

Université du Québec
INRS-Santé

**MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE MESURE DE LA PROLIFÉRATION
DES HÉPATOCYTES DE RAT EN CULTURE ET ÉVALUATION DU
POTENTIEL MITOGÈNE DE L'HCB ET DE CERTAINES COMPOSANTES
STÉROÏDIENNES**

Par
Isabelle Bégin
Baccalauréat en biochimie (B.Sc.)

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Denis Nadeau
Unité de santé et environnement
Université Laval

Examineur interne

Daniel Cyr
INRS-Santé

Directeur de recherche

Michel Charbonneau
INRS-Santé

Septembre 1998

© droits réservés de Isabelle Bégin, 1998

RÉSUMÉ

La littérature relate un nombre croissant de facteurs environnementaux susceptibles d'augmenter l'incidence du cancer chez l'humain. Une classe importante de contaminants environnementaux est celle des organochlorés. L'hexachlorobenzène (HCB) en est un membre important quant à l'exposition humaine. L'HCB a un effet hépatocancérogène chez le rat et cet effet est plus grand chez la femelle que chez le mâle (Lambert et al., 1983; Smith et Cabral, 1980; Smith et al., 1985). L'HCB est un cancérigène de type épigénétique. Un aspect mécanistique important par lequel les cancérigènes épigénétiques agissent est par l'augmentation de la prolifération cellulaire. La connaissance du mécanisme d'action de l'HCB permettrait d'évaluer le risque d'exposition chez l'humain.

L'objectif des présents travaux est de déterminer si l'HCB induit la prolifération des hépatocytes en culture et de déterminer si l'EGF ou certaines composantes stéroïdiennes sont impliqués dans l'induction de l'effet hépatocancérogène de l'HCB. Pour répondre à cet objectif deux sous-objectifs techniques ont été accomplis. Tout d'abord, nous nous sommes assurés de la viabilité et de la reproductibilité de la préparation d'hépatocytes isolés chez les rats femelles. Deuxièmement, nous avons mis au point une méthode de mesure non-radioactive de la prolifération cellulaire dans une culture primaire d'hépatocytes cultivés en monocouche.

L'utilisation d'une méthode d'enrichissement de la préparation d'hépatocytes par une centrifugation dans un milieu percoll à une densité de 1,06 g/ml a permis d'obtenir une préparation d'hépatocytes avec une viabilité moyenne de 92 % comparativement à 77 % pour les hépatocytes non enrichis. Contrairement aux hépatocytes non enrichis, les cellules parenchymateuses viables enrichies au percoll ne présentent pas de cytotoxicité lorsque soumises à des concentrations d'HCB variant de 10 à 100 μ M.

Une nouvelle méthode de mesure de la prolifération des hépatocytes primaires cultivés en monocouche a été mise au point. Cette méthode est basée sur l'incorporation de la bromodéoxyuridine (BrdU) par les cellules en phase S, c'est-à-dire qui synthétisent de l'ADN. Le nombre de cellules marquées est évalué par une méthode ELISA réalisée directement dans les plaques multi-puits où s'est fait la culture des cellules; l'intensité de l'absorbance est proportionnelle au nombre de molécules de BrdU réagissant avec l'anticorps primaire. La méthode ELISA-BrdU a permis de détecter une prolifération cellulaire significativement ($p < 0.05$) différente entre les hépatocytes témoins, ceux traités avec 10 ng/ml d'EGF et ceux traités avec 20 ng/ml d'EGF. La méthode d'incorporation de [^3H]-thymidine (quantifiée par scintillation) ne réussit pas à détecter de différence significative ($p > 0.05$) dans l'induction de la prolifération des hépatocytes soumis à 10 ng/ml comparativement à 20 ng/ml d'EGF.

Les hépatocytes primaires de rat femelle en monocouche traités avec 50 μM d'HCB, en présence ou en absence d'EGF ou de 17β -estradiol, ont un taux de prolifération des cellules parenchymateuses cultivées dans le milieu Williams'E comparable à celui des témoins. Cependant, des travaux complémentaires ont montré que l'HCB induit une augmentation de la prolifération des hépatocytes de rat mâle, cultivés dans le milieu Leibovitz L-15. De plus, l'effet prolifératif induit par 1 nM d'estrone est inhibé par 50 μM d'HCB. Les expériences ont démontré que 1 nM d'éthiocholanolone ou 1 nM de 5β -androstanedione produit respectivement une augmentation de 256 et 265% de la prolifération des hépatocytes par rapport au groupe témoin. L'addition de 50 μM d'HCB n'amène aucune différence significative ($p > 0.05$) sur le pouvoir mitogène de ces deux stéroïdes sur les hépatocytes en culture.

Les résultats de ces travaux nous incitent à émettre l'hypothèse que l'HCB induit son effet hépatocancérogène chez le rat femelle en induisant une accumulation de certains β -androgènes, dont l'androstanedione et l'éthiocholanolone lesquels pourraient à leur tour causer une augmentation de la prolifération cellulaire. Cette augmentation indirecte de la prolifération cellulaire pourrait favoriser le développement de l'hépatocarcinogénèse chez le rat femelle. Enfin, l'HCB possède un effet mitogène sur les hépatocytes primaires

en monocouche qui est dépendant du type de milieu de culture employé. Les observations effectuées dans ce mémoire suggèrent qu'une action directe ou indirecte (modulation des stéroïdes) de l'HCB exerce un effet mitogène au niveau des hépatocytes. L'effet mitogène pourrait donc servir à l'évaluation du risque cancérigène induit par l'HCB.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier Michel Charbonneau, mon directeur de recherche. Il m'a accueilli dans son laboratoire pour un stage d'été. C'est grâce à ce stage que j'ai compris que j'aimais la recherche et que je tenais à faire une maîtrise. Avec son aide et son soutien, j'ai pu passer à travers des temps tourmentés et difficiles.

Merci Martin, tu demeureras le plus beau souvenir de ma maîtrise. Ton amour, ton support, tes conseils et tes encouragements m'ont aidée à parvenir au terme de ce projet.

J'aimerais remercier les membres de ma famille, même s'ils étaient loin, je savais qu'ils étaient là pour m'écouter et parfois venir me voir lorsque le besoin se faisait sentir. Je tiens à vous dire que juste savoir que vous êtes là, m'aide à aller toujours un peu plus loin.

Merci Ninon, ce fût une très grande aventure que nous avons vécue. Sans ta présence je n'aurais jamais pu faire ma maîtrise, puisque tu étais là pour partager les frais de subsistances mais surtout tu as été la première amie que j'ai connu à Montréal. Maintenant que nos chemins s'éloignent, nos moments de folie me manque. Ninon, bonne chance. Merci aussi à Nathalie pour les bons moments en ta compagnie et pour m'avoir aidé à dénicher mon premier emploi au cours de ma maîtrise.

Enfin je tiens à remercier Guylaine Lassonde. Sans toi, je crois que je n'aurais jamais eu d'hépatocytes viables. Tu es une femme très consciencieuse dont les conseils sont toujours appréciés. Merci pour ton constant sourire et ta bonne humeur.

AVANT-PROPOS

J'aimerais dédier ce mémoire à mon père Bernard. Papa, tu es parti beaucoup trop tôt. Lorsque tu nous as quittés je n'avais encore aucune idée de ce que je deviendrais. J'espère que tu es fier de ce que j'ai accompli jusqu'à maintenant.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	v
AVANT-PROPOS	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET DÉFINITION DES OBJECTIFS DE RECHERCHE	3
1.1 L'hexachlorobenzène	3
1.1.1 L'utilisation, l'exposition, l'absorption, la distribution et le métabolisme	3
1.1.2 Les effets pathologiques de l'hexachlorobenzène	5
1.2 La cancérogenèse	7
1.2.1 Généralités.....	7
1.2.2 Le potentiel cancérogène de l'hexachlorobenzène.....	8
1.2.3 Les cancérogènes génotoxiques ou épigénétiques.....	10
1.3 La prolifération cellulaire.....	11
1.3.1 Le cycle cellulaire.....	11
1.3.2 La prolifération cellulaire et le cancer	13
1.3.3 Les méthodes de mesure de la prolifération cellulaire	15
1.4 Les stéroïdes hormonaux.....	20
1.4.1 La synthèse des stéroïdes.....	21
1.4.2 La synthèse des stéroïdes sexuels.....	23
1.4.3 Les stéroïdes, l'hexachlorobenzène et le cancer.....	26

1.5	Modèle d'étude.....	29
1.5.1	Le foie.....	30
1.5.2	Les hépatocytes.....	32
1.5.3	La culture primaire d'hépatocytes et les études toxicologiques	33
1.6	Les objectifs de la recherche	35
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES		37
2.1	Matériel	37
2.1.1	Matériel pour l'isolation des hépatocytes de rat adulte	37
2.1.2	Matériel pour la culture et le traitement des hépatocytes	37
2.1.3	Matériel pour les tests de cytotoxicité.....	38
2.1.4	Matériel pour la quantification de la prolifération cellulaire.....	38
2.1.5	Matériel pour la quantification de l'ADN	39
2.2	Isolation des hépatocytes de rat femelle adulte	39
2.2.1	Méthodologie chez l'animal	39
2.2.2	Perfusion du foie de rat	39
2.2.3	Isolation des hépatocytes.....	40
2.2.4	Évaluation de la viabilité des hépatocytes.....	42
2.3	Culture et traitement des hépatocytes de rat.....	42
2.4	Tests de cytotoxicité.....	43
2.4.1	Relargage de la LDH	43
2.4.2	Quantification des protéines	44
2.5	Essai de la prolifération cellulaire.....	44
2.5.1	Incorporation de la [méthyl- ³ H]-thymidine	44
2.5.2	Isolement et purification de l'ADN	45
2.5.3	Quantification de l'ADN.....	45
2.5.4	Méthode ELISA-BrdU	46
2.6	Analyses statistiques	47

CHAPITRE 3: RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	48
3.1 La préparation d'une culture primaire d'hépatocytes de rat en monocouche	48
3.1.1 La reproductibilité des méthodes d'isolement des hépatocytes avec ou sans milieu percoll	48
3.1.2 La comparaison de la cytotoxicité de l'HCB sur des hépatocytes isolés avec ou sans milieu percoll	49
3.2 La mise au point de la méthode ELISA-BrdU pour mesurer la proli- fération cellulaire dans une culture monocouche d'hépatocytes de rat femelle adulte	51
3.2.1 L'évaluation de la méthode de base ELISA-BrdU	51
3.2.2 La caractérisation de la réaction enzymatique utilisée dans la méthode ELISA-BrdU	52
3.2.3 L'influence de la méthode de fixation des cellules, de la concentration de l'anticorps secondaire et du tampon utilisé	54
3.2.4 Le blocage des sites non-spécifiques	57
3.2.5 La quantité d'hépatocytes utilisés	60
3.2.6 L'évaluation de la méthode ELISA-BrdU optimisée	63
3.2.7 La comparaison de la méthode ELISA-BrdU à la méthode d'incorpora- tion de la [³ H]-thymidine	64
3.3 L'évaluation du potentiel mitogène de l' HCB et de certains stéroïdes sexuels	67
3.3.1 L'HCB et l'EGF	67
3.3.2 L'HCB et les estrogènes	67
3.3.3 L'HCB et les β-androgènes	69
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	71
4.1 La viabilité et la qualité de la préparation d'hépatocytes.....	71
4.2 Le développement d'une méthode améliorée de mesure de la prolifération cellulaire	76
4.3 L'activité mitogène de l'HCB	85

CONCLUSION.....	91
ANNEXE 1	93
RÉFÉRENCES	95

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: Méthodes de mesure de la prolifération cellulaire employant des marqueurs du cycle cellulaire	15
FIGURE 1.2: Voies métaboliques de la stéroïdogenèse	22
FIGURE 1.3: Métabolisme des androgènes et des estrogènes.....	24
FIGURE 1.4: Effet de l'HCB, du TCDD et du 17 β -estradiol sur le métabolisme des androgènes.....	28
FIGURE 3.1: Effet de la concentration d'HCB (incubé 48 h) sur (A) le relargage de la LDH et (B) la concentration protéique totale des hépatocytes isolés avec ou sans l'aide d'un milieu de percoll	50
FIGURE 3.2: Évaluation de la méthode de base ELISA-BrdU, par la mesure de la prolifération cellulaire d'hépatocytes de rat, traités à l'EGF pour 72 h..	52
FIGURE 3.3: Effet de la température sur la formation du <i>p</i> -nitrophénol en fonction de la durée de la réaction enzymatique qui est (A) de 4 h et (B) de 28 h.....	53
FIGURE 3.4: Effet de la concentration (1:1000, 1:10 000 et 1:100 000) de l'anticorps secondaire sur la formation du <i>p</i> -nitrophénol	55
FIGURE 3.5: (A) Influence de la méthode de fixation, de la dilution de l'anticorps secondaire et/ou du tampon utilisé sur la formation du <i>p</i> -nitrophénol. (B) Évaluation de la méthode ELISA-BrdU optimisée en (A), en mesurant la prolifération cellulaire d'hépatocytes de rat, traités à l'EGF pendant 72 h	57
FIGURE 3.6: (A) Évaluation du blocage des sites-non spécifiques avec 0,2% Tween 20 ou 3% BSA ou 10% de sérum de cheval sur des hépatocytes non-traités au BrdU. (B) Évaluation, par la méthode ELISA-BrdU optimisée en (A), de la prolifération d'hépatocytes de rat, traités à l'EGF pendant 72 h	59

- FIGURE 3.7: Comparaison de la prolifération des hépatocytes, mesurée par la méthode ELISA-BrdU, traités avec 10 ng/ml d'EGF et cultivés dans des plaques de 24, 48 et 96 puits 61
- FIGURE 3.8: Comparaison de la formation du *p*-nitrophénol (absorbance nette à 405 nm), dans des plaques de (A) 96, (B) 48 ou (C) 24 puits, en fonction du temps, tel que mesuré par la méthode ELISA-BrdU 63
- FIGURE 3.9: Mesure, par la méthode ELISA-BrdU optimisée, de la prolifération d'hépatocytes incubés avec (EGF) ou sans (témoin) 10 ng/ml d'EGF pendant 72 h..... 64
- FIGURE 3.10: Comparaison de la prolifération cellulaire mesurée par (A) la méthode ELISA-BrdU ou (B) la méthode d'incorporation de [³H]-thymidine..... 66
- FIGURE 3.11: Influence de l'incubation de 0,25 nM du 17 β-estradiol ou de 1 nM d'estrone sur la prolifération d'hépatocytes traités avec ou sans 50 μM d'HCB..... 68
- FIGURE 3.12: Influence de 1 nM d'éthiocholanolone ou de 1 nM de 5β-androstanedione sur la prolifération d'hépatocytes traités avec ou sans 50 μM d'HCB 69

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1: Méthodes de mesure de la prolifération cellulaire avec l'utilisation de marqueurs non-reliés au cycle cellulaire	18
TABLEAU 1.2: Dimorphisme sexuel de l'activité enzymatique et de la concentration protéique du foie de rat	26
TABLEAU 3.1: Effet de l'utilisation d'un milieu percoll sur la viabilité des hépatocytes de rat femelle adulte, fraîchement isolés.....	49
TABLEAU 4.1: Résumé des modifications apportées à la méthode ELISA-BrdU de base (section 2.5.4) en vue de son optimisation	77
TABLEAU A.1: Effet du milieu de culture (Williams'E, avec rouge de phénol ou Leibovitz L-15) sur la prolifération des hépatocytes traités avec l'EGF ou l'HCB	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-OH	2-hydroxy
2-OH-E ₁	2-hydroxyestrone
4-OH	4-hydroxy
4-OH-E ₁	4-hydroxyestrone
ADN	Acide déoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de variance simple
5 β -ANDROSTANEDIONE	5 β -Androstane-3,17-dione
BrdU	5'-Bromo-2'-déoxyuridine
BSA	Albumine du sérum de boeuf (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BPC	Biphényles polychlorés
CKD1	kinase dépendante des cyclines de type 1 (<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)
CYP1A1 ou CYP1B1	Cytochrome p-450 de type 1A1 ou 1B1
DDE	1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthane
DEN	Diéthylnitrosamine
DHEA	Dihydroépiandrostérone
DMSO	Diméthyle Sulfoxyde
E ₁	Estrone
E ₂	17 β -estradiol
E ₃	16 α -hydroxyestrone
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGTA	<i>Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)tetra acetic acid</i>
ELISA	Immunoessai avec une enzyme liée (<i>Enzyme Linked ImmunoAssay</i>)

TDI.....	Valeur acceptable d'ingestion journalière (<i>Tolerable Daily Intake</i>)
TCDD.....	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TDI.....	Valeur acceptable pour l'injection journalière (d'un produit chimique)
TGF α	Facteur de transformation de croissance α (<i>Transforming Growth Factor α</i>)
TGF β	Facteur de transformation de croissance β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)

ER	Réticulum endoplasmique (<i>Endoplasmic Reticulum</i>)
ETHIOCHOLANOLONE.....	3 α -hydroxy-5 β -androstane-17-one
GSH.....	Glutathion
HCB	Hexachlorobenzène
β -HCH.....	β -hexachlorocyclohexane
HEPES	<i>N-2-HydroxyEthyl Piperazine-N'-2-Ethane Sulfonic</i>
HGF/HPTA.....	Facteur de croissance des hépatocytes (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)/Hépatopoïtine A
HPTB	Hépatopoïétine B
HS	Sérum de Cheval (<i>Horse Serum</i>)
IARC	Agence internationale de recherche sur le cancer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IgG	Immunoglobuline G
LDH	Lactate Déhydrogénase
MPF.....	Facteur promoteur de la phase M (<i>M-phase Promoting Factor</i>)
NADH-NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite ou oxydée
4-NPP.....	4-nitrophénylphosphate
P450	Cytochrome p-450
PA	Phosphatase Alcaline
P.B.S.	Tampon sels et phosphate inorganique (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCNA.....	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
SEM	Erreur sur la moyenne (<i>Standard error of the mean</i>)
T.B.S.	Tampon sels et Tris (<i>Tris Buffer Saline</i>)

INTRODUCTION

Dans la littérature, on mentionne un nombre croissant de facteurs environnementaux susceptibles d'augmenter l'incidence du cancer chez l'humain. Une classe importante de contaminants environnementaux sont les organochlorés. Dans cette famille on retrouve le β -hexachlorocyclohexane (β -HCH ou lindane), le 1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthane (DDT), son métabolite majeur le 1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène (DDE) et enfin l'hexachlorobenzène (HCB).

L'HCB administré de façon chronique à des rats de différentes souches augmente la fréquence de tumeurs hépatiques en comparaison des animaux témoins et la réponse est plus sévère chez le rat femelle que chez le rat mâle (Lambrecht *et al.*, 1983; Smith et Cabral, 1980 et Smith *et al.*, 1985). Le gouvernement du Canada et l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) ont respectivement classé l'HCB comme un cancérigène probable et un cancérigène possible chez l'humain (Newhook et Meek, 1994).

Santé et Bien-être social Canada (1993) a recommandé de réunir d'autres données sur les mécanismes d'induction de diverses tumeurs par l'HCB chez les espèces animales, afin de mieux déterminer le risque de développer des néoplasmes chez l'humain. La connaissance du mécanisme d'action de l'HCB et des différents paramètres impliqués, permettrait ultimement de définir quels sont les éléments à considérer lors de l'extrapolation des données à l'humain.

La prolifération cellulaire a été reconnue comme étant un aspect mécanistique important des cancérigènes (Tomatis, 1993; Ames et Gold, 1990). L'effet cancérigène de l'HCB pourrait donc s'exprimer via cette voie. Ainsi, la division cellulaire pourrait s'avérer le paramètre qui permettrait de réaliser ultimement des analyses de risque sur une base scientifique solide, en particulier en ce qui se rapporte à l'établissement d'une dose à laquelle l'humain peut être exposé et qui est sans effet sur l'organisme.

Le dimorphisme sexuel de l'hépatocarcinogénèse de l'HCB amène un questionnement sur le rôle des hormones sexuelles dans l'induction de cet effet. Puisqu'un dimorphisme sexuel dans le métabolisme des stéroïdes et des xénobiotiques au niveau du foie chez les rongeurs est reconnu depuis longtemps, l'étude du rôle des stéroïdes dans l'effet hépatocarcinogène de l'HCB semble justifiée.

Les travaux de recherche qui sont l'objet de ce mémoire cherchent donc à étudier le potentiel cancérogène de l'HCB en évaluant son pouvoir mitogène, seul ou avec l'aide de facteurs mitogéniques ou stéroïdiens, dans le modèle de la culture primaire d'hépatocytes.

Le chapitre 1 est constitué d'une revue de la littérature qui présente les connaissances actuelles sur le HCB, ses effets cancérogènes, les modèles expérimentaux d'études en hépatotoxicologie et l'implication possible des stéroïdes dans l'hépatocarcinogénèse. On retrouve aussi dans ce chapitre la définition des objectifs spécifiques des travaux de recherche rapportés dans ce mémoire. Le deuxième chapitre décrit les méthodologies expérimentales employées pour préparer le système cellulaire, vérifier l'intégrité du système expérimental et mesurer la prolifération cellulaire. Le troisième chapitre présente les résultats sur la mise en place du système cellulaire, la mise au point d'une méthode spécifique pour la mesure de la mitogenèse dans une culture primaire d'hépatocytes et les résultats obtenus suite à l'exposition de ces cellules au HCB avec ou sans la présence de mitogènes ou de stéroïdes. Enfin, le dernier chapitre présente une discussion des résultats expérimentaux.

CHAPITRE 1

RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE ET PRÉSENTATION DES OBJECTIFS DE RECHERCHE

1.1 L'HEXACHLOROBENZÈNE

1.1.1 L'utilisation, l'exposition, l'absorption, la distribution et le métabolisme

L'hexachlorobenzène (C_6Cl_6) fait partie de la grande famille des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés qui sont des contaminants environnementaux répandus. Cette famille regroupe entre autre les biphényles polychlorés (BPC), les chlorodibenzofuranes et les chlorodibenzodioxines (incluant la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou TCDD).

Jusqu'en 1972, l'HCB était principalement utilisé comme fongicide. Après cette date, son utilisation a été interdite. L'HCB continu à être relargué dans l'environnement puisque cet organochloré est un sous-produit de plusieurs procédés de fabrication de pesticides, herbicides, produits chimiques (chlore, atrazine, tétrachlorure de carbone, etc) et pétrochimique, ainsi qu'un intermédiaire dans la fabrication de colorants et dans la synthèse de divers produits chimiques (IARC, 1987). La grande utilisation de l'HCB comme fongicide a contribué à sa distribution massive dans l'environnement. En fait, sa présence environnementale est généralisée à l'échelle du Canada et des États-Unis. La persistance de l'hexachlorobenzène et sa grande capacité à se bioaccumuler (dû à son comportement lipophile) expliquent sa présence dans le sol, l'air, l'eau, les aliments végétaux et animaux.

Chez l'humain, l'ingestion d'HCB est faite par la voie orale via la consommation d'eau potable et de nourriture contaminée. L'ingestion quotidienne moyenne pour un

canadien moyen (70 kg et 70 ans d'espérance de vie) est de 6,2 ng/kg/jour. L'ingestion moyenne est plus élevée chez les enfants de 0 à 6 mois (210 ng/kg/jour) et diminue chez les gens de 20 ans et plus (2,8 ng/kg/jour) (Newhook et Meek, 1994). Dû à son comportement lipophile, le produit ingéré est absorbé passivement, cheminant de la lumière de l'intestin jusqu'au sang pour être distribué aux différents organes et tissus (Matthews, 1986). Chez les humains, l'HCB est majoritairement localisé dans les tissus adipeux. En fait, le composé a été retrouvé chez virtuellement 100% des citoyens testés dans les pays industrialisés (William *et al.*, 1988). Des études ont été effectuées dans le but d'analyser la répartition de l'HCB administré à des rats. Kuiper-Goodman et son équipe (1977) ont démontré que l'HCB administré à des rats des deux sexes est localisé, par ordre décroissant, dans le tissu adipeux, le foie, le cerveau et le sérum. Une étude plus exhaustive réalisée par Foster *et al.* (1993) a déterminé que l'HCB administré (50 mg/kg/jour) à des rats femelles pendant 5 jours était distribué préférentiellement selon l'ordre suivant: lipides péri-ovariens > thyroïde > surrénales > ovaires > thymus > foie > poumons > muscles > coeur > reins > rate > cerveau > hypophyse > sérum.

Malgré l'interdiction de sa production depuis 1972, le taux d'HCB mesuré dans le tissu adipeux des Américains est resté au même niveau entre 1974 et 1984 (Robinson *et al.*, 1990). Ceci est probablement dû au faible métabolisme de l'HCB (Rizzardini et Smith, 1982). Ce processus de biotransformation est fait *in vivo* et *in vitro* selon deux voies: la voie oxydative et la voie de conjugaison au glutathion (GSH). La voie de conjugaison au GSH semble une voie de détoxification. La voie oxydative se fait via différentes déchlorinations conduisant à la formation de quinones. Les métabolites de l'HCB sont principalement excrétés dans les selles (Matthews, 1986) et seulement 5% de la dose administrée est retrouvée dans l'urine (Scheufler et Rozman, 1984). Le métabolite majeur, provenant de la voie oxydative, est le pentachlorophénol (Goldstein *et al.*, 1976). Le métabolisme de l'HCB est lent dû au haut niveau de chlore. Donc, la majorité de l'HCB retrouvé dans la bile, les selles et le tissu adipeux est non-métabolisé.

1.1.2 Les effets pathologiques de l'hexachlorobenzène

Des effets nocifs pour la santé sont induits par l'HCB. Chez les animaux une porphyrie hépatique, des tumeurs hépatiques, une toxicité au niveau du système reproducteur (Courtney, 1979; IARC, 1987), de la toxicité neurologique causant des convulsions et des tremblements (DeMatteis *et al.*, 1961; Mylchreest et Charbonneau, 1994), de l'hypothyroïdie (Peters *et al.*, 1982) et de l'immunotoxicité (Newhook et Meek, 1994) ont été relevés.

Autant chez l'humain que chez l'animal, la toxicité sous-chronique la plus marquée est la porphyrie hépatique, un effet aussi causé par les BPC planaires et le TCDD (Newhook et Meek, 1994). La porphyrie est une perturbation du cycle de synthèse de l'hème et elle est manifestée par une augmentation de la concentration des porphyrines et/ou des précurseurs des porphyrines dans le foie et dans l'urine. Les rats femelles ont une plus grande propension à développer des porphyries comparativement aux mâles (Kuiper-Goodman *et al.*, 1977; Rizzardini et Smith, 1982; Smith *et al.*, 1985, Krishnan *et al.*, 1991). Ce dimorphisme sexuel peut être dû à des différences dans l'expression (ou le rôle) de plusieurs facteurs: l'induction des cytochrome P450 (Smith *et al.*, 1990), la conjugaison du glutathion (Rizzardini et Smith, 1982; D'Amour et Charbonneau, 1992), la modulation des hormones stéroïdiennes (Grant *et al.*, 1975; Legault et Charbonneau, 1997), ou encore la modulation de l'acide ascorbique (Mylchreest *et al.*, 1997).

Lorsque l'HCB est administré de façon chronique à des rats de différentes souches, à des souris ou à des hamsters, la fréquence de tumeurs hépatiques en comparaison des groupes témoins est augmentée (IARC, 1987). La réponse est plus sévère chez les rats femelles que chez les rats mâles (Lambrecht *et al.*, 1983; Smith et Cabral, 1980; Smith *et al.*, 1985). Lambrecht et son équipe (1983) ont démontré que 64 à 87 % des rats femelles Sprague-Dawley recevant une diète contenant de l'HCB ont développé un carcinome hépatocellulaire alors qu'uniquement 6 et 7% des mâles ont répondu. Cette propension des rats femelles à être plus susceptible à développer des hépatocarcinomes se retrouve aussi pour d'autres composés aromatiques polyhalogénés

(TCDD, 1,2,3,6,7,8- et 1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzo-p-dioxins) (Kociba *et al.*, 1978; National toxicity program, 1980).

Chez l'humain, une épidémie de porphyrie *cutanea tarda* (4000 cas rapportés) s'est produite en Turquie entre 1955 et 1959, suite à la consommation de grains traités avec de l'HCB. Les symptômes de la porphyrie ont persisté pendant plus de 25 ans (Crips *et al.*, 1984; Peters *et al.*, 1982). La majorité des patients étaient des enfants, surtout des garçons âgés entre 4 et 14 ans (Cam et Nigogosyan, 1963). Plus de 95% de décès ont été recensés chez les enfants allaités, le lait maternel étant contaminé (Cam, 1960; Peters, 1976; Peters *et al.*, 1978). Aucune donnée sur les niveaux de cancer n'a été publiée concernant cette tragédie. Une étude de cas a rapporté qu'un travailleur exposé à l'HCB, mais possiblement aussi à d'autres hydrocarbures aromatiques chlorés, avait développé un carcinome hépatocellulaire (Seldén *et al.*, 1989). Donc, aucune donnée quantitative sur la cancérogenèse de l'HCB chez l'humain n'est disponible pour permettre d'estimer le risque de développer des carcinomes hépatiques au niveau des populations exposées.

La valeur acceptable pour l'injection journalière (TDI) d'HCB (50 ng/kg/jour) a été évaluée (par Newhook et Meek, 1994) en se basant sur les effets du composé sur le développement de la porphyrie chez le rat et l'induction enzymatique au niveau du foie sans pouvoir inclure l'effet tumorigène. Fait important, la consommation moyenne de source environnementale pour un sous-groupe de la population canadienne est plus grande que cette TDI. En absence de données adéquates chez l'humain et en se fiant aux données animales, le Gouvernement du Canada a récemment classé l'HCB comme étant un cancérigène probable chez l'humain (Newhook et Meek, 1994), tandis que l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) l'a classé comme un cancérigène possible chez l'humain (IARC, 1987). Il est donc essentiel de poursuivre les travaux afin d'identifier des paramètres plus adéquats reliés au mécanisme d'action cancérigène de l'HCB. C'est à partir de ces paramètres que l'extrapolation des données à l'humain ainsi que l'évaluation de la dose sans effet (TDI) pourraient être mieux dégagée. L'HCB figure dans le groupe 1 de la liste des substances d'intérêt prioritaire de la Loi Canadienne sur la protection de l'environnement. Les travaux rapportés dans ce mémoire tenteront

d'analyser quelques voies par lesquelles l'HCB pourrait induire son effet hépatocancérogène. Le rôle que pourrait jouer un facteur endogène important, les stéroïdes sexuels, sera examiné.

1.2 LA CANCÉROGENÈSE

1.2.1 Généralités

Chaque année, environ 6 millions de nouveaux cas de cancer sont déclarés et de ce nombre la moitié des individus décéderont des suites de leur cancer (American Cancer Society, 1986). De plus, le cancer a été évalué comme étant la cause principale de décès chez les femmes aux États-Unis (Henderson *et al.*, 1991). Entre 1973 et 1992 le taux de mortalité causé par le cancer du foie et du système biliaire a augmenté de 29,2 % (National Cancer Institute, 1995). Plusieurs facteurs de risque pour le développement de cancers ont été identifiés: le tabac (cancer du poumon), l'alimentation (cancer du colon et du foie), l'obésité, les radiations aux ultraviolets, les hormones (cancer du sein, des ovaires, du foie et de la prostate), les virus oncogènes, l'hérédité et enfin les produits chimiques (Henderson *et al.*, 1991; IARC, 1987).

Le développement du cancer (incluant l'hépatocarcinogénèse) est un processus complexe qui peut-être divisé en trois phases. (1) L'initiation est caractérisée par l'altération de l'ADN. C'est une phase irréversible qui mène à la formation de cellules préneoplasiques, (2) La promotion, une étape où les dommages faits à l'ADN sont fixés dans le génome. Les cellules initiées deviennent des cellules néoplasiques. Ce changement génomique est génétiquement transmissible et il altère le pouvoir de prolifération et de différenciation de la cellule, (3) Le stage final, la progression, est défini comme l'étape où la cellule cancéreuse exhibe des changements de structure ou d'activité de son génome (Pitot *et al.*, 1987; Milo *et al.*, 1995). Cette phase est caractérisée par une forte croissance cellulaire. L'efficacité d'un cancérogène chimique à induire son effet dépend de plusieurs facteurs comme le cheminement métabolique d'activation du

composé, la dose du composé, la formation ou non d'un adduit, les mécanismes et le taux de réparation de l'ADN, la survie et la reproduction des cellules touchées, ainsi que les types de gènes actifs au moment de l'exposition. Les cancérrogènes chimiques (tel l'HCB) peuvent produire leurs effets au niveau de chacune des trois étapes du cancer. Les effets induits par un cancérrogène lors de l'étape d'initiation sont souvent non détectables. La mesure de la prolifération cellulaire sert donc à évaluer la progression de la cellule possédant un phénotype normal vers celle possédant un phénotype transformé (Milo *et al.*, 1995). Dans l'hépatocarcinogénèse, la séquence des événements est critique pour le développement du cancer. L'omission d'une étape ou l'exécution en même temps de l'initiation et de la promotion diminue ou empêche le développement de tumeurs (Pitot *et al.*, 1987).

1.2.2 Le potentiel cancérrogène de l'hexachlorobenzène

Comme mentionné plus tôt, l'HCB est un hépatocarcinogène chez le rat et la réponse est plus sévère chez la femelle. L'HCB est un promoteur de l'hépatocarcinogène induite par la diéthylnitrosamine (DEN), un agent initiateur de la carcinogénèse (Pereira *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1989).

Le mécanisme expliquant la susceptibilité des rats femelles aux composés aromatiques polyhalogénés (TCDD et HCB) est inconnu, mais plusieurs modèles ont été proposés. L'hypothèse selon laquelle ce dimorphisme pouvait provenir d'une variation dans le taux de transformation de l'HCB en métabolite(s) actif(s) est à rejeter puisqu'*in vivo* et *in vitro* le métabolisme de ce dernier est lent (Stewart et Smith, 1986, 1987). D'ailleurs, il a été observé que des cellules du foie se transforment spontanément dans le foie de rat. L'hypothèse selon laquelle l'administration d'un produit chimique favoriserait la promotion de ces cellules est généralement acceptée comme moteur du développement de tumeurs hépatiques. Une des hypothèses avancées pour expliquer le dimorphisme sexuel dans la carcinogénicité de l'HCB serait que ce dernier agirait comme promoteur de cellules transformées préférentiellement retrouvées chez la femelle. Comme mentionné

plus tôt, deux équipes ont démontré que l'HCB est un promoteur de l'hépatocarcinogénèse induite par la DEN (Pereira *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1989). Cependant, l'équipe de Pereira (1982) a montré une augmentation des lésions prénéoplasiques plus grande chez la femelle comparativement au mâle tandis que l'équipe de Stewart (1989) a observé un effet un peu plus élevé chez les mâles. La différence entre les résultats peut-être expliquée par des différences dans la dose et la période d'exposition. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle l'HCB est un promoteur de l'hépatocarcinogénèse préférentiellement chez la femelle reste à prouver.

