

Xénoestrogènes, estrogènes environnementaux, perturbateurs endocriniens

Xenoestrogens, environmental estrogens, endocrine disrupter

Mots clés : Pesticides organochlorés, Phtalates, Polychlorinates, Récepteurs des estrogènes, Cancer du sein, Perturbatoir endocrinienne.

Keywords : Organochlorine pesticides, Phtalate, Polychlorinate, Estrogens receptors, Breast cancer, Endocrine disrupter.

P.M. Martin ^(1, 2), Y. Berthois ^(1, 2), A. Saso ⁽³⁾

Problème de santé publique

Associés au développement de nos sociétés depuis la Seconde Guerre mondiale, de très grandes quantités de pesticides et molécules chimiques industrielles ont été libérées dans l'environnement sans un réel contrôle, ni évaluation des conséquences et, de ce fait, ont créé une réelle pollution.

Bien que ces composés soient structurellement non associés aux hormones stéroïdiennes, de façon surprenante un très grand nombre possède de faibles effets "estrogène-like" et de ce fait ont été appelés xénoestrogènes ou estrogènes environnementaux.

Les xénoestrogènes ont été également dénommés "perturbateurs endocriniens", ils sont impliqués dans toute une variété d'effets sur l'homme et les animaux par leur influence ou activité "estrogène-like" sur les voies d'action des estrogènes endogènes [1].

On reporte ainsi chez l'homme l'altération en quantité et qualité du spermogramme, une augmentation de l'hypospadie, de la cryptorchidie, dans les cancers du testicule, relations au cancer de la prostate [2, 3]. Chez la femme, apparaissent des problèmes de fertilité, une diminution de la fonction de lactation et ils interfèrent avec la cancérogenèse mammaire [4, 5].

En 1996, devant l'importance de ces problèmes de santé publique, l'agence américaine de

1. Laboratoire de transfert d'oncologie biologique AP-HM, Marseille.

2. Laboratoire de cancérologie Inserm EMI 0359, Marseille.

3. Unité épidémiologie prévention cancer CIRC, Lyon.

protection de l'environnement a créé un comité de surveillance et teste des perturbateurs endocriniens. Un des buts de l'action de ce comité est de tester plus de 15 000 molécules chimiques par leur potentiel de perturbateurs endocriniens sur l'homme et l'animal et leur biodisponibilité dans l'environnement en fonction du développement économique [6, 7].

Structure/activité

1. Structure

Les xénoestrogènes recouvrent un très large spectre de diverses structures moléculaires.

(figure 1). Les organochlorés constituent le plus large groupe avec des pesticides tels :

– DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane ou 1,1,1 trichloro-2,2 bis [p-chlorophényl] éthane) et son métabolite le DDE (1,1 dichloro-2,2 bis [p-chlorophényl] éthylène) ;

– le méthoxychlore et son métabolite HPTE (2,2 bis [p-hydroxyphényl] 1,1,1 trichloroéthane) ;

– les polychlorinates biphenyls (PCB dont les dichlorobiphenyls [DCB], tétrachlorobiphenyls [TCB], les hexachlorobiphenyls [HCB] et les biphenyls hydroxylés qui sont utilisés comme isolants électriques, lubrifiants, plastiques [9].

D'autres xénoestrogènes sont des insecticides carbamates (dont le propoxur) et une grande variété de molécules chimiques utilisées dans la manufacture des plastiques tels les alkylphénols (dont nonylphénol, octylphénol), les bisphénol A et phtalate esters (dont benzylbutylphtalate [BBP]) [10, 11].

