.* 1992; Rundle *et al.* 2000; Rubin 2001; Grover 2002; Wogan *et al.* 2004) listed as a Group 1 carcinogen by the IARC (IARC 2012). B[a]P is detected at picomolar concentrations in body fluids and tissues of cancer patients (Obana *et al.* 1981; Hecht *et al.* 1999; Besaratinia *et al.* 2002). B[a]P participates to the development of human breast cancer because its metabolites form strong DNA-adducts that cause DNA lesions (Morris *et al.* 1992; Shou *et al.* 1993; Rundle *et al.* 2000; Caruso *et al.* 2001). As PAH-derived DNA-adducts alone are insufficient for inducing human breast cancer (Guengerich 2000; Rundle *et al.* 2000; Caruso *et al.* 2001), B(a)P probably induces carcinogenicity through many other modes of action, one of which is its binding and activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (IARC 2012). AhR is a ligand-activated transcription factor that upon ligand activation is able to bind and activate specific DNA-recognition element (XRE). The XRE has been mapped to AhR-target genes, including those for xenobiotic metabolizing enzymes such as *cytochrome P450 1A1* (*CYP1A1*) (Fujii-Kuriyama *et al.* 2005), which is capable of generating mutagenic intermediates and postulated to play important roles in activating the carcinogenic functions of environmental factors (Smith *et al.* 1995; Huang *et al.* 1996; Imbert *et al.* 1996; Shimada *et al.* 1996; Kuukasjarvi *et al.* 1997; Ciolino *et al.* 1999; Fujita *et al.* 2001; Shimada *et al.* 2001; Nebert *et al.* 2004; Baird *et al.* 2005; Hughes *et al.* 2008). The AhR/CYP1A1 pathway seems to in participate to carcinogenesis by mediating expansion of breast cancer stem cells and the transcriptional activity of AhR is mainly involved in such effects (Al-Dhfyhan *et al.* 2017).

Short-term and millimolar dose of B(a)P have been observed to induce aggressiveness and transformation of human mammary epithelial cells (Calaf *et al.* 1993; Russo *et al.* 2002; Guo *et al.* 2015). The impact of chronic and low-doses exposure of these cells to B(a)P was barely investigated, but seems to foster progression towards the precancerous substage by : (i) conferring increased mesenchymal, stem-like, and anchorage-independence growth properties (Siriwardhana *et al.* 2008; Rathore *et al.* 2012; Rathore *et al.* 2013; Pluchino *et al.* 2014) by preventing Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-mediated luminal progenitor commitment and expansion (Clement *et al.* 2016).

Bisphenol-A (BPA) is a monomer of polycarbonate plastics widely used in the manufacture of numerous consumer products and BPA exposure to humans occurs mainly through the oral route due to the leaching of BPA in food and beverage containers, but non-dietary sources such as dust, air and cosmetics are also relevant (Giulivo *et al.* 2016). BPA has been the focus of widespread concern due to the fact that it interferes with endocrine signaling pathways even at extremely low doses, and thus belongs to the endocrine disrupting compounds (EDC) (Delfosse *et al.* 2014; Seachrist *et al.* 2016) BPA has a similar structure as the highly potent estrogen receptor (ER) agonist diethylstilbestrol, binds classical nuclear ER alpha and beta (ER α and β), binds the G protein-coupled receptor 30 (GPR30)/GPER1, a transmembrane receptor that mediates non-genomic estrogenic actions (albeit with lower affinity) and also the pregnane X receptor (PXR) (Thomas *et al.* 2006; Delfosse *et al.* 2014). Although several *in vivo* studies reported a carcinogenic potential of BPA (reviewed in Seachrist *et al.* 2016), the World Health Organization indicated that there is currently insufficient evidence on which to judge the carcinogenic potential of BPA (FAO/WHO *et al.* 2011). *In vitro* studies have however found that BPA causes adverse effects in noncancerous mammary epithelial cells (Fernandez *et al.* 2010; Marchese *et al.* 2012) or in breast cancer cell lines, including increased cell proliferation, oxidative stress and alterations of cell

signaling pathways involved in carcinogenesis (Wetherill *et al.* 2007; Jenkins *et al.* 2012). Most of these studies focused on short-term exposures to BPA ranging from 10^{-4} to 10^{-9} M. Considering the BPA concentration in human serum (0.2–1.6 ng/mL; 0.88–7.0 nM) (Sajiki *et al.* 1999; Takeuchi *et al.* 2002), is thus of utmost interest to study the impact of chronic and low doses exposure of BPA on breast tumor progression. To date, only one recent report has reported that chronic low-dose exposures (10^{-10} M) of human mamary epithelial cells to BPA has little effect on epithelial stem cells properties but prevents the maintenance of stem cells features prompted by BMP4 (Clement *et al.* 2016).

Altogether, few is known about the impact of chronic and low-doses exposures of B(a)P or BPA on tumor progression, and the previous studies have mainly investigated such impact on the early stage of carcinogenesis (non-transformed epithelial cells) (Siriwardhana *et al.* 2008; Rathore *et al.* 2012; Rathore *et al.* 2013; Pluchino *et al.* 2014; Clement *et al.* 2016). The effects of long-term, accumulative exposure to BPA or B(a)P on the precancerous substage needs, however, to be addressed. Another important issue is to decipher whether combination of BPA and B(a)P, each compound possessing distinct mechanisms of action, induces any additive/synergistic effect on tumor progression.

The aim of this study was to investigate: (i) whether chronic and low-doses exposure to B(a)P and/or BPA triggers the progression of precancerous breast cells to a more aggressive/cancerous stage; (ii) whether the combination of B(a)P and BPA enhances the effect of each compound tested individually. The MCF10AT1 precancerous breast cells (representing the transformed, premalignant stage in the MCF10 unique model of breast cancer progression (Dawson *et al.* 1996; Miller 2000), to our knowledge, has never been used to test the impact of chronic and low-dose exposure to environmental pollutants. We investigated long-term and cumulative exposures (60 days, 20 passages) of the MCF10AT1 cells to BPA and B[a]P, at physiologically-achievable concentrations (10^{-10} M), alone or in

combination. Exposed cells were frozen every 2 weeks during the 60 days chronic exposure, in order to investigate the kinetics of acquisition of the aggressive phenotype. In order to identify endpoints reflecting B(a)P- and/or BPA-induced progression to malignancy, we explored the acquisition of different cancerous properties of the exposed MCF10AT1: (i) anchorage independent growth (AIG), a hallmark of carcinogenesis associated with aggressiveness and metastasis in malignant cells; (ii) cancer stem-like properties, as cumulating data evidenced that cancer stem-like cells are involved in generating and maintaining pre-malignant and malignant lesions (Farnie *et al.* 2007; Charafe-Jauffret *et al.* 2008; Kakarala *et al.* 2008). We then sought to investigate in MCF10AT1 cells the involvement of AhR and GPR30 receptors in the B(a)P and/or BPA mediated-effects, and whether a functional interplay exists between these two receptors. The present study newly reveals that long-term and low-doses exposure to BPA and B(a)P affects the aggressiveness of the precancerous cell line MCF10AT1, by triggering increased AIG and increased mammospheres formation efficiency (MFE). Our data also new highlighted the existence of a functional cross talk between AhR and GPR30 in mediating the deleterious effects of chronic and low dose exposure to BPA and or B(a)P.

Methods

Cell culture

Human breast precancerous MCF10AT1 and cancerous MCF10CA1a.c11 cells (Karmanos Institute, Detroit, USA) were purchased from (Karmanos Institute, Detroit, USA) and maintained in complete DMEM/Ham's F12 medium with 5% horse serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and additional supplements: 100 ng/mL cholera enterotoxin, 10 mg/mL insulin, 0.5 mg/mL hydrocortisol, 20 ng/mL epidermal growth factor (Sigma, Saint Louis, USA) 100 units/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. MCF-7 cells were purchased from ATCC (Teddington, UK) and grown according to the recommendations. HG5LN PXR a cell line that express PXR, cells were grown in DMEM containing phenol red and 1g/l glucose with 5% fetal calf serum (FCS) and additional supplements: 1 mg/ml G418 and 0.5µg/ml puromycin (Lemaire et al. 2007).

Reagents

B[a]P and BPA were purchased from Sigma (Saint Louis, USA). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) was purchased from LGC Standard (Molsheim, France). G1, G15 and ITE were from TOCRIS Bioscience (Bristol, UK); GNF from Calbiochem (Billerica, USA); stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) for all chemicals except BPA which was dissolved in ethanol (EtOH). The concentration of stock solutions was 10^{-2} M for all reagents, except 10^{-4} M for TCDD.

Establishment of the chronically exposed cellular model and culture conditions

MCF10AT1 cells were chronically exposed or not to 10^{-10} M of B(a)P or to 10^{-10} M BPA, alone or in combination, during 60 days (\approx 20 passages) in phenol red-free DMEM/Ham's F12

medium with 5% steroid-depleted, dextran-coated and charcoal-treated horse serum, the above-mentioned supplements and was further referred to as DCC medium. Unexposed MCF10CA1a.cl1 cells were grown concomitantly in the same medium for 60 days and named MCF10CA1a.cl1_{60d}. Media and exposure were changed every 2 days. Cells were frozen every 2 weeks.

Anchorage independent growth (AIG)

Anchorage independent growth was assessed by soft agar assay as previously described (Vendrell *et al.* 2012). Single-cell suspensions (75×10^3) were seeded in soft agar, and colonies were counted after 3 weeks of incubation.

Mammosphere formation efficiency (MFE)

Single-cell suspensions were seeded using non-adherent mammosphere culture conditions (Dontu *et al.* 2003). After 7 days, primary mammospheres (PMs) were counted, collected, trypsinized and replated for 10 days in nonadherent culture conditions to generate second-generation mammospheres. The culture media were replenished every 2 to 3 days.

RNA extraction and Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA extraction, reverse transcription and RT-qPCR measurements were performed as described previously (Vendrell *et al.* 2012; Chapellier *et al.* 2015). RNA lysates were extracted after exposure with G1 (10^{-6} M), TCDD (10^{-7} M and 10^{-8} M) alone or combined with the antagonists G15 (10^{-5} M and 10^{-6} M), GNF (10^{-5} M and 10^{-6} M) for 24 hr, and ITE (10^{-6} M and 10^{-7} M), TCDD (10^{-7} M and 10^{-8} M) alone or combined with the antagonists G15 (10^{-5} M and 10^{-6} M), GNF (10^{-5} M and 10^{-6} M) for 4 hr. Controls were obtained in the presence of the corresponding solvent. One microgram of total RNA from each sample was reverse-

transcribed as previously described (Vendrell *et al.* 2012). RT–qPCR measurements were performed using a CFX96 with the SsoAdvanced Universal SYBR green supermix (BioRad, Hercules, USA), according to the manufacturer’s recommendations. The primers used to explore the expression of the *ER α* , *ER β* , *PXR*, *AhR*, *GPR30*, *CYP1A1* and *28S* genes are listed in the Table S1.

Western blot

Western blot experiments were performed as previously described (Vendrell *et al.* 2012) using the following antibodies: AhR (1:1,000, ab2770; Abcam, Paris, France), GPR30 (1:1,000, NBP1-31239; Novus Biologicals, Littleton, USA), ER α (1:1,000, sc-8002; SantaCruz, Nanterre, France), α -tubulin (1:10,000, T5168; Sigma), P-p42/44 MAPK (1:1,000, 9106; Cell Signaling), p42/44 MAPK (1:1,000, 9102; Cell Signaling, Danvers, USA).

Luciferase assay

Cells were plated and then transfected with 150 ng xenobiotic response element (XRE) firefly luciferase reporter plasmid (XRE-luc) (Rasmussen *et al.* 2016) and 10 ng Renilla luciferase plasmid (pTK-RL). Twenty-four hr after transfection cells were grown for 8 hr in the presence of the indicated exposure, and luciferase activities were then assessed as previously described (Vendrell *et al.* 2012).

***GPR30* or *AhR* silencing**

StealthTM siRNAs siRNA-GPR30 and StealthTM siRNAs siRNA-AhR and their corresponding scrambled control RNA (scrambled) were obtained from, respectively, Ambion (Carlsbad, USA,4390825) and Invitrogen (Carlsbad, USA, AHRHSS100337). Fifty nM of siRNA-GPR30, 5 nM of siRNA-AhR or corresponding scrambled were transfected into MCF10AT1

cells with lipofectamine RNAimax (Invitrogen). Transfections were performed directly at the moment of cells seeding. Western blots were performed 48 hr post-transfection. Exposure to G1, TCDD or ITE for RNA collection or luciferase assay was performed 24 hr post-transfection.

Cell proliferation

A total of $4 \cdot 10^4$ cells/well were seeded and cultured into 24-well plates. Proliferating cells were analyzed using the Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, Billerica, USA).

Cell viability assay

A total of 10^4 cells/well were plated in a 96-well plate and treated for 4 days as indicated. Cell viability was assessed as previously described (Thollet et al. 2010).

Breast tumor cohort

Women with primary breast tumors ($n = 113$) and known clinical follow-up who had not received any therapy before surgery and who relapsed, or not, while receiving endocrine therapy and/or chemotherapy were recruited from the Centre de Ressources Biologiques of the Centre Léon Bérard (Lyon, France) (CLB cohort, Table S2). Informed consent was obtained from all patients, and the study was approved by the center's ethics committee. Extraction of total RNA from frozen tumour samples and RT-qPCR measurements were performed as previously described (Thollet et al. 2010). Univariate analyses were performed using SPSS™ Software (IBM, USA). IBM SPSS software (IBM) was used for all statistical analyses in which the prognostic value of AhR and GPR30 was analyzed. The data are divided at the median value of *AhR* or *GPR30* mRNA expression into 2 groups with either high or low expression. The Kaplan-Meier plotter (KMP) cohort was established from a meta-

analysis of the gene-expression profiles of 1,877 primary breast cancer samples from patients who had not received any therapy prior to surgery (Mihaly et al. 2013). P value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

BPA and/or B(a)P exposure increases MCF10AT1 cells aggressiveness

Accordingly with the stage of breast cancer progression displayed by each cell line, the precancerous MCF10AT1 cells formed significantly less and smaller colonies in soft agar and significantly less mammospheres than the cancerous MCF10CA1a.cl1 cells (Figures S1A-B). With the aim of mimicking environmental exposure (low doses, chronic exposure, combination of several environmental factors), the human precancerous mammary MCF10AT1 cells were chronically or not exposed to 10^{-10} M of B(a)P and/or to 10^{-10} M BPA during 60 days (MCF10AT1_{60d}). The unexposed MCF10AT1_{60d} and MCF10CA1a.cl1_{60d} cells displayed unmodified AIG and MFE phenotypes (Figures 1A-B, Figure S1C) compared to the corresponding parental cells (Figures S1A-B). Chronic exposure of MCF10AT1 cells to 10^{-10} M of BPA or to 10^{-10} M of B(a)P were able to significantly increase AIG, with B(a)P having a significantly greater impact (Figure 1A). Combination of BPA+B(a)P (10^{-10} M) had a significant greater effect than each environmental factor tested alone, and gave rise to a number of colonies as high as that observed in the unexposed cancerous MCF10CA1a.cl1_{60d} cells (Figure 1A). The size of the colonies was also bigger in the BPA- and/or B(a)P-exposed MCF10AT1_{60d} cells compared to the unexposed cells, with B(a)P having a significantly greater impact than BPA, and BPA+B(a)P inducing bigger colonies than each environmental factor alone (Figure S1C). Figure 1B further revealed that: (i) MCF10AT1_{60d} cells chronically exposed to 10^{-10} M of BPA or to 10^{-10} M B(a)P displayed a higher MFE than the unexposed cells, with a number of second generation mammospheres similar with that of the unexposed MCF10CA1a.cl1_{60d} cells; (ii) exposure to the combination of BPA+B(a)P had a significant higher impact on second generation MFE if compared to BPA or B(a)P tested alone. Interestingly this effect was even significantly higher than that of the unexposed

MCF10CA1a.cl1_{60d} cells (Figure 1B). Figure S2 ruled out that the aggressive phenotypes observed in the different exposed MCF10AT1_{60d} cells is not the consequence of any increase in cell proliferation (compared to unexposed MF10AT1_{60d}).

Unexposed or exposed MCF10AT1_{60d} cells were additionally grown for other 30 days in the absence of any exposition (MCF10AT1_{60+30d} cells), and then tested again for AIG and MFE. The number and size of colonies in soft agar (Figures 1C and S1D) and the number of mammospheres (Figure 1D) did not display any difference between the MCF10AT1_{60d} and MCF10AT1_{60+30d} cells, thus demonstrating that the aggressive phenotype induced by chronic and low-dose exposure to BPA and/or B(a)P of MCF10AT1_{60d} cells is an acquired phenotype.

Taking advantage of the systematic freezing of exposed cells during the time course of exposure, AIG and MFE were retrospectively tested after 23 and 48 days of exposure and compared to 60 days of exposure (Figures 1E-F). The number of colonies in soft agar and mammospheres significantly gradually increased between 23-48 and 48-60 days of chronic exposure, thus demonstrating that the more the MCF10AT1 cells are exposed to low doses of BPA and/or B(a)P, the more aggressive is the phenotype displayed. Again, at any time tested, combined BPA+B(a)P exposure caused more deleterious effects than those of BPA or B(a)P alone.

Collectively, our results suggest that: (i) chronic, low-dose BPA and/or B(a)P exposure affect the aggressiveness of the MCF10AT1 cells in a time-dependent manner; (ii) the resulting phenotype is acquired; (iii) combined exposure had more impact than exposure to BPA or B(a)P alone and was at least equivalent or higher than that of cancerous MCF10Ca1a.cl1 cells.

GPR30 and AhR are expressed and functional in MCF10AT1 cells

As the aryl hydrocarbon receptor AhR is the main target for B(a)P (Shimizu et al. 2000) and BPA is known to bind to two estrogen receptor (ER) subtypes (*ie*, ER α and ER β), to the G protein-coupled estrogen receptor 1 GPR30/GPER1 and to the Pregnane X receptor PXR (Delfosse *et al.* 2014; Acconcia *et al.* 2015), we sought to investigate their presence and if so, their possible molecular involvement in mediating the BPA and/or B(a)P low-dose impact on MCF10AT1 cells. Figure S3A validated that ER α and ER β are not or barely expressed in MCF10AT1 and MCF10CA1a.c11 cells. AhR expression has been previously reported in the MCF10AT1 cells (Wong et al. 2009) but to our knowledge, GPR30 expression has been poorly investigated. Here, we newly reported that AhR and GPR30 receptors are both expressed at the mRNA and protein levels in MCF10AT1 (and MCF10CA1.c11 cells) (Figures 2A-B). Rapid phosphorylation of MAPK has been documented as one of GPR30 activation main downstream effects (Filardo et al. 2000) and decreased AhR protein levels have been described following AhR activation as a consequence of rapid proteolysis by the proteasome (Davarinos *et al.* 1999). In MCF10AT1 cells, the functionality of GPR30 was highlighted by demonstrating the MAPK pathway is quickly activated (increase on the phospho MAPK/MAPK ratio) in the presence of the selective GPR30 agonist G1 (Bologna et al. 2006) and this activation was impaired in the presence of the GPR30 antagonist G15 (Dennis et al. 2009) (Figure 2C). Exposure of MCF10AT1 cells with the AhR agonist ITE (Song et al. 2002) led to a decrease in AhR protein levels which was preventable by the AhR antagonist GNF351 (Smith et al. 2011) (Figure 2D). Finally, gene reporter experiments performed in MCF10AT1 cells demonstrated that Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), a well-known AhR ligand and activator of AhR-direct transcriptional activity (Rasmussen et al. 2016), leads to an increase in XRE-luciferase activity, totally preventable upon AhR silencing (Figure 2E-F).

A functional cross-talk exists between AhR and GPR30

We then aimed at investigating the possible involvement of the AhR and/or GPR30 receptors in mediating the deleterious effects of a short exposure to BPA and/or B(a)P in the MCF10AT1 cells. This was tested in the presence or the absence of the AhR or GPR30 antagonists (GNF351 and G15, respectively) at non-toxic concentrations (Figures S4A-B). Figure 3A first demonstrates in AIG assays that 72 hr exposure with 10^{-10} M BPA and/or 10^{-10} M B(a)P are sufficient to generate increased colonies number in soft agar. While having themselves no impact on colony number formation, GNF351 and G15 were capable to completely inhibit the impact of BPA and/or B(a)P on AIG (Figure 3A). This result was, at least in some degree, expected with the BPA/G15 and the B(a)P/GNF351 combinations, but was totally surprising concerning the BPA/GNF351 and the B(a)P/G15 combinations. In MFE assays conducted with MCF10AT1 cells exposed only during the frame of the experiments (Figure 3B), the increased number of mammospheres induced by 10^{-10} M BPA was totally blocked in the presence of G15 or GNF351 (while the antagonists themselves had no effect when tested alone). The AhR antagonist GNF351 completely inhibited the B(a)P-induced MFE, while the GPR30 antagonist G15 surprisingly showed only a partial but significant inhibition. Logically, the impact of the G15 or GNF351 on the combination BPA+B(a)P was similar to that observed with B(a)P alone.

To confirm the above data supporting the involvement of both GPR30 and AhR receptors in mediating the effects of low dose BPA and/or B(a)P, we then performed the same experiments using G1 and ITE agonists, at non-toxic concentrations (Figures S4C-D). Figures 3C-D show that: (i) low-dose exposure of MCF10AT1 cells to 10^{-10} M G1 or 10^{-10} M ITE gave rise to increased colony number or MFE in the same range than that observed with 10^{-10} M BPA or 10^{-10} M B(a)P, respectively; (ii) G15 and GNF351 were both able to totally inhibit

G1-dependent AIG or MFE; (iii) the impact of ITE on MFE was totally blocked in the presence of GNF351, while only partially inhibited by G15.

Altogether these results support the idea that both the AhR and GPR30 receptors, which are present and functional in the MCF10AT1 cells, play a role in mediating the deleterious effects exerted by BPA and B(a)P exposure on these cells. More importantly, these data also suggest a functional cross-talk between AhR and GPR30.

Activation of GPR30 is correlated with enhanced AhR transcriptional activity

Activated AhR is known to dimerize and to bind to xenobiotic response elements (XREs) in the promoters of AhR target genes. Cytochrome P450-dependent monooxygenase 1A1 (*CYP1A1*) is amongst the canonical enzymes found under the transcriptional control of AhR. To go further in the analysis of the interplay between AhR and GPR30, we first performed firstly XRE-luciferase reporter assays. With TCDD used as control, we found that ITE is able to lead to great and dose-dependent activation of AhR-driven transcriptional activity in MCF10AT1 cells (Figure 4A). Concentration as low as 10^{-11} M of ITE was sufficient to give rise to significant increase in XRE-luc activity. ITE impact was totally impaired in the presence of siRNA-AhR or GNF351 (Figures 4B and 4C, respectively). Here, we newly report that G1 is able to significantly increase XRE-luciferase activity in a dose-dependent manner, as illustrated at 10^{-7} M and 10^{-6} M of G1 (Figure 4D). G1-induced XRE-luciferase signal was totally impaired in the presence of GNF351 (Figure 4E) but also in the presence of siRNA-AhR (Figure 4F). We verified that this latter led to AhR silencing while having no impact on GPR30 expression (Figure S5A) or on MCF10AT1 cell viability (Figure S5B). Surprisingly, silencing GPR30 by a siRNA-GPR30 strategy (Figure S5C) gave rise to a significant decrease in both G1 10^{-6} M (Figure 4G), TCDD 10^{-7} M and ITE 10^{-10} M (Figure

4H). These effects were independent from any impact of the siGPR30 neither on AhR expression (Figure S5C) nor on MCF10AT1 cell viability (Figure S5D).

We further investigated endogenous *CYP1A1* mRNA levels in MCF10AT1 upon ITE and G1 exposure. In accordance with Figure 4, Figures 5A-B-C revealed that: (i) *CYP1A1* mRNA levels are significantly increased by both TCDD 10^{-7} M and ITE 10^{-7} M; (ii) ITE impact was totally impaired in the presence of siRNA-AhR or GNF351, and significantly decreased in the presence of siRNA-GPR30. Figures 5D-E-F highlighted that G1 is able to lead to a significant increase in *CYP1A1* mRNA levels, and this was totally impaired in the presence of siRNA-AhR (Figure 5D), GNF351 (Figure 5E) and significantly decreased in the presence of siRNA-GPR30 (Figure 5F). Altogether, our XRE-luciferase experiments and Rt-qPCR experiments confirmed, at the transcriptional activity level, the existence of an interplay between GPR30 and AhR interfering with AhR-driven transcriptional activity.

The *GPR30/AhR* gene expression signature is of poor prognosis

To investigate the clinical relevance of AhR and GPR30, we used RT-qPCR to explore *GPR30* and *AhR* mRNA expression levels in a cohort of 113 human primary breast tumor samples. By univariate analysis, we found that neither *GPR30* or *AhR* mRNA levels were informative ($P = 0.09$ and $P = 0.41$, respectively, log-rank test), while a *GPR30/AhR* gene expression signature based on high expression levels of both *GPR30* and *AhR* was significantly associated with shorter overall survival (OS) ($P = 0.01$, Table 1). Thus, the concomitant presence of both high mRNA expression levels of *AhR* and *GPR30* in primary breast tumors is of poor prognosis. The resulting Kaplan–Meier curves are shown in Figure 6. Regarding breast cancer subclasses (Table 1), the *GPR30/AhR* gene expression levels signature was more informative in the estrogen receptor (ER)-negative ($P = 0.001$) but not in the ER-positive or luminal subclasses ($P = 0.41$ and $P = 0.50$, respectively) (Table 1). The

most striking results arose from the retrospective analysis of gene-expression array data for 1,877 breast cancer patients (KMP cohort). Again, the *GPR30/AhR* signature is more informative than *GPR30* mRNA levels alone or *AhR* mRNA levels alone and is associated with shorter OS in the ER-negative subclass (P = 0.005) and the triple negative subclass (P = 0.03) (Table 2, Univariate analysis). Altogether, our data newly highlighted that a signature based on both high *GPR30* expression levels and high *AhR* expression levels represent a novel marker for poor prognosis in breast cancer, especially in an ER-negative / Triple negative subclasses

Table 1. Univariate analysis of the *GPR30* gene expression levels, the *AhrR* gene expression levels and the *GPR30/AhrR* gene expression signature in relation to overall survival (OS) in different subclasses of the 113 breast cancer samples of the CLB cohort.

	n	<i>GPR30</i> mRNA levels			<i>AhrR</i> mRNA levels			<i>GPR30/AhrR</i> signature		
		HR ^a	95 % CI ^b	p ^c	HR ^a	95 % CI ^b	p ^c	HR ^a	95 % CI ^b	p ^c
All breast tumor samples	113	2.78	0.8 to 4.1	NS (0.09)	0.68	0.6 to 3.4	NS (0.41)	6.15	1.1 to 5.6	0.01
ER+ subclass	68	0.66	0.4 to 9.2	NS (0.42)	0.10	0.2 to 3.1	NS (0.75)	0.67	0.4 to 6.5	NS (0.41)
ER- subclass	45	5.39	1.1 to 13.3	0.02	2.08	0.7 to 9.7	NS (0.15)	10.25	1.7 to 20.1	0.001
Luminal subclass (ER+/PR+) ^d	62	0.03	0.2 to 6.3	NS (0.87)	0.11	0.2 to 3.8	NS (0.74)	0.45	0.4 to 8.5	NS (0.50)
HER2- enriched subclass (ER-/PR-/HER2+) ^d	16	2.56	0.5 to 63.1	NS (0.11)	0.17	0.2 to 18.2	NS (0.68)	4.47	0.8 to 96.6	0.03
Triple negative subclass (ER-/PR-/HER2-) ^d	21	-	NA ^e	-	0.005	0.1 to 12.1	NS (0.94)	-	NA ^f	-

^a HR, Hazard ratio.

^b 95% CI, 95% confidence interval.

^c p was considered significant when $p < 0.05$. NS, not significant.

^d subclasses of breast cancer were determined using immunohistological (ER, PR, HER2) according to the St Gallen recommendation (Goldhirsch et al. 2013).

^e N/A, Not applicable as all the cases are censored in the high *GPR30* mRNA level group.

^f N/A, Not applicable as all the cases are censored in the high *GPR30* and/or *AhrR* mRNA level group.

Table 2. Univariate analysis of the *GPR30* gene expression levels, the *Ahr* gene expression levels and the *GPR30/Ahr* gene expression signature in relation to overall survival (OS) in different subclasses of the 113 breast cancer samples of the KMP cohort.

	n	<i>GPR30</i> mRNA levels			<i>Ahr</i> mRNA levels			<i>GPR30/Ahr</i> signature		
		HR ^a	95 % CI ^b	p ^c	HR ^a	95 % CI ^b	p ^c	HR ^a	95 % CI ^b	p ^c
All breast tumor samples	1,877	0.83	0.68 to 1.01	NS (0.06)	0.91	0.73 to 1.15	NS (0.4)	0.78	0.46 to 1.10	NS (0.14)
ER+ subclass	1,308	0.82	0.62 to 1.08	NS (0.15)	0.83	0.63 to 1.1	NS (0.2)	0.67	0.26 to 1.08	NS (0.06)
ER- subclass	569	1.46	1.06 to 2.02	0.02	1.24	0.89 to 1.73	NS (0.2)	1.88	1.43 to 2.33	0.005
Luminal subclass	1,055	1.2	0.88 to 1.64	NS (0.24)	0.8	0.58 to 1.11	NS (0.18)	0.95	0.5 to 1.4	NS (0.82)
HER2- enriched subclass	419	1.22	0.84 to 1.77	NS (0.29)	0.79	0.54 to 1.16	NS (0.23)	0.99	0.45 to 1.53	NS (0.99)
Triple negative / Basal-like subclass	403	1.44	0.97 to 2.13	NS (0.06)	1.22	0.79 to 1.88	NS (0.36)	1.85	1.28 to 2.41	0.033

^a HR, Hazard ratio.