Pour expliquer le dimorphisme sexuel dans l'hépatocarcinogénèse de l'HCB, Stewart *et al.*, (1989) ont proposé une troisième hypothèse, selon laquelle la plus grande propension des rats femelles à développer des tumeurs hépatiques suite au traitement à l'HCB serait reliée au développement de porphyries, une manifestation toxique de l'HCB présentant aussi un dimorphisme sexuel en faveur de la femelle. Cette hypothèse a été éliminée par notre équipe. Dans notre laboratoire, le DEN a été administré au moment où la concentration en HCB hépatique était très faible et semblable entre les deux sexes. L'induction de la porphyrie chez les femelles persiste pour plus d'un an (modèle développé par Krishnan *et al.*, 1991). Un an après l'administration du DEN, le nombre de tumeur n'était pas différent chez les femelles porphyriques comparativement aux femelles non-porphyriques. Une autre équipe (Lucier *et al.*, 1991) a traité des rats avec un autre agent aromatique polyhalogéné, le TCDD et le DEN. Cette équipe ont vu une augmentation de la quantité de foyers prénéoplasiques chez les rats femelles "normales" en comparaison des femelles ovariectomisées. Les femelles "normales" étaient aussi plus sensibles au développement de cancer que les mâles. Cette équipe a aussi observé un taux de prolifération cellulaire des hépatocytes plus important chez la femelle "normale" que les rats femelles ovariectomisées. De ceci, Lucier *et al.* (1991) ont conclu que les estrogènes joueraient un rôle important dans le dimorphisme de l'hépatocarcinogénèse. Les conclusions de Lucier et son équipe permettent de soulever l'hypothèse que l'HCB, un aromatique polyhalogéné comme le TCDD, soit lui aussi un agent mitogène augmentant la prolifération des cellules initiées. Des études sont nécessaires pour répondre à cette hypothèse.

1.2.3 Les cancérogènes génotoxiques ou épigénétiques

Les cancérogènes chimiques sont divisés en deux groupes: les génotoxiques et les épigénétiques. Les agents génotoxiques sont des produits électrophiles (directement ou suite à leur biotransformation par les cytochromes P450) qui forment des adduits avec l'ADN. Ces agents causent des altérations génomiques dans la structure ou le fonctionnement de l'ADN de la cellule cible. Environ 40% des produits chimiques cancérogènes sont non-mutagènes chez l'animal (Zeiger, 1987; Ashby et Tennant, 1988) et sont appelés épigénétiques. Ces produits n'ont aucune configuration électrophile et donc ne réagissent pas avec l'ADN. Les agents épigénétiques ont une caractéristique commune à savoir l'apparition et/ou la croissance de tumeur se fait suite à une longue et/ou forte exposition (William, 1992, Sivak *et al.*, 1987). La prolifération cellulaire semble être la composante majeure qui amène leur effet cancérogène (Williams *et al.*, 1996). En fait, la majorité ont un effet mitogène *in vivo* et *in vitro* chez les rongeurs (Ames et Gold, 1990). À l'instar de l'HCB, les cancérogènes épigénétiques ont fréquemment une incidence plus grande chez l'un des deux sexes (Iatropoulos, 1993 et 1994). Dans les tests de mutagenèse à court terme, l'HCB a été identifié comme étant une substance non-mutagène, c-à-d. épigénétique (Siekel *et al.*, 1991). L'induction de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire par des cancérogènes non-génotoxiques est un des mécanismes suggérés pour la production de cancers qui sont sélectifs pour un organe ou une espèce (Ames et Gold, 1990). En résumé, la compréhension de la division cellulaire est importante pour comprendre le mécanisme d'action de l'HCB. La section suivante traitera donc de la prolifération cellulaire, de son rôle dans la cancérogenèse et surtout dans son rôle "probable" dans l'effet cancérogène de l'HCB.

1.3 La prolifération cellulaire

1.3.1 Le cycle cellulaire

La division cellulaire est un processus vital dans le maintien de l'équilibre chez un être vivant. La prolifération cellulaire est normalement induite pour compenser la perte de cellules mortes. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases: G₁ (gap 1), S (synthèse), G₂ (gap 2) et M (mitose). La cellule peut arrêter ce cycle temporairement ou de façon permanente (quiescente) en entrant dans la phase G₀.

Dans le foie, les hépatocytes sont généralement quiescents. Lors d'une hépatectomie la prolifération cellulaire est induite dans le foie et plus de 90% des hépatocytes progressent dans le cycle vers une division. Certaines de ces cellules se répliquent deux fois ou plus (*in vivo*), afin de permettre la régénération complète du foie (Piwnica-Worms, 1994; Michalopoulos, 1990; McGowan, 1986). *In vitro*, la prolifération cellulaire est aussi engagée par l'ajout d'agents mitogènes à une culture d'hépatocytes (Michalopoulos, 1990). Il faut cependant souligner que dans ces conditions seulement 50% des hépatocytes entrent dans le cycle cellulaire (pour se diviser), et rare sont les cellules qui se diviseront plus de deux fois (McGowan, 1986; Eckl, 1987). Les mitogènes ont été divisés en deux catégories: les mitogènes directs et les co-mitogènes. Les mitogènes directs sont définis par leur capacité à induire la prolifération cellulaire d'hépatocytes quiescents sans l'aide d'autres composés. Ce groupe est composé du facteur de croissance épidermal (EGF), du facteur de transformation de croissance α (TGF α), du facteur de croissance des hépatocytes ou Hépatopoiétine A (HPTA/HGF) et de l'hépatopoiétine B (HPTB). Les co-mitogènes sont définis par leur capacité à augmenter la prolifération induite par les mitogènes directs tout en diminuant l'effet des inhibiteurs de croissance (TGF β , interleukine 1 β , etc), sans cependant être capables d'induire un effet mitogène par eux-même (Michalopoulos, 1990). La norépinéphrine, les hormones vasopressine, angiotensine II et III et l'estrogène, ont été classés comme co-mitogènes de l'EGF pour les hépatocytes (Michalopoulos, 1990, Shi et Yager, 1989).

Différentes équipes ont démontré que les produits chimiques sans activité cancérigène dans des bioessais chroniques chez le rat peuvent devenir tumorigènes lorsque couplés à un stimulus mitogène (Glinos *et al.*, 1951; Pound, 1968; Warwick, 1971). Wölfle et son équipe (1993) ont démontré que la TCDD induit la croissance d'hépatocytes primaires de rat en synergie avec des facteurs de croissances tel l'EGF et l'insuline. Des études qui ont été faites dans notre laboratoire ont démontré que dans un autre système cellulaire, soit les cellules mammaires MCF-10A, l'HCB est co-mitogène en présence d'EGF dans le milieu et que l'HCB augmente la phosphorylation des récepteurs à l'EGF dans ces cellules (Charbonneau *et al.*, 1998). Ceci tend à démontrer que l'HCB agirait via la même voie que l'EGF, c'est-à-dire en augmentant la prolifération cellulaire. Il est logique d'émettre l'hypothèse que l'effet cancérigène de l'HCB dans le foie serait dû à ses propriétés mitogéniques ou co-mitogéniques (en présence de l'EGF). Les travaux de ce mémoire tenteront d'évaluer cette hypothèse.

Les mitogènes chimiques sont aussi classés en deux sous-groupes; (1) Les mitogènes directs induisent une hyperplasie des tissus, sans mort cellulaire associée, tandis que (2) les mitogènes indirects déclenchent la prolifération pour compenser la perte cellulaire induite par l'effet cytotoxique de l'agent chimique (Tomatis, 1993). Ces deux comportements sont des réponses adaptatives du foie suite à l'exposition à l'agent toxique (Schulte-Hermann, 1974). Les mitogènes directs sont reconnus pour induire: (1) une augmentation de l'ADN total du foie; (2) une augmentation du poids du foie; (3) aucun signe pathologique de nécrose; (4) aucune augmentation de l'activité de l'alanine transaminase dans le sérum et (5) un maximum de synthèse d'ADN retrouvé 24 heures après le début du traitement (Loury *et al.*, 1987; Cunningham, 1996). Selon Rizzardini et son équipe (1990), le poids du foie est augmenté sans qu'aucune nécrose ne soit apparente après 15 jours de traitement avec 100 mg/kg/jour de HCB ce qui tend à caractériser l'HCB comme un agent hypertrophique ou un mitogène direct (sans cytotoxicité). Des études se penchant sur la corrélation entre la cytotoxicité du HCB est sa cancérigénicité sont donc nécessaires. Les travaux de ce mémoire s'attarderont également à cette question.

1.3.2 La prolifération cellulaire et le cancer

La cancérogenèse chimique implique la participation de deux aspects importants: l'augmentation des dommages causés à l'ADN ainsi que l'augmentation de la mitose (Ames et Gold, 1990). L'ADN n'est pas directement endommagé par les agents épigénétiques mais peut l'être indirectement par une série d'évènements intra- ou extra-cellulaires. La prolifération cellulaire elle-même peut indirectement induire des mutations au génome (Ames et Gold, 1990). La mutagenèse est favorisée par la mitogenèse: (1) La division cellulaire augmente la susceptibilité des cellules à accumuler des erreurs de synthèse. En effet, l'ADN répliqué est simple brin, non complexé avec les histones, donc plus sensible aux dommages endogènes ou exogènes, alors que les cellules quiescentes ont un ADN double brins complexé aux histones (Ames et Gold, 1990; Preston-Martin *et al.*, 1993). (2) Le temps de réparation de l'ADN est diminué lorsque la division cellulaire est soutenue. Ceci permet l'insertion d'erreur de synthèse et leur fixation. (3) La fixation des mutations spontanées est promue par la réplication cellulaire (Williams *et al.*, 1996). Dans le foie, la formation spontanée d'ADN muté se produit normalement ce qui explique le développement de tumeurs hépatiques chez le rat témoin. En effet, une cellule normale possède plusieurs promutagènes endogènes (oxidants, adduits naturels). La probabilité de convertir des adduits naturels en mutations est favorisée par la division cellulaire (Ames et Gold, 1990). En fait, plusieurs équipes ont postulé que les oxidants endogènes provoquent 10^5 hits à l'ADN par jour chez le rat et 10^4 à l'ADN par jour chez l'humain (Ames, 1989; Fraga *et al.*, 1990; Shigenaga *et al.*, 1989). (4) La méthylation complète de certains gènes est empêchée par la prolifération cellulaire. Cette hypométhylation provoque l'expression de gènes, tel les oncogènes, normalement peu exprimés (Williams *et al.*, 1996; Goodman et Counts, 1993); (5) La recombinaison mitotique et la duplication de certains gènes, qui se produisent seulement lors de la division cellulaire, peut altérer l'expression de certains gènes (Preston-Martin *et al.*, 1993; Ames et Gold, 1990; Williams, 1996).

Les mutations issues d'une surprolifération cellulaire peuvent favoriser le cancer en activant ou en inactivant plusieurs gènes important dans le contrôle cellulaire tels les

proto-oncogènes, les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes contrôlant l'apoptose ou ceux contrôlant la réparation cellulaire pour n'en nommer que quelques uns. Ainsi, la mitogenèse induit la mutagenèse. Le rôle de la prolifération cellulaire est d'autant plus important que les agents mitogènes endogènes ou exogènes ont été démontrés comme étant un dénominateur commun dans le déroulement du cancer chez l'humain (Preston-Martin *et al.*, 1993; Henderson *et al.*, 1988).

La prolifération cellulaire est impliquée autant dans les cancers induits par les produits chimiques épigénétiques que génotoxiques (Cunningham et Matthews, 1995). En fait, plusieurs équipes ont démontré le besoin d'au moins une ronde de prolifération cellulaire pour initier et fixer les mutations dans l'ADN causées par des cancérigènes chimiques (Cayama *et al.*, 1978; Ishikawa *et al.*, 1980; Columbano *et al.*, 1981). La prolifération cellulaire peut agir à chacune des étapes du processus de cancérogenèse en altérant la grandeur du pool cellulaire à risque pour le prochain évènement (Tomatis, 1993). Outre les agents chimiques aptent à provoquer une prolifération cellulaire et favoriser la cancérogenèse, des agents physiques, infectieux, hormonaux (estrogène, progestérone) ou médicamenteux, tel les contraceptifs oraux et les stéroïdes anabolisants peuvent également induire le cancer du foie chez l'humain (Preston-Martin *et al.*, 1993).

L'utilisation de la prolifération cellulaire pour évaluer les propriétés cancérogènes des substances chimiques semble donc appropriée puisque tel que l'a rapporté Tomatis (1993), le groupe de travail de l'IARC (juin 1991) a reconnu la prolifération cellulaire comme un aspect mécanistique important dans la cancérogenèse des agents génotoxiques et épigénétiques et que sans prolifération le processus de transformation ne peut avoir lieu. Loury et ses collaborateurs (1987) ont démontré que la majorité des mitogènes directs induisaient une augmentation des tumeurs du foie chez le rat et la souris. La valeur prédictive de l'utilisation de la prolifération cellulaire comme indicateur de la cancérogenèse a été estimée à 91% (Loury *et al.*, 1987) pour les mitogènes chimiques directs, tandis que pour les mitogènes indirects, la corrélation entre la prolifération et le cancer est moindre. Plusieurs données permettent de croire que l'HCB est un mitogène direct (voir section 1.3.1). La mesure de la prolifération cellulaire apparaît donc comme la

méthode indiquée pour évaluer la cancérogenèse et les mécanismes d'action de l'HCB sur des hépatocytes de rat.

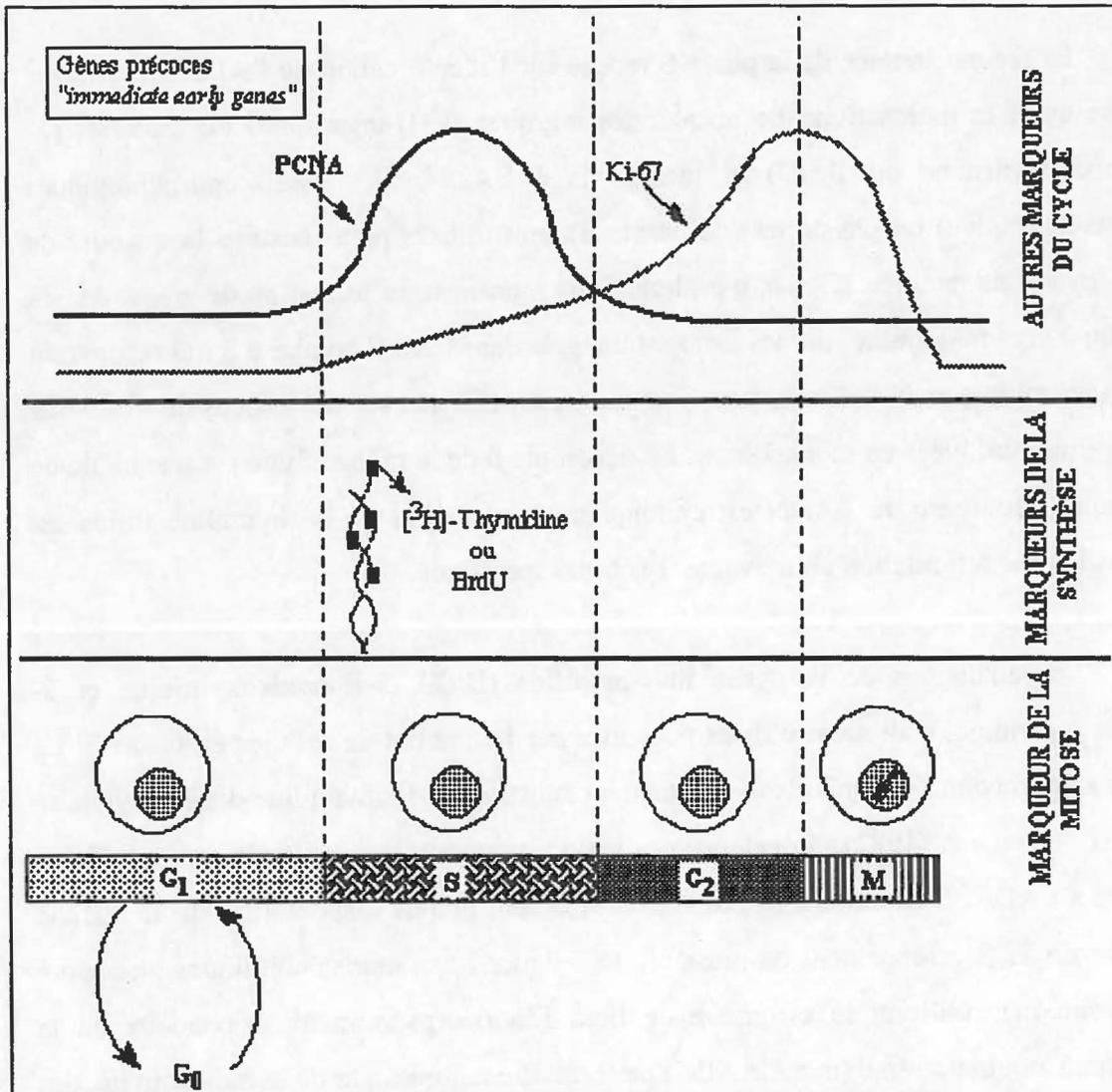


FIGURE 1.1 Méthodes de mesure de la prolifération cellulaire employant des marqueurs du cycle cellulaire.

1.3.3 Les méthodes de mesure de la prolifération cellulaire

La reconnaissance des phases S, M ou des autres éléments spécifiques au cycle cellulaire est généralement utilisée pour évaluer la prolifération cellulaire d'un tissu (figure 1.1). La reconnaissance de la phase M repose sur l'observation (suite à la

coloration des tissus) de la condensation et de la division des chromatides, comportement morphologique typique à cette phase. Les résultats sont obtenus grâce au décompte des formes mitotiques observées au microscope par l'utilisateur.

La reconnaissance de la phase S repose sur l'identification de l'ADN en synthèse en mesurant la radioactivité de nucléotides marqués ($[^3\text{H}]$ -thymidine) ou modifiés (5-bromodéoxyuridine ou BrdU) et incorporés à l'ADN. Des essais morphologiques (autoradiographie) ou physiques (décompte β) sont utilisés pour mesurer la quantité de $[^3\text{H}]$ -thymidine intégrée. L'essai morphologique repose sur la formation de grains denses (sur un autoradiogramme) par les isotopes intégrés dans l'ADN en phase S qui recouvrent typiquement le noyau. Cet essai peut être aussi bien effectué sur des coupes de tissus que des cellules cultivées en monocouche. Le décompte β de la radioactivité est une méthode physique rigoureuse où l'ADN est chimiquement extrait et où la thymidine tritiée est quantifiée par scintillation pour évaluer l'activité spécifique.

Les analogues de la pyrimidine modifiée (BrdU, 5-fluorodéoxyuridine et 5-iododéoxyuridine) sont aussi utilisés pour mesurer le nombre de cellules en phase S. Le BrdU a été reconnu comme étant un excellent substitut de la thymidine dans la synthèse de l'ADN. Gatzner (1982) a développé des anticorps monoclonaux dirigés contre le BrdU intégré à l'ADN. L'apparition de ces anticorps et leur grande disponibilité sur le marché ont permis le développement de plusieurs techniques immunohistochimiques ou encore des techniques utilisant le cytomètre de flux. L'anticorps primaire, secondaire ou le complexe avidine-biotine (modèle ABC) peuvent être marqués par de la radioactivité, des molécules d'or, une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxidase) ou un fluorochrome (majoritairement le fluorescein isothiocyanate pour les hépatocytes). La détection est faite par l'application d'un substrat insoluble qui s'attache aux noyaux des cellules en synthèse. Ces techniques sont surtout appliquées à des coupes de tissus provenant d'étude *in vivo*. Le cytomètre de flux qui permet le décompte des cellules ayant intégré le BrdU offre l'avantage de déterminer différents caractères physiques de la cellule (volume, structure interne, mesure de la ploïdité) en plus d'évaluer le nombre de cellules en phase S (Boulton et Hodgson, 1995).

Un grand nombre de protéines sont exprimées spécifiquement lors des différents stades du cycle cellulaire. Les gènes précoces, le "*proliferating cell nuclear antigen*" (PCNA), l'anticorps Ki-67 et p34 cdc2 kinase (CKD1) font parties de ces protéines. Ces protéines peuvent donc être utilisées comme marqueur de la prolifération cellulaire. Tout d'abord, les gènes précoces plus souvent connus sous le nom d'*Immediate early genes* apparaissent en G1. L'utilisation de ces gènes pour évaluer la prolifération cellulaire est controversée puisque leur apparition n'est pas toujours suivie par l'entrée en phase S et la poursuite du cycle cellulaire. Le Ki-67, un anticorps développé par Gerdes et son équipe (1983), reconnaît une protéine qui est exprimée seulement lors de la prolifération cellulaire. Le Ki-67 a été majoritairement utilisé pour l'analyse de tissus humains (Boulton et Hodgson, 1995), sa fiabilité chez les rongeurs restant inconnue.

Le *Proliferating cell nuclear antigen* ou PCNA est une cycline et serait un cofacteur ou une protéine auxiliaire à l'ADN polymérase δ (Mathew *et al.*, 1984; Prelich *et al.*, 1987). Le rôle du PCNA n'a pas encore été bien défini mais sa présence est essentielle à la division cellulaire. Comme dans le cas du BrdU, plusieurs anticorps dirigés contre le PCNA ont été développés pour effectuer des essais immunohistochimiques ou des essais au cytomètre de flux. Paules *et al.* (1995), ont développé une technique mesurant l'activité des histones H1, protéine phosphorylée par la MPF (composé de la CDK1 et de la cycline B) pour évaluer l'expression de la CDK1 (dans des cellules humaines). Ainsi, le CDK1 est utilisé comme biomarqueur moléculaire de la prolifération cellulaire. D'autres méthodes de mesure de la prolifération cellulaire utilisent des propriétés cellulaires non-relées au cycle lui-même. Ces techniques (Boulton et Hodgson, 1995) sont mentionnées au tableau.1.1.

TABLEAU 1.1. Méthodes de mesure de la prolifération cellulaire avec l'utilisation de marqueurs non-reliés au cycle cellulaire. Dans le tableau le mot "augmente" est remplacé par la flèche (↑)

TYPES	MÉTHODES	PRINCIPES
DIRECTE	Décompte des cellules Décompte des noyaux	↑ avec la division ↑ avec la mitose
INDIRECTE	Quantité de protéines Activité des mitochondries Activité de la LDH	↑ avec le nombre cellules ↑ avec le nombre cellules ↑ avec le nombre cellules

Chaque méthode comporte ses avantages et ses inconvénients. Le choix de la méthode à utiliser pour la mesure de la prolifération cellulaire dépend des problèmes à résoudre. L'étude de la prolifération des cellules du foie se présente comme un défi méthodologique puisque les propriétés cellulaires du foie sont distinctes et complexes (Saeter et Seglen., 1990). Durant la prolifération cellulaire, différents hépatocytes sont synthétisés (mono- ou bi-nucléé, 2N, 2x2N, 4N, 4x4N ou 8N, majoritairement). Cette population hétérogène d'hépatocytes est due au fait que parfois, la division nucléaire et/ou la cytodierèse n'a pas lieu avant l'entrée en G₁ (Gerlyng *et al.*, 1992; McGowan, 1986). Donc, pour les hépatocytes, les techniques utilisant des marqueurs de la phase M et le décompte nucléaire ou cellulaire de façon directe ou indirecte (tableau 1.1) ne peuvent être employées.

L'utilisation des marqueurs spécifiques au cycle cellulaire, et plus précisément de la phase S, est indiquée. Cependant, ces méthodes comportent plusieurs désavantages. Tout d'abord, le PCNA est instable, tolère mal la fixation et requiert des tissus frais. La concentration de cette protéine est souvent très faible et demande donc beaucoup d'hépatocytes cultivés *in vitro* pour être détectée. L'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN en phase S est une technique qui a été largement adoptée pour l'étude de la prolifération des hépatocytes (Lanier *et al.*, 1989). Cependant, la manipulation de matériel radioactif demande des mesures de protection qui consomment beaucoup de temps et d'énergie. La durée d'exposition des autoradiogrammes avec la [³H]-thymidine demande au minimum une semaine et parfois jusqu'à quelques mois. En plus de cette

consommation de temps, les autoradiogrammes ont le désavantage de présenter des variations entre les utilisateurs (subjectivité du décompte fait par des humains), ainsi que d'être difficile à reproduire et à standardiser (Boulton et Hodgson, 1995). Un autre désavantage tient au fait que la radioactivité émise peut induire des bris ou aberrations chromosomales (Boulton et Hodgson, 1995). De plus, une étude de Bodycote et Wolff (1986) faite sur des lymphocytes humains a démontré que la thymidine radioactive est intégrée dans les cellules lors du premier cycle, et qu'ensuite, les cellules prolifèrent sans incorporer de radioactivité. L'incorporation de thymidine radioactive comporte donc plusieurs désavantages. Contrairement à la radioactivité, le BrdU un autre marqueur de la phase S, le BrdU permet la détection des noyaux de cellules en synthèse en quelques heures. Cependant les désavantages de la méthode reposant sur un décompte morphologique (subjectivité, peu de reproductibilité, et peu ou pas de standardization) demeurent les mêmes. Malgré ses nombreux avantages, la technique du cytomètre de flux demande la préparation d'une suspension des cellules ce qui entraîne une perte cellulaire conduisant à des variations dans la mesure. De plus, l'obtention d'une suspension d'hépatocytes séparés les uns des autres est difficile, ces cellules ayant la caractéristique de se détacher en feuille, ce qui amène la formation d'amas lors de la suspension.

La mise au point d'une méthode mesurant l'activité de l'histone H1 pour évaluer la prolifération cellulaire a été entamée lors des travaux de maîtrise de madame Bégin, puisque certains auteurs ont rapporté que l'expression de la CDK1 est augmentée par plusieurs xénobiotiques, dont la TCDD (Ma et Babish, 1993). Cependant, les imprévus de la recherche n'ont pas permis de rendre à terme ce projet. Il s'agit d'une voie intéressante à poursuivre pour évaluer et confirmer la prolifération cellulaire des hépatocytes. La méthode idéale pour étudier la prolifération cellulaire des hépatocytes en culture serait une méthode utilisant un marqueur de la phase S préférentiellement, non-radioactif, un essai rapide et automatisé pour éviter les erreurs humaines et demandant peu de manipulation sur les hépatocytes (mesure sur la matrice proliférative). La méthode basée sur l'incorporation du BrdU offre tout ces avantages. La détection du BrdU peut se faire par un anticorps couplé avec une phosphatase alcaline ou une peroxidase. Ces enzymes possèdent des substrats solubles chromogènes qui peuvent être directement ajoutés dans

un puits de culture et leur chromophore peut être détectable à l'aide d'un spectrophotomètre.

1.4 Les stéroïdes hormonaux

En Occident, plusieurs cancers, incluant le cancer du sein, de l'endomètre, des ovaires, du foie et de la prostate, sont liés à l'exposition inappropriée ou prolongée des tissus à des stéroïdes hormonaux endogènes ou synthétiques (Yager et Liehr, 1996). Chez l'animal expérimental, il est prouvé que l'incidence des néoplasmes est augmentée lorsque ces organes cibles sont stimulés par une hormone en excès (Henderson *et al.*, 1982, 1988).

L'exposition chronique des femmes à de hauts niveaux d'estrogènes synthétiques parfois retrouvés dans les contraceptifs oraux a été liée à l'augmentation des risques de développement de tumeurs hépatiques (Baum *et al.*, 1973; Palmer *et al.*, 1989). En effet, le 17 α -éthynyl estradiol (un contraceptif oral stéroïdien) a été démontré comme étant un faible cancérigène mais un fort promoteur de l'hépatocarcinogénèse chez le rat (Yager *et al.*, 1991). De même, de tous les mauvais effets causés par les stéroïdes anaboliques androgéniques les dommages au foie sont les plus importants: Péliose, cholestase et adénome hépatocellulaire (Welder *et al.*, 1995; Preston-Martin *et al.*, 1993). Le DHEA est un précurseur des androgènes et des estrogènes chez la femme (Morales *et al.*, 1994; Mortola et Yen, 1990). Le dihydroépiandrostérone (DHEA) est un proliférateur de peroxisome et un cancérigène chez les rongeurs (Rao *et al.*, 1992). La cancérigénicité du DHEA semble reliée à la capacité de ce composé à se métaboliser en androgènes et en estrogènes et ne serait pas due à son activité de proliférateur de peroxisome (Orner *et al.*, 1996). L'énumération de ces faits et le rappel du dimorphisme sexuel de l'effet de l'HCB dans le foie de rat vise à faire prendre conscience au lecteur de l'importance de l'étude des hormones sexuelles pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'HCB.

Une hormone est définie comme étant un messager chimique secrété à l'état de trace par un tissu spécialisé et transporté par le sang à un tissu cible afin de stimuler une activité biochimique ou physiologique (Lehninger, 1982). Les hormones exercent leur fonction sur quatre grands domaines: l'homéostasie cellulaire, la régulation de l'énergie disponible, le développement et la croissance cellulaire ou tissulaire et enfin la reproduction (Iatropoulos, 1993 et 1994). Les stéroïdes hormonaux sont tous formés à partir du cholestérol et ils possèdent une structure commune formée de quatre noyaux fusionnés. Les stéroïdes peuvent être regroupés en trois grandes classes (1) les progestagènes (progestérone), (2) les corticostéroïdes qui sont séparés en deux sous-classes, soit les glucocorticoïdes (cortisol) et les minéralocorticoïdes (aldostérone ou corticostérone) et (3) les hormones sexuelles séparées en androgènes et en estrogènes. L'induction d'une série de fonctions biochimiques ou physiologiques peut être faite dans différents tissus par une seule hormone ou alternativement une seule fonction peut être régulée par plusieurs hormones à la fois. Par exemple, les estrogènes et les androgènes ont une activité anabolique sur les protéines, un effet trophique sur les organes sexuels (et les muscles squelettiques pour les androgènes) et ils augmentent la masse osseuse (Lehninger, 1982; Iatropoulos, 1993/94).

1.4.1 La synthèse des stéroïdes

Les trois classes de stéroïdes dérivent tous du cholestérol. La mitochondrie est le siège de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux (Rawn, 1990). Les premiers stéroïdes hormonaux dérivés du cholestérol sont la prégnénolone et la progestérone. Suite à différentes hydroxylations, ces deux stéroïdes sont les précurseurs de tous les autres stéroïdes hormonaux (figure 1.2).

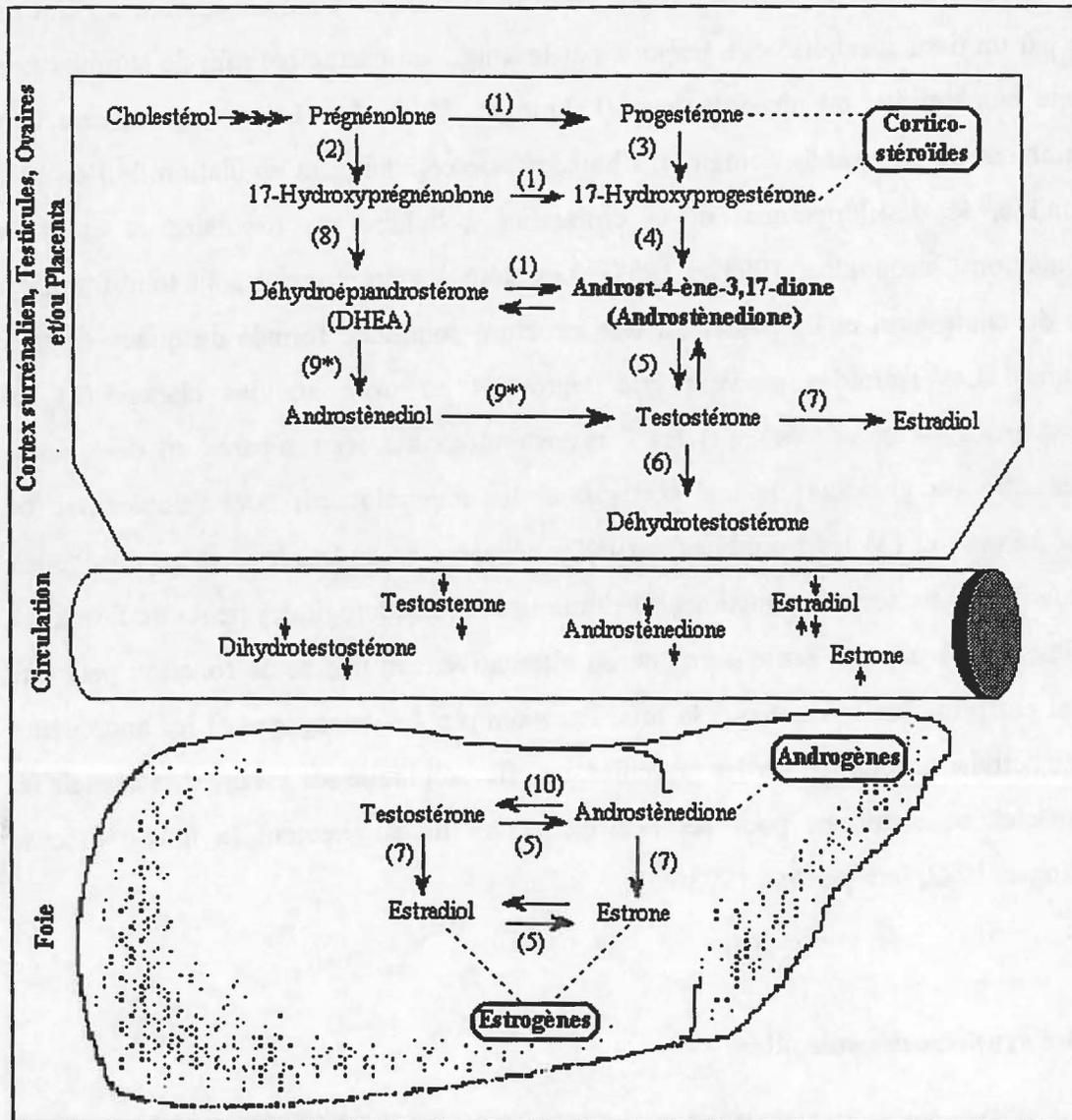


FIGURE 1.2 Voies métaboliques de la stéroïdogénèse. Les différentes étapes menant à la synthèse des corticostéroïdes, androgènes ou estrogènes ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) ne sont pas complètes. L'androstènedione et le 17β -estradiol synthétisés dans les organes sexuels ou les surrénales forment eux aussi des androgènes ou des estrogènes (non représentés pour simplifier le dessin). (1) hydroxystéroïde déhydrogénase et isomérase, (2) hydroxylase, (3) 17α -hydroxylase, (4) $17,20$ -lyase, (5) 17 -kétostéroïdes réductase, (6) réductase, (7) aromatisation, (8) desmolase ou lyase, (9*) réactions exclusives aux rats, (10) voies proposées par Robel *et al.*, 1966 et Ghraff *et al.*, 1973 (voir texte). Inspiré de Rawn, 1992 et Iatropoulos 1993/94.