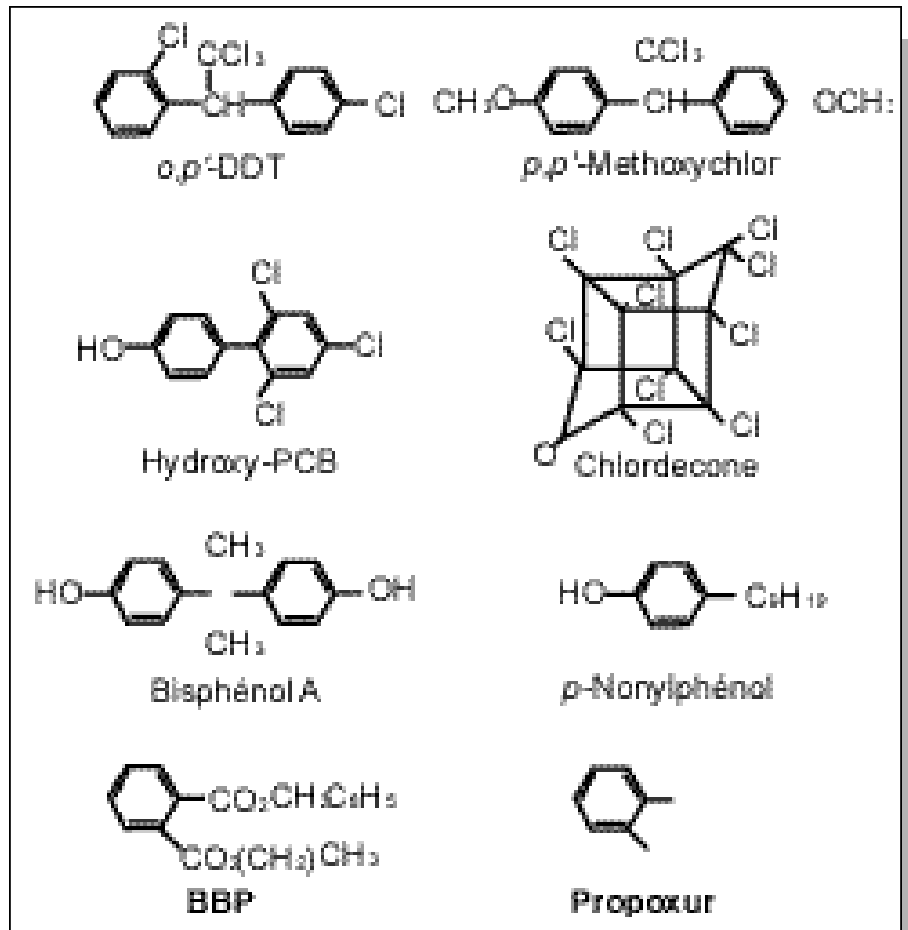


Figure 1. Structures chimiques représentatives des différentes classes de xénoestrogènes comprenant :

- Organochlorées : *o,p'*-DDT, *p,p'*-méthoxychlor.
- Polychlorés Biphenyls PCB5 : hydroxy PCB de chlordecone (kepene).
- Dérivés phénoliques : bisphénol A. *p*-monylphénol.
- Phtalates : BBP.
- Corbamates : propoxur.

La présence de xénoestrogènes est souvent inattendue ainsi le biphénol A, molécule utilisée pour le plastique se retrouve dans certains composants de la chirurgie dentaire, le revêtement interne des containers et canette de boisson ou alimentation en aluminium. Ce composé est détecté dans la salive, dans les aliments et les boissons ayant été stockés dans des récipients ayant du biphénol A en revêtement interne [12, 13].

2. Activité

De façon ironique, en 1986, les premiers travaux expérimentaux mettant en évidence l'interférence de ces composés portaient sur la non reproductibilité de l'hormonosensibilité in vitro de modèle cellulaire tels les MCF7 et l'observation d'effets pharmacologiques paradoxaux.

Dans ces modèles in vitro standard de cellule épithéliale mammaire humaine, il est très difficile d'obtenir une réponse à un stimulateur à l'estradiol (E2). La réponse est faible et incomparable avec les réponses observées in vivo. En revanche, l'hydroxy-tamoxifène (OH-TAM) donne des réponses extrêmement importantes très inférieure aux taux de prolifération dite contrôle (*figure 2*).

Berthois et Katzenellenbogen [14] ont mis en évidence que les préparations commerciales de phénolsulfonphtaléine (rouge de phénol), indicateur de PH présent dans tous les milieux de culture in vitro, avaient intrinsèquement une faible activité estrogénique, mais la concentration d'utilisation standard (mM) en faisait une molécule interférente majeure.

L'unique retrait de ce composé entraînait une réponse très importante à E2. L'OH-TAM n'avait spontanément aucun effet dans une culture in vitro sans rouge de phénol, en revanche, il bloquait parfaitement par un retour à la valeur contrôle de prolifération toute stimulation par E2 et rouge de phénol.

