

Université du Québec  
INRS Institut Armand-Frappier Santé Humaine

Études de la localisation tissulaire de la connexine 32 et de la prolifération  
cellulaire dans le foie des rats traités à l'hexachlorobenzène

Par  
David Leclerc

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade M.Sc. en Science expérimentale de la santé

Jury d'évaluation

Examineur interne	Darakhshan Ahmad INRS Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Philip Spear Université de Montréal
Directeur de recherche	Michel Charbonneau INRS Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Daniel Cyr INRS Institut Armand-Frappier

## Résumé

L'hexachlorobenzène (HCB) est un contaminant de la famille des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés largement répandu dans l'environnement. Étant donné ses propriétés lipophiles, l'HCB a tendance à se bioaccumuler dans l'environnement. Plusieurs études ont démontré que l'HCB est cancérigène chez l'animal et qu'il est un promoteur de tumeurs hépatiques. D'autre part, un dimorphisme sexuel a été démontré dans la réponse des rats à l'HCB. Les femelles sont en effet plus susceptibles de développer des tumeurs hépatiques que les mâles. Les données actuelles ne permettent pas de déterminer si le HCB pourrait être cancérigène chez l'humain, c'est pourquoi des études ont été entreprises afin de déterminer les mécanismes d'action de l'HCB dans le développement de tumeurs hépatiques et d'en arriver à établir un seuil d'exposition acceptable pour la population.

Les travaux du présent mémoire visent la caractérisation des effets de l'HCB sur la promotion de tumeurs hépatiques chez le rat. L'étude a porté principalement sur la prolifération cellulaire et la localisation dans le foie des rats femelles de la connexine 32 (Cx32), impliquée dans la communication intercellulaire, chez les rats mâles et femelles suite à un traitement à l'HCB. Une hausse du taux de prolifération cellulaire et une baisse de la communication intercellulaire sont des caractéristiques communes à plusieurs carcinogènes épigénétiques.

Le modèle expérimental utilisé consiste en l'administration par gavage d'une dose quotidienne d'HCB durant 5 jours consécutifs; les rats sont sacrifiés aux jours 50 ou 100 du protocole de traitement. La localisation tissulaire de la Cx32 des rats femelles a été observée au jour 45 du protocole. Des travaux précédents dans notre laboratoire ont démontré que l'HCB réduit l'expression de la Cx32 à ce temps chez le rat femelle. Une analyse par immunohistochimie de la Cx32 a été effectuée afin de déterminer si cette baisse est localisée en endroits précis du lobule hépatique ou si l'HCB agit sur l'ensemble des hépatocytes. Les résultats ont montré que l'HCB cause une diminution de l'expression de la Cx32 qui s'étend aux hépatocytes de toutes les régions du foie.

Lors de l'étude portant sur la prolifération cellulaire, les hépatocytes ont été isolés du foie par une technique de perfusion avec une solution de collagénase. La mesure de la prolifération cellulaire au niveau du foie a été effectuée par une analyse en cytométrie en flux du contenu en ADN des hépatocytes isolés permettant de déterminer le pourcentage de cellules présentant une ploïdie de 2N, 4N ou 8N. Les résultats obtenus ont permis de déterminer que le HCB n'induit pas de prolifération cellulaire entre la fin du traitement et le jour 50 ou le jour 100 du protocole, et ce, tant chez les mâles que chez les femelles.

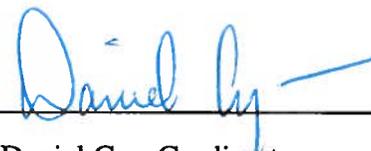
Les résultats infirment l'hypothèse que l'HCB augmente la prolifération cellulaire afin de permettre l'expansion des cellules plus susceptibles de devenir tumorales. Néanmoins, l'ensemble des hépatocytes semblent démontrer une baisse de la communication intercellulaire caractérisée par une baisse de la Cx32. Une observation novatrice importante est l'absence de lien entre la baisse de la communication intercellulaire et le taux de prolifération de hépatocytes. Le dimorphisme sexuel dans l'effet hépatique de l'HCB semble donc reposer très fortement sur la perte de communication intercellulaire à la grandeur du foie.



David Leclerc, Étudiant



Michel Charbonneau, Directeur



Daniel Cyr, Co-directeur

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Michel Charbonneau, ainsi que mon co-directeur, Daniel Cyr, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et m'ont procuré un soutien logistique et moral tout au long de la maîtrise. C'est en grande partie grâce à eux si ce projet vient maintenant à terme.

Merci également à Guylaine Lassonde pour son aide indispensable dans l'apprentissage des nombreuses techniques employés dans le cadre de ce projet, et pour les nombreux conseils

Merci aussi à Marcel Desrosiers pour ses enseignements sur l'utilisation adéquate et l'historique du cytomètre en flux.

Merci à Jacques Lussier et Daniel Venne pour avoir assuré le suivi des animaux employés dans le présent travail.

Merci enfin à mes collègues de laboratoire pour les discussions, les conseils et le soutien dont ils ont fait part. Isabelle, Gianni, Ben, Stéphanie, Jean-Marc, Stéphane et les autres.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	iv
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Revue de littérature et présentation des objectifs de recherche</b>	
1.1 L'hexachlorobenzène.....	4
1.1.1 Généralités.....	4
1.1.2 Effets de l'HCB sur la santé.....	6
1.2 Le foie.....	8
1.3 Le cancer du foie.....	9
1.3.1 Généralités.....	9
1.3.2 Carcinogènes génotoxiques et épigénétiques.....	12
1.3.3 Le potentiel cancérigène de l'HCB : un modèle d'étude de l'hépatocarcinogénèse.....	14
1.3.4 Hypothèses de mécanismes d'action de l'HCB.....	15
1.3.5 La communication intercellulaire.....	17
1.3.5.1 Les jonctions lacunaires.....	17
1.3.5.2 Les jonctions lacunaires et le développement de tumeurs hépatiques.....	19
1.3.6 La prolifération cellulaire.....	23
1.3.6.1 Cycle de division standard.....	23
1.3.6.2 Polyploïdie de hépatocytes.....	25
1.3.6.3 La prolifération cellulaire et le cancer.....	28
1.3.6.4 La prolifération cellulaire comme facteur de risque.....	31

1.4 Objectifs de recherche.....	32
 <b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
2.1 Matériel général.....	34
2.2 Traitement des animaux.....	35
2.3 Immunohistochimie de la connexine 32 .....	38
2.3.1 Sacrifice des animaux et obtention de lames de cryosections.....	38
2.3.2 Marquage de la connexine 32.....	38
2.3.3 Analyse en microscopie à fluorescence.....	38
2.4 Perfusion, isolation et analyse des hépatocytes.....	39
2.4.1 Perfusion du foie de rat.....	39
2.4.2 Décompte et évaluation de la viabilité des cellules...	41
2.4.3 Marquage de l'ADN des cellules.....	42
2.4.4 Analyse en cytométrie en flux.....	42
2.5 Analyses statistiques.....	45
 <b>Chapitre 3 : Résultats</b>	
3.1 Immunohistochimie de la connexine 32 .....	46
3.1.1 Spécificité du marquage de la connexine 32.....	46
3.1.2 Effets du traitement HCB sur la localisation de la connexine 32.....	48
3.2 Prolifération cellulaire suite au traitement à l'HCB.....	50
3.2.1 Reproductibilité des analyses par cytométrie en flux....	50
3.2.2 Validation de la technique utilisée pour détecter la prolifération cellulaire <i>in vivo</i> .....	52
3.2.3 Effets du traitement HCB sur la prolifération cellulaire dans le foie.....	54

## **Chapitre 4 : Discussion**

4.1 L'expression de la Cx32 suite au traitement à l'HCB.....	57
4.2 L'effet du HCB sur la prolifération cellulaire.....	59
4.3 L'apoptose.....	63
Conclusion.....	65
Références citées.....	66

## Liste des figures

Figure 1.1 :	Représentation de la molécule d'hexachlorobenzène.....	4
Figure 1.2 :	Photographie à faible grossissement d'une coupe de foie humain illustrant la conformation classique d'un lobule.....	10
Figure 1.3 :	A) Cycle cellulaire standard. B) Analyse du contenu cellulaire en ADN d'une population de cellules diploïdes en croissance. ....	18
Figure 1.4 :	A) Polyploïdisation des hépatocytes. ....	24
	B) Distribution typique de l'ADN dans une population d'hépatocytes chez un rat femelle adulte. ....	24
Figure 1.5 :	Représentation schématique d'un connexon.....	26
Figure 2.1 :	Protocole de traitement à l'HCB et temps de sacrifices pour les deux expériences présentées dans le présent mémoire....	36
Figure 2.2 :	Montage expérimental pour la perfusion du foie de rat. ....	40
Figure 2.3 :	Protocole d'acquisition lors de l'analyse de s hépatocytes en cytométrie en flux. ....	44
Figure 3.1 :	A) Observation à 100x d'une section de foie de rat. ....	47
	B) Témoin négatif du marquage de la Cx32 à 100x. ....	47
	C) Observation à 400x d'une section de foie de rat témoin...	47
Figure 3.2 :	Marquage immunohistochimique de la connexine 32 sur des cryosections de foie de rats tel qu'observé en microscopie à fluorescence à 100x.....	49
Figure 3.3 :	Effet du traitement CCl <sub>4</sub> sur la ploïdie des hépatocytes. ....	53

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Liste de substances provoquant un effet spécifiquement chez les mâles ou les femelles. ....	13
Tableau 1.2 : Phénotypes observés chez les souris chez qui on a supprimé l'expression d'une connexine spécifique.....	20
Tableau 3.1 : Comparaison de trois lectures consécutives d'un même échantillon cellulaire en cytométrie en flux.....	51
Tableau 3.2 : Comparaison de l'analyse consécutive de trois échantillons provenant d'un même individu.....	51
Tableau 3.3 : A) Effet de l'HCB sur la ploïdie des populations d'hépatocytes chez les rats mâles et femelles au jour 50 du protocole de traitement.....	56
B) Effet de l'HCB sur la ploïdie des populations d'hépatocytes chez les rats femelles au jour 100 du protocole de traitement..	56

## Introduction

L'hexachlorobenzène est un contaminant largement répandu dans l'environnement. Il fait partie de la famille des organochlorés, dont font aussi partie le lindane, les biphényles polychlorés (BPC) et le dichlorodiphényltrichloroethylene (DDT). Cette substance a longtemps été utilisée comme fongicide en agriculture, mais cette utilisation a été interdite au Canada en 1972. Cependant, l'HCB continue à être relargué dans l'environnement à partir d'une multitude de sources, telles la production de pesticides et de solvants chlorés dont l'HCB est un sous-produit. Le caractère lipophile de la molécule lui permet de s'accumuler partout dans l'environnement. Une étude de Williams (1988) a permis de constater que le HCB est retrouvé en faible quantité chez virtuellement toute la population dans les pays industrialisés. Or, comme la lactation est une voie importante d'élimination de l'HCB, chez les nouveaux-nés se nourrissant au lait maternel, l'ingestion quotidienne d'HCB dépasse largement la valeur acceptable d'ingestion journalière ("*tolerable daily intake*", ou TDI), évaluée par Newhook et Meek (1994), ce qui en fait un groupe à risque.

Le foie est un organe cible pour l'HCB. Le HCB est reconnu comme un inducteur de tumeurs hépatiques chez les animaux lorsqu'il est administré de façon chronique (Cabral *et al.*, 1977; Cabral *et al.* 1979; Lambrecht *et al.*, 1983; Arnold *et al.*, 1985). On sait aussi que le HCB agit comme promoteur de tumeurs hépatiques chez les rats (Smith *et al.*, 1989). Par contre, il n'existe que très peu d'études portant sur les risques cancérigènes de l'HCB chez l'humain. C'est pourquoi le gouvernement du Canada a classé l'HCB comme étant un cancérigène possible chez l'humain (Newhook et Meek, 1994) et a recommandé l'étude des mécanismes de l'HCB dans le processus de cancérogenèse chez différentes espèces animales afin d'être en mesure de mieux évaluer le risque posé à la santé humaine. Les travaux présentés dans le présent mémoire, qui visaient justement à caractériser l'action de l'HCB dans la promotion de tumeurs hépatiques *in vivo* chez le rat, sont donc très pertinents quant à la problématique actuelle de l'HCB.

L'HCB est un carcinogène épigénétique, c'est à dire qu'il n'a pas d'effet génotoxique direct, mais qu'il module, via l'expression de gènes ou de protéines, les différents paramètres de l'homéostasie cellulaire, dont le taux de prolifération et a communication intercellulaire. Ce sont ces deux éléments qui ont été à l'étude lors des travaux présentés ici et qui seront discutés au cours des prochains paragraphes.

La prolifération cellulaire est un mécanisme essentiel au développement de tumeurs. De nombreux promoteurs ont démontré leur capacité à induire la prolifération chez les hépatocytes (Butterworth et Goldsworthy, 1991; Elridge *et al.*, 1992; Kolaja *et al.*, 2000; Krutovskikh *et al.*, 1995). De même, la baisse de la communication intercellulaire est une caractéristique commune à de nombreux, sinon tous les types de tumeurs (Nguyen-ba et Vasseur, 1999). Il est donc important de mieux connaître l'influence de l'HCB sur chacun de ces paramètres afin de mieux comprendre son mécanisme de promotion de tumeurs hépatiques.

Des travaux antérieurs ont démontré que les rats femelles étaient plus susceptibles que les mâles à l'effet de l'HCB (Pereira *et al.*, 1982; Plante *et al.*, 2002). Dans le protocole de traitement animal employé dans ces travaux, les rats sont traités à l'HCB durant cinq jours consécutifs (Krishan *et al.*, 1991). L'administration d'un initiateur de tumeurs tel que le dimethylnitrosamine (DEN) 95 jours après la fin du traitement, les femelles développeront environ trois fois plus de tumeurs que les mâles. L'HCB a donc eu un effet sur la modulation de l'homéostasie cellulaire entre la fin du traitement et le moment de l'initiation au DEN. Des travaux précédents de notre laboratoire ont démontré une baisse de la communication intercellulaire et de l'expression de la connexine 32 (Cx32) durant cette période de latence (Plante *et al.*, 2002). La Cx32 est une protéine membranaire impliquée dans la formations de connexons, des canaux intercellulaires permettant une communication via le passage de molécules de faible poids moléculaire (Simon et Goodenough, 1998a). C'est dans le but d'approfondir les connaissances sur les modulations causés par l'HCB durant cette période que les travaux qui font l'objet du présent mémoire ont été effectués.

Les objectifs des travaux présentés ici visent à déterminer si l'HCB induit une prolifération cellulaire, et ce préférentiellement chez la femelle. Dans un deuxième temps, ils visent à caractériser la baisse de l'expression de la Cx32 afin de savoir si celle-ci est localisée en des endroits précis du foie ou si elle frappe l'ensemble des hépatocytes.