1.4.2 La synthèse des stéroïdes sexuels

Les androgènes sont synthétisés dans les tissus spécifiques que sont les testicules, mais aussi par le cortex surrénalien et les ovaires. De même, les estrogènes sont synthétisés principalement dans les ovaires mais également dans le cortex surrénalien et les testicules. Ces trois organes ont une origine embryologique commune. Les androgènes dérivent tous de l'androst-4-ène-3,17-dione (androstènedione). Seule la testostérone peut être directement formée à partir du DHEA sans passer par l'androstènedione (figure 1.2 et 1.3). Le métabolisme des androgènes et estrogènes (surtout l'aromatisation des androgènes en estrogènes) n'est pas seulement produit par les tissus sexuels mais aussi par les muscles, le tissu adipeux et le foie (figure 1.2).

La classe des androgènes est composée de l'adrénostérone, du 5β -androstane-3,17-dione (5β -androstanedione), du 5α -androstane-3,17-dione (5α -androstanedione), de l'étiocolan- 3α -ol-17-one (étiocolanolone) et de l'androstérone. La synthèse de tous les androgènes est faite à partir de l'androstènedione (figure 1.3). La transformation de l'androstènedione en testostérone est retrouvée dans les hépatocytes. La réaction inverse selon Robel *et al.* (1966) et Graef *et al.* (1979) est faite en plusieurs étapes et demande la glucuronidation de la testostérone avant sa transformation en androstènedione. La testostérone est parfois synthétisée à partir de la DHEA qui est l'hormone circulante retrouvée en plus grande majorité dans le plasma humain (Orner *et al.*, 1996). Le foie favorise la formation du 5α -androstanedione et de l'androstérone suite à la 5α -réduction et du 5β -androstanedione et de l'éthiochlolanolone suite à la 5β -réduction.

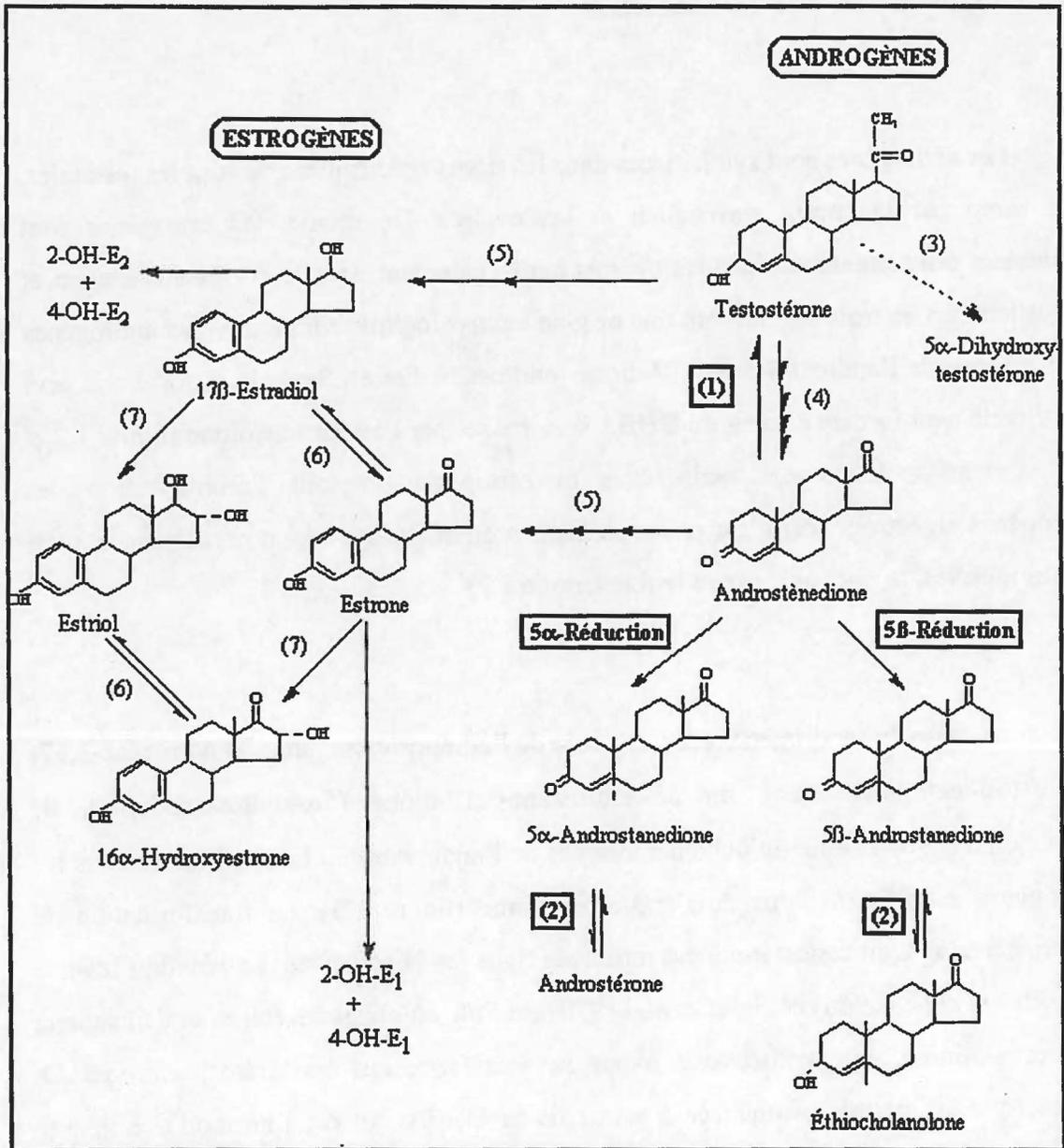


FIGURE 1.3 Métabolisme des androgènes et des estrogènes. (1) 17 β -Hydroxystéroïde déhydrogénase, (2) 3 α -hydroxystéroïdes déhydrogénase, (3) 5 α -réductase, (4) voie proposé par Ropel *et al.*, 1966 et Ghraf *et al.*, 1973 (voir texte), (5) aromatasase, (6) 17 β -hydroxylase, (7) 16 α -hydroxylase. Inspiré de Rawn, 1992; Iatropoulos, 1993/94; Yager et Liehr, 1996.

Les estrogènes sont principalement constitués du 17 β -estradiol (E₂), de l'estriol, du 16 α -hydroxyestrone (E₃), de l'estrone (E₁), du 2-hydroestrone (2-OH-E₁) et du 4-hydroxyestrone (4-OH-E₁). L'estrone et le 17 β -estradiol, le principal estrogène sécrété par la femme, sont respectivement formés à partir de la testostérone ou de l'androstènedione

par l'action d'un complexe enzymatique appelé aromatasase (Lehninger,1982; Yager et Liehr, 1996). L'aromatase est composé d'un cytochrome P450 et d'une NADPH-cytochrome P450 réductase (Thompson *et al.*, 1974). Les autres estrogènes sont formés à partir de l'estradiol et de l'estrone suite à différentes hydroxylations. L'estrone est principalement métabolisé en estriol dans le foie (Iatropoulos, 1993/94). La production d'estrogènes *in situ* est donc faite par l'aromatase et l'enzyme *estrone sulfate* (Masamura *et al.*, 1996). Le produit majeur de l'aromatase de l'androstènedione est l'estrone sulfate (Lanoux *et al.*, 1985). Les sulfates d'esters d'estrogènes sont aussi formés à partir d'estrogènes libres dans le foie (Bolt, 1979). Chez l'humain, l'estrogène majeur en circulation est l'estrone sulfate (Purdy *et al.*, 1961). Le foie est capable de synthétiser de l'estrone libre à partir de l'estrone sulfate. En effet, 78 % de l'estrone du foie est obtenu par l'action de l'enzyme *estrone sulfate* (Masamura *et al.*, 1996). Les estrogènes, principalement l'estradiol et l'estrone, sont transformés en leur métabolite 2-OH accompagnés par la formation non spécifique (20%) du catéchol 4-OH correspondant (Weisz *et al.*, 1992). Toutes les enzymes de la stéroïdogénèse ovarienne appartiennent aux oxydases à fonction mixte à l'exception des 3 β - et 17 β - hydroxystéroïdes déhydrogénases (Iatropoulos, 1993/94). Pour que les estrogènes deviennent biodisponibles, la barrière que forme le foie doit être passée car les estrogènes sont fortement métabolisés à leur premier passage dans le foie (Lobo et Cassidenti, 1992).

Plusieurs réactions, telle la réduction du groupement cétone ou des double liaisons, se font dans le foie pour cataboliser (de façon partielle) et inactiver les stéroïdes. Les stéroïdes inactivés sont conjugués avec l'acide glucuronique ou le sulfate afin d'être éliminés par le foie dans la bile; ils peuvent retourner dans le foie via la circulation entéro-hépatique (Iatropoulos, 1993 et 1994, Yager et Liehr, 1996). Même si l'estrone est le métabolite majeur, une petite partie de l'estradiol est en mesure d'intégrer la circulation systémique. La révision des différentes voies métaboliques des stéroïdes sexuels a permis de constater que plusieurs de ces voies sont communes ce qui implique que le moindre désordre ou déséquilibre peut avoir différentes répercussions sur l'activité des hormones.

1.4.3 Les stéroïdes, l'hexachlorobenzène et le cancer

Comme mentionné précédemment, les effets nocifs induits par l'HCB sont plus importants chez le rat femelle que le rat mâle (Courtney, 1979; IARC, 1987). La différence dans le métabolisme de l'HCB ne semble pas apparaître comme une explication du dimorphisme sexuel (Smith *et al.*, 1985), puisque le composé est métabolisé lentement *in vivo* et *in vitro* (Stewart et Smith, 1986,1987). Plusieurs équipes dont celle de Foster (1993) ont démontré l'importance d'étudier les effets toxiques de l'HCB sur les fonctions endocriniennes puisqu'une accumulation de l'HCB dans les tissus endocriniens a été retrouvée. De même, plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que la porphyrie hépatique retrouvée préférentiellement chez le rat femelle traité à l'HCB serait reliée à la concentration en estrogènes chez la femelle (Kuiper-Goodman *et al.*, 1977). Depuis longtemps, un dimorphisme sexuel dans le métabolisme des stéroïdes et des xénobiotiques a été reconnu chez les rongeurs (Gustafsson *et al.*, 1983). Le foie est touché par cette différenciation entre les sexes (tableau 1.2). La féminisation du métabolisme au niveau hépatique est caractérisée par une augmentation de l'activité de la 15 β -hydroxylation des stéroïdes conjugués à un groupement sulfate (Gustafsson, 1994). Les estrogènes "féminisent" le foie des rats mâles (induction de l'activité 15 β -hydroxylation des stéroïdes sulfates) tandis que les androgènes "masculiniserait" le métabolisme hépatique chez la femelle (Gustafsson, 1994; Elger *et al.*, 1995). Selon Gustafsson (1994) le facteur féminisant du métabolisme du foie de rat serait une (ou des) hormone(s) de croissance.

TABLEAU 1.2 Dimorphisme sexuel de l'activité enzymatique et de la concentration protéiques du foie de rat. \uparrow et \downarrow signifient respectivement une activité plus grande ou plus basse que chez l'autre sexe.

CATEGORIES	FEMELLES	MALE	AUTEURS
ENZYMES			
15 β -hydroxylation des	\uparrow	\downarrow	Gustafsson, 1994
Stéroïdes hydroxylases	\downarrow	\uparrow	Wilson et Leigh, 1992
5 α -réductase	\uparrow	\downarrow	Wilson et Leigh, 1992
PROTÉINES			
Récepteurs prolactine	forte densité	faible	Wilson et Leigh, 1992

Ce dimorphisme sexuel dans l'hépatocarcinogénicité de l'HCB soulève donc la possibilité d'un rôle inductif des estrogènes et/ou des androgènes. À cet effet, mentionnons que les estrogènes sont reconnus pour augmenter l'activité mitotique (Ni et Yager, 1994; Yager et Liehr, 1996; Fujii *et al.*, 1985). Pour que la prolifération cellulaire soit plus efficace dans son action sur la cancérogenèse, l'agent épigénétique doit agir sur des cellules déjà modifiées ou en synchronisme avec un agent (endogène ou exogène) causant des changements spécifiques à la cellule (Tomatis, 1993). Dans notre cas, l'HCB pourrait être l'agent épigénétique et les stéroïdes seraient les agents causant des changements à la cellule. Un fait qui permet d'avancer cette hypothèse est que les xénobiotiques sont reconnus pour induire des changements endocriniens qui résultent en une insuffisance, un excès ou une résistance à une ou plusieurs hormones (Iatropoulos, 1993 et 1994). Selon l'étude de Foster *et al.* (1993), l'HCB administré à des rats femelles se retrouvent en plus grande quantité dans les glandes endocriniennes (hypophyse, thyroïde et surrénales) que dans le foie. Ces faits sont en accord avec l'hypothèse que l'effet cancérogène de l'HCB est relié à la présence et à l'activité des estrogènes.

Les androgènes ont divers effets sur plusieurs organes, incluant les muscles, les reins, les glandes salivaires et le foie. Selon Granick et Kappas (1967) et Graef *et al.* (1982) la porphyrie induite par l'HCB proviendrait du changement dans le métabolisme hépatique des stéroïdes favorisant une augmentation des stéroïdes 5 β non-conjugués.

Graef *et al.* (1982) ont observé une diminution du rapport des stéroïdes 5 α /5 β dans le sang de rats traités à l'HCB comparativement aux témoins. Graef *et al.* (1979) ont mesuré le métabolisme de certains stéroïdes dans des microsomes de foie de rats traités avec l'HCB. Cette étude a démontré une diminution de l'activité de la 5 α -réductase et de la 3-hydroxystéroïde déhydrogénase et une augmentation de l'activité de la 5 β -réductase induite par l'HCB (figure 1.4). De plus, lorsque les concentrations circulantes de 17 β -œstradiol sont élevées, la β -hydroxystéroïde déhydrogénase, responsable de convertir l'androstènedione en testostérone est rétro-inhibée. L'altération enzymatique par l'HCB semble donc favoriser une augmentation dans le métabolisme de la 5 β -réductase, c-à-d. une augmentation de la synthèse de l'androstènedione (figure 1.4)

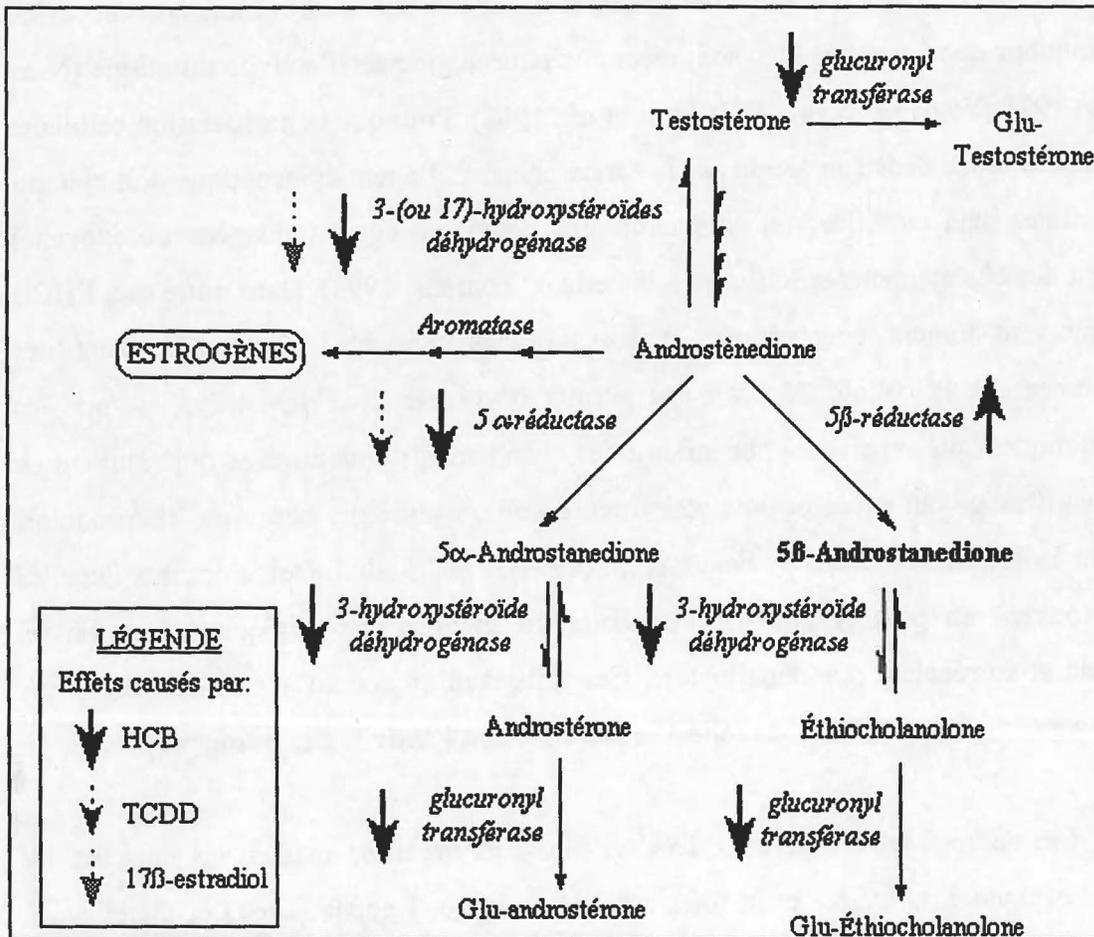


FIGURE 1.4 Effet de l'HCB, du TCDD et du 17β-estradiol sur le métabolisme des androgènes. Inspiré de Iatropoulos (1993/94), Graef et al. (1979, 1982), Gustafson et Ingelman-Sundberg (1979).

Gustafsson et Ingelman-Sundberg (1979) ont, en aussi, démontré qu'un autre agent de la même famille que l'HCB, la TCDD, diminue le métabolisme de la voie 5α-réductase dans le foie des rats (figure 1.4). La concentration des 5β-stéroïdes libres ne dépend pas seulement de leur production mais aussi de leur inactivation par la glucuronyl transférase. Cependant, le 5β-androstanedione ne peut être glucuronidé puisqu'il n'y a pas de groupement hydroxy. De plus, Graef *et al* (1982) ont démontré que l'activité de la glucuronyl transférase est diminuée dans le foie de rats traités à l'HCB. Ceci contribua à favoriser, l'accumulation des stéroïdes 5β. Une deuxième hypothèse concernant les

stéroïdes sur laquelle s'appuient les travaux de ce mémoire est que l'HCB induirait une variation dans le métabolisme des stéroïdes et principalement les stéroïdes 5 β .

1.5 Modèle d'étude

Le foie est l'organe le plus sensible aux effets de l'HCB puisque sa toxicité sous-chronique la plus marquée est la porphyrie hépatique (Newhook et Meek, 1994). Lorsque l'HCB est administré de façon chronique à des rats de différentes souches, la fréquence des tumeurs hépatiques en comparaison des animaux témoins est augmentée (IARC, 1987). Pour mieux déterminer le danger de développer des néoplasmes chez les humains, la connaissance du mécanisme d'action de l'HCB est importante afin de savoir quelles données obtenues chez le rat pourront être extrapolées chez l'humain pour être en mesure d'évaluer le risque de cancérogenèse induit par l'HCB. Grâce à la revue de la littérature faite précédemment, plusieurs hypothèses ont été dégagées: (1) L'effet hépatocancérogène de l'HCB pourrait être dû à son effet mitogène; (2) l'effet mitogène de l'HCB sur les hépatocytes pourrait être produit en présence ou en absence d'EGF; (3) Les stéroïdes auraient un rôle à jouer dans l'effet hépatocancérogène de l'HCB, car a) l'HCB pourrait augmenter l'activité mitogène connue de certains estrogènes, b) l'HCB pourrait augmenter la synthèse de certains androgènes.

Pour être en mesure de vérifier ces hypothèses, un bon modèle d'étude est nécessaire. Farber (1987) a rapporté que la réponse du foie de rat aux substances hépatocancérogènes est très similaire à celle observée chez l'humain. La pathologie, la morphologie et le comportement biologique du cancer du foie chez le rat sont identiques à ceux observés chez l'humain. Les effets d'une substance sur un organisme peuvent être multiples et dépendent, entre autre, du mode d'application, du ou des tissus affectés, des transformations intermédiaires éventuelles que peut subir la substance, de l'interaction avec d'autres substances présentes, de l'influence des organes autres que le foie (pouvant eux aussi être atteints par ce même xénobiotique) et de l'état physique de l'organisme (prédisposition, facteurs nerveux et humorales, etc.). Une façon de mieux cibler et de

déterminer le mode d'action tissulaire d'une substance est de simplifier le modèle expérimental en utilisant un système *in vitro* permettant l'étude de processus complexes à l'abri de certaines influences exogènes ou endogènes pouvant nuire à l'interprétation des résultats (Guillouzo, 1986). Un problème central de la recherche sur le cancer est l'extrapolation des données et des mécanismes de la cancérogenèse de l'animal à l'humain et d'un niveau organisationnel biologique (molécules ou cellules) à un autre (tissus ou organisme entier).

Puisque les conditions de culture sont contrôlées par l'expérimentateur, la culture cellulaire permet de comparer des conditions de culture qui peuvent être changées l'une après l'autre (exemple: avec ou sans HCB, avec ou sans EGF, etc). Le développement d'un système *in vitro* demande la simplification du modèle tout en conservant les propriétés de l'organe ou de l'organisme entier. Divers systèmes ont été mis au point: Organe perfusé, tranche d'organe, suspension cellulaire et culture cellulaire. Puisque les réactions se déroulant dans un organe ont lieu à l'intérieur ou à la surface des cellules, les modèles utilisant les cellules animales en culture sont préférés afin d'extrapoler ou de comparer les résultats obtenus à ceux retrouvés *in vivo*.

1.5.1 Le foie

Pour développer un bon système *in vitro*, la connaissance de l'organe cible est nécessaire. Les différents rôles du foie sont d'emmagasiner ou de dégrader des substances pour les distribuer aux autres organes, de régler la composition et la concentration des substances contenues dans le sang, de retirer de la circulation sanguine les produits de dégradation et enfin de métaboliser les xénobiotiques. Le but premier de la biotransformation des xénobiotiques est de faciliter leur élimination en les convertissant en métabolites hydrosolubles excrétables. Les produits hydrophiles sont éliminés par la bile ou les reins tandis que les substances lipophiles (stéroïdes et dérivés, composés aromatiques et polycycliques) ne sont pas excrétées due à leur insolubilité dans les phases

aqueuses. Ces dernières substances ont donc tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux.

La biotransformation des xénobiotiques est faite par plusieurs enzymes qui sont classées en deux phases séquentiellement liées. Les xénobiotiques sont activés lors de la phase I par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse dans le but d'ajouter sur la molécule un ancrage hydrophile. Les principales enzymes impliquées dans cette phase font parties d'une super-famille d'isoformes appelée cytochromes P450. Les cytochromes P450 sont des enzymes importantes dans le métabolisme d'un grand nombre de composés endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires, les acides gras, les prostaglandines, les leukotriènes et les amines biogènes ou les produits exogènes tel les drogues, les polluants environnementaux et l'alcool (Nelson *et al.*, 1993). Les cytochromes P450 sont principalement localisés dans les hépatocytes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (ER) (Paine 1990). La phase II, aussi appelée phase de conjugaison, est la phase de détoxification et consiste en des réactions d'addition d'entités polaires (glucuronyle, glutathion et sulfate) sur le site d'ancrage hydrophile pour faciliter leur élimination. Les entités fixées par des transférases sont présentes dans le cytosol et la membrane des hépatocytes. La réaction de glucuronidation catalysée par l'UDP-glucuronyltransférase est le processus majeur dans cette phase (Berry *et al.*, 1991). Le système de détoxification participe parfois des effets délétères, les métabolites produits étant parfois plus toxiques suite aux réactions de détoxification (McManus, 1990).

Les interactions cellulaires sont nécessaires au fonctionnement harmonieux d'un organe. Le foie est composé de six types de cellules qui sont regroupées en deux classes. La première classe est constituée des cellules parenchymateuses du foie que sont les hépatocytes (ces cellules seront étudiées dans la section suivante). La deuxième classe est formée des cellules non-parenchymateuses et elle englobe (1) les cellules épithéliales biliaires; (2) les cellules endothéliales qui sécrètent diverses substances et jouent le rôle de filtre entre le sang et les hépatocytes; (3) les cellules de Kupffer qui sont les

macrophages du foie; (4) les cellules de Ito (lipocytes ou *fat-storing cells*); (5) les *pit cells* qui ont une fonction anti-tumorale ("*natural killer*"). (Rosenbaum *et al.*, 1991; Rieder *et al.*, 1992; Ramadori *et al.*, 1992). La réalisation de nombreuses fonctions métaboliques et de transport s'opère grâce aux interactions intercellulaires entre les cellules de différents types.

1.5.2 Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules du foie responsables de la biotransformation des xénobiotiques. Les hépatocytes sont les cellules ciblées pour le développement d'un modèle *in vitro* répondant aux besoins des analyses toxicologiques puisqu'en culture, ces propriétés sont conservées (Holme, 1985; Berry *et al.*, 1991; Guillouzo, 1986). Les hépatocytes représentent 70 % des cellules hépatiques et occupent 93% du volume cytoplasmique (Hayne *et al.*, 1984) et ils sont responsables des principaux métabolismes tels la synthèse des protéines plasmatiques, la sécrétion de la bile ou le métabolisme de nombreux composés endogènes ou exogènes. Les hépatocytes sont grandement hétérogènes au niveau de leur contenu en noyaux et en ADN. Les hépatocytes du rat à la naissance contiennent un seul noyau et sont diploïdes (deux lots de chromosomes homologues). Lors du développement et à l'âge adulte, on retrouve des cellules avec un ou deux noyaux et di-, tetra- ou octoploïdes. Rizzardini *et al.* (1990) ont démontré que chez le rat adulte, environ 30% des hépatocytes sont binucléés et la sous-population d'hépatocytes prédominante est constituée de cellules tétraploïdes mononucléées (environ 62%). L'absence de division nucléaire et/ou l'absence de division cellulaire (cytodiérèse) suite à la réplication de l'ADN, sont les chemins amenant la cellule mononucléée diploïde à devenir un hépatocyte binucléé et/ou polyploïde. La raison de la polyploïdie des hépatocytes est inconnue mais serait nécessaire à l'expression des fonctions différenciées du foie (Rizzardini *et al.*, 1990).

Les hépatocytes sont des entités autonomes et viables qui conservent leur capacité d'adaptation (induction enzymatique, mitogénèse) à des influences (ou stress) extérieures. Ces cellules peuvent être facilement isolées et l'observation de leurs caractéristiques

cellulaires est aisée. Les hépatocytes isolés peuvent être cultivés en monocouche dans des boîtes de Pétri, dans des plaques multipuits ou sur des billes, sur des membranes ou des filtres, maintenus en suspension ou en agrégats. La grande quantité d'hépatocytes produits lors d'une seule préparation permet un plus grand nombre d'expérience et l'obtention d'un plus grand nombre de données comparativement à la méthode du foie perfusé ou aux expérimentations *in vivo*. Ceci est important puisqu'à chaque année, des milliers de nouvelles substances ont besoin d'être analysées, pour déterminer leur potentiel toxique (Goldberg et Frazier, 1989). La démonstration par Howard *et al.* (1967) de la valeur de la collagénase, une enzyme protéolytique utilisée pour séparer les différentes cellules du foie, a été le point tournant du développement des méthodes d'isolation d'hépatocytes intacts. Ensuite, Berry et Friend (1969) ont augmenté le rendement en perfusant le foie (avec la collagénase) *in situ*. La méthode de base la plus utilisée est la méthode enzymatique en deux étapes (utilisant d'abord un chélateur de calcium pour cliver les desmosomes et molécules d'adhésion cellulaires tel les cadhérines, suivit de la collagénase) mise au point par Seglen (1972).

1.5.3 La culture primaire d'hépatocytes et les études toxicologiques

Les études toxicologiques ne sont pas limitées à l'observation de l'effet causé par l'application d'une dose unique élevée (toxique) mais, par l'application chronique d'une dose subtoxique qui produit une réponse adaptative (induction enzymatique, mitogènes), dont les effets sont détectables à long terme. Ce sont ces effets à long terme qui sont intéressants dans les études cancérogènes des produits chimiques. Actuellement, seules les cultures cellulaires ont permis des études sur plus de 48 heures. Contrairement aux lignées cellulaires d'hépatocytes (tel les cellules de Chang), les cultures primaires d'hépatocytes maintiennent plusieurs de leurs fonctions spécifiques et peuvent proliférer en réponse à divers facteurs de croissance. Les hépatocytes s'avèrent donc très utiles pour l'étude *in vitro* de certaines fonctions du foie et pourront peut-être permettre de répondre aux recommandations de Santé et Bien-être social Canada (1993), qui tel que souligné précédemment, recommande de réunir d'autres données sur les mécanismes d'induction

de diverses tumeurs par l'HCB chez des espèces animales, afin de déterminer le danger de développer des néoplasmes chez les humains.

Le maintien du métabolisme des xénobiotiques se produisant *in vivo* dans les hépatocytes est important pour l'étude des substances *in vitro*. Ce maintien des fonctions spécifiques et du pouvoir de biotransformation des hépatocytes est déterminé par le substrat d'attachement, le milieu de culture, les hormones et la présence de d'autres types cellulaires (McQueen, 1993). Dans une culture d'hépatocytes, la production des métabolites, les cytochromes P450 et l'activité des enzymes de biotransformation sont diminués rapidement (Guillouzo, 1986). La perte du cytochrome P450 est produite après quelques heures de mise en culture (Lake et Paine, 1982; Berry *et al.*, 1991). Cette perte serait causée par l'augmentation de la dégradation et l'incapacité de synthétiser des cytochromes P450 en culture (Paine, 1990). Cependant, la conservation des cytochromes P450 et des fonctions différenciées des hépatocytes peut être faite par l'ajout d'hormones glucocorticoïdes tel le dexaméthasone (Skett, 1994; Michalopoulos et Pitot, 1975), l'augmentation de la densité cellulaire (Saad, 1993), l'utilisation d'un milieu sans sérum (Reid *et al.*, 1986), ou la culture des hépatocytes avec un autre type cellulaire du foie (Bégué *et al.*, 1984). Le maintien des hépatocytes sur des Pétris recouverts de collagène dans un milieu sans sérum avec l'ajout d'insuline et de dexaméthasone est l'un des systèmes le plus employé qui permet de faire des expérimentations sur une période de quelques jours.

Peu d'études ont comparé les résultats obtenus dans des systèmes *in vivo* ou *in vitro* sur l'analyse de la biotransformation des xénobiotiques. Lebigot et son équipe (1987) ont comparé la biotransformation d'un produit chimique, le ketotifen, chez trois espèces animales et dans des cultures d'hépatocytes de chaque espèce. Les mécanismes de biotransformation et les différences entre les espèces étaient semblables dans les deux systèmes. Cependant, le lecteur ne doit pas oublier qu'on ne peut prétendre remplacer totalement l'expérimentation animale, même si le progrès constant réalisé dans l'estimation du risque des substances étrangères permettent d'affiner les prévisions faites *in vitro*. L'innervation des tissus et le rôle des autres organes présents dans l'organisme

ne peut être prévue par le système *in vitro*. La confirmation ultime que le système donne les bons résultats ne pourra se faire qu'en comparant ceux-ci à des valeurs obtenues dans l'organisme entier. Cette étape finale même réduite au minimum, ne peut être totalement éliminée.

1.6 Les objectifs de la recherche

La revue de la littérature qui précède a permis de constater que l'HCB a un effet hépatocancérogène chez le rat et que cet effet est plus grand chez le rat femelle que chez le mâle (Lambercht *et al.*, 1983; Smith et Cabral, 1980; Smith *et al.*, 1985). Le risque de cancérogenèse causé par l'HCB chez l'humain est inconnu et il doit être extrapolé de l'un de ces deux modèles. La connaissance du mécanisme de l'action cancérogène de l'HCB permettrait de mieux évaluer le risque chez l'humain. Puisque la prolifération cellulaire est reconnue comme un aspect mécanistique important par lequel agissent les cancérogènes épigénétiques (Tomatis, 1993), l'étude de l'activité mitogène de l'HCB est alléchante et elle fait l'objet de ce mémoire.

L'objectif général de ce mémoire est donc de déterminer si l'HCB induit la prolifération des hépatocytes primaires en culture et de voir si l'EGF ou d'autres composantes stéroïdiennes ne seraient pas impliquées dans l'induction de l'effet hépatocancérogène de l'HCB chez des rats femelles.

Pour répondre à cet objectif général, quelques sous-objectifs techniques importants ont dû être accomplis.

A) S'assurer de la viabilité, de la reproductibilité et de la fonctionnalité de la préparation d'hépatocytes isolés chez les rats femelles.

B) Mettre au point une méthode de mesure de la prolifération cellulaire dans une culture primaire d'hépatocytes en monocouche. Cette méthode doit avoir

l'avantage d'être non-radioactive, rapide, automatisée et de demander peu de manipulation des hépatocytes.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les différents produits chimiques employés dans les expérimentations et non mentionnés dans la liste qui suit, ont été obtenus chez Biopharm inc. (Laval, Qué., Canada) et Fisher (Montréal, Qué., Canada).

2.1.1 Matériel pour l'isolation des hépatocytes de rat adulte

Les produits suivants ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO): le bleu de Trypan, la collagénase de type IV (isolée chez *Clostridium histolyticum*), le dexaméthasone, le diméthyle sulfoxyde (DMSO), le "ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether)tetra acetic acid" (EGTA), le "N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid" (HEPES) et l'insuline. La L-glutamine, la pénicilline/streptomycine et la gentamycine ont été obtenues de Gibco Life Technologies (Burlington, Ont., Canada). Le collagène isolé du derme de boeuf, "Vitrogen 100[®] collagen", a été acheté chez Collagen corporation (Fremont, CA). Le milieu de culture Williams' E, sans rouge de phénol, a été acheté chez Biofluids (Rockville, MD). Le Percoll[®] a été obtenu chez Pharmacia Biotech, (Uppsala, Sweden). Le somnotol (85 mg/ml) provenait de CDMV, (St-Hyacinthe, Qué., Canada).

2.1.2 Matériel pour la culture et le traitement des hépatocytes

L'hexachlorobenzène (HCB, 99% de pureté) a été obtenu d'Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Le 5 β -androstane-3,17-dione (androstanedione), le 3 α -hydroxy-5 β -

androstane-17-one (éthiocholanolone) et l'estrone ont généreusement été fournis par le laboratoire du Dr. Christiane Ayotte, INRS-Santé, Université du Québec. Le facteur de croissance épidermique (EGF) et le 17 β -estradiol ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO). Enfin, le sérum de foetus de veau a été obtenu de Gibco Life Technologies (Burlington, Ont., Canada).

2.1.3 Matériel pour les tests de cytotoxicité

L'acide α -cétopropionique (acide pyruvique) et le Triton-X-100 ont été obtenus de Sigma, (St-Louis, MO). L'albumine de sérum de boeuf (BSA) a été obtenue de Fisher Scientific, (Bepean, Ont., Canada). L'albumine provenant du sérum de rat a été achetée de US Biochemicals (Cleveland, OH). Les anticorps dirigés contre l'albumine de rat ont été achetés chez Binding Site (Birmingham UK), tandis que les anticorps conjugués à une phosphatase alcaline et dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) et la solution pour doser les protéines (*BCA reagent*) ont été commandés chez Pierce (Rockford, IL). Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme réduite (NADH) de grade II a été acheté chez Boehringer-Mannheim (Montréal, Qué., Canada).