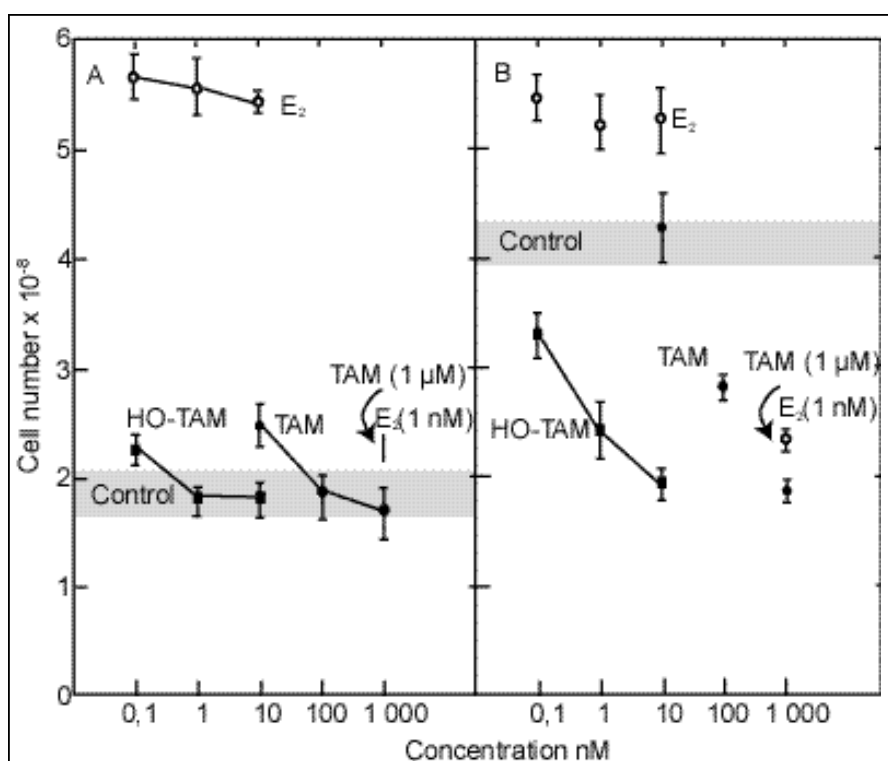


Figure 2. Effet du rouge de phénol indicateur standard du PH des milieux de culture sur la croissance et réponse de la lignée MCF7 via l'estradiol et OH-TAM.

Control : taux de prolifération exprimé en 10⁶ cellules dans des conditions de culture standard dans :

A- milieu sans rouge de phénol.

B - milieu avec rouge de phénol.

E2 : stimulation obtenue avec 0,1-1-10 nanoMolaire (nM).

HO-TAM : inhibition de croissance 0,1-1-10 nanoMolaire (nM).

TAM + E2 : inhibition obtenue par TAM (1µM) et E2 (1nM).

L'effet spontané paradoxal observé pour l'OH-TAM n'était en fait que le blocage d'une stimulation incontrôlée estrogénique par le rouge de phénol (*figure 2*) [14].

Cette activité estrogénique est due à un contaminant mineur lipophile (environ 0,002%) qui a été caractérisé comme étant le bis (4-hydroxyphényl) [2-(phénoxy-sulfonyl)-phényl] méthane [15].

Ce composé se lie au récepteur des estrogènes $ER\alpha$ et stimule la prolifération des cellules $ER\alpha$ positives dont les MCF7.

Ces mêmes cellules MCF7 proliférant dans un milieu préparé à partir d'eau stérile, autoclavée dans des récipients en polycarbonate, présentent un taux de récepteurs à la progestérone très élevé. Le composé estrogène perturbant relargué par le plastique polycarbonate à l'autoclavage a été isolé et caractérisé par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire [16], il s'agit de bis phénols A (*figure 1*). De façon identique, le nonylphénol (*figure 1*) relargué par les plastiques en polystyrène des tubes et flacons de culture induit une prolifération des MCF7 et une induction des RP dans ces cellules [17].

Détection des molécules

Si l'on considère la totalité des classes moléculaires capables de se lier au récepteur des estrogènes, il est virtuellement impossible de prédire quelle structure serait un ligand parfait. De même, il est impossible de prédire quelles modifications structurales peuvent leur faire perdre la totalité de leur capacité de liaison au site actif du récepteur.

Pour l'exemple, l'insecticide chlordecone (kepone) (*figure 1*) qui comporte des résidus chlorés et une structure spatiale quadrangulaire, se lie comme un agoniste au ER. Dans les tests *in vivo* chez la ratte, il démontre une activité estrogénique sur la croissance utérine, l'implantation embryonnaire et l'axe hypothalamo-hypophysaire [18-20].

Les études de liaison doivent prendre en compte non seulement les récepteurs $ER\alpha$ mais également $ER\beta$, car tous deux sont capables de lier les xénoestrogènes (type méthoxychlore bisphénol A) avec une très faible affinité [21].

Pour caractériser une molécule comme étant de la classe des xénoestrogènes, l'utilisation de test *in vitro* mais également *in vivo*, est recommandée [22].

In vitro, l'interaction directe de ces molécules avec ER peut être démontrée par une technique de compétition avec la liaison de E2 et induction de la liaison de ER (associée à ces molécules) avec le site spécifique chromatine en "Estrogène Responsive Element" (ERE) [23-25]. Mais des faux négatifs peuvent être observés en raison du manque dans ces essais de bioactivation possible d'un proestrogène en son métabolite estrogénique [26].