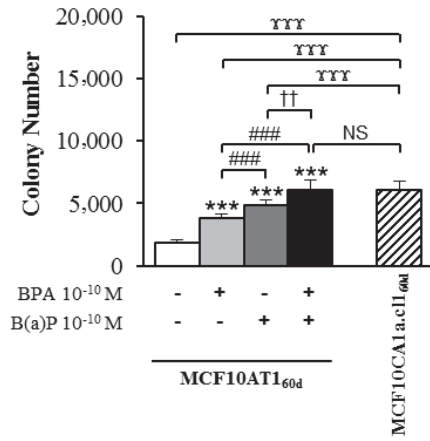
^b 95% CI, 95% confidence interval.

^c p was considered significant when $p < 0.05$. NS, not significant.

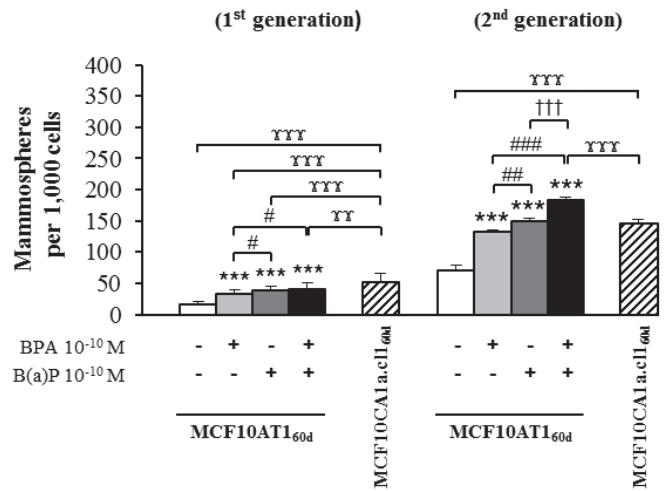
^d breast cancer subclasses were based on the St Gallen recommendation (Goldhirsch et al. 2013) according to Gyorffy et al. (Gyorffy et al. 2012)

Figure 1

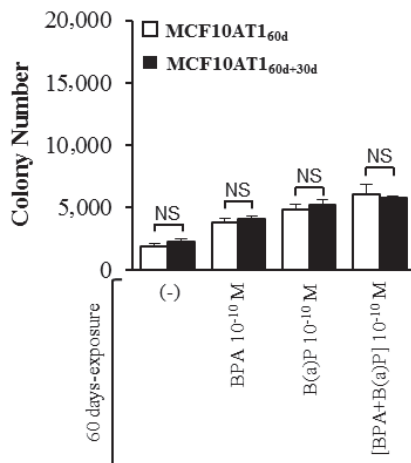
A



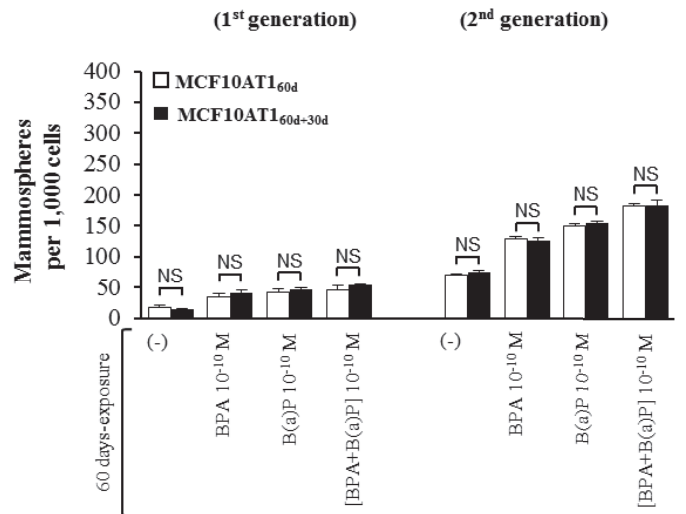
B



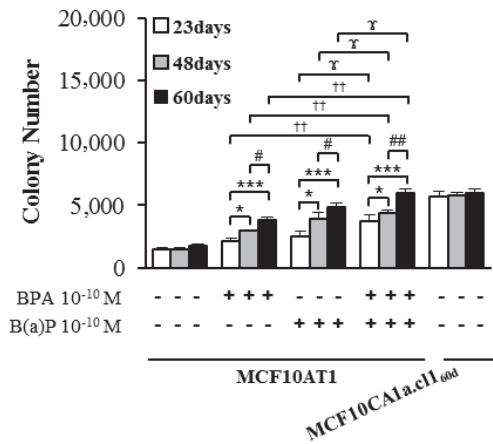
C



D



E



F

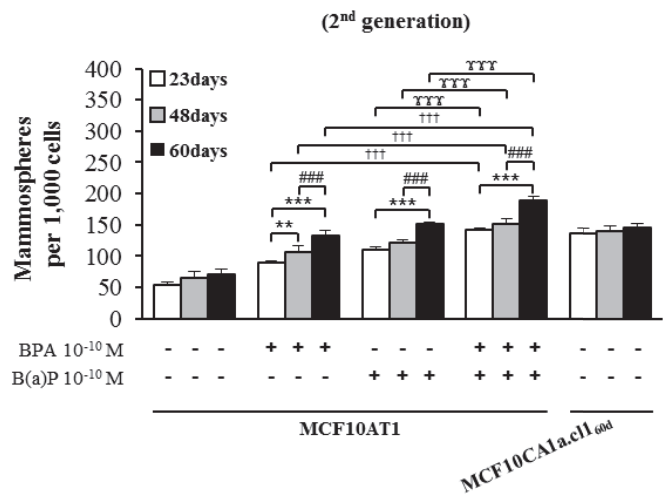
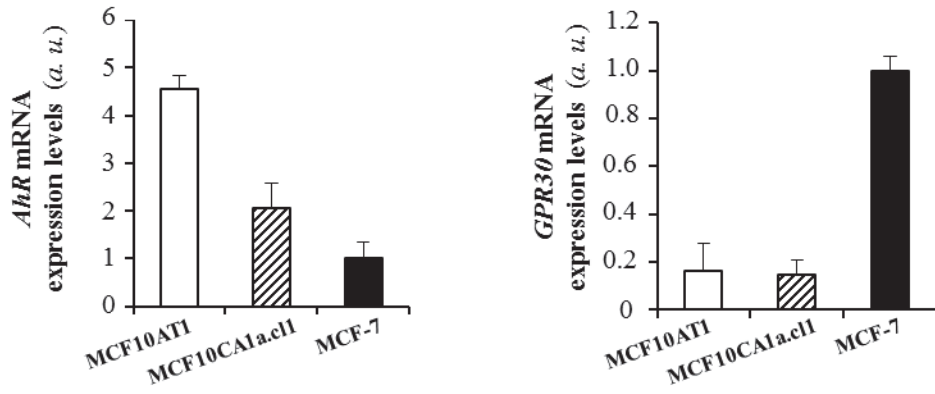


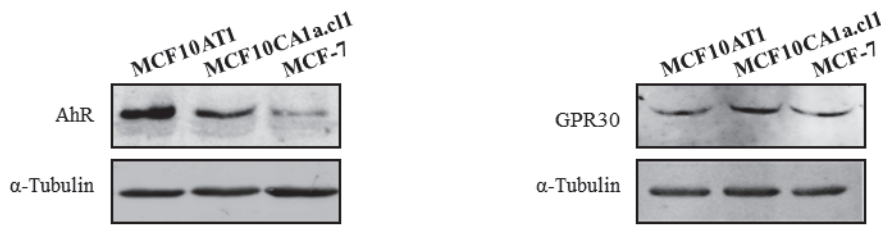
Figure 1. Chronic and low-doses exposure to BPA and/or B(a)P affects the aggressiveness of MCF10AT1 cells in anchorage-independent growth and mammosphere efficiency formation. **(A)**, average number of colonies in soft agar after 60 days-chronic exposure to BPA and/or B(a)P (10^{-10} M) of the MCF10AT1_{60d} cells. Exposures continued in the course of the experiments. NS, not significant; ***, $P < 0.001$ versus unexposed MCF10AT1_{60d}; ###, $P < 0.001$ versus BPA 10^{-10} M; †† $P < 0.01$ versus B(a)P 10^{-10} M; ^{xxx}, $P < 0.001$ versus unexposed MCF10CA1a.cl1_{60d} (Student t-test). **(B)**, average number of primary and secondary mammospheres after 60 days-chronic exposure to BPA and/or B(a)P (10^{-10} M). Exposures continued in the course of the experiments. ***, $P < 0.001$ versus unexposed MCF10AT1_{60d}; #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, ###, $P < 0.001$ versus BPA 10^{-10} M; †††, $P < 0.001$ versus B(a)P 10^{-10} M; ^{xx}, $P < 0.01$, ^{xxx}, $P < 0.001$ versus unexposed MCF10CA1a.cl1_{60d} (Student t-test). **(C, D)** After 60 days of chronic exposure to BPA and/or B(a)P (10^{-10} M), MCF10AT1 cells were grown for further 30 days without any exposure, and single-cell suspensions of cells were seeded in soft agar **(C)** or in non-adherent mammosphere culturing conditions **(D)**. NS, not significant (Student t-test). **(E, F)**, Time-dependent acquisition of the aggressive phenotype: average number of colonies in soft agar **(E)** and of secondary mammospheres **(F)** upon 23, 48 or 60 days of chronic exposure to BPA and/or to B(a)P (10^{-10} M) (mean \pm SD of 3 independent experiments in triplicate). . *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus exposure upon 23 days; #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, ###, $P < 0.001$ exposure upon 48 days versus exposure upon 60 days; †† $P < 0.01$, †††, $P < 0.001$, BPA 10^{-10} M versus [BPA+B(a)P] 10^{-10} M; ^x, $P < 0.05$, ^{xx}, $P < 0.01$, ^{xxx}, $P < 0.001$, B(a)P 10^{-10} M versus [BPA+B(a)P] 10^{-10} M (Student t-test). For **(A, B, E, F)**: Unexposed MCF10CA1a.cl1 cells were used as controls.

Figure 2

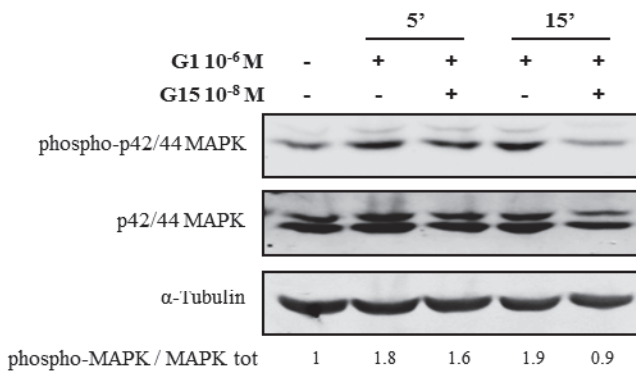
A



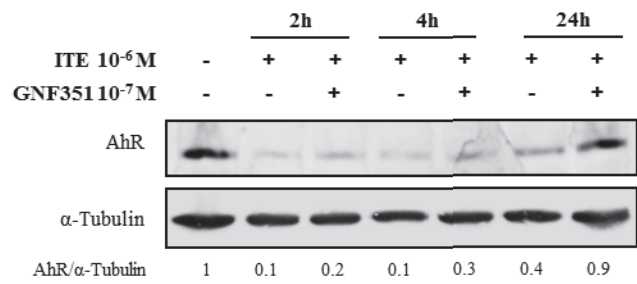
B



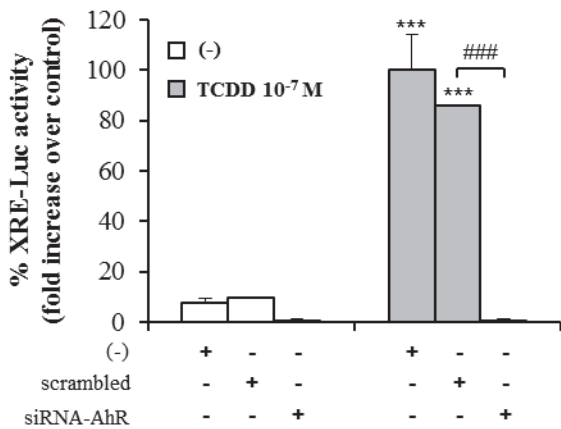
C



D



E



F

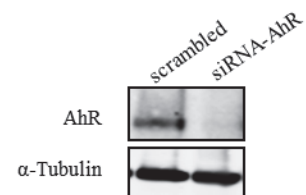
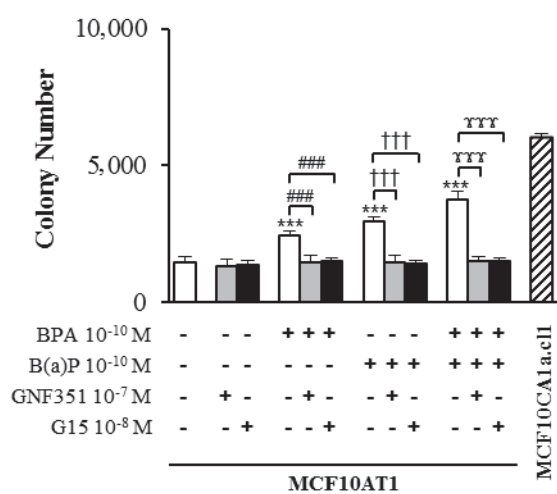


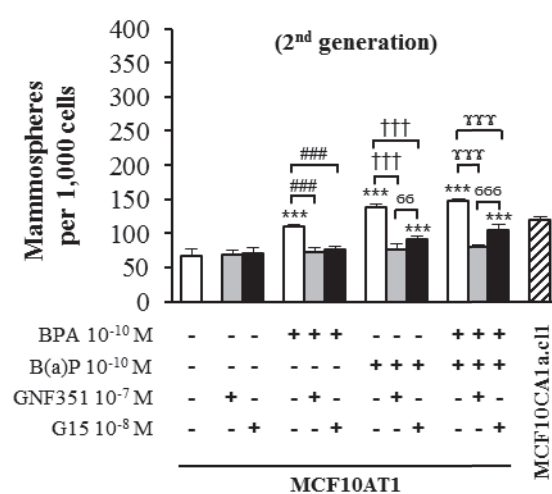
Figure 2. AhR and GPR30 receptors are present and functional in the MCF10AT1 cells. **(A)**, RTQ-PCR analysis of *AhR* and *GPR30* mRNA expression levels represented in arbitrary units (*a.u.*) in the MCF10AT1 and MCF10CA1a.cl1 cells. MCF-7 cells were used as control (mean \pm SD of 3 independent experiments in triplicate). **(B)**, Western blot analysis (representative) from three independent experiments of AhR and GPR30 protein expression in MCF10AT1 and MCF10CA1a.cl1 cells. MCF-7 cells were used as control. **(C)**, western blot analysis (representative from three independent experiments) of the phospho MAPK/MAPK ratio upon exposure of the MCF10AT1 cells with G1 (GPR30 agonist) for the indicated time, in the presence or the absence of a 2 hr pre-exposure with G15 (GPR30 antagonist) **(D)**, western blot analysis representative from three independent experiments to assess the AhR protein expression in MCF10AT1 cells after exposure with the AhR receptor agonist ITE 10^{-6} M for the indicated time, in the presence or the absence of a 2 hr pre-exposure of the antagonist GNF351 10^{-7} M. **(C, D)** Quantification of protein expression levels are normalized to tubulin expression. **(E)**, XRE-luciferase activity of MCF10AT1 cells transfected with either scrambled RNA or siRNA-AhR, and treated or not with Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) 10^{-7} M for 8 hr after 48 hr of siRNA transfection. Firefly luciferase values are normalized against the Renilla value. ***, $P < 0.001$ versus unexposed, ###, $P < 0.001$ versus transfection with the siRNA-AhR (Student t-test). **(F)**, representative western blot from three independent experiments to validate the knockdown of AhR expression after transfection with siRNA-AhR, compared to its scrambled RNA control.

Figure 3

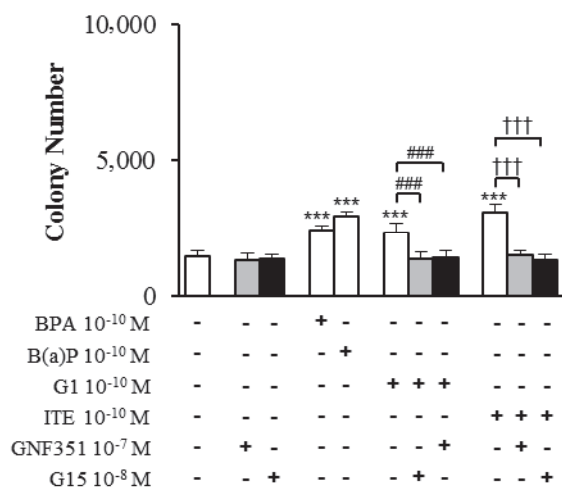
A



B



C



D

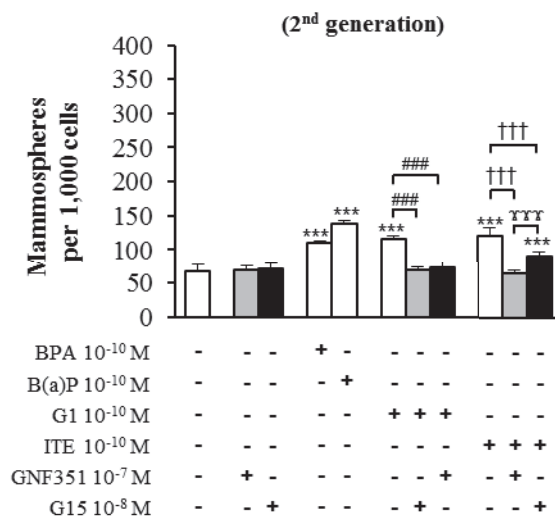
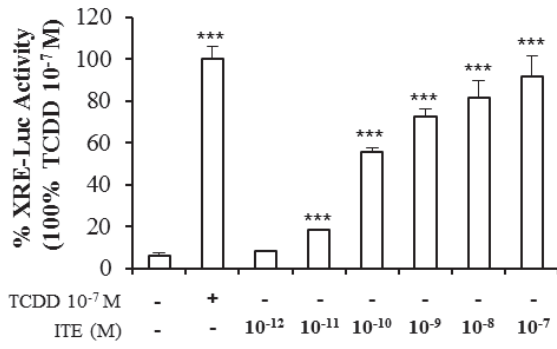


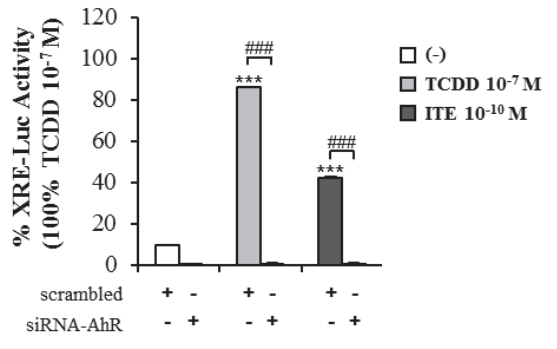
Figure 3. BPA and B(a)P deleterious effects on anchorage independent growth and mammospheres formation in the MCF10AT1 cells are inhibited by GPR30 and AhR receptor antagonists. Average number of colonies in soft agar (**A**) or of secondary mammospheres (**B**) upon 72 hr exposure with BPA and/or B(a)P 10^{-10} M in the presence or the absence of a 2 hr pre-exposure with the AhR antagonist GNF351 10^{-7} M or the GPR30 antagonist G15 10^{-8} M. Exposures continued in the course of the experiments. Unexposed MCF10CA1a.c11 cells were used as controls (mean \pm SD of 3 independent experiments, in triplicates). ***, $P < 0.001$ versus unexposed MCF10AT1 cells; ###, $P < 0.001$ versus BPA 10^{-10} M; †††, $P < 0.001$ versus B(a)P 10^{-10} M; xxx, $P < 0.001$ versus [BPA+B(a)P] 10^{-10} M; $\sigma\sigma$, $P < 0.01$, $\sigma\sigma\sigma$, $P < 0.001$ GNF351 10^{-7} M versus G15 10^{-8} M (Student t-test). (**C**) average number of colonies in soft agar or (**D**) secondary mammospheres upon 72 hr exposure with ITE 10^{-10} M or G1 10^{-10} M in the presence or the absence of 2 hr pre-exposure with GNF351 10^{-7} M or the G15 10^{-8} M. Exposures with BPA 10^{-10} M or B(a)P 10^{-10} M were used as control. Exposures continued in the course of the experiments. Mean \pm SD of 3 independent experiments, in triplicate. ***, $P < 0.001$ versus unexposed MCF10AT1; ###, $P < 0.001$ versus G1 10^{-10} M; †††, $P < 0.001$ versus ITE 10^{-10} M; xxx, $P < 0.001$ GNF351 10^{-7} M versus G15 10^{-8} M (Student t-test).

Figure 4

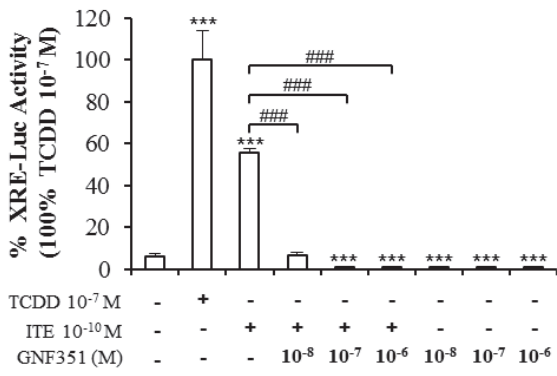
A



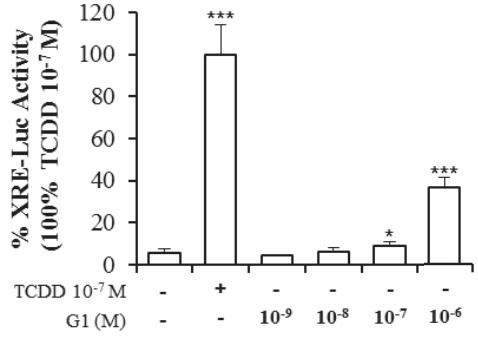
B



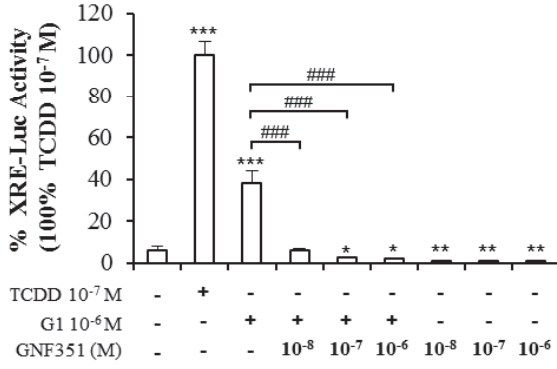
C



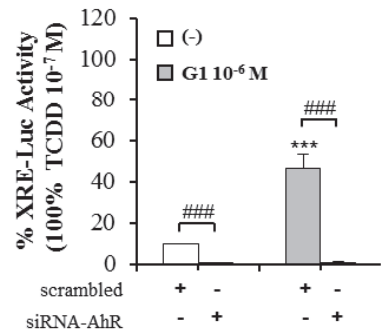
D



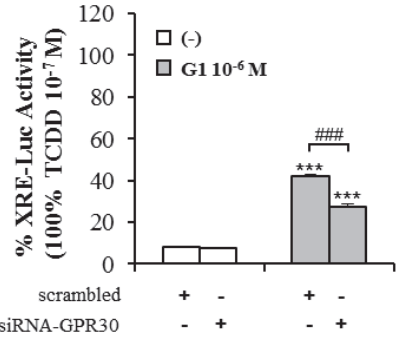
E



F



G



H

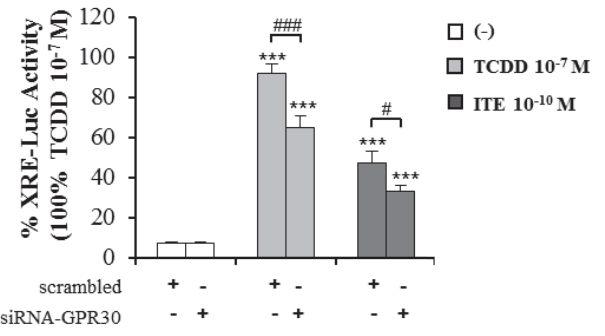


Figure 4. XRE-luciferase assays investigating the transcriptional activation of AhR in presence of ITE and G1 (**A**), XRE-luciferase activity upon 8 hr exposure of MCF10AT1 cells with ITE at the indicated concentrations. TCDD 10^{-7} M was used as control and results were expressed as % of TCDD 10^{-7} M activity. ***, $P < 0.001$ versus unexposed (Student t-test). (**B**), XRE-luciferase activity in MCF10AT1 cells transfected with either scrambled RNA or siRNA-AhR and treated 8 hr with TCDD 10^{-7} M or ITE 10^{-10} M after 48 hr of siRNA transfection. ***, $P < 0.001$ versus unexposed; ###, $P < 0.001$, siRNA-AhR versus scrambled RNA (Student t-test). (**C**), XRE-luciferase activity upon 8 hr-exposure to ITE 10^{-10} M, alone or combined with GNF351 at the indicated concentrations. TCDD 10^{-7} M was used as control, and results were expressed as % of TCDD 10^{-7} M activity. ***, $P < 0.001$ versus unexposed; ###, $P < 0.001$, ITE versus ITE + GNF351 (Student t-test). (**D**), XRE-luciferase activity upon 8 hr exposure with G1 at the indicated concentrations. TCDD 10^{-7} M was used as control. *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$ versus unexposed (Student t-test). (**E**), XRE-luciferase activity upon 8 hr exposure with G1 10^{-6} M alone or in combination with GNF351 at the indicated concentrations. TCDD 10^{-7} M was used as control, and results were expressed as % of TCDD 10^{-7} M activity. ***, $P < 0.001$ versus unexposed; ###, $P < 0.001$, ITE versus ITE + GNF351 (Student t-test). (**F**), XRE-luciferase activity in MCF10AT1 cells transfected with either scrambled RNA or siRNA-AhR and treated 8 hr with G1 10^{-6} M after 48 hr of siRNA transfection. ***, $P < 0.001$ versus unexposed; ###, $P < 0.001$, siRNA-AhR versus scrambled RNA (Student t-test). (**G**), XRE-luciferase activity in MCF10AT1 cells transfected with either scrambled RNA or siRNA-GPR30 and treated 8 hr with G1 10^{-6} M after 48 hr of siRNA transfection. ***, $P < 0.001$ versus unexposed; ###, $P < 0.001$, siRNA-GPR30 versus scrambled RNA (Student t-test). (**H**), XRE-luciferase activity in MCF10AT1 cells transfected with either scrambled RNA or siRNA-GPR30 and treated 8 hr with TCDD 10^{-7} M or ITE 10^{-10} M after 48 hr of siRNA transfection. ***, $P < 0.001$ versus unexposed; #, $P < 0.05$, ###, $P <$

0.001, siRNA-GPR30 *versus* scrambled RNA (Student t-test). All data are mean \pm SD of 3 independent experiments, in triplicates.