2.1.4 Matériel pour la quantification de la prolifération cellulaire

Les anticorps dirigés contre le 5'-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU), les anticorps couplés à une phosphatase alcaline et dirigés contre les IgG de souris ou le BrdU ainsi que le "*Trizma hydrochloride*" (Tris-Cl) ont été achetés de Sigma (St-Louis, MO). Les produits suivants ont été obtenus de Gibco Life Technologies (Burlington, Ont., Canada): le sérum de cheval ("*Horse Serum*", HS) et la trypsine-0,25%EDTA. La protéinase K isolée de *Tritirachium album* a été obtenue de Boehringer-Mannheim (Montréal, Qué., Canada). Le liquide à scintillation "*Ecolite*TM" et le [méthyl-³H]-thymidine (35-67 Ci/mmol) ont été achetés de ICN Pharmaceuticals, Inc. (Montréal, Qué., Canada).

2.1.5 Matériel pour la quantification de l'ADN

Le "2'[4-hydroxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-1H-benzimide" (Bis-benzimide trihydrochloride ou Hoechst 33258) a été commandé chez. L'ADN de sperme de hareng (sel de sodium) a été acheté de Boehringer-Mannheim (Montréal, Qué., Canada).

2.2 Isolation des hépatocytes de rat femelle adulte

2.2.1 Méthodologie chez l'animal

Les hépatocytes ont été isolés chez des rats femelles adultes (45 ± 3 jours d'âge) Sprague-Dawley (de 170-210 g) obtenues de Charles River Canada Inc. (St.-Constant, Québec). Les rongeurs ont été utilisés après 5 à 12 jours d'adaptation aux conditions environnementales de l'animalerie (21°C de température et 55% d'humidité). Les rats ont été soumis à un cycle de 12 h de noirceur et de lumière et un accès *ad libitum* à l'eau, de même qu'à la nourriture Purina Rat Chow 5012 (Purina Mills, Richmond IN). Les animaux ont été anesthésiés par une injection intra-péritonéale de somnotol (0,1 ml/g du poids corporel) avant de procéder à la perfusion du foie.

2.2.2 Perfusion du foie de rat

La préparation d'hépatocytes a été obtenue par une perfusion enzymatique en deux étapes, tel que décrit par Maier et Schawalder (1993). L'animal inconscient a été étendu et attaché sur le dos. À l'aide de ciseaux, la cavité abdominale a été ouverte à partir de la pointe du sternum jusqu'au bas du ventre. L'intestin a été déplacé vers la droite de la cavité pour dégager le foie. Les deux plus gros lobes du foie ont été soulevés pour mieux voir les veines et artères du foie. À l'aide de fils, la branche pancréatico-duodénale de la veine cave inférieure (au-dessus du rein droit) a été ligaturée. Pour procéder à la canulation de la veine porte, deux fils y ont été attachés; d'abord, le fil 1 a

été noué tandis que le fil 2 a servi de guide pour installer la canule. La veine porte a été incisée (entre les deux fils) et la canule a été glissée à l'intérieure de cette veine. Le fil 2 a été attaché pour maintenir la canule en place. Une coupure a été effectuée au niveau de la veine cave inférieure (en dessous du niveau du rein). Le foie a d'abord été perfusé *in situ* pendant 5 à 10 minutes à 37°C en administrant une solution de pré-perfusion préparée à partir du tampon Hanks à pH 7.6 (Hanks et Wallace, 1949) auquel a été ajouté 0,5 mM d'EGTA, 50 µg/ml de gentamycine, 8,6 mM de bicarbonate de sodium, 20 mM d'HEPES pH 7.8 et 10^{-7} M d'insuline. Au départ, le débit a été ajusté à 10 ml/min pour tranquillement être augmenté à 30 ml/min. Pendant ce temps, un tube de récupération du liquide à perfusion a été installé. Le thorax de l'animal a été ouvert à l'aide de ciseaux. Le sternum a été coupé et la cage thoracique a été écartée. La veine cave inférieure située juste au-dessus du coeur a été dégagée. Une incision y a été effectuée pour installer la canule de récupération. La perfusion a alors été poursuivie en faisant circuler, pendant 4 à 10 minutes à 37°C, la solution de perfusion (tampon Hanks à pH 7.4 supplémenté avec 1 mM de chlorure de calcium et 15000 unités Mandl de collagénase ont été ajoutés tandis que l'EGTA a été omis). Une unité Mandl a été définie comme étant la quantité de peptides libérés (ou séparés) par le collagène. La quantité de peptides libérés est évalué grâce à la quantification de la leucine présente. La leucine est détectée par le colorant ninhydrine. Une unité Mandl est égale à 1 µM de leucine détecté par le colorant ninhydrine. Seul les premiers 30 ml de ce tampon n'ont pas été recirculés. Une fois la digestion terminée, le foie a été retiré de l'animal et déposé dans la solution de perfusion conservée sur la glace.

2.2.3 Isolation des hépatocytes

La première méthode d'isolation d'hépatocytes (méthode A) est une méthode qui ne sépare pas les cellules viables des cellules non-viables. Tout d'abord, le foie perfusé a été transféré dans une solution de lavage (milieu de culture Williams' E supplémenté avec 20 mM d'HEPES pH 7.6, 2 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de penicilline/streptomycine et 1 mM de chlorure de calcium) à 4°C pour le couper en morceaux (2-3 mm²) afin de libérer les hépatocytes. La préparation de cellules a été filtrée une première fois à l'aide

d'un filtre en acier inoxydable de 0,5 mm. Le filtrat a ensuite été passé dans un tamis de nylon ayant des pores de 100 μm . Le volume a été complété à 50 ml avec la solution de lavage. Les hépatocytes ont été délicatement mélangés et centrifugés à 20xg pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été ressuspendues dans 50 ml de solution de lavage. Les étapes de lavage et de centrifugation ont été répétées trois fois. Les cellules ont été ressuspendues dans 20 ml de la solution de lavage afin de compter la viabilité par l'exclusion du bleu de Trypan sur un hématocytomètre (voir section 2.2.4).

La deuxième méthode d'isolation d'hépatocytes (méthode B) est une méthode qui sépare les cellules viables des cellules non-viables à l'aide d'un milieu percoll et d'une centrifugation à petite vitesse. L'isolation des hépatocytes avec du percoll est une adaptation du protocole de Kreamer *et al.* (1986). La méthode utilisée est identique à celle décrite au paragraphe précédent auquel quelques modifications ont été apportées. Tout d'abord, après le premier lavage, les cellules ont été ressuspendues dans la solution de lavage et un premier décompte cellulaire a été fait. La viabilité, qui a été calculée par l'exclusion du bleu de Trypan, était de 70 à 85%. Ensuite, une solution de percoll a été préparée en mélangeant neuf volumes de percoll à un volume de tampon Hanks 10 fois plus concentré que la préparation de tampon Hanks formulée par Hanks et Wallace (1949). La concentration des cellules a été ajustée, à l'aide du tampon Hanks, entre 15×10^7 et 20×10^7 cellules/ml. De cette dilution d'hépatocytes, 10 volumes ont été mélangés à 10 volumes de la solution de percoll. Cette préparation a été mélangée par inversion et centrifugée à 50xg, pendant 10 min à 4°C. Après la centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot de cellules parenchymateuses viables a été resuspendu dans la solution de lavage. Après un dernier lavage à l'aide d'une centrifugation à 20xg, pendant 2 min à 4°C, les cellules ont été resuspendues dans 20 ml de solution de lavage. La viabilité des hépatocytes a été calculée (voir la section 2.2.4) par l'exclusion du bleu de Trypan.

2.2.4 Évaluation de la viabilité des hépatocytes

L'évaluation de la viabilité des hépatocytes a été effectuée par la méthode d'exclusion du bleu de Trypan (Berry *et al.*, 1991). Tout d'abord, un volume de la préparation finale des hépatocytes (après la purification) a été dilué dans 10 volumes de la solution de lavage, puis quatre volumes de cette dilution de cellules ont été mélangés à un volume de bleu de Trypan. Une goutte a été déposée sur un hématocytomètre (pourvu d'une chambre de 0.1 mm de profondeur). Le nombre de cellules ayant intégré (hépatocytes morts) ou exclues (hépatocytes vivants) le bleu de Trypan a été compté. Le pourcentage de viabilité a été calculé en divisant le nombre de cellules n'ayant pas intégré le bleu de Trypan par le nombre total de cellules.

2.3 Culture et traitement des hépatocytes de rat

Pour les tests de cytotoxicité, 2×10^6 hépatocytes ont étéensemencés dans des Pétris (pour la culture cellulaire) de 6 cm, enduits de collagène et contenant 4 ml de milieu de culture (Williams' E sans phénol rouge, 10 ou 100 nM de dexaméthasone, 100 nM d'insuline, 2 mM de L-Glutamine et 100 U/ml de pénicilline/streptomycine) enrichie de 2% de sérum de fœtus de veau. Pour la mesure de la prolifération cellulaire, 25 000 cellules/cm² de matrice d'ensemencement ont étéensemencées dans des Pétri de 6 cm et des plaques de 24, 48 ou 96 puits (à fond plat, enduit de collagène) et respectivement incubées dans un volume final de 4 ml, 500 µl, 300 µl et 100 µl du même milieu de culture. Les cellules ont été incubées à 37°C et une atmosphère humidifiée contenant 5% CO₂. Trois heures plus tard, le milieu a été remplacé par le milieu de culture sans sérum. Après 21 h supplémentaires de culture, les hépatocytes ont été exposés aux substances à tester, pendant 24 h pour les tests de cytotoxicité et 72 h pour les essais de prolifération cellulaire. L'HCB (10-100 µM) a été dissout dans le DMSO; la concentration finale du DMSO dans le milieu n'excédait pas 0,5%. L'estrone, le 5β-androstane-3,17-dione et le 3α-hydroxy-5β-androstane-17-one ont été dissout dans de l'éthanol 100% à une concentration de 10 µM, puis dilués dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale dans le milieu de 1 nM. L'EGF (10 ou 20 ng/ml) a été simplement

dissout dans le milieu de culture. Les milieux de cultures ont été changés à chaque jour en utilisant toujours des solutions fraîchement faites.

2.4 Tests de cytotoxicité

2.4.1 Relargage de la LDH

La terminologie anglaise identifiant ce test est "*LDH leakage test*". L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les cellules et le milieu de culture des cellules a été mesurée selon un protocole adapté des méthodes décrites par Jauregui *et al.* (1981) et Chao *et al.* (1988). Les milieux de culture ont été recueillis (1 ml), puis les cellules ont été lavées avec du P.B.S. à 4°C avant d'être récoltées dans du P.B.S. (3 ml) à l'aide d'un balai de type "policeman". Les homogénats de cellules ont été dilués (1:5) dans du P.B.S.. Du Triton-X-100 a été ajouté aux homogénats et aux milieux de culture à une concentration finale de 1%. Ensuite, les hépatocytes ont été éclatés en effectuant deux cycles de sonification de 30 secondes, dans un bain à ultrasons ("ultrasonic cleaner", model 8850, Cole-Parmer, Chicago, Illinois). Les échantillons ont été conservés, au maximum 48 h à 4°C, en accord avec la littérature qui montre une conservation efficace jusqu'à deux semaines à 10°C sans qu'il y est une perte significative de l'activité de la LDH (Chao *et al.*, 1988; Jauregui *et al.*, 1981 et Berry *et al.*, 1991). L'activité de la LDH a été mesurée en suivant la transformation du NADH en NAD⁺, qui se produit lors de la conversion du pyruvate en lactate. Le temps zéro de la réaction était initié lorsque 50 µl d'échantillon ont été ajoutés au substrat (50 mM d'un tampon phosphate potassium, pH 7.4, 5 mM NADH et 20 mM de sodium pyruvate). La transformation du NADH a été enregistrée à toutes les 30 secondes, en suivant l'absorbance du NADH à 340 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre lambda3 (Perkin-Elmer). Un aliquot a été conservé à -20°C jusqu'à ce que le dosage des protéines soit effectué (voir section 2.4.2) afin d'exprimer les résultats en activité spécifique (U/mg/min). L'unité enzymatique (U) est définie comme étant la variation de 0,001 unité de densité optique par minute multiplié par 1.25, un coefficient tenant compte du fait que la réaction a été effectuée à 25°C et non 37°C. (Chao *et al.*, 1988). Le pourcentage d'écoulement de la LDH a été calculé en divisant

l'activité spécifique de la LDH dans le milieu de culture par la somme de l'activité spécifique de la LDH dans le milieu de culture et dans les cellules, multiplié par 100.

2.4.2 Quantification des protéines

Les mêmes échantillons qui ont servis à mesurer l'écoulement de la LDH ont été utilisés pour déterminer la concentration en protéines dans les cellules et les milieux de culture. Les aliquots ont été congelés à -20°C . Le BSA a été utilisé comme étalon en préparant une courbe d'étalonnage allant de 0,05 à 0,5 mg/ml d'albumine. Après avoir dégelé les échantillons, 10 μl ont été aliquotés dans une plaque de 96 puits, puis 200 μl de colorant (le réactif BCA de Pierce) ont été ajoutés à chacun des puits. Après avoir incubé les plaques 30 minutes à 37°C , l'absorbance a été enregistrée à 595 nm dans un lecteur de plaque Elx 800 Biotek instrument inc (Montréal, Qué). Les tests ont été faits en triplicata.

2.5 Essai de la prolifération cellulaire

Durant les derniers 48 h du traitement des hépatocytes, le BrdU ou la [méthyl- ^3H]-thymidine (35-67 Ci/mmol) ont été ajoutés au milieu de culture à des concentrations de 0,5 mM et 2 $\mu\text{Ci/ml}$ respectivement.

2.5.1 Incorporation de la [méthyl- ^3H]-thymidine

Après 72 h d'exposition, les cellules ont été détachées en les incubant 15-20 minutes avec une solution aqueuse de trypsine-0,25%EDTA. Les hépatocytes ont été récoltés avec du P.B.S. et le culot a été lavé deux fois à l'aide de centrifugations à 500 g pendant 5 min à 4°C . Ensuite, l'ADN a été isolé (voir la section 2.5.2). Un aliquot de 10 μl de chaque échantillon a été ajouté à 15 ml de liquide à scintillation Ecolite™. L'activité radioactive a été enregistrée au compteur à scintillation "LKB wallac 1217 RackBeta". L'incorporation de [méthyl- ^3H]-thymidine par les cellules a été calculée en cpm/ μg d'ADN. La quantité d'ADN a été évaluée par fluorescence (voir section 2.5.3). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de prolifération cellulaire en établissant que le groupe témoin avait une prolifération cellulaire de 100%. Le nombre d'essai par

traitement est indiqué dans le texte du chapitre 3, résultats expérimentaux. Chaque traitement comprend six essais. Le terme "essai" dans ce mémoire correspond à un Pétri ou un puits (d'une plaque multipuits)ensemencé avec des hépatocytes provenant d'une même perfusion. Des essais provenant de perfusions différentes sont indiqués dans le texte du chapitre 3.

2.5.2 Isolement et purification de l'ADN

L'ADN des hépatocytes a été isolé selon la méthode décrite par Gross-Bellard, *et al.* (1973). En bref, les protéines ont d'abord été digérées en incubant pendant 12 à 18 h à 50°C les hépatocytes dans un tampon (1 ml/10⁸ cellules) de digestion (100 mM NaCl, 10 mM tris-Cl pH 8, 25 mM EGTA pH 8, 0,5% SDS et 0,1 mg/ml de protéinase K). Ensuite, l'extraction de l'ADN a été faite en ajoutant 1 volume d'une solution de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1) aux échantillons. Ces aliquots ont été centrifugés à 1700xg pendant 10 minutes à 4°C. La phase aqueuse a été prélevée puis 0.5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et deux volumes d'éthanol (EtOH) 100% glacé ont été ajoutés aux échantillons. Après une précipitation pendant une nuit à -80°C, l'ADN a été centrifugé à 1700 g pendant 2 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec deux volumes EtOH 70% glacé et une centrifugation à 1700 g pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant a été enlevé et le culot séché. L'ADN isolé a été ressuspendu dans un tampon Tris-EDTA (10 mM Tris-Cl pH 8.0 et 1 mM EDTA).

2.5.3 Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN a été faite selon une adaptation des méthodes de Kapuscinski et Skoczylas (1977) et Brunk *et al.* (1979). Tout d'abord, un tampon de fluorescence à pH 7.0 (10 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA et 0,1M NaCl) a été préparé. Ensuite, une solution Hoechst 33258 a été préparée en mélangeant 0,2 µg du chromophore Hoechst 33258 à 1 ml du tampon de fluorescence. Enfin, 50 µl de l'échantillon ont été mélangés à 2 ml de la solution Hoechst 33258. Après 30 minutes d'incubation, la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre de type Perkin-Elmer LS50B et du logiciel "FL data manager" (FLDM). L'excitation a été faite entre 320 et

380 nm, l'émission à 458 nm a été enregistrée; la vitesse de balayage était de 240 nm/min et la sensibilité de l'enregistreur a été fixée à 10. Les résultats ont été exprimés en μg d'ADN en utilisant l'ADN de sperme d'hareng comme étalon.

2.5.4 Méthode ELISA-BrdU

Dans cette section, les volumes d'incubation des anticorps et du substrat sont respectivement de 300 μl , 150 μl et 50 μl pour les plaques multipuits de 24, 48 et 96 puits. Les lavages sont respectivement effectués avec le tampon P.B.S. et des volumes de 1 ml, 500 μl et 200 μl sont utilisés pour les plaques multipuits de 24, 48 et 96 puits. La méthode ELISA-BrdU a été inspirée d'une méthode de base rapportée par Saad *et al.* (1993). À la fin du traitement de 72 h, les hépatocytes ont été lavés, puis fixés aux plaques en les exposants à un volume (c-à-d le même volume que pour l'incubation en présence du milieu de culture) d'éthanol 70% glacé pendant 30 minutes à -20°C . Les plaques ont ensuite été lavées, puis l'ADN des hépatocytes a été dénaturé en incubant les cellules dans de l'eau distillée glacée pendant 8 minutes, suivi d'une autre incubation de 8 minutes avec 1N d'HCl à 65°C . Après deux lavages, les sites non-spécifiques ont été bloqués avec du P.B.S. contenant 3% de BSA (3% BSA/P.B.S.) pendant 1 h à 37°C . Les cellules ont été lavées trois fois, puis un volume d'anticorps primaire (anti-BrdU conjugué à un IgG de souris) a été dilué dans 500 volumes de la solution 3% BSA/P.B.S.. Les cellules ont été incubées pendant 2 h à la température de la pièce dans cette solution d'anticorps. Les plaques ont été à nouveau lavées et une dilution d'un volume de l'anticorps secondaire (un anti-IgG de souris conjugué à une phosphatase alcaline) a été mélangée à 500 volumes de la solution 3% BSA/P.B.S.. Les cellules ont été incubées pendant deux heures à la température de la pièce dans cette solution contenant l'anticorps secondaire. Les plaques ont été lavées et le substrat (100 mM diéthanolamine, pH 9.8, 0,5 de MgCl_2 contenant 1 mg p-nitrophénylphosphate/ml) a été ajouté. La réaction colorimétrique a été évaluée à l'aide de l'absorption, mesurée à 405 nm, au lecteur de plaque. L'absorbance nette a été obtenue en calculant la moyenne des puits n'ayant pas étéensemencés avec des hépatocytes (bruit de fond) et en soustrayant cette valeur aux données obtenues dans les puits expérimentaux contenant des hépatocytes. La réponse proliférative a été calculée en pourcentage. Le pourcentage de prolifération cellulaire du

groupe témoin a été établi à 100%. Chaque groupe est constitué d'un nombre d'essais variant de 6 à 18.

2.6 Analyses statistiques

La moyenne, l'écart-type et l'erreur sur la moyenne (SEM) ont été calculés pour chaque groupe analysés. Pour comparer les moyennes des groupes exposés à celle du groupe témoin, tant pour les tests de cytotoxicité que pour les tests de prolifération cellulaire, une analyse de type ANOVA a été faite, suivi d'un test de comparaison multiple par la méthode selon Dunnett's ou la méthode Student-Newman-Keuls selon le cas. Cependant, les résultats de viabilité des hépatocytes isolés avec ou sans percoll (tableau 3.1) et les résultats de prolifération cellulaire mesurés par la méthode ELISA-BrdU optimisée ont été analysés par le test de t de Student. Le seuil de signification était de 0.05.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1 La préparation d'une culture primaire d'hépatocytes de rat en monocouche

3.1.1 La reproductibilité des méthodes d'isolement des hépatocytes avec ou sans milieu percoll

L'intégrité cellulaire et la reproductibilité du rendement de l'isolation des hépatocytes sont des points importants pour assurer la validité des études toxicologiques. Dans ce mémoire, le modèle *in vitro* repose sur l'utilisation d'hépatocytes isolés chez des rats femelles. Le tableau 3.1 donne la viabilité d'hépatocytes isolés avec ou sans milieu percoll (respectivement identifiées méthodes B et A dans la section 2.2.3); le milieu percoll est préparé à une densité, de 1,06 g/ml, qui est inférieure à la densité des hépatocytes viables (1,07 à 1,11 g/ml) et supérieure à celle (1,02 à 1,05 g/ml) des cellules de Kupffer, des cellules endothéliales, des cellules parenchymateuses non-viables et des débris cellulaires (Kreamer *et al.*, 1986). Ainsi les hépatocytes viables sont séparés des cellules non-parenchymateuses et des hépatocytes non-viables. L'emploi du milieu percoll augmente de 15% la viabilité des hépatocytes fraîchement purifiés. Cette valeur plus élevée est significativement différente ($p < 0.05$) de celle obtenue lors des purifications faites avec la méthode A. L'utilisation du milieu percoll permet d'atteindre le taux de viabilité critique de 85% requis pour des études toxicologiques de qualité, alors qu'avec la méthode A, seulement une des onze perfusions effectuées a permis d'atteindre cet objectif. La variation de la viabilité des hépatocytes est aussi plus grande lors de l'utilisation de la méthode A. En effet, l'écart séparant la plus petite de la plus grande valeur de viabilité est de 17% pour les hépatocytes non-traités au percoll comparativement à 6% pour les hépatocytes obtenus avec la méthode B.

TABLEAU 3.1 Effet de l'utilisation d'un milieu percoll sur la viabilité des hépatocytes de rat femelle adulte, fraîchement isolés. La viabilité est exprimée en pourcentage d'exclusion du bleu de Trypan et les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM pour 11 perfusions. * indique une différence statistique ($p < 0.05$) significativement différente entre les deux méthodes d'isolation des hépatocytes.

MÉTHODE D'ISOLATION	VIABILITÉ (% d'exclusion du bleu de Trypan)
Sans milieu percoll	77 \pm 1,4 (11)
Avec milieu Percoll	92 \pm 0,6* (11)

3.1.2 La comparaison de la cytotoxicité de l'HCB sur des hépatocytes isolés avec ou sans milieu percoll

La cytotoxicité de l'HCB a été évaluée par le dosage du relargage de la LDH. La figure 3.1-A montre le pourcentage de relargage de la LDH par les hépatocytes en fonction de la concentration d'HCB présente dans le milieu de culture. Pour les hépatocytes isolés sans milieu percoll; lorsque 10 à 80 μM d'HCB (sauf la concentration de 20 μM d'HCB) sont incubés dans le milieu cellulaire, le relargage de la LDH est significativement ($p < 0.05$) plus grand que celui chez le témoin (DMSO seulement). Le maximum de LDH évacuée est de $14,60 \pm 0,88$ % pour une concentration de 80 μM d'HCB. Lorsque les cellules parenchymateuses du foie sont isolées avec du milieu percoll l'application d'HCB, à des concentrations allant de 10 à 100 μM , n'amène aucune variation significative du relargage de la LDH. Le DMSO est le solvant dans lequel l'HCB est dissout pour ensuite être incubé dans le milieu de culture. Lorsque les hépatocytes, isolés avec ou sans milieu percoll sont soumis à 0,5% de DMSO, soit la concentration maximale utilisée, le déversement de la LDH ne présente aucune différence significative comparativement à leur témoin (sans ajout de DMSO) respectif (données non présentées). Bien que les deux groupes témoins (DMSO seul pour les méthodes avec et sans percoll)

n'aient pas une valeur identique $5,00 \pm 0,10$ et $6,54 \pm 0,59$; (moyenne \pm SEM) leur différence n'est pas significative ($p < 0,05$).

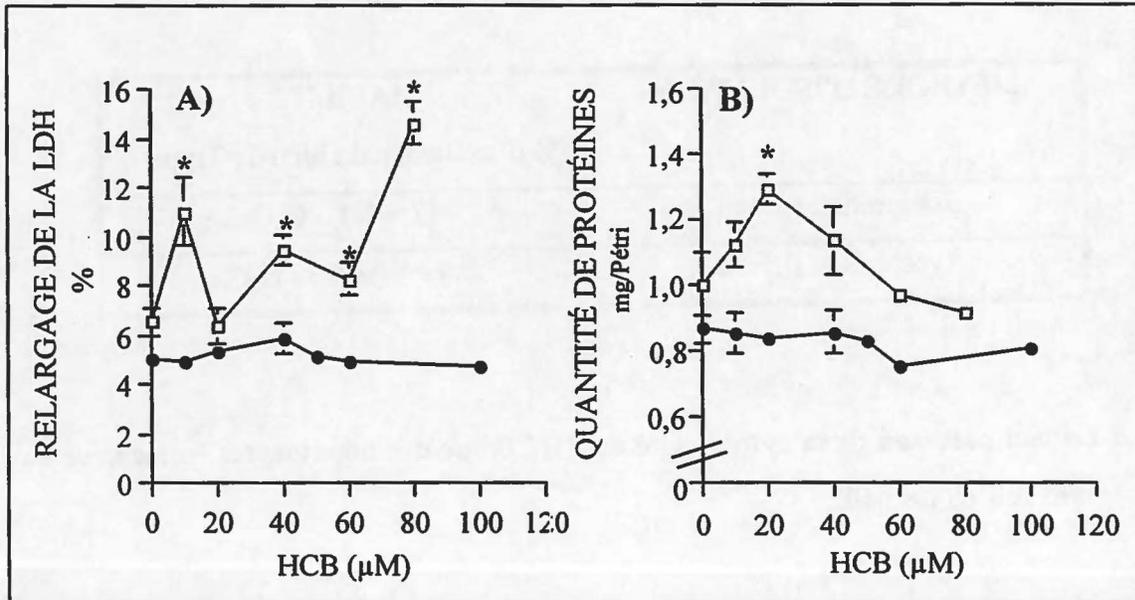


FIGURE 3.1 Effet de la concentration d'HCB (incubé 48 h) sur (A) le relargage de la LDH et (B) la concentration protéique totale des hépatocytes isolés avec ou sans l'aide d'un milieu de percoll. Les hépatocytes isolés sans le milieu percoll sont représentés par un carré (\square) et ceux enrichis avec le percoll sont représentés par un rond (\bullet). Chaque point sur le graphique est exprimé comme la moyenne \pm SEM pour (A) 12 essais ou (B) 3 essais. * indique que la moyenne est significativement différente ($p < 0,05$) du témoin (DMSO seul) correspondant.

La détermination du contenu en protéines intra- et extra-cellulaire est un bon marqueur de l'état des hépatocytes et de l'apparition de cellules mortes dans le milieu. La figure 3.1-B réfère au dosage de la quantité de protéines (exprimé en mg/Pétri) en fonction de la concentration d'HCB à laquelle ont été soumis les hépatocytes isolés avec ou sans milieu percoll. Les deux témoins (DMSO seul) ne sont significativement pas différents l'un de l'autre. L'application de 0,5% de DMSO aux hépatocytes isolés selon la méthode A ou B n'a pas modifiée de façon significative la quantité de protéines retrouvée dans les Pétris par rapport à leur témoin respectif (données non présentées). La figure 3.1-

B montre que seule l'application de 20 μM d'HCB aux hépatocytes isolés sans l'aide d'un milieu percoll amène une concentration significativement plus grande ($P < 0.05$) de protéines/Pétri comparativement au groupe témoin (avec ou sans DMSO). Aucune autre variation significative n'a été exprimée. Le traitement des hépatocytes avec une concentration de 20 μM d'HCB est la seule concentration d'HCB qui augmente significativement la quantité de protéines des cellules traitées et c'est aussi, tel que décrit plus haut, la seule concentration qui n'augmente pas significativement le relargage de la LDH (figure 3.1-A). Les études *in vitro* subséquentes utilisent des hépatocytes de rat adulte femelle, isolés avec l'aide du milieu percoll (méthode B) puisque cette méthode permet d'avoir un taux de viabilité constant, plus grand que 85% et qu'aucune cytotoxicité n'est apparente chez ces cellules lorsque des concentrations inférieures à 80 μM d'HCB sont ajoutées au milieu de culture.

3.2 La mise au point de la méthode ELISA-BrdU pour mesurer la prolifération cellulaire dans une culture monocouche d'hépatocytes de rat femelle adulte

3.2.1 L'évaluation de la méthode de base ELISA-BrdU

La méthode ELISA-BrdU, proposée (voir section 2.5.4) pour évaluer la prolifération cellulaire dans une culture primaire d'hépatocytes de rat est une adaptation de la méthode dite de base décrite par Saad et *al.* (1993). Cette approche utilise une méthode ELISA indirecte avec un anticorps dirigé contre le BrdU pour mesurer la quantité de BrdU incorporée dans l'ADN des hépatocytesensemencés dans des plaques multipuits de 96 puits. La figure 3.2 montre les résultats obtenus à l'aide de cette méthode non-optimisée. Le traitement pendant 72 h des hépatocytes avec 50 ou 100 ng/ml d'EGF, un mitogène reconnu (Michalopoulos, 1990; Parzefall, W *et al.*, 1985; Gebhardt et Jonitza, 1991), ne produit aucune augmentation significative de la prolifération cellulaire comparativement au témoin (dont le taux d'incorporation a été établi à 100%).

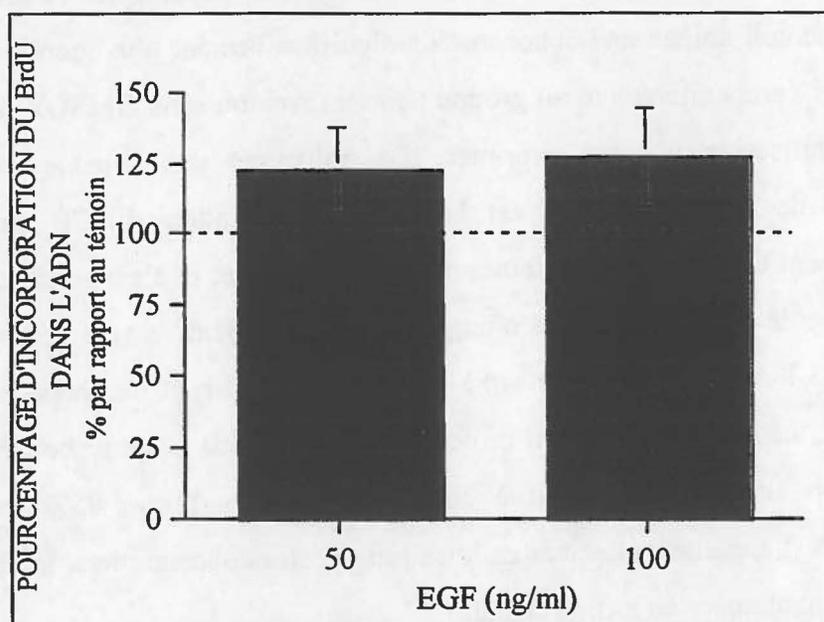


FIGURE 3.2 Évaluation de la méthode de base ELISA-BrdU, par la mesure de la prolifération cellulaire d'hépatocytes de rat, traités à l'EGF pour 72 h. Le pourcentage de cellules marquées est exprimée comme étant le rapport de la moyenne du taux de formation du *p*-nitrophénol (incorporation du BrdU pendant 48 h) par le groupe traité sur la moyenne du taux de formation du *p*-nitrophénol du groupe témoin. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM pour 12 essais.

3.2.2 La caractérisation de la réaction enzymatique utilisée dans la méthode ELISA-BrdU

La mesure de la quantité de BrdU intégré à l'ADN des hépatocytes durant la phase S est faite à l'aide d'un immunoessai indirect où l'anticorps secondaire est marqué par une phosphatase alcaline (PA). La présence du complexe immunologique est détectée à l'aide d'un système enzymatique qui est fonction du temps et de la température. La figure 3.3 montre la linéarité, dans le temps, de la formation du chromophore *p*-nitrophénol à partir du 4-nitrophénylphosphate (4-NPP) par la PA conjuguée à l'anti-IgG de souris utilisé pour la mesure de la prolifération cellulaire. Pour une dilution 1:10 000 de l'anticorps secondaire, la formation du *p*-nitrophénol (exprimé par l'absorbance produite à 405 nm) est linéaire à 25°C pendant 4 h (figure 3.3-A).

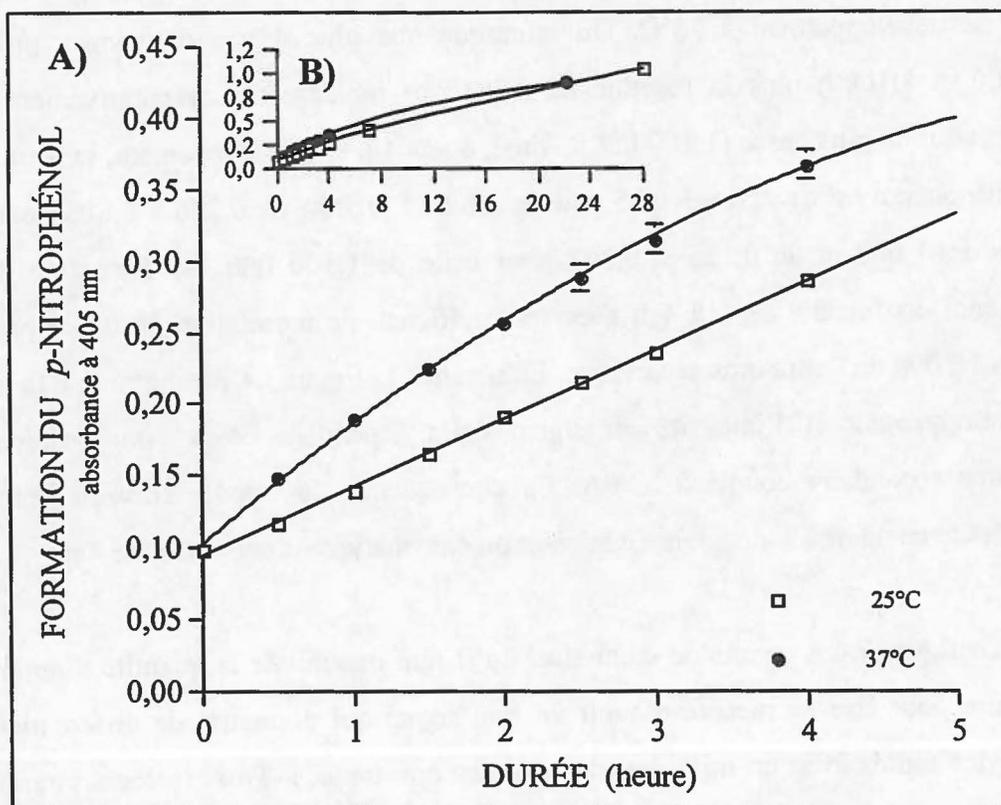


FIGURE 3.3 Effet de la température sur la formation du *p*-nitrophénol en fonction de la durée de la réaction enzymatique qui est (A) de 4 h et (B) de 28 h. Les données sont exprimées selon l'absorbance nette (405 nm) du *p*-nitrophénol qui est formé à partir du 4-NPP par la phosphatase alcaline (PA) conjuguée à l'anticorps secondaire dilué 1:10 000. Chaque point du graphique est exprimé sous la forme de la moyenne \pm SEM pour 18 essais.