Pour démontrer l'activité estrogénique potentielle des molécules testées, les essais utilisent l'induction des gènes E2 régulés tels PS2, le récepteur à la progestérone, la stimulation de la prolifération de lignée cellulaire E2 sensible (dans des tests *in vivo*, conditions spécifiques cf. structure/activité), ces tests *in vivo* de la cornification des cellules vaginales et augmentation du poids de l'utérus chez les rongeurs [27, 28].

L'interférence potentielle de l'accès à ER par une liaison avec la molécule sérique de transport TeBG (ou SHBG) peut être démontrée par des tests *in vitro* de prolifération des

MCF7 en condition "serum free" avec ou non présence de TeBG ou sérum humain [29].

Des équipes de recherche ont mis au point des tests *in vitro* rapide de "screening" utilisant des cellules transformées par transfection stable. Ces cellules tests ont été transfectées par le gène humain ER α et un ERE associé à un gène "reporter" facilement identifiable tel le gène de la luciférase [30-33].

Dans ces tests l'activité relative des xénoestrogènes est déterminée en se référant à l'activité obtenue avec l'estradiol à des concentrations nanoMolaires (E2 nM) (concentration physiologique). Dans ces conditions, le p nonylphénol, bisphénol A, méthoxychlore et DDT sont de 5 000 à 1 000 000 fois moins actifs que E2.

Ces affinités sont apparemment faibles, mais dans le cadre de l'évaluation des perturbations biologiques potentielles de ces molécules, on doit, d'une part, également tenir compte des concentrations environnementales polluantes possibles et, d'autre part, de l'accumulation tissulaire progressive des xénoestrogènes par l'exposition des organismes à cette pollution.

Les tests sur cellules transformées sont rapides et de plus permettent les analyses systématiques des différentes structures des composés, tels les alkylphénols dans lesquels la position (para > méta > ortho) ainsi que le branchement (para > méta > ortho) des résidus alkyl affectent le potentiel estrogénique [34].

De telles études permettent la mise au point de modèles tridimensionnels qui aident à l'identification des xénoestrogènes [35].

Cependant, la combinaison de tests *in vivo* et *in vitro* est nécessaire pour cerner le potentiel estrogénique des xénoestrogènes [26-36]. Par ailleurs, un aspect particulier de potentialisation et synergie d'action avec les molécules hormonales endogènes a été démontré, mais la difficulté de les reproduire ne doit pas masquer ou faire oublier cet effet potentiel [37-40]. et doit inciter l'expertise de ces molécules dans des populations parfaitement définies sur le plan de leur charge estrogénique comprenant :

- L'évaluation des estrogènes gonadiques et corticosurrénaux.
- La fonction ovarienne cyclique ou non.
- La masse grasseuse corporelle.
- Il est également important d'avoir une évaluation du stockage grasseux des xénoestrogènes, évaluation directe ou indirecte par dosage plasmatique.

L'effet potentialisateur peut s'observer spécifiquement dans un sous-groupe, celui des femmes postménopausées à faible masse grasseuse corporelle qui présente la charge estrogénique endogène la plus faible.

Ainsi bien que la DDT et le PCB ont été interdits d'utilisation dans les années 1970 aux États-Unis et dans la plupart des pays occidentaux. Vingt ans plus tard, ces molécules et leurs métabolites ont été détectés dans les fluides et tissus de la plupart des résidents des pays industrialisés occidentaux [41, 42].

Les composés organochlorés sont des molécules hautement lipophiles et résistantes aux métabolismes de type I et II permettant leur excrétion. Ces propriétés intrinsèques permettent ou provoquent leur séquestration dans les tissus grasseux de l'organisme avec des taux 200 à 400 fois supérieurs à ceux observés dans le plasma [9].

Les taux plasmatiques mesurant du DDE (métabolite du DDT) sont positivement corrélés

à la masse corporelle et augmentent avec l'âge, reflétant ainsi l'exposition aux polluants qui peut s'étendre sur de nombreuses années [43].

Des mesures de taux plasmatiques répétées à court terme, 2 à 3 mois d'intervalle, sont relativement stables et permettent une estimation fiable à l'exposition aux xénoestrogènes [44-46].

La séquestration dans le tissu graisseux de ces molécules lipophiles (et entre autres les organochlorés) explique leurs concentrations très importantes dans le lait, et le fait que la sécrétion lactée est la voie rapide majeure d'élimination ou excrétion de ces molécules. La concentration dans le lait des organochlorés diminue avec la durée cumulative de la lactation [47]. De ce fait, la concentration corporelle des organochlorés varie de façon importante chez les femmes jeunes et cela en corrélation inverse avec leur période cumulative de lactation.