Figure 5

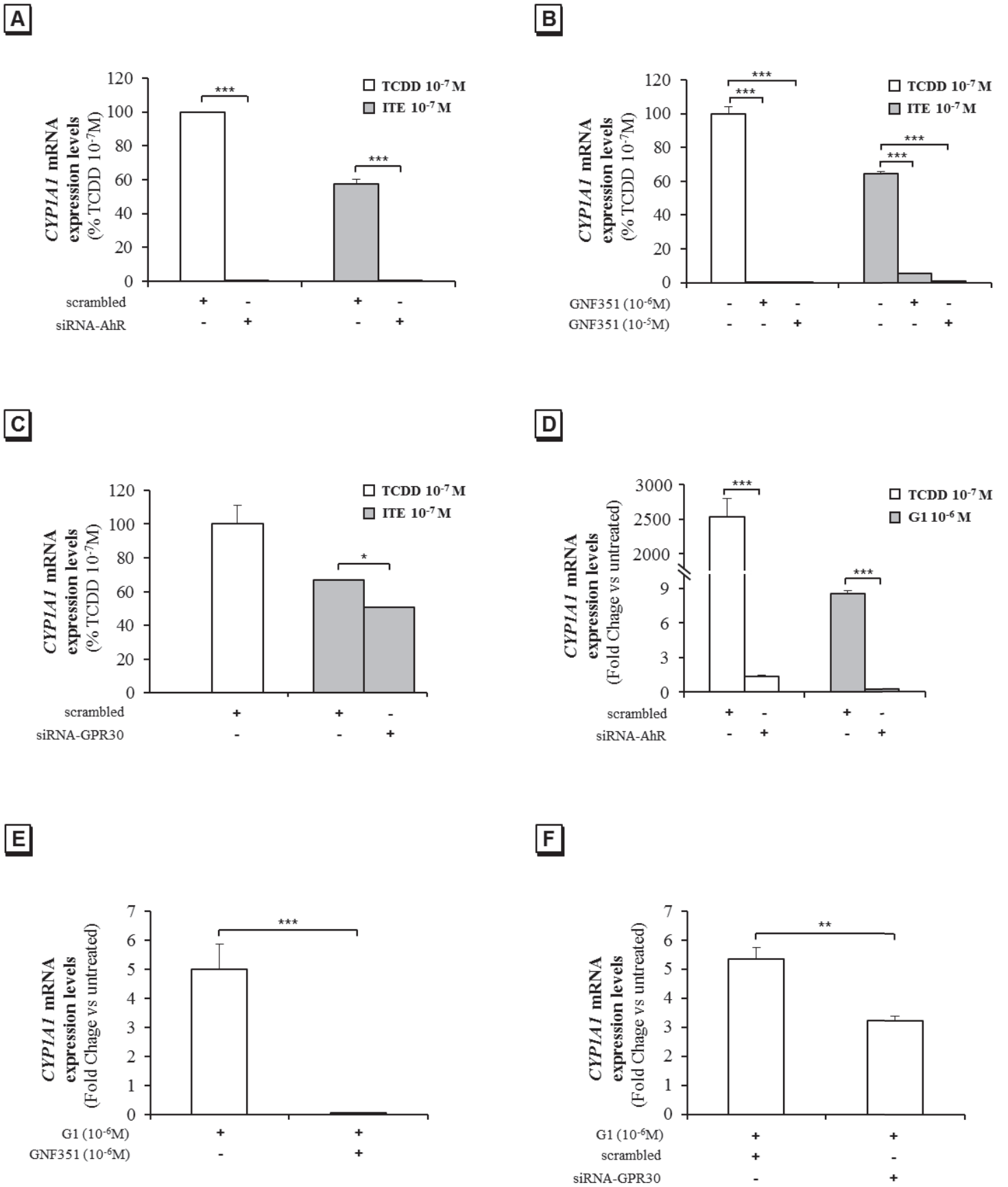
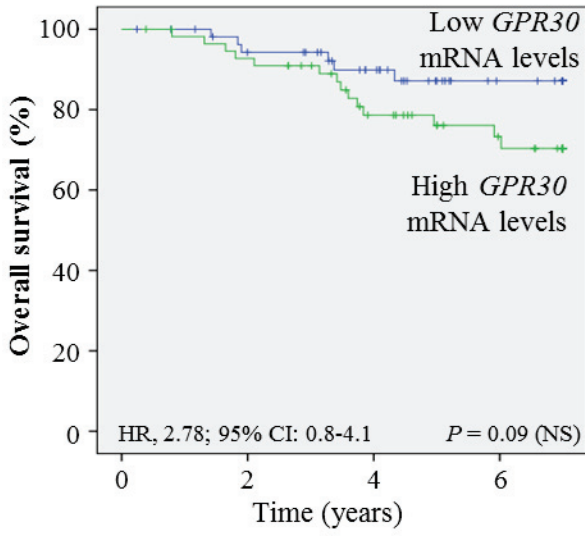


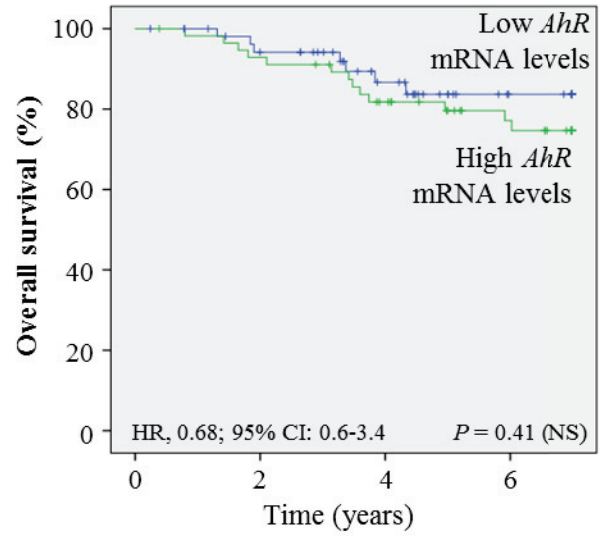
Figure 5. Analysis of *CYP1A1* mRNA levels by quantitative RT-qPCR in MCF10AT1 cells. **(A)**, *CYP1A1* expression levels in cells transfected with either siRNA-AhR or scrambled RNA after 4 hr of exposure with ITE 10^{-7} M. TCDD 10^{-7} M was used as control and results were expressed as % of TCDD 10^{-7} M activity. ***, $P < 0.001$ scrambled *versus* siRNA-AhR (Student t-test). **(B)**, *CYP1A1* expression levels in cells treated with GNF351 alone at indicated concentrations or combined with ITE 10^{-7} M or TCDD 10^{-7} M, TCDD 10^{-7} M was used as control and results were expressed as % of TCDD 10^{-7} M activity. ***, $P < 0.001$ in the presence *versus* in the absence of GNF351 (Student t-test). **(C)**, *CYP1A1* expression levels in cells transfected with either siRNA-GPR30 or scrambled RNA and 4 hr-exposure with ITE 10^{-7} M. TCDD 10^{-7} M was used as control and results were expressed as % of TCDD 10^{-7} M activity. *, $P < 0.05$ scrambled *versus* siRNA (Student t-test). **(D)**, *CYP1A1* expression levels in cells transfected with either siRNA-AhR or scrambled RNA and 24 hr-exposure with G1 10^{-6} M or TCDD 10^{-7} M. TCDD 10^{-7} M was used as control. ***, $P < 0.001$ scrambled RNA *versus* siRNA (Student t-test). **(E)**, *CYP1A1* expression levels in cells treated with G1 10^{-6} M in the presence or absence of GNF351 10^{-6} M. ***, $P < 0.001$, in the presence *versus* the absence of GNF351 (Student t-test). **(F)**, *CYP1A1* expression levels in cells transfected with either siRNA-GPR30 or scrambled RNA and 24 hr-exposure of G1 10^{-6} M. ***, $P < 0.001$ scrambled RNA *versus* siRNA-GPR30 (Student t-test). mean \pm SD of 3 independent experiments, in triplicates.

Figure 6

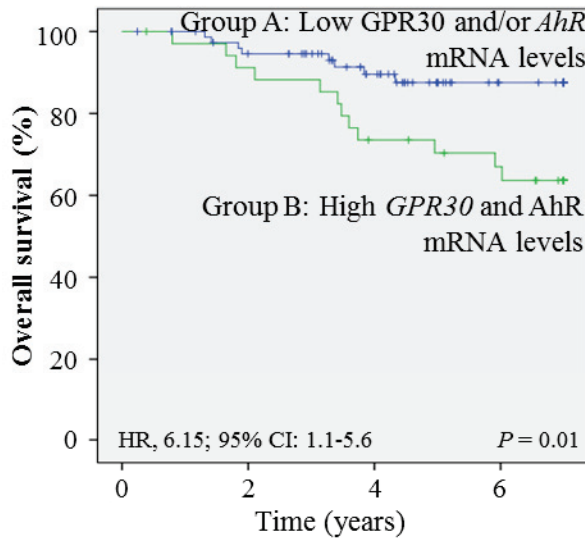
A



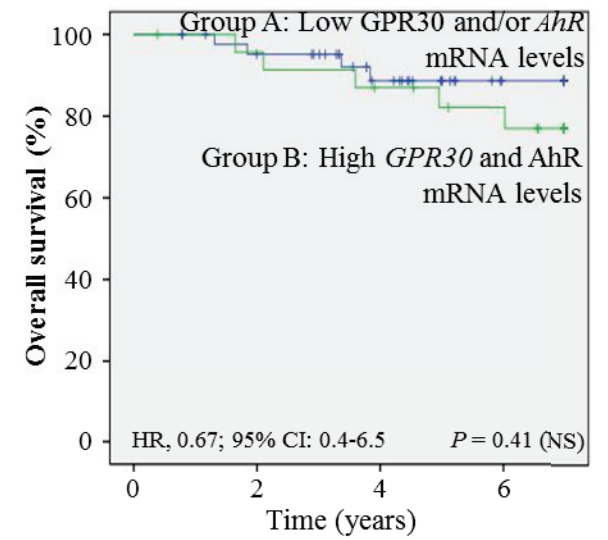
B



C



D



E

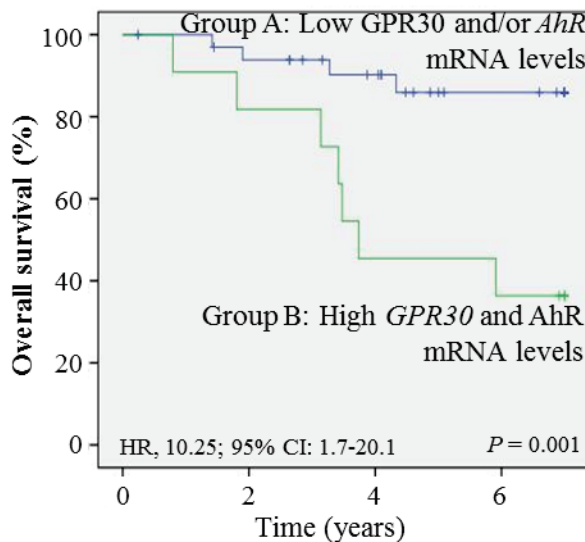


Figure 6. The *GPR30/AhR* gene expression signature is of poor prognostic and is associated with shorter OS. Kaplan-Meier analysis (univariate analysis) for overall survival (OS) in the CLB cohort of: **(A)** *GPR30* mRNA expression levels; **(B)** *AhR* mRNA expression levels; **(C, D, E)**, Patients were divided into two groups: patients expressing low levels of *GPR30* and/or low levels of *AhR* mRNA levels (group A) and patients expressing high mRNA levels of *GPR30* and *AhR* (group B). **(C)**, *GPR30/AhR* gene expression signature in all breast tumor samples **(D)**, *GPR30/AhR* gene expression signature in the ER+ subclass. NS, not significant **(E)**, *GPR30/AhR* gene expression signature in the ER- subclass.

Table S1. Primers used for RTq-PCR measurements

Gene	Forward	Reverse
<i>ESR1</i> (<i>ERα</i>)	5' TGTTCCAAACCCATCGTCAGT 3'	5' TTCACAGAGAGGTCATTGGTTATAGAG 3'
<i>ESR2</i> (<i>ERβ</i>)	5' AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG 3'	5' GATGCTCACTTCTGCGCTGTC 3'
<i>NR1I2</i> (<i>PXR</i>)	5' GGCATGAAGAAGGAGATGAT 3'	5' TTTGACACTACCTTCTCCCA 3'
<i>AHR</i>	5' ACATCACCTACGCCAGTCGC 3'	5' ATCCTTCCAAGCGGCATAGA 3'
<i>GPER1</i> (<i>GPR30</i>)	5' AGGGACAAGCTGAGGCTGTA 3'	5' TTCAGCAGTGCCGTGTAGAC 3'
<i>CYP1A1</i>	5' CAGATCAACCATGACCAGAAGC 3'	5' GCTATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAA 3'
<i>28S</i>	5' CGATCCATCATCCGCAATG 3'	5' GTTGCCTGAGCTTGGCT 3'

Table S2. Characteristics of the 113 patients with primary breast cancers available from the Biological Resources Centre of the Leon Berard Cancer Centre (CLB cohort).

	Number of patients (n = 113)	%
Age (years)		
≤ 70	96	85.0%
> 70	17	15.0%
SBR grade ^{a,b}		
I + II	47	41.6%
III	65	57.5%
Lymph node status		
Node negative	19	16.8%
Node positive	94	83.2%
Macroscopic tumour size ^b		
< 30 mm	43	38.1%
≥ 30 mm	69	61.1%
Estrogen Receptor status		
Positive	68	60.2%
Negative	45	39.8%
Progesterone Receptor status		
Positive	70	61.9%
Negative	43	38.1%
HER2 status ^{b,d}		
Positive	30	26.5%
Negative	82	72.5%

^a Scarff-Bloom-Richardson classification.

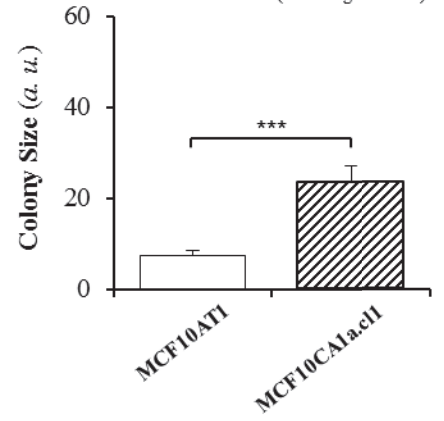
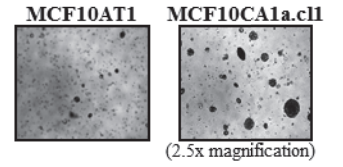
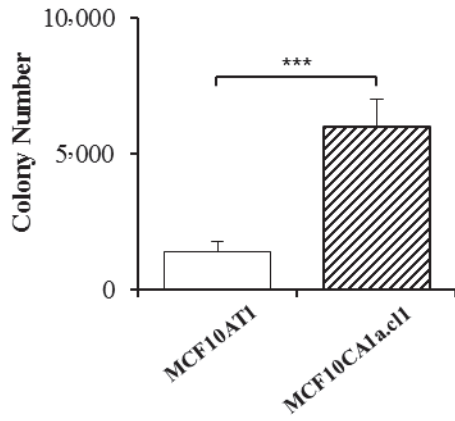
^b Information available for 112 patients.

^c Measured by immunohistochemistry (IHC).

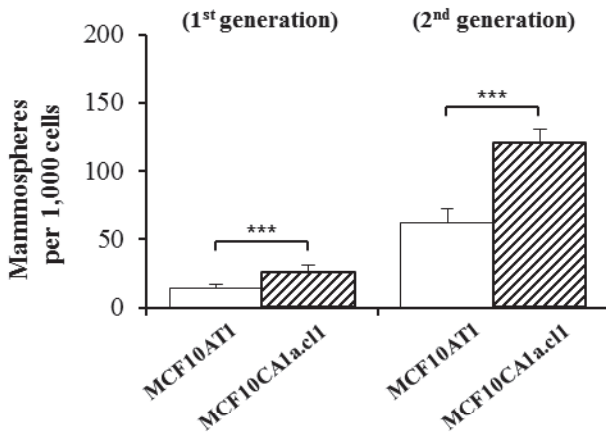
^d Measured by IHC. Few samples were validated by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Figure S1

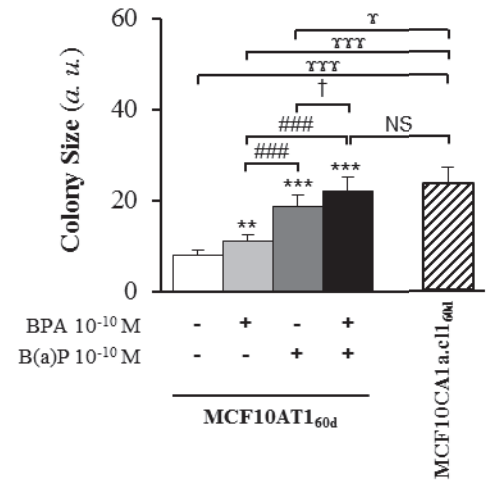
A



B



C



D

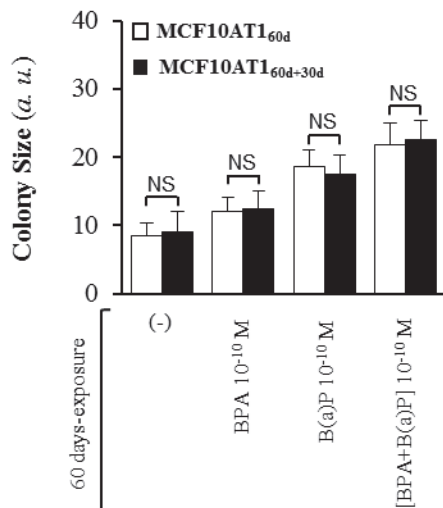


Figure S1. Characterization of the MCF10AT1 cells. **(A)**, left, average number of colonies in soft agar. Single-cell suspensions of MCF10AT1 and MCF10CA1a.cl1 cells were seeded in soft agar, and colonies were counted after 3 weeks of incubation. Right, top, representative images of colonies in soft-agar assay; bottom, average size of the colonies in soft agar. ***, $P < 0.001$ MCF10AT1 *versus* MCF10CA1a.cl1 (Student t-test). **(B)**, average number of mammospheres formed by the MCF10AT1 and MCF10CA1a.cl1 cells. ***, $P < 0.001$ *versus* MCF10CA1a.cl1 (Student t-test). The proportion of mammosphere-forming cells isolated from the PMs greatly increased through the second generation, thus indicating their ability to self-renew. **(C)**, average size of the colonies in soft agar after 60 days of chronic exposure to BPA and/or B(a)P (10^{-10} M) of the MCF10AT1 cells. Unexposed MCF10CA1a.cl1 cells were used as control. NS, not significant; **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ *versus* unexposed MCF10AT1_{60d}; ###, $P < 0.001$ *versus* BPA 10^{-10} M; † $P < 0.05$ *versus* B(a)P 10^{-10} M ; x, $P < 0.05$, xxx, $P < 0.001$ *versus* MCF10CA1a.cl (Student t-test). **(D)**, Average size of the colonies in soft agar after 60 days of chronic exposure to BPA and/or B(a)P (10^{-10} M), cells were grown for further 30 days without any exposure and seeded in soft agar. NS, not significant (Student t-test). *a.u.*, arbitrary units. All data are mean \pm SD (standard deviation) of 3 independent experiments, in triplicates.

Figure S2

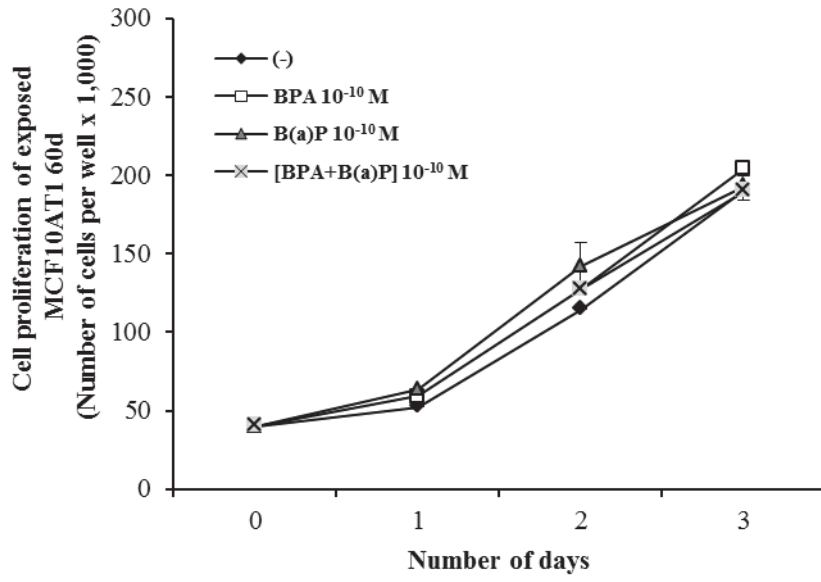


Figure S2. BPA and/or B(a)P 10^{-10} M chronic exposure does not affect the proliferation of MCF10AT_{160d} cells.

Figure S3

A

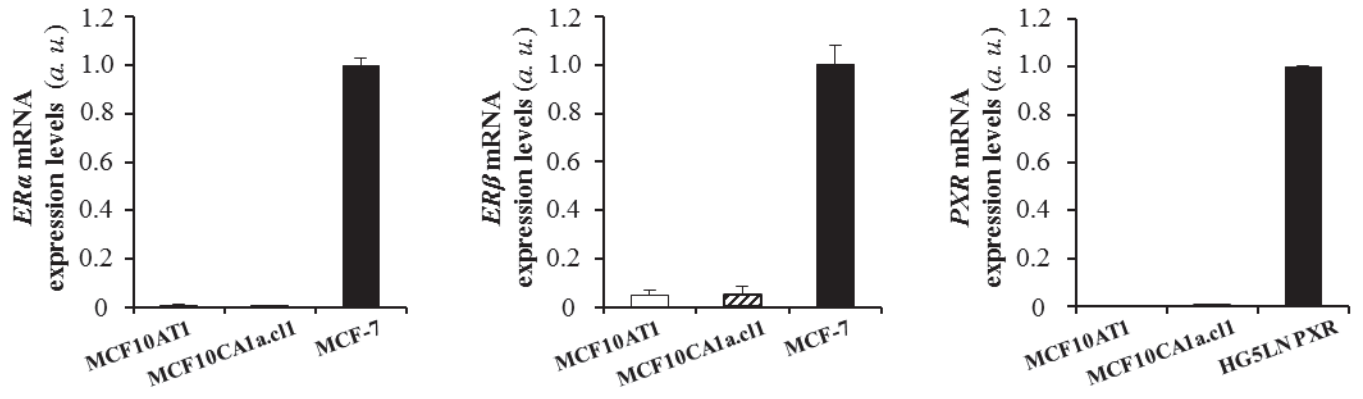
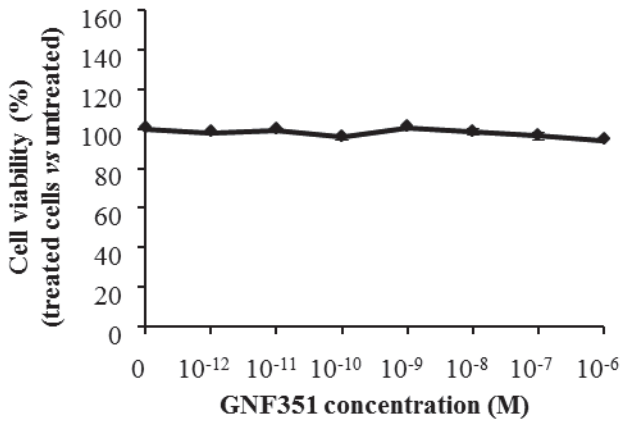


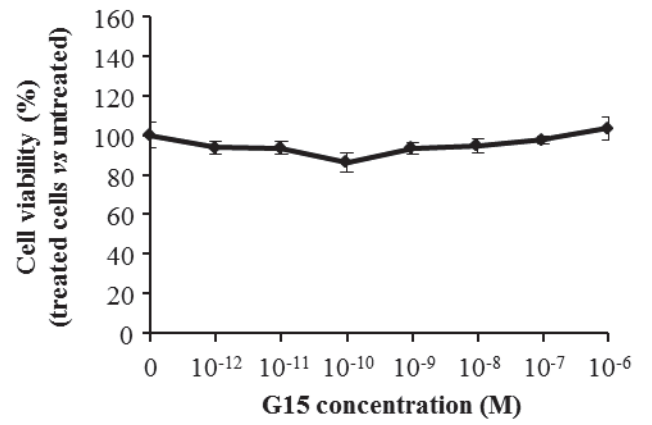
Figure S3. RTQ-PCR analysis of *ER α* , *ER β* and *PXR* mRNA expression levels represented in arbitrary units (*a.u.*) in MCF10AT1 cells. ER-positive MCF-7 and PXR-positive HG5LN PXR cells were used as control (mean \pm SD of 3 independent experiments in triplicate).

Figure S4

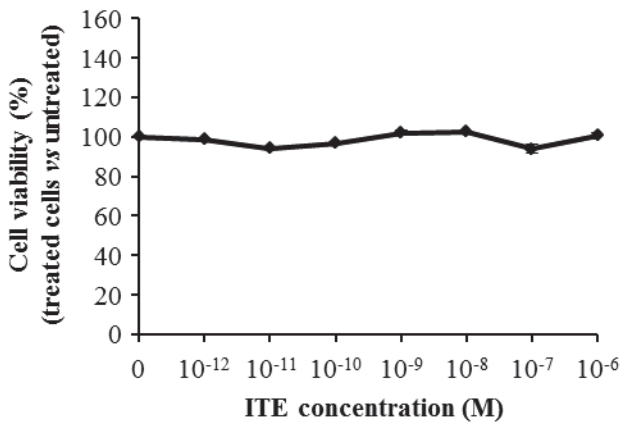
A



B



C



D

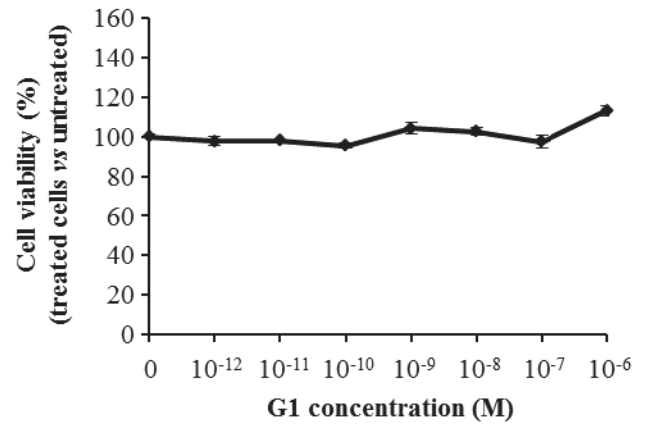
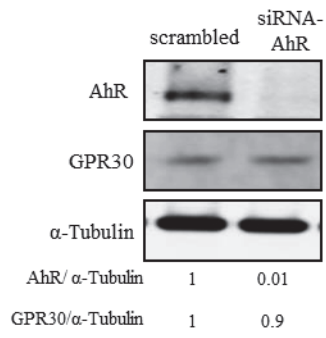


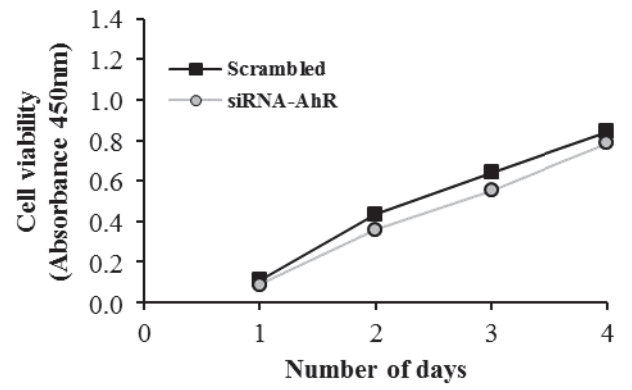
Figure S4. Cell viability assay of the MCF10AT1 cells exposed or not to *(A)*, GNF351. *(B)*, G15. *(C)*, ITE. *(D)* G1. The different molecules were tested at the indicated concentrations (mean \pm SD of 3 independent experiments in triplicate).

Figure S5

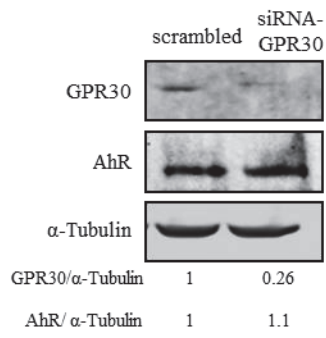
A



B



C



D

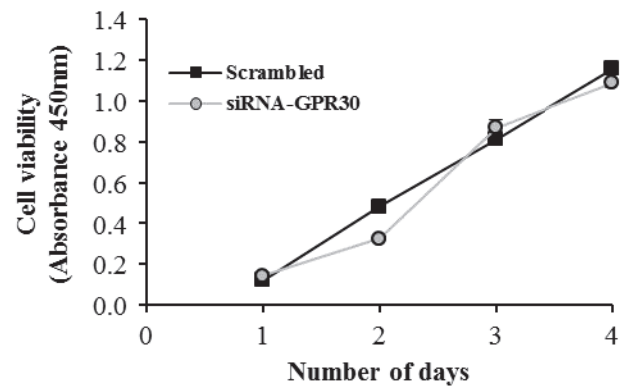


Figure S5. *(A)*, Western blot analysis representative from three independent experiments of AhR and GPR30 expression in transfected MCF10AT1 cells with either scrambled RNA or siRNA-AhR. Quantification of protein expression levels was normalized to tubulin expression. *(B)*, cell viability of MCF10AT1 cells transfected with either scrambled or siRNA-AhR. Values are mean \pm SD, of 2 independent experiments in quadruplicates. *(C)*, same as *(A)*, but using siRNA-GPR30 and its corresponding scrambled RNA. *(D)*, same as *(B)*, but using siRNA-GPR30 and its corresponding scrambled RNA.

References

- Acconcia F, Pallottini V, Marino M. 2015. Molecular mechanisms of action of bpa. *Dose Response* 13:1559325815610582.
- Al-Dhfyhan A, Alhoshani A, Korashy HM. 2017. Erratum to: Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome p450 1a1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through pten inhibition and beta-catenin and akt activation. *Mol Cancer* 16:69.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45:106-114.
- Benigni R, Bossa C. 2011. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. *Chem Rev* 111:2507-2536.
- Besaratinia A, Maas LM, Brouwer EMC, Moonen EJC, De Kok TMCM, Wesseling GJ, et al. 2002. A molecular dosimetry approach to assess human exposure to environmental tobacco smoke in pubs. *Carcinogenesis* 23:1171-1176.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, et al. 2006. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for gpr30. *Nat Chem Biol* 2:207-212.
- Calaf G, Russo J. 1993. Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 14:483-492.
- Caruso JA, Reiners JJ, Jr., Emond J, Shultz T, Tainsky MA, Alaoui-Jamali M, et al. 2001. Genetic alteration of chromosome 8 is a common feature of human mammary epithelial cell lines transformed in vitro with benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 473:85-99.
- Chapellier M, Bachelard-Cascales E, Schmidt X, Clement F, Treilleux I, Delay E, et al. 2015. Disequilibrium of bmp2 levels in the breast stem cell niche launches epithelial transformation by overamplifying bmp1b cell response. *Stem Cell Reports* 4:239-254.
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. 2008. Cancer stem cells in breast: Current opinion and future challenges. *Pathobiology* 75:75-84.
- Ciolino HP, Yeh GC. 1999. Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome p-450 1a1 enzyme activity and cyp1a1 expression by resveratrol. *Mol Pharmacol* 56:760-767.
- Clement F, Xu X, Donini CF, Clement A, Omarjee S, Delay E, et al. 2016. Long-term exposure to bisphenol a or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to bmp2 and bmp4, by pre-activating bmp signaling. *Cell Death Differ*.
- Davarinos NA, Pollenz RS. 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 274:28708-28715.
- Dawson PJ, Wolman SR, Tait L, Heppner GH, Miller FR. 1996. Mcf10at: A model for the evolution of cancer from proliferative breast disease. *Am J Pathol* 148:313-319.
- DeBruin LS, Josephy PD. 2002. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 1:119-128.
- Delfosse V, Grimaldi M, le Maire A, Bourguet W, Balaguer P. 2014. Nuclear receptor profiling of bisphenol-a and its halogenated analogues. *Vitam Horm* 94:229-251.
- Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, et al. 2009. In vivo effects of a gpr30 antagonist. *Nat Chem Biol* 5:421-427.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17:1253-1270.
- FAO/WHO JFWEMtRTaHAoBAOO, Organization WH, Nations FaAOotU, FAO/WHO SMOBAOO. 2011. Toxicological and health aspects of bisphenol a : Report of joint fao/who expert meeting 2-5 november 2010 and report of stakeholder meeting on bisphenol a, 1

november 2010 ottawa, canada / food and agriculture organization of the united nations, world health organization.:Geneva : World Health Organization, c2011.