Le coefficient de corrélation (r^2) pour une durée de 4 h de développement est de 0,999. La figure 3.3 (A et B) montre aussi qu'à 37°C, il y a perte de la linéarité du développement de la réaction enzymatique. Le coefficient de la corrélation r^2 est de 0,987; il s'agit plutôt d'une courbe polynomynale de deuxième ordre ($y = -0,006x^2 + 0,090x + 0,102$; $R^2 = 0,999$). L'absorbance obtenue à la suite de 4 h de développement à 25°C donne un signal trois fois plus élevé qu'au temps 0. En conséquence, les expériences subséquentes ont été faites à 25°C.

Le comportement d'une réaction enzymatique peut-être modifié par la concentration de l'enzyme présente. La figure 3.4 décrit l'activité enzymatique de la PA

(couplée à un anti-IgG de souris) incubée à différentes concentrations en fonction du temps de développement à 25°C. On remarque que plus il y a d'enzymes présents (1:10000 et 1:1000) plus la réaction se développe rapidement comparativement à la concentration la plus basse (1:100 000). Ainsi, après 4 h de développement, la formation du *p*-nitrophénol est de $1,505 \pm 0,05$ pour la dilution 1:1000, de $0,286 \pm 0,003$ pour une dilution 1:10 000 et de $0,125 \pm 0,002$ pour celle de 1:100 000. La formation du *p*-nitrophénol est linéaire de 1 à 4 h avec un coefficient de corrélation de 0,996 pour la dilution 1:1000 de l'anticorps secondaire. En résumé, la figure 3.4 démontre que la durée du développement et l'intensité du signal émis dépendent de la concentration de l'anticorps secondaire couplé à la PA. En conséquence, les études suivantes ont été effectuées avec un développement de la réaction enzymatique d'une durée de 4 h.

La figure 3.4 a permis de démontrer qu'il faut maximiser la quantité d'anticorps secondaire pour être en mesure d'avoir un bon signal qui permettra de différencier les hépatocytes traités avec un mitogène des cellules non-traitées. Trois facteurs pourraient affecter la sensibilité de l'essai impliquant la PA: 1) la quantité d'antigène (BrdU) lié à la phase solide (les plaques ELISA), 2) l'avidité de l'anticorps pour l'antigène et 3) l'activité du marqueur (PA). En conséquence, ces trois facteurs ont été optimisés et les résultats sont présentés dans les sections subséquentes.

3.2.3 L'influence de la méthode de fixation des cellules, de la concentration de l'anticorps secondaire et du tampon utilisé

Pour augmenter la quantité d'antigène liée à la phase solide, deux méthodes de fixation des hépatocytes ont été évaluées. La figure 3.5-A illustre la formation du *p*-nitrophénol (mesurée par l'absorbance nette) par des hépatocytes témoins, fixés avec 70% d'éthanol à -20°C ou encore avec un mélange fait de 50% acétone:50% méthanol à 25°C. Entre les deux modes de fixation, aucune différence significative n'a pu être constatée.

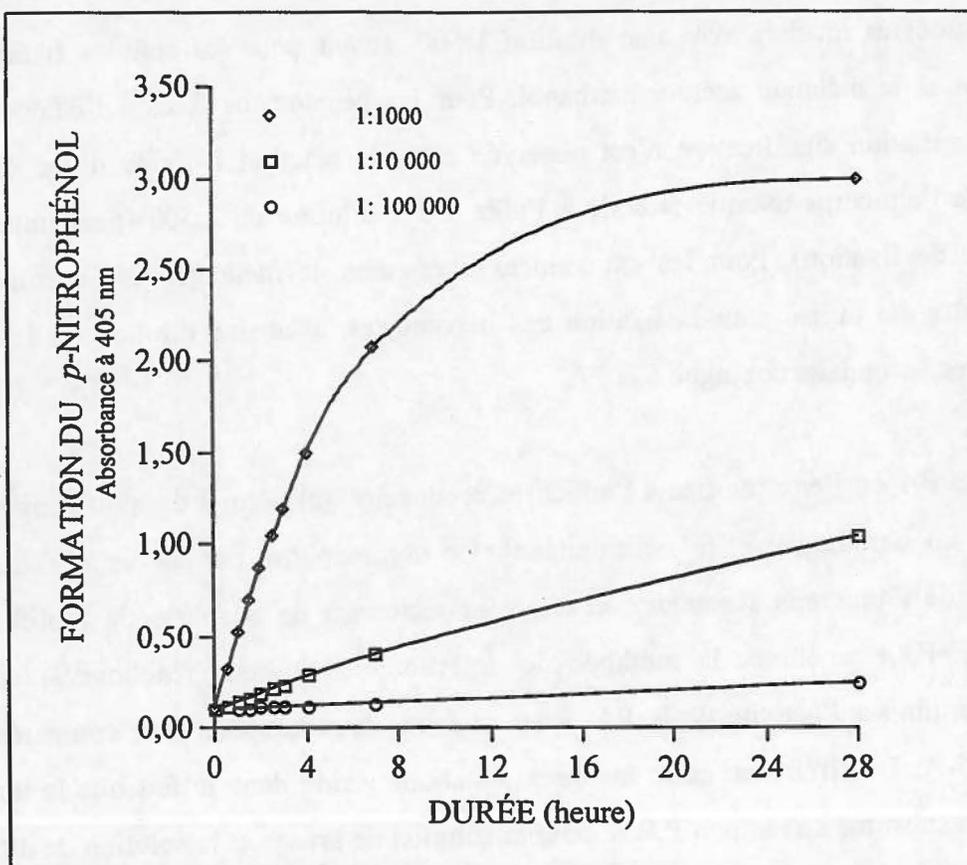


FIGURE 3.4 Effet de la concentration (1:1000, 1:10 000 et 1:100 000) de l'anticorps secondaire sur la formation du *p*-nitrophénol. Les données sont exprimées selon l'absorbance nette (405 nm) du *p*-nitrophénol qui est formé à partir du 4-NPP par l'enzyme (PA) conjuguée à l'anticorps secondaire. Chaque point du graphique représente la moyenne \pm SEM pour 18 essais.

La figure 3.4 a permis de démontrer que plus la concentration de l'anticorps secondaire est grande, plus le signal émis est intense (pour une durée de développement identique). Ainsi, la présence de l'anticorps secondaire doit être augmentée pour améliorer le signal émis par les cellules marquées. La figure 3.5-A compare l'utilisation de deux dilutions de l'anticorps secondaire. L'utilisation d'une dilution 1:250 augmente de façon significative l'absorbance produite par les hépatocytes fixés avec le mélange d'acétone et de méthanol comparativement aux cellules détectées avec une dilution plus grande, peu importe le mode de fixation utilisé. Pour les cellules détectées avec une dilution 1:250, l'absorbance nette est respectivement 62 % et 70% plus grande que dans

les hépatocytes incubés avec une dilution 1:500, autant pour les cellules fixées avec l'éthanol et le mélange acétone/méthanol. Pour les hépatocytes fixés à l'éthanol 70% aucune variation significative n'est observée entre la réaction à l'aide d'une dilution 1:250 de l'anticorps marqué et celle à l'aide d'une dilution de 1:500 (peut importe la méthode de fixation). Pour les expériences ultérieures, le mélange 50% acétone/50% méthanol a été utilisé pour la fixation des hépatocytes, avec une dilution de 1:250 de l'anticorps secondaire conjugué à la PA.

La PA est l'enzyme liée à l'anticorps secondaire qui permet de transformer le 4-NPP en un chromophore, le *p*-nitrophénol. Ce chromophore permet de quantifier la présence de l'anticorps secondaire et donc indirectement de quantifier la prolifération cellulaire. Pour améliorer la méthode de détection, les milieux réactionnels utilisés doivent optimiser l'activité de la PA. Pour se faire, deux tampons sont comparés à la figure 3.5-A: La différence entre les deux situations réside dans le fait que le tampon T.B.S. est substitué au tampon P.B.S. pour la solution de lavage et la solution de dilution des agents bloquants, des anticorps et du substrat chromogène. La figure montre que la détection du BrdU est agmentée de façon significative ($p < 0.05$) lorsque le tampon utilisé est le T.B.S. comparativement au P.B.S. Ici on compare les résultats des détections ayant utilisé une concentration de 1:250 de l'anticorps secondaire autant avec le tampon P.B.S. que T.B.S.. L'absorbance obtenue suite à l'utilisation du T.B.S. est le double du signal enregistré avec l'autre tampon. Le T.B.S. est retenu pour l'exécution des protocoles suivants.

La figure 3.5-B illustre la prolifération cellulaire mesurée à l'aide de la méthode ELISA-BrdU utilisant le tampon T.B.S., une dilution 1:250 de l'anticorps marqué et la méthode de fixation appliquant le mélange de 50% d'acétone/50% méthanol. Malgré ces modifications, le traitement pendant 72 h des hépatocytes avec 50 ou 100 ng/ml d'EGF ne produit aucune augmentation significative de la prolifération cellulaire comparativement au témoin (sans EGF) correspondant.

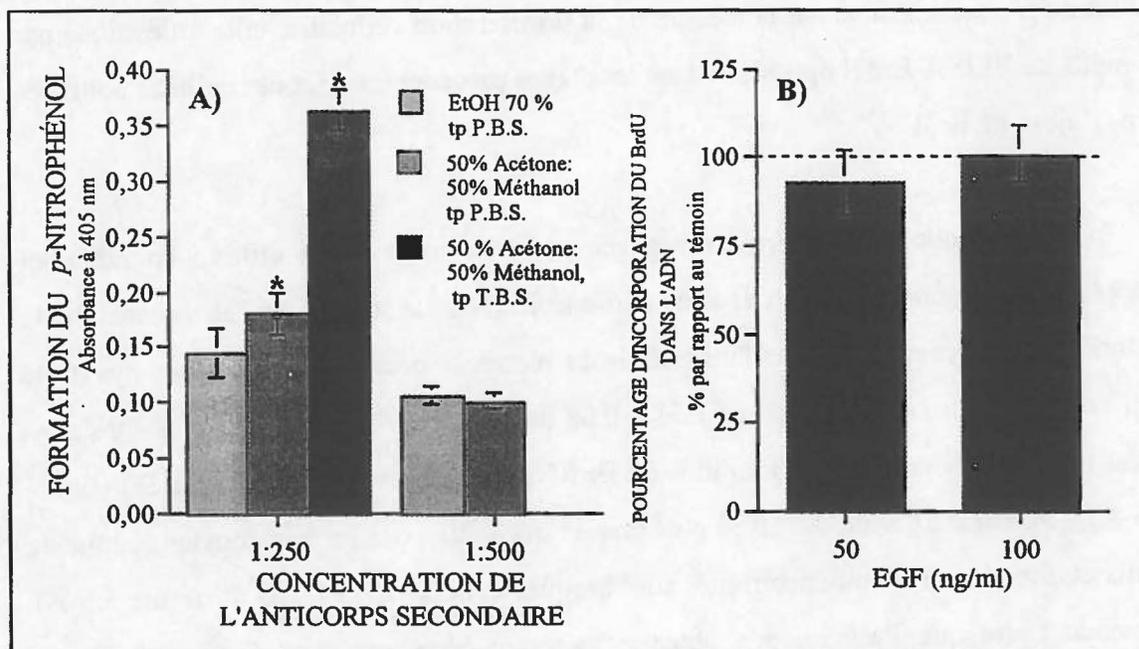


FIGURE 3.5 (A) Influence de la méthode de fixation, de la dilution de l'anticorps secondaire et/ou du tampon utilisé sur la formation du *p*-nitrophénol. (B) Évaluation de la méthode ELISA-BrdU optimisée en (A), en mesurant la prolifération cellulaire d'hépatocytes de rat, traités à l'EGF pendant 72 h. Le BrdU a été ajouté au milieu de culture pendant 48 h. Les cellules fixées à l'éthanol sont représentées par une colonne grise pâle (□), les hépatocytes fixés avec 50% d'acétone/50% de méthanol sont représentés par une colonne grise (■) lorsque le tampon utilisé est le P.B.S. et la colonne est grise foncée (■) pour le tampon T.B.S.. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM, $n=8$ pour les cellules fixées à l'éthanol et pour les hépatocytes fixés avec 50% acétone:50% méthanol utilisant le tampon P.B.S. $n=16$ ou T.B.S. $n=12$. * indique que la moyenne est significativement différente ($p<0.05$) du témoin correspondant.

3.2.4 Le blocage des sites non-spécifiques

Le choix d'un agent bloquant, qui prévient l'absorption non-spécifique des réagents immunologiques sur la membrane plasmique des cellules, est très important puisqu'un bon blocage permet de mieux sélectionner le signal positif par rapport au bruit de fond et par le fait même, permet d'optimiser la méthode de mesure ELISA-BrdU. L'augmentation de la concentration de l'un des anticorps employés peut affecter l'efficacité de l'agent bloquant. Puisque précédemment la concentration de l'anticorps

secondaire a été augmentée, cette vérification est essentielle. La figure 3.6-A montre l'effet du bloqueur utilisé sur la mesure de la prolifération cellulaire, telle qu'évaluée par la méthode ELISA-BrdU optimisée dans les étapes précédentes chez des cellules cultivées sans l'ajout de BrdU.

La méthode ELISA-BrdU optimisée précédemment a été utilisée en omettant d'appliquer un agent bloqueur des sites non-spécifiques. La mesure de l'absorbance nette (données non-présentées), sans l'utilisation de bloqueur pour des hépatocytes ayant été cultivés en absence de BrdU, est de 1.51 ± 0.08 (moyenne \pm SEM). Lorsque les sites non-spécifiques des hépatocytes non-traités au BrdU sont bloqués avec du Tween 20 (figure 3.6-A), l'absorbance nette est 10 % plus grande que celle pour les hépatocytes soumis au BrdU et dont les sites non-spécifiques sont bloqués avec 3 % BSA/T.B.S. (figure 3.5-A). Cependant, lorsque l'absorbance obtenue suite au blocage avec le Tween 20 est comparée à l'absorbance mesurée lorsqu'aucun agent bloquant n'est utilisé, le Tween 20 produit un blocage quatre fois plus efficace. L'utilisation de 10% de sérum de cheval empêche la liaison des anticorps primaire et secondaire avec les sites non-spécifiques. Le blocage avec le sérum de cheval est 7 et 9 fois plus grand que le blocage respectivement produit par le BSA et le Tween 20 respectivement. L'absorbance nette produite par des hépatocytes non-traités avec le BrdU et bloqués avec 10% de sérum de cheval est 34 fois moins élevée que pour les cellules dont les sites non-spécifiques n'ont pas été bloqués. Le lait en poudre (10%), avec ou sans 0,2% de Tween 20, a aussi été essayé comme agent bloqueur. L'inhibition de l'interaction des anticorps avec les sites non-spécifiques est identique au blocage produit par 10 % le sérum de cheval, soit respectivement $0,033 \pm 0,003$ et $0,030 \pm 0,004$ (moyenne \pm SEM) pour le lait avec et sans le Tween 20. L'agent retenu pour bloquer les sites non-spécifiques des expériences subséquentes est le sérum de cheval à une concentration de 10%.

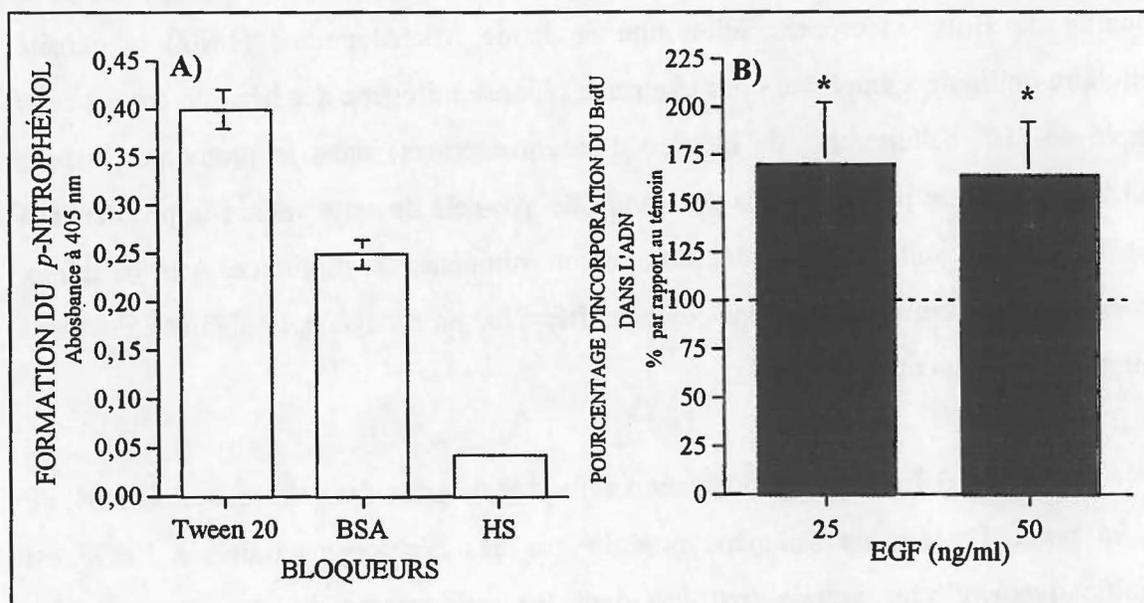


FIGURE 3.6 (A) Évaluation du blocage des sites non-spécifiques avec 0,2% Tween 20 ou 3% BSA ou 10% de sérum de cheval sur des hépatocytes non-traités au BrdU. Les données sont exprimées selon l'absorbance nette (405 nm) du *p*-nitrophénol formé à partir du 4-NPP par l'anticorps secondaire de la méthode d'ELISA-BrdU. (B) Évaluation, par la méthode ELISA-BrdU optimisée en (A), de la prolifération d'hépatocytes de rat, traités à l'EGF pendant 72 h. Le BrdU a été ajouté au milieu de culture pendant 48 h. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM pour 12 essais en (A) et respectivement 18 et 17 essais pour l'EGF 25 et l'EGF 50 ng/ml en (B). * indique une moyenne significativement différente ($p < 0.05$) du témoin correspondant.

La figure 3.6-B décrit la prolifération cellulaire mesurée par la méthode ELISA-BrdU optimisée dans laquelle les sites non-spécifiques sont bloqués avec 10 % de sérum de cheval. Des hépatocytes de rat femelle soumis à 25 et 50 ng/ml d'EGF ont une prolifération cellulaire significativement différente ($p < 0.05$) des hépatocytes témoins (sans EGF). Le pourcentage passe de 100% pour le témoin (pourcentage établi à cette valeur) à 170 ± 32 % et 164 ± 28 % pour les hépatocytes traités avec 25 ng/ml ou 50ng/ml (moyenne \pm SEM).

3.2.5 La quantité d'hépatocytes utilisés

La sensibilité de la méthode ELISA-BrdU peut être améliorée en optimisant la quantité de BrdU incorporé. Selon une étude de Michalopoulos (1982) la densité cellulaire optimale à employer pour avoir une réponse mitogène des hépatocytes est celle employée (10^4 cellules/cm² de matrice d'ensemencement) dans le protocole de base ELISA-BrdU et ne peut donc pas être modifiée. Au-delà de cette valeur, la prolifération des hépatocytes, suite à une stimulation par un mitogène, est diminuée. Afin de mieux déceler le signal émis par des hépatocytes traités avec un mitogène, le diamètre des puits pourrait être augmenté.

La figure 3.7 décrit la prolifération cellulaire détectée dans des plaques de 24, 48 ou 96 puits. La réaction mitogène produite par des hépatocytes traités à l'EGF est significativement plus grande ($p < 0.05$) dans les trois genres de plaques employées comparativement à leur témoin respectif. La variation mesurée dans les plaques de 96 puits est plus grande que dans les plaques de 24 et 48 puits. L'amplitude de l'augmentation de la prolifération cellulaire induite par l'EGF n'est pas significativement différente entre les trois plaques.

Les résultats illustrés à la figure 3.7 proviennent de l'application de la même méthode ELISA-BrdU optimisée que celle employée à la figure 3.6-B. Sauf pour une modification: les anticorps primaire et secondaire ont été incubés plus longtemps, une nuit (18 h) à 4°C au lieu de 2 h à la température de la pièce. L'EGF provoque une prolifération cellulaire significativement plus grande lorsque les anticorps sont incubés pendant toute la nuit à 4°C comparativement à une incubation de 2 h à 25°C. En effet, la figure 3.7 montre que des hépatocytes traités avec 10 ng/ml d'EGF dans des plaques de 96 puits montrent un signal de prolifération deux fois plus grand lorsque les anticorps sont incubés toute la nuit (18 h) à 4°C que lorsque les hépatocytes traités avec 25 et 50 ng/ml d'EGF (dans des plaques de 96 puits) sont incubés 2 h à 25°C avec les anticorps (figure 3.6-B); malgré que les concentrations d'EGF utilisées à la figure 3.6-B sont 2,5 et 5 fois (respectivement) plus élevées que la concentration utilisée à la figure 3.7.

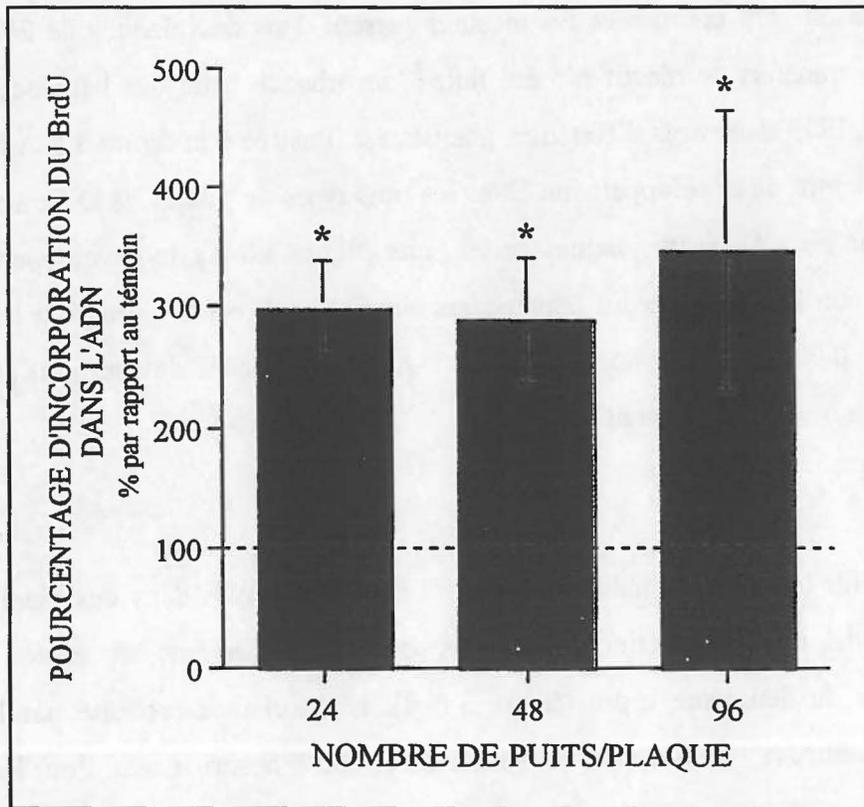


FIGURE 3.7 Comparaison de la prolifération des hépatocytes, mesuré par la méthode ELISA-BrdU, traités pendant 72 h avec 10 ng/ml d'EGF et cultivés dans des plaques de culture contenant 24, 48 ou 96 puits. Le BrdU a été ajouté au milieu de culture pendant 48 h. Les anticorps sont incubés une nuit à 4°C et le développement de la réaction se fait pendant 8h à 25°C. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM pour 6 essais. * indique une moyenne significativement plus grande ($p < 0.05$) du témoin (sans EGF).

La section 3.2.2 a permis de caractériser la cinétique enzymatique de la PA conjuguée à une IgG, mais non liée à un antigène. Cependant, la caractérisation de la cinétique enzymatique lorsque l'anticorps secondaire est lié à un anticorps primaire lui-même lié à un épitope doit aussi être faite. Tout d'abord, une expérience dans laquelle des cellules fixées ont été mis en présence du substrat chromogène a confirmée l'inactivation des PA endogènes (données non présentées) La figure 3.8 décrit donc la cinétique de développement de la réaction enzymatique dans le système d'immunodétection indirecte ELISA-BrdU optimisé. Cette cinétique a été faite dans les trois différentes plaques. L'avantage de la méthode ELISA-BrdU est que la détection du taux de prolifération des

hépatocytes se fait dans les puits où se fait la culture. Ainsi, dans toutes les expériences subséquentes où sont comparées les mesures prises dans des plaques de 24, 48 et 96 puits, aucun transfert de réactif n'a été fait. L'absorbance nette des hépatocytes traités avec ou sans EGF dans trois différentes plaques est illustrée à la figure 3.8-A à 3.8-C en fonction du temps de développement. Dans les trois types de plaque, la D.O. au départ ne passe pas par zéro. Dans les plaques de 96 puits (figure 3.8-A), le développement de la réaction est non linéaire pour les hépatocytes témoins mais est linéaire pour l'EGF avec une pente de 0,006 d'absorbance/h (figure 3.8-A). L'absorbance devient plus grande que zéro après 6 h de développement.

Pour les hépatocytes incubés avec de l'EGF et cultivés dans des plaques de 48 puits l'absorbance en fonction du temps de développement est plutôt de type polynomiale de deuxième ordre (figure 3.8-B). L'absorbance produite par le groupe témoin est linéaire ($r^2=0,998$) avec une pente de 0,003 d'absorbance/h. Pour les plaques de 24 puits, les hépatocytes témoins ($r^2=0,995$) et soumis à l'EGF ($r^2=0,999$) ont un schéma de développement linéaire en fonction du temps (3.8-C). Les pentes des hépatocytes témoins et EGF sont de 0,002 et 0,005 d'absorbance/h respectivement. Après 8 h de développement, les cellules traitées à l'EGF ont une absorbance plus grande dans les plaques de 48 puits ($0,198 \pm 0,015$) que dans les plaques de 24 puits ($0,048 \pm 0,003$) ou les plaques de 96 puits ($0,040 \pm 0,004$).

La durée de la réaction dans les plaques de 24 puits peut s'échelonner sur plus de 150 h sans atteindre de plateau (données non représentées). Selon les résultats des figures 3.7 et 3.8, on peut utiliser les trois catégories de plaques pour évaluer la prolifération cellulaire des hépatocytes par la méthode ELISA-BrdU. Les plaques de 24 puits avec une durée de développement de 4 h ont été retenues pour les expériences subséquentes.

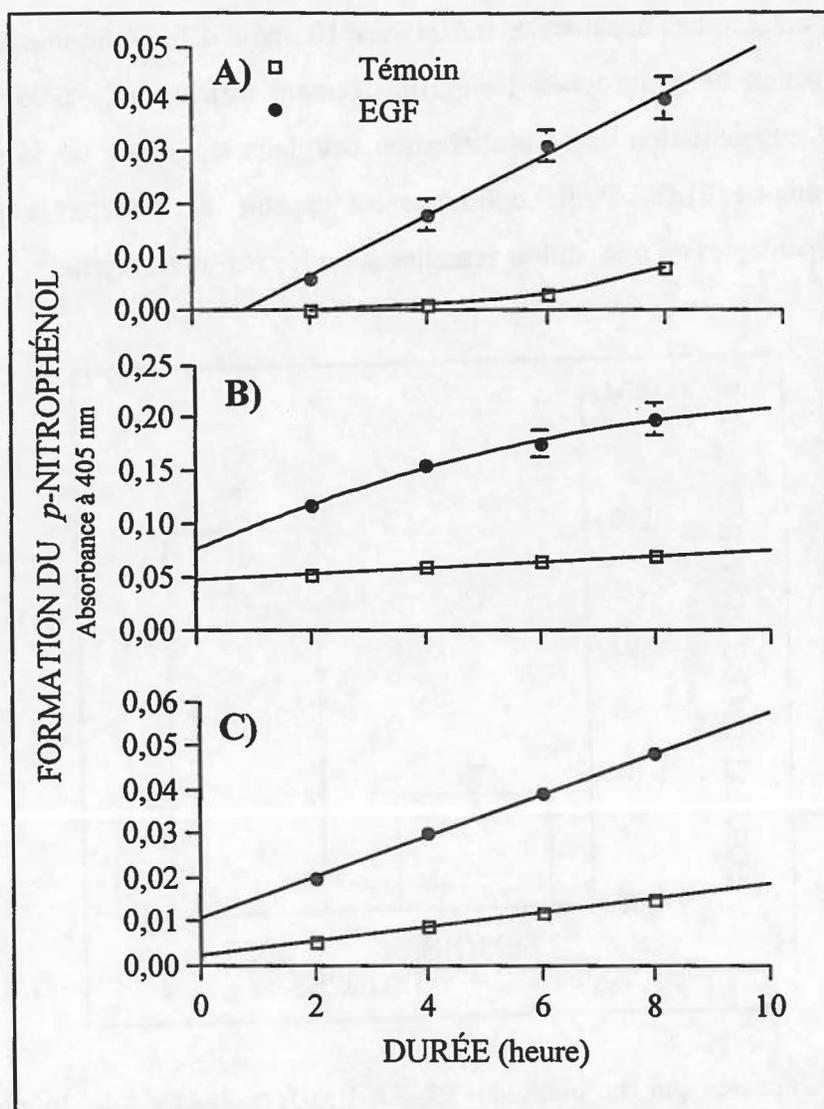


FIGURE 3.8 Comparaison de la formation du *p*-nitrophénol (absorbance nette à 405 nm) dans des plaques de (A) 96, (B) 48 ou (C) 24 puits, en fonction du temps, tel que mesuré par la méthode ELISA-BrdU. Les hépatocytes de rat femelle adulte ont été mis en présence ou en absence de 10 ng/ml d'EGF. Le BrdU et l'EGF ont été ajoutés au milieu de culture pendant 48 h et 72 h respectivement. Les hépatocytes témoins sont représentés par un carré (□) alors que les hépatocytes cultivés en présence de 10 ng/ml d'EGF sont représentés par un rond plein (●). Chaque point sur le graphique représente la moyenne \pm SEM pour 18 essais en (A) et (B) et pour 8 essais en (C).

3.2.6 L'évaluation de la méthode ELISA-BrdU optimisée

La figure 3.9 mesure la prolifération cellulaire d'hépatocytes de rats adultes femelles avec toutes les optimisations faites sur la méthode ELISA-BrdU dans les

sections 3.2.3 à 3.2.5. Les hépatocytes traités avec 10 ng/ml d'EGF ont une augmentation dans la production de *p*-nitrophénol significativement différente ($p < 0.05$) du témoin, indiquant une augmentation de la prolifération cellulaire de 321 ± 66 % (moyenne \pm SEM). La méthode ELISA-BrdU optimisée est capable de détecter la prolifération cellulaire d'hépatocytes de rats adultes femelles stimulée par un mitogène.

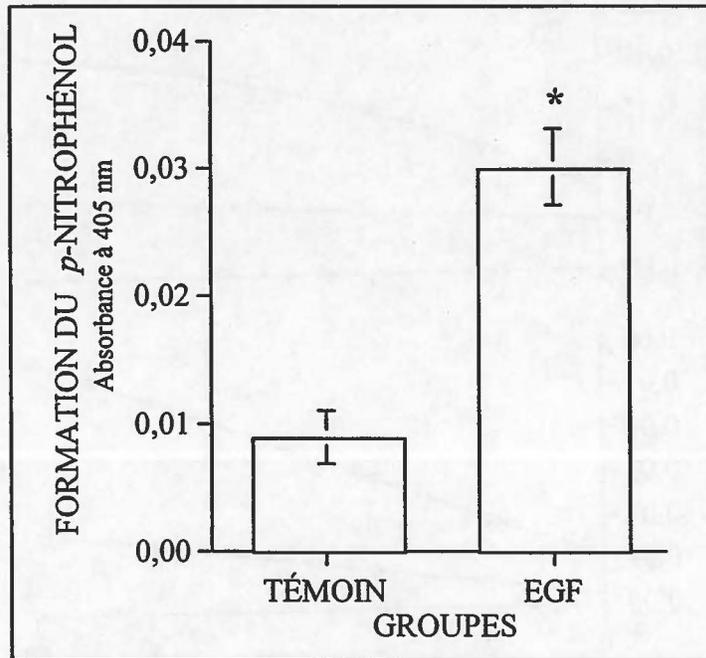


FIGURE 3.9 Mesure, par la méthode ELISA-BrdU optimisée, de la prolifération d'hépatocytes incubés avec (EGF) ou sans (témoin) 10 ng/ml d'EGF pendant 72 h. Le BrdU a été ajouté au milieu de culture pendant 48 h. Les résultats sont exprimés selon la formation du *p*-nitrophénol (absorbance nette à 405 nm). Chaque colonne est l'expression de la moyenne \pm SEM pour 8 essais. * indique une moyenne significativement plus grande ($p < 0.05$) du groupe témoin.

3.2.7 La comparaison de la méthode ELISA-BrdU à la méthode d'incorporation de [³H]-thymidine

Dans cette section nous allons comparer les conclusions obtenues à l'aide de la méthode ELISA-BrdU à celle de la méthode d'incorporation de la [³H]-thymidine. La

figure 3.10 compare deux méthodes de mesure de la prolifération cellulaire: la méthode ELISA-BrdU (3.10-A) et l'incorporation de [³H]-thymidine (3.10-B).

Pour chacune des deux méthodes de mesure, le traitement des cellules avec 10 ou 20 ng/ml d'EGF amène une augmentation significativement différente ($p < 0.05$) d'incorporation par rapport au témoin correspondant (sans EGF et sans HCB). Les hépatocytes traités avec de l'EGF (10 ng/ml) et de l'HCB (50 μ M) simultanément n'ont aucune augmentation significative ($p > 0.05$) de la prolifération cellulaire comparativement aux cellules traitées avec l'EGF 10 ng/ml seul sans l'ajout de 50 μ M d'HCB. Le groupe soumis à l'EGF (10 ng/ml) et l'HCB (50 μ M) simultanément a une réponse mitogène significativement plus grande ($p < 0.05$) du groupe incubé avec aucun agent possiblement mitogène (c-à-d sans EGF ou sans HCB). Ces conclusions sont identiques peu importe la méthode employée pour mesurer la réponse mitogène.