Un des aspects protecteurs de la lactation sur l'incidence du cancer du sein pourrait être le fait que la lactation augmente l'excrétion des molécules polluantes lipophiles dont les organochlorés, diminuant de ce fait la charge tissulaire [48].

Cet aspect devrait faire prendre en compte la mesure de l'impact de toutes ces molécules lipophiles présentées et concentrées dans l'alimentation lactée (d'origine humaine ou non) sur le nouveau-né et l'enfant.

Épidémiologie clinique

Le sujet le plus étudié est celui du lien pesticides-cancer du sein. Avec plus de 30 études disponibles. Il s'agit d'une vieille hypothèse (plus de 25 ans) [49-54], qui est née d'une considération générale de la cancérogénicité de ces produits pour aller vers une extrapolation à des sites spécifiques de cancer ou d'un site à l'autre, par exemple des lymphomes au cancer du sein. Le débat qui persiste est de faire la part des choses entre l'effet pur de cancérogenèse et celui de l'activité hormonale. Les articles pionniers ont été réalisés sur des femmes décédées [55]. Ils ont évalué la concentration des composés organochlorés dont des insecticides et des biphényles polychlorés (PCB). Ils ont trouvé des niveaux plus élevés de p, p'-DDT et o-p'-DDD dans le tissu cancéreux mammaire que dans des tissus sains ou provenant de témoins. De la même façon, des niveaux plus élevés de DDE ont été retrouvés chez les femmes avec cancer par rapport à celles sans cancer [56], en particulier avec une différence au niveau du tissu adipeux mammaire de femmes avec cancer du sein par rapport à celui de femmes avec des pathologies mammaires non cancéreuses [57, 58]. L'hypothèse était avancée selon laquelle les xénoestrogènes représentent une cause évitable de cancer du sein [49-59]. La première vague d'études a été le plus souvent positive. C'est ainsi qu'ont été décrits pour les cas de cancer du sein par rapport à des témoins, des niveaux plus élevés de PCB, p,p'-DDE, p,p'-DDT, PCB et DDE, PCB, parfois uniquement dans le cas de tumeurs positives pour les récepteurs aux estrogènes (pour PCB et DDE). Toutefois, certaines études ne retrouvaient pas de différence et certaines trouvaient même des niveaux de résidus organochlorés plus bas chez les cas par rapport aux témoins [43, 65].

Dans un deuxième temps, les études sont devenues plus spécifiques, avec des résultats pour des composés précis. C'est ainsi qu'un risque général faible a pu être décrit pour les PBB,

l'OCDD mais pas pour les PCDD et PCDF, l'hexachlorobenzène et les PCB 118 et 138, PCB 105 et 118, dieldrine avec un effet sur la survenue mais aussi la survie du cancer du sein ou encore un effet des DDE dans l'agressivité du cancer. Néanmoins, la plupart des articles de revue écrits à la fin des années 1990 étaient rassurants [73, 74]. Cette impression a été confortée par d'autres études [46, 75-79] ainsi qu'une méta-analyse [80], ne retrouvant pas d'association entre pesticides et cancer du sein.

La question aurait pu être considérée comme résolue si des études récentes n'avaient pas retrouvé de liaison entre l'incidence des xénoestrogènes sur le cancer du sein. Les niveaux de DDE ont été associés de façon positive, même si non statistiquement significative avec le risque de cancer du sein, surtout en postménopause dans une étude dans la ville de Mexico [81]. La dernière étude sur le sujet [82] montre que le risque lié aux PCB est modifié par le polymorphisme du CYP1A1-MspI (transition T à C au nucléotide 6235) et le polymorphisme de l'exon 7. Ces résultats montrent la nécessité de mieux définir les groupes de population à risque, par exemple au niveau des profils de polymorphismes génétiques.

Conclusion

Cette revue de la littérature épidémiologique, rend difficile la proposition d'une réponse simple et c'est cela qui justifie la conduite d'étude multicentrique dans des populations actuellement en pleine transition épidémiologique avec une incidence du cancer du sein qui évolue rapidement et aussi une profonde modification d'exposition au cours des vingt dernières années telles les populations du Maghreb, du sud de l'Europe (Espagne, Italie, France).