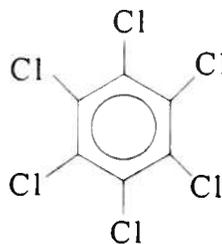
Ce mémoire se divise en quatre sections distinctes. Dans la première, on retrouve une revue de littérature qui fait le point sur l'avancée des connaissances sur l'HCB, ses effets sur la santé, la carcinogénèse et les rôles qu'y jouent la prolifération cellulaire et la communication cellulaire via les jonctions lacunaires. La section se termine par la définition spécifique des objectifs de recherche des travaux de recherches poursuivis dans le cadre de ce mémoire. La seconde section présente de façon détaillée le matériel et les différentes techniques employés dans le but d'évaluer la prolifération des hépatocytes et d'effectuer la caractérisation tissulaire de la baisse de l'expression de la Cx32. La troisième section rapporte les observations et résultats obtenus. Enfin, la dernière section discute de l'incidence des résultats quant à l'avancement des connaissances sur l'effet promoteur de l'HCB.

# Chapitre 1 : Revue de littérature et présentation des objectifs de recherche

## 1.1 L'Hexachlorobenzène

### 1.1.1 Généralités

L'hexachlorobenzène (HCB,  $C_6Cl_6$ , figure 1) est un contaminant largement répandu dans l'environnement. Il fait partie de la famille de hydrocarbures aromatiques polyhalogénés, laquelle comprend également des molécules comme les biphényles polychlorés (BPC) et les chlorodibenzodioxines (dont la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou TCDD).



**Figure 1.1** Représentation de la molécule d'hexachlorobenzène.  
La molécule est composée d'un anneau benzène dont chaque atome de carbone est attaché à un atome de chlore

L'HCB a longtemps eu de nombreuses utilisations en agriculture ainsi que dans l'industrie. En 1940, l'HCB a été développé comme agent fongicide pour les semences telles que l'orge et le blé (Newhook et Meek, 1994). Cette utilisation a cependant été discontinuée au Canada en 1972 parce que l'on craignait qu'il y ait des effets nocifs sur l'environnement et la santé de la population (World Health Organization, 1997). L'HCB a également été utilisé entre autre dans la fabrication de pièces pyrotechniques, de balles

traçantes et comme préservatif pour le bois (Newhook et Meek, 1994). Depuis les années 80, il n'y a aucune production commerciale d'HCB (World Health Organization, 1997). Cependant, l'HCB est toujours relargué dans l'environnement puisqu'il est un sous-produit de la fabrication et de l'utilisation de plusieurs composés chimiques tels que les solvants chlorés, dont le tétrachlorure de carbone et le trichloroéthylène, et de pesticides. On a évalué la production mondiale d'HCB à 10 000 tonnes par année entre les années 1978 à 1981 (Rippen et Franck, 1986). Depuis les années '70, la production d'HCB a diminué suite aux restrictions liées à son utilisation. Cependant, étant donné sa haute mobilité et sa résistance à la dégradation, l'HCB est toujours très répandu dans l'environnement. Sa forte propension à se bioaccumuler fait que l'HCB est retrouvé dans le sol, l'eau et l'air, ainsi que chez les plantes et les animaux (Newhook et Meek, 1994).

Une étude de William (1988) a démontré la présence de l'HCB en faible quantité dans les tissus adipeux de virtuellement toute la population des pays industrialisés. L'ingestion de l'HCB se fait principalement par la consommation d'eau ou de nourriture, en particulier les produits laitiers, contaminés à l'HCB. On a évalué qu'un canadien de 70 kg et ayant une espérance de vie de 70 ans aura une ingestion quotidienne d'HCB de 6,2 ng/kg de poids corporel. Cette valeur varie avec l'âge : en effet, les très jeunes enfants se nourrissant du lait maternel auront une ingestion quotidienne de 214 ng/kg de poids corporel, ce qui est de loin supérieure à celle des adolescents, qui est de 4,8 ng/kg de poids corporel, ou de celle des adultes, qui est de 2,8 ng/kg de poids corporel (Gouvernement du Canada, 1993). Il y a peu d'études portant sur l'absorption d'HCB chez l'humain, on sait cependant que l'HCB passe de façon passive de l'intestin au sang, pour être ensuite distribué dans les différents organes et tissus (Matthews, 1986). Dans une courte étude, le groupe de Schechter (1989) a pratiqué une série d'autopsie sur des gens de la population générale et a observé que la plus forte concentration de HCB se retrouvait, dans l'ordre, dans les tissus adipeux, les tissus surrénaux, la moelle osseuse puis dans le foie. Ces observations sont supportées par de nombreuses études en laboratoire sur différents animaux qui démontrent que l'HCB s'accumule majoritairement dans les tissus lipidiques, tels que les tissus adipeux, le tissu surrénal et les différentes glandes endocrines (Kuiper-Goodman *et al.*, 1977; Foster *et al.*, 1993). Chez l'humain,

la concentration dans les tissus augmente avec l'âge, mais il n'y a pas de différences significatives entre les sexes (World Health Organization, 1997).

Étant donné que l'anneau de benzène de la molécule d'HCB est saturée par le chlore et que l'HCB a tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux, son métabolisme se fait lentement. Le métabolisme se fait selon deux voies principales : la voie oxydative, conduisant à la formation de substances telles que le pentachlorophénol, le tetrachlorohydroquinone et le tetrachloro-benzoquinone, puis la voie de conjugaison au glutathion, qui est une voie de détoxification produisant des métabolites tel que le pentachlorothiophenol. Le métabolisme de l'HCB se fait principalement au niveau du foie. Son excrétion et celle de ses métabolites se fait principalement via les selles (Matthews, 1986). D'autre part, l'HCB a la capacité de traverser la barrière placentaire de même que la lactation peut devenir une voie importante de détoxification pour les mères (Linder *et al.*, 1983; Nakashima *et al.*, 1997).

### **1.1.2 Effets de l'HCB sur la santé**

L'HCB peut causer une porphyrie cutanée et on a observé le développement de tumeurs hépatiques chez des animaux y étant exposé de façon chronique. L'HCB peut également avoir une influence notable sur le système reproducteur, le développement des embryons, sur le système immunitaire et le système nerveux (Courtney, 1979; Babineau *et al.* 1991; Newhook et Meek, 1994; Mylchreest et Charbonneau, 1994).

La porphyrie cutanée tardive, causée par une exposition à l'HCB, est un phénomène qui a été largement étudié et il est probablement l'effet toxique le plus marqué de l'HCB. Elle résulte de l'inhibition d'une enzyme impliquée dans la synthèse de l'hème, ce qui entraîne l'accumulation de porphyrines ou de précurseurs de la porphyrine dans le foie et l'urine. Ceci provoque la formation de lésions cutanées ainsi qu'une photosensibilité de la peau. Des études rapportent un dimorphisme sexuel face à la réponse porphyrique suite à une exposition à l'HCB chez les rats (Krishan *et al.*, 1991; Kuiper-Goodman *et al.*, 1977). En effet, les rats femelles sont plus sensibles à l'exposition à l'HCB et développent d'une porphyrie plus marquée que chez les mâles

(Rizzardini et Smith, 1982). Plusieurs voies sont explorées afin d'expliquer cet écart entre les deux sexes, dont une différence dans le niveau d'expression de l'induction de cytochrome P-450 spécifiques entre rats mâles et femelles (Smith *et al.*, 1990), le métabolisme via la voie métabolique de la conjugaison du glutathion plus rapide chez les femelles (Rizzardini et Smith, 1982) ou la modulation des hormones stéroïdiennes (Legault *et al.*, 1997).

C'est en Turquie, entre 1955 et 1959, qu'on a vu la pire épidémie de porphyrie chez l'humain suite à une intoxication à l'HCB. Plus de 600 cas de porphyrie cutanée tardive ont été rapportés, principalement chez des enfants, après qu'on aie accidentellement transformé du grain traité à l'HCB et destiné à l'agriculture en farine pour en faire du pain. On a évalué qu'entre 3000 et 5000 personnes ont été affectés par cet incident, et que le taux de mortalité était de 10% (Peters, 1976). Près de 95% des enfants en bas âges et se nourrissant au lait maternel sont mort dans l'année qui a suivie, de sorte que de nombreux villages ne comptaient aucun enfant âgée entre 2 et 5 ans entre les années 1955 et 1959 (Peters *et al.*, 1978). Les effets de la contamination ont persisté et on observait toujours des symptômes de porphyrie 25 ans après l'accident (Crisp *et al.*, 1984).

Il n'existe que peu de données portant sur l'incidence de l'HCB sur la formation de tumeurs chez l'humain. Les études qui ont fait suite à l'épisode d'épidémie en Turquie ne portaient pas sur le cancer. Une étude de cas fait état d'un ouvrier ayant travaillé comme contremaître dans une fonderie d'aluminium et qui a été exposé, entre autres, à des vapeurs d'HCB, mais aussi à d'autres hydrocarbures aromatiques chlorés, a développé une carcinome hépatique (Selden *et al.*, 1989). En somme, il n'existe pas de données quantitative portant sur la cancérogenèse de l'HCB chez l'humain pour nous permettre d'effectuer une analyse de risque sur le potentiel cancérogène de l'HCB sur les populations exposées.

Une administration chronique d'HCB est cancérigène chez les animaux, particulièrement au niveau du foie. L'équipe de Cabral (1977, 1979), celle de

Lambrecht (1983) et celle d'Arnold (1985) ont démontré, en utilisant plusieurs niveaux de doses et un temps de traitement prolongé, une augmentation significative du nombre de tumeurs hépatiques chez le rat, la souris et le hamster. À l'instar du développement de porphyries chez les animaux, les femelles sont plus susceptibles à développer des tumeurs. Dans une étude de Smith et coll. (1985), la totalité des femelles ont développé des tumeurs suite à un traitement au HCB de 90 semaines, tandis que l'on a retrouvé des tumeurs plus petites et moins nombreuses chez seulement 16% des mâles.

Étant donné que le potentiel cancérigène de l'HCB a été démontré chez les animaux mais qu'il n'y a pas de données quantitative satisfaisante afin de déterminer si l'HCB est cancérigène chez l'humain, l'HCB est présentement considéré par le gouvernement canadien comme étant une substance toxique sans seuil d'exposition, c'est à dire une substance qui pourrait avoir des effets nocifs à n'importe quel niveau d'exposition (Gouvernement du Canada, 1993). Or, pour certains sous-groupes de la population, soit les poupons qui se nourrissent au lait maternel, l'ingestion journalière de l'HCB est supérieur à la valeur acceptable pour l'ingestion journalière ("*tolerable daily intake*" ou TDI), évaluée par Newhook et Meek (1994), qui est de 50 ng/kg/jour. Cette valeur est basée sur les données portant sur le développement de porphyries chez le rat et l'induction de l'activité d'enzymes au niveau du foie, mais n'inclue pas de données sur le potentiel cancérigène du foie. L'HCB a été classé dans le groupe 1 dans la liste des substances d'intérêt prioritaire de la loi canadienne sur la protection de l'environnement.

## 1.2 Le foie

Le foie est le plus gros organe chez l'humain et le rat. C'est une glande endocrine et exocrine dont les principales fonctions sont la régulation de la composition et la concentration des différentes substances qui circulent dans le sang, le meilleur exemple étant le contrôle de la concentration du glucose dans le sang, et la détoxification de l'organisme. Ce rôle de détoxification se fait par l'entremise du métabolisme des xénobiotiques ou par élimination via la bile (Marieb et Laurendeau, 1993). C'est pour cette raison que le foie est un organe cible pour toute une gamme de substances, dont les

organochlorés et l'HCB. C'est pourquoi les effets des organochlorés sur foie sont abondamment étudiés (Williams et Iatropoulos, 2002 ; Lerche-Langrand, 2000).

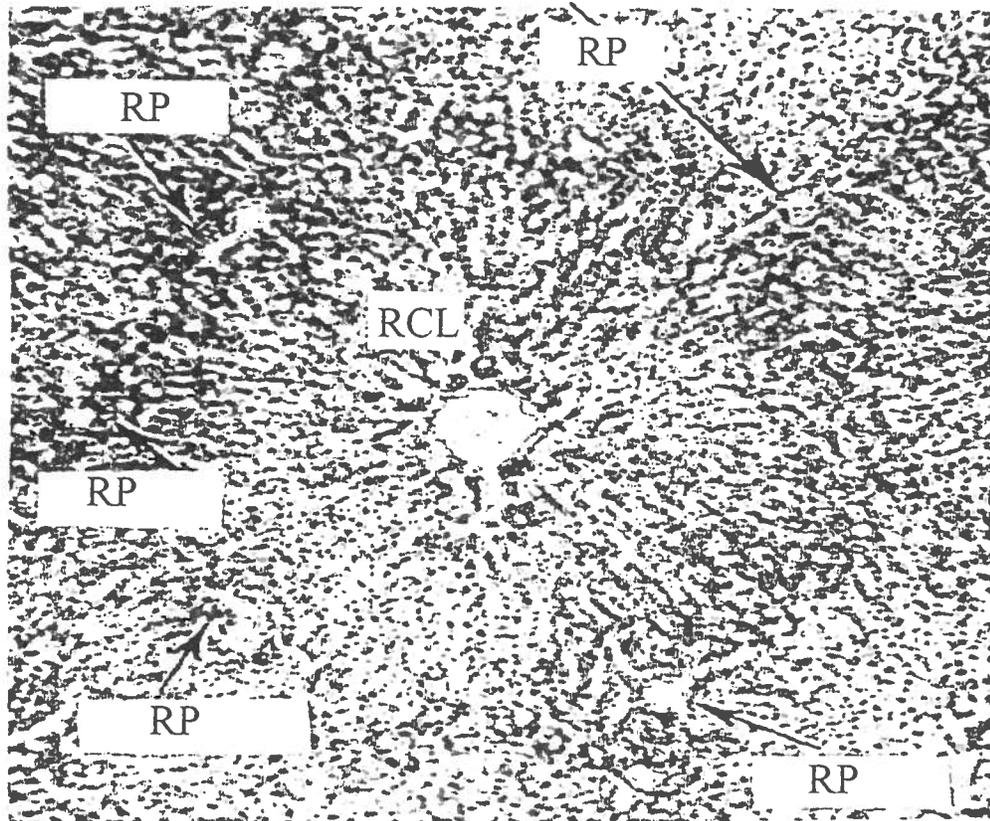
Le foie est composé de six classes de cellules : les hépatocytes, les cellules épithéliales biliaires, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer qui sont des macrophages du foie, les cellules de Ito qui sont des lipocytes et les "*pit cells*", des lymphocytes granulaires impliqués dans des fonctions anti-tumorales. Les hépatocytes, aussi appelés cellules parenchymateuses, sont les cellules les plus nombreuses et les plus volumineuses du foie. Elle composent 60% du nombre total des cellules dans le foie et occupent 80% de son volume total. Toutes les cellules qui ne sont pas des hépatocytes sont appelées non-parenchymateuses (Kmiec, 2001).