Les hépatocytes traités avec 20 ng/ml d'EGF ont une augmentation de la prolifération cellulaire significativement différente ($p < 0.05$) des cellules traitées avec 10 ng/ml d'EGF lorsque la mesure est faite avec la méthode ELISA-BrdU (figure 3.10 A). La prolifération cellulaire induite par 20 ng/ml d'EGF est de 57% supérieure à la réponse mitogène induite par la concentration de 10 ng/ml d'EGF. Lorsque la prolifération cellulaire est mesurée par la méthode d'incorporation de [³H]-thymidine (figure 3.10-B), aucune différence significative ($p > 0.05$) n'est notée entre les hépatocytes soumis à 10 ou 20 ng/ml d'EGF.

La figure 3.10 montre que la variation sur la mesure de la moyenne est beaucoup plus grande pour la méthode d'incorporation de la radioactivité (représente $\pm 30\%$ de la moyenne) que la variation produite par la méthode ELISA-BrdU (représente $\pm 10\%$ de la moyenne).

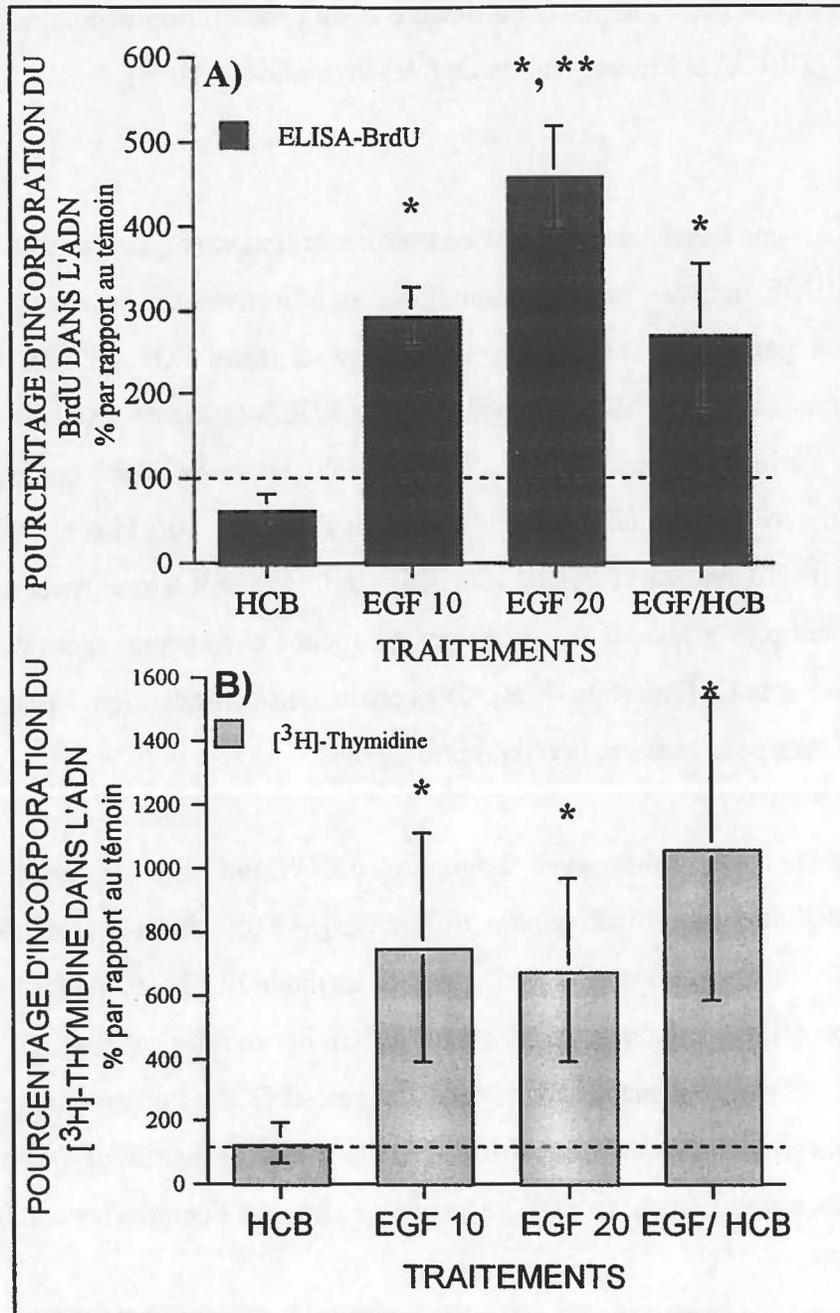


FIGURE 3.10 Comparaison de la prolifération cellulaire mesurée par (A) la méthode ELISA-BrdU ou (B) la méthode d'incorporation de [³H]-thymidine. Les hépatocytes de rat ont été traités avec 50 μ M d'HCB (HCB), 10 ng/ml EGF (EGF 10), 20 ng/ml d'EGF (EGF 20) ou 10 ng/ml d'EGF + 50 μ M d'HCB (EGF/HCB). L'exposition à l'EGF et au HCB s'est faite pendant 72 h tandis que l'incubation avec le BrdU ou le [³H]-thymidine s'est faite pendant 48 h. Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM pour 6 essais. * indique un groupe traité significativement différent ($p < 0.05$) du témoin correspondant (sans ou avec EGF). ** indique un groupe traité significativement différent ($p < 0.05$) du groupe traité avec de l'EGF à une concentration de 10 ng/ml.

3.3 L'évaluation du potentiel mitogène de l'HCB et de certains stéroïdes sexuels

3.3.1 L'HCB et l'EGF

Nous avons évalué si l'HCB était un mitogène. La figure 3.10 permet d'observer que le traitement des hépatocytes avec 50 μ M d'HCB n'apporte pas de modification significative par rapport au groupe témoin (sans EGF et HCB) peu importe le méthode de mesure de la prolifération cellulaire employée. Comme nous l'avons observé à la section 3.2.7, la figure 3.10-A et la figure 3.10-B montre que l'HCB n'est pas un co-mitogène de l'EGF puisque l'ajout d'HCB à 10 ng/ml d'EGF n'augmente pas significativement la prolifération cellulaire produit par le mitogène seul. La méthode d'incorporation de [3 H]-thymidine décrit une augmentation de la prolifération cellulaire (la moyenne passe de 751 % à 1054%) mais cette augmentation n'est cependant pas significative dû à la très grande variation sur la mesure.

Les mesures subséquentes de prolifération chez les hépatocytes primaires de rats femelles en monocouche présentées dans ce mémoire ont été faites par la méthode d'intégration de la thymidine tritiée quantifié par scintillation. Cette méthode est utilisée puisque ces travaux ont été fait en même temps que le développement de la méthode ELISA-BrdU. Comme nous venons de le démontré, l'utilisation des deux méthodes (ELISA-BrdU et [3 H]-thymidine) résulte en des conclusions identiques.

3.3.2 L'HCB et les estrogènes

Nous avons voulu évaluer l'effet de certains estrogènes sur la prolifération cellulaire avec ou sans l'ajout d'HCB. La figure 3.11 montre que l'ajout de 0,25 nM d'estradiol avec ou sans la présence d'HCB ne modifie pas la prolifération cellulaire. Cette concentration d'estradiol est la plus grande concentration retrouvée dans le plasma de rat femelle durant le cycle estral (Smith *et al.*, 1975). Pour sa part, l'estrone amène une augmentation significative ($p < 0.05$) de la prolifération des hépatocytes. L'ajout de 50 μ M d'HCB à l'estrone amène une diminution significative de la prolifération induite par

l'estrone seul. Le taux d'incorporation est 5 fois plus petit en présence de l'estrone et de l'HCB qu'avec l'estrone seul.

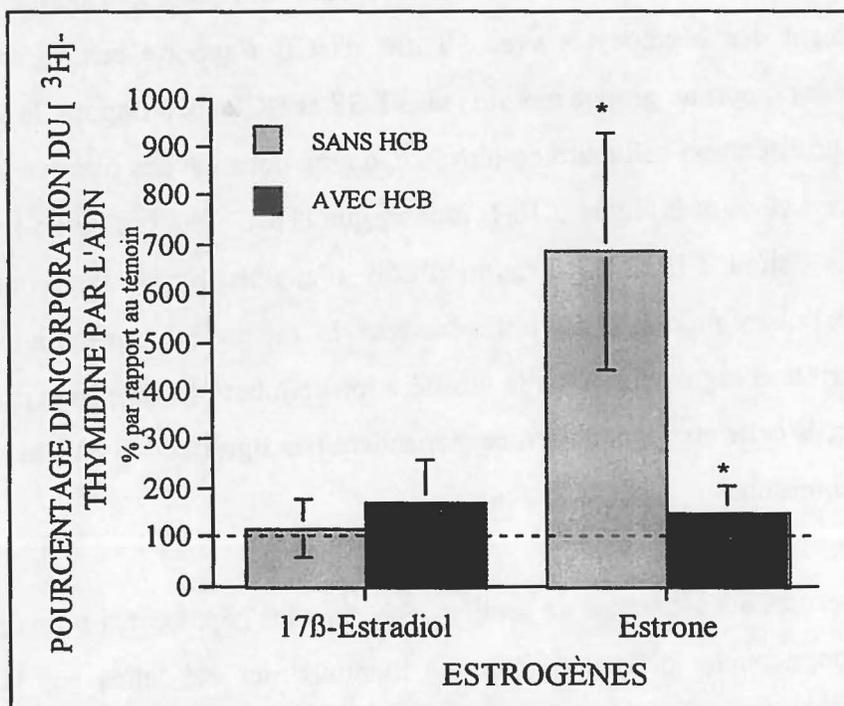


FIGURE 3.11 Influence de l'incubation, de 0,25 nM de 17β-estradiol ou de 1 nM d'estrone sur la prolifération cellulaire d'hépatocytes traités avec ou sans 50 μM d'HCB. Les estrogènes et l'HCB ont été ajoutés au milieu de culture pendant 72 h tandis que l'exposition des cellules au $[^3\text{H}]$ -thymidine s'est faite pendant 48 h. Les hépatocytes non-traités avec l'HCB sont représentés par une colonne grise pâle (□) et les hépatocytes traités avec 50 μM d'HCB sont représentés par une colonne grise foncée (■). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM pour 6 essais. * indique une différence significativement ($p < 0.05$) entre un groupe traité et son témoin correspondant.

3.3.3 L'HCB et les β -androgènes

Selon la littérature, une modulation par l'HCB du métabolisme des androgènes serait une des voies par laquelle l'HCB pourrait induire ses effets au niveau hépatique (Graef *et al.* 1979 et 1982).

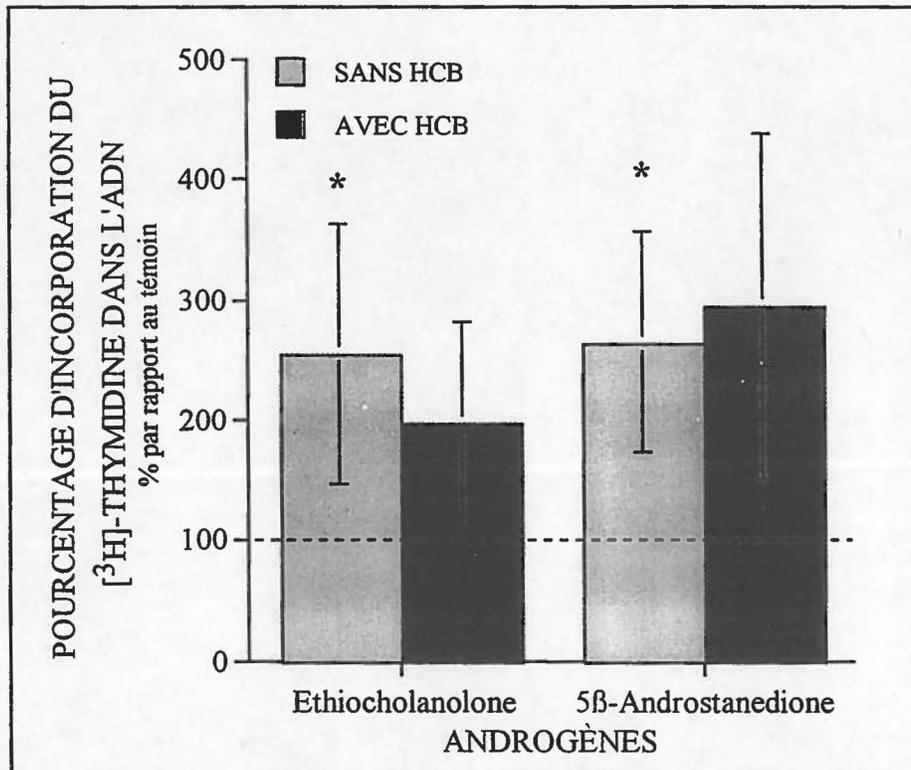


FIGURE 3.12 Influence de 1 nM d'éthiocholanolone ou de 1 nM de 5 β -androstanedione sur la prolifération d'hépatocytes traités avec ou sans 50 μ M d'HCB. Les androgènes et l'HCB ont été ajoutés au milieu de culture pendant 72 h tandis que l'exposition des cellules au [3 H]-thymidine s'est faite pendant 48 h. Les hépatocytes non-traités avec l'HCB sont représentés par une colonne grise pâle (□) et les hépatocytes traités avec 50 μ M d'HCB sont représentés par une colonne grise foncée (■). Chaque colonne est exprimée selon la moyenne \pm SEM pour 6 essais. * indique un groupe traité est significativement différent ($p < 0.05$) du témoin correspondant.

La figure 3.12 montre que l'ajout de 1 nM d'éthiocholanolone ou de 5 β -androstanedione à des hépatocytes de rat provoque une augmentation de la prolifération cellulaire significativement ($p < 0,05$) différente de celle des hépatocytes témoins (sans androgène).

Cependant, l'ajout simultané d'HCB et d'éthiocholanolone ou de 5β -androstanedione ne modifie pas de façon significative le pouvoir mitogène de ces derniers.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Le mécanisme moléculaire par lequel l'HCB induit son effet hépatocancérogène est inconnu. Une des hypothèses étudiée dans ce mémoire est de savoir si l'HCB induit cet effet hépatocancérogène en augmentant la prolifération des hépatocytes. Après s'être assuré que les hépatocytes utilisés rencontraient les critères de viabilité et de fonctionnalité désirés, nous avons développé une méthode de mesure de la prolifération cellulaire adaptée aux hépatocytes primaires en monocouche. Enfin, nous avons évalué l'activité mitogène de l'HCB en présence ou en absence de l'agent mitogène qu'est l'EGF, des estrogènes ou des androgènes. Ainsi, la discussion sera sous divisée en trois sections. La première partie présentera la discussion sur le système cellulaire, la deuxième sur la mise au point d'une méthode de mesure de la prolifération cellulaire et enfin, dans la troisième partie nous discuterons des résultats obtenus lors de la mesure de l'activité mitogénique de l'HCB.

4.1 La viabilité et qualité de la préparation d'hépatocytes

Il a été démontré que les hépatocytes de rat, isolés par traitement à la collagénase constituaient un modèle valable pour étudier le métabolisme du foie ainsi que les effets que les cancérogènes chimiques peuvent avoir sur cet organe (Berry et Friend, 1969; Bonney *et al.*, 1974; Howard *et al.*, 1967; Seglen, 1973). Néanmoins, l'isolement des hépatocytes amènent le risque d'endommager les cellules, d'altérer la réponse cellulaire, et de donner des résultats incomplets, variables ou erronés. Plusieurs chercheurs utilisant les hépatocytes reconnaissent qu'un taux critique de viabilité de 85% doit être visé, puisqu'un taux plus faible peut réduire la sensibilité des hépatocytes face aux mitogènes (Maier et Schawalder, 1993) et qu'il peut indiquer un endommagement général des hépatocytes (Berry *et al.*, 1991).

Ainsi, dès le départ de ces études toxicologiques nous nous sommes assurés de la viabilité et de la reproductibilité de la préparation d'hépatocytes isolés chez le rat femelle. Nos expériences ont démontré que la viabilité de la préparation cellulaire est plus élevée lorsque la préparation d'hépatocytes est enrichie par une centrifugation dans un milieu percoll. L'amélioration du pourcentage de viabilité de la préparation cellulaire (15% d'amélioration soit de 77 à 92%) est de la même grandeur que les valeurs obtenues par Kreamer *et al.* (1986). Cette équipe a utilisé quatre méthodes d'isolement des hépatocytes: celle de Berry et Friends (1969) telle que modifiée par Hsia *et al.* (1983), Sawada et Toukada, (1982) ou Michalopoulos et Pitot (1975), de même que celle de Bonney *et al.* (1974), telle que modifiée par Kreamer *et al.* (1986). Dans les quatre cas, l'utilisation du percoll a amené une augmentation respective de 9, 7, 15 et 19 % du nombre de cellules parenchymateuses viables.

La moyenne de viabilité des hépatocytes suite à leur isolement à l'aide de chacune des quatre méthodes de préparation décrites au paragraphe précédent est de 98 %. Cette valeur est supérieure de 5 % au pourcentage de viabilité obtenu dans notre étude ($92 \pm 0,6$ %). Cette différence peut être expliquée par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la méthode de base qui a été utilisée pour l'isolement des hépatocytes est différente. Chaque méthode possède différentes variables. La concentration de calcium ajouté au milieu et l'oxygénation du milieu lors de la perfusion sont des facteurs qui varient d'une méthode d'isolement à l'autre et qui affectent la viabilité et le rendement de la préparation d'hépatocytes (Berry *et al.*, 1991). Deuxièmement, le milieu de culture employé par Kreamer *et al.* (1986) est le Leibovitz L-15 tandis que dans notre étude le milieu était le Williams' E. La concentration de plusieurs nutriments dont les acides aminés, est différente entre ces deux milieux (Leibovitz, 1963; William et Gunn, 1974). Selon certains auteurs (Dickson et Pogson, 1977; Schwarze *et al.*, 1982), les cellules survivent mieux après l'isolation dans un milieu complexe car les acides aminés contribuent à préserver l'équilibre en azote et leur présence permet de conserver les propriétés biochimiques des hépatocytes (Berry *et al.*, 1991). La variation du milieu peut donc affecter la viabilité obtenues lors de l'isolement des hépatocytes. Troisièmement, la concentration d'hépatocytes mis en suspension dans le milieu percoll était de $5-10 \times 10^6$

cellules/cm² de matrice d'ensemencement comparativement à 15-20 x 10⁷ cellules/cm² de matrice d'ensemencement dans notre étude. L'augmentation de la concentration de cellules mis en suspension peut diminuer l'efficacité du milieu percoll à séparer les cellules viables des cellules non-viables ou non-parenchymateuses.

Les études effectuées dans le cadre de ce mémoire ont également démontré que le pourcentage de viabilité de la préparation cellulaire est plus constant lorsque la préparation d'hépatocytes viables est enrichie à l'aide du percoll. L'écart séparant la plus petite de la plus grande valeur de viabilité est de 17 et 6 % pour les approches sans et avec percoll respectivement. À l'instar de cette observation une étude de Kreamer *et al.* (1986) a montré que lorsque l'isolement des hépatocytes a été fait selon la méthode de Bonney *et al.* (1974) n'employant pas le percoll, l'écart entre la plus petite et la plus grande valeur était de 16 %, tandis que lorsqu'un enrichissement des cellules parenchymateuses viables était fait, l'écart était de seulement 2%.

La méthode d'enrichissement des hépatocytes que nous avons utilisée permet de séparer les cellules parenchymateuses viables et non agrégées des cellules agrégées, des débris cellulaires et des cellules non-parenchymateuses (Kreamer *et al.*, 1986). Contrairement aux autres méthodes d'enrichissement plus anciennes (Sumner et Freedman, 1983; Drochmans et al., 1975; Rojkind et al., 1974), cette méthode permet d'enregistrer un bon rendement, le temps de préparation des hépatocytes est court et la technique est simple. Tous ces avantages nous ont amenés à utiliser la procédure d'enrichissement des hépatocytes par la méthode de Kreamer *et al.* (1986), telle que modifiée dans la section 2.2.3 de ce mémoire, afin d'obtenir une suspension d'hépatocytes homogènes avec un haut niveau de viabilité et ce, à chacune des perfusions effectuées.

Bien que lors du développement d'un système cellulaire *in vitro*, la conservation de la viabilité n'est pas trop problématique, il peut en être tout autrement concernant le maintien de leur fonctionnalité. Cette dernière varie fortement d'un type de système à l'autre. La procédure d'enrichissement suivie dans ce mémoire est, comme nous venons

de le voir, une modification de la méthode décrite par Kreamer *et al.* (1986). Selon cet auteur, la préparation cellulaire est supérieure selon plusieurs critères, dont plusieurs touchent l'aspect fonctionnel des hépatocytes: 1) la viabilité initiale, 2) l'homogénéité de la préparation, 3) le maintien de la morphologie cellulaire, 4) l'intégrité des cytochrome P450, 5) une bonne réponse hormonale (mesurée par l'induction de la tyrosine aminotransférase après avoir traités les hépatocytes au glucagon et/ou au dexaméthasone), 6) l'intégrité de la membrane plasmique, mesurée selon le pourcentage d'exclusion du bleu de Trypan et le relargage de l'aspartate aminotransférase, puis enfin 7) le maintien de la capacité de réparer les dommages causés à l'ADN suite au traitement des cellules avec le benzo[a]pyrène et le 2-acétylaminofluorène.

Nos résultats semblent corroborer les observations rapportées par Kreamer et son équipe (1986). Selon cette équipe, l'intégrité de la membrane plasmique est supérieure pour les hépatocytes isolés avec le percoll. Dans notre étude, la mesure du relargage de la LDH a permis de constater que l'intégrité de la membrane est meilleure pour les cellules enrichies avec le percoll que pour les cellules non enrichies au percoll (figure 3.1-A). Par ailleurs plusieurs chercheurs qui ont utilisé un gradient, et non une concentration unique de percoll pour obtenir une préparation de cellules parenchymateuses enrichies, ont démontré que les préparations d'hépatocytes obtenues étaient supérieures aux suspensions cellulaires non enrichies (Dalet *et al.*, 1982; Pertoft *et al.*, 1977; Singh *et al.*, 1983; Tonda *et al.*, 1983, Kreamer *et al.*, 1986).

Le fait que les cellules parenchymateuses soient exemptes de la plupart des débris cellulaires laissés par les cellules mortes permet d'éliminer plusieurs inconvénients, puisque la présence de fragments de la membrane plasmique a été démontrée comme étant un élément affectant d'une part, les réponses régulatrices qui sont fonction de la densité cellulaire (telle que la synthèse d'ADN) et d'autre part, les fonctions spécifiques aux hépatocytes telle que l'induction de la tyrosine aminotransférase (Nakamura *et al.*, 1983). Des facteurs cytosoliques (tels que les enzymes protéolytiques) relargués dans le milieu par les cellules endommagées peuvent à leur tour endommager la membrane plasmique et les récepteurs protéiques (tel les récepteurs hormonaux des cellules viables).

Un autre moyen d'évaluer l'état fonctionnel des hépatocytes isolés, est de mesurer la concentration protéique intra- et extra-cellulaire, c'est-à-dire la concentration protéique totale (Berry *et al.*, 1991). Lors de la comparaison de la concentration en protéines dans la préparation d'hépatocytes enrichie, la quantité de protéines intra- et extra-cellulaires est plus faible comparativement aux préparations d'hépatocytes non enrichies (figure 3.1). De plus, quel que soit la concentration d'HCB dans le milieu, la concentration protéique des hépatocytes enrichis avec le percoll est constante et ne varie pas significativement du témoin. La méthode utilisant le percoll permet d'ajouter une étape supplémentaire pour éliminer les débris cellulaire et surtout d'éliminer les hépatocytes morts et les cellules non-parenchymateuses. La préparation contient donc une concentration de protéines plus constante comparativement à la préparation d'hépatocytes non enrichie.

Pour la préparation d'hépatocytes non purifiée à l'aide du percoll, seul le traitement des cellules avec 20 μ M d'HCB amène une augmentation significative du contenu en protéines, augmentation retrouvée autant dans le milieu de culture que dans les cellules (données non publiées). C'est aussi la seule concentration d'HCB qui n'a pas produit d'augmentation significative de la LDH comparativement au témoin (figure 3.1). L'activité spécifique de la LDH (U/mg de protéines/min) s'obtient en divisant l'activité de la LDH par le contenu protéique intra- et extra-cellulaire du Pétri examiné. Ainsi, l'activité de la LDH mesurée pour les hépatocytes traités avec 20 μ M d'HCB a été divisée par une concentration protéique beaucoup plus grande comparativement aux autres traitements, causant une diminution de l'activité spécifique pour ce groupe traité.

L'optimisation de la méthode d'isolation des hépatocytes a permis de s'assurer d'atteindre un taux de viabilité critique pour des études toxicologiques de qualité. Ainsi, cette optimisation permet de s'assurer que les variations chez les mesures faites sur les hépatocytes sont dues aux traitements appliqués et qu'elles ne sont pas dues à la variation de la qualité de la préparation cellulaire. Le principal objectif de ce mémoire était de déterminer la mitogenèse de l'HCB. La mesure de la cytotoxicité de l'HCB, les mesures du relargage de la LDH et de la concentration protéique, a pour unique but de déterminer

les doses non cytotoxiques pouvant être utilisées afin d'étudier l'effet mitogène. Sur la base d'une relation dose-effet linéaire il n'y avait pas lieu de tester des concentrations d'HCB inférieure à 50 μM puisque cette dernière n'est pas mitogène.

4.2 Le développement d'une méthode améliorée de mesure de la prolifération cellulaire

La revue de la littérature présentée au chapitre 1 a démontré le besoin de la mise au point d'une méthode de mesure de la prolifération cellulaire répondant aux besoins spécifiques des hépatocytes en culture. Saad *et al* (1993) ont mis au point une méthode de quantification de l'albumine sécrétée par des hépatocytes. Le protocole utilisé pour faire ce dosage a inspiré la création de la méthode ELISA-BrdU initiale telle que décrite à la section 2.5.4. Lorsque mesurée à l'aide de cette méthode ELISA-BrdU, les hépatocytes traités avec l'EGF, un mitogène reconnu (Michalopoulos, 1990; Parzefall *et al.*, 1985; Gebhardt et Jonitza, 1991) ont montré une faible augmentation non statistiquement significative ($p > 0.05$) de la prolifération cellulaire (environ 1.25 fois). Ces premiers résultats nous ont permis de prendre conscience qu'une optimisation de la méthode était nécessaire. En effet, lorsque la prolifération des hépatocytes est mesurée selon le pourcentage d'incorporation de thymidine tritiée, Parzefall et son équipe (1996) ont noté une augmentation de 3.6 fois de la prolifération cellulaire. Stolz et Michalopoulos (1994) ont pour leur part noté une augmentation d'environ quatre fois de la prolifération cellulaire par rapport au témoin. Dans ces deux études, la mitogenèse était provoquée par le traitement des hépatocytes avec 20 ng/ml d'EGF, une concentration plus faible que celle que nous avons utilisée (50 et 100 ng/ml).

Les modifications successives apportées à la méthode ELISA-BrdU de base sont résumées dans le tableau 4.1.

TABLEAU 4.1 Résumé des modifications apportées à la méthode ELISA-BrdU de base (section 2.5.4) en vue de son optimisation.

Facteurs	Méthode de base	Méthode optimisée
Type de plaque multipuits	96 puits	24, 48 et 96 puits
Solvant pour la fixation	Éthanol 70%	50% acétone/50% méthanol
Tampon	P.B.S.	T.B.S.
Bloqueur des sites non-spécifiques	B.S.A.	Sérum de cheval
Durée des réactions immunologiques	30 minutes à 25°C	18 h à 4°C
Dilution de l'anticorps secondaire	1:500	1:250
Durée de développement de la réaction colorimétrique	variable	4 heures

Selon Shalev *et al.* (1980) trois facteurs ont un effet important sur la sensibilité des essais d'immunodétection: 1) la méthode de détection de l'enzyme liée à l'anticorps secondaire, 2) la durée d'incubation du substrat avec l'enzyme, et 3) l'aire de la surface à laquelle l'épitope est lié. Pour mettre au point la nouvelle méthode, nous avons d'abord commencé par caractériser et optimiser la réaction enzymatique catalysée par la PA couplée à l'anticorps secondaire. Un agent, tel qu'une solution alcaline forte, peut-être utilisé pour arrêter la réaction enzymatique (Nadeau *et al.*, 1981). Par ailleurs cet agent qui génère un pH final ≥ 11 favorise la détermination du chromophore *p*-nitrophénol libéré, ce qui augmente la sensibilité de l'essai. Dans la mise au point du protocole ELISA-BrdU, aucun agent d'arrêt a été utilisé afin de pouvoir réaliser des dosages sériés pour de déterminer le temps de développement idéal. Bien que notre méthode permette de mesurer efficacement l'incorporation de BrdU, l'utilisation d'un agent d'arrêt pourrait augmenter la sensibilité de la méthode.

Les expériences de transformation (figure 3.3) faites à l'aide de l'anticorps secondaire ont permis de démontrer que la réaction est linéaire pendant quatre heures à 25°C mais que cette linéarité est perdue à 37°C. Comme le rapporte le producteur de cet anticorps couplé (Pierce, 1994 et 1995), la linéarité de la réaction se conserve pendant 28 heures à 25°C. De plus, la sensibilité de la réaction augmente en prolongeant le temps accordé pour que la réaction se développe. Une autre façon d'optimiser le signal émis, c'est-à-dire la lecture de l'absorbance à 405 nm du *p*-nitrophénol issu de la transformation du substrat 4-nitrophénylphosphate (4-NPP) par la phosphatase alcaline (PA), est d'augmenter la concentration enzymatique. Une courbe dose-réponse (figure 3.4) de l'anticorps secondaire a permis de démontrer que l'accroissement de la concentration en enzyme permet d'augmenter le signal émis mais qu'à une trop forte concentration (1:1000), et en utilisant une durée de développement supérieure à 4 heures, la linéarité de la réaction est perdue. Cette perte de linéarité peut être due à un manque de substrat pour l'enzyme puisque la PA est reconnue pour la linéarité de sa réaction.

Le deuxième facteur à améliorer pour optimiser la méthode ELISA-BrdU était l'augmentation de la quantité d'antigène (BrdU) liée à la plaque ELISA. Rappelons que la méthode repose sur le principe que le signal dépend du degré d'incorporation du BrdU à l'ADN et qu'il faut s'assurer que l'anti-BrdU puisse se lier aux sites où le BrdU a été incorporé. Pour ce faire, deux solvants organiques courant ont été utilisés pour perméabiliser les cellules, soit l'éthanol 70% et une préparation fraîche de 50 % acétone et de 50 % méthanol (Gerlyng *et al.*, 1992; Mossin *et al.*, 1994). Aucune différence significative n'a pu être détectée entre ces deux méthodes (figure 3.5-A). Ce résultat n'est pas surprenant puisque même si deux types de solvant ont été utilisés, les deux fixent les cellules en enlevant les lipides et en déhydratant la cellule tout en précipitant les protéines dans l'architecture cellulaire. Essayer un deuxième type d'agent fixatif, tel que les *cross-linking reagents* (formaldéhyde, glutaraldéhyde, etc.) aurait peut-être permis d'observer des résultats différents. Ce type d'agent agit en créant des ponts intermoléculaires avec les groupes amino libres, créant ainsi un réseau d'antigènes liés. Néanmoins, ce réseau a le désavantage de parfois masquer ou de changer certains épitopes (Arlow et Lane, 1988),

c'est pourquoi nous avons choisi de nous attarder seulement à l'utilisation des solvants comme agent fixatif .

Pour améliorer le signal émis lors de la lecture de l'absorbance du *p*-nitrophénol issu de la transformation du 4-NPP par la PA, provenant des cellules en croissance ayant intégré le BrdU, nous avons essayé d'augmenter la présence de l'anticorps secondaire, afin d'augmenter l'avidité du complexe anticorps primaire/anticorps secondaire (figure 3.5-A). Une augmentation dans l'absorption du *p*-nitrophénol a été observée lorsqu'une concentration plus grande (1:250) de l'anticorps secondaire a été utilisée, ainsi que lorsque le solvant de fixation employé est la préparation de 50 % acétone et de 50 % méthanol. Ensuite, nous avons cherché à optimiser l'activité de l'enzyme (encore une fois pour améliorer le signal émis) en modifiant le tampon dans lequel l'enzyme agit (figure 3.5-A). Les expériences ont démontré que l'absorbance du *p*-nitrophénol à 405 nm est deux fois plus grande lorsque le tampon T.B.S. est utilisé comparativement au tampon P.B.S. Même si certains chercheurs utilisent le tampon P.B.S. comme tampon de lavage et/ou de diluant pour les anticorps, son utilisation est à déconseiller puisque les ions phosphates participeraient à une réaction de compétition au niveau du site actif de l'enzyme (Cohen, 1970, Shalev *et al.*, 1980). De plus, le Tris (qui compose le tampon T.B.S.) a l'avantage d'être un bon accepteur d'ions phosphates, ce qui permet d'augmenter la dissociation du phosphate inorganique de l'enzyme (Trentham et Gutfreund, 1968) et ainsi favorise l'activité enzymatique.

Un autre point important à vérifier lors de la mise au point d'une méthode d'immunodétection est le blocage des sites non-spécifiques (figure 3.6-A). Ce blocage peut se faire par le biais de solutions protéiques ou de détergents. Nous avons déterminé qu'une solution constituée de 10% de sérum de cheval dans du T.B.S. ou une solution faite de T.B.S. et de 10% de lait en poudre avec ou sans tween 80 bloquait plus efficacement les sites non-spécifiques que le tween 80 ou le BSA. Bien que le lait, avec ou sans tween 80, semble mieux bloquer les sites non-spécifiques comparativement au sérum de cheval, ce dernier a été choisi puisque le lait peut inhiber la phosphatase alcaline due à la présence de phosphate inorganique (Shalev *et al.*, 1980). Lorsque le sérum de

cheval a été employé comme agent bloquant et que toutes les optimisations précédentes sont appliquées (figure 3.6-B), la méthode ELISA-BrdU a permis de détecter une augmentation significative (comparativement au témoin) de la prolifération des hépatocytes traités avec 25 et 50 ng/ml d'EGF. Dans les expériences négatives précédentes, l'agent bloquant employé était le BSA. Avec cet agent, une absorbance (de $0,25 \pm 0,05$) a été détectée par le méthode de base même si les cellules n'avaient pas été cultivées avec du BrdU. Cette observation est susceptible d'expliquer pourquoi aucune augmentation significative de la prolifération des hépatocytes comparativement aux témoins n'avait pu être détectée par la méthode initiale ELISA-BrdU chez des cellules exposées à l'EGF: Les anticorps se liaient de façon non-spécifique sur plusieurs sites (de la membrane plasmique ou autre) ne permettant pas de dégager le signal positif émis par les cellules en prolifération comparativement au bruit de fond trop élevé émis par les liaisons non-spécifiques.

Pour optimiser la liaison des anticorps avec leur épitope respectif, ces derniers ont été incubées plus longtemps (16 heures de plus) comparativement à ce qui était fait dans la méthode de base (voir section 2.5.4). La sensibilité de la détection a ainsi été accrue.