Farnie G, Clarke RB. 2007. Mammary stem cells and breast cancer--role of notch signalling. *Stem Cell Rev* 3:169-175.

Fernandez SV, Russo J. 2010. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol Pathol* 38:110-122.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. 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* 14:1649-1660.

Fujii-Kuriyama Y, Mimura J. 2005. Molecular mechanisms of ahr functions in the regulation of cytochrome p450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338:311-317.

Fujita K, Kamataki T. 2001. Predicting the mutagenicity of tobacco-related n-nitrosamines in humans using 11 strains of salmonella typhimurium yg7108, each coexpressing a form of human cytochrome p450 along with nadph-cytochrome p450 reductase. *Environ Mol Mutagen* 38:339-346.

Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barcelo D. 2016. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res* 151:251-264.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol* 24:2206-2223.

Grover PLM, Francis L. 2002. The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis* Vol. 23: p. 1095-1102.

Guengerich FP. 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21:345-351.

Guo J, Xu Y, Ji W, Song L, Dai C, Zhan L. 2015. Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ros-erk-mmp9 axis signaling. *Toxicol Lett* 234:201-210.

Gyorffy B, Benke Z, Lanczky A, Balazs B, Szallasi Z, Timar J, et al. 2012. Recurrenceonline: An online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data. *Breast Cancer Res Treat* 132:1025-1034.

Hall JM, Bar Hoover MA, Kazmin D, McDonnell DP, Greenlee WF, Thomas RS. 2010. Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation. *Mol Endocrinol* 24:359-369.

Hecht SS, Carmella SG, Chen M, Dor Koch JF, Miller AT, Murphy SE, et al. 1999. Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Res* 59:590-596.

Hecht SS. 2002. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ Mol Mutagen* 39:119-126.

Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. 1996. Expression of cytochromes p450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos* 24:899-905.

Hughes D, Guttenplan JB, Marcus CB, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. 2008. Heat shock protein 90 inhibitors suppress aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyp1a1 and cyp1b1 transcription and DNA adduct formation. *Cancer Prev Res (Phila)* 1:485-493.

IARC. 2012. Chemical agents and related occupations. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100:9-562.

Imbert A, Chaffanet M, Essioux L, Noguchi T, Adelaide J, Kerangueven F, et al. 1996. Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and werner syndrome. *Genomics* 32:29-38.

Jaiswal AS, Panda H, Pampo CA, Siemann DW, Gairola CG, Hromas R, et al. 2013. Adenomatous polyposis coli-mediated accumulation of abasic DNA lesions lead to cigarette smoke condensate-induced neoplastic transformation of normal breast epithelial cells. *Neoplasia* 15:454-460.

Jenkins S, Betancourt AM, Wang J, Lamartiniere CA. 2012. Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129:191-200.

Kakarala M, Wicha MS. 2008. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 26:2813-2820.

Kelloff GJ, ed. 2005. *Cancer chemoprevention*.

Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Kallioniemi OP, Isola J. 1997. Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 150:1465-1471.

Leffall L KM. 2009. *Reducing environmental cancer risk*. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2010. .

Lemaire G, Benod C, Nahoum V, Pillon A, Boussioux AM, Guichou JF, et al. 2007. Discovery of a highly active ligand of human pregnane x receptor: A case study from pharmacophore modeling and virtual screening to "in vivo" biological activity. *Mol Pharmacol* 72:572-581.

Marchese S, Silva E. 2012. Disruption of 3d mcf-12a breast cell cultures by estrogens--an in vitro model for er-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis. *PLoS One* 7:e45767.

Mehta RG. 2000. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer* 36:1275-1282.

Mihaly Z, Kormos M, Lanczky A, Dank M, Budczies J, Szasz MA, et al. 2013. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 140:219-232.

Miller FR. 2000. Xenograft models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:379-391.

Morris JJ, Seifter E. 1992. The role of aromatic hydrocarbons in the genesis of breast cancer. *Med Hypotheses* 38:177-184.

Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the cyp1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279:23847-23850.

Obana H, Hori S, Kashimoto T, Kunita N. 1981. Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver. *Bull Environ Contam Toxicol* 27:23-27.

Pluchino LA, Wang HC. 2014. Chronic exposure to combined carcinogens enhances breast cell carcinogenesis with mesenchymal and stem-like cell properties. *PLoS One* 9:e108698.

Rasmussen MK, Balaguer P, Ekstrand B, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S. 2016. Skatole (3-methylindole) is a partial aryl hydrocarbon receptor agonist and induces cyp1a1/2 and cyp1b1 expression in primary human hepatocytes. *PLoS One* 11:e0154629.

Rathore K, Wang HC. 2012. Green tea catechin extract in intervention of chronic breast cell carcinogenesis induced by environmental carcinogens. *Mol Carcinog* 51:280-289.

Rathore K, Wang HC. 2013. Mesenchymal and stem-like cell properties targeted in suppression of chronically-induced breast cell carcinogenesis. *Cancer Lett* 333:113-123.

- Roukos DH, Murray S, Briasoulis E. 2007. Molecular genetic tools shape a roadmap towards a more accurate prognostic prediction and personalized management of cancer. *Cancer Biol Ther* 6:308-312.
- Rubin H. 2001. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: A bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 22:1903-1930.
- Rudel RA, Fenton SE, Ackerman JM, Euling SY, Makris SL. 2011. Environmental exposures and mammary gland development: State of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ Health Perspect* 119:1053-1061.
- Rundle A, Tang D, Hibshoosh H, Estabrook A, Schnabel F, Cao W, et al. 2000. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis* 21:1281-1289.
- Russo J, Tahin Q, Lareef MH, Hu YF, Russo IH. 2002. Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens. *Environ Mol Mutagen* 39:254-263.
- Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo J. 1999. Sensitive method for the determination of bisphenol-a in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 736:255-261.
- Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. 2016. A review of the carcinogenic potential of bisphenol a. *Reprod Toxicol* 59:167-182.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, et al. 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome p-450 1b1. *Cancer Res* 56:2979-2984.
- Shimada T, Oda Y, Gillam EM, Guengerich FP, Inoue K. 2001. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes p450 1a1 and p450 1b1 allelic variants and other human cytochromes p450 in salmonella typhimurium nm2009. *Drug Metab Dispos* 29:1176-1182.
- Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, et al. 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:779-782.
- Shou M, Harvey RG, Penning TM. 1993. Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis* 14:475-482.
- Siriwardhana N, Wang HC. 2008. Precancerous carcinogenesis of human breast epithelial cells by chronic exposure to benzo[a]pyrene. *Mol Carcinog* 47:338-348.
- Smith KJ, Murray IA, Tanos R, Tellew J, Boitano AE, Bisson WH, et al. 2011. Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* 338:318-327.
- Smith TJ, Stoner GD, Yang CS. 1995. Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (nnk) in human lung microsomes by cytochromes p450, lipoxygenase, and hydroperoxides. *Cancer Res* 55:5566-5573.
- Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, et al. 2002. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14694-14699.
- Song X, Siriwardhana N, Rathore K, Lin D, Wang HC. 2010. Grape seed proanthocyanidin suppression of breast cell carcinogenesis induced by chronic exposure to combined 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene. *Mol Carcinog* 49:450-463.
- Takeuchi T, Tsutsumi O. 2002. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291:76-78.

Thollet A, Vendrell JA, Payen L, Ghayad SE, Ben Larbi S, Grisard E, et al. 2010. Znf217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of aurora-a in breast cancer cells. *Mol Cancer* 9:291.

Thomas P, Dong J. 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor gpr30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:175-179.

Vendrell JA, Thollet A, Nguyen NT, Ghayad SE, Vinot S, Bieche I, et al. 2012a. Znf217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion. *Cancer Res* 72:3593-3606.

Vendrell JA, Thollet A, Nguyen NT, Ghayad SE, Vinot S, Bieche I, et al. 2012b. Znf217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion. *Cancer Research* 72:3593-3606.

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol a action. *Reprod Toxicol* 24:178-198.

Williams DE. 2012. The rainbow trout liver cancer model: Response to environmental chemicals and studies on promotion and chemoprevention. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155:121-127.

Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14:473-486.

Wong PS, Li W, Vogel CF, Matsumura F. 2009. Characterization of mcf mammary epithelial cells overexpressing the arylhydrocarbon receptor (ahr). *BMC Cancer* 9:234.

B. Résultats complémentaires à l'article

1. Validation de l'implication des récepteurs AhR et GPR30 dans le phénotype observé dans les cellules MCF10AT1 par des siRNA spécifiques

Les siRNA spécifiques de GPR30 et d'AhR ont été utilisés pour des tests de mammosphères afin i) de préciser la spécificité de l'implication d'AhR et de GPR30 dans les effets médiés par les agonistes G1 et ITE des deux récepteurs, mais surtout par les facteurs environnementaux BPA et B[a]P, ii) de valider les résultats obtenus avec les antagonistes (G15 et GNF351). Ainsi, l'effet de l'extinction des récepteurs sur la formation de mammosphères et de colonies en présence des agonistes et des molécules environnementales a pu être étudiée.

En mammosphères, dans les cellules transfectées avec le scrambled contrôle du siRNA-GPR30 et avec le scrambled contrôle du siRNA-AhR, on retrouve le phénotype attendu sous traitement au BPA 10^{-10} M seul, B[a]P 10^{-10} M seul et à la combinaison des deux (BPA+B[a]P) 10^{-10} M (avec un effet plus important de celle-ci par rapport aux molécules testées individuellement). De même, ce phénotype est également induit par les molécules agonistes de GPR30 et d'AhR (G1 et ITE, respectivement) (**Figure 21 A, 21 B**). Le siRNA-AhR inhibe la formation des mammosphères dans toutes les conditions testées (**Figure 21 A**). De la même manière, le siRNA-GPR30 est capable d'inhiber totalement la formation des mammosphères BPA et G1-induites. Tandis que l'inhibition de la formation des mammosphères B[a]P, BPA+B[a]P et ITE-dépendantes est presque totale mais reste néanmoins significative (**Figure 21 B**).

Ces résultats obtenus avec les siRNA complètent ceux obtenus avec les antagonistes des récepteurs (G15 et GNF351) (cf Figure 3 de l'article) et nous confirment l'implication d'AhR et de GPR30 dans la médiation des effets des facteurs environnementaux BPA et B[a]P.

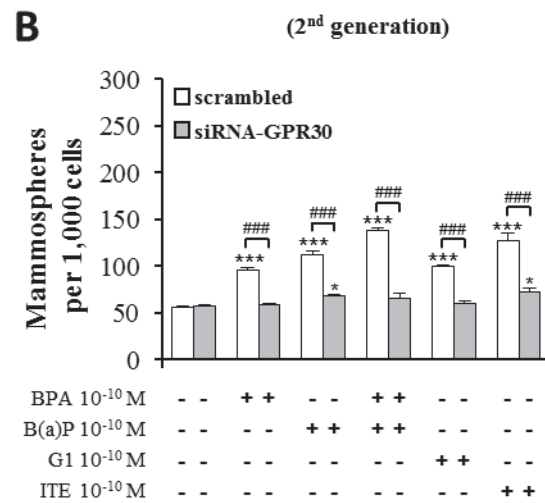
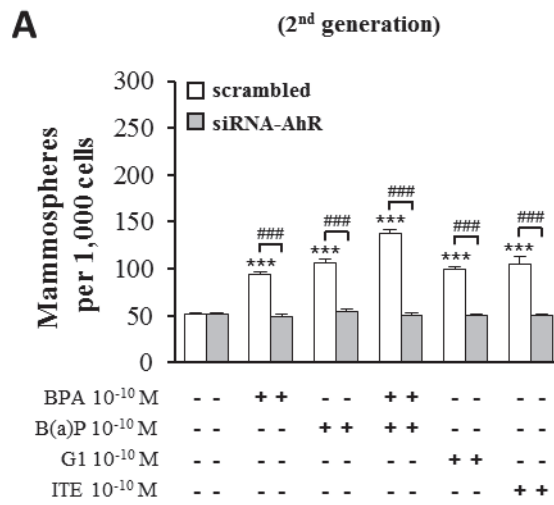


Figure 21: Les effets des siRNA-AhR et siRNA-GPR30 sur la capacité à former des mammosphères

(A, B) Les effets des molécules environnementales et des agonistes sont inhibés en présence des siRNA AhR et GPR30 en mammosphères. La significativité des résultats a été déterminée par le test T de Student. *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$, versus non exposé; ###, $P < 0.001$ scrambled RNA versus siRNA

2. Cinétique de l'expression de *CYP1A1* en RT-qPCR

Afin d'optimiser les conditions d'induction de l'expression d'ARNm de *CYP1A1* par les agonistes des récepteurs AhR et GPR30, une étude de la cinétique d'expression a été réalisée. En se référant à la bibliographie, on a choisi d'évaluer l'expression de *CYP1A1* après 4 heures, 8 heures et 24 heures de traitement au G1 10^{-6} M, ITE 10^{-6} M, TCDD 10^{-8} M. Nos résultats montrent une meilleure induction du *CYP1A1* par le G1 à 24 heures post-traitement, par l'ITE à 4 heures post-traitement, tandis que le TCDD montre une forte induction pour les trois temps testés (**Figure 22**). Ce sont les conditions qui ont été choisies pour les expériences représentées dans la figure 5 de l'article.

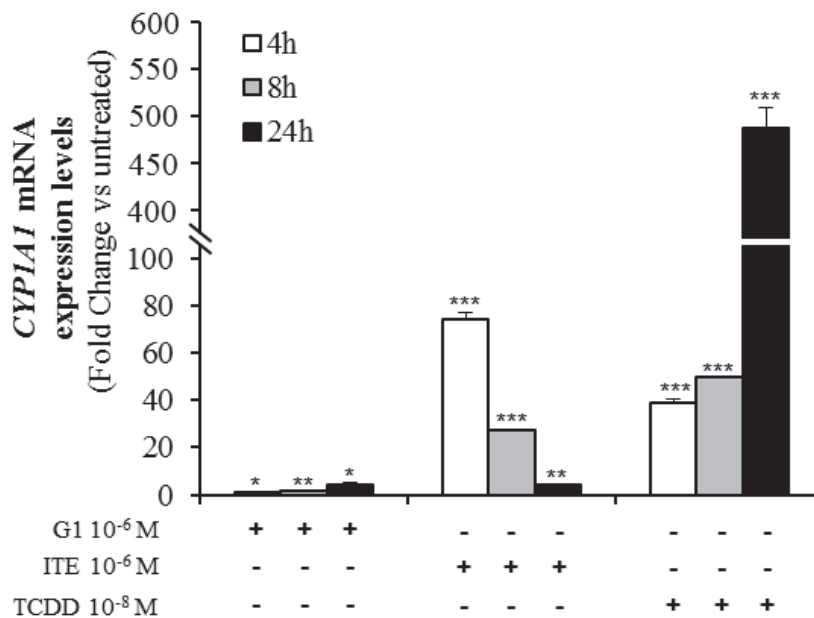


Figure 22 : Etude de la cinétique de l'expression du *CYP1A1* par RT-qPCR

Etude de la cinétique de l'expression du *CYP1A1* par RT-qPCR dans les cellules MCF10AT1 sous différents traitements G1 10^{-6} M, ITE 10^{-6} M, TCDD 10^{-8} M. h : nombre d'heures de traitement. La significativité des résultats a été déterminée par le test T de Student. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus non exposé.

3. G15, l'antagoniste de GPR30, induit l'expression de l'activité transcriptionnelle d'AhR en gène rapporteur et l'expression de *CYP1A1* en RT-qPCR

En technique du gène rapporteur (XRE-luciférase), l'agoniste de GPR30 (G1) à une dose de 10^{-6} M induit l'activité transcriptionnelle d'AhR de façon significative. De manière surprenante, nous avons observé que l'antagoniste de GPR30 (G15) montre un effet agoniste en induisant l'activité transcriptionnelle d'AhR de façon significative à partir de 10^{-7} M. Logiquement G15 ne démontre aucune activité inhibitrice vis-à-vis de G1. (**Figure 23**).

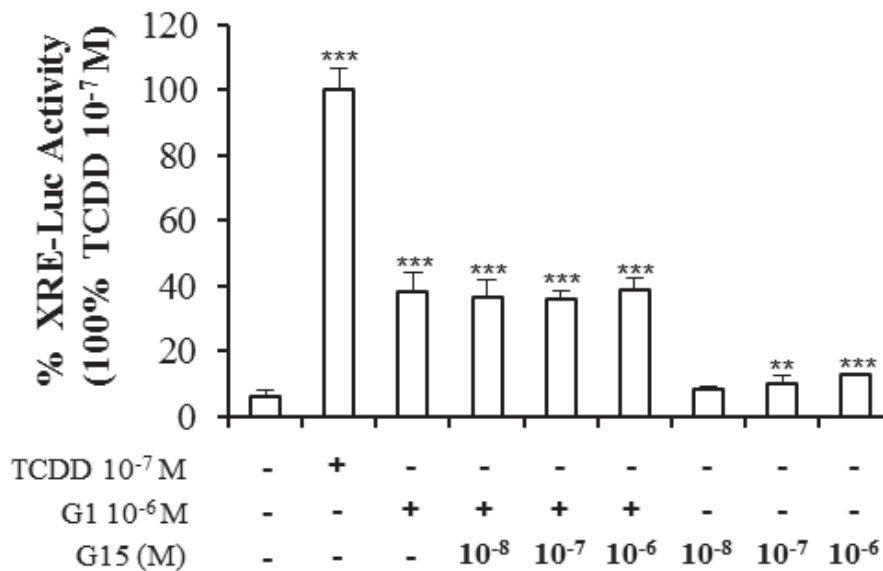


Figure 23 : L'activité transcriptionnelle d'AhR en présence du G1 à 10^{-6} M et le G15 aux différentes concentrations indiquées

L'activité transcriptionnelle d'AhR par technique du gène rapporteur des cellules MCF10AT1 traitées pendant 8 heures avec la TCDD à 10^{-7} M, le G1 à 10^{-6} M et le G15 aux différentes concentrations indiquées. La TCDD est utilisée comme un contrôle de l'activité transcriptionnelle d'AhR, et les résultats sont présentés en % par rapport à l'activité de la TCDD. La significativité des résultats a été déterminée par le test T de Student. **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus non exposé.

En RT-qPCR, après avoir traité les cellules MCF10AT1 pendant 4 heures ou 24 heures au G15 10^{-5} M ou G15 10^{-6} M, nous avons observé une surexpression de *CYP1A1* par le G15 de façon dose-dépendante dans les deux temps testés (**Figure 24**).

Nos résultats montrent, grâce à deux techniques différentes, que le G15 possède un léger effet agoniste qui bloque son utilisation en tant qu'inhibiteur complet en technique de gène rapporteur XRE-luc et en RT-qPCR.

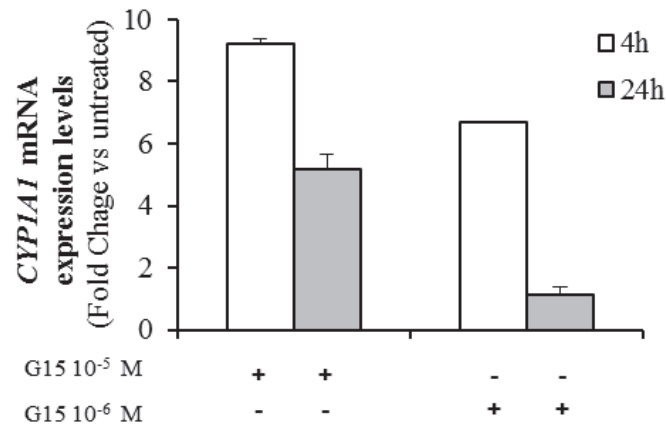


Figure 24 : L'expression du *CYPIA1* par RT-qPCR en présence de l'antagoniste de GPR30 (G15).

L'expression du *CYPIA1* par RT-qPCR en présence de l'antagoniste de GPR30 (G15). Les niveaux d'expression d'ARNm sont représentés en fold change par rapport aux cellules non traitées.

4. Impact de l'agoniste de GPR30 (G1) sur la prolifération cellulaire de la lignée MCF10AT1

Une étude récente montre que le G1 à 10^{-6} M et à 10^{-5} M induit l'expression du *CYPIA1* et que cet effet est une conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire (Tarnow *et al.* 2016). Nous avons donc voulu déterminer l'effet du G1 sur la prolifération cellulaire dans la lignée MCF10AT1. Pour cela, nous avons testé les concentrations utilisées dans nos expériences de gène rapporteur, RT-qPCR (à 10^{-6} M), de soft agar et de mammosphères (à 10^{-10} M). De manière intéressante, nos résultats montrent que les cellules MCF10AT1 traitées au G1, soit à 10^{-6} M soit à 10^{-10} M, ne présentent pas de différence significative de prolifération par rapport aux cellules non traitées (**Figure 25**). Ce résultat ne confirme pas l'effet stimuloire du G1 sur le cycle cellulaire publié par Tarnow *et al.* (Tarnow *et al.* 2016), qui utilisait le G1 à 10^{-5} M et à

10^{-6} M. Nous n'avons pas pu tester ces concentrations car G1 à 10^{-5} M ou à $5 \cdot 10^{-6}$ M est toxique pour les cellules MCF10AT1 (data not shown).

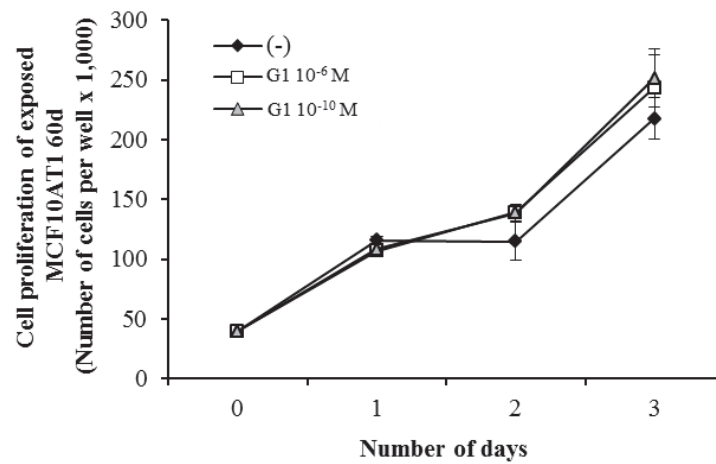


Figure 25 : La prolifération cellulaire des cellules MCF10AT1 en présence du G1 10^{-6} M et 10^{-10} M

L'impact de l'exposition G1 à 10^{-6} M et à 10^{-10} M sur la prolifération cellulaire de la lignée MCF10AT1. La prolifération cellulaire a été évaluée tous les jours pendant 4 jours. La significativité des résultats a été déterminée par le test T de Student. Pas de différence significative observée.

5. Impact des antagonistes des récepteurs dans la prévention des effets associées à l'exposition chronique et faible dose (BPA+B[a]P)

Après avoir démontré l'implication des deux récepteurs AhR et GPR30 dans la médiation des effets délétères des molécules environnementales dans les cellules MCF10AT1, nous avons exploré la possibilité de prévenir ces effets en présence des antagonistes pendant une exposition chronique. Pour cela, nous avons effectué une nouvelle exposition chronique de 60 jours et à faible dose des cellules MCF10AT1 aux BPA et B[a]P en combinaison en présence ou en absence des antagonistes des récepteurs (GNF351, G15), seuls ou combinés. Après cette exposition de 60 jours, les cellules exposées ont été testées dans des expérimentations de mammosphères et de soft agar. La nouvelle exposition des MCF10AT1 à la combinaison (BPA+B[a]P) est capable d'induire la formation de colonies et de mammosphères de manière reproductible par rapport à la première exposition (Figures 1A et 1B de l'article). En revanche, nous avons montré de manière très intéressante qu'en présence des antagonistes d'AhR seul, de GPR30 seul ou des deux combinés, la combinaison (BPA+B[a]P) n'induit plus la formation de mammosphères (**Figure 26 A**) et de colonies

(Figure 26 B). Ce résultat montre que les antagonistes d'AhR et de GPR30 sont capables de prévenir les effets délétères d'une exposition chronique à la combinaison (BPA+B[a]P) 10^{-10} M.

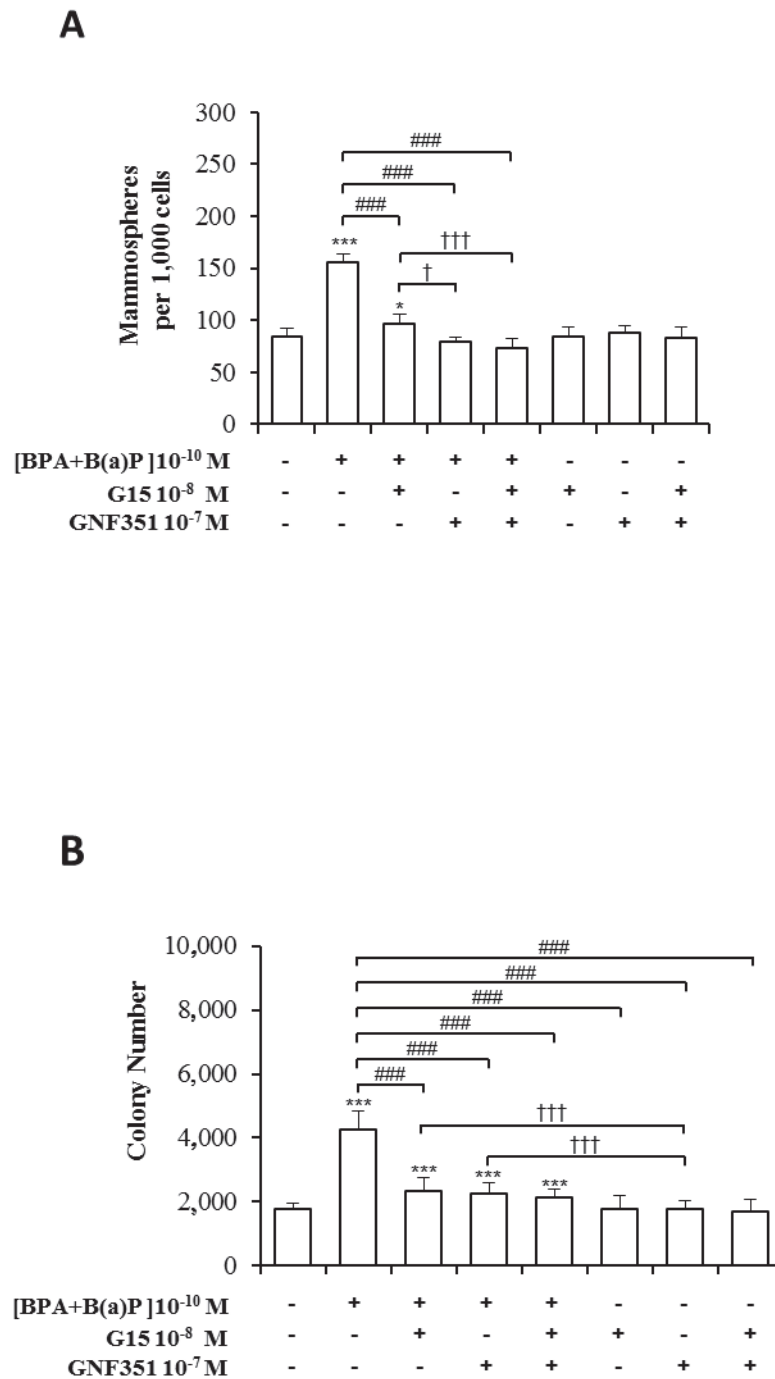


Figure 26 : La prévention des effets délétères de (BPA+B[a]P) avec les antagonistes d'AhR et/ou GPR30

L'impact des antagonistes d'AhR et de GPR30 sur une exposition chronique de 60 jours à la combinaison (BPA+B[a]P) 10^{-10} M en mammosphères (A), et en soft agar (B). La significativité des résultats a été déterminée par le test T de Student. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$, versus non exposé; ###, $P < 0.001$ versus (BPA+B[a]P); †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.001$ (BPA+B[a]P) en présence versus absence d'antagonistes.

6. Lignée MCF10AT1: lignée mammaire HER2 ou ErbB2 négative

Nous avons regardé l'expression de la protéine ErbB2 / HER2 dans la lignée MCF10AT1 par western blot en prenant comme contrôle la lignée MB453 (HER2 +) et la lignée T47D (HER2 -). Nos résultats montrent que la lignée MCF10AT1 est une lignée (HER2 -) (Figure 27) et par conséquent une lignée triple négative (ER -, PR -, HER2 -).

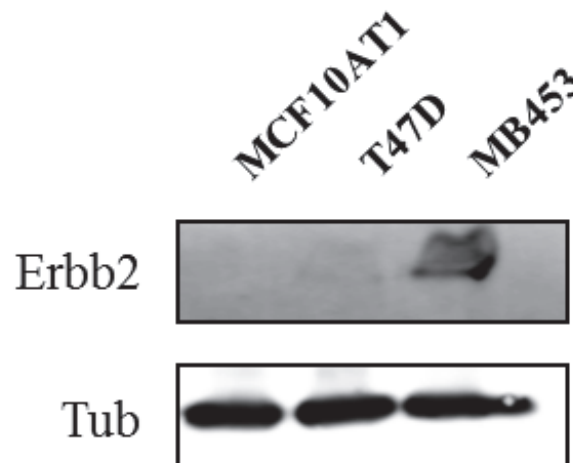


Figure 27 : Détection de la protéine HER2 / ErbB2 par western blot dans la lignée MCF10AT1.