Le terme lobule désigne une unité fonctionnelle dans le foie. Ce concept représente les relations entre les hépatocytes quant à l'apport sanguin et le système biliaire. La figure 1.2 représente la configuration d'un lobule hépatique chez l'humain. Le foie chez l'humain est comparable à celui du rat. La veine porte est le vaisseau qui recueille le sang provenant du petit l'intestin. L'artère portale apporte du sang en provenance des poumons et qui est donc oxygéné. Le sang provenant de ces deux vaisseaux est dirigé vers la région centro-lobulaire où l'on retrouve la veine centrale, d'où il se rend par la suite vers le cœur et le reste de l'organisme. La bile circule en sens inverse du sang dans le lobule, donc de la région centro-lobulaire vers la région portale où on retrouve le canal lymphatique. On retrouve aussi dans la région portale le canal lymphatique, qui est parfois difficile de distinguer en microscopie (Ham et Leeson, 1961).

### **1.3 Le cancer du foie**

#### **1.3.1 Généralités**

On a recensé 58 703 cas de cancer au Canada durant l'année 1997. De ce nombre, 1663 cancers étaient localisés au niveau du foie et de la vésicule biliaire, dont 44 % chez les femmes (Statistique Canada, Statistiques canadiennes sur le cancer, 2001).



**Figure 1.2** Photographie à faible grossissement d'une coupe de foie humain illustrant la conformation classique d'un lobule. RP région portale; RCL région centro-lobulaire (Tiré de Ham et Leeson, 1961)

Cette maladie, peu courante en Amérique du Nord, est l'un des types de cancers les plus répandus dans les pays d'Asie et d'Afrique. On dénombre de nombreux facteurs de risques qui font augmenter les chances qu'une personne soit atteinte d'un cancer du foie. Parmi eux figurent les infections chroniques du foie, ou hépatites, causées par des virus, dont les virus de l'hépatite B et l'hépatite C. On retrouve également les cirrhoses, une maladie qui se développe lorsque les hépatocytes sont endommagés et remplacés par le tissu conjonctif, et qui peuvent être causées par l'abus d'alcool et de certaines drogues (National Cancer Institute, 2002). Autre facteur de risque, les hommes ont deux fois plus de chances de développer un cancer que les femmes. La présence d'aflatoxine, un produit toxique produit par certains champignons se développant sur les semences, peut lui aussi causer le cancer du foie (National Cancer Institute, 2002). Enfin, l'exposition à des substances chimiques peut également être un facteur dans le développement de tumeurs hépatiques en causant des mutations au niveau de l'ADN ou des modulations de gènes régulateurs de l'homéostasie (Kitchin et Brown, 1989; Jackson *et al.*, 1993).

La cancérogenèse est un processus complexe dans lequel une cellule normale ayant acquis la capacité de survivre et de grandir de façon indépendante des cellules avoisinantes va se développer en tumeur bénigne, puis maligne pour enfin se propager dans le reste de l'organisme. On divise généralement la cancérogenèse en trois phases (Butterworth et Goldsworthy, 1991). La première est l'initiation, caractérisée par la modification d'un caractère dans une cellule, une lésion de l'ADN par exemple, dont on pourra faire la promotion et qui deviendra le foyer d'un néoplasme. Cette modification est fixée dans le génome et peut donc être transmise lors des divisions cellulaires subséquentes. Durant la seconde phase, la promotion, on observe une prolifération localisée à l'endroit de l'initiation. Cette prolifération permet la croissance préférentielle des cellules initiées au détriment des cellules normales. Dans le foie, cette prolifération va conduire à la formation de nodules, des îlots de cellules initiées de 0,5 à 2mm de diamètre. Au cours de la phase finale, la progression, les nodules (ou autre foyers de prolifération dans d'autres tissus, tels que les papillomes dans le conduit urinaire ou la peau et les polypes dans l'intestin) subissent une lente évolution et deviennent tumeurs

malignes, ou cancer, c'est à dire une tumeur qui a la propriété d'entrer en métastase et se propager dans le reste de l'organisme (Farber, 1987).

On a dénombré de nombreuses substances chimiques, dont l'HCB, qui sont susceptibles d'influencer l'une ou l'autre des trois étapes de la cancérogenèse (Nguyen-Ba et Vasseur, 1999; Butterworth, 1990). Ces différentes substances toxiques ont des modes d'actions qui leur sont spécifiques. En se basant sur ces mécanismes, on peut généralement séparer ces substances en deux groupes : les carcinogènes génotoxiques et épigénétiques .

### **1.3.2 Carcinogènes génotoxiques et épigénétiques**

Les substances chimiques qui sont en mesure d'altérer l'ADN d'un tissu cible sont appelées génotoxiques. Cette habilité mutagène vient de leur propriété électrophile qu'elle possède directement ou qui vient suite à une activation métabolique par les cytochromes P450 et qui leur permettent de former des adduits avec l'ADN et ainsi modifier la structure ou le fonctionnement de la molécule (Williams, 1980). Cette catégorie comprend des substances telles que l'aflatoxin B<sub>1</sub>, le dimethylnitrosamine (DEN) et le fluorenylacétamide (Wild, 2002; Pitot *et al.*, 1996; Furuya *et al.*, 1984).

Environ 40% des toxiques cancérogènes ne sont pas mutagènes (Zeiger, 1987). Les substances qui ne causent pas de changement dans l'ADN des cellules cibles sont appelés non-génotoxiques, ou épigénétiques. Ces substances n'ont pas de configuration électrophile leur permettant de réagir avec l'ADN. Elles interfèrent avec les mécanismes de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de la communication des cellules initiées afin de faciliter le développement des tumeurs (Nguyen-Ba et Vasseur, 1999).

Il est intéressant de noter que l'on observe souvent un dimorphisme sexuel face à la réponse aux cancérogènes épigénétiques. Au niveau du foie, le phénobarbital, certains stéroïdes oestrogénique et des pesticides organochlorés tel que le DDT sont classés dans cette catégorie (Williams et Whysner, 1996; Yager et Liehr, 1996; Ren *et al.*,

**Tableau 1.** Liste de substances provoquant un effet spécifiquement chez les mâles ou les femelles.

	Femelles	Mâles	Pas de dimorphisme	Référence
PCB	+	-	-	Kimura et Baba (1973)
HCB	+	-	-	Pereira <i>et al.</i> (1982)
TCDD	+	-	-	Kociba <i>et al.</i> (1978)
3'-methyl-4- dimethylaminoazobenzène	-	+	-	Reuber <i>et al.</i> (1972)
N-4-(4'- fluorobiphenyl)acetamide	-	+	-	Stromberg et Reuber (1970)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	-	+	-	Wogan et Newberne (1967)
DEN	-	-	+	Reuber et Lee (1968)

1998) . Le tableau 1 énumère quelques substances, génotoxiques ou épigénétiques, chez lesquelles un dimorphisme sexuel a été observé.

L'étude de Siekel *et al.* (1991) sur la mutagenèse à court terme de l'HCB a démontré que celui-ci ne causait pas l'altération de l'ADN des cellules cibles. L'HCB est donc considéré comme un carcinogène épigénétique. Les résultats obtenus par notre laboratoire semblent indiquer que l'HCB a des effets sur la modulation de paramètres de l'homéostasie cellulaire, dont la prolifération cellulaire et la communication intercellulaire (Krishnan *et al.*, 1991; Plante *et al.*, 2002). Nous aborderons l'importance de ces paramètres dans le développement de tumeurs plus tard dans ce mémoire. Pour l'instant, il importe présenter le modèle d'étude employé dans les travaux du présent mémoire, et de se pencher sur les études portant sur la carcinogénicité de l'HCB afin d'en dégager les éléments pertinents aux travaux présentés ici.

### **1.3.3 Le potentiel cancérigène de l'HCB : un modèle d'étude de l'hépatocarcinogénèse**

Ce que nous apprennent les études de Cabral (1977, 1979), de Lambrecht (1983) et d'Arnold (1985) sur la réaction des rats, hamsters et souris lors d'une exposition à l'HCB, c'est qu'à dose continue et importante, prolongée sur une longue durée, il y aura développement de tumeurs hépatiques. Cependant, on ne retrouve pas ce type d'exposition dans l'environnement. Administré à plus faibles doses, le groupe de Stewart *et al.* (1989) a démontré que l'HCB pouvait agir comme promoteur dans un processus de carcinogénèse causé par le diethylnitrosamine (DEN), un initiateur de tumeurs hépatiques.

Notre laboratoire a développé un modèle permettant l'étude de l'effet promoteur de l'HCB dans le processus de carcinogénèse chez les rats Sprague-Dawley. Le design expérimental de ce modèle est inspiré d'une étude précédente portant sur le développement de la porphyrie (Krishnan *et al.*, 1991). Le modèle se compose de quatre étapes distinctes : (1) une phase de traitement où les rats reçoivent une dose quotidienne de HCB durant cinq jours consécutifs; (2) une période de latence entre les jours 6 et 95

où les rats ne reçoivent pas de traitement et durant laquelle la concentration d'HCB au niveau du foie décroît de façon exponentielle, de sorte que la concentration est inférieure à 1 µg/g au jour 100; (3) une dose de l'initiateur de tumeurs DEN est administrée; (4) on assiste à la formation de tumeurs entre les jours 100 et 465.

Une caractéristique importante de ce modèle est que le promoteur de tumeurs a été administré avant l'exposition au DEN et l'initiation de tumeurs. Les résultats ont démontré que les femelles traitées à l'HCB développaient trois fois plus de carcinomes et d'adénomes que les mâles. D'autre part, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre de tumeurs développées chez les rats n'ayant reçu que le DEN entre les mâles et les femelles. Il faut donc conclure que même si le DEN administré 90 jours après la fin du traitement HCB, et que la concentration d'HCB est très faible, les femelles sont plus sensibles à son effet promoteur. Il semble donc que l'HCB induit des changements dans la modulation de gènes au niveau du foie durant la période de latence (Krishnan *et al.*, 1991).

#### **1.3.4 Hypothèses de mécanismes d'action de l'HCB**

À ce jour, les mécanismes qui permettraient d'expliquer la susceptibilité des femelles aux effets de l'HCB demeurent méconnus. Quelques hypothèses ont été soulevées afin d'expliquer ce dimorphisme sexuel.

Une des hypothèses avancées a été la présence d'une variation dans le taux de transformation du HCB entre les rats mâles et femelles. Rizzardini et Smith (1982) ont observé que chez les rats F 344 traités à l'HCB, les femelles excrètent dans leurs urines une quantité supérieure de pentachlorothiophenol que chez les mâles. Cependant, cette hypothèse a été infirmée par les observations de Stewart et Smith (1987) selon lesquelles il n'existe qu'une très faible corrélation entre le taux de métabolisme de l'HCB et les effets porphyriques et carcinogéniques du HCB dans le foie. En fait, le métabolisme de l'HCB *in vivo* et *in vitro* étant très lent, il ne permet pas d'expliquer le dimorphisme sexuel.

Smith *et al.* (1985) ont suggéré l'existence d'un mécanisme commun entre la formation de porphyrie et le développement de tumeurs hépatiques suite à l'exposition à l'HCB. Le fait que les rats femelles soient plus susceptibles de développer une porphyrie pourrait en partie expliquer le dimorphisme sexuel en faveur des femelles pour le développement de tumeurs. Cette hypothèse n'est cependant pas appuyée par les résultats de notre laboratoire. En effet, les rats traités à l'HCB selon le protocole décrit plus haut (Krishnan *et al.* 1991) ont une concentration en HCB très faible et semblable entre les deux sexes au moment de l'initiation par le DEN. Des porphyries peuvent se développer pendant un an suivant l'initiation, mais il n'y a pas de différences significatives entre le nombre de tumeurs qui se forment chez les femelles porphyriques et celles non-porphyriques.

Le rôle des hormones sexuelles dans le développement de différents types de cancers fait l'objet de nombreuses études et pourraient être impliqués dans les mécanismes d'action de l'HCB. L'emploi de contraceptifs oraux sur des périodes de temps prolongées a été lié au développement de tumeurs hépatiques (Palmer *et al.*, 1989); le contraceptif oral 17 $\alpha$ -éthynyl estradiol est un promoteur de tumeurs hépatiques chez le rat (Yager *et al.*, 1991). L'exposition à des substances xénobiotiques, tel que l'éthynyl estradiol, agissant comme agoniste ou antagoniste de différentes hormones sexuelles a été liée au développement de tumeurs (Yager et Liehr, 1996). Dans le cas de l'HCB et de son dimorphisme sexuel, la réalité semble être plus complexe. Dans notre laboratoire, les travaux de Plante *et al.* (2002) ont démontré un dimorphisme sexuel dans l'expression de la Cx32 et Cx26 dans le foie qui résulterait à la fois de l'expression de facteurs ovariens et de facteurs non-ovariens. En effet, on a observé qu'une ovariectomie pratiquée chez les rats femelles conduit à la baisse de l'expression de l'ARNm de la Cx26 et des canaux protéiques impliqués dans la communication intercellulaire. Cependant, le traitement à l'HCB chez ces rats ovariectomisés provoque une seconde baisse de l'ARNm de la Cx26 ainsi que la diminution de l'expression de l'ARNm de la Cx32. Ceci suggère que l'HCB n'agit pas via l'ovaire sur la communication cellulaire mais qu'il a une action directe sur le foie et qu'un facteur non-ovarien pourrait avoir un rôle important dans l'effet promoteur du HCB.