Pour répondre au troisième critère (c'est-à-dire l'augmentation de l'aire de la surface réactionnelle) servant à améliorer la sensibilité de la méthode d'immunodétection, des plaques de 96, 48 et 24 puits ont été utilisées. Les puits ont une surface de 0.28, 1.0 et 2.0 cm², respectivement. Nos travaux ont démontré que peu importe le diamètre des puits, le taux de prolifération cellulaire chez les groupes traités à l'EGF est significativement différent du témoin mais n'est pas différent entre chacune des plaques (figure 3.7). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Shalev et son équipe (1980) puisque cette équipe a noté qu'en augmentant la surface de liaison de l'antigène de 4 fois, la sensibilité de la méthode de détection était améliorée de 1000 fois. Cette différence avec nos résultats peut être due au fait que cette équipe a utilisé des billes de verre comme surface de contact et que le système cellulaire employé est différent (cellules tumorales P815X2 (*mastocytoma* de souris)). Lorsque la prolifération des hépatocytes (traités à l'EGF) dans des plaques de 24, 48 et 96 puits est comparée, la seule différence rencontrée demeure la variation inter-

puits. Cette variation est plus grande dans les plaques de 96 puits comparativement aux plaques de 24 et 48 puits. Ce point est important puisqu'une méthode avec une grande variation peut compromettre la détection d'un taux de prolifération cellulaire dont la différence avec le groupe témoin est minime. Aussi, l'avantage du grand nombre de traitements simultanés que permet la plaque de 96 puits est perdu en raison du plus grand nombre de puits d'un même groupe qui doivent être effectués pour réduire la variabilité. À notre connaissance, aucune étude traitant de la différence de prolifération des hépatocytes en fonction de l'augmentation de l'aire de la surface d'incubation de la réaction immunologique n'a été effectuée pour les hépatocytes primaires en monocouche.

Précédemment, les expériences effectuées à l'aide de plaques de 96 puits ont permis de constater que plus la concentration de l'anticorps secondaire est augmentée, plus le signal émis est fort, mais qu'à fortes concentrations la linéarité de la réaction est perdue. Pour chacun des types de plaques (24, 48 et 96 puits) dans lesquelles s'effectuent la mesure de la prolifération cellulaire, la linéarité de la réaction a été vérifiée (figure 3.8). On remarque que pour les trois types de plaque la D.O. au départ ne passe pas par zéro, la lecture initiale était due au tapis cellulaire. La réaction qui est mesurée dans les plaques de 24 puits a démontré une linéarité (de 2 à 8 heures) pour les cellules traitées avec ou sans EGF, tandis que dans les plaques de 48 ou 96 puits la réaction enzymatique n'est pas linéaire.

Les hépatocytes sont attachés aux plaques multipuits grâce à l'application d'une fine couche de collagène. Ce substrat d'attachement semble avoir une influence majeure sur la préservation des fonctions spécifiques du foie et probablement sur la croissance ou la capacité des cellules à se propager sur ce substrat d'attachement (Sawada *et al.*, 1986; Berry *et al.*, 1991). L'attachement des cellules sur un film de collagène dépend du volume de la préparation initiale de cellules utilisées (Williams *et al.*, 1977), c'est-à-dire que plus le volume est grand, plus les cellules vont s'attacher et ce, même si les deux volumes contiennent la même concentration de cellules. Ceci permet d'expliquer la meilleure linéarité et la meilleure stabilité obtenue dans les plaques de 24 puits (500 μ l) comparativement aux plaques de 48 (300 μ l) et 96 puits (100 μ l). De plus, Bissel et son

équipe (1986) ont démontré que l'étalement des cellules, tel que rencontré lors de la prolifération cellulaire, requiert une plus grande concentration de matrice protéique par surface comparativement aux conditions nécessaires pour l'attachement de ces même cellules. Les plaques de 24 puits ont une surface plus grande ce qui permet un meilleur attachement mais surtout un meilleur étalement des cellules lors de la croissance cellulaire (Bissel *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1977). Tout ces facteurs permettent d'expliquer les meilleurs résultats obtenus dans les plaques de 24 puits.

Grâce aux améliorations apportées à la méthode ELISA-BrdU de base, une hausse significative ($p < 0.05$) de la prolifération des hépatocytes soumis à 10 ng/ml d'EGF a pu être détectée par comparaison avec les hépatocytes témoins (figure 3.9). Rappelons que la méthode initiale n'enregistrait aucune hausse de prolifération lors du traitement des hépatocytes avec 50 ou 100 ng/ml d'EGF (figure 3.2). La hausse (3,2 fois) du taux de prolifération cellulaire mesurée par la méthode optimisée chez le groupe exposé à l'EGF (10 ng/ml) est comparable aux hausses observées par différentes équipes. En effet, les augmentations de prolifération chez des hépatocytes soumis à 20, 50 et 50 ng/ml d'EGF était de 3.6 et environ 4 fois et 4.5 fois plus grande que leur témoin respectif (Parzefall *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1994; Stolz et Michalopoulos, 1994). Dans les trois cas, la mesure de la prolifération cellulaire s'est faite par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée. La variation des résultats obtenus à l'aide de la méthode ELISA-BrdU et ceux obtenus par les trois équipes mentionnées plus tôt peut être expliquée par divers facteurs. Tout d'abord, les concentrations d'EGF employées sont différentes. Dans le cas de Peterson *et al.* (1994), l'ADN n'est pas isolé comparativement à notre méthode et le milieu de culture employé est différent du notre. Pour sa part, Parzefall et son équipe (1996) ont supplémenté le milieu de culture avec 150 mM d'acide ascorbique. Le rôle de cet agent est encore mal connu mais il aurait un rôle dans le maintien des fonctions spécifiques aux hépatocytes (Berry *et al.*, 1991).

La méthode la plus employée pour mesurer la prolifération cellulaire est l'incorporation de [³H]-thymidine quantifiée par scintillation (Lanier *et al.*, 1989). Dans notre étude, lorsque les résultats de prolifération cellulaire obtenus par la méthode

optimisée ELISA-BrdU sont comparés à ceux obtenus par la méthode d'incorporation de la [³H]-thymidine, les conclusions retirées sont les mêmes. Le pourcentage d'augmentation de la prolifération cellulaire, mesurée par la méthode d'incorporation de la thymidine tritiée est plus grand mais les écarts types sont cependant aussi plus grands que pour la méthode ELISA-BrdU. Une différence importante est obtenue lorsque la sensibilité des deux méthodes est comparés. La méthode ELISA-BrdU semble plus sensible: lorsque nous avons soumis des hépatocytes à 10 et 20 ng/ml d'EGF et que la mesure de la prolifération cellulaire a été faite par la mesure de thymidine tritiée incorporée, aucune différence de prolifération cellulaire n'a été détectée entre les deux concentrations d'EGF, alors que la prolifération des hépatocytes induite par 20 ng/ml d'EGF, mesurée par la méthode ELISA-BrdU, est cependant significativement différente de la prolifération des hépatocytes induite par 10 ng/ml d'EGF. Une étude sur la réponse proliférative des hépatocytes périverneux exposés à différentes concentrations d'EGF mesurée par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée a aussi montré aucune différence significative entre les cellules traitées avec 10 ou 20 ng/ml d'EGF (Gebhardt et Jonitza, 1991). La capacité de la méthode ELISA-BrdU à détecter des différences significatives de prolifération cellulaire entre deux concentrations du même mitogène démontre la supériorité de cette méthode comparativement à la méthode d'incorporation de la thymidine tritiée. Ainsi, la méthode ELISA-BrdU serait plus performante pour la détection de faibles mitogènes. L'utilisation de cette méthode dans les travaux futurs permettra de bien démontrer la sensibilité de la méthode.

Plusieurs méthodes utilisant le BrdU comme marqueur de la prolifération cellulaire existent depuis que Gratzner (1982) a développé des anticorps monoclonaux dirigés contre le BrdU. Le BrdU peut-être injecté à l'animal (Eacho *et al.*, 1991; Eldridge *et al.*, 1995; Lanier *et al.*, 1989), ingéré par l'animal (Gerlyn *et al.*, 1992) ou ajouté au milieu de culture cellulaire (Zeymer *et al.*, 1992; Mossin *et al.*, 1994). Le système sur lequel se fait la mesure peut être des coupes de foie (Eacho *et al.*, 1991; Lanier *et al.*, 1989; Eldridge *et al.*, 1995), des hépatocytes (Gerlyng *et al.*, 1992; Mossin *et al.*, 1994) ou d'autres types cellulaires (Zeymer *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1994). Enfin, le marqueur et la détection de la prolifération cellulaire peut se faire grâce à une quantification de la

fluorescence émise (Gerlyng *et al.*, 1992) ou de la quantité de chromophore dissout dans le milieu (Doyle *et al.*, 1994) ou par la détermination du *labelling index* (Zeymer *et al.*, 1992; Eacho *et al.*, 1991; Eldrige et Goldsworthy 1996; Mossin *et al.*, 1994; Lanier *et al.*, 1989). Le *labelling index* est défini comme étant le nombre de cellules marquées divisé par le nombre total de cellules.

De toutes ces méthodes, seule celle de Doyle *et al.* (1994) et la méthode ELISA-BrdU mise au point dans ce mémoire proposent une mesure de la prolifération dans le contenant (plaque de 96 puits) où a été fait la culture et le traitement des cellules. La méthode de Doyle *et al.* (1994) utilise aussi une méthode ELISA où l'anticorps secondaire est conjugué à une peroxidase et le signal émis est mesuré par fluorimétrie. Ces deux méthodes offrent l'avantage d'automatiser les manipulations et les résultats sont obtenus par des lectures au spectrophotomètre ou au fluorimètre ce qui diminue le risque de subjectivité et augmente la sensibilité des lectures. Notre méthode ELISA-BrdU, ainsi que celle de Doyle *et al.* (1994) permettent d'éviter les erreurs possibles lors du décompte des cellules marquées positivement, elles augmentent la standardisation et la reproductibilité, et elles éliminent les problèmes de faux positifs ou faux négatifs induit par un important bruit de fond (causé par des grains argents qui se retrouve dans les noyau en interphase), tous des facteurs qui font défauts lors de l'utilisation de méthodes impliquant l'utilisation du *labelling index* (Boulton *et al.*, 1995).

L'avantage de la méthode ELISA-BrdU comparativement à la méthode de Doyle *et al.* (1994) est l'emploi de la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline est stable, elle génère un grand signal avec plusieurs substrats (Mason *et al.*, 1983), la réaction est linéaire et sa sensibilité peut-être augmentée en prolongeant le temps de réaction alors qu'avec la *horseradish peroxidase*, la réaction est très rapide et la partie linéaire est courte (Pierce, 1994/95). Comme le mentionne Doyle (1994), les méthodes ELISA impliquent plusieurs variables qui doivent être standardisées. Tous ces paramètres ont été mis au point pour la méthode ELISA-BrdU et la majorité des paramètres que comporte cette méthode ont été optimisés, contrairement à la méthode de Doyle *et al.* (1994) qui n'a pas été mise au point pour les hépatocytes en culture. Ainsi, la méthode ELISA-BrdU

peut facilement être adaptée à toute étude de la prolifération cellulaire dans une culture d'hépatocytes primaires en monocouche.

4.3 L'activité mitogène de l'HCB

L'objectif ultime de ce mémoire était de déterminer si l'HCB induit la prolifération cellulaire dans une culture primaire d'hépatocytes avec ou sans la présence d'EGF. Ces mesures ont été faites en utilisant la méthode d'incorporation de la [³H]-thymidine et la méthode ELISA-BrdU. Ces deux méthodes mesurent la synthèse de l'ADN lors de la réplication cellulaire (Lanier *et al.*, 1989; Boulton et Hodgson, 1995). Cependant, la synthèse détectée pourrait ne pas être uniquement le reflet de la prolifération cellulaire puisque l'ADN est constamment réparé (Boulton et Hodgson, 1995). La proportion du signal causé par la réparation d'ADN est cependant minime par rapport au signal émis par l'ADN en synthèse sur la base de l'importance relative des deux phénomènes. Contrairement aux éléments génotoxiques qui causent des altérations génomiques dans la structure ou le fonctionnement de l'ADN, l'HCB est un élément épigénétique qui ne réagit pas avec l'ADN (Siekel *et al.*, 1991). L'induction de réparation de l'ADN par l'HCB est donc minime. Ainsi, l'utilisation de ces deux méthodes de mesure pour évaluer la prolifération des hépatocytes traités à l'HCB est justifiée. Pour valider plus en profondeur la comparaison des deux méthodes, un plus grand nombre de concentrations d'EGF pourrait être testé (1,5,30 ng/ml d'EGF en plus des niveaux de 10 et 20 ng/ml déjà testés).

Nous avons déjà mentionné en introduction qu'une forte population d'hépatocytes sont bi-nucléées et/ou polyploïdes; ces états résultent d'une absence de division nucléaire et/ou d'une absence de division cellulaire suite à la réplication de l'ADN (section 1.3.1). Rizzardini et son équipe ont démontré que l'HCB n'entraîne pas de modification dans l'expression de chacune des sous-populations cellulaires. Ainsi, la mesure de la synthèse d'ADN, dans le cas de l'étude de l'HCB, reflète vraiment une augmentation de la prolifération cellulaire et vers un changement de la ploïdie.

Les résultats obtenus démontrent que l'HCB, avec ou sans l'EGF, n'augmente pas la prolifération d'hépatocytes primaires en monocouche (figure 3.10). L'HCB (Pereira *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1989) et un autre composé chimique de la famille des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés, le TCDD (Pitot *et al.*, 1980; 1987) ont été démontrés comme étant des promoteurs des tumeurs dans le foie de rat. Selon Wölfle *et al.* (1993), la TCDD augmente la prolifération d'hépatocytes primaires en culture en synergie avec l'EGF et l'insuline. Comparativement à notre étude, le milieu de culture employé par Wölfle *et al.* (1993) contient des suppléments non retrouvés dans notre milieu de culture: la transférine, le sélénium et le $ZnCl_2$. Le zinc pourrait avoir favorisé la mitogenèse puisque selon Kobush et Bock (1990), l'augmentation de la concentration de zinc dans un milieu de culture d'hépatocytes de souris a stimulé la synthèse de leur ADN. De plus, le zinc favoriserait la biosynthèse des acides nucléiques (Kobusch et Bock, 1990). Les hépatocytes possèdent plusieurs récepteurs à la transférine (Sciot *et al.*, 1990). Meredith (1987 et 1988) a démontré que l'ajout de transférine augmente la survie des cellules du foie et augmente la préservation des fonctions normales du foie. Pour sa part, le sélénium augmenterait le nombre d'hépatocytes entrant en phase S après le traitement au TCDD tout en protégeant les cellules du stress oxydatif induit par ce produit chimique (Stohs, 1990; Wölfle *et al.*, 1993).

Le milieu de culture semble en effet jouer un rôle majeur. Des travaux récents (présentés en annexe 1) effectués en collaboration avec le laboratoire du Dr. Francine Denizeau de l'Université du Québec à Montréal, ont révélé que l'HCB semble mitogène dans un milieu enrichi, le Leibovitz L-15, et ils ont confirmé nos résultats obtenus pour les hépatocytes cultivés dans le milieu Williams' E. Il serait donc intéressant de poursuivre en réalisant des études à l'aide d'hépatocytes isolés de rat mâle ou femelle et cultivés dans le milieu L-15 afin d'évaluer si un dimorphisme sexuel parallèle à la cytotoxicité *in vivo*, est présent dans le modèle *in vitro*.

La composition entre les deux milieux diffère. En effet, le milieu Leibovitz L-15 est plus riche tant en acides aminés, en acide ascorbique, en transférine, en zinc, en sel

de sélénium qu'en cobalt. En effet, pour le milieu Leibovitz L-15 ont retrouve des concentrations de 30 mg/L, 5 µg/ml, 20 mg/L, 10 mM et 0,1 µg/L d'acide ascorbique, de transférine, de ZnSO₄, de Na₂SeO₃ et de CoCl₂ tandis que pour le milieu Williams'E ont retrouve respectivement des concentrations de 2 mg/L, 0µg/ml, 0,0002 mg/L, 0 mM et 0 µg/ (Leibovitz, 1963; William et Gunn, 1974). Comme démontré plus tôt, le sel de sélénium et le zinc semblent favoriser la mitogenèse (Kobush et Bock, 1990; Stohs, 1990; Wölfle *et al.*, 1993) tandis que l'acide ascorbique et la transférine auraient un rôle dans le maintien des fonctions spécifiques des hépatocytes (Berry *et al.*, 1991). Pour sa part, le cobalt est un cofacteur enzymatique important. Tout ces éléments permettent d'expliquer pourquoi la mitogenèse est favorisée dans le milieu Lebovitz L-15 comparativement au milieu Williams' E. De plus, dans le milieu Williams' E, une vitamine, la menadione, est retrouvée exclusivement dans ce milieu. Cette vitamine inhiberait la croissance des cellules hépatiques (*human hepatoma Hep 62*) en insérant un délai dans le cycle cellulaire et en altérant le patron de phosphorylation et l'activité de la p34cdc2 kinase et des protéines tyrosine phosphatase (Juan et Wu, 1993). Une autre hypothèse est que le transport de l'HCB dans les cellules est peut-être diminué dans le milieu Williams'E. Selon les résultats obtenus par notre équipe sur un autre type cellulaire (MCF10A), l'HCB augmente la prolifération cellulaire de ces cellules et augmente la phosphorylation des récepteurs à l'EGF (Charbonneau *et al.*, 1998). L'hypothèse que l'HCB agirait en activant le récepteur à l'EGF pour induire son effet mitogène est donc lancée. Une expérience mesurant la phosphorylation des récepteurs à l'EGF suite au traitement d'hépatocytes cultivés dans le milieu Leibovitz L-15 et traités à l'HCB serait à faire pour répondre à cette question. Ainsi, même si notre étude a démontré que l'HCB n'induit pas de prolifération cellulaire, ce résultat pourrait varier avec la composition du milieu. Une étude plus poussée sur l'effet du milieu sur la prolifération cellulaire serait nécessaire.

Un des objectifs de ce mémoire était aussi de déterminer si l'ajout d'estrogènes (à notre milieu qui en est dépourvu) pourrait favoriser une réponse mitogène induite par l'HCB. Nous avons démontré que le traitement des cellules avec 0,25 nM de 17β-estradiol n'induit pas de prolifération cellulaire dans une culture primaire d'hépatocytes (figure 3.11). D'autres études ont démontrées que des concentrations plus élevées (30

μM) d'estradiol augmentent la prolifération cellulaire des hépatocytes chez les rats (Fujii *et al.*, 1985; Shi et Yager, 1989). Dans notre étude, une concentration de 0,25 nM avait été choisie puisqu'il s'agit de la plus grande concentration retrouvée dans le plasma de rat femelle durant le cycle estral (Smith *et al.*, 1975). Cette concentration physiologique a été choisie pour tester l'effet de l'HCB dans une culture d'hépatocytes, mimant les conditions retrouvées normalement *in vivo*.

Un traitement des hépatocytes avec 1 nM d'estrone a amené l'augmentation de la prolifération cellulaire (figure 3.11). Le taux d'estrone utilisé, soit 1 nM (environ 270 pg/ml) est semblable au taux d'estrone dans le sérum de rat qui est de $135 \pm 9,3$ pg/ml (Masamura *et al.*, 1996). L'addition de 50 μM d'HCB à ce traitement produit une inhibition de la prolifération cellulaire induit par l'estrone (figure 3.11). L'estrone peut-être catabolisé en 16α -hydroxyestrone (E_3), 2-hydroxyestrone (2-OH- E_1) et 4-hydroxyestrone (4-OH- E_1). La littérature suggère que le E_3 est un mitogène tandis que le 2-OH- E_1 et le 4-OH- E_1 ne le sont pas. Puisque notre étude a démontré que l'HCB diminue l'effet mitogène de l'estrone, une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est que l'HCB modulerait les voies du métabolisme de l'estrone (en modifiant l'expression des enzymes impliquées dans la biotransformation), ce qui favoriserait les voies métaboliques menant à la formation du 2-OH- E_1 et 4-OH- E_2 . Comme ces deux métabolites de l'estrone, contrairement au E_3 ne favorisent pas la mitogenèse, l'HCB diminuerait l'effet prolifératif de l'estrone. Une action directe sur le récepteur ne peut être exclue. Les mesures de prolifération pour ces études ont été faites par la méthode d'intégration de la thymidine tritiées, quantifié par scintillation puisque, comme nous l'avons démontré précédemment, la méthode ELISA-BrdU et [^3H]-thymidine de tirer les mêmes conclusions.

Un des points importants de notre étude est la démonstration de l'augmentation significative (comparativement aux témoins) de la prolifération des hépatocytes de rat femelle lorsque soumis à l'éthiochlolanolone et l'androstanedione (figure 3.12). Les mesures de prolifération ont été faites par la méthode d'intégration de la thymidine tritiée, quantifié par scintillation. À notre connaissance, il s'agit de la première observation

rapportant une augmentation de la prolifération cellulaire d'hépatocytes due à ces androgènes. Cette observation doit être analysée à la lumière des résultats de Graef *et al.* (1979) qui ont mesuré le métabolisme de certains stéroïdes dans les microsomes de foie de rats traités à l'HCB. Ils ont démontré que l'HCB induit des altérations enzymatiques qui semblent favoriser une augmentation des androgènes de type 5 β . De plus, Gustafsson et Ingelman-sundbug (1979) ont démontré qu'un autre produit chimique, le TCDD diminue lui aussi la voie 5 α -réductase dans le foie de rat ce qui favoriserait la production plus élevée du type 5 β . Ces différentes constatations permettent d'émettre l'hypothèse que l'HCB modifierait l'activité enzymatique de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des androgènes ce qui amènerait l'accumulation des androgènes 5 β , lesquels seraient responsables d'un effet mitogène au niveau hépatique.

L'ajout d'HCB dans la culture d'hépatocytes contenant le stéroïdes 5 β n'a pas fait varier de façon significative la prolifération cellulaire induite par ces derniers (figure 3.12). Selon notre hypothèse, l'HCB induirait l'accumulation des androgènes 5 β qui à leur tour induiraient la prolifération des hépatocytes. Ainsi, le système *in vitro* ne pourrait démontrer l'effet de l'HCB puisqu'il ne contient pas les éléments nécessaires à la synthèse et l'accumulation des stéroïdes 5 β et la poursuite des expérimentations à l'aide du système *in vivo* pour prouver cette hypothèse semble nécessaire.

Tel que décrit au chapitre 1 (section 1.6) le principal objectif de ce mémoire était de déterminer si l'HCB induit la prolifération des hépatocytes primaires en culture et de voir si l'EGF ou d'autres composantes stéroïdiennes n'étaient pas impliqué dans l'induction de l'effet hépatocancérogène de l'HCB chez des rats femelles. Pour répondre à cet objectif, la mise au point d'une méthode employant l'incorporation du BrdU nous a semblé justifiée puisque la thymidine tritiée comporte de nombreux désavantages. Les résultats sur l'effet de certaines composantes stéroïdiennes seules ou en présence de l'HCB (figure 3.11 et 3.12) ont été obtenus par la méthode d'incorporation de [³H]-thymidine car la mise au point de la méthode ELISA-Brdu n'était pas terminée. Même si nous avons démontré que la méthode ELISA-Brdu est plus sensible, les deux protocoles

permettent de tirer les mêmes conclusions (figure 3.10) sur l'effet mitogénique de l'HCB et de L'EGF.

Une étude préliminaire a été amorcée. Des rats mâles et femelles ont été traités pendant 5 jours avec 100 mg/kg/jour d'HCB. Ensuite, les rats ont été sacrifiés puis le foie et le sang ont été récoltés. Le cytosol a été isolé et purifié via le passage sur une colonne de type SEP-PAC pour analyse par GC-MS. Les premiers résultats obtenus ont démontré qu'un témoin ayant une concentration de 5 ng/ml ne donne aucun signal. Ceci suggère que la méthode d'extraction pour le dosage au GC-MS doit être améliorée pour obtenir la sensibilité nécessaire pour déterminer l'effet de l'HCB sur le taux d'androgènes 5 β dans le plasma et/ou cytosol de foie de rat.

CONCLUSION

Le présent travail a permis de mettre au point une nouvelle méthode de mesure de la prolifération cellulaire chez des hépatocytes de rat en monocouche. Cette technique utilise un analogue de la thymidine, le BrdU, comme marqueur de l'ADN en synthèse. La méthode de détection utilisée est une méthode ELISA, d'où le nom pour ce nouveau protocole: méthode ELISA-BrdU. Cette procédure offre l'avantage d'être une méthode non-radioactive basée sur l'incorporation d'un réactif stable, qui est peu coûteuse, rapide et facile à effectuer. De plus, cette méthode diminue les manipulations sur les cellules traitées et enfin, la quantification des résultats est standardisée et automatisée. Les expériences rapportées dans ce mémoire ont démontré que la méthode ELISA-BrdU est plus sensible pour mesurer l'effet mitogène induit par l'EGF (sur des hépatocytes en monocouche) comparativement à la méthode d'incorporation de la thymidine tritiée quantifiée par scintillation.

Ces travaux ont permis de démontrer que chez des hépatocytes primaires de rat femelle en monocouche, à l'HCB (avec ou sans l'EGF) ne modifie pas la prolifération des cellules cultivées dans le milieu Williams' E. Cependant, l'HCB a un effet mitogène lorsque les hépatocytes sont cultivés dans un milieu "enrichi" tel que le milieu Leibovitz L-15. Selon les résultats obtenus par notre équipe sur un autre type cellulaire (MCF10A), l'HCB augmente la prolifération cellulaire de ces cellules et augmente la phosphorylation des récepteurs à l'EGF (Charbonneau et la., 1998). Il serait donc intéressant de vérifier la phosphorylation de ces récepteurs dans une culture d'hépatocytes de rat femelle, cultivés dans le milieu Leibovitz L-15 lors d'expériences future.

Ces travaux ont aussi démontré que 0,25 nM d'estradiol n'augmente pas la mitogenèse des hépatocytes en culture et que l'ajout de l'HCB à ce milieu n'amène aucune modification. La capacité de l'estrone à augmenter la prolifération cellulaire

d'hépatocytes en culture était déjà connu. Cependant, cette étude a permis de démontrer que l'ajout d'HCB avec l'estrone empêche l'effet prolifératif induit par l'estrone.

Enfin, le présent travail constitue la première étude où la démonstration de l'effet mitogène de l'éthiocholanolone et de l'androstandione chez des hépatocytes de rat femelle en culture a été faite. Ces expériences ont aussi démontrées que l'ajout d'HCB n'amène aucune différence significative sur le pouvoir mitogène de ces deux stéroïdes. Une étude *in vivo* sur le rôle de l'HCB dans l'accumulation de ces deux androgènes reste à être complétée.

Le mécanisme proposé par lequel l'HCB induirait son effet hépatocancérogène chez le rat femelle est que ce dernier favoriserait l'accumulation des 5 β -androgènes. Puisque ce mémoire a démontré que les 5 β -androgènes ont un effet mitogène sur les hépatocytes primaires en culture, l'androstanedione et/ou l'éthiocholanolone induiraient le développement d'hépatocancérogène par leur activité mitogénique. Des travaux de collaboration ont cependant aussi permis de démontrer que l'HCB serait mitogène sans l'intervention de d'autres cofacteurs. En effet, l'expression de l'activité mitogène de l'HCB chez des hépatocytes de rats en culture serait dépendant du milieu de culture employé et des différents éléments présents dans le milieu.

ANNEXE 1

Travaux réalisés par monsieur Michel Marion du laboratoire du Dr Françoise Denizeau: Prolifération des hépatocytes de rats mâles cultivés dans le milieu Williams'E ou le milieu Leibovitz L-15 et traités avec l'EGF ou l'HCB.

Les méthodes de culture et de traitement des hépatocytes sont semblables aux méthodes décrites à la section 2.3 de ce mémoire. Cependant, il faut noter que les hépatocytes utilisés viennent de rat mâle et que le milieu Williams'E employé par cette équipe contient du rouge de phénol contrairement à notre milieu où ce facteur n'était pas présent. Par ailleurs, pour la mesure du taux d'incorporation de thymidine tritiée la méthode pour la préparation de la fraction ADN était différente de celle utilisée dans le cadre de ce mémoire. Cette méthode se résume ainsi:

À la fin de la période de traitement, les Pétris ont été lavés plusieurs fois avec du TCA 5% puis placés à 4°C pendant au moins 15 minutes. Le TCA a été enlevé et les Pétris, lavés cinq fois avec de l'eau distillée à 4°C. Les Pétris ont été séchés pendant au moins 2 heures à température de la pièce. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 10 minutes avec 1 ml de NaOH 0,3 N. Les échantillons ont été aliquotés pour être mesurés au compteur à scintillation. Le dosage des protéines a été effectuée pour exprimer les résultats en DPM/ μ g de protéine.

TABLEAU A.1 Effet du milieu de culture (Williams'E, avec rouge de phénol ou Leibovitz L-15) sur la prolifération des hépatocytes traités avec l'EGF ou l'HCB. Les hépatocytes de rat mâle ont été traités avec 20 ng/ml d'EGF ou 50 μ M d'HCB. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM.

Traitement	Milieu Williams'E	Milieu Leibovitz L-15
EGF	243 \pm 23 %	303 \pm 30 %
HCB	83 \pm 1 %	182 \pm 4 %

Le tableau A.1 montre que 50 μ M d'HCB induit la prolifération des hépatocytes de rats mâles cultivés dans le milieu Leibovitz L-15 mais que la même concentration d'HCB n'induit pas de prolifération cellulaire lorsque les hépatocytes sont cultivés dans le milieu Williams'E. L'EGF induit la prolifération des hépatocytes autant dans le milieu Williams'E que dans le milieu Leibovitz L-15.

RÉFÉRENCES

ARLOW, E.H. et D. Lane. 1988. *Antibodies a laboratory manuel*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. p. 595.

AMERICAN CANCER SOCIETY. 1996. "Cancer facts and figures". Dans Scientific American. 1996, Vol. 275, p. 56-167.

AMES, B.N.. 1989. "Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer." Free Radical Res. Commun. Vol. 7, p. 121-128.

AMES, B.N. et L.S. Gold. 1990. "Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87, p. 7772-7776.

ASHBY, J. et R.W. Tennant. 1988. "Chemical structure salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NIP." Mutat. Res. Vol. 204, p. 17-115.

BAUM, J.K., F. Holtz, J.J. Bookstein et E.W. Klein. 1973. "Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives." Lancet. Vol. 2, p. 926-929.

BÉGUÉ, J.M., C. Guguen-Guillouzo, N. Padeloup, A. Guillouzo. 1984. "Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type." Hepatology. Vol. 4, p. 839-842.

BERRY, M.N. et D.S. Friend. 1969. "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study." J. Cell. Biol. Vol 43, p. 506-520.

BERRY, M.N., A.M. Edwards et G.J. Barritt. 1991. Isolated hepatocytes: preparation, properties and applications. R.H. Burdon (ed.) New York: Elsevier, 460p

BISSEL, D.M., S.C. Stamatoglou, M.V. Nermut et R.C. Hughes. 1986. "Interaction of rat hepatocytes with type IV collagen, fibronectin and laminin matrices. Distinct matrix-controlled modes of attachment and spreading." Eur. J. Cell. Biol. Vol. 40, p. 72-78.

BODYCOTE, J. et S. Wolff. 1986. "Metabolic breakdown of [3H]thymidine and the inability to measure human lymphocyte proliferation by incorporation of radioactivity." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 83, p.4749-4753.

BOLT, H.M. 1979. "Metabolism of estrogens, natural and synthetic." Pharma. Therap. Vol. 4, p. 155-181.

BONNEY, R.J., J.E. Becker, P.R. Walder et V.R. Potter. 1974. "Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis." In vitro. Vol. 9, p. 399-413.

BOULTON, R.A. et J.F. Hodfson. 1995. "Assesing cell proliferation: a methodological review." Clinical Science. Vol. 88, p. 119-130.

BRUNK, C.F., K.C. Jones et T.W. James. 1979. "Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates." Anal. Biochem. Vol. 92, p. 497-500.

CAYAMA, E., H. Tsuda, D.S.R. Sarma et E. Farber. 1978. "Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation." Nature. Vol. 275, p. 60-61.

CHAO, E.S., D. Dunbar et L.S. Kaminsky. 1988. "Intracellular lactate déhydrogenase concentration as an index of cytotoxicity in rat hepatocyte primary culture." Cell Biol. and Toxicol. Vol. 4, no. 1, p. 1-11.

CHARBONNEAU, M., N. Lyrette, J.F. Côté. 1998. "Increased epidermal grwth factor (EGF) phosphorylation in hexachlorobenzene (HCB)-induced mitogenesis of human mammary epithelial cells." Toxicol. Sciences. Vol. 42 (1-S), p. 243

COHEN, S.R. 1970. "Phosphatases." In A. Lajtha (ed.). Handbook of neurochemistry volumes III, metabolic reactions in the nervous systeme. N.Y., Plenum press, 1970, p. 87.

COLUMBANO A., S. Raalakshmi et D.S.R. Sarma. 1981. "Requirement of cell proliferation for the initiation of carcinogenesis as assayed by three different procedures." Cancer Res. Vol. 41, p. 2079-2083.

COURTNEY, K.D.. 1979. "Hexachlorobenzene (HCB): a review." Environ. Res. Vol. 20, p. 225-266.

CRIPS, D.J., H.A. Peters, A. Gocmen et I. Dogramaci. 1984. "Porphyria turcica due to hexachlorobenzene: a 20 to 30 year follow-up study on 204 patients." Br. J. Dermatol. Vol. 11, p. 413-422.

CUNNINGHAM, M.L. et H.B. Matthews. 1995. "Cell proliferation as a determining factor for the carcinogenicity of chemicals: studies with mutagenic carcinogens and mutagenic noncarcinogens." Toxicol. Lett. Vol. 82/83, p. 9-14.

CUNNINGHAM, M.L. 1996. "Role of increased DNA replication in the carcinogenic risk of nonmutagenic chemical carcinogens." Mutat. Res. Vol. 365, p. 59-69.

D'AMOUR, M. et M. Charbonneau. 1992. "Sex-related differences in hepatic glutathione conjugation of hexachlorobenzene in the rat". Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 112, p. 229-234.

DALET, C., M. Fehlmann et P. Debey. 1982. "Use of percoll density gradient centrifugation for prepng isolated rat hepatocytes having long-term viability." Anal. Biochem. Vol. 122, p. 119-123.

DeMATTEIS, F.B., B.E. Prior et C. Rimington. 1961. "Nervous and biochemical disturbances following hexachlorobenzene intoxication." Nature. Vol. 191, p. 363-366.

DICKSON, A.J. et C.I. Pogson. 1977. "The metabolic integrity of hepatocytes in sustained incubations." FEBS Lett. Vol. 83, p. 27.

DOYLE, A., J.B. Griffiths, D.G. Newell (eds). 1994. "Assays of cell proliferation. Supplementary procedure: ELISA method for BrdU". In Doyle, A., J.B. Griffiths, D.G. Newell (eds.). Cell and tissue culture: laboratory procedures. Chichester: John Wiley, 1994; 10E, 1.6-1.7.