Dans les études menées jusqu'à aujourd'hui, il est possible de noter plusieurs limites. Les pesticides dosés étaient différents d'une étude à l'autre, en général déterminés en nombre relativement réduit parfois dans le sérum, parfois dans le tissus adipeux et avec des méthodes diverses. Surtout, aucune pratiquement, à l'exception d'une étude récente conduite par *Olea-Serrano* et al., ne tentait d'estimer un impact global de produits multiples, auxquels la personne a été exposée de façon répétée, à faibles doses, cumulées tout au long de la vie, dès la période intra-utérine.

Deux mécanismes différents et vraisemblablement complémentaires peuvent être proposés : une action purement carcinogène et une action essentiellement hormonale et associant ainsi carcinogène et promoteur oncocarcinogène. Comme la majorité des produits qui ont été utilisés dans le passé avaient une activité prédominante de type estrogénique, il conviendra de mesurer la charge estrogénique globale, et aussi de s'efforcer de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, notamment par le biais de l'évaluation du polymorphisme des cytochromes impliqués dans le métabolisme des estrogènes et du pouvoir carcinogénique des composés et de leurs métabolites dérivés dans des études futures.



Références bibliographiques

- [1] Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993;101(5):378-84. Review.
- [2] Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproduc-

tive tract? *Lancet* 1993;29;341(8857):1392-5.

[3] Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104 Suppl 4:741-803. Review.

[4] Gladen BC, Rogan WJ. DDE and shortened duration of lactation in a northern Mexican town. *Am J Public Health*. 1995;85(4):504-8.

[5] Golden RJ, Noller KL, Titus-Ernstoff L, Kaufman RH, Mittendorf R, Stillman R, Reese EA. Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Crit Rev Toxicol*. 1998;28(2):109-227. Review.

[6] Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996;104 Suppl 4:715-40. Review.

[7] Fenner-Crisp PA. Endocrine Disruptor Risk Characterization: An EPA Perspective *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26(1):70-3.

[8] Gray LE Jr, Kelce WR, Wiese T, Tyl R, Gaido K, Cook J, Klinefelter G, Desaulniers D, Wilson E, Zacharewski T, Waller C, Foster P, Laskey J, Reel J, Giesy J, Laws S, McLachlan J, Breslin W, Cooper R, Di Giulio R, Johnson R, Purdy R, Mihaich E, Safe S, Colborn T, et al. Endocrine Screening Methods Workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reprod Toxicol* 1997;11(5):719-50.

[9] Kutz FW, Wood PH, Bottimore DP. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1991;120:1-82. Review.

[10] Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JPA. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;103(6):582-7.

[11] Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;65(1-6):143-50. Review.

[12] Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 1995;103(6):608-12.

[13] Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996;104(3):298-305.

[14] Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(8):2496-500.

[15] Bindal RD, Katzenellenbogen JA. Bis(4-hydroxyphenyl)[2-(phenoxy-sulfonyl)phenyl]methane: isolation and structure elucidation of a novel estrogen from commercial preparations of phenol red (phenolsulfonphthalein) *J Med Chem* 1988;31(10):1978-83. Erratum in: *J Med Chem* 1989;32(12):2582.

[16] Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993;132(6):2279-86.

[17] Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* 1991;92:167-73.

[18] Palmiter RD, Mulvihill ER. Estrogenic activity of the insecticide kepone on the chicken oviduct. *Science* 1978;28,201(4353):356-8.

[19] Hudson PM, Yoshikawa K, Ali SF, Lamb JC 4th, Reel JR, Hong JS. Estrogen-like activity of chlordecone (kepone) on the hypothalamo-pituitary axis: effects on the pituitary enkephalin system. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;74(3):383-9.

[20] Johnson DC. Estradiol-chlordecone (Kepone) interactions: additive effect of combinations for uterotrophic and embryo implantation functions. *Toxicol Lett* 1996;89(1):57-64.

[21] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863-70.

[22] Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect* 1996;104(12):1296-300.