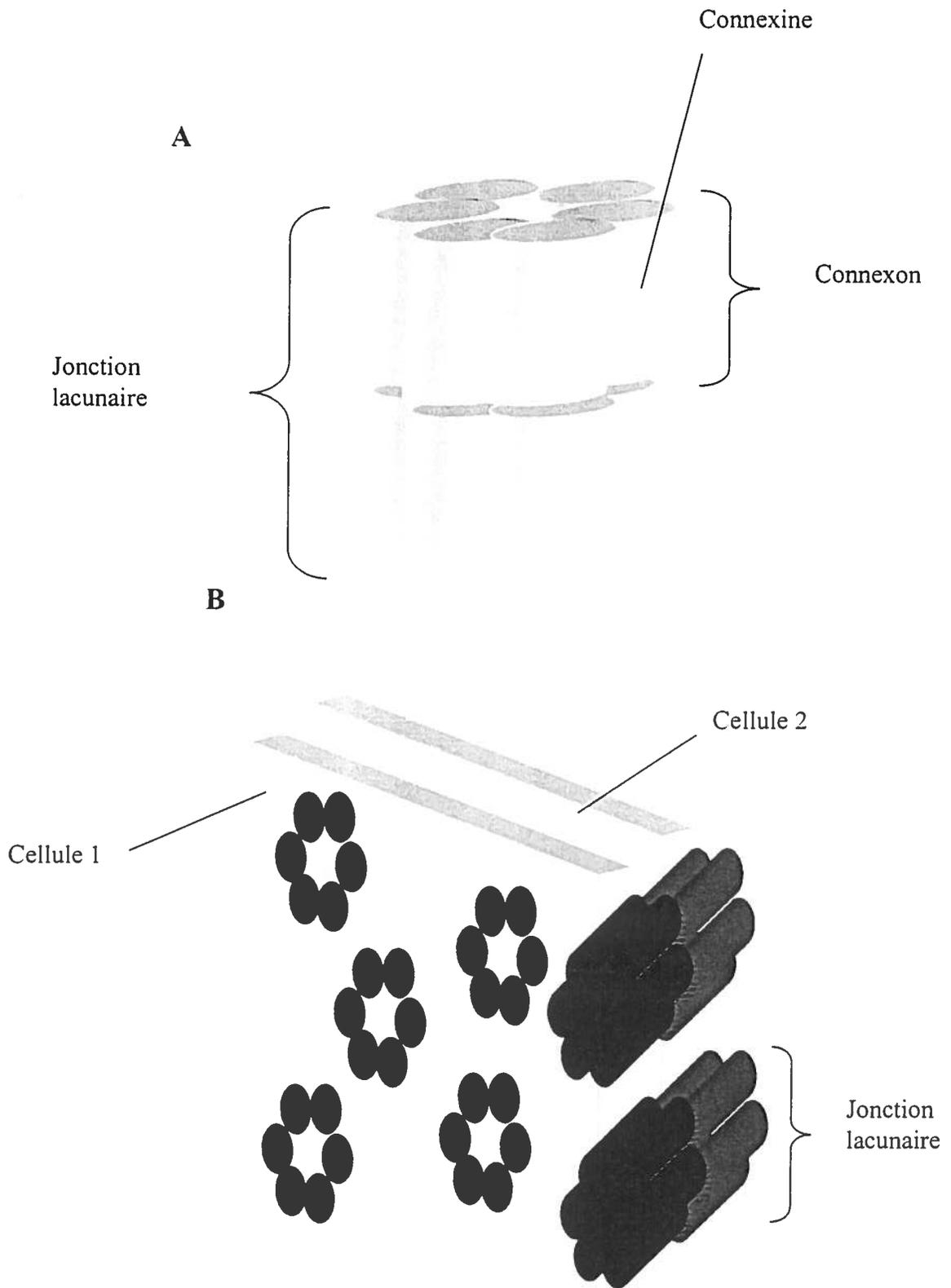
## La communication intercellulaire

### 1.3.5.1 Les jonctions lacunaires

La perte de la communication entre les cellules est un facteur important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Une communication cellulaire aberrante entre les cellules est une caractéristique commune dans plusieurs sinon tous les types de tumeurs (Holder *et al.*, 1993). Les modes de communications entre les cellules sont nombreux et variés. Parmi eux, les jonctions lacunaires sont les seules qui permettent le passage sélectif et bi-directionnel de molécules de faible taille, incluant des seconds messagers tels que l'AMPc, l'inositol triphosphate et le calcium et ce, du cytoplasme d'une cellule à celui de la cellule avoisinante. Pour cette raison, on croit que les jonctions lacunaires pourraient jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie et la prolifération cellulaire (Evans et Martin, 2002; Loewenstein, 1990).

Les jonctions lacunaires sont des agrégats des canaux transmembranaux, appelés connexons, permettant le passage de molécules de petites tailles (<1 kDa). La structure des connexons est présentée à la figure 1.3. Le connexon est composé d'une famille de protéines transmembranaux appelées connexines. Six connexines dans chaque cellule vont s'oligomériser de façon radiale autour d'un pore pour former un connexon et les deux connexons ainsi formés vont s'associer pour former une jonction lacunaire (Simon et Goodenough, 1998a).

Les différents tissus dans l'organisme expriment chacun leur série de connexines spécifiques. On dira d'un connexon qu'il est homo-oligomérique s'il est constitué du même type de connexines, ou hétéro-oligomérique si les connexines qui le compose sont de type différents (Sosinsky, 1995; Stauffer, 1995). De même, une jonction lacunaire sera dite homo-typique s'il est composé de deux connexons semblables ou hétéro-typique si ces connexons sont différents. Il a été démontré que la perméabilité des jonctions lacunaires varie en fonction des connexines qui la composent (Elfgang *et al.*, 1995). Ainsi, une combinaison de différentes connexines dans la formation de jonctions lacunaires pourrait modifier sa fonction et lui donner un rôle spécifique dans



**Figure 1.3** Structure schématique de la structure des connexons et des plaque jonctionnelles. A) Six connexines s'unissent pour former un connexon, et deux connexons s'alignent pour former une jonction lacunaire. B) Les jonctions lacunaires se regroupent au niveau de plaques, unissant les cytoplasme des cellules adjacentes.

différents tissus. Au niveau du foie de rat adultes, on retrouve majoritairement deux connexines : la connexine 32 principalement, et la connexine 26 (Cx32 et Cx26). On retrouve la Cx32 à la grandeur du lobule hépatique, tandis que la Cx26 est exprimée seulement dans la région portale. (Traub *et al.*, 1989; Berthoud *et al.*, 1992). La Cx43 est aussi exprimée dans le foie, mais seulement dans le tissu épithélial et conjonctif, pas dans les hépatocytes différenciés (Zhang et Thorgeirsson, 1994)

Presque tout les types de cellules sont en mesure de former des jonctions lacunaires, et la même connexine peut-être exprimée dans différents tissus. Par exemple, la Cx32 et exprimé chez les hépatocytes, mais aussi dans les cellules de Schwann du système nerveux (Omori *et al.*, 1996). De même, la Cx26 est exprimée entre autres dans le foie et dans les cellules de la peau et le pancréas (Willecke *et al.*, 1999). Chez la souris, le blocage spécifique de l'expression des différents types de connexines dans différents tissus entraîne une variété de phénotypes. Chez les souris chez qui on a bloqué l'expression de la Cx43 se développent normalement dans l'utérus mais développent une malformation cardiaque qui cause un problème dans l'échange gazeux au niveau du poumon et provoque la mort à la naissance (Reaume *et al.*, 1995). Lorsque la Cx26 est supprimée chez les souris, le transfert des nutriments et de déchets métaboliques entre l'embryon et sa mère, ce qui cause la mort de l'embryon (Gabriel *et al.*, 1998). Le tableau 2 présente quelques phénotypes observés chez des souris qui n'expriment pas certaines connexines. Les souris qui n'expriment pas la Cx32 se développent normalement et peuvent à leur tour se reproduire. Cependant, on a remarqué que ces animaux développent un nombre sensiblement supérieur de tumeurs spontanées ou induites chimiquement. Aussi, le taux de division cellulaire du foie est plus rapide chez les souris Cx32 négatives (Temme *et al.*, 1997).

### **1.3.5.2 Les jonctions lacunaires et le développement de tumeurs hépatiques**

De nombreuses études ont démontré que la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires était réduite durant le développement de tumeurs (Jou *et al.*,

**Tableau 2.** Phénotypes observés chez les souris chez qui on a supprimé l'expression d'une connexine spécifique

	Phénotype chez les souris -/-	Référence
Cx26	Mauvais fonctionnement du placenta	Gabriel <i>et al.</i> (1998)
Cx32	Augmentation du nombre de tumeurs et de la réplication de l'ADN	Temme <i>et al.</i> (1997)
Cx37	Mauvais fonctionnement des ovaires	Simon <i>et al.</i> (1997)
Cx40	Anormalités dans la conduction de l'impulsion au niveau du coeur	Simon <i>et al.</i> (1998b)
Cx43	Malformation du coeur	Reaume <i>et al.</i> (1995)
Cx46	Développement de cataractes	Gong <i>et al.</i> (1997)

1995 ; Mehta *et al.*, 1996 ; Murray *et al.*, 2000). Au niveau du foie, les cellules néoplastiques et préneoplastiques montrent habituellement une baisse dans l'expression de la Cx32 et parfois même une diminution de la communication intercellulaire avec les cellules avoisinantes (Neveu *et al.*, 1990). Les causes de cette diminution chez les cellules tumorales demeurent méconnues. On sait cependant qu'il est possible d'entraver la progression d'une tumeur en transfectant les cellules malignes avec certains types de connexines. C'est ce qui a été observé lorsqu'on a transfecté le gène de la Cx32 chez les cellules tumorales du foie chez l'humain (Eghbali *et al.*, 1991). De même, la transfection du gène de la Cx43 dans les cellules du gliome bloque la progression de la tumeur (Naus *et al.*, 1992). Ceci suggère que la connexine agit comme agent de suppression de tumeurs.

Il a été suggéré que les altérations des jonctions lacunaires dans les cellules tumorales pourrait soustraire ces cellules aux contraintes de croissances provenant des cellules normales avoisinantes (Fitzgerald et Yamasaki, 1990). L'absence des canaux intercellulaires empêcherait ainsi le passage de facteurs de contrôle de la croissance cellulaire. Krutovskikh *et al.* (1994) ont étudié des tumeurs hépatiques retirées chirurgicalement de gens décédés de la maladie. Ils ont démontré une communication intercellulaire significativement réduite des cellules tumorales du foie. D'autre part, les tumeurs elles-mêmes sont physiquement isolées par une couche de tissu fibreux. Il est donc raisonnable de penser que la baisse de la communication empêcherait un contrôle de la croissance cellulaire provenant des cellules voisines.

Neveu *et al.* (1994) ont observé par immunohistochimie l'expression de la Cx32 dans le foie de rats chez qui des tumeurs hépatiques avaient été initiées par un traitement au DEN. Il est possible d'identifier les nodules néoplastiques en se fiant au marquage. Alors que toutes les cellules du foie expriment la Cx32, les cellules néoplastiques ne le font pas. Les nodules apparaissent donc comme des plaques vaguement circulaires de cellules où le marquage de la Cx32 n'est pas présent.

Les jonction lacunaires sont souvent les cibles d'agents toxiques. Des substances hépatotoxiques telles que le CCl<sub>4</sub> et le DEN provoquent la baisse de l'expression de la Cx32 après une seule administration (Miyashita *et al.*, 1991). De même, de nombreux promoteurs de tumeurs agissent sur l'expression de la connexine et la formation des jonctions lacunaires. Des organochlorés comme le dichlorodiphényltrichloroéthylène (DDT), le lindane et les biphenyl polychlorinés (BPC) chez le rat (Tateno *et al.*, 1994 ; Guan *et al.*, 1995 ; Krutovskikh *et al.*, 1995), et le pentachlorophénol (PCP) dans les lignées cellulaires d'hépatocytes (Sai *et al.*, 1998) ont tous pour effet de diminuer la communication cellulaire par les jonctions lacunaires.

Les travaux de notre laboratoire ont démontré que l'HCB peut aussi causer une diminution à long terme de la communication intercellulaire chez les rats femelles (Plante *et al.*, 2002). Ainsi, chez les rats femelles traitées à l'HCB selon le protocole en quatre étapes décrit plus haut, on observe une baisse du niveau de l'ARNm de la Cx26 et la Cx32 au jour 45 et le jour 100 du protocole. Le niveau de l'ARNm de la Cx26 et la Cx32 n'a pas changé significativement chez les mâles traités au jour 50 du protocole. Au jour 45, on a remarqué que la diminution de l'expression de la protéine de la Cx26 et la Cx32 chez les femelles traitées est encore plus grande que celle observée au niveau de l'ARNm. Le niveau d'expression protéique de la Cx26 est diminuée de 63% chez les femelles traitées, tandis que le niveau protéique de la Cx32 est diminué de 90%. Enfin, cette baisse des niveaux de l'ARNm et protéique de la Cx26 et Cx32 s'exprime par une baisse d'efficacité du fonctionnement des jonctions lacunaires au jour 100 du protocole. On mesure l'efficacité de la communication cellulaire en effectuant une incision sur un lobe du foie, pour ensuite y placer un colorant qui peut passer par les jonctions lacunaires. Chez les femelles traitées, on a constaté que ce colorant migrerait sur une moins grande distance que chez les témoins.

Ces résultats sont intéressants puisque la baisse de la communication cellulaire par les jonctions lacunaires est enregistrée bien avant le moment où il y a formation de tumeurs chez le rat. Ceci laisse croire que la baisse de l'expression de la Cx26 et la Cx32 et la baisse de la communication intercellulaire qui en résulte sont des événements

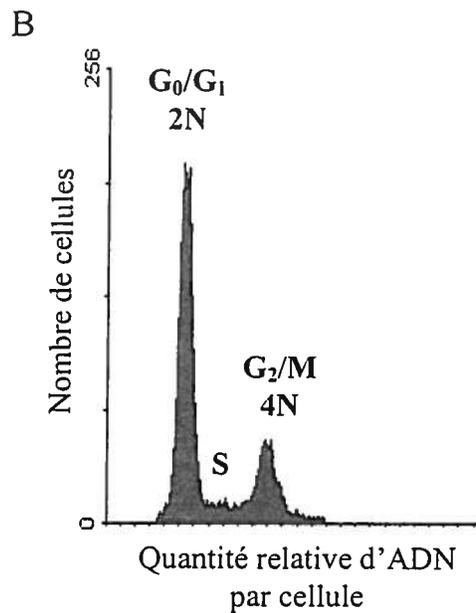
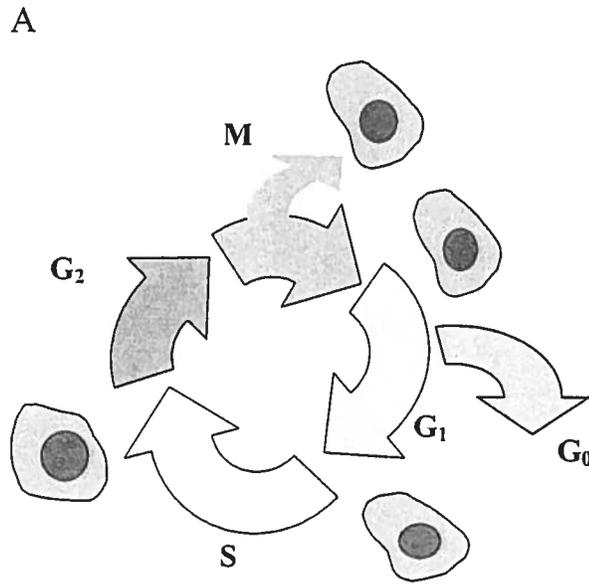
précoces dans le développement de tumeurs hépatiques. La Cx32 pourrait servir de marqueur précoce de la formation de tumeurs dans le foie. C'est pourquoi il est important de caractériser la baisse de l'expression de la Cx32 dans le tissu afin de déterminer si la baisse de l'expression se focalise en des régions précises du foie ou si la diminution est généralisée à l'ensemble des cellules.

### **1.3.6 La prolifération cellulaire**

#### **1.3.6.1 Cycle de division standard**

La prolifération cellulaire est un phénomène incontournable dans le développement et le maintien d'un organisme. C'est ce qui lui permet de croître et de se maintenir en remplaçant les cellules qui ont fait leur temps et qui tombent en apoptose. Cependant, la perte de contrôle sur le taux de prolifération cellulaire est un mécanisme majeur dans le développement de cancers (Mills *et al.*, 1995).