Les lignées MB453 et T47D sont utilisées comme contrôles.

C. Commentaires et discussion

A l'heure actuelle, un des défis scientifiques est de comprendre le rôle que jouent les molécules environnementales dans le cancer du sein, qui reste le problème majeur de santé au cours de la vie des femmes. Notre projet permet de décrypter, de manière originale, les événements moléculaires associés au développement de ce cancer suite à une exposition chronique (60 jours) à faibles doses (10^{-10} M) de molécules carcinogènes environnementales et ce notamment grâce à des mélanges de molécules possédant des mécanismes d'action différents pour imiter au mieux l'exposition environnementale.

L'exposition chronique et à faibles doses au BPA et/ou B[a]P affecte l'agressivité des cellules MCF10AT1

L'exposition chronique à faibles doses au BPA et/ou B[a]P a permis aux cellules précancéreuses MCF10AT1 (ER-/PR-/HER2-) de développer, de manière durée-dépendante, un phénotype agressif *in vitro* caractérisé par une augmentation de nombre de mammosphères et de colonies en ancrage-independent growth (cf Figures de l'article 1A, 1B). De manière intéressante, l'amplitude du phénotype développé dans ces cellules est directement corrélée à la durée d'exposition aux facteurs environnementaux testés. De plus, la combinaison (BPA+ B[a]P) 10^{-10} M induit des effets délétères plus importants que le BPA seul ou le B[a]P seul voir équivalent à l'effet de notre lignée cancéreuse contrôle MCF10CA1a.cl1 (cf Figures de l'article 1E, 1F).

De plus, nous observons un résultat important: les cellules pré-cancéreuses acquièrent un phénotype agressif résultant de notre exposition chronique et à faibles doses. Les cellules exposées 60 jours (60j) à faibles doses aux facteurs environnementaux ont été gardées en culture 30 jours (30j) de plus mais sans traitement; des tests d'ancrage independent growth et de mammosphères ont ensuite été réalisés pour ces cellules traitées 60j + 30j non traitement (60j+30j), en les comparant avec les cellules traitées 60j. L'amplitude de la formation de mammosphères et de colonies pour chaque condition testée est totalement équivalente que ce soit à 60j ou à 60j + 30j (cf Figures de l'article 1C, 1D). Ceci démontre que le phénotype agressif observé après 60 jours d'exposition reste acquis, même après 30 jours.

Ces deux caractéristiques phénotypiques observées (formation de colonies et de mammosphères) reflètent une acquisition des caractéristiques observées avec des cellules malignes des cellules MCF10AT1 suite à cette exposition.

Nos résultats démontrent que l'impact de l'exposition environnementale chronique à faibles doses est acquis de manière durée-dépendante. De plus, nous avons mis en avant l'existence d'un effet potentialisé en présence des deux facteurs environnementaux testés alors que ces derniers possèdent des mécanismes d'action bien distincts.

Dans la littérature, la propriété de croissance cellulaire indépendante de l'ancrage *in vitro* montre des liens avec les caractéristiques cancéreuses *in vivo* telles que la résistance à l'anoikis (Guadamillas *et al.* 2011) et le processus de développement métastatique (Mori *et al.* 2009). Une étude a mis en avant le rôle critique de l'intégrine (dont les modifications dans leur expression peuvent entraîner le détachement de cellules de la membrane basale et une baisse de l'interaction cellule-cellule) et de l'oncogène RAS dans le processus de croissance indépendante de l'ancrage (Weinberg 2007). Leurs activités sont notamment importantes dans la capacité à développer des métastases (Campbell *et al.* 2004; Guo *et al.* 2004). D'autre part, la capacité des cellules à former des mammosphères est une caractéristique de cellules souches. En effet, cette capacité est corrélée avec des propriétés stem-like telles que la capacité d'auto-renouvellement ou encore la forte expression d'ABCG2 qui jouent un rôle dans la résistance à la chimiothérapie (Bomken *et al.* 2010; Abdullah *et al.* 2013). Une étude récente a également montré une corrélation entre la capacité à former des mammosphères et une activité élevée d'ALDH, marqueur de cellules souches, dans la lignée mammaire MCF7 (Al-Dhfyan *et al.* 2017).

Par conséquent, ces observations suggèrent fortement que l'exposition chronique à faibles doses au BPA et/ou B[a]P pourrait provoquer des effets délétères, notamment avec la combinaison des deux molécules, sur les cellules pré-cancéreuses MCF10AT1 en leur permettant d'acquérir des caractéristiques cancéreuses (potentiel de développer des métastases, résistance à l'anoikis et propriétés stem-like).

L'implication des récepteurs cibles de BPA et B[a]P, respectivement GPR30 et AhR dans la médiation des effets délétères probablement via un cross-talk

Nos résultats démontrent que les récepteurs AhR et GPR30 sont présents (cf Figures de l'article 2A, 2B) et fonctionnels (après activation de leurs voies de signalisation sous-jacentes ; cf Figures de l'article 2C, 2D, 2E et 2F) dans les MCF10AT1. Comme décrit précédemment, les deux molécules BPA et B[a]P sont capables de lier respectivement les récepteurs GPR30 et AhR et d'activer leurs voies de signalisation sous-jacentes qui sont impliquées dans divers processus aboutissant à la cancérogenèse. Afin de savoir si ces deux récepteurs sont impliqués dans la médiation des effets du BPA et/ou B[a]P sur les deux phénotypes étudiés (formation de colonies et mammosphères), des inhibiteurs chimiques des deux récepteurs ont été testés en présence de BPA et/ou B[a]P. Les antagonistes d'AhR et GPR30 (GNF351 et G15, respectivement) permettent de prévenir ces deux phénotypes (cf Figures de l'article 3A, 3B). Ces derniers sont également induits par des molécules agonistes d'AhR et GPR30 (ITE et G1, respectivement). De manière inattendue, l'antagoniste d'AhR est capable d'inhiber les colonies et les mammosphères induites par l'agoniste du GPR30 et par les molécules environnementales. L'antagoniste du GPR30 est également capable d'inhiber les colonies et les mammosphères induites par l'agoniste d'AhR et par les molécules environnementales (cf Figures de l'article 3C, 3D). Ce résultat montre l'implication des deux récepteurs dans le phénotype agressif et une hypothèse est envisagée: il existerait un cross-talk entre les récepteurs GPR30 et AhR puisque chacun des facteurs environnementaux lie son propre récepteur. Lors de l'exposition à ces facteurs environnementaux combinés (BPA + B(a)P 10^{-10} M), on observe des effets significativement supérieurs; ce qui soutient l'hypothèse du cross-talk AhR-GPR30.

Les antagonistes testés (GNF351 et G15), comme la plupart des inhibiteurs, peuvent avoir en dehors de leur cible principale (respectivement AhR et GPR30) des effets « off-targets ». Des essais en mammosphères en présence des siRNA spécifiques d'AhR et de GPR30 (**Figure 21**) valident l'effet de ces antagonistes, en confirmant l'effet de l'extinction des récepteurs sur la formation des mammosphères en présence des agonistes et des molécules environnementales. Ce résultat nous assure que l'inhibition de la formation des mammosphères BPA-dépendantes, B[a]P-dépendantes et (BPA+B[a]P)-dépendantes est bien dûe à une inhibition du récepteur. Donc les récepteurs AhR et GPR30 sont impliqués dans la médiation des effets du BPA et B[a]P et probablement par un cross-talk.

La validation du Cross-talk à l'échelle moléculaire

L'activité transcriptionnelle d'AhR (technique du gène rapporteur XRE-luc) est induite dans les cellules MCF10AT1 en présence de son agoniste chimique ITE d'une manière dose-dépendante et inhibée en présence du siRNA-AhR et de son antagoniste chimique GNF351 (cf Figures de l'article 4 A, 4B, 4C); ce qui démontre la fonctionnalité d'AhR et la spécificité de notre gène rapporteur. D'une façon importante, nos résultats démontrent que le G1, l'agoniste sélectif de GPR30, est capable d'induire l'activité transcriptionnelle d'AhR, et l'implication de GPR30 dans cette induction est confirmée en présence du siRNA-GPR30 qui inhibe significativement l'effet du G1 en luciférase (cf Figures de l'article 4D, 4G). On observe un effet stimulateur du G15 (l'antagoniste de GPR30) sur l'activité d'AhR en luciférase (**Figure 23**), par conséquent, l'utilisation du G15 dans le but de voir l'implication de GPR30 dans l'effet du G1 sur l'activité d'AhR n'était pas possible. De même, cet effet agoniste a été trouvé dans l'étude Tarnow *et al* notamment dans les cellules MCF7 où le G15 a également induit l'expression du *CYP1A1* (le gène cible de la voie AhR) en RT-qPCR (Tarnow *et al.* 2016). Ce qui semble intéressant, c'est qu'il existe une similarité de structure chimique entre le G15 et le G1; ces deux molécules ne diffèrent que par un groupe alkylcétone qui détermine leurs propriétés antagoniste et agoniste respectivement (Albanito *et al.* 2007). Ceci pourrait expliquer l'effet observé du G15. Par ailleurs, l'effet du G1 sur l'activité d'AhR en présence du siRNA-AhR est totalement inhibé. D'autre part, l'effet de la TCDD et l'ITE sur l'activité d'AhR en présence du siRNA-GPR30 est significativement inhibé en présence du siRNA-GPR30 (cf Figures de l'article 4F, 4H). Nos résultats montrent qu'il existe un échange entre les deux récepteurs AhR et GPR30 au niveau de l'activité transcriptionnelle; ce qui confirme notre hypothèse du cross-talk AhR-GPR30.

Nos résultats en RT-qPCR sur l'expression du *CYP1A1*, le gène cible d'AhR, confirment nos résultats en luciférase. Après avoir étudié la cinétique de l'induction du *CYP1A1* sous les différents ligands TCDD, ITE et G1 (**Figure 22**). En se basant sur ces résultats, on a choisi d'étudier l'induction du *CYP1A1* après 24h de traitement au G1, et après 4h de traitement à l'ITE avec la TCDD en contrôle. La TCDD et l'ITE induisent l'expression en ARNm du *CYP1A1*, alors que le siRNA-AhR inhibe presque totalement cette induction (cf Figure de l'article 5A). De même, le GNF inhibe l'induction de la TCDD presque totalement et inhibe l'induction de l'ITE de manière dose-dépendante (cf Figure de l'article 5B). Ces résultats montrent la spécificité d'induction du *CYP1A1* à travers le récepteur AhR. D'autre

part, le siRNA-GPR30 inhibe significativement ($p < 0.05$) l'effet d'ITE sur l'expression du *CYP1A1*. Donc, GPR30 influence l'expression du *CYP1A1* induite par AhR dans les MCF10AT1 (cf Figure de l'article 5C). En plus, G1 induit l'expression du *CYP1A1* et le siRNA-GPR30 inhibe de façon significative cette induction ($P < 0.01$) montrant encore une fois que GPR30 est impliqué dans cette induction. Le siRNA-AhR inhibe aussi significativement l'effet du G1 sur le *CYP1A1*. Ces résultats confirment, au niveau de l'activité transcriptionnel d'AhR le cross-talk entre AhR et GPR30 (cf Figure de l'article 5D). Concernant l'antagoniste chimique du GPR30, les résultats sont identiques à ceux obtenus en luciférase : le G15 induit *CYP1A1* de façon dose et temps-dépendants (**Figure 24**).

L'étude de Tarnow *et al*, démontre que G1 induit la transcription du *CYP1A1*. Et selon eux, cette induction est une conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire en présence du G1. En revanche, nous avons démontré que le G1 n'affecte pas la prolifération cellulaire dans nos cellules MCF10AT1 (**Figure 25**) ce qui nous permet de défendre notre hypothèse du cross-talk.

Les conséquences possibles de ce cross-talk

Il a été démontré que l'activation de la voie AhR est impliquée dans divers processus de cancérogenèse tels que la plasticité cellulaire (Diry *et al.* 2006), la dérégulation du cycle cellulaire (Andrysik *et al.* 2007; Weiss *et al.* 2008) et l'inhibition de l'apoptose (Marlowe *et al.* 2008). Par ailleurs, il existe une interaction entre AhR et les voies régulatrices des cellules souches (Schneider *et al.* 2014). Très récemment, une étude a démontré que la voie AhR/CYP1A1 contrôle le développement, la maintenance et l'auto-renouveau des CSC de cancer du sein via les mécanismes PTEN/Akt et β -Catenin (Al-Dhfyhan *et al.* 2017). Dans des cellules de cancer du sein triple négative (ER- /PR - /HER2-), l'activation d'AhR permet le développement des caractéristiques de cellules souches, l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le processus de migration/invasion cellulaire (Stanford *et al.* 2016), ainsi que la résistance à l'anoikis (apoptose programmée) et la métastase des lignées TNBC (D'Amato *et al.* 2015). Néanmoins, l'expression d'AhR est également associée à l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène *BRCA-1* et pourrait servir de biomarqueur pour le développement tumoral des cancers du sein ER- (Romagnolo *et al.* 2015).

De forts niveaux d'expression de GPR30 est décrit comme biomarqueur du cancer du sein associé à un mauvais pronostic (Yang *et al.* 2016). L'activation de la voie GPR30 permet l'activation de l'oncogène *c-fos* à travers la voie de signalisation GPR30/EGFR/ERK et

également l'expression des gènes impliqués dans la prolifération (par exemple, les cyclines) et la survie cellulaire (par exemple Bcl-2). Ceci suggère que l'expression de GPR30 et/ou son activation pourrait jouer un rôle crucial dans le processus de cancérogenèse. Outre cela, GPR30 joue un rôle dans la résistance aux anti-œstrogènes, vu sa capacité à lier le tamoxifène, ce qui favorise son rôle crucial dans la croissance et la survie des tumeurs mammaires ER⁻/GPR30⁺. Ces tumeurs peuvent rester sensibles aux œstrogènes via l'activation d'EGFR (Ignatov *et al.* 2011).

Ces différentes études montrent que l'expression d'AhR seul et du GPR30 seul est corrélée avec divers processus cancérogènes. En conclusion, le cross-talk AhR-GPR30 identifié dans notre étude pourrait aboutir à des effets néfastes et peut être même plus potentialisés dans nos cellules précancéreuses MCF10AT1 que dans le cas où cette interaction n'existerait pas.

Exploration de la relevance clinique de la signature moléculaire GPR30/AhR dans des échantillons tumoraux mammaires humains

L'exploration de la relevance clinique du cross-talk GPR30/AhR, observé *in vitro*, a été réalisée en évaluant la signature moléculaire d'AhR et de GPR30 présent dans des tumeurs mammaires humaines. Dans une cohorte de 113 tumeurs primitives du sein, la valeur pronostique de la signature moléculaire combinant à la fois l'expression d'AhR et celle de GPR30, est associée à un mauvais pronostic comparée à la valeur pronostic de l'expression d'AhR seul, ou de GPR30 seul (cf Figure 6 de l'article). De manière intéressante, cette valeur pronostique prédomine significativement dans les tumeurs ER⁻ mais pas dans les tumeurs ER⁺. Une analyse rétrospective des données transcriptomiques *in silico* d'une cohorte de 1877 tumeurs mammaires de patientes montre de la même manière qu'un mauvais pronostic est associé à une signature moléculaire combinant à la fois de forts niveaux d'expressions d'AhR et de GPR30 dans les tumeurs ER-négatives et triple négatives (cf Tableau 2 de l'article). D'un point de vue clinique, cette signature moléculaire pourrait être utilisée comme nouveau biomarqueur pronostique pour l'exposition environnementale au BPA et/ou B[a]P dans le cancer du sein humain. Dans le futur, les biomarqueurs ainsi identifiés pourraient peut-être être également associés à l'exposition à d'autres HAPs, à d'autres perturbateurs endocriniens ou bien aux deux. Ceci reste à explorer.

Une stratégie de prévention de l'impact de l'exposition environnementale faible dose et chronique au BPA et au B[a]P à l'aide d'antagonistes de GPR30 et/ou d'AhR

Nos résultats *in vitro* ont mis en avant l'impact délétère et potentialisé de l'exposition au (BPA+B[a]P) durant 60 jours des cellules précancéreuses MCF10AT1. Nous avons testé si la présence d'antagonistes des récepteurs AhR seul (GNF351), GPR30 seul (G15) ou combinés (GNF351+G15) était capable de prévenir cet impact sur les cellules MCF10AT1. Pour répondre à cette question, nous avons effectué, toujours sur des cellules MCF10AT1, une nouvelle exposition chronique de 60j à faibles doses aux BPA et B[a]P (10^{-10} M) combinés mais cette fois en présence ou en absence des antagonistes des récepteurs (GNF351, G15 ou GNF351+G15). En soft agar et en mammosphères, la présence des antagonistes d'AhR seul, de GPR30 seul ou des deux combinés permet d'éviter l'impact de l'exposition aux (BPA+B[a]P) en inhibant l'induction des colonies en soft agar et la formation de mammosphères. (**Figure 26**). Ainsi, nous avons démontré que les antagonistes d'AhR et de GPR30 sont capables de prévenir les effets délétères d'une exposition chronique à la combinaison (BPA+ B[a]P) 10^{-10} M. Ce travail montre que AhR et GPR30 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante et pourra potentiellement permettre de valider une stratégie de prévention candidate de la cancérogénèse mammaire due à l'exposition environnementale au BPA et/ou B[a]P.

Conclusions et perspectives

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans le monde tout genre confondu. Chez la femme, il représente l'affection maligne la plus fréquente et constitue la principale cause de décès par cancer au monde avec une incidence croissante. Un faible pourcentage (5-10%) du cancer du sein est héréditaire dû aux mutations des gènes *BRCA-1*, *BRCA-2*; et 90-95% des cancers du sein sont sporadiques ou non-héréditaires.

Plusieurs facteurs de risques du cancer du sein ont été identifiés tels que les facteurs de mode de vie, les facteurs de risques hormonaux endogènes et exogènes et enfin l'exposition à des molécules environnementales. Parmi les mécanismes d'action, les molécules environnementales peuvent agir comme i) des agents initiateurs de la cancérogenèse avec leur effet génotoxique en induisant des mutations et des modifications au niveau de l'expression de gènes (*i.e*) les PAHs et ceci en activant le récepteur nucléaire des xénobiotiques AhR et ii) des agents promoteurs de la cancérogenèse *via* leurs activités œstrogéniques-like (xéno-œstrogènes) qui permettent aux molécules d'agir comme des perturbateurs endocriniens capables de se lier aux ERs ou au GPR30 pour induire leurs effets mitogènes. Ces molécules environnementales sont capables d'activer des récepteurs cellulaires, nucléaires et/ou membranaires, et d'induire les voies de signalisation sous-jacentes. En plus de ces mécanismes de toxicité, ces molécules possèdent également des effets épigénétiques pouvant influencer le transcriptome cellulaire. De nos jours, ces molécules ont été largement étudiées et sont reconnues pour leur rôle dans la cancérogenèse. Cependant, aucune étude à ce jour n'a décrypté l'impact de l'exposition environnementale multifactorielle chronique à faibles doses sur la transformation et la progression tumorale du cancer du sein. Ainsi, notre projet vise à approfondir nos connaissances sur ce possible impact multifactoriel et ses effets sur les mécanismes moléculaires et cellulaires dans des cellules mammaires humaines afin d'identifier et de prévenir une action synergique potentielle.

L'ensemble de notre travail a permis d'approfondir nos connaissances quant à l'impact de l'environnement sur la progression tumorale et de mettre en avant des résultats principaux *in vitro*. Les récepteurs AhR et GPR30 sont impliqués dans le phénotype agressif développé par les cellules MCF10AT1 sous exposition environnementale et chronique à faible dose de l'ordre de 10^{-10} M de BPA et/ou de B[a]P. Un cross-talk fonctionnel existe entre les deux récepteurs AhR et GPR30. *In vitro*, l'inhibition de GPR30 et/ou d'AhR permet de bloquer les effets délétères de l'exposition environnementale chronique et à faibles doses. *In silico*, dans deux cohortes de tumeurs du sein, la relevance clinique de la signature moléculaire combinant

à la fois l'expression de GPR30 et d'AhR, comparée à celle des récepteurs seuls, révèle être un facteur de mauvais pronostic dans les tumeurs ER-négatives et triple négatives suggérant une fois de plus les effets délétères de ce cross-talk. Ces résultats permettraient, pour la première fois, d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques de l'exposition environnementale.

En perspectives, une évaluation de la présence de marqueurs de cellules souches et aussi l'expression des protéines CD44 et Smad4 pourra être réalisée. De cette manière, nous pourrions identifier si l'agressivité des cellules exposées aux facteurs environnementaux, observée *in vitro*, est également associée à une agressivité au niveau moléculaire. En effet, la présence de marqueurs de cellules souches reflètera la capacité des cellules à devenir potentiellement métastatiques tandis que l'expression croissante des protéines CD44 et Smad4, impliquées dans l'activation de multiples voies de signalisation, nous indiquera le potentiel de malignité des cellules. En effet, une étude a démontré que cette expression croissante est corrélée à un potentiel de malignité dans la lignée du modèle de progression tumorale MCF10 (So *et al.* 2012). Ces données reflèteront ainsi la progression maligne des cellules précancéreuses sous l'effet de l'exposition environnementale.

Comme vu précédemment, le BPA et le B[a]P induisent des modifications épigénétiques telles qu'une modification des profils de méthylation et d'acétylation ou encore d'expression de miRNA conduisant au remaniement des profils d'expression génique (cf partie Introduction, sous-partie D paragraphe 1.4 et sous-partie E paragraphe 2.3). Ces modifications épigénomiques et transcriptomiques sont impliquées (i) dans des changements phénotypiques et fonctionnels comme l'acquisition de propriétés de mobilité et d'invasion mais également de propriétés d'auto-renouvellement, d'échappement au système immunitaire et à l'apoptose et (ii) dans la dérégulation des voies de signalisation comme la prolifération et l'adhésion cellulaire. Ces diverses modifications peuvent participer à la progression tumorale. En perspectives, il serait donc nécessaire d'explorer à la fois la signature transcriptomique et épigénomique des cellules exposées afin de pouvoir détecter une potentielle dérégulation dans ces réseaux impliqués dans les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation associées à cette exposition environnementale. Ceci permettra d'identifier de nouveaux biomarqueurs GPR30 et AhR candidats de l'exposition. Une fois ces mécanismes décryptés, ils pourraient être envisagés comme des cibles thérapeutiques candidates afin d'empêcher l'impact de l'exposition environnementale.

Nos analyses rétrospectives dans deux cohortes différentes ont mis en évidence l'association de la signature moléculaire *GPR30/AhR* à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein ER-négatives et triple négatifs. Ces données permettent de proposer un nouveau biomarqueur associé à des sous-types agressifs de cancer du sein. D'autre part, en se basant sur des données de la littérature, l'activation de GPR30 et d'AhR semble être impliquée dans la résistance à la thérapie anti-cancéreuse. Ces informations supplémentaires pourront ainsi apporter de futures pistes concernant l'utilisation de nouveaux marqueurs prédictifs de réponse à la thérapie (GPR30, AhR) autres que les marqueurs utilisables en routine clinique (tels que ER, PR, HER2). De plus, nous avons démontré que l'inhibition des récepteurs GPR30 et/ou AhR *in vitro* permet de prévenir le phénotype agressif induit par l'exposition aux molécules environnementales. L'importance de ces résultats dans la recherche fondamentale pourrait avoir des perspectives dans la recherche appliquée en permettant d'imaginer une stratégie d'inhibition du cross-talk entre AhR et GPR30 dans les tumeurs ayant une signature moléculaire GPR30+ et AhR+. Ces nouveaux résultats pourraient être les toutes premières prémices dans l'orientation du développement de nouvelles approches thérapeutiques en proposant GPR30 et AhR comme des cibles potentielles dans les traitements anti-cancéreux. En effet, une approche thérapeutique chez les malades peut être envisagée grâce au développement d'un inhibiteur des récepteurs qui pourrait être administré avec les thérapies. Cette stratégie permettra ainsi d'inhiber les voies de signalisation sous-jacentes à ces deux récepteurs impliquées dans divers processus de la cancérogenèse afin d'éviter les effets délétères synergiques de GPR30 et d'AhR notamment dans les cancers agressifs triple-négatifs.

Références bibliographiques

(2015).

- Abaci, A., K. Demir, et al. (2009). "Endocrine disrupters - with special emphasis on sexual development." Pediatr Endocrinol Rev **6**(4): 464-475.
- Abdullah, L. N. and E. K. Chow (2013). "Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells." Clin Transl Med **2**(1): 3.
- Abel, J. and T. Haarmann-Stemmann (2010). "An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology." Biol Chem **391**(11): 1235-1248.
- Acconcia, F., V. Pallottini, et al. (2015). "Molecular Mechanisms of Action of BPA." Dose Response **13**(4): 1559325815610582.
- Adrada, B. E., R. N. Miranda, et al. (2014). "Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: sensitivity, specificity, and findings of imaging studies in 44 patients." Breast Cancer Res Treat **147**(1): 1-14.
- Aguiar, M., R. Masse, et al. (2005). "Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification." Drug Metab Rev **37**(2): 379-404.
- Ahuja, N., A. R. Sharma, et al. (2016). "Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer." Annu Rev Med **67**: 73-89.
- Akekawatchai, C., J. D. Holland, et al. (2005). "Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells." J Biol Chem **280**(48): 39701-39708.
- Al-Dhfyhan, A., A. Alhoshani, et al. (2017). "Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through PTEN inhibition and beta-Catenin and Akt activation." Mol Cancer **16**(1): 14.
- Al-Dhfyhan, A., A. Alhoshani, et al. (2017). "Erratum to: Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cells expansion through PTEN inhibition and beta-Catenin and Akt activation." Mol Cancer **16**(1): 69.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Albanito, L., R. Lappano, et al. (2008). "G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells." Environ Health Perspect **116**(12): 1648-1655.
- Albanito, L., A. Madeo, et al. (2007). "G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells." Cancer Res **67**(4): 1859-1866.
- Alowami, S., S. Troup, et al. (2003). "Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression." Breast Cancer Res **5**(5): R129-135.
- Altamirano, G. A., M. Munoz-de-Toro, et al. (2015). "Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A." Mol Cell Endocrinol **411**: 258-267.
- Amaral Mendes, J. J. (2002). "The endocrine disrupters: a major medical challenge." Food Chem Toxicol **40**(6): 781-788.
- Anderson, K. N., R. B. Schwab, et al. (2014). "Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature." Breast Cancer Res Treat **144**(1): 1-10.
- Anderson, M. W., S. H. Reynolds, et al. (1992). "Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis." Environ Health Perspect **98**: 13-24.
- Anderson, W. F., P. S. Rosenberg, et al. (2014). "How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?" J Natl Cancer Inst **106**(8).
- Andrysyk, Z., J. Vondracek, et al. (2007). "The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells." Mutat Res **615**(1-2): 87-97.

- Antoniou, A., P. D. Pharoah, et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." *Am J Hum Genet* **72**(5): 1117-1130.
- Aoki, Y. (2017). "Evaluation of in vivo mutagenesis for assessing the health risk of air pollutants." *Genes Environ* **39**: 16.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." *Physiol Rev* **81**(3): 1269-1304.
- Armaou, S., M. Pertesi, et al. (2009). "Contribution of BRCA1 germ-line mutations to breast cancer in Greece: a hospital-based study of 987 unselected breast cancer cases." *Br J Cancer* **101**(1): 32-37.
- Arrese, M. and S. J. Karpen (2010). "Nuclear receptors, inflammation, and liver disease: insights for cholestatic and fatty liver diseases." *Clin Pharmacol Ther* **87**(4): 473-478.
- Atashi, F., A. Modarressi, et al. (2015). "The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review." *Stem Cells Dev* **24**(10): 1150-1163.
- Audet-Walsh, E. and V. Giguere (2015). "The multiple universes of estrogen-related receptor alpha and gamma in metabolic control and related diseases." *Acta Pharmacol Sin* **36**(1): 51-61.
- Avissar-Whiting, M., K. R. Veiga, et al. (2010). "Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells." *Reprod Toxicol* **29**(4): 401-406.
- Baek, S. H. and K. I. Kim (2014). "Emerging roles of orphan nuclear receptors in cancer." *Annu Rev Physiol* **76**: 177-195.
- Baer, C., R. Claus, et al. (2013). "Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer." *Cancer Res* **73**(2): 473-477.
- Bagnardi, V., M. Rota, et al. (2013). "Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis." *Ann Oncol* **24**(2): 301-308.
- Baird, W. M., L. A. Hooven, et al. (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." *Environ Mol Mutagen* **45**(2-3): 106-114.
- Barker, D. J., C. Osmond, et al. (2012). "A possible link between the pubertal growth of girls and prostate cancer in their sons." *Am J Hum Biol* **24**(4): 406-410.
- Barr, L., G. Metaxas, et al. (2012). "Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum." *J Appl Toxicol* **32**(3): 219-232.
- Bartella, V., P. De Marco, et al. (2012). "New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer." *Cell Signal* **24**(8): 1515-1521.
- Bartsch, H. and J. Nair (2004). "Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis." *Cancer Detect Prev* **28**(6): 385-391.
- Bartucci, M., R. Dattilo, et al. (2015). "TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells." *Oncogene* **34**(6): 681-690.
- Baylin, S. B. and P. A. Jones (2011). "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications." *Nat Rev Cancer* **11**(10): 726-734.
- Belcher, S. M., R. B. Gear, et al. (2015). "Bisphenol A alters autonomic tone and extracellular matrix structure and induces sex-specific effects on cardiovascular function in male and female CD-1 mice." *Endocrinology* **156**(3): 882-895.
- Belfiore, A. and F. Frasca (2008). "IGF and insulin receptor signaling in breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **13**(4): 381-406.
- Belinsky, S. A., M. J. Grimes, et al. (2007). "Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum." *Br J Cancer* **96**(8): 1278-1283.
- Belpomme, D., P. Irigaray, et al. (2007). "The multitude and diversity of environmental carcinogens." *Environ Res* **105**(3): 414-429.
- Belpomme, D., P. Irigaray, et al. (2007). "The growing incidence of cancer: role of lifestyle and screening detection (Review)." *Int J Oncol* **30**(5): 1037-1049.