- [23] Nesaretnam K, Corcoran D, Dils RR, Darbre P. 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 1996;10(8):923-36.
- [24] Danzo BJ. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect* 1997;105(3):294-301.
- [25] Balaguer P, François F, Comunale F, Fenet H, Boussioux AM, Pons M, Nicolas JC, Casellas C. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci Total Environ* 1999;233(1-3):47-56.
- [26] Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 2:577-82. Review.
- [27] Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995;103 Suppl 7:II3-22.
- [28] Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J. The rodent utero-trophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;25(2):176-88.
- [29] Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 1997;105(1):70-6.
- [30] Arnold SF, Robinson MK, Notides AC, Guillette LJ Jr, McLachlan JA. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104(5):544-8.
- [31] Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* 1997;105(7):734-42.
- [32] Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143(1):205-12.
- [33] Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 1997;105(8):802-11.
- [34] Routledge EJ, Sumpter JP. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J Biol Chem* 1997;272(6):3280-8.
- [35] Waller CL, Oprea TI, Chae K, et al. Ligand-based identification of environment estrogens. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1240-8.
- [36] Petit F, Le Goff P, Cravedi JP, Valotaire Y, Pakdel F. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J Mol Endocrinol* 1997;19(3):321-35.
- [37] Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJ Jr, McLachlan JA. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*. 1996 Jun 7;272(5267):1489-92. Retraction in: McLachlan JA. *Science* 1997;25,277(5325):462-3.
- [38] Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Harris CA, Routledge EJ, Sumpter JP. Synergy between synthetic oestrogens? *Nature*. 1997;6,385(6616):494.
- [39] McLachlan JA. Synergistic effect of environmental estrogens: report withdrawn. *Science* 1997; 25,277(5325):462-3.
- [40] Ramamoorthy K, Wang F, Chen IC, Norris JD, McDonnell DP, Leonard LS, Gaido KW, Bocchinfuso WP, Korach KS, Safe S. Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 1997;138(4):1520-7.
- [41] Jensen AA. Polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorodibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorodibenzofurans (PCDFs) in human milk, blood and adipose tissue. *Sci Total Environ* 1987;64(3):259-93.
- [42] Longnecker MP, Rogan WJ, Lucier G. The human health effects of DDT(dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu Rev Public Health* 1997;18:211-44. Review.
- [43] Hunter DJ, Hankinson SE, Laden F, Colditz GA, Manson JE, Willett WC, Speizer FE, Wolff MS. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997;337(16):1253-8.
- [44] Gammon MD, Wolff MS, Neugut AI, Terry MB, Britton JA, Greenebaum E, Hibshoosh H, Levin B, Wang Q, Santella RM. Treatment for breast cancer and blood levels of chlorinated hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(6):467-71.
- [45] Gammon MD, Wolff MS, Neugut AI, Terry MB, Papadopoulos K, Levin B, Wang Q, Santella RM. Temporal varia -

- tion in chlorinated hydrocarbons in healthy women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(5):327-32.
- [46] Gammon MD, Wolff MS, Neugut AI, Eng SM, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Levin B, Stellman SD, Kabat GC, Hatch M, Senie R, Berkowitz G, Bradlow HL, Garbowski G, Maffeo C, Montalvan P, Kemeny M, Citron M, Schnabel F, Schuss A, Hajdu S, Vinceguerra V, Niguidula N, Ireland K, Santella RM. Environmental toxins and breast cancer on Long Island. II. Organochlorine compound levels in blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(8): 686-97.
- [47] Dewailly E, Ayotte P, Laliberte C, Weber JP, Gingras S, Nantel AJ. Polychlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) concentrations in the breast milk of women in Quebec. *Am J Public Health* 1996;86(9):1241-6.
- [48] Dewailly E, Ayotte P, Brisson J. Protective effect of breast feeding on breast cancer and body burden of carcinogenic organochlorines. *J Natl Cancer Inst* 1994;18,86(10):803.
- [49] Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 1993;101(5):372-7. Review.
- [50] Hunter DJ, Kelsey KT. Pesticide residues and breast cancer: the harvest of a silent spring? *J Natl Cancer Inst* 1993;21;85(8):598-9.
- [51] Key T, Reeves G. Organochlorines in the environment and breast cancer. *BMJ* 1994;11,308(6943):1520-1
- [52] Wolff MS, Collman GW, Barrett JC, Huff J. Breast cancer and environmental risk factors: epidemiological and experimental findings. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:573-96. Review.
- [53] Safe SH. Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ Health Perspect* 1995;103(4):346-51. Review.
- [54] Safe SH. Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:121-58. Review.
- [55] Wassermann M, Nogueira DP, Tomatis L, Mirra AP, Shibata H, Arie G, Cucos S, Wassermann D. Organochlorine compounds in neoplastic and adjacent apparently normal breast tissue. *Bull Environ Contam Toxicol* 1976;15(4):478-84.
- [56] Unger M, Olsen J. Organochlorine compounds in the adipose tissue of deceased people with and without cancer. *Environ Res* 1980;23(2):257-63.
- [57] Unger M, Kiaer H, Blichert-Toft M, Olsen J, Clausen J. Organochlorine compounds in human breast fat from deceased with and without breast cancer and in a biopsy material from newly diagnosed patients undergoing breast surgery. *Environ Res* 1984;34(1):24-8.
- [58] Mussalo-Rauhamaa H, Hasanen E, Pyysalo H, Antervo K, Kauppila R, Pantzar P. Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer* 1990;15,66(10):2124-8.
- [59] Aschengrau A, Coogan PF, Quinn M, Cashins LJ. Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis. *Am J Ind Med* 1998;34(1):6-14.
- [60] Falck F, Ricci A, Wolff MS, Godbold J, Deckers P. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 1992;47(2):143-6.
- [61] Schechter A, Toniolo P, Dai LC, Thuy LT, Wolff MS. Blood levels of DDT and breast cancer risk among women living in the north of Vietnam. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997;33(4):453-6.
- [62] Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(8):648-52.
- [63] Djordjevic MV, Hoffmann D, Fan J, Prokopczyk B, Citron ML, Stellman SD. Assessment of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose breast tissue using a supercritical fluid extraction method. *Carcinogenesis* 1994;15(11):2581-5.
- [64] Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N. Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and asian women. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(8):589-99.
- [65] López-Carillo L, Blair A, Lopez-Cervantes M, Cebrian M, Rueda C, Reyes R, Mohar A, Bravo J. Dichlorodiphenyltrichloroethane serum levels and breast cancer risk: a case-control study from Mexico. *Cancer Res*.
- [66] Henderson AK, Rosen D, Miller GL, Figs LW, Hoar Zahm S, Sieber SM, Rothman N, Humphrey HE, Sinks T. Breast cancer among women exposed to polybrominated biphenyls. *Epidemiology* 1995;6(5):544-6.
- [67] Hardell L, Lindström G, Liljegren G, Dahl P, Magnuson A. Increased concentrations of octachlorodibenzo-p-dioxin in cases with breast cancer - results from a case-control study. *Eur J Cancer Prev* 1996;5:351-7.
- [68] Dorgan JF, Brock JW, Rothman N, Needham LL, Miller R, Stephenson HE Jr, Schussler N, Taylor PR. Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA). *Cancer Causes Control* 1999;10(1):1-11.