Le cycle cellulaire standard se compose de quatre phases : Gap 1 ( $G_1$ ), S, Gap2 ( $G_2$ ) et M (Fig.1.4A). La cellule qui entre en division débute le cycle en phase  $G_1$ , une phase de croissance où elle attend que les conditions de l'environnement ainsi que sa propre taille afin soient propices à initier la synthèse de l'ADN et la complétion du cycle cellulaire. Durant la phase  $G_1$ , une cellule peut quitter le cycle temporairement ou de façon permanente, afin d'effectuer les actions spécifiques à sa nature, en entrant en phase  $G_0$ . Lorsque la cellule se commet dans la réplication de l'ADN, elle entre dans la phase S, où il y a duplication de l'ADN contenu dans le noyau. Ainsi, pour un certain moment dans le cycle, durant les phases  $G_2$  et M, la cellule compte le double du matériel génétique qu'elle trimbale habituellement. La phase  $G_2$  qui suit est une phase de croissance où la cellule double en volume et en masse de sorte qu'il y ait, lors de la phase M, assez de matériel pour permettre la séquence d'événements qui mènera à la création d'une seconde cellule. En premier lieu, la membrane nucléaire se désintègre, puis le contenu du noyau se condense en chromosomes visibles en microscopie. Ensuite, le cytosquelette de la cellule se réorganise en arcs mitotiques sur lesquels les chromosomes vont s'aligner. Les chromosomes se dirigent alors vers les pôles de la cellule où ils vont



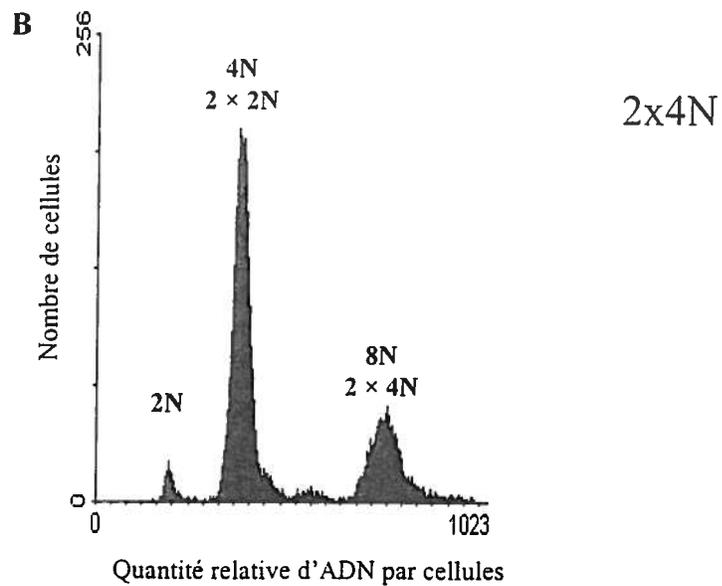
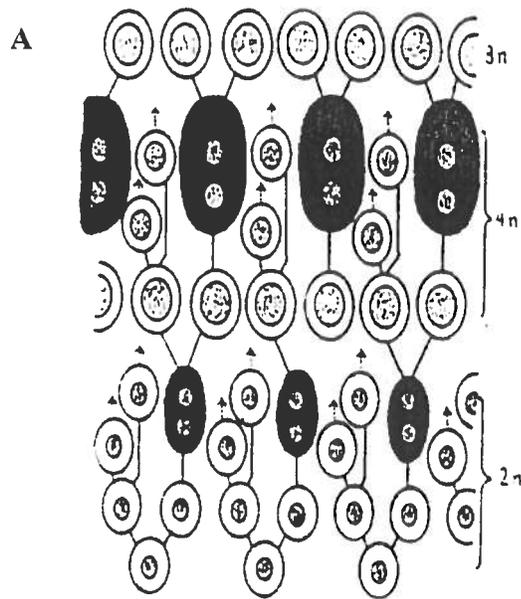
**Figure 1.4** A) Cycle cellulaire standard. B) Analyse du contenu cellulaire en ADN d'une population de cellules diploïdes en croissance. Grâce à la cytométrie en flux, il est possible de mesurer le contenu en ADN de chaque cellule de la population. La distribution illustrée dans cet exemple indique qu'il y a un nombre supérieur de cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

se décondenser et reforment un noyaux. La cellule se divise alors par un processus appelé cytokinésie. Il y a donc formation de deux cellules filles au terme du cycle cellulaire (Alberts *et al.*, 1994). Le contrôle du cycle cellulaire met en cause une série de relations complexes entre protéines, dont celles de la famille des cyclines et celles de des kinases cyclines-dépendantes, dont la phosphorylation est au centre des mécanismes d'interaction, qui débordent du cadre de ce mémoire.

La description du cycle qui vient d'être présentée est celle d'un cycle standard, où la division une cellule diploïde mène à la formation de deux cellules diploïdes. La figure 1.4B présente la variation de la ploïdie d'une population de cellules dans le cycle standard. Cependant, la présence de cellules polyploïdes est aussi courante dans la nature.

#### **1.3.6.2 Polyploïdie de hépatocytes**

Le phénomène de la ploïdie des cellules est connu depuis près de 50 ans. Le nombre d'exemples de cellules polyploïdes rapportées s'est accru grâce aux études cytophotométriques de l'ADN, l'approche utilisée à l'époque (Brodsky et Uryvaeva, 1977). On retrouve des noyaux polyploïdes chez les organismes unicellulaires ainsi que chez les plantes et plusieurs animaux (Brodsky et Uryvaeva, 1977). La polyploïdie se définit comme étant l'état d'une cellule qui contient plus d'une paire de copies de ses chromosomes homologues. C'est un état qui caractérise essentiellement les cellules qui sont appelées à produire une quantité importante de protéines spécialisées et spécifiques à leurs fonctions. C'est particulièrement le cas chez les organismes invertébrés, comme le ver, les mollusques et les insectes, où certaines fonctions nerveuses ou sécrétoires ne peuvent être accomplies que par quelques cellules (Brodsky et Uryvaeva, 1977). Cependant, on retrouve aussi de nombreux exemples de cellules polyploïdes chez les mammifères et les autres vertébrés. En fait, la polyploïdie est une caractéristique de virtuellement tous les organes (Sigal *et al.*, 1999). Les cellules cardiaques, neuronales et hépatiques sont quelques exemples des nombreuses cellules polyploïdes que l'on retrouve chez les mammifères (Sigal *et al.*, 1999).



**Fig. 1.5** A) Polyploïdisation des hépatocytes. B) Distribution typique de l'ADN dans une population d'hépatocytes chez un rat femelle adulte. Cette distribution indique une majorité de cellules polyploïdes, avec une majorité de cellules tétraploïdes 4N ou  $2 \times 2N$ .

En fait, dans le foie des rats adultes, on retrouve une variété d'hépatocytes avec un nombre de noyaux et une ploïdie variable (Fig. 1.5). La majorité des cellules du foie chez le rat adulte sont tétraploïdes, soit 60 à 75% de la population des hépatocytes. Les cellules diploïdes représentent environ 10% des cellules, tandis que les cellules octoploïdes sont à 30%. À la naissance, les hépatocytes du rats ne comptent qu'un seul noyau diploïde. C'est durant la croissance post-natale de l'animal que la population de cellules va se transformer et passer à une population pratiquement totalement polyploïde. D'autre part, les proportions de cellules de différentes ploïdies vont varier avec l'âge et le sexe des rats (Brodsky et Uryvaeva, 1977).

La polyploïdisation des hépatocytes est due à des anomalies lors de la phase M. La première étape est la formation d'une cellule binuclée à partir d'une cellule diploïde par un mécanisme qui se nomme la mitose acytokinétique (Brodsky et Uryvaeva, 1977). La cellule en division cellulaire poursuit le cycle de façon normale jusqu'au moment de terminer la phase M. À ce moment, les chromosomes ont été répliqués et sont séparés de chaque côté de la cellule; les noyaux se reforment autour de leur copies des chromosomes, mais il n'y a pas la cytotélerèse qui devrait normalement conclure le cycle cellulaire. Au terme de ceci, la cellule sort du cycle de division, et on a donc la production d'une cellule binuclée dont les noyaux sont diploïdes. Lors du cycle de division suivant, les deux paires de copies des chromosomes sont répliqués. Au moment de la mitose, un seul arc mitotique bipolaire se forme et deux paires homologues de chaque chromosomes se retrouvent de chaque côté de la cellule. Le reste de la mitose se complète normalement et lors de la division cellulaire, on assiste à la formation de deux cellules filles tétraploïdes. Le même processus va conduire à la formation des cellules octoploïdes à partir de ces cellules. Ainsi, les hépatocytes en polyploïdisation vont passer par chacune des étapes de la série :  $2n$ ,  $2n \times 2$ ,  $4n$ ,  $4n \times 2$ , etc. (Brodsky et Uryvaeva, 1977) Enfin, il est important de noter que le processus de polyploïdisation est irréversible : un hépatocyte ne peut donner naissance à un autre de ploïdie inférieure. Ainsi, la ploïdie des cellules augment avec le nombre de division qu'elles subissent.

Il est possible de montrer les changements ploïdiques dans une population d'hépatocytes ayant subi une prolifération cellulaire suite à un traitement mitogène à l'aide de la cytométrie en flux. Hasmail et Roberts (1997) ont observé une augmentation de la population de cellules octoploïdes et une diminution de la proportion de cellules tétraploïdes chez des rats mâles F344 ayant subi un traitement au dichlorobenzène (DCB). D'autre part, chez les rats traités à l'acétylaminofluorène (2-AAF) ayant développé des tumeurs hépatiques suite à un traitement avec un initiateur, on observe l'émergence d'une population d'hépatocytes diploïde importante (70% du total des cellules) qui demeure jusqu'à trois semaines après la fin du traitement, ce qui suggère que la diploïdie est une caractéristique stable des populations de cellules néoplastiques (Schwarze *et al.*, 1984).

Chez les rats adultes, les hépatocytes ne se divisent que très rarement. Ce sont des cellules généralement quiescentes dont la principale fonction est de s'assurer le métabolisme de différentes substances endogènes. Cependant, le foie peut entrer dans une phase de prolifération rapide lorsque celui-ci est endommagé, suite à une hépatectomie partielle ou à l'exposition à un toxique tel que le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) qui va causer une nécrose chez des cellules foie. La régénération du foie diffère de ce que l'on observe dans d'autres tissus, comme la moelle épinière ou la peau, par le fait que cette régénérescence ne repose pas sur la présence de cellules souches. Au contraire, ce sont des hépatocytes différenciés qui, sous l'influence de certains signaux de croissance, vont se dédifférencier puis proliférer de façon clonale pour enfin se re-différencier afin de former des hépatocytes matures à nouveau (Chevalier et Roberts, 1998).

#### 1.3.6.3 La prolifération cellulaire et le cancer

La prolifération cellulaire est un facteur essentiel dans le développement des tumeurs. Une augmentation de la prolifération cellulaire est un élément favorable à la mutagenèse. D'abord, une augmentation du taux de réplication cellulaire fait augmenter la probabilité d'erreurs lors de la duplication de l'ADN. De même, une prolifération cellulaire soutenue réduit le temps disponible aux différents mécanismes de réparation de l'ADN et les rends ainsi moins efficaces. Ceci favorise la conversion d'adduits

endogènes ou exogènes en mutation avant que l'ADN ne soit réparé (Chevalier et Roberts, 1998).

La prolifération est impliquée dans toutes les étapes de la cancérogenèse. Une première ronde de réplication cellulaire est nécessaire lors de l'initiation de la cellule néoplastique afin de fixer dans le génome les mutations dans l'ADN causées par des oxydants endogènes ou d'autres facteurs exogènes. Durant la promotion, la croissance préférentielle des cellules néoplastiques au détriment des cellules normales permet la croissance clonale de la tumeur (Mills *et al.*, 1995; Nguyen-ba et Vasseur, 1999).

Considérant ce qui précède, il n'est donc pas surprenant de constater que de nombreux cancérigènes ont un effet modulateur sur la prolifération cellulaire. Ces agents mitogènes ont la capacité de stimuler directement la croissance cellulaire. Au niveau du foie, par exemple, on a constaté que le phénobarbital ainsi que l' $\alpha$ -hexachlorocyclohexane causent une augmentation hyperplasique du poids du foie qui se maintient avec l'administration des substances (Butterworth et Goldsworthy, 1991). D'autre part, une administration continue d'ethinyl estradiol induit la prolifération cellulaire dans le foie des rats, particulièrement chez les cellules diploïdes (Mayol *et al.*, 1992). Enfin, le DCB, le phénobarbital et le DDT peuvent également induire la prolifération des hépatocytes (Elridge *et al.*, 1992; Kolaja *et al.*, 2000; Krutovskikh *et al.*, 1995).

L'homéostasie dans un tissu normal se caractérise par un équilibre entre le taux de prolifération cellulaire et de mort cellulaire. Les agents mitogéniques altèrent cette balance en promouvant préférentiellement la croissance des cellules néoplastiques. Ces agents peuvent avoir deux types d'effets sur les tissus-cibles (Schulte-Hermann *et al.*, 1999). Le premier de ces effets est l'hyperstimulation de fonctions spécifiques du tissu, tels que la synthèse d'enzymes liées au métabolisme de xénobiotiques ou au peroxisome au niveau du foie. Cette stimulation va promouvoir la prolifération et la survie des cellules. L'augmentation de la taille de l'organe et l'hyperplasie est maintenue tant que l'exposition au mitogène est effective. La réplication cellulaire, par contre, n'est

maintenue que durant les premiers jours du traitement. Plus tard, les cellules acquièrent une résistance à l'effet mitogène du traitement. Ces effets sont réversibles en absence de stimuli. En absence de l'agent mitogène, les cellules du tissu reprennent leur taille normale, le taux de survie des cellules diminue et les cellules excédentaires sont éliminées. Chez les rats traités à l'acétate cyproterone, un hépatomitogène et cancérigène, près de 25% des cellules du foie sont éliminées en quelques jours par apoptose (Bursch *et al.*, 1984).

Le deuxième effet des carcinogènes sur le tissu-cible est la cytotoxicité. L'agent mitogène va causer des bris cellulaires, des pertes de cellules ou une réaction inflammatoire dans l'organe. C'est le cas de la N-nitrosomorpholine qui entraîne une augmentation du taux d'apoptose dans les cellules du foie du rat à partir de 12 heures après une seule exposition. On verra alors le tissu se régénérer afin de combler la perte des cellules causées par le traitement. Ainsi, à l'inverse de l'hyperstimulation, ou la prolifération cellulaire a pour conséquence secondaire la mort cellulaire des cellules excédentaires, le mitogène causant la mort cellulaire comme effet primaire va entraîner une prolifération cellulaire de régénérescence. Il faut noter cependant que certaines substances sont capables d'initier ces deux types de réponses simultanément. C'est le cas par exemple du thioacetamide (Ledda-Columbano *et al.*, 1991) et du griseofulvin (Knasmüller *et al.*, 1997). Les agents carcinogènes peuvent donc exercer des effets inverses sur la vie et la mort des cellules. Mais ce sont les cellules qui vont tirer un avantage évolutif de ces effets par rapport aux autres cellules qui vont éventuellement former des tumeurs.