- Benigni, R. and C. Bossa (2011). "Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology." *Chem Rev* **111**(4): 2507-2536.
- Benigni, R., C. Bossa, et al. (2013). "Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts." *Chem Rev* **113**(5): 2940-2957.
- Benoit, G., M. Malewicz, et al. (2004). "Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies." *Trends Cell Biol* **14**(7): 369-376.
- Berger, S. L., T. Kouzarides, et al. (2009). "An operational definition of epigenetics." *Genes Dev* **23**(7): 781-783.
- Besaratinia, A., L. M. Maas, et al. (2002). "A molecular dosimetry approach to assess human exposure to environmental tobacco smoke in pubs." *Carcinogenesis* **23**(7): 1171-1176.
- Bleau, A. M., D. Hambarzumyan, et al. (2009). "PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells." *Cell Stem Cell* **4**(3): 226-235.
- Blows, F. M., K. E. Driver, et al. (2010). "Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies." *PLoS Med* **7**(5): e1000279.
- Bock, K. W. and C. Kohle (2005). "Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis." *Biochem Pharmacol* **69**(10): 1403-1408.
- Bologa, C. G., C. M. Revankar, et al. (2006). "Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30." *Nat Chem Biol* **2**(4): 207-212.
- Bolos, V., M. Blanco, et al. (2009). "Notch signalling in cancer stem cells." *Clin Transl Oncol* **11**(1): 11-19.
- Bomken, S., K. Fiser, et al. (2010). "Understanding the cancer stem cell." *Br J Cancer* **103**(4): 439-445.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* **3**(7): 730-737.
- Boonstra, J. and J. A. Post (2004). "Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells." *Gene* **337**: 1-13.
- Borek, C. (2004). "Dietary antioxidants and human cancer." *Integr Cancer Ther* **3**(4): 333-341.
- Bose, K. S., P. Vyas, et al. (2012). "Plasma non-enzymatic antioxidants-vitamin C, E, beta-carotenes, reduced glutathione levels and total antioxidant activity in oral sub mucous fibrosis." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **16**(4): 530-532.
- Bouskine, A., M. Nebout, et al. (2009). "Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor." *Environ Health Perspect* **117**(7): 1053-1058.
- Boyd, N. F., L. J. Martin, et al. (2011). "Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects." *Breast Cancer Res* **13**(6): 223.
- Brisken, C. (2013). "Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight." *Nat Rev Cancer* **13**(6): 385-396.
- Britt, K., A. Ashworth, et al. (2007). "Pregnancy and the risk of breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **14**(4): 907-933.
- Brody, J. G., K. B. Moysich, et al. (2007). "Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies." *Cancer* **109**(12 Suppl): 2667-2711.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, et al. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Nature* **389**(6652): 753-758.
- Burbach, K. M., A. Poland, et al. (1992). "Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8185-8189.
- Burdelski, C., O. M. Ruge, et al. (2015). "HDAC1 overexpression independently predicts biochemical recurrence and is associated with rapid tumor cell proliferation and genomic instability in prostate cancer." *Exp Mol Pathol* **98**(3): 419-426.

- Burgio, E. and L. Migliore (2015). "Towards a systemic paradigm in carcinogenesis: linking epigenetics and genetics." *Mol Biol Rep* **42**(4): 777-790.
- Burks, H., N. Pashos, et al. (2016). "Endocrine disruptors and the tumor microenvironment: A new paradigm in breast cancer biology." *Mol Cell Endocrinol*.
- Byford, J. R., L. E. Shaw, et al. (2002). "Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**(1): 49-60.
- Calaf, G. and J. Russo (1993). "Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens." *Carcinogenesis* **14**(3): 483-492.
- Calafat, A. M., Z. Kuklennyik, et al. (2005). "Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population." *Environ Health Perspect* **113**(4): 391-395.
- Caldarola, G., C. Battista, et al. (2010). "Melanoma onset after estrogen, thyroid, and growth hormone replacement therapy." *Clin Ther* **32**(1): 57-59.
- Campbell, P. M. and C. J. Der (2004). "Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis." *Semin Cancer Biol* **14**(2): 105-114.
- Carmeci, C., D. A. Thompson, et al. (1997). "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer." *Genomics* **45**(3): 607-617.
- Carrier, F., R. A. Owens, et al. (1992). "Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation." *Mol Cell Biol* **12**(4): 1856-1863.
- Caruso, J. A., J. J. Reiners, Jr., et al. (2001). "Genetic alteration of chromosome 8 is a common feature of human mammary epithelial cell lines transformed in vitro with benzo[a]pyrene." *Mutat Res* **473**(1): 85-99.
- Casey, S. C., M. Vaccari, et al. (2015). "The effect of environmental chemicals on the tumor microenvironment." *Carcinogenesis* **36 Suppl 1**: S160-183.
- Castillo-Sanchez, R., S. Villegas-Comonfort, et al. (2013). "Benzo-[a]-pyrene induces FAK activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells." *Cell Biol Toxicol* **29**(4): 303-319.
- Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." *Science* **331**(6024): 1559-1564.
- Chakravarti, D., D. Venugopal, et al. (2008). "The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin." *Mutat Res* **649**(1-2): 161-178.
- Chamorro-Garcia, R., S. Kirchner, et al. (2012). "Bisphenol A diglycidyl ether induces adipogenic differentiation of multipotent stromal stem cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism." *Environ Health Perspect* **120**(7): 984-989.
- Chapellier, M., E. Bachelard-Cascales, et al. (2015). "Disequilibrium of BMP2 levels in the breast stem cell niche launches epithelial transformation by overamplifying BMPR1B cell response." *Stem Cell Reports* **4**(2): 239-254.
- Chappell, G., I. P. Pogribny, et al. (2016). "Epigenetic alterations induced by genotoxic occupational and environmental human chemical carcinogens: A systematic literature review." *Mutat Res Rev Mutat Res* **768**: 27-45.
- Charafe-Jauffret, E., F. Monville, et al. (2008). "Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges." *Pathobiology* **75**(2): 75-84.
- Charles, A. K. and P. D. Darbre (2009). "Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro." *J Appl Toxicol* **29**(5): 422-434.
- Chen, C. and D. W. Wang (2015). "Cytochrome P450-CYP2 Family-Epoxygenase Role in Inflammation and Cancer." *Adv Pharmacol* **74**: 193-221.
- Chen, F. P. and M. H. Chien (2014). "Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells." *Climacteric* **17**(4): 377-384.

- Chen, R. J., S. H. Siao, et al. (2014). "TCDD promotes lung tumors via attenuation of apoptosis through activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways." *PLoS One* **9**(6): e99586.
- Chen, W., K. Pan, et al. (2009). "BRCA1 germline mutations and tumor characteristics in Chinese women with familial or early-onset breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **117**(1): 55-60.
- Chen, Y., Y. Tang, et al. (2007). "Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer." *Cancer Res* **67**(21): 10361-10367.
- Chen, Z. J., X. L. Yang, et al. (2015). "Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions." *Arch Toxicol* **89**(8): 1371-1381.
- Cheng, S. B., J. A. Quinn, et al. (2011). "Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway." *J Biol Chem* **286**(25): 22441-22455.
- Chiang, H. C. and T. C. Tsou (2009). "Arsenite enhances the benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE)-induced mutagenesis with no marked effect on repair of BPDE-DNA adducts in human lung cells." *Toxicol In Vitro* **23**(5): 897-905.
- Chiou, S. H., M. L. Wang, et al. (2010). "Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation." *Cancer Res* **70**(24): 10433-10444.
- Chlebowski, R. T., J. E. Manson, et al. (2013). "Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study." *J Natl Cancer Inst* **105**(8): 526-535.
- Choi, Y. M., S. An, et al. (2012). "CYP1A1 is a target of miR-892a-mediated post-transcriptional repression." *Int J Oncol* **41**(1): 331-336.
- Choudhari, S. K., M. Chaudhary, et al. (2013). "Nitric oxide and cancer: a review." *World J Surg Oncol* **11**: 118.
- Ciolino, H. P. and G. C. Yeh (1999). "Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol." *Mol Pharmacol* **56**(4): 760-767.
- Cittelly, D. M., J. Finlay-Schultz, et al. (2013). "Progestin suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4." *Oncogene* **32**(20): 2555-2564.
- Clement, F., X. Xu, et al. (2016). "Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling." *Cell Death Differ*.
- Clement, F., X. Xu, et al. (2017). "Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling." *Cell Death Differ* **24**(1): 155-166.
- Cohn, B. A., M. B. Terry, et al. (2012). "Exposure to polychlorinated biphenyl (PCB) congeners measured shortly after giving birth and subsequent risk of maternal breast cancer before age 50." *Breast Cancer Res Treat* **136**(1): 267-275.
- Colborn, T., F. S. vom Saal, et al. (1993). "Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans." *Environ Health Perspect* **101**(5): 378-384.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." *Mol Biotechnol* **26**(3): 249-261.
- Combes, R., M. Balls, et al. (1999). "Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity." *Altern Lab Anim* **27**(5): 745-767.
- Commission, E. (1996). European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife. Weybridge, UK.
- Condoluci, A., C. Mazzara, et al. (2016). "Impact of smoking on lung cancer treatment effectiveness: a review." *Future Oncol* **12**(18): 2149-2161.
- Cordenonsi, M., F. Zanconato, et al. (2011). "The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells." *Cell* **147**(4): 759-772.

- Cornwell, T., W. Cohick, et al. (2004). "Dietary phytoestrogens and health." *Phytochemistry* **65**(8): 995-1016.
- D'Amato, N. C., T. J. Rogers, et al. (2015). "A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer." *Cancer Res* **75**(21): 4651-4664.
- Damiani, L. A., C. M. Yingling, et al. (2008). "Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells." *Cancer Res* **68**(21): 9005-9014.
- Darbre, P. D., A. Aljarrah, et al. (2004). "Concentrations of parabens in human breast tumours." *J Appl Toxicol* **24**(1): 5-13.
- Darbre, P. D., J. R. Byford, et al. (2003). "Oestrogenic activity of benzylparaben." *J Appl Toxicol* **23**(1): 43-51.
- Darbre, P. D., J. R. Byford, et al. (2002). "Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo." *J Appl Toxicol* **22**(4): 219-226.
- Davarinos, N. A. and R. S. Pollenz (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export." *J Biol Chem* **274**(40): 28708-28715.
- Dawson, M. A. and T. Kouzarides (2012). "Cancer epigenetics: from mechanism to therapy." *Cell* **150**(1): 12-27.
- Dawson, P. J., S. R. Wolman, et al. (1996). "MCF10AT: a model for the evolution of cancer from proliferative breast disease." *Am J Pathol* **148**(1): 313-319.
- De Marco, P., V. Bartella, et al. (2013). "Insulin-like growth factor-I regulates GPER expression and function in cancer cells." *Oncogene* **32**(6): 678-688.
- Deb, P., A. Bhan, et al. (2016). "Endocrine disrupting chemical, bisphenol-A, induces breast cancer associated gene HOXB9 expression in vitro and in vivo." *Gene* **590**(2): 234-243.
- DeBruin, L. S. and P. D. Josephy (2002). "Perspectives on the chemical etiology of breast cancer." *Environ Health Perspect* **110 Suppl 1**: 119-128.
- Del Pup, L., A. Mantovani, et al. (2016). "Carcinogenetic mechanisms of endocrine disruptors in female cancers (Review)." *Oncol Rep* **36**(2): 603-612.
- Delfosse, V., M. Grimaldi, et al. (2014). "Nuclear receptor profiling of bisphenol-A and its halogenated analogues." *Vitam Horm* **94**: 229-251.
- DeMatteo, R., M. M. Keith, et al. (2012). "Chemical exposures of women workers in the plastics industry with particular reference to breast cancer and reproductive hazards." *New Solut* **22**(4): 427-448.
- Denison, M. S. and S. R. Nagy (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 309-334.
- Denison, M. S., A. Pandini, et al. (2002). "Ligand binding and activation of the Ah receptor." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 3-24.
- Denissenko, M. F., A. Pao, et al. (1996). "Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53." *Science* **274**(5286): 430-432.
- Dennis, M. K., R. Burai, et al. (2009). "In vivo effects of a GPR30 antagonist." *Nat Chem Biol* **5**(6): 421-427.
- DeSantis, C. E., S. A. Fedewa, et al. (2016). "Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **66**(1): 31-42.
- Dhimolea, E., P. R. Wadia, et al. (2014). "Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development." *PLoS One* **9**(7): e99800.
- Diamanti-Kandarakis, E., J. P. Bourguignon, et al. (2009). "Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement." *Endocr Rev* **30**(4): 293-342.
- Diehl, J. A., M. Cheng, et al. (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." *Genes Dev* **12**(22): 3499-3511.

- Diry, M., C. Tomkiewicz, et al. (2006). "Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism." *Oncogene* **25**(40): 5570-5574.
- Doherty, L. F., J. G. Bromer, et al. (2010). "In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer." *Horm Cancer* **1**(3): 146-155.
- Dolwick, K. M., H. I. Swanson, et al. (1993). "In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8566-8570.
- Donaldson, K., C. A. Poland, et al. (2010). "Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies." *Nanotoxicology* **4**: 414-420.
- Dong, B., P. K. Saha, et al. (2009). "Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(44): 18831-18836.
- Dontu, G., W. M. Abdallah, et al. (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." *Genes Dev* **17**(10): 1253-1270.
- Duygu, B., E. M. Poels, et al. (2013). "Genetics and epigenetics of arrhythmia and heart failure." *Front Genet* **4**: 219.
- Elsherbiny, M. E. and D. R. Brocks (2011). "The ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to alter physiological factors underlying drug disposition." *Drug Metab Rev* **43**(4): 457-475.
- Engelman, J. A., J. Luo, et al. (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." *Nat Rev Genet* **7**(8): 606-619.
- Enoch, S. J. and M. T. Cronin (2010). "A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent DNA binding." *Crit Rev Toxicol* **40**(8): 728-748.
- Erler, C. and J. Novak (2010). "Bisphenol a exposure: human risk and health policy." *J Pediatr Nurs* **25**(5): 400-407.
- Evans, R. (2004). "A transcriptional basis for physiology." *Nat Med* **10**(10): 1022-1026.
- Fabbri, M., F. Calore, et al. (2013). "Epigenetic regulation of miRNAs in cancer." *Adv Exp Med Biol* **754**: 137-148.
- Fahlen, M., H. Zhang, et al. (2016). "Expression of Estrogen Receptors in Relation to Hormone Levels and the Nottingham Prognostic Index." *Anticancer Res* **36**(6): 2839-2847.
- FAO/WHO, J. F. W. E. M. t. R. T. a. H. A. o. B. A. O. O., W. H. Organization, et al. (2011). Toxicological and health aspects of Bisphenol A : report of Joint FAO/WHO Expert Meeting 2-5 November 2010 and report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A, 1 November 2010 Ottawa, Canada / Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization., Geneva : World Health Organization, c2011.
- Farnie, G. and R. B. Clarke (2007). "Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling." *Stem Cell Rev* **3**(2): 169-175.
- Faupel-Badger, J. M., K. F. Arcaro, et al. (2013). "Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: summary of a National Cancer Institute-sponsored workshop." *J Natl Cancer Inst* **105**(3): 166-174.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-767.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-153.
- Felton, J. S., M. G. Knize, et al. (2002). "Human exposure to heterocyclic amine food mutagens/carcinogens: Relevance to breast cancer." *Environmental and Molecular Mutagenesis* **39**(2-3): 112-118.
- Feng, Z., W. Hu, et al. (2002). "Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer." *J Natl Cancer Inst* **94**(20): 1527-1536.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer* **136**(5): E359-386.

- Fernandez, S. V. and J. Russo (2010). "Estrogen and xenoestrogens in breast cancer." Toxicol Pathol **38**(1): 110-122.
- Filardo, E., J. Quinn, et al. (2007). "Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane." Endocrinology **148**(7): 3236-3245.
- Filardo, E. J. (2002). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **80**(2): 231-238.
- Filardo, E. J., C. T. Graeber, et al. (2006). "Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression." Clin Cancer Res **12**(21): 6359-6366.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (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 **14**(10): 1649-1660.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2002). "Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis." Mol Endocrinol **16**(1): 70-84.
- Finlay-Schultz, J., D. M. Cittelly, et al. (2015). "Progesterone downregulation of miR-141 contributes to expansion of stem-like breast cancer cells through maintenance of progesterone receptor and Stat5a." Oncogene **34**(28): 3676-3687.
- Finlay-Schultz, J. and C. A. Sartorius (2015). "Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells." J Mammary Gland Biol Neoplasia **20**(1-2): 39-50.
- Fisher, D. T., M. M. Appenheimer, et al. (2014). "The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment." Semin Immunol **26**(1): 38-47.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-626.
- Fujii-Kuriyama, Y. and J. Mimura (2005). "Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 311-317.
- Fujita, K. and T. Kamataki (2001). "Predicting the mutagenicity of tobacco-related N-nitrosamines in humans using 11 strains of Salmonella typhimurium YG7108, each coexpressing a form of human cytochrome P450 along with NADPH-cytochrome P450 reductase." Environ Mol Mutagen **38**(4): 339-346.
- Fukunaga, B. N., M. R. Probst, et al. (1995). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **270**(49): 29270-29278.
- Garraway, L. A. and E. S. Lander (2013). "Lessons from the cancer genome." Cell **153**(1): 17-37.
- Garzon, R., M. Fabbri, et al. (2006). "MicroRNA expression and function in cancer." Trends Mol Med **12**(12): 580-587.
- Garzon, R., S. Liu, et al. (2009). "MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1." Blood **113**(25): 6411-6418.
- Gee, J. M., J. F. Robertson, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer." Endocr Relat Cancer **12 Suppl 1**: S99-S111.
- Gelboin, H. V. (1980). "Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes." Physiol Rev **60**(4): 1107-1166.
- Ghanayem, B. I., H. Wang, et al. (2000). "Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity, and carcinogenicity." Toxicol Pathol **28**(6): 839-850.
- Giguere, V. (2008). "Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors." Endocr Rev **29**(6): 677-696.

- Giltane, J. M., L. Ryden, et al. (2007). "Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer." *J Clin Oncol* **25**(21): 3007-3014.
- Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." *Cell Stem Cell* **1**(5): 555-567.
- Giri, A. K. (1986). "Mutagenic and genotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a review." *Mutat Res* **168**(3): 241-248.
- Giulivo, M., M. Lopez de Alda, et al. (2016). "Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review." *Environ Res* **151**: 251-264.
- Globocan. (2012). from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
- Goldhirsch, A., E. P. Winer, et al. (2013). "Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013." *Ann Oncol* **24**(9): 2206-2223.
- Gomez, A. L., M. B. Delconte, et al. (2017). "Perinatal Exposure to Bisphenol A or Diethylstilbestrol Increases the Susceptibility to Develop Mammary Gland Lesions After Estrogen Replacement Therapy in Middle-Aged Rats." *Horm Cancer* **8**(2): 78-89.
- Gonzales, J. F., N. D. Barnard, et al. (2014). "Applying the precautionary principle to nutrition and cancer." *J Am Coll Nutr* **33**(3): 239-246.
- Gonzalez, D. M. and D. Medici (2014). "Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition." *Sci Signal* **7**(344): re8.
- Gonzalez, F. J. and P. Fernandez-Salguero (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice." *Drug Metab Dispos* **26**(12): 1194-1198.
- Gordon, M. W., F. Yan, et al. (2015). "Regulation of p53-targeting microRNAs by polycyclic aromatic hydrocarbons: Implications in the etiology of multiple myeloma." *Mol Carcinog* **54**(10): 1060-1069.
- Grimm, F. A., D. Hu, et al. (2015). "Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls." *Crit Rev Toxicol* **45**(3): 245-272.
- Griner, E. M. and M. G. Kazanietz (2007). "Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 281-294.
- Grover, P. L. M., Francis L (2002). "The initiation of breast and prostate cancer." *Carcinogenesis* **Vol. 23**(No. 7, 07.2002): p. 1095-1102.
- Guadamillas, M. C., A. Cerezo, et al. (2011). "Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer." *J Cell Sci* **124**(Pt 19): 3189-3197.
- Guengerich, F. P. (2000). "Metabolism of chemical carcinogens." *Carcinogenesis* **21**(3): 345-351.
- Guo, H., T. Liu, et al. (2010). "Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity." *Cell Mol Immunol* **7**(3): 227-234.
- Guo, J., Y. Xu, et al. (2015). "Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling." *Toxicol Lett* **234**(3): 201-210.
- Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 816-826.
- Guo, Y., L. Wang, et al. (2014). "Phthalates and parabens in personal care products from China: concentrations and human exposure." *Arch Environ Contam Toxicol* **66**(1): 113-119.
- Guo, Y. P., L. J. Martin, et al. (2001). "Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(3): 243-248.
- Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." *Cell* **127**(4): 679-695.

- Gutzman, J. H., S. E. Nikolai, et al. (2005). "Prolactin and estrogen enhance the activity of activating protein 1 in breast cancer cells: role of extracellularly regulated kinase 1/2-mediated signals to c-fos." Mol Endocrinol **19**(7): 1765-1778.
- Gyorffy, B., Z. Benke, et al. (2012). "RecurrenceOnline: an online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data." Breast Cancer Res Treat **132**(3): 1025-1034.
- Hall, J. M., M. A. Bar Hoover, et al. (2010). "Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation." Mol Endocrinol **24**(2): 359-369.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Harris, J. R., M. E. Lippman, et al. (2010). Diseases of the Breast, Lippincott Williams & Wilkins.
- Hart, S., O. M. Fischer, et al. (2005). "GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways." Biol Chem **386**(9): 845-855.
- Harvey, P. W. and P. Darbre (2004). "Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women?" J Appl Toxicol **24**(3): 167-176.
- Hassan, A. M., S. S. Alam, et al. (2011). "Benzo-a-pyrene induced genotoxicity and cytotoxicity in germ cells of mice: Intervention of radish and cress." Journal of Genetic Engineering and Biotechnology **9**(1): 65-72.
- Haston, C. K. (2012). "Mouse genetic approaches applied to the normal tissue radiation response." Front Oncol **2**: 94.
- Hauser, R., S. Duty, et al. (2004). "Medications as a source of human exposure to phthalates." Environ Health Perspect **112**(6): 751-753.
- Hayes, T. B., P. Case, et al. (2006). "Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?" Environ Health Perspect **114** **Suppl 1**: 40-50.
- Hecht, S. S. (2002). "Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention." Lancet Oncol **3**(8): 461-469.
- Hecht, S. S. (2002). "Tobacco smoke carcinogens and breast cancer." Environ Mol Mutagen **39**(2-3): 119-126.
- Hecht, S. S., S. G. Carmella, et al. (1999). "Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation." Cancer Res **59**(3): 590-596.
- Heldring, N., A. Pike, et al. (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.
- Herceg, Z., M. P. Lambert, et al. (2013). "Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation." Carcinogenesis **34**(9): 1955-1967.
- Herceg, Z. and T. Vaissiere (2011). "Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome." Epigenetics **6**(7): 804-819.
- Hernandez-Blanquisset, A., D. Touya, et al. (2016). "Current and emerging therapies of HER2-positive metastatic breast cancer." Breast **29**: 170-177.
- Hilakivi-Clarke, L., S. de Assis, et al. (2013). "Exposures to synthetic estrogens at different times during the life, and their effect on breast cancer risk." J Mammary Gland Biol Neoplasia **18**(1): 25-42.
- Ho, M. K., J. C. Mwenifumbo, et al. (2009). "Association of nicotine metabolite ratio and CYP2A6 genotype with smoking cessation treatment in African-American light smokers." Clin Pharmacol Ther **85**(6): 635-643.
- Ho, M. M., A. V. Ng, et al. (2007). "Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells." Cancer Res **67**(10): 4827-4833.

- Holbro, T. and N. E. Hynes (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 195-217.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.
- Hovestadt, V., D. T. Jones, et al. (2014). "Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing." Nature **510**(7506): 537-541.
- Hsieh, T. H., C. F. Tsai, et al. (2012). "Phthalates stimulate the epithelial to mesenchymal transition through an HDAC6-dependent mechanism in human breast epithelial stem cells." Toxicol Sci **128**(2): 365-376.
- <http://rcpg.chez.com/partie4.html>. from <http://rcpg.chez.com/partie4.html>.
- Hu, W., Z. Feng, et al. (2003). "Preferential carcinogen-DNA adduct formation at codons 12 and 14 in the human K-ras gene and their possible mechanisms." Biochemistry **42**(33): 10012-10023.
- Huang, H., G. Hu, et al. (2014). "Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing in DNA hypomethylation induced by benzo(a)pyrene." Biochem Biophys Res Commun **452**(3): 708-714.
- Huang, W., J. Zhang, et al. (2005). "Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor." Mol Endocrinol **19**(6): 1646-1653.
- Huang, Z., M. J. Fasco, et al. (1996). "Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors." Drug Metab Dispos **24**(8): 899-905.
- Hughes, D., J. B. Guttenplan, et al. (2008). "Heat shock protein 90 inhibitors suppress aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of CYP1A1 and CYP1B1 transcription and DNA adduct formation." Cancer Prev Res (Phila) **1**(6): 485-493.
- Hukkanen, J., P. Jacob, 3rd, et al. (2005). "Metabolism and disposition kinetics of nicotine." Pharmacol Rev **57**(1): 79-115.
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t., W. H. Organization, et al. (1989). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Occupational Exposures in Petroleum Refining : Crude Oil and Major Petroleum Fuels, WHO-IARC.
- Hummasti, S. and P. Tontonoz (2008). "Adopting new orphans into the family of metabolic regulators." Mol Endocrinol **22**(8): 1743-1753.
- Hutcheon, D. E., J. Kantrowitz, et al. (1983). "Factors affecting plasma benzo[a]pyrene levels in environmental studies." Environ Res **32**(1): 104-110.
- IAEA (2011). Annual report. I. A. E. Agency.
- IARC (2004). "Tobacco smoke and involuntary smoking." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **83**: 1-1438.
- IARC (2010). "Alcohol consumption and ethyl carbamate." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **96**: 3-1383.
- IARC (2010). "Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **92**: 1-853.
- IARC (2012). "Chemical agents and related occupations." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **100**(Pt F): 9-562.
- IARC and H. Vainio (2003). IARC handbooks of cancer prevention. Vol. 8: Fruit and vegetables, IARC Press.
- Ignatov, A., T. Ignatov, et al. (2010). "Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells." Breast Cancer Res Treat **123**(1): 87-96.
- Ignatov, A., T. Ignatov, et al. (2011). "G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **128**(2): 457-466.
- Ikegwuonu, F. I., M. Christou, et al. (1999). "Regulation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in mouse embryo fibroblast (C3H10T1/2) cells by protein kinase C (PKC)." Biochem Pharmacol **57**(6): 619-630.

- Ikuta, T., T. Tachibana, et al. (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor." J Biochem **127**(3): 503-509.
- Imbert, A., M. Chaffanet, et al. (1996). "Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and Werner syndrome." Genomics **32**(1): 29-38.
- In, S. J., S. H. Kim, et al. (2015). "Benzophenone-1 and nonylphenol stimulated MCF-7 breast cancer growth by regulating cell cycle and metastasis-related genes via an estrogen receptor alpha-dependent pathway." J Toxicol Environ Health A **78**(8): 492-505.
- Indo, H. P., H. C. Yen, et al. (2015). "A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging." J Clin Biochem Nutr **56**(1): 1-7.
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). "Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity." Pharmacogenomics J **5**(1): 6-13.
- Ingelman-Sundberg, M., S. C. Sim, et al. (2007). "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects." Pharmacol Ther **116**(3): 496-526.
- Ingthorsson, S., E. Briem, et al. (2016). "Epithelial Plasticity During Human Breast Morphogenesis and Cancer Progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **21**(3-4): 139-148.
- Inoue, M., E. F. Sato, et al. (2003). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life." Curr Med Chem **10**(23): 2495-2505.
- Iorio, M. V., C. Piovan, et al. (2010). "Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network." Biochim Biophys Acta **1799**(10-12): 694-701.
- Irigaray, P., L. Mejean, et al. (2005). "Behaviour of dioxin in pig adipocytes." Food Chem Toxicol **43**(3): 457-460.
- Irigaray, P., V. Ogier, et al. (2006). "Benzo[a]pyrene impairs beta-adrenergic stimulation of adipose tissue lipolysis and causes weight gain in mice. A novel molecular mechanism of toxicity for a common food pollutant." FEBS J **273**(7): 1362-1372.
- Jackson, J. H. (1994). "Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis." Environ Health Perspect **102 Suppl 10**: 155-157.
- Jaiswal, A. S., H. Panda, et al. (2013). "Adenomatous polyposis coli-mediated accumulation of abasic DNA lesions lead to cigarette smoke condensate-induced neoplastic transformation of normal breast epithelial cells." Neoplasia **15**(4): 454-460.
- Jang, J. W., R. B. Boxer, et al. (2006). "Isoform-specific ras activation and oncogene dependence during MYC- and Wnt-induced mammary tumorigenesis." Mol Cell Biol **26**(21): 8109-8121.
- Jenkins, S., A. M. Betancourt, et al. (2012). "Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention." J Steroid Biochem Mol Biol **129**(3-5): 191-200.
- Jigorel, E., M. Le Vee, et al. (2006). "Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes." Drug Metab Dispos **34**(10): 1756-1763.
- Jirtle, R. L. and M. K. Skinner (2007). "Environmental epigenomics and disease susceptibility." Nat Rev Genet **8**(4): 253-262.
- Jones, H. E., J. M. Gee, et al. (2006). "Growth factor receptor interplay and resistance in cancer." Endocr Relat Cancer **13 Suppl 1**: S45-51.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.
- Juhasz, M. L. and E. S. Marmur (2014). "A review of selected chemical additives in cosmetic products." Dermatol Ther **27**(6): 317-322.
- Kakarala, M. and M. S. Wicha (2008). "Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy." J Clin Oncol **26**(17): 2813-2820.
- Kala, R., G. W. Peek, et al. (2013). "MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics." J Clin Bioinforma **3**(1): 6.