- [69] Aronson KJ, Miller AB, Woolcott CG, Sterns EE, McCready DR, Lickley LA, Fish EB, Hiraki GY, Holloway C, Ross T, Hanna WM, SenGupta SK, Weber JP. Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(1):55-63.
- [70] Høyer AP, Grandjean P, Jorgensen T, Brock JW, Hartvig HB. Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 1998;352(9143):1816-20.
- [71] Høyer AP, Jorgensen T, Brock JW, Grandjean P. Organochlorine exposure and breast cancer survival. *J Clin Epidemiol* 2000;53(3):323-30.
- [72] Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J, Dewailly E. Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:161-6.
- [73] Safe SH. Xenoestrogens and breast cancer. *N Engl J Med* 1997;337(18):1303-4.
- [74] Laden F, Hunter DJ. Environmental risk factors and female breast cancer. *Annu Rev Public Health* 1998;19:101-23.
- [75] van't Veer P, Lobbezoo IE, Martin-Moreno JM, Guallar E, Gomez-Aracena J, Kardinaal AFM, Kohlmeier L, Martin BC, Strain JJ, Thamm M, van Zoonen P, Baumann BA, Huttunen JK, Kok FJ. DDT (dicophane) and postmenopausal breast cancer in Europe: case-control study. *BMJ* 1997;315(7100):81-5.
- [76] Stellman SD, Djordjevic MV, Britton JA, Muscat JE, Citron ML, Kemeny M, Busch E, Gong L. Breast cancer risk in relation to adipose concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1241-9.
- [77] Wolff MS, Zeleniuch-Jacquotte A, Dubin N, Toniolo P. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:271-7.
- [78]. Zheng T, Holford TR, Taylor Mayne S, Tessari J, Ward B, Carter D, Hansen Owens P, Boyle P, Dubrow R, Archibeque-Engle S, Dawood O, Hoar Zahm S. Risk of female breast cancer associated with serum polychlorinated biphenyls and 1,1-dichloro-2,2'-bis(p-chlorophenyl)ethylene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:167-74.
- [79]. Laden F, Hankinson SE, Wolff MS, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: an extended follow-up in the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* 2001a;91(4): 568-74.
- [80] Laden F, Collman G, Iwamoto K, Alberg AJ, Berkowitz GS, Freudenheim JL, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Holford TR, Huang HY, Moysich KB, Tessari JD, Wolff MS, Zheng T, Hunter DJ. 1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and polychlorinated biphenyls and breast cancer: combined analysis of five U.S. studies. *J Natl Cancer Inst* 2001b;93(10):768-76.
- [81] Romieu I, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E, Weber JP, Dewailly E. Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am J Epidemiol* 2000;152(4):363-70.
- [82] Laden F, Ishibe N, Hankinson SE, Wolff MS, Gertig DM, Hunter DJ, Kelsey KT. Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1, and breast cancer risk in the nurses' health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11: 1560-5.