La perte de l'équilibre entre la croissance cellulaire et la mort cellulaire dans les tissus néoplastiques est liée à l'implication des oncogènes. La dérégulation de ces gènes conduit à la croissance clonale anarchique des cellules mutées qui conduira à la formation d'une tumeur. Un oncogène est la forme mutée d'un proto-oncogène, un gène codant pour une protéine importante dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Par exemple, *c-myc*, un facteur de transcription ayant un rôle dans la croissance cellulaire et la différenciation (Dang, 1991), est un gène souvent

surexprimé dans les tumeurs (Cole 1986). Aussi, *Ha-ras* a démontré une activité anti-apoptotique qui confère aux cellules néoplastiques un avantage évolutif majeur (Frey, 2000). Ainsi, l'activation des oncogènes vient bouleverser l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose et permet aux cellules de croître sans subir le contrôle des cellules voisines.

#### 1.3.5.4 La prolifération cellulaire comme facteur de risque

Il faut demeurer prudent lorsque l'on discute de la place qu'occupe la prolifération cellulaire dans le développement de tumeurs. Farber (1995) a émis deux critiques face à la tendance à croire que la prolifération cellulaire en elle-même est un facteur de risque pour le développement de cancers. Premièrement, il y a un manque d'association entre la prolifération cellulaire et l'occurrence de cancers dans plusieurs organes et tissus. Par exemple, la prolifération que l'on observe au niveau du petit intestin est intensive et soutenue (Falk *et al.*, 1998). Leblond (1965) a estimé que durant une période de 20 à 30 jours, le remplacement des cellules perdues dans le tube digestif correspond au nombre total de cellules dans le corps. Pourtant, le développement de cancers dans le petit intestin est très rare, et est en fait l'un des types de cancers les moins fréquents. La deuxième critique réside dans le fait que plusieurs carcinogènes chimiques génotoxiques ont en commun d'inhiber la prolifération cellulaire dans différents tissus et organes. Farber cite l'exemple du tétrachlorure de carbone, du thioacetamide et de l'aflatoxine qui sont des substances qui inhibent la prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN. Il se pourrait donc que cet inhibition sur la prolifération s'appliquerait à l'ensemble des cellules du tissu-cible, mais que les cellules initiées auraient une résistance à cette inhibition, ce qui leur conférerait un avantage prolifératif marqué.

Cette hypothèse ne peut pas s'appliquer au foie. Farber y fait d'ailleurs exception, en faisant remarquer qu'au niveau du foie, où la prolifération cellulaire basale est minimale, l'initiation de la prolifération cellulaire est un facteur déterminant dans la formation et la promotions des cellules prénéoplastiques et néoplastiques. Cette prolifération doit cependant s'accompagner d'une initiation préalable afin qu'il y ai

hépatocarcinogénèse. Mais il importe de réaliser que l'étude de la prolifération cellulaire dans le contexte de la cancérogenèse dépend fortement du contexte de l'organe à l'étude.

Nonobstant ce qui précède, l'étude de l'influence de l'HCB sur la prolifération cellulaire demeure un des facteurs importants dans l'évaluation du risque que pose cette substance sur la santé. Les effets de l'HCB sur la prolifération cellulaire demeurent méconnus et peu d'études en font objet. Rizzardini *et al.* (1990) ont observé une légère augmentation, non-significative, du nombre de hépatocytes mononucléés diploïdes en phase S après un traitement au HCB. Dans le cadre du modèle employé dans notre laboratoire, des modifications dans l'expression de certains gènes impliqués dans l'homéostasie cellulaire semblent se produire chez les rats femelles entre la fin du traitement et la phase d'initiation au DEN, soit pour une période de 95 jours. La détection de la prolifération cellulaire apparaît comme une pièce importante dans la poursuite d'une meilleure compréhension du dimorphisme sexuel observé.

#### **1.4 Objectifs de recherche**

Les sections précédentes ont montré que l'HCB est un promoteur de tumeurs hépatiques chez le rat qui agit spécifiquement chez la femelle. Le risque que pose l'HCB sur la santé humaine demeure méconnu, mais le fait que l'ingestion quotidienne d'HCB chez les nourrissons dépasse largement la valeur de l'ingestion journalière soulève des inquiétudes. Il est donc important d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'HCB dans le développement de tumeurs hépatiques.

Le modèle d'étude employé ici pour comprendre ces mécanismes est basé sur un protocole qui se déroule en quatre temps. Des rats sont d'abord traités à l'HCB durant une période de cinq jours, puis vient une période de latence d'une durée de 95 jours durant laquelle des modulations au niveau de l'homéostasie tissulaire du foie semblent survenir. En troisième lieu, un initiateur de tumeurs est administré aux animaux au jour 100 du protocole, ce qui sera suivie d'une phase de développement de tumeurs. Nos recherches portent essentiellement sur les périodes latence de 45 et 95 jours après le

traitement. Nous voulons déterminer quelles sont les modulations causées par le traitement HCB qui causent les rats à développer un nombre supérieur de tumeurs spécialement chez les femelles. Les travaux du présent mémoire ont porté sur deux aspects liés à la promotion de tumeurs :

- 1) **La diminution de la communication cellulaire via les jonctions lacunaires.** Ceci est une caractéristique commune à de nombreuses, sinon toutes les tumeurs. Une baisse de communication pourrait avoir une influence sur le contrôle de la prolifération cellulaire. Les travaux de notre laboratoire ont déjà démontré une diminution de l'expression de la Cx32 au jour 50 du protocole de traitement chez les rats femelles. **Nous avons voulu caractériser cette baisse dans le foie et vérifier si la diminution est focalisée en un endroit précis du lobule ou si, alternativement, elle est généralisée à l'ensemble de hépatocytes.**
  
- 2) **La prolifération cellulaire.** De nombreux promoteurs de tumeurs influent sur la taux de division cellulaire des cellules prénéoplastiques, un élément crucial dans la promotion hépatiques, afin de leur donner un avantage évolutif qui permettra au foyer de cellules initiées de prendre de l'ampleur. **Nous avons donc voulu déterminer si le traitement HCB avait un impact sur le taux de prolifération cellulaire chez les rats femelles entre la fin du traitement et le jour 50 ou le jour 100 du protocole.**

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Dans le but d'étudier les modulations de l'expression des gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie induite par le traitement à l'HCB, nous avons effectué deux séries d'expériences. Dans la première, nous avons isolé des hépatocytes afin de déterminer l'effet de l'HCB sur la prolifération cellulaire. Dans la seconde, nous avons étudié la localisation tissulaire de l'expression de la connexine 32 à un moment où une baisse de son expression est observée.

### 2.1 Matériel général

Les différents produits chimiques employés dans le cadre des expériences présentées dans ce mémoire, et qui ne sont pas mentionnés dans la liste qui suit, ont été obtenus chez Sigma (St-Louis, MO) et FisherBiotech (Montréal, Qc, Canada). L'hexachlorobenzène (HCB, pureté de 99%) a été obtenu d'Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Les produits suivants ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO) : la collagénase de type IV, l'inhibiteur de trypsine, le "ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)tetra acetic acid" (EGTA), le "N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid" (HEPES), le bleu de Trypan et l'insuline. L'isoflurane (Isoflo®) a été acheté chez CDMV (Ste-Hyacinthe, Qc, Canada). L'iodure de propidium a été obtenu chez PharMingen (Mississauga, ON, Canada)

Les lames contenant les cryosections de foie ont été préparées à partir de blocs de foie préparé par la compagnie CTBR (Senneville, QC, Canada). L'anticorps spécifique à la Cx32 provient de Chemicon International (Temecula, CA). L'anticorps secondaire anti-lapin couplé au TRITC provient de Sigma (St-Louis, MO).

### 2.2 Traitement des animaux

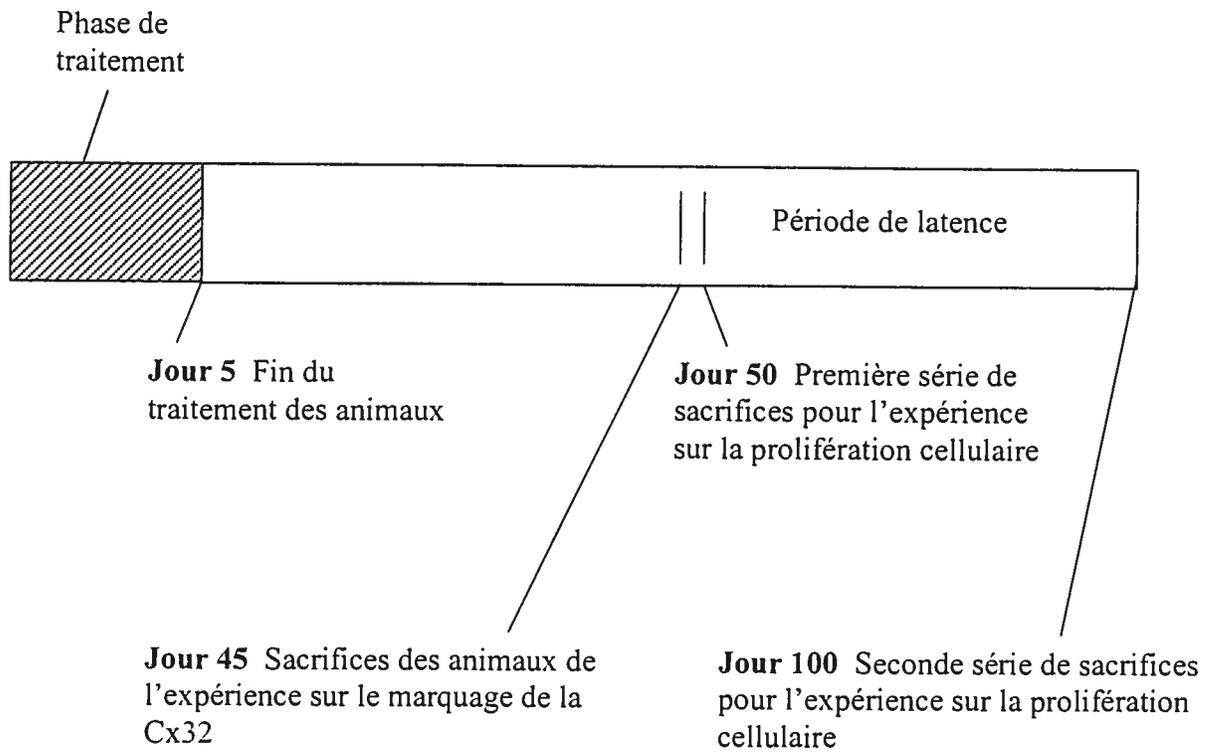
Les animaux utilisés dans les expériences de traitement à l'HCB étaient des rats mâles (200 à 225 g) et femelles adultes (175 à 200 g) obtenus de Charles River Canada

Inc. (St-Constant, Québec). Les expériences sur les animaux ont été menées après sept jours d'adaptation aux conditions de l'animalerie, où la température est de 21°C, l'humidité est de 55% et le cycle de noirceur et de lumière est de 12 heures. Les rats ont eu un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture Purina Rat Chow 5012 (Purina Mills, Richmond IN).

Afin d'étudier les mécanismes responsable pour le dimorphisme sexuel observé suite au traitement à l'HCB, un groupe de rats mâles et femelles a reçu le traitement d'HCB selon le protocole décrit plus haut (section 1.2.3), par lequel on observe une réponse plus marquée chez les femelles. La première phase du protocole est une phase de traitement où l'on administre par gavage, durant cinq jours consécutifs, une dose de 100 mg/kg d'HCB à raison de 10 ml/kg. Les rats témoins ne reçoivent que le véhicule, soit de l'huile végétale. La seconde phase du protocole est une phase de latence où les animaux ne reçoivent aucun traitement pendant 95 jours. Durant cette période, l'HCB est éliminé de l'organisme et semble induire certaines modulations au niveau de l'homéostasie cellulaire du foie (Fig. 2.1).

Pour la première expérience portant sur la prolifération cellulaire, les rats ont été sacrifié au jour 50 du protocole, au milieu de la phase de latence, ainsi qu'à la toute fin, au jour 100. Étant donné la lourdeur des manipulations requises afin d'isoler les hépatocytes chez les rats, seulement deux rats par jour pouvaient être sacrifiés. Les gavages ont donc été étalés de façon à n'avoir qu'un rat témoin et un rat traité à sacrifier les jours de sacrifices. Dans la seconde expérience, les rats ont été sacrifié au jour 45, soit au temps où une baisse de l'expression de la Cx32 a été observé.

D'autre part, considérant le risque de rater l'isolation d'hépatocytes et de perdre ainsi un rat représentant un investissement de temps considérable, nous avons traité huit



**Figure 2.1** Protocole de traitement à l'HCB et temps de sacrifices pour les deux expériences présentées dans le présent mémoire.

animaux mâles et femelles pour les groupes du jour 50 et 100, de façon à obtenir un nombre minimal de quatre échantillons pour analyses statistiques pour chacun des temps. Ceci a été d'autant plus nécessaire que l'isolation d'hépatocytes par perfusion est une manipulation complexe où de nombreux problèmes pouvaient survenir (la procédure réussit dans environ 70 % des cas). Les problèmes les plus fréquemment rencontrés ont été le manque d'homogénéité dans la perfusion à travers le foie et un nombre insuffisant de cellules isolées. Dans le premier cas, on observait que la solution ne perfusait pas le foie en entier; le foie en perfusion se vide de son sang et change de couleur en passant du rouge au beige. Nous pouvions donc voir des régions d'un lobe ou encore des lobes entier conserver leur coloration rouge. De nombreux facteurs pourraient expliquer cet effet, comme la position du cathéter dans la veine portale qui fait en sorte que la solution ne se propage pas adéquatement dans le foie, ou la position de lobes, qui si repliés, peuvent ne pas permettre le passage de la solution. Il a été établi que pour que la manipulation soit considérée comme réussie, les deux lobes les plus importants du foie devaient nécessairement être entièrement perfusés, soit le lobe médian gauche. Pour ce qui est du nombre de cellules isolées, la technique décrite plus bas a permis d'isoler entre 15 et 20 millions d'hépatocytes avec une viabilité de 85 à 95% sans avoir à utiliser d'étapes de purification au percoll permettant de retirer les cellules mortes. Cependant, en situation de problèmes lors de la perfusion, que la température de la solution ne soit pas assez élevée pour activer l'enzyme ou que le débit de la solution soit trop haut ou trop bas, le nombre de cellules récoltées était inférieur. De façon générale, une faible quantité de cellules isolées était également caractérisée par une faible viabilité. C'est ce qui explique pourquoi nous avons utilisé un nombre de rats supérieur à ce que nous avons besoin dans l'expérience pourtant sur la prolifération cellulaire.

Dans la seconde expérience sur la localisation du marquage de la connexine 32, les analyses ont été effectuées sur trois animaux témoins et trois animaux traités. Il est important de noter que, contrairement à la plupart des études portant sur l'effet de différentes substances toxiques sur la promotion de tumeurs, les rats traités n'ont pas reçus de dose d'initiateur de tumeurs tel que le DEN, le but premier de l'étude étant de

caractériser les modulations induites par le traitement HCB qui pourraient expliquer la susceptibilité des femelles au développement de tumeurs.