- Kanda, N. and S. Watanabe (2003). "17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages." J Invest Dermatol **121**(4): 771-780.
- Kanda, N. and S. Watanabe (2004). "17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression." J Invest Dermatol **123**(2): 319-328.
- Kapitulnik, J., P. G. Wislocki, et al. (1978). "Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo(a)pyrene which indicate that (+/-)-trans-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice." Cancer Res **38**(2): 354-358.
- Kasai, H. (1997). "Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis." Mutat Res **387**(3): 147-163.
- Kasala, E. R., L. N. Bodduluru, et al. (2015). "Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention." Pharmacol Rep **67**(5): 996-1009.
- Kazlauskas, A., S. Sundstrom, et al. (2001). "The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor." Mol Cell Biol **21**(7): 2594-2607.
- Kelloff, G. J., Ed. (2005). Cancer Chemoprevention.
- Kendzierski, J. A. and S. M. Belcher (2015). "Strain-specific induction of endometrial periglandular fibrosis in mice exposed during adulthood to the endocrine disrupting chemical bisphenol A." Reprod Toxicol **58**: 119-130.
- Khandrika, L., B. Kumar, et al. (2009). "Oxidative stress in prostate cancer." Cancer Lett **282**(2): 125-136.
- Khanna, S., P. R. Dash, et al. (2014). "Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro." J Appl Toxicol **34**(9): 1051-1059.
- Kim, Y. S., K. A. Hwang, et al. (2015). "Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway." Chem Res Toxicol **28**(4): 662-671.
- Kisfalvi, K., G. Eibl, et al. (2009). "Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth." Cancer Res **69**(16): 6539-6545.
- Kitamura, S., T. Suzuki, et al. (2005). "Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds." Toxicol Sci **84**(2): 249-259.
- Klaunig, J. E., L. M. Kamendulis, et al. (2000). "Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis." Hum Exp Toxicol **19**(10): 543-555.
- Kluiver, J., S. Poppema, et al. (2005). "BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas." J Pathol **207**(2): 243-249.
- Knaapen, A. M., P. J. Borm, et al. (2004). "Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms." Int J Cancer **109**(6): 799-809.
- Knerr, S. and D. Schrenk (2006). "Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models." Mol Nutr Food Res **50**(10): 897-907.
- Knowlden, J. M., I. R. Hutcheson, et al. (2005). "Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor." Endocrinology **146**(11): 4609-4618.
- Knowlden, J. M., H. E. Jones, et al. (2008). "Insulin receptor substrate-1 involvement in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor signalling: implication for Gefitinib ('Iressa') response and resistance." Breast Cancer Res Treat **111**(1): 79-91.
- Kobayashi, C. I. and T. Suda (2012). "Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells." J Cell Physiol **227**(2): 421-430.

- Kohler, B. A., R. L. Sherman, et al. (2015). "Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State." *J Natl Cancer Inst* **107**(6): djv048.
- Korde, S. D., A. Basak, et al. (2011). "Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma." *Oncology* **80**(5-6): 382-389.
- Kourouklis, A. P., K. B. Kaylan, et al. (2016). "Substrate stiffness and matrix composition coordinately control the differentiation of liver progenitor cells." *Biomaterials* **99**: 82-94.
- Kousidou, O., A. Berdiaki, et al. (2008). "Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells." *Mol Oncol* **2**(3): 223-232.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* **128**(4): 693-705.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, et al. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-870.
- Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, et al. (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." *Endocrinology* **139**(10): 4252-4263.
- Kulis, M., S. Heath, et al. (2012). "Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia." *Nat Genet* **44**(11): 1236-1242.
- Kumar, G. N. and S. Surapaneni (2001). "Role of drug metabolism in drug discovery and development." *Med Res Rev* **21**(5): 397-411.
- Kuroda, N., Y. Kinoshita, et al. (2003). "Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent." *J Pharm Biomed Anal* **30**(6): 1743-1749.
- Kurokawa, Y., A. Maekawa, et al. (1990). "Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate--a new renal carcinogen." *Environ Health Perspect* **87**: 309-335.
- Kuukasjarvi, T., M. Tanner, et al. (1997). "Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization." *Am J Pathol* **150**(4): 1465-1471.
- Lachenmeier, D. W. (2008). "Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity." *J Occup Med Toxicol* **3**: 26.
- Lachenmeier, D. W. and J. Rehm (2015). "Comparative risk assessment of alcohol, tobacco, cannabis and other illicit drugs using the margin of exposure approach." *Sci Rep* **5**: 8126.
- Lamouille, S., J. Xu, et al. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(3): 178-196.
- Lancet (2002). "Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease." *Lancet* **360**(9328): 187-195.
- Lancet (2012). "Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies." *Lancet Oncol* **13**(11): 1141-1151.
- Lappano, R., P. De Marco, et al. (2013). "Cross-talk between GPER and growth factor signaling." *J Steroid Biochem Mol Biol* **137**: 50-56.
- Le Romancer, M., C. Poulard, et al. (2011). "Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors." *Endocr Rev* **32**(5): 597-622.
- Lee, G. A., K. C. Choi, et al. (2017). "Kaempferol, a phytoestrogen, suppressed triclosan-induced epithelial-mesenchymal transition and metastatic-related behaviors of MCF-7 breast cancer cells." *Environ Toxicol Pharmacol* **49**: 48-57.
- Lee, H. M., K. A. Hwang, et al. (2016). "Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects of endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process." *Mol Cell Endocrinol*.

- Lee, H. R. and K. C. Choi (2013). "4-tert-Octylphenol stimulates the expression of cathepsins in human breast cancer cells and xenografted breast tumors of a mouse model via an estrogen receptor-mediated signaling pathway." *Toxicology* **304**: 13-20.
- Lee, H. S., E. J. Park, et al. (2014). "Bisphenol A exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity." *Biosci Biotechnol Biochem* **78**(8): 1371-1375.
- Lee, J. J., G. F. Murphy, et al. (2014). "Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines." *Lab Invest* **94**(8): 822-838.
- Leffall L, K. M. (2009). *Reducing Environmental Cancer Risk*. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2010. .
- Legler, J., T. Fletcher, et al. (2015). "Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union." *J Clin Endocrinol Metab* **100**(4): 1278-1288.
- Lemaire, G., C. Benod, et al. (2007). "Discovery of a highly active ligand of human pregnane x receptor: a case study from pharmacophore modeling and virtual screening to "in vivo" biological activity." *Mol Pharmacol* **72**(3): 572-581.
- Lesniewska, M., W. Milyk, et al. (2009). "Estrogen receptor beta participate in the regulation of metabolism of extracellular matrix in estrogen alpha negative breast cancer." *Folia Histochem Cytobiol* **47**(5): S107-112.
- Lillo, M. A., C. Nichols, et al. (2017). "Bisphenol A Induces Sox2 in ER+ Breast Cancer Stem-Like Cells." *Horm Cancer* **8**(2): 90-99.
- Lin, S. Y., W. Xia, et al. (2000). "Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4262-4266.
- Lin, Y. S., J. L. Caffrey, et al. (2012). "Environmental exposure to dioxin-like compounds and the mortality risk in the U.S. population." *Int J Hyg Environ Health* **215**(6): 541-546.
- Liu, B., Q. Xue, et al. (2016). "Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage." *Mutat Res Rev Mutat Res* **768**: 53-67.
- Liu, F., J. K. Killian, et al. (2010). "Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate." *Oncogene* **29**(25): 3650-3664.
- Liu, L., Y. Jiang, et al. (2010). "Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide." *Life Sci* **86**(5-6): 192-198.
- Liu, L., Y. Jiang, et al. (2010). "miR-22 functions as a micro-oncogene in transformed human bronchial epithelial cells induced by anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide." *Toxicol In Vitro* **24**(4): 1168-1175.
- Liu, Y., N. Nguyen, et al. (2015). "Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence." *Womens Health (Lond)* **11**(1): 65-77.
- Liu, Y., T. Yin, et al. (2015). "Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research." *Quant Imaging Med Surg* **5**(5): 708-729.
- Lopez-Carrillo, L., R. U. Hernandez-Ramirez, et al. (2010). "Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico." *Environ Health Perspect* **118**(4): 539-544.
- Lopez-Garcia, M. A., F. C. Geyer, et al. (2010). "Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways." *Histopathology* **57**(2): 171-192.
- Lopez-Serra, P. and M. Esteller (2012). "DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer." *Oncogene* **31**(13): 1609-1622.
- Lu, M. and B. Wu (2016). "Structural studies of G protein-coupled receptors." *IUBMB Life* **68**(11): 894-903.
- Lynch, B. M., D. W. Dunstan, et al. (2011). "Objectively assessed physical activity, sedentary time and waist circumference among prostate cancer survivors: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey (2003-2006)." *Eur J Cancer Care (Engl)* **20**(4): 514-519.

- Ma, Q. (2011). "Influence of light on aryl hydrocarbon receptor signaling and consequences in drug metabolism, physiology and disease." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **7**(10): 1267-1293.
- Mackowiak, B. and H. Wang (2016). "Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect." *Biochim Biophys Acta* **1859**(9): 1130-1140.
- Macon, M. B. and S. E. Fenton (2013). "Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **18**(1): 43-61.
- Madeo, A. and M. Maggiolini (2010). "Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts." *Cancer Res* **70**(14): 6036-6046.
- Maggiolini, M. and D. Picard (2010). "The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor." *Journal of Endocrinology* **204**(2): 105-114.
- Maggiolini, M. and D. Picard (2010). "The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor." *J Endocrinol* **204**(2): 105-114.
- Maggiolini, M., A. Vivacqua, et al. (2004). "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells." *J Biol Chem* **279**(26): 27008-27016.
- Mailliez, A. (2014). "Ce que le radiologue doit savoir des nouvelles classifications moléculaires des cancers du sein." *Imagerie de la Femme*
- Maipas, S. and P. Nicolopoulou-Stamati (2015). "Sun lotion chemicals as endocrine disruptors." *Hormones (Athens)* **14**(1): 32-46.
- Malumbres, M. (2013). "miRNAs and cancer: an epigenetics view." *Mol Aspects Med* **34**(4): 863-874.
- Mandal, P. K. (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." *J Comp Physiol B* **175**(4): 221-230.
- Mandrup, K., J. Boberg, et al. (2016). "Low-dose effects of bisphenol A on mammary gland development in rats." *Andrology* **4**(4): 673-683.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." *Cell* **83**(6): 835-839.
- Manson, J. E., R. T. Chlebowski, et al. (2013). "Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials." *JAMA* **310**(13): 1353-1368.
- Marchese, S. and E. Silva (2012). "Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens--an in vitro model for ER-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis." *PLoS One* **7**(10): e45767.
- Marlowe, J. L., Y. Fan, et al. (2008). "The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis." *Mol Biol Cell* **19**(8): 3263-3271.
- Martino-Andrade, A. J. and I. Chahoud (2010). "Reproductive toxicity of phthalate esters." *Mol Nutr Food Res* **54**(1): 148-157.
- Mass, M. J., A. J. Jeffers, et al. (1993). "Ki-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by benz[j]aceanthrylene and benzo[a]pyrene in the lungs of strain A/J mice." *Mol Carcinog* **8**(3): 186-192.
- Massarweh, S., C. K. Osborne, et al. (2008). "Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function." *Cancer Res* **68**(3): 826-833.
- Maulik, N. (2002). "Redox signaling of angiogenesis." *Antioxid Redox Signal* **4**(5): 805-815.
- Mavaddat, N., S. Peock, et al. (2013). "Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE." *J Natl Cancer Inst* **105**(11): 812-822.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1263-1284.
- McDermott, S. P. and M. S. Wicha (2010). "Targeting breast cancer stem cells." *Mol Oncol* **4**(5): 404-419.

- McFadyen, M. C. and G. I. Murray (2005). "Cytochrome P450 1B1: a novel anticancer therapeutic target." Future Oncol **1**(2): 259-263.
- McKenna, N. J., R. B. Lanz, et al. (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." Endocr Rev **20**(3): 321-344.
- McKinlay, R., J. A. Plant, et al. (2008). "Calculating human exposure to endocrine disrupting pesticides via agricultural and non-agricultural exposure routes." Sci Total Environ **398**(1-3): 1-12.
- Meeker, J. D., H. Hu, et al. (2009). "Urinary phthalate metabolites in relation to preterm birth in Mexico city." Environ Health Perspect **117**(10): 1587-1592.
- Mehrgou, A. and M. Akouchekian (2016). "The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development." Med J Islam Repub Iran **30**: 369.
- Mehta, R. G. (2000). "Experimental basis for the prevention of breast cancer." Eur J Cancer **36**(10): 1275-1282.
- Metz, R., J. B. Duhadaway, et al. (2007). "Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan." Cancer Res **67**(15): 7082-7087.
- Mihaly, Z., M. Kormos, et al. (2013). "A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **140**(2): 219-232.
- Milanese, T. R., L. C. Hartmann, et al. (2006). "Age-related lobular involution and risk of breast cancer." J Natl Cancer Inst **98**(22): 1600-1607.
- Miller, F. R. (2000). "Xenograft models of premalignant breast disease." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(4): 379-391.
- Mlynarcikova, A., L. Macho, et al. (2013). "Bisphenol A alone or in combination with estradiol modulates cell cycle- and apoptosis-related proteins and genes in MCF7 cells." Endocr Regul **47**(4): 189-199.
- Mnif, W., J. M. Pascussi, et al. (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." Toxicol Lett **170**(1): 19-29.
- Moasser, M. M. (2007). "The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis." Oncogene **26**(45): 6469-6487.
- Moller, P., J. K. Folkmann, et al. (2008). "Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis." Cancer Lett **266**(1): 84-97.
- Mori, K., M. Shibamura, et al. (2004). "Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells." Cancer Res **64**(20): 7464-7472.
- Mori, S., J. T. Chang, et al. (2009). "Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential." Oncogene **28**(31): 2796-2805.
- Morris, J. J. and E. Seifter (1992). "The role of aromatic hydrocarbons in the genesis of breast cancer." Med Hypotheses **38**(3): 177-184.
- Mrema, E. J., F. M. Rubino, et al. (2013). "Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity." Toxicology **307**: 74-88.
- Munoz, D. M., T. Tung, et al. (2013). "Loss of p53 cooperates with K-ras activation to induce glioma formation in a region-independent manner." Glia **61**(11): 1862-1872.
- Munzel, T., T. Gori, et al. (2016). "CardioPulse. Noise pollution and arterial hypertension." Eur Heart J **37**(12): 933-936.
- Musolino, A., N. Naldi, et al. (2005). "A breast cancer patient from Italy with germline mutations in both the BRCA1 and BRCA2 genes." Breast Cancer Res Treat **91**(2): 203-205.
- Nagy, L. and J. W. Schwabe (2004). "Mechanism of the nuclear receptor molecular switch." Trends Biochem Sci **29**(6): 317-324.
- Nebert, D. W., T. P. Dalton, et al. (2004). "Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer." J Biol Chem **279**(23): 23847-23850.

- Neumann, H. G. (1986). "The role of DNA damage in chemical carcinogenesis of aromatic amines." J Cancer Res Clin Oncol **112**(2): 100-106.
- Nilsson, U. W., S. Garvin, et al. (2007). "MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **102**(3): 253-261.
- Niu, G. and X. Chen (2010). "Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy." Curr Drug Targets **11**(8): 1000-1017.
- Nohynek, G. J., C. J. Borgert, et al. (2013). "Endocrine disruption: fact or urban legend?" Toxicol Lett **223**(3): 295-305.
- Novikov, O., Z. Wang, et al. (2016). "An Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Amplification Loop That Enforces Cell Migration in ER-/PR-/Her2- Human Breast Cancer Cells." Mol Pharmacol **90**(5): 674-688.
- O'Hagan, H. M. (2014). "Chromatin modifications during repair of environmental exposure-induced DNA damage: a potential mechanism for stable epigenetic alterations." Environ Mol Mutagen **55**(3): 278-291.
- O'Hagan, H. M., W. Wang, et al. (2011). "Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands." Cancer Cell **20**(5): 606-619.
- Obana, H., S. Hori, et al. (1981). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver." Bull Environ Contam Toxicol **27**(1): 23-27.
- Okino, S. T., D. Pookot, et al. (2006). "Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer." Cancer Res **66**(15): 7420-7428.
- Oladimeji, P., R. Skerl, et al. (2016). "Synergistic Activation of ERalpha by Estrogen and Prolactin in Breast Cancer Cells Requires Tyrosyl Phosphorylation of PAK1." Cancer Res **76**(9): 2600-2611.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." EMBO J **19**(13): 3159-3167.
- Oliveira, P. A., A. Colaco, et al. (2007). "Chemical carcinogenesis." An Acad Bras Cienc **79**(4): 593-616.
- Opitz, C. A., U. M. Litzemberger, et al. (2011). "An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor." Nature **478**(7368): 197-203.
- Osada, H. and T. Takahashi (2011). "let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development." Cancer Sci **102**(1): 9-17.
- Osborne, C. K., J. Shou, et al. (2005). "Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer." Clin Cancer Res **11**(2 Pt 2): 865s-870s.
- Pandey, D. P., R. Lappano, et al. (2009). "Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF." EMBO J **28**(5): 523-532.
- Parise, C. A. and V. Caggiano (2014). "Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers." J Cancer Epidemiol **2014**: 469251.
- Park, S., E. C. Henry, et al. (2000). "Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation." Arch Biochem Biophys **381**(2): 302-312.
- Park, S. L., M. I. Tiirikainen, et al. (2016). "Genetic determinants of CYP2A6 activity across racial/ethnic groups with different risks of lung cancer and effect on their smoking intensity." Carcinogenesis **37**(3): 269-279.
- Parry, C. D., J. Patra, et al. (2011). "Alcohol consumption and non-communicable diseases: epidemiology and policy implications." Addiction **106**(10): 1718-1724.
- Patel, B. P., U. M. Rawal, et al. (2008). "Tobacco, antioxidant enzymes, oxidative stress, and genetic susceptibility in oral cancer." Am J Clin Oncol **31**(5): 454-459.
- Patel, J. B., F. D. Shah, et al. (2009). "Role of nitric oxide and antioxidant enzymes in the pathogenesis of oral cancer." J Cancer Res Ther **5**(4): 247-253.

- Patel, R. P., J. McAndrew, et al. (1999). "Biological aspects of reactive nitrogen species." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 385-400.
- Patterson, A. R., X. Mo, et al. (2015). "Sustained reprogramming of the estrogen response after chronic exposure to endocrine disruptors." *Mol Endocrinol* **29**(3): 384-395.
- Paulose, T., L. Speroni, et al. (2015). "Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer." *Reprod Toxicol* **54**: 58-65.
- Peinado, H., D. Olmeda, et al. (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nat Rev Cancer* **7**(6): 415-428.
- Perou, C. M. and A. L. Borresen-Dale (2011). "Systems biology and genomics of breast cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(2).
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.
- Perry, J. M., X. C. He, et al. (2011). "Cooperation between both Wnt/ β -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion." *Genes Dev* **25**(18): 1928-1942.
- Petrelli, J. M., E. E. Calle, et al. (2002). "Body mass index, height, and postmenopausal breast cancer mortality in a prospective cohort of US women." *Cancer Causes Control* **13**(4): 325-332.
- Petsalo, A., M. Turpeinen, et al. (2008). "Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing sub 2 microm particle size column." *J Chromatogr A* **1215**(1-2): 107-115.
- Pflaum, T., T. Hausler, et al. (2016). "Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update." *Arch Toxicol* **90**(10): 2349-2367.
- Piletic, K. and T. Kunej (2016). "MicroRNA epigenetic signatures in human disease." *Arch Toxicol* **90**(10): 2405-2419.
- Pluchino, L. A. and H. C. Wang (2014). "Chronic exposure to combined carcinogens enhances breast cell carcinogenesis with mesenchymal and stem-like cell properties." *PLoS One* **9**(11): e108698.
- Pogribny, I. P., F. A. Beland, et al. (2016). "The role of microRNAs in the development and progression of chemical-associated cancers." *Toxicol Appl Pharmacol* **312**: 3-10.
- Pogribny, I. P. and I. Rusyn (2013). "Environmental toxicants, epigenetics, and cancer." *Adv Exp Med Biol* **754**: 215-232.
- Polyak, K. and R. Kalluri (2010). "The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(11): a003244.
- Pongratz, I., P. E. Stromstedt, et al. (1991). "Inhibition of the specific DNA binding activity of the dioxin receptor by phosphatase treatment." *J Biol Chem* **266**(25): 16813-16817.
- Preston, D. L., A. Mattsson, et al. (2002). "Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts." *Radiat Res* **158**(2): 220-235.
- Prins, G. S., W. Y. Hu, et al. (2014). "Bisphenol A promotes human prostate stem-progenitor cell self-renewal and increases in vivo carcinogenesis in human prostate epithelium." *Endocrinology* **155**(3): 805-817.
- Prossnitz, E. R. and M. Barton (2009). "Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89**(3-4): 89-97.
- Prossnitz, E. R. and H. J. Hathaway (2015). "What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice?" *J Steroid Biochem Mol Biol* **153**: 114-126.
- Puga, A., C. Ma, et al. (2009). "The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 713-722.
- Pupo, M., A. Pisano, et al. (2012). "Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts." *Environ Health Perspect* **120**(8): 1177-1182.

- Quinn, J. A., C. T. Graeber, et al. (2009). "Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30." *Mol Endocrinol* **23**(7): 1052-1064.
- Ramadoss, P., C. Marcus, et al. (2005). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**(1): 9-21.
- Rammensee, S., M. S. Kang, et al. (2017). "Dynamics of Mechanosensitive Neural Stem Cell Differentiation." *Stem Cells* **35**(2): 497-506.
- Rasmussen, M. K., P. Balaguer, et al. (2016). "Skatole (3-Methylindole) Is a Partial Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist and Induces CYP1A1/2 and CYP1B1 Expression in Primary Human Hepatocytes." *PLoS One* **11**(5): e0154629.
- Rathore, K. and H. C. Wang (2012). "Green tea catechin extract in intervention of chronic breast cell carcinogenesis induced by environmental carcinogens." *Mol Carcinog* **51**(3): 280-289.
- Rathore, K. and H. C. Wang (2013). "Mesenchymal and stem-like cell properties targeted in suppression of chronically-induced breast cell carcinogenesis." *Cancer Lett* **333**(1): 113-123.
- Ravegnini, G., G. Sammarini, et al. (2015). "Key Genetic and Epigenetic Mechanisms in Chemical Carcinogenesis." *Toxicological Sciences* **148**(1): 2-13.
- Reaves, D. K., E. Ginsburg, et al. (2015). "Persistent organic pollutants and obesity: are they potential mechanisms for breast cancer promotion?" *Endocr Relat Cancer* **22**(2): R69-86.
- Repetto, R. and S. S. Baliga (1997). "Pesticides and immunosuppression: the risks to public health." *Health Policy Plan* **12**(2): 97-106.
- Revankar, C. M., D. F. Cimino, et al. (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." *Science* **307**(5715): 1625-1630.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-111.
- Rezg, R., S. El-Fazaa, et al. (2014). "Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives." *Environ Int* **64**: 83-90.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-115.
- Riggins, R. B., M. M. Mazzotta, et al. (2010). "Orphan nuclear receptors in breast cancer pathogenesis and therapeutic response." *Endocr Relat Cancer* **17**(3): R213-231.
- Roberts, R. A., D. W. Nebert, et al. (1997). "Perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology." *Fundam Appl Toxicol* **38**(2): 107-115.
- Robinson, A. (1993). "Tumour suppressor genes: nature's defence against cancer." *CMAJ* **149**(3): 310-313.
- Rochester, J. R. (2013). "Bisphenol A and human health: a review of the literature." *Reprod Toxicol* **42**: 132-155.
- Rodriguez-Antona, C., A. Gomez, et al. (2010). "Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment." *Hum Genet* **127**(1): 1-17.
- Rodriguez, C., A. V. Patel, et al. (2001). "Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(4): 345-353.
- Romagnolo, D. F., A. J. Papoutsis, et al. (2015). "Constitutive expression of AhR and BRCA-1 promoter CpG hypermethylation as biomarkers of ERalpha-negative breast tumorigenesis." *BMC Cancer* **15**: 1026.
- Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." *N Engl J Med* **353**(16): 1673-1684.
- Roshan-Moniri, M., M. Hsing, et al. (2014). "Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers." *Cancer Treat Rev* **40**(10): 1137-1152.

- Roskoski, R., Jr. (2004). "The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 1-11.
- Rossini, A., T. de Almeida Simao, et al. (2008). "CYP2A6 polymorphisms and risk for tobacco-related cancers." Pharmacogenomics **9**(11): 1737-1752.
- Roszkowski, K., W. Jozwicki, et al. (2011). "Oxidative damage DNA: 8-oxoGua and 8-oxodG as molecular markers of cancer." Med Sci Monit **17**(6): CR329-333.
- Roukos, D. H., S. Murray, et al. (2007). "Molecular genetic tools shape a roadmap towards a more accurate prognostic prediction and personalized management of cancer." Cancer Biol Ther **6**(3): 308-312.
- Routledge, E. J., R. White, et al. (2000). "Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta." J Biol Chem **275**(46): 35986-35993.
- Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." Crit Rev Toxicol **27**(2): 109-134.
- Rubin, H. (2001). "Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates." Carcinogenesis **22**(12): 1903-1930.
- Rudel, R. A., S. E. Fenton, et al. (2011). "Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations." Environ Health Perspect **119**(8): 1053-1061.
- Rudel, R. A. and L. J. Perovich (2009). "Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air." Atmos Environ (1994) **43**(1): 170-181.
- Rudraiah, S., X. Zhang, et al. (2016). "Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Liver Disease: Are We There Yet?" Annu Rev Pharmacol Toxicol **56**: 605-626.
- Ruggeri, B., M. DiRado, et al. (1993). "Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 1013-1017.
- Rundle, A., D. Tang, et al. (2000). "The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer." Carcinogenesis **21**(7): 1281-1289.
- Rushmore, T. H. and A. N. Kong (2002). "Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes." Curr Drug Metab **3**(5): 481-490.
- Russo, J., Y. F. Hu, et al. (2000). "Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer." J Natl Cancer Inst Monogr(27): 17-37.
- Russo, J., Q. Tahin, et al. (2002). "Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens." Environ Mol Mutagen **39**(2-3): 254-263.
- Ryu, J. K., S. M. Hong, et al. (2010). "Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma." Pancreatology **10**(1): 66-73.
- Sadikovic, B., J. Andrews, et al. (2007). "DNA methylation analysis using CpG microarrays is impaired in benzopyrene exposed cells." Toxicol Appl Pharmacol **225**(3): 300-309.
- Sajiki, J., K. Takahashi, et al. (1999). "Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **736**(1-2): 255-261.
- Sandoval, J. and M. Esteller (2012). "Cancer epigenomics: beyond genomics." Curr Opin Genet Dev **22**(1): 50-55.
- Sathyanarayana, S. (2008). "Phthalates and children's health." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **38**(2): 34-49.
- Schein, J. R. (1995). "Cigarette smoking and clinically significant drug interactions." Ann Pharmacother **29**(11): 1139-1148.
- Schiestl, R. H., J. Aubrecht, et al. (1997). "Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induce intrachromosomal recombination in vitro and in vivo." Cancer Res **57**(19): 4378-4383.

- Schlezinger, J. J., D. Liu, et al. (2006). "A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis." *Biol Chem* **387**(9): 1175-1187.
- Schlyer, S. and R. Horuk (2006). "I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development." *Drug Discov Today* **11**(11-12): 481-493.
- Schmidt, J. V. and C. A. Bradfield (1996). "Ah receptor signaling pathways." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 55-89.
- Schmielau, J. and O. J. Finn (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." *Cancer Res* **61**(12): 4756-4760.
- Schneider, A. J., A. M. Branam, et al. (2014). "Intersection of AHR and Wnt signaling in development, health, and disease." *Int J Mol Sci* **15**(10): 17852-17885.
- Schrenk, D. (1998). "Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics." *Biochem Pharmacol* **55**(8): 1155-1162.
- Schroder, K., A. Kohnen, et al. (2009). "NADPH oxidase Nox2 is required for hypoxia-induced mobilization of endothelial progenitor cells." *Circ Res* **105**(6): 537-544.
- Schug, T. T., A. F. Johnson, et al. (2016). "Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions." *Molecular Endocrinology* **30**(8): 833-847.
- Schuller, H. M. (2008). "Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy." *Anticancer Drugs* **19**(7): 655-671.
- Schumacher, M., R. Sitruk-Ware, et al. (2008). "Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair." *Curr Opin Pharmacol* **8**(6): 740-746.
- Schwartz, G. F., K. S. Hughes, et al. (2009). "Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007." *Breast J* **15**(1): 4-16.
- Sciences, R. S. A. o. (1973). "Front Matter." *Ambio Special Report*(3).
- Seachrist, D. D., K. W. Bonk, et al. (2016). "A review of the carcinogenic potential of bisphenol A." *Reprod Toxicol* **59**: 167-182.
- Seitz, H. K. and F. Stickel (2007). "Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(8): 599-612.
- Shan, W., Y. Jiang, et al. (2017). "HDAC2 overexpression correlates with aggressive clinicopathological features and DNA-damage response pathway of breast cancer." *Am J Cancer Res* **7**(5): 1213-1226.
- Shen, D., W. Mao, et al. (2014). "Sedentary behavior and incident cancer: a meta-analysis of prospective studies." *PLoS One* **9**(8): e105709.
- Shen, Y. M., A. B. Troxel, et al. (2006). "Comparison of p53 mutations induced by PAH o-quinones with those caused by anti-benzo[a]pyrene diol epoxide in vitro: role of reactive oxygen and biological selection." *Chem Res Toxicol* **19**(11): 1441-1450.
- Shenker, N. S., S. Polidoro, et al. (2013). "Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking." *Hum Mol Genet* **22**(5): 843-851.
- Shi, S., D. Y. Yoon, et al. (2009). "The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) is required for tumor initiation by benzo[a]pyrene." *Carcinogenesis* **30**(11): 1957-1961.
- Shi, T., C. Zhao, et al. (2016). "Bisphenol a exposure promotes the migration of NCM460 cells via estrogen receptor-mediated integrin beta1/MMP-9 pathway." *Environ Toxicol* **31**(7): 799-807.
- Shi, Y. (2007). "Orphan nuclear receptors in drug discovery." *Drug Discov Today* **12**(11-12): 440-445.
- Shield, K. D., C. Parry, et al. (2013). "Chronic diseases and conditions related to alcohol use." *Alcohol Res* **35**(2): 155-173.
- Shiizaki, K., M. Kawanishi, et al. (2017). "Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor." *Genes Environ* **39**: 14.