DROCHMANS, P., J.C. Wanson et R. Mosselmans. 1975. "Isolation and subfractionation on ficoll gradients of adult rat hepatocytes." J. Cell. Biol. Vol. 66, p. 1-22.

EACHO, P.I., T.L. Lanier et C.A. Brodhecker. 1991. "Hepatocellular DNA synthesis in rats given peroxisome proliferating agents: comparison of WY-14,643 to clofibrac acid, nafenopin and LY171883." Carcinogenesis. Vol. 12, p. 1557-1561.

ECKL, P.M., W.R. Whitcomb, B.K. Michalopoulos et R.L. Jirtle. 1987. "Effects of EGF and calcium on adult parenchymal hepatocyte proliferation." J. Cell. Physiol. Vol. 132: 363-366.

ELDRIDGE, S.R., S.M. Goldsworthy. 1996. "Cell proliferation rates in common cancer target tissues of B6C3F1 mice and F344 rats: effects of age, gender, and choice of marker." Fund. Appl. Toxicol. Vol. 32, p. 159-167.

ELGER, W., S. Schwarz, A. Hedden, G. Reddersen et B. Schneider. 1995. "Sulfamates of various estrogens are prodrugs with increased systemic and reduced hepatic estrogenicity at oral application." J. Steroids Biochem. Molec. Biol. Vol. 55, No. 3/4, p. 395-403.

FARBER, E. 1987. "Liver cancer: insights into the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in humans from experimental hepatocarcinogenesis in rat." Monographs in Pathol. Vol. 28, p. 199-200.

FOSTER, W.G., J.A. Pentick, A. McMahon et P.R. Lecavalier. 1993. "Body distribution and endocrine toxicity of hexachlorobenzene (HCB) in the female rat." J. Applied Toxicol. Vol. 13, No. 2, p. 79-83.

FRAGA, C.G., M.K. Shigenaga, J.-W. Park, P. Degan et B.N. Ames. 1990. "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 87, p. 4533-4537.

FUJJI, H., T. Hayama et M. Kotani. 1985. "Stimulating effect of natural estrogens on proliferation of hepatocytes in adult mice." Acta Anat. Vol. 121, p. 174-178.

GARTZNER, H.G.. 1982. "Monoclonal antibody to 5-Bromo and 5-Iodoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." Science. Vol. 218, p. 474-475.

- GERBHARDT, R. et D. Jonitzza. 1991. "Different proliferative responses of periportal and perivenous hepatocytes to EGF." Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 181, p. 1201-1207.
- GERDES, J., U. Schwab, H. Lemke et H. Stein. 1983. "The production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation." Int. J. Cancer. Vol. 31, p. 13-20.
- GERLYNG, P., T. Stokke, H.S. Huitfeldt, T. Stenersen, H.E. Danielsen, T. Grotmol et P.O. Seglen. 1992. "Analytical methods for the study of liver cell proliferation." Cytometry. Vol. 13, p. 404-415.
- GLINOS, A.D., N.L.R. Bucher et N.C. Aub. 1951. "The effect of liver regeneration on tumor formation in rats fed 4-dimethylaminobenzene." J. Exp. Med. Vol. 93, p. 313-324.
- GOLDBERG, M. et J.M. Frazier. 1989. "Alternatives to animal in toxicity testing". Scientific American. Vol. 267, p. 24.
- GOLDSTEIN, J.A., R.E. Linder, P. Hickman et H. Bergman. 1976. "Effects of pentachlorophenol on hepatic drug metabolism and porphyria related to contamination with chlorinated dibenzo-p-dioxins." Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 36, p.81-92.
- GOODMAN, J.I. et J.L. Counts. 1993. "Hypomethylation of DNA: A possible nongenotoxic mechanism underlying the role of cell proliferation in carcinogenesis." Environmental Health Perspect. Vol. 101 (suppl. 5), p. 169-172.
- GRANICK, S., A. Kappas. 1967. "Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture. I. Structural basis and possible physiological role in the control of heme formation". J. Biol. Chem. Vol. 242, p.4587-4593.
- GRAEF, V., S.W. Golf et G. Goerz. 1979. "Effect of hexachlorobenzene on enzymes of the steroid metabolism in rat liver." Arch. Toxicol. Vol. 43, p.115-120.
- GRAEF, V., S.W. Golf et C. Tyrell. 1982. "Further evidence for the participation of 5 β -steroids in the development of a porphyria induced by hexachlorobenzene." Arch Toxicol. Vol. 50, p. 233-239.
- GRANICK, S., A. Kappas. 1967. "Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture. I. Structural basis and possible physiological role in the control of heme formation". J. Biol. Chem. Vol. 242, p.4587-4593.
- GRANT, D.L., W.E.J. Phillips et G.W. Hatina. 1977. "Effect of hexachlorobenzene on reproduction in the rat." Arch. Environ. Contaminant Toxicol. Vol. 5, p. 207-216.
- GRATZNER, H.G.. 1982. "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." Science. Vol. 218, p. 474-475.

GROSS-BELLARD, M., Oudet P. et Chambon P. 1979. "Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells". Eur. J. Biochem. Vol. 36, p. 32-38.

GUILLOUZO, A.. 1986. "Use of isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism and cytotoxicity studies". In A. Guillouzo et C. Guguen-Guillouzo (éds.). Isolated and cultured hepatocytes. Grande-Bretagne: John Libbey Eurotext LTd/INSERM, 1986, p. 313-331.

GUSTAFSSON, J-A, M. Ingelman-Sundberg. 1979. "Changes in steroid hormone metabolism in rat liver microsomes following administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)". Biochem. Pharmacol. Vol. 28, p. 497-499.

GUSTAFSSON J-A., A. Mode, G. Norstedt, P. Skett. 1983. "Sex steroid induced changes in hepatic enzymes." Annu. Rev. Physiol. Vol. 45, p. 51-60.

GUSTAFSSON, J-A.. 1994. "The hypothalamic-pituitary-liver axis: growth hormone controls liver sex." In M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D.A. Schachter e D.A. Shfritz (éds) The liver: Biology and pathobiology. Third edition. New York, Raven Press, Ltd., 1994, p. 1209-1215.

HANKS, J.H. et R.E. Wallace. 1949. " Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol.71, p. 196-200.

HAYNE, N.T., F. Eckardt, B.A. Dunz. 1984. "Isozyme profiles of oval cells, parenchymal cells, and biliary cells isolated by centrifugal elutriation from normal and preneoplastic livers." Cancer Res. p. 332-338.

HENDERSON, B.E., R.K. Ross, M.C. Pike et J.T. Casagrande. 1982. "Endogenous hormones as a major fact in human cancer." Cancer Res. Vol. 42, p.3232-3239.

HENDERSON, B.E., R. Ross et L. Bernstein. 1988. "Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture." Cancer Res. Vol. 48, p. 246-253.

HENDERSON, B.E., R.K. Ross et M.C. Pike. 1991. "Toward the primary prevention of cancer." Science. Vol. 254, p. 1131-1138.

HOLME, J.A.. 1985. "Xénobiotic metabolism and toxicity in primary monolayer cultures of hepatocytes". NIPH Annals. Vol. 8 p. 49.

HARLOW, E., et D. Lane. 1988. Antibodies a laboratory manuel. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold spring, N.Y. p. 497,384-393

HOWARD, R.B., A.K. Christensen, F.A.S. Gibbs et L.A. Pesh. 1967. "The enzymatic preparation of isolated cells from rat liver." J. Cell. Biol. Vol. 35: p. 675-687.

- HSIA, M.T.S., B.L. Kreamer, P.A. Dolora. 1983. "A simple and rapid method to quantitate chemically induced unscheduled DNA synthesis in freshly isolated rat hepatocytes facilitated by DNA synthesis in freshly isolated rat hepatocytes facilitated by DNA retention on membrane filters." Mutat. Res. Vol. 122, p. 177-185.
- IARC. 1979. "IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans". International agency for research on cancer, Hexachlorobenzene. IARC Monographs. Lyon, France. vol. 20 p. 155-178.
- IARC. 1987. "IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans". International agency for research on cancer, Hexachlorobenzene. IARC Monographs. Lyon, France. suppl. 7 p 219-220.
- IATROPOULOS, M.J. 1993/94. "Endocrine considerations in toxicologic pathology." Exp. Toxicol. Pathol. Vol 45, p. 391-410.
- ISHIKAWA, T., S. Takayama et T. Ditagawa. 1980. " Correlation between time of partial hepatectomy after a single treatment with diethylnitrosamine and induction of adenosine triphosphate-deficient islands in rat liver. " Cancer Res. Vol. 40, p. 4261-4264.
- JAUREGUI, H.O., N.T. Hayner, J.L. Driscoll, R. Williams-Holland, M.H. Lipsky et P.M. Galletti. 1981. "Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes-freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures." In Vitro. Vol. 17, No. 12, p.1100-1110.
- JUAN, C.C., et F.Y. Wu. 1993. "Vitamin K3 inhibits growth of human hepatoma HepG2 cells by decreasing activities of both p34cdc2 kinase and phosphatase." Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 190, p. 907-913.
- KAPUSCINSKI, J. et B. Skoczylas. 1977. "Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay." Anal. Biochem. Vol. 83, p. 252-257.
- KOBUSCH A.-B. et D.W. Bock. 1990. "Zinc increases EGF-stimulated DNA synthesis in primary mouse hepatocytes. Studies in tumor promoter treated cell cultures." Biochem. Pharmacol. Vol. 39, p. 555-558.
- KOCIBA, R.J., D.G. Keyes, J.E. Beyer, R.M. Carreon, E.E. Wade, D.A. Ditterver, R.P. Kalnins, L.F. Frauson, D.N. Park, S.D. Barnard, R.A. Hummel et C.G. Humiston. 1978. "Results of a two year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats." Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 46, p. 279-303.
- KREAMER, B.L., J.L. Staecker, N. Sawada, G.L. Sattler, M.T.S. Hsia et H.C. Pitot. 1986. "Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations." In Vitro Cell. Develop. Biol. Vol. 22, no. 4, p. 201-211.

KRISHNAN, K., J. Brodeur et M. Charbonneau. 1991. "Development of an experimental model for the study of hexachlorobenzene-induced hepatic porphyria in rat." Fund. Appl. Toxicol. Vol. 17, p. 433-441.

KUIPER-GOODMAN, T., D.L. Grant, C.A. Moodie, G.O. Korsrud et I.C. Munro. 1977. "Subacute toxicity of hexachlorobenzene in the rat." Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 40, p. 529-249.

LAKE, B.G. et A.J. Paine. 1982. "The effect of hepatocyte culture conditions on cytochrome P-450 linked drug metabolizing enzymes." Biochem. Pharmacol. Vol. 31, p. 2141-2144.

LAMBRECHT, R.W., E. Ertürk, E.E. Grunden, D.B. Headley, H.A. Peters, C.R. Morris et B.T. Bryan. 1983. "Renal toxicity and tumorigenicity of hexachlorobenzene (HCB) in Syrian golden hamsters (H) after subchronic administration". Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Vol. 42, p. 786.

LANIER, T.L., E.K. Berger et P.I. Eacho. 1989. "Comparison of 5-bromo-2-deoxyuridine and [3H]thymidine for studies of hepatocellular proliferation in rodents." Carcinogenesis. Vol. 10, no. 7, p. 1341-1343.

LANOUX, M.J., W.H. Cleland, C.R. Mendelson, B.R. Carr et E.R. Simpson. 1985. "Factors affecting the conversion of androstenedione to estrogens by human fetal hepatocytes in monolayer culture." Endocrinology. Vol. 117, p. 361-368.

LeBIGOT, J.F., J.M. Begue, J.R. Kiechel et A. Guillouzo. 1987. "Species differences in metabolism of ketotifen in rat, rabbit and man: demonstration of similar pathways in vivo and in cultured hepatocytes." Life Sci. Vol. 40, p. 883-90.

LEGAULT, N., H., Sabik, S.F. Cooper et M. Charbonneau. 1997. "Effect of estradiol on the induction of porphyria by hexachlorobenzene in the rat." Biochem. Pharmacol. Vol. 54, p. 19-25

LEHNINGER ALBERT L. 1982. Principes de Biochimie. France. Flammarion médecine-sciences, 1006p.

LEIBOVITZ, A. 1963. Am. J. Hyg. Vol. 78, p. 173.

LOBO, R.A. et D.L. Cassidenti. 1992. "Pharmacokinetics of oral 17 β -estradiol." J. Reproductive Med. Vol. 37, no. 1, p. 77-84.

LOURY, D.J., T.L. Goldsworthy et B.E. Butterworth. 1987. "The value of measuring cell replication as a predictive index of tissue-specific tumorigenic potential." In B.E. Butterworth et T.J. Slaga (Éds.). Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987, p. 119-134.

- LUCIER, G.W., A. Tristcher, T. Goldsworthy, J. Foley, G. Clark, J. Goldstein et R. Maronpot. 1991. "Ovarian hormones enhance 2'3'7'8'-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated increases in cell proliferation and preneoplastic foci in a two-stage model for rat." Cancer Res. Vol. 51, p. 1391-1397.
- MA, X. et J.G. Babish. 1993. "Acute 2'3'7'8'-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure results in enhanced tyrosylphosphorylation and expression of murine hepatic cyclin dependent kinase." Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 197, p. 1070-1077.
- MAÏER, P. et H. Schawalder. 1993. "Physiological oxygen tension modulates the chemically induced mitogenic response of cultured rat hepatocytes." J. Cell. Physiol. Vol. 156, p. 119-129.
- MASAMURA, S., S.J. Santner et R.J. Santen. 1996. "Evidence of in situ estrogen synthesis in nitroso-methylurea-induced rat mammary tumors via the enzyme estrone sulfate." J. Steroïd Biochem. Biol. Vol. 58, No. 4, p. 425-429.
- MATHEWS, M.B., R.M. Bernstein, R. Franza et J.L. Garrels. 1984. "Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin." Nature. Vol. 309, p.374-376.
- MATTHEWS, H.B.. 1986. "Factors determining hexachlorobenzene distribution and persistence in higher animals. " In C.R. Morris et J.R.P. Cabral (éds) Hexachlorobenzene proceeding of an international symposium. Lyon, International agency for research on cancer, 1986, p.253-260.
- McGOWAN, J.A. 1986. "Hepatocyte proliferation in culture". In: A. Guillouzo et C. Guguen-Guillouzo (eds). Research in isolated and cultured hepatocytes. Montrouge, France: John Eurotext Ltd., 1986: 13-38.
- McMANUS, M.E., W.M. Burgess, M.E. Veronise, A. Huggett, L.C. Quattrochi et R.H. Tuckey. 1990. "Metabolism of 2-acetylaminogluorene and benzo[a]pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochrome P-450".Cancer Res. Vol. 50 p. 3367-3376.
- McQUEEN, C.A.. 1993. "Isolation and Culture of hepatocytes from different laboratory species." In Methods in Toxicol. Academic Press, 1991, vol. 1A, p. 255-261.
- MEREDITH, M.J. 1987. "Cystathionase activity and glutathione metabolism in redifferenting rat hepatocyte primary cultures." Cell. Biol. Toxicol. Vol. 3, p. 361-377.
- MEREDITH, M.J. 1988. "Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture." Cell. Biol. Toxicol. Vol. 4, p. 405-425.
- MICHALOPOULOS, G et H.C. Pitot. 1975. "Primary cultures of parenchymal cells on collagen membranes: morphological and biochemical observations." Exp. Cell. Res. Vol. 94, p. 70-78.

- MICHALOPOULOS, G.K., H.D. Cianciulli, A.R. Novotny, A.D. Kligerman, S.C. Strom et R.L. Jirtle. 1982. "Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture". Cancer Res. Vol.42, p. 4673-4682.
- MICHALOPOULOS, G.K. 1990. "Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control." FASEB J. Vol. 4, p. 176-187.
- MILO, G.E., C.F. Shyler, H. Lee et B.C. Casto. 1995. "A conundrum in molecular toxicology: Molecular and biological changes during neoplastic transformation of human cells." Cell. Biol. and Toxicol. Vol. 11, p. 329-345.
- MORALES, A.J., J.J. Nolan, J.C. Nelson et S.S.C. Yen. 1994. "Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age." J. Clin. Endocrinol. Metabol. Vol. 78, p. 1360-1367.
- MORTOLA, J. et S.C.C. Yen. 1990. "The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women." J. Clin. Endocrinol. Metabol. Vol. 71, p. 696-704.
- MOSSIN, L., H. Blankson, H. Huitfeldt et P.O. Seglen. 1994. "Ploidy-dependant growth and binucleation in cultured rat hepatocytes." Exp. Cell. Research. Vol. 214, p. 551-560.
- MYLCHREEST, E. et M. Charbonneau. 1994. "Ultrasound-induced epileptiform activity in rats treated with hexachlorobenzene." Neurotoxicol. Vol. 15, No. 2, p. 273-278.
- MYLCHREEST, E. et M. Charbonneau. 1997. "Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced porphyria in the female rat." Toxicol. Appl. Pharmacol. 145, p. 23-33.
- NADEAU, D MJ Reasor et GE Hook. 1981. "Extracellular alkaline phosphatase from alveolar secretions of patients with pulmonary alveolar proteinosis." Can. J. Biochem. Vol. 59, p. 290-300.
- NAKAMURA, T., K. Yoshimoto, Y. Nakayama Y. Tomita et A. Ichihara. 1983. "Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 80, p. 7229-7233.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 1995. "SEER Statistics review, 1973-1992." NIH Publication.
- NATIONAL TOXICITY PROGRAM. 1980. "Bioassay of 1,2,3,6,7,8- and 1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzo-p-dioxins (HCDD) for possible carcinogenicity." NCI Technical Report Series. Issu 198

NELSON, D.R., T. Kamataki, D.J. Waxman, F.P. Guengerich, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, F.J. Gonzalez, M.J. Coon, I.C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda et D.W. Nebert. 1993. "The P-450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession, numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." DNA Cell. Biol. Vol. 12, p. 1-51.

NEWHOOK, R. et M.E. Meek. 1994. "Hexachlorobenzene: évaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. " Environ. Carcino. Ecotox. Rev. C12(2), p. 345-360.

NI, N. ET J.D. Yager. 1994. "The co-mitogenic effects of various estrogens for TGF- α -induced DNA synthesis in cultured female rat hepatocytes." Cancer Lett. Vol. 84, p. 133-140.

ORNER, G.A., R.M. Donohoe, J.D. Hendricks, L.R. Curtis et D.E. Williams. 1996. "Comparison of the enhancing effects of dehydroepiandrosterone with the structural analog 16 α -fluoro-5-androsten-17-one on aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout." Fund. Appl. Toxicol. Vol. 34, p. 132-140.

PAINE, A.J. 1990. "The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system". Chem. Biol. Interactions. Vol. 74, p. 1-31.

PALMER, J.R., L. Rosenberg, D.W. Kaufman, M.E. Warshauer, P. Stolley et S. Shapiro. 1989. "Oral contraceptive use and liver cancer." Am. J. Epidermiol. Vol. 130, p. 878-882.

PARZEFALL, W., P.R. Galle et R. Schulte-Hermann. 1985. "Effect of calf and rat serum on the induction of DNA synthesis and mitosis in primary cultures of adult rat hepatocytes by cyproterone acetate and epidermal growth factor". In Vitro Cell. Develop. Biol. Vol 21, p. 665-673.

PARZEFALL, W., E. Erber, R. Sedivy et R. Schulte-Hermann. 1991. "Testing for induction of DNA synthesis in human hepatocyte primary cultures by rat liver tumor promoters." Cancer Res. Vol. 51, p. 1143-1147.

PARZEFALL, W., E. Erber, E. Kainzbauer et R. Schulte-Herman. 1996. "Effects of insulin, glucagon and triiodothyronine on DNA synthesis in rat hepatocyte primary cultures induced by liver tumor promoters and EGF." Toxicol. In Vitro. Vol. 10, p. 183-193.

PAULES, R.S., E.N. Levedakou, S.J. Wilson, C.L. Innes, N. Rhodes, T.D. Tisty, D.A. Galloway, L.A. Donehover, M.A. Tainsky et W. K. Kaufmann. 1995. "Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes." Cancer Res. Vol. 55, p. 1763-1773.

PEREIRA, M.A., S.L. Herren, A.L. Britt et M.M. Khoury. 1982. "Sex difference in enhancement of GGTase-positive foci by hexachlorobenzene and lindane in rat liver." Cancer Lett. Vol. 15, p. 95-101.

PERTOFT, H., K. Rubin, L. Kjellen, T.C. Laurent et B. Klingeborn. 1977. "The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, percoll (TM)." Exp. Cell. Res. Vol. 110, p. 449-457.

PETERS, H.A.. 1976. "Hexachlorobenzene poisoning in Turkey." Fed. Proc. Vol. 35, p.2400-2403.

PETERS, H.A., D.J. Cripps, et A. Gocmen. 1978. "Porphyria 20 years after hexachlorobenzene exposure." Neurology. Vol. 28, p. 333 (Abstract No. PP10).

PETERS H.A., A. Goeman, D.J. Cripps, G.T. Bryan et I. Dogramaci. 1982. "Epidemiology of hexachlorobenzene induced porphyria in Turkey." Arch. Neurol. Vol. 39, p. 744-749.

PETERSON, B., C.J. Yee, W. Bowen, R. Zarnegar et G.K. Michalopoulos. 1994. "Distinct morphological and mito-inhibitory effects induced by TGF- β 1, HGF and EGF on mouse, rat and human hepatocytes." Cell. Biol. Toxicol. Vol. 10, p. 219-230.

PIERCE. 1994/1995. "Catalog and handbook life science and analytical research products." U.S.A. Pierce chemical cie, 1994.

PITOT, H.C., T. Goldsworthy, H.A. Campbell et A. Poland. 1980. "Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine." Cancer Res. Vol. 40, p. 3616-3620.

PITOT, H.C., D.G. Beer et S. Hendrich. 1987. "Multistage carcinogenesis of the rat hepatocyte." In B.E. Butterworth et T.J. Slaga (Éds.). Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987, p. 41-50.

PITOT, H.C., T.L. Goldsworthy, S. Moran, W. Kennan, H.P. Glanert, R.R. Maronpot et H.A. Campbell. 1987. "A method to uantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to alter hepatic foci." Carcinogenesis. Vol. 8, p. 1491-1499.

PIWNICA-WORMS, H.M. 1994. "Regulation of the eukaryotic cell cycle." I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D.A. Schachter et D.A. Shfritz (Éds.). The liver: Biology and pathobiology, third edition. New York: Raven Press Ltd., 1994, p. 1557-1562.

POUND, A.W.. 1968. "Carcinogenesis and cell proliferation." N. Z. Med. J. Vol. 67, p. 88-99.

PRELICH, G., C.K. Tan, M. Kostura, M.B. Mathews. 1987. "Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase δ auxiliary protein." Nature. Vol. 326, p. 517-520.

PRESTON-MARTIN, S., M.C. Pike, R.K. Ross, et B.E. Henderson. 1993. "Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model of carcinogenesis." Environmental Health Perspect. Vol. 101 (Suppl. 5), p. 137-138.

PURDY, R.H., L.L. Engel et J.L. Oncley. 1961. "The characterization of estrone sulfate frome human plasma." J. Biol. Chem. Vol. 236, p. 1043-1050.

RAO, M.S., V. Subbarao, A.V. Veldandi et J.K. Reddy. 1992. "Hepatocarcinogenicity of dehydroepiandrosterone in the rat." Cancer Res. Vol. 52, p. 2977-2979.

RAMADORI, G., T. Knittel, M Odenthal, S Schwögler, K. Neubauer et K. H. Meyer zum Büschenfelde. 1992. "Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines". Gastroenterology. Vol. 103, p. 1313-1321.

RAWN, J.D.. 1990. Traité de Biochimie. Belgique. Boeck-Wesmael. 1146p.

REID, N.J., R.E. Stitzel, R.J. Head. 1986. "Characterization of the o-methylation of catechol oestrogens by intact rabbit thotracic aorta and subcellular fraction thereof. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharacol. Vol. 334, p. 17-28.

RIEDER, H., K.H. Meyer zum Büschenfelde et G. Ramadori. 1992. "Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis synthesis capacities and intercellular communication". Hepatology. Vol. 15, p. 237-250.

RIZZARDINI, M. et A.G. Smith. 1982. "Sex differences in the metabolism of hexachlorobenzene by rats and the development of porphyria in females." Biochem. Pharmacol. Vol. 31, p. 3543-3548.

RIZZARDINI, M., L. Cantoni, P. Villa et P. Ubezio. 1990. "Biochemical, morphological and flow-cytometric evaluation of thhe effects of hexachlorobenzene on rat liver." Cell Biol. Toxico. Vol. 6, p. 185-203.

ROBEL, P., R. Emiliozzi, E.E. Baulieu. 1966. "5 β -androtane-3 α 17 β -diol-3-H17-glucuronide-¹⁴C the direct 5 β -metabolism of testorone glucuronide." J. Biol. Chem. Vo. 241, p. 5879-5885.

ROBINSON, P.E., G.A. Mack, J. Remmers, R. Levy et L. Mohadjer. 1990. "Trends of PCB, hexachlorobenzene, and β -benzene hexachloride levels in adipose tissue of the U.S. population. Environ. Res. Vol. 53, p. 175-192.

ROJKIND, M., M.L. Portales et M.E. Cid. 1974. "Isolation of rat liver cells containing concanavalin-A receptor-A receptor sites." FEBS Letters. Vol. 47, p. 11-14

ROSENBAUM, J., P. Mavier et D. Dhumeaux. 1991. "Interactions cellulaires dans le foie". Médecine/Sciences. Vol. 7, p. 110-117.

SAAD, BASHAR, Hanspeter Schawalder et Peter Maier. 1993. "Crude liver membrane fractions as substrate preserve liver-specific functions in long-term, serum-free rat hepatocyte cultures". In Vitro Cell. Dev. Biol. Vol. 29A p. 32-40.

SAETER, G ET P.O. Seglen. 1990. "Cell biology of hepatocarcinogenesis." Crit. Rev. Oncogenesis. Vol. 1,p. 437-466.

SANTÉ ET BIEN-ÊTRE SOCIAL CANADA. 1993. "Liste des substance d'intérêt prioritaire. Rapport d'évaluation: Hexachloropenzène. " 56p.

SAWADA, N. et H. Tsukada. 1982. "Changes in phalloidin-sensirivitu of hepatocytes of rats during 2-acetylaminofluorene carcinogenesis." Tumor Res. Vol. 17, p. 39-50.

SAWADA, N., A. Tomomura, C.A. Sattler, G.L. Sattler, H.K. Kleinman et H.C. Pitot. 1986. "Extracellular matrix component influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture." Exp. Cell. Res. Vol. 167, p. 458-470.

SCHEUFLER, E. et K.K. Rozman. 1984. "Comparative decontamination of hexachlorobenzene exposed rats and rabbits by hexadecane." J. Toxicol. Environ. Health. Vol. 14, p. 353-362.

SCHULTE-HERMANN, R. 1974. "Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli." CRC Crit. Rev. Toxicol. Vol. 3, p. 97-158.

SCHULTE-HERMANN, R., W. Parzefall et W. Bursch. 1987. "Role of stimulation of liver growth by chemicals in hepatocarcinogenesis." In Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis. N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, 1987, p. 91-104.

SCHWARZE, P.E., A.E. Solheim et P.O. Seglen. 1982. "Amino acid and energy requirements for rat hepatocytes in primary culture." In Vitro. vol. 18, p. 43-54.

SCIOT, R., G. Verhoeven, P. Van Eyken, J. Cailleu et V.J. Desmet. 1990. "Transferrin receptor expression in rat liver: immunohistochemical and biochemical analysis of the effect of age and iron storage." Hepatology. Vol. 11, p. 416-427.

SEGLEN, P.O.. 1972. "Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{2+} on enzymatic dispersion of isolated perfused liver." Exp. Cell. Res. Vo. 76, p. 25.

SEGLEN, P.O.. 1973. "Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion." Exp. Cell. Res. Vol. 76, p. 25-30.

SELDÉN, A., G. Jacobson, P. Berg et O. Axelson. 1989. "Hepatocellular carcinoma and exposure to hexachlorobenzene; a case report." Brit. J. Indust. Med. Vol. 46, p. 138-140.

SHALEV, A., A.H. Greenberg et P.J. McAlpine. 1980. "Detection of attograms of antigen by a high-sensitivity enzyme-linked immuno-adsorbant assay (HS-ELISA) using a fluorogenic substrat." J. Immunol. Methods. Vo. 38, p. 125-139.

SHI, Y.E. et J.D. Yager. 1989. "Effects of the liver tumor promoter ethinyl estradil on epidermal growth factor-induced DNA synthesis and epidermal growth factor reeptor levels in cultured rat hepatocytes." Cancer Res. Vol. 49, p. 3574-3580.

SHIGENAGA, M.K., C.J. Gimeno et B.N. Ames.. 1989. "Urinary oxy-2'-deoxysine as a biological marker of in io oxidative DNA damage." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 86, p. 9697-9701.

- SIEKEL P., I. Chaloupka, J. Beno, M. Blasko, J. Novotny et J. Burian. 1991. "A genotoxicological study of hexachlorobenzene and pentachloroanisole." Terato. Carcino. Mutagen. Vol. 11, p. 55-60.
- SINGH, B., B. Borrelaeck et H. Osmundsen. 1983. "Separation of different cell populations of rat liver by density gradient centrifugation in a vertical rotor with self-generated percoll gradients." Acta Physiol. Scand. Vol. 117, p. 497-505.
- SIVAK, A., M.M. Goyer et P.F. Ricci. 1987. "Nongenotoxic carcinogens: prologue." In B.E. Butterworth et T.J. Slaga (Éds.). Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis. New York: Colk spring harvor laboratory, 1987, p. 1-6.
- SKETT, P.. 1994. "Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/métabolism-based toxicity testing-solution?" Toxicol. In Vitro. Vol. 8, p. 491-504.
- SMITH, M.S., M.E. Freeman et J.D. Neill. 1975. "The control of progesterone secretion during estous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy". Endocrinology. Vol. 96, p. 219-228.
- SMITH, A.G. et J.R. Cabral. 1980. "Liver-cell tumours in rats fed hexachlorobenzene". Cancer Let. Vol. 11, p. 169-172.
- SMITH A.G., J.E. Francis, D. Dinsdale, M.M. Manson et J.R.P. Cabral. 1985. "Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sec difference in hepatic iron status and development of porphyria." Carcinogenesis. Vol. 6, p. 631-636.
- SMITH, A.G., J.E. Francis, J.A. Green, J.B. Greig, C. Roland et M.M. Manson. 1990. "Sex-linked hepatic uroporphyrin and the induction of cytochromes P4501A in rats caused by hexachlorobenzene and polychlorinated biphenyls." Biochem. Pharmacol. Vol. 40, p. 2059-2068.
- STEWART, F.P. et A.G. Smith. 1986. "Metabolism of the 'mixed' cytochrome P-450 inducer hexachlorobenzene by rat liver microsomes." Biochem Pharmacol. Vol. 35, p. 2163-2170.
- STEWART, F.P. et A.G. Smith. 1987. "Metabolism and covalent binding of hexachloroben by iated male and female rat hepatocytes." Biochem. Pharmacol. Vol. 36, p. 2232-2234.
- STEWART, F.P., M.M. Manson, J.R.P. Cabral et A.G. Smith. 1989. "Hexachlorobenzene as a promoter of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis in rats and comparison with induction of porphyria". Carcinogenesis. Vol.10, p. 1225-1230.
- STOHS, S.J.. 1990. "Oxydative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." Free Radical Biol. Med. Vol. 9, p. 79-90.

STOLZ, D. B. et G.K. Michalopoulos. 1994. "Comparative effects of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor on motility, morphology, mitogenesis, and signal transduction of primary rat hepatocytes." J. Cell Biochem. Vol. 55, p. 445-464.

SUMNER, I.G., R.B. Freedman, A. Lodola. 1983. "Characteristics of hepatocytes sub-populations generated by centrifugal elutriation." Eur. J. Biochem. Vol. 134, p. 539-545.

THOMPSON, Jr. E.R., P.K. Siiteri. 1974. "The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization." J. Biol. Chem. Vol. 249, p. 5373.

TOMATIS, L.. 1993. "Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report." Environmental Health Perspect. Vol. 101 (suppl. 5), p. 149-152.

TONDA, K., T. Hasegawa et M. Hirata. 1983. "Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatments on monooxygenase activities and proportions of isolated rat hepatocyte sub-populations." Mol. Pharmacol. Vol. 23, p. 235-243.

TRENTHAM, D.R. et H. Gutfreund. 1968. "The kinetics of the reaction of nitrophenyl phosphates with alkaline phosphatase from *Escherichia coli*." Biochem. J. Vol. 106, p. 455-460.

WARWICK, G.P. .1971. "Effect of the cell cycle on carcinogenesis." Fed. Proc. Vol. 30, p. 1760-1765.

WEISZ, J., Q.D. Bui, D. Roy, J.G. Liehr. 1992. "Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens." Endocrinology Vol. 131, p. 655-661.

WELDER, A.A., J.W. Robertson et R.B. Melchelt. 1995. "Toxic effects of anabolic-androgenic steroids in primary rat hepatocyte culture." J.Pharmacol. Toxicol. Methods. Vol. 33, p. 187-195.

WILLIAMS, F.M. et J.M. Gunn. 1974. "Long term cell culture of adult rat liver epithelial cells." Exp. Cell. Res. Vol. 89, p. 139-142.

WILLIAMS, G.M.. 1977. "Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures." Cancer Res. Vol. 37, p. 1845-1851.

WILLIAMS, G.M., E. Bermudez et D. Scaramuzzino. 1977. "Rat hepatocytes primary cell cultures. III. Improved dissociation and attachment techniques and the enhancement of survival by culture medium." In Vitro. Vol. 13, p. 809-817.

WILLIAMS, D.T., G.L. Lebel, E. Junkins. 1988. "Organohalogen residues in human adipose autopsy samples from six Ontario municipalities." J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 71, p.410-414.

WILLIAMS, G.M., M.J. Iatropoulos et J.H. Weisburger. 1996. "Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology." Exp. Toxic. Pathol. Vol. 48, p. 101-111.

WILSON C.A. et A.J. Leigh. 1992. "Endocrine toxicology of the female reproductive système." In C.K. Atterwill et J.D. Flack (éds) Endocrinol. Toxicol. Grande-Bretagne; Cambridge University Press, 1992, p.313-395.

WÖLFLE, D., E. Becker et C. Schmutte. 1993. "Growth stimulation of primary rat hepatocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Cell. Biol. Toxicol. Vol. 9, p.15-31.

YAGER, J.D., J. Zurlo et N. Ni. 1991. "Sex hormones and tumor promotion in liver." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol. 198, p. 667-674.

YAGER J.D. et J.G. Liehr. 1996. "Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Vol. 36, p. 203-232.

ZEIGER, E.. 1987. "Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity." Cancer Res. Vol. 27, p. 1287-1296.

ZEYMER, U., M.C. Fishbein, J.S. Forrester, et B. Cercek. 1992. "Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry in rat aorta after balloon denudation." American J. Pathol. Vol. 141, No. 3, p. 685-690.