## **2.3 Immunohistochimie de la connexine 32**

### **2.3.1 Sacrifice des animaux et obtention de lames de cryosections**

Une seconde série de rats femelles a été traitée selon le protocole décrit plus haut et sacrifiée au jour 50. Ces rats ont été anesthésiés à l'isoflurane et tués par exsanguination (Plante *et al.*, 2002). Rapidement, le foie a été prélevé et coupé en tranches d'environ 5 mm. Une tranche par animal a été mise dans une solution cryomatrix (Fisher, Montréal, Qc, Canada) à -80°C durant toute une nuit. Les tranches de foies ont été envoyées à la compagnie CTBR où elles ont été montées en blocs. Des coupes de 6 µm ont été effectuées et montées sur des lames à partir de ces blocs. Les lames ont été conservées à -80°C.

### **2.3.2 Marquage de la connexine 32**

Les coupes en cryosections ont été fixées à l'acétone -20°C durant 15 minutes pour ensuite être lavées à la saline phosphate tamponnée (PBS) à deux reprises, 5 minutes à température ambiante. Les sites de fixation non-spécifiques ont ensuite été bloqués à l'aide d'une solution de PBS-BSA 5% à température ambiante pour 15 minutes. L'incubation avec l'anti-connexine 32 a duré 1 heure à température de la pièce à une concentration de 1/200. L'incubation avec l'anticorps secondaire couplé au TRITC s'est fait dans les mêmes conditions durant 45 minutes. Deux lavages de 5 minutes dans le PBS ont suivis chacune des incubations. Les lames ont montés avec une solution Cryomatrix (Fisher, Montréal, Qc, Canada) avec une lamelle pour ensuite être observées en microscopie à fluorescence.

### **2.3.3 Analyse en microscopie à fluorescence**

Les lames ont été observées au microscope Leica DMR (Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Strasse, Allemagne). Une caméra Sensicam (The Cooke Corporation, Auburn Hills, MI) branchée au microscope et l'utilisation du logiciel Image-Pro Plus (Media

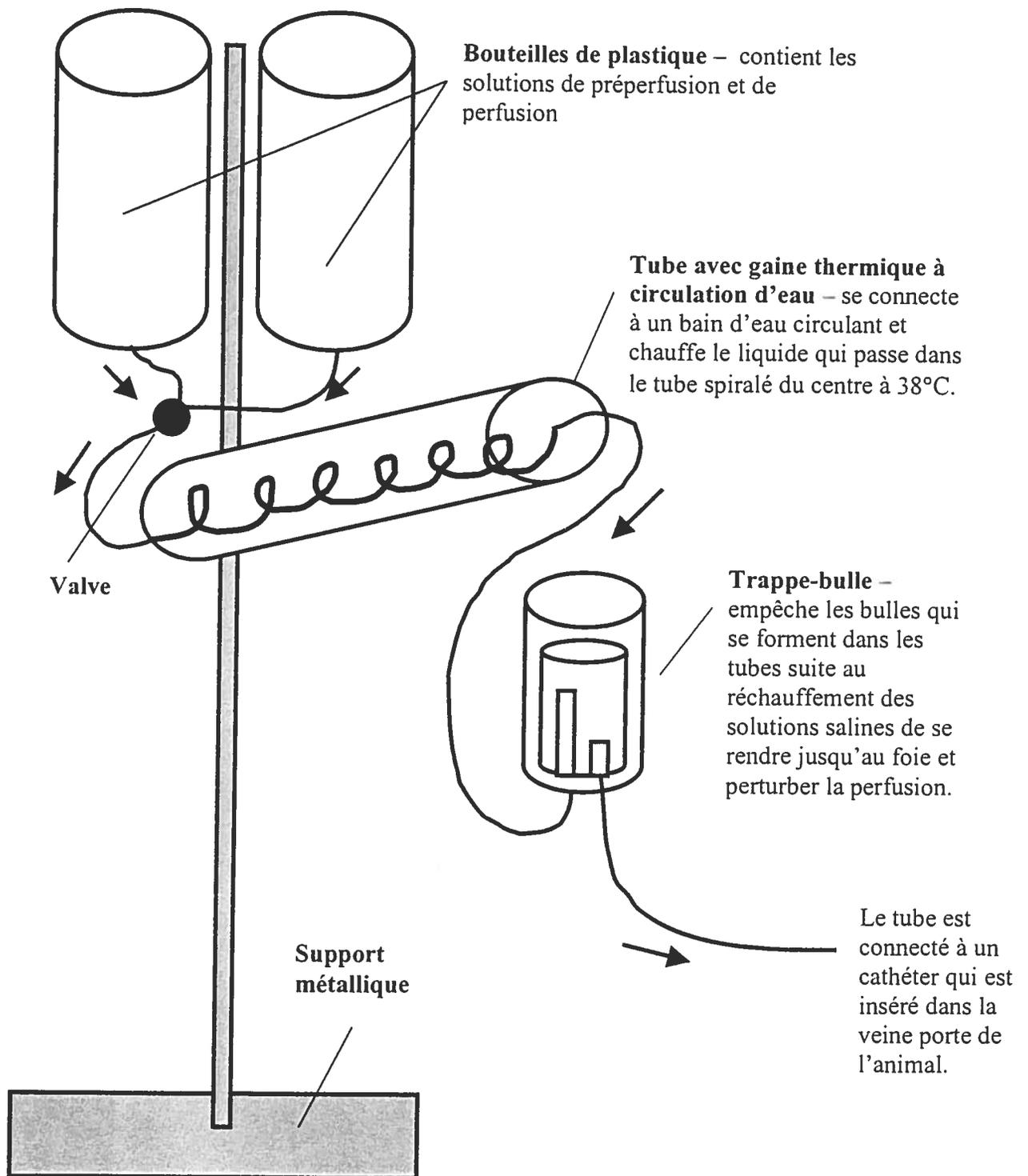
Cybernetics, Silver Spring, MA) a permis l'acquisition d'images des coupes. L'acquisition des différents champs s'est faite de façon aléatoire en tournant à l'aveugle les vis du chariot, en partant du coin gauche supérieur vers la droite puis vers le bas, de façon à ne pas capter un même champs deux fois. Un minimum de quinze images de différents champs ont été prises pour chaque lame. L'évaluation de l'effet de l'HCB sur le marquage de la Cx32 a été effectuée en comparant de façon qualitative l'intensité du marquage chez les animaux témoins et traités.

## **2.4 Perfusion, isolation et analyse des hépatocytes**

### **2.4.1 Perfusion du foie de rat**

Le foie du rat a été perfusé selon une méthode en deux phases décrite par Seglen (1979). La figure 2.2 illustre le montage de perfusion utilisé. Il est composé de deux bouteilles contenant les solutions de préperfusion et de perfusion, ainsi que d'un élément chauffant et d'un trappe-bulle tous deux connectés à un bain d'eau circulant permettant aux solutions de conserver une température de 38 °C. Un cathéter est utilisé comme interface entre le système sanguin de l'animal et le montage. Le débit de la solution à la sortie du montage a été ajusté à 10 ml/min.

Le rat a été anesthésié à l'aide d'isoflurane liquide pur à 99,9% administré par un évaporateur de la compagnie Ohmeda couplé à une bonbonne d'oxygène de qualité médicale avec un débit de 1 litre par minute. Un masque d'anesthésie est ajusté au niveau du museau de l'animal jusqu'à ce que le sommeil s'ensuive. Une fois endormi, le rat a été étendu sur le dos et attaché à la grille d'opération. La cavité abdominale de l'animal a été ouverte aux ciseaux de la pointe du sternum jusqu'au bassin, puis latéralement, d'un flanc à l'autre juste dessous la cage thoracique. Les viscères ont été déplacées sur la gauche afin de dégager la veine porte-hépatique. La branche pancréatico-duodénale de la veine cave inférieure a été ligaturée afin d'éviter un reflux de sang par cette voie. Deux fils ont ensuite été enroulés autour en soutien thoracique. Les viscères ont été déplacées sur la gauche afin de dégager la veine porte-hépatique. La branche à la veine porte, ainsi qu'un troisième plus loin afin de guider l'entrée du



**Figure 2.2** Montage expérimental pour la perfusion du foie de rat. Les solutions de préperfusion et de perfusion passent par le tube à gaine thermique et le trappe-bulle qui sont connectés à un bain d'eau circulant (non illustré sur le schéma) avant d'entrer dans le foie de l'animal (les flèches indiquent la direction des solutions).

cathéter. Le cathéter a été introduit dans la veine porte, puis les fils de soutien ont été rapidement ligaturés et le cathéter a été connecté au montage. Enfin, la veine cave inférieure a été ouverte aux ciseaux afin de libérer le sang. La perfusion du foie s'est faite en deux étapes, d'abord par la solution de préperfusion, préparée à partir de tampon de Hanks (pH 7.6) contenant 8,6 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM de HEPES, 0,5 nM d'EGTA et 0,1 µM d'insuline et qui a circulé dans le foie durant huit minutes. La perfusion s'est poursuivie en faisant passer la solution de perfusion, composée à partir de tampon de Hanks à pH 7,4 additionné de 8,6mM de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM de HEPES, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 µM d'insuline, 49,5 mg/150ml et la collagénase de type IV (100-110 unités par ml de solution de perfusion), durant cinq minutes. La collagénase de type 4 permet la destruction de la matrice intercellulaire qui maintient les hépatocytes reliés ensemble tout en limitant les dommages aux protéines membranaires et différents récepteurs des hépatocytes. Après 5 minutes de perfusion à la solution de collagénase, les hépatocytes étaient dissociés les uns des autres. Le foie a alors été ouvert à l'aide de ciseaux et les hépatocytes ont été libérés dans 20 ml de la solution de perfusion. La suspension cellulaire a alors été filtrée à l'aide d'un filtre de nylon de 100 µm et le volume de la solution a été complété à 50 ml avec la solution de lavage, composée de NaCl (0,14 M), KCl (5 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,6 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,8 mM), de CaCl<sub>2</sub> (1 mM) et d'insuline (10 µM).

Afin de séparer les hépatocytes des autres cellules du foie, la suspension cellulaire a été centrifugée à 20x g pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant les cellules non-parenchymateuses, a été éliminé et les étapes de lavage et de centrifugation ont été reprises deux autres fois. Suite à la dernière centrifugation, les cellules ont été re-suspendues dans 20 ml de solution de lavage afin de procéder au comptage de cellules et à l'évaluation de la viabilité cellulaire par la méthode d'exclusion du bleu de Trypan sur un hémocytomètre (Maier *et al.*, 1993).

#### **2.4.2 Décompte et évaluation de la viabilité des cellules**

Le compte des cellules a été effectué par observation au microscope et l'évaluation de la viabilité des hépatocytes s'est fait selon la méthode d'exclusion du bleu

de Trypan. Un volume de la suspension purifiée d'hépatocytes a été mélangé à un volume de bleu de Trypan. Une goutte du mélange a été placée sur l'hémocytomètre pourvu d'une chambre de 0,1 mm de profondeur. Comme les dimensions du quadrilatère imprimé sur l'hémocytomètre est connu, l'évaluation de la quantité de cellules a été possible en effectuant un comptage des cellules retrouvés sur ce quadrilatère en microscopie. Le compte des hépatocytes a été effectué en ne tenant compte que des cellules vivantes. Les cellules vivantes étant en mesure d'expulser le colorant de leur cytoplasme elles apparaissent blanches au microscope, par opposition aux cellules mortes qui ont perdu leur intégrité membranaire et qui apparaissent bleues. La viabilité cellulaire est évaluée en divisant le nombre de cellules vivantes par le nombre total de cellules. La viabilité de tous les échantillons de cellules analysés était d'au moins 85%.

#### **2.4.3 Marquage de l'ADN des cellules**

Afin de préparer les cellules à l'analyse en cytométrie en flux, les cellules ont été fixées à l'éthanol 70% à -20°C. Les cellules ont d'abord été re-suspendues dans 15 ml de la solution de lavage décrite plus tôt, puis 35 ml d'éthanol 70% à -20°C a été ajouté goutte à goutte en l'espace d'une trentaine de secondes tout en vortexant le tube afin de prévenir la formation d'agrégats. La suspension cellulaire a alors été placée à -20°C durant 15 minutes. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée 3 minutes à 20x g et re-suspendue dans la solution de lavage de façon à obtenir une concentration de 1 million de cellules par millilitre.

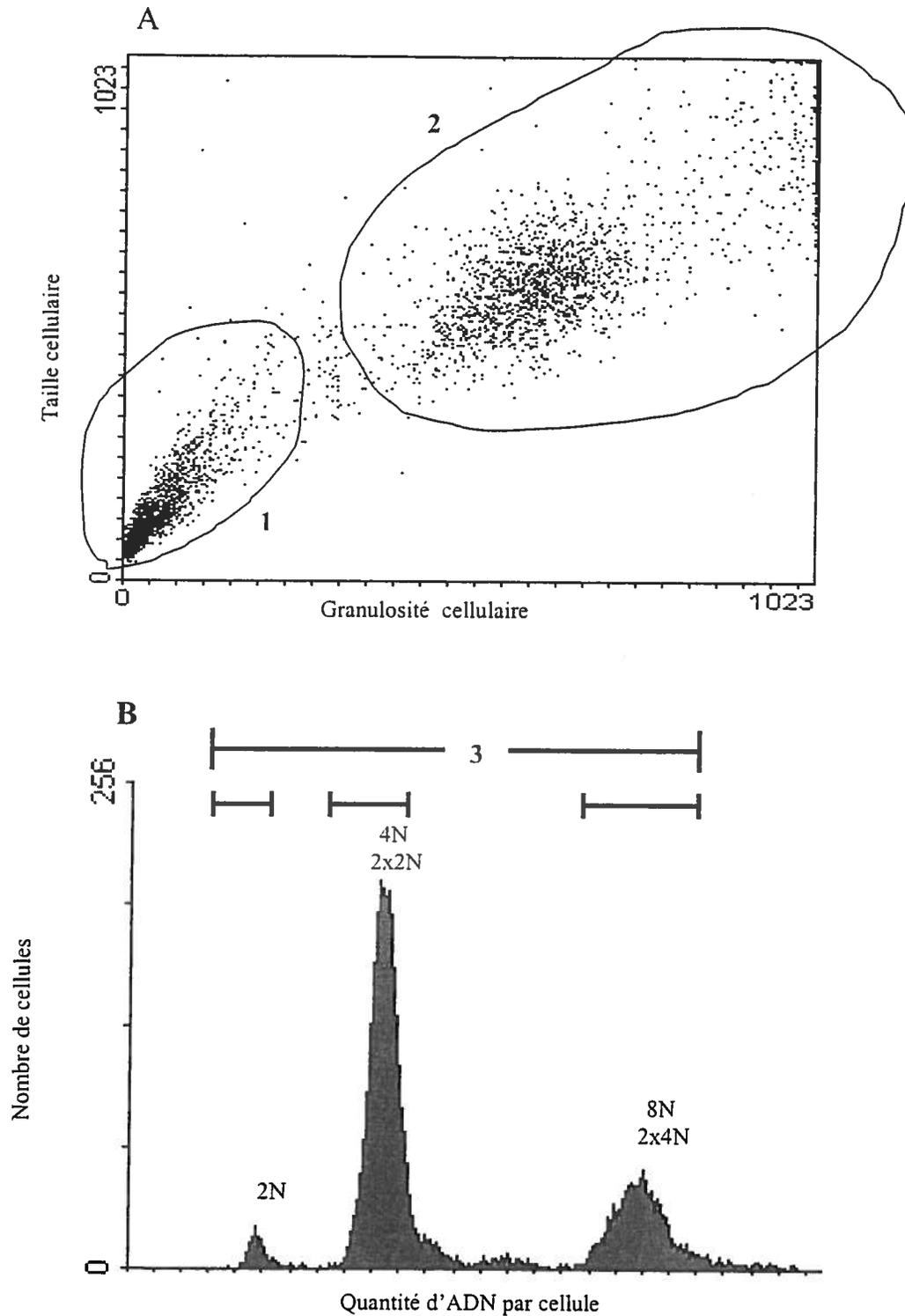
On a prélevé 1 ml de la suspension cellulaire par échantillons à analyser. Chacun de ces échantillons a d'abord été traité à la RNase 10 mg/ml 15 minutes à 37°C afin d'éliminer les molécules d'ARN. Les échantillons ont été re-centrifugés 3 minutes à 20x g et re-suspendus dans 1ml de solution de lavage contenant 1ml de solution d'iodure de propidium (50 µg/ml) pour marquer l'ADN. Les cellules ont été laissés à 4°C pour une nuit complète avant d'être analysées en cytométrie en flux.