- Shim, Y. and J. M. Song (2015). "Spectral overlap-free quantum dot-based determination of benzo[a]pyrene-induced cancer stem cells by concurrent monitoring of CD44, CD24 and aldehyde dehydrogenase 1." *Chem Commun (Camb)* **51**(11): 2118-2121.
- Shimada, T., C. L. Hayes, et al. (1996). "Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1." *Cancer Res* **56**(13): 2979-2984.
- Shimada, T., Y. Oda, et al. (2001). "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009." *Drug Metab Dispos* **29**(9): 1176-1182.
- Shimizu, Y., Y. Nakatsuru, et al. (2000). "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 779-782.
- Shinohara, M., Y. Adachi, et al. (2010). "Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloproteinase-9 production and cell migration." *J Biol Chem* **285**(7): 4481-4488.
- Shou, M., R. G. Harvey, et al. (1993). "Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts." *Carcinogenesis* **14**(3): 475-482.
- Sichletidis, L., D. Chloros, et al. (2006). "Diachronic study of pleural plaques in rural population with environmental exposure to asbestos." *Am J Ind Med* **49**(8): 634-641.
- Silva, J. F., I. E. Mattos, et al. (2016). "Exposure to pesticides and prostate cancer: systematic review of the literature." *Rev Environ Health* **31**(3): 311-327.
- Sims, P., P. L. Grover, et al. (1974). "Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide." *Nature* **252**(5481): 326-328.
- Sincic, N. and Z. Herceg (2011). "DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes." *Curr Opin Oncol* **23**(1): 69-76.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* **63**(18): 5821-5828.
- Siriwardhana, N. and H. C. Wang (2008). "Precancerous carcinogenesis of human breast epithelial cells by chronic exposure to benzo[a]pyrene." *Mol Carcinog* **47**(5): 338-348.
- Sladek, F. M. (2003). "Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas." *Expert Opin Ther Targets* **7**(5): 679-684.
- Smith, H. O., H. Arias-Pulido, et al. (2009). "GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **114**(3): 465-471.
- Smith, H. O., K. K. Leslie, et al. (2007). "GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma." *Am J Obstet Gynecol* **196**(4): 386 e381-389; discussion 386 e389-311.
- Smith, K. J., I. A. Murray, et al. (2011). "Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism." *J Pharmacol Exp Ther* **338**(1): 318-327.
- Smith, M. T., K. Z. Guyton, et al. (2016). "Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis." *Environ Health Perspect* **124**(6): 713-721.
- Smith, T. J., G. D. Stoner, et al. (1995). "Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung microsomes by cytochromes P450, lipoxygenase, and hydroperoxides." *Cancer Res* **55**(23): 5566-5573.
- So, J. Y., H. J. Lee, et al. (2012). "Differential Expression of Key Signaling Proteins in MCF10 Cell Lines, a Human Breast Cancer Progression Model." *Mol Cell Pharmacol* **4**(1): 31-40.
- Society, A. C. (2015). "Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016." *American Cancer Society*
- Soldano, S., P. Montagna, et al. (2010). "Effects of estrogens on extracellular matrix synthesis in cultures of human normal and scleroderma skin fibroblasts." *Ann N Y Acad Sci* **1193**: 25-29.
- Solt, L. A. and T. P. Burris (2012). "Action of RORs and their ligands in (patho)physiology." *Trends Endocrinol Metab* **23**(12): 619-627.

- Song, J., M. Clagett-Dame, et al. (2002). "A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14694-14699.
- Song, X., N. Siriwardhana, et al. (2010). "Grape seed proanthocyanidin suppression of breast cell carcinogenesis induced by chronic exposure to combined 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene." *Mol Carcinog* **49**(5): 450-463.
- Song, Y., M. K. Washington, et al. (2010). "Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer." *Cancer Res* **70**(5): 2115-2125.
- Song, Y. Z., F. J. Han, et al. (2015). "Association between Single Nucleotide Polymorphisms in XRCC3 and Radiation-Induced Adverse Effects on Normal Tissue: A Meta-Analysis." *PLoS One* **10**(6): e0130388.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-10874.
- Spitzwieser, M., C. Pirker, et al. (2016). "Promoter methylation patterns of ABCB1, ABCC1 and ABCG2 in human cancer cell lines, multidrug-resistant cell models and tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients." *Oncotarget* **7**(45): 73347-73369.
- Sprague, B. L., A. Trentham-Dietz, et al. (2013). "Circulating serum xenoestrogens and mammographic breast density." *Breast Cancer Res* **15**(3): R45.
- Stanford, E. A., Z. Wang, et al. (2016). "The role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of cells with the molecular and functional characteristics of cancer stem-like cells." *BMC Biol* **14**: 20.
- Stansfeld, S. A. (2015). "Noise Effects on Health in the Context of Air Pollution Exposure." *Int J Environ Res Public Health* **12**(10): 12735-12760.
- Stohs, S. J. (1990). "Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." *Free Radic Biol Med* **9**(1): 79-90.
- Subbiah, R., M. P. Hwang, et al. (2016). "Tunable Crosslinked Cell-Derived Extracellular Matrix Guides Cell Fate." *Macromol Biosci* **16**(11): 1723-1734.
- Sugatani, J., H. Kojima, et al. (2001). "The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR." *Hepatology* **33**(5): 1232-1238.
- Sugimura, T., K. Wakabayashi, et al. (2004). "Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish." *Cancer Sci* **95**(4): 290-299.
- Sureau, F., L. Chinsky, et al. (1990). "Microspectrofluorimetric study of the kinetics of cellular uptake and metabolism of benzo(a)pyrene in human T 47D mammary tumor cells: evidence for cytochrome P1450 induction." *Eur Biophys J* **18**(5): 301-307.
- Sweeney, M. F., N. Hasan, et al. (2015). "Environmental endocrine disruptors: Effects on the human male reproductive system." *Rev Endocr Metab Disord* **16**(4): 341-357.
- Synold, T. W., I. Dussault, et al. (2001). "The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux." *Nat Med* **7**(5): 584-590.
- Takegawa, N. and K. Yonesaka (2017). "HER2 as an Emerging Oncotarget for Colorectal Cancer Treatment After Failure of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapy." *Clin Colorectal Cancer*.
- Takeuchi, T. and O. Tsutsumi (2002). "Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels." *Biochem Biophys Res Commun* **291**(1): 76-78.
- Talsness, C. E., A. J. Andrade, et al. (2009). "Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1526): 2079-2096.
- Tan, Z., X. Chang, et al. (2002). "Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function." *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 771-780.

- Tang, W. Y., L. Levin, et al. (2012). "Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and 5'-CpG methylation of interferon-gamma in cord white blood cells." Environ Health Perspect **120**(8): 1195-1200.
- Tannenbaum, S. R., V. Young, et al. (1980). "Intestinal formation of nitrite and N-nitroso compounds." IARC Sci Publ(31): 2819.
- Tantcheva-Poor, I., M. Zaigler, et al. (1999). "Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test." Pharmacogenetics **9**(2): 131-144.
- Tarantini, A., A. Maitre, et al. (2011). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells." Toxicology **279**(1-3): 36-44.
- Tarapore, P., J. Ying, et al. (2014). "Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro." PLoS One **9**(3): e90332.
- Tarnow, P., T. Tralau, et al. (2016). "G protein-coupled receptor 30 ligand G-1 increases aryl hydrocarbon receptor signalling by inhibition of tubulin assembly and cell cycle arrest in human MCF-7 cells." Arch Toxicol **90**(8): 1939-1948.
- Tehrani, R. and B. Van Aken (2014). "Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: sources, fate, and toxicities." Environ Sci Pollut Res Int **21**(10): 6334-6345.
- Thany, S. H., P. Reynier, et al. (2013). "[Neurotoxicity of pesticides: its relationship with neurodegenerative diseases]." Med Sci (Paris) **29**(3): 273-278.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.
- Thollet, A., J. A. Vendrell, et al. (2010). "ZNF217 confers resistance to the pro-apoptotic signals of paclitaxel and aberrant expression of Aurora-A in breast cancer cells." Mol Cancer **9**: 291.
- Thomas, D. (2010). "Gene--environment-wide association studies: emerging approaches." Nat Rev Genet **11**(4): 259-272.
- Thomas, P. and J. Dong (2006). "Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 175-179.
- Thomas, P., Y. Pang, et al. (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." Endocrinology **146**(2): 624-632.
- Thongprakaisang, S., A. Thiantanawat, et al. (2013). "Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors." Food Chem Toxicol **59**: 129-136.
- Tiemann, U. (2008). "In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review." Reprod Toxicol **25**(3): 316-326.
- Tokizane, T., H. Shiina, et al. (2005). "Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer." Clin Cancer Res **11**(16): 5793-5801.
- Tompkins, L. M., H. Li, et al. (2010). "A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells." Biochem Pharmacol **80**(11): 1754-1761.
- Torres, I. O. and D. G. Fujimori (2015). "Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation." Curr Opin Struct Biol **35**: 68-75.
- Trachootham, D., W. Lu, et al. (2008). "Redox regulation of cell survival." Antioxid Redox Signal **10**(8): 1343-1374.
- Trauner, M. and E. Halilbasic (2011). "Nuclear receptors as new perspective for the management of liver diseases." Gastroenterology **140**(4): 1120-1125 e1121-1112.
- Travis, L. B., D. A. Hill, et al. (2003). "Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease." JAMA **290**(4): 465-475.

- Trinh, T., S. E. Christensen, et al. (2015). "Background risk of breast cancer influences the association between alcohol consumption and mammographic density." *Br J Cancer* **113**(1): 159-165.
- Trosko, J. E. (2001). "Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm?" *Mol Carcinog* **30**(3): 131-137.
- Trueba, G. P., G. M. Sanchez, et al. (2004). "Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer." *Front Biosci* **9**: 2029-2044.
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, et al. (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." *Cancer Lett* **227**(2): 115-124.
- Tsuji, N., K. Fukuda, et al. (2014). "The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90." *FEBS Open Bio* **4**: 796-803.
- Turnbull, C. and N. Rahman (2008). "Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**: 321-345.
- Uauy, R. and N. Solomons (2005). "Diet, nutrition, and the life-course approach to cancer prevention." *J Nutr* **135**(12 Suppl): 2934S-2945S.
- Vachon, C. M., H. Sasano, et al. (2011). "Aromatase immunoreactivity is increased in mammographically dense regions of the breast." *Breast Cancer Res Treat* **125**(1): 243-252.
- Valentino, R., V. D'Esposito, et al. (2013). "Bisphenol-A impairs insulin action and up-regulates inflammatory pathways in human subcutaneous adipocytes and 3T3-L1 cells." *PLoS One* **8**(12): e82099.
- Valko, M., M. Izakovic, et al. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Mol Cell Biochem* **266**(1-2): 37-56.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40.
- van der Veeken, J., S. Oliveira, et al. (2009). "Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy." *Curr Cancer Drug Targets* **9**(6): 748-760.
- van Kruijsdijk, R. C., E. van der Wall, et al. (2009). "Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(10): 2569-2578.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, et al. (2009). "Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption." *Endocr Rev* **30**(1): 75-95.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, et al. (2007). "Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland." *Endocrinology* **148**(1): 116-127.
- Vares, G., X. Cui, et al. (2013). "Generation of breast cancer stem cells by steroid hormones in irradiated human mammary cell lines." *PLoS One* **8**(10): e77124.
- Vaz, A. D. (2001). "Multiple oxidants in cytochrome P450 catalyzed reactions: implications for drug metabolism." *Curr Drug Metab* **2**(1): 1-16.
- Vendrell, J. A., A. Thollet, et al. (2012). "ZNF217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion." *Cancer Res* **72**(14): 3593-3606.
- Vendrell, J. A., A. Thollet, et al. (2012). "ZNF217 Is a Marker of Poor Prognosis in Breast Cancer That Drives Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion." *Cancer Research* **72**(14): 3593-3606.
- Venkatakrisnan, A. J., X. Deupi, et al. (2013). "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors." *Nature* **494**(7436): 185-194.
- Venkatesh, S. and J. L. Workman (2015). "Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(3): 178-189.
- Ventura, C., M. R. Nieto, et al. (2016). "Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance." *J Steroid Biochem Mol Biol* **156**: 1-9.

- Verma, A. K. and R. K. Boutwell (1980). "Effects of dose and duration of treatment with the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin carcinogenesis." Carcinogenesis **1**(3): 271-276.
- Vivacqua, A., D. Bonofiglio, et al. (2006). "17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30." Mol Pharmacol **70**(4): 1414-1423.
- Vivacqua, A., D. Bonofiglio, et al. (2006). "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells." Mol Endocrinol **20**(3): 631-646.
- Vivacqua, A., R. Lappano, et al. (2009). "G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells." Mol Endocrinol **23**(11): 1815-1826.
- Vogel, C. F., W. Li, et al. (2007). "Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression." Am J Pathol **171**(5): 1538-1548.
- von Weyarn, L. B., C. Retzlaff, et al. (2012). "CYP2A6- and CYP2A13-catalyzed metabolism of the nicotine Delta5'(1')iminium ion." J Pharmacol Exp Ther **343**(2): 307-315.
- Vrtacnik, P., B. Ostanek, et al. (2014). "The many faces of estrogen signaling." Biochem Med (Zagreb) **24**(3): 329-342.
- Wadia, P. R., N. J. Cabaton, et al. (2013). "Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland." PLoS One **8**(5): e63902.
- Walker, A. I., A. Kohli, et al. "Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Is Associated with Higher Levels of Total IgE, Decreased Function of T Regulatory Cells and an Increase of Asthma Occurrence in Children." Journal of Allergy and Clinical Immunology **131**(2): AB54.
- Wallace, B. D. and M. R. Redinbo (2013). "Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective." Drug Metab Rev **45**(1): 79-100.
- Wang, D., H. Gao, et al. (2014). "Pubertal bisphenol A exposure alters murine mammary stem cell function leading to early neoplasia in regenerated glands." Cancer Prev Res (Phila) **7**(4): 445-455.
- Wang, H. and E. L. LeCluyse (2003). "Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes." Clin Pharmacokinet **42**(15): 1331-1357.
- Wang, H., M. Venkatesh, et al. (2011). "Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice." J Clin Invest **121**(8): 3220-3232.
- Wang, K. H., A. P. Kao, et al. (2015). "Bisphenol A-induced epithelial to mesenchymal transition is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in human endometrial carcinoma cells." Reprod Toxicol **58**: 229-233.
- Wang, L. L., Y. Li, et al. (2009). "A bioinformatics approach for the phenotype prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human cytochromes P450." Drug Metab Dispos **37**(5): 977-991.
- Wang, Z., H. Liu, et al. (2017). "Low-Dose Bisphenol A Exposure: A Seemingly Instigating Carcinogenic Effect on Breast Cancer." Adv Sci (Weinh) **4**(2): 1600248.
- Ward, M. H., T. M. deKok, et al. (2005). "Workgroup report: Drinking-water nitrate and health--recent findings and research needs." Environ Health Perspect **113**(11): 1607-1614.
- Warita, K., T. Mitsushashi, et al. (2013). "Gene expression of epigenetic regulatory factors related to primary silencing mechanism is less susceptible to lower doses of bisphenol A in embryonic hypothalamic cells." J Toxicol Sci **38**(2): 285-289.
- Warren, G. W. and A. K. Singh (2013). "Nicotine and lung cancer." J Carcinog **12**: 1.
- Waters, R., P. van Eijk, et al. (2015). "Histone modification and chromatin remodeling during NER." DNA Repair (Amst) **36**: 105-113.

- Watson, C. S., N. N. Bulayeva, et al. (2007). "Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses." *Steroids* **72**(2): 124-134.
- Weber, C. M. and S. Henikoff (2014). "Histone variants: dynamic punctuation in transcription." *Genes Dev* **28**(7): 672-682.
- Wei, M., A. S. Hamoud, et al. (2009). "Potassium bromate enhances N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine-induced kidney carcinogenesis only at high doses in Wistar rats: indication of the existence of an enhancement threshold." *Toxicol Pathol* **37**(7): 983-991.
- Wei, S. J., R. L. Chang, et al. (1999). "Dose-dependent mutation profile in the c-Ha-ras proto-oncogene of skin tumors in mice initiated with benzo[a]pyrene." *Carcinogenesis* **20**(9): 1689-1696.
- Wei, W., Z. J. Chen, et al. (2014). "The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo." *Cell Death Dis* **5**: e1428.
- Weinberg, R. (2007). "The biology of cancer." *Garland Science; New York*.
- Weisburger, J. H. (2002). "Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health." *Mutat Res* **506-507**: 9-20.
- Weiss, C., D. Faust, et al. (2008). "TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and cyclin A." *Oncogene* **27**(15): 2198-2207.
- Wells, P. G., G. P. McCallum, et al. (2009). "Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer." *Toxicol Sci* **108**(1): 4-18.
- Wen, J., N. G. Nikitakis, et al. (2011). "Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) expression and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma." *Am J Pathol* **178**(6): 2866-2878.
- Weng, Y. I., P. Y. Hsu, et al. (2010). "Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **248**(2): 111-121.
- Weston, A. (2003). *Multistage Carcinogenesis*, BC Decker.
- Wetherill, Y. B., B. T. Akingbemi, et al. (2007). "In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action." *Reprod Toxicol* **24**(2): 178-198.
- Wetzel, L. T., L. G. Luempert, 3rd, et al. (1994). "Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats." *J Toxicol Environ Health* **43**(2): 169-182.
- White, M. F. (1998). "The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action." *Mol Cell Biochem* **182**(1-2): 3-11.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 103-125.
- WHO. (2012). "State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012." Retrieved 14/06, 2017, from www.who.int/iris/bitstream/10665/78101/1/9789241505031.
- Willett, E. V., C. F. Skibola, et al. (2005). "Non-Hodgkin's lymphoma, obesity and energy homeostasis polymorphisms." *Br J Cancer* **93**(7): 811-816.
- Williams, D. E. (2012). "The rainbow trout liver cancer model: response to environmental chemicals and studies on promotion and chemoprevention." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **155**(1): 121-127.
- Williams, G. M. (2001). "Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment." *Toxicology* **166**(1-2): 3-10.
- Willson, T. M., P. J. Brown, et al. (2000). "The PPARs: from orphan receptors to drug discovery." *J Med Chem* **43**(4): 527-550.
- Wise, A., K. O'Brien, et al. (2011). "Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water?" *Environ Sci Technol* **45**(1): 51-60.
- Wislocki, P. G., A. W. Wood, et al. (1976). "Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene arene oxides, phenols, quinones, and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells." *Cancer Res* **36**(9 pt.1): 3350-3357.

- Witt, O., H. E. Deubzer, et al. (2009). "HDAC family: What are the cancer relevant targets?" Cancer Lett **277**(1): 8-21.
- Wogan, G. N., S. S. Hecht, et al. (2004). "Environmental and chemical carcinogenesis." Semin Cancer Biol **14**(6): 473-486.
- Wojciechowski, M. F. and T. Meehan (1984). "Inhibition of DNA methyltransferases in vitro by benzo[a]pyrene diol epoxide-modified substrates." J Biol Chem **259**(15): 9711-9716.
- Wong, P. S., W. Li, et al. (2009). "Characterization of MCF mammary epithelial cells overexpressing the Arylhydrocarbon receptor (AhR)." BMC Cancer **9**: 234.
- Wrobel, A. M. and E. L. Gregoraszczuk (2014). "Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor-alpha and -beta and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells." Toxicol Lett **230**(3): 375-381.
- Wrobel, A. M. and E. L. Gregoraszczuk (2014). "Differential effect of methyl-, butyl- and propylparaben and 17beta-estradiol on selected cell cycle and apoptosis gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells and MCF-10A non-malignant cells." J Appl Toxicol **34**(9): 1041-1050.
- Wu, C. H., H. L. Chen, et al. (2004). "The topical application of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin lacks skin tumor-promoting potency but induces hepatic injury and tumor necrosis factor-alpha expression in ICR male mice." Food Chem Toxicol **42**(8): 1217-1225.
- Wynder, E. L. and E. A. Graham (1950). "Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases." J Am Med Assoc **143**(4): 329-336.
- Yamamoto, Y., R. Moore, et al. (2010). "Nuclear receptor CAR represses TNFalpha-induced cell death by interacting with the anti-apoptotic GADD45B." PLoS One **5**(4): e10121.
- Yamashita, U., T. Sugiura, et al. (2005). "Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro." J UOEH **27**(1): 1-10.
- Yan, J. and W. Xie (2016). "A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors." Acta Pharm Sin B **6**(5): 450-452.
- Yang, F. and Z. M. Shao (2016). "Double-edged role of G protein-coupled estrogen receptor 1 in breast cancer prognosis: an analysis of 167 breast cancer samples and online data sets." Onco Targets Ther **9**: 6407-6415.
- Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6): 818-829.
- Yang, L., L. Luo, et al. (2013). "Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells." Toxicol Lett **218**(3): 187-193.
- Yang, P., J. Ma, et al. (2012). "CpG site-specific hypermethylation of p16INK4alpha in peripheral blood lymphocytes of PAH-exposed workers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **21**(1): 182-190.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.
- Young, S. H. and E. Rozengurt (2010). "Crosstalk between insulin receptor and G protein-coupled receptor signaling systems leads to Ca(2)+ oscillations in pancreatic cancer PANC-1 cells." Biochem Biophys Res Commun **401**(1): 154-158.
- Yuan, J., N. Llamas Luceno, et al. (2017). "Synergistic anti-cancer effects of epigenetic drugs on medulloblastoma cells." Cell Oncol (Dordr).
- Yuan, Z., Q. Sun, et al. (2017). "Design, synthesis and anticancer potential of NSC-319745 hydroxamic acid derivatives as DNMT and HDAC inhibitors." Eur J Med Chem **134**: 281-292.
- Yuspa, S. H. and M. C. Poirier (1988). "Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade." Adv Cancer Res **50**: 25-70.
- Zanger, U. M. and M. Schwab (2013). "Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation." Pharmacol Ther **138**(1): 103-141.

- Zevin, S. and N. L. Benowitz (1999). "Drug interactions with tobacco smoking. An update." Clin Pharmacokinet **36**(6): 425-438.
- Zhang, S., K. Kim, et al. (2012). "Aryl hydrocarbon receptor agonists induce microRNA-335 expression and inhibit lung metastasis of estrogen receptor negative breast cancer cells." Mol Cancer Ther **11**(1): 108-118.
- Zhang, W., Y. Fang, et al. (2012). "Effect of bisphenol A on the EGFR-STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells." Mol Med Rep **5**(1): 41-47.
- Zhang, X. L., H. S. Wang, et al. (2015). "Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals." Arch Biochem Biophys **585**: 10-16.
- Zhou, S. F., J. P. Liu, et al. (2009). "Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact." Drug Metab Rev **41**(2): 89-295.
- Zhou, X., S. Wang, et al. (2015). "Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer." J Clin Invest **125**(5): 2123-2135.
- Zhu, H., Y. Li, et al. (1995). "Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA/2 mice: potential role of mitochondrial dysfunction." Toxicol Appl Pharmacol **130**(1): 108-120.
- Zoeller, R. T., T. R. Brown, et al. (2012). "Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the endocrine society." Endocrinology **153**(9): 4097-4110.
- Zouboulis, C. C., W. C. Chen, et al. (2007). "Sexual hormones in human skin." Horm Metab Res **39**(2): 85-95.

TITRE

Exploration de l'impact de l'exposition chronique et faibles doses de facteurs environnementaux sur les cellules pré-cancéreuses mammaires MCF10AT1

RESUME

Les facteurs environnementaux que sont le Bisphénol A (BPA), un perturbateur endocrinien, et le Benzo[a]pyrène (B[a]P), un agent génotoxique, représentent un véritable enjeu parmi les facteurs de risques du cancer du sein associés à l'exposition environnementale. Nos objectifs sont d'explorer l'impact d'une exposition chronique à de faibles doses (10^{-10} M) de BPA et/ou de B[a]P sur l'agressivité de la lignée cellulaire pré-cancéreuse mammaire MCF10AT1 (immortelle, transformée, ER-, PR-, HER2-). Les buts principaux sont : (i) d'explorer si la combinaison de deux molécules possédant deux mécanismes d'action distincts conduit à un effet potentialisé par rapport à l'exposition aux molécules seules ; (ii) d'identifier et de prévenir les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à cette exposition multiple. Nos résultats démontrent que l'exposition chronique des MCF10AT1 à de faibles doses de BPA et/ou de B[a]P induit un phénotype cellulaire agressif de façon temps-dépendant, avec un effet potentialisé pour la combinaison BPA+B[a]P, comparée aux molécules seules. Le phénotype observé est un phénotype acquis, car toujours présent 30 jours post-exposition. Nous avons également déterminé dans les cellules MCF10AT1 la présence et la fonctionnalité de deux récepteurs : le récepteur Aryl hydrocarbon (AhR) liant le B[a]P et le récepteur couplé à la protéine G (GPER1/GPR30) liant le BPA. D'un point de vue mécanistique, ces deux récepteurs sont impliqués dans le phénotype cellulaire agressif BPA et/ou B[a]P-dépendant, et notre travail révèle un nouveau cross-talk fonctionnel entre ces deux récepteurs. L'inhibition *in vitro* d'AhR et de GPR30 (inhibiteurs chimiques ou siRNA) permet de bloquer les effets délétères de l'exposition chronique au BPA et/ou au B[a]P. Enfin, l'analyse rétrospective de tumeurs primitives du sein ER-négatives démontre que la signature moléculaire *GPR30/AhR* possède une valeur de mauvais pronostic, alors que l'expression de *GPR30* ou d'*AhR* n'en possède pas. L'ensemble de ces résultats souligne donc le rôle particulier que joue la présence concomitante d'AhR et de GPR30 dans des cellules précancéreuses/cancéreuses mammaires. En conclusion, nos résultats permettent d'identifier des cibles potentielles pour le développement de nouvelles stratégies préventives capables de bloquer la carcinogenèse mammaire due à l'exposition chronique au BPA et/ou B[a]P, et d'envisager des nouveaux biomarqueurs de cette exposition environnementale.

TITLE

Exploration of the impact of chronic and low doses exposure of environmental factors on the pre-cancerous mammary cells MCF10AT1

ABSTRACT

Environmental factors such as Bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor, and Benzo[a]pyrene (B[a]P), a genotoxic agent, represent a real issue among the environmental risk factors for breast cancer. Our objectives are to investigate the impact of chronic and low doses exposure to BPA (10^{-10} M) and/or B[a]P on the aggressiveness of the mammary pre-cancerous cell line MCF10AT1 (immortal, transformed, ER-, PR-, HER2-). The main aims are: (i) explore whether an exposure to the combination of two molecules with two distinct mechanisms of action has a greater impact than the molecules tested alone; (ii) identify and prevent the associated molecular and cellular mechanisms. Our results demonstrate that chronic exposure of MCF10AT1 to low doses of BPA and/or B[a]P induces an aggressive cell phenotype in a time-dependent manner, with a greater effect for (BPA + B[a]P) combination compared to single molecules. The observed phenotype is an acquired phenotype, as it still persists 30 days post-exposure. We also determined the presence and functionality of two receptors in the MCF10AT1 cells: the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) binding B[a]P and the G binding protein receptor (GPER1 / GPR30) binding BPA. Mechanistically, these two receptors are involved in the BPA and/or B[a]P-induced aggressive phenotype, and our study reveals a new functional cross-talk/interplay between these two receptors. *In vitro*, the inhibition of AhR and GPR30 (chemical inhibitors or siRNA) can block the deleterious effects of chronic exposure to BPA and/or B[a]P. Finally, a retrospective analysis of primary ER-negative subclass breast tumors demonstrates that the *GPR30/AhR* gene expression signature has a poor prognosis value, whereas *GPR30* or *AhR* mRNA levels were poorly informative. All these results underline the particular role played by the concomitant presence of AhR and GPR30 in mammary precancerous/cancerous cells. In conclusion, our results allow us to identify potential targets for the development of new preventive strategies capable of blocking mammary carcinogenesis due to chronic exposure to BPA and/or B[a]P, and to consider new biomarkers for environmental exposure.

DISCIPLINE: Cancérologie

MOTS CLES:

Cancer du sein ; facteurs environnementaux ; exposition chronique à faible dose ; cellules précancéreuses ; phénotype agressif ; cross-talk ; prévention
Breast cancer; environmental factors; chronic and low doses exposure; precancerous cells; aggressive phenotype; cross-talk; prevention

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE:

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
INSERM U1052 / CNRS UMR5286
8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08