#### **2.4.4 Analyse en cytométrie en flux**

Les hépatocytes ont été analysées à l'aide d'un cytomètre Epics (Coulter, Hialeah, FL). Le protocole d'acquisition a été développé dans le but d'éliminer au maximum le compte de débris cellulaires ou de doublets de façon à ne pas inclure de biais lors de l'analyse. La sélection des éléments d'intérêt se fait en deux étapes. Un premier tri des éléments est d'abord effectué sur la base de la taille et granulosité des événements enregistrés, tel qu'illustré à la figure 2.3A. Le petit ensemble de cellules au coin inférieur gauche du graphique indiqué par le chiffre 1 représente les débris cellulaires, tandis que l'ensemble 2 regroupant les éléments centraux et ceux à l'extrémité supérieure droite du graphique représente les hépatocytes. À partir de ce second regroupement, un second tri est effectué sur la base de la ploïdie de hépatocytes. Ce tri, illustré sur la figure 2.3B, permet de visualiser les hépatocytes diploïdes, tétraploïdes et octoploïdes, ainsi que les agrégats cellulaires. L'appareil a été instruit d'effectuer un compte de 10 000 événements dans l'ensemble 3 du graphique 2.2B et de les trier selon leur ploïdie 2N, 4N et 8N. Ainsi, les événements comportant une ploïdie aberrante n'ont pas été inclus dans l'analyse. Ces 10 000 cellules sont alors analysées à l'aide du logiciel WinMDI afin d'obtenir le pourcentage d'hépatocytes de chaque ploïdie au sein de chaque échantillon. Tel que discuté dans la section 1.3.6.2, la ploïdie des hépatocytes se modifie avec les cycles de division cellulaires et cette ploïdie modifiée se maintient dans le temps, donc la méthode employée nous a permis de vérifier la présence d'un épisode de prolifération entre la fin du traitement et le jour 50 ou le jour 100 du protocole.

#### **2.4.5 Modèle pour la validation de la méthode d'évaluation de la prolifération cellulaire**

Afin de déterminer l'efficacité de la méthode d'évaluation de la prolifération des hépatocytes décrite plus haut, nous avons induit la prolifération cellulaire dans le foie de rats par un traitement chimique au CCl<sub>4</sub>. Nous avons fixé la dose de CCl<sub>4</sub> et le moment où la perfusion devrait avoir lieu sur les bases de l'analyse temporelle de la régénérescence du foie suite à un traitement au CCl<sub>4</sub> reconnu comme causant une prolifération cellulaire suite à la nécrose provoquée au foie (Charbonneau *et al.*, 1985). Une dose de 10 ml/kg d'une solution d'huile végétale ou 1,0 ml/kg de CCl<sub>4</sub> dans l'huile



**Figure 2.3** Protocole d'acquisition lors de l'analyse de s hépatocytes en cytométrie en flux. Une première sélection se fait en A) selon la taille et la granulosité cellulaire. Les point du groupe 1 sont des débris cellulaires tandis que les points du groupe 2 sont les hépatocytes. Ces cellules sont rapportées dans la figure B) où un compte des hépatocytes di-, tetra- et octoploïde est effectué. Le compte s'arrête à 10 000 évènements dans l'ensemble 3.

végétale a été administrée par injection intra péritonéale à quatre rats mâles. Les quatre animaux témoins ont été injectés seulement avec l'huile végétale. Ces animaux ont préalablement eu droit à une période d'acclimatation d'une semaine et ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Nous avons fixé le temps où la prolifération cellulaire de compensation est au maximum suite au traitement entre 48 et 72 heures, temps optimisé pour un maximum de régénération, et avons procédé à l'isolation de hépatocytes de la manière décrite plus haut.

### **2.5 Analyses statistiques**

Des tests statistiques ont été utilisés seulement dans le cas des expériences sur la prolifération cellulaire. La moyenne et l'erreur type ont été calculés pour chacun des groupes de rats utilisés. Un test de t de Student bi-paramétrique non-pairé a été utilisé pour comparer les moyennes obtenus chez les groupes témoins et les groupes traités. Le seuil de signification était de 0,05.

## Chapitre 3 : Résultats

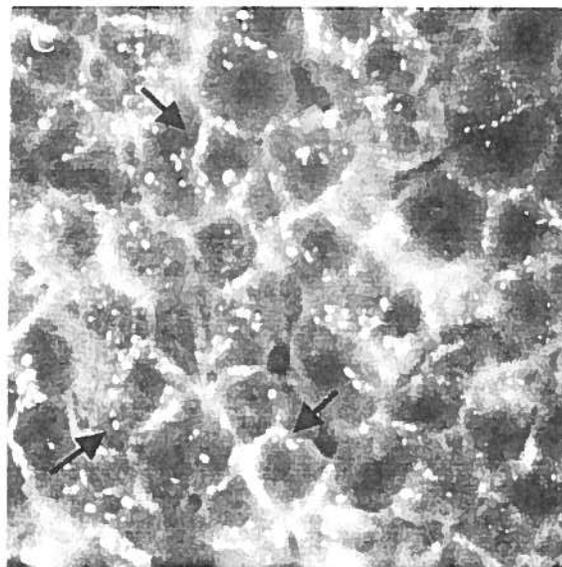
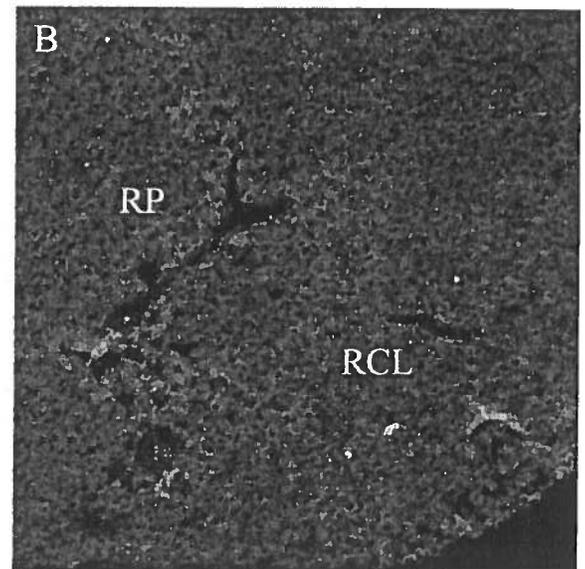
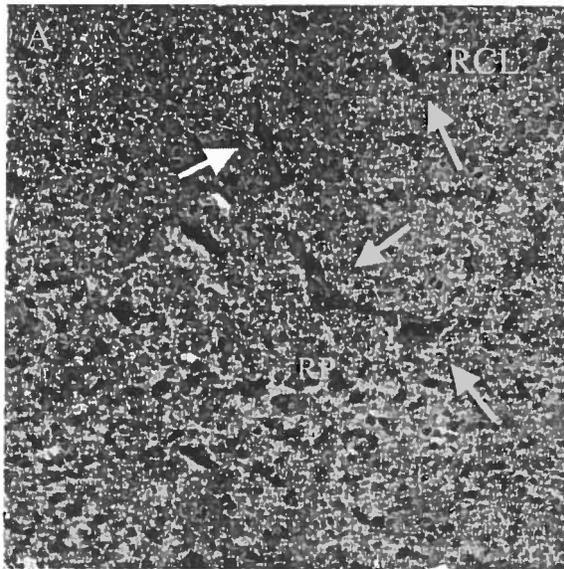
### 3.1 Immunohistochimie de la connexine 32

#### 3.1.1 Spécificité du marquage de la connexine 32

La connexine est une protéine de communication intercellulaire localisée en périphérie de la cellule, en travers de la membrane plasmatique. La figure 3.1A illustre le marquage typique de la Cx32 sur une crysection de foie observé à faible grossissement (100x) chez un animal témoin. On peut d'abord identifier la région centro-lobulaire, désigné par RCL sur la figure, avec la veine centrale seule dans sa région. On observe aussi un ensemble de trois canaux regroupés très près les uns des autres : ce sont la veine porte hépatique, l'artère portale et le canal biliaire. Bien qu'il soit difficile d'identifier précisément chacun de ces vaisseaux, leur conformation nous permet cependant d'identifier cette région comme étant la région portale.

On peut voir le marquage de la Cx32 dans le foie d'un animal témoin sur la figure 3.1A sous la forme des points lumineux que l'on retrouve partout sur la coupe et identifiés par des flèches sur la figure. Chacun de ces points lumineux représente en fait l'ensemble des connexines qui s'agglomèrent pour former les connexons, qui vont à leur tour s'unir pour former les jonctions lacunaires. Ces jonctions sont retrouvées partout sur la coupe, mais le marquage est plus intense et les points plus volumineux aux alentours des différents vaisseaux retrouvés dans le foie, tant dans la région portale que dans la région centro-lobulaire.

La figure 3.1B est un témoin négatif observée à faible grossissement (100x). Il s'agit en fait d'une coupe de foie incubée avec l'anticorps secondaire sans l'anticorps primaire, et ce dans le but de vérifier la spécificité du marquage. Comme on peut le voir sur la figure, on ne retrouve pas de points lumineux sur la coupe, ce qui indique que l'anticorps secondaire ne s'attache pas de façon aléatoire sur la coupe et que le marquage observé est le fait de l'association de l'anticorps secondaire à l'anticorps primaire.



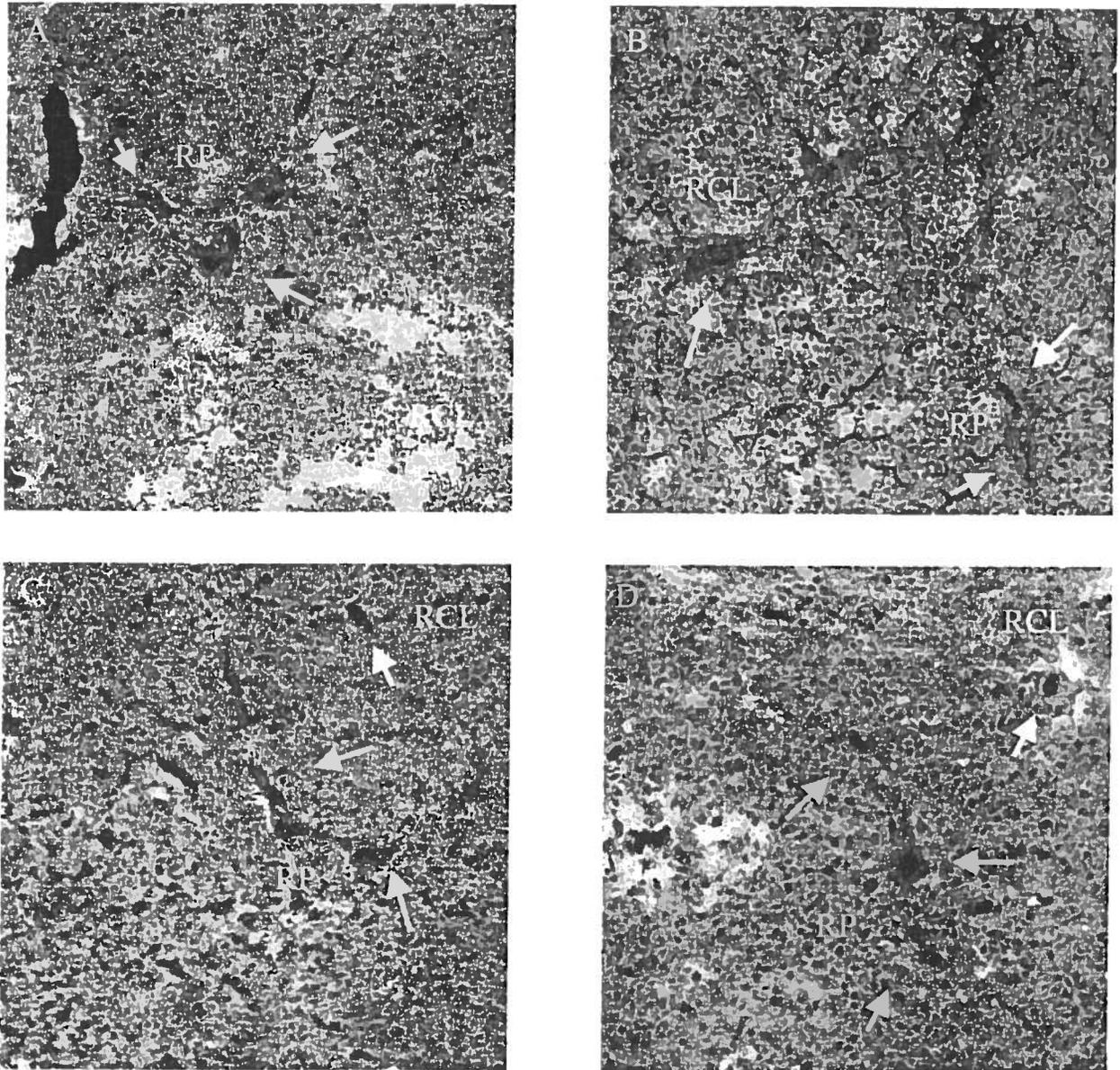
**Figure 3.1** Allure typique du marquage de la connexine 32 sur des sections de foie de rats femelles. A) Observation à 100x d'une section de foie de rat. Les points lumineux sur la figure sont les connexons composés de nombreuses molécules de Cx32 (flèches). On les retrouve à la grandeur de la coupe, mais ceux dans les régions portales sont plus gros et plus intenses. B) Témoin négatif du marquage de la Cx32 à 100x. On ne retrouve pas les points lumineux sur la section. C) Observation à 400x d'une section de foie. Les connexons sont situés au niveau de la membrane cellulaire à l'interface entre deux cellules (flèches).  
 RP = Région Portale; RCL = Région Centro-Lobulaire

Enfin, la figure 3.1 C montre une section de la coupe du foie de rat témoin située entre la région portale et la région centro-lobulaire à plus fort grossissement, soit 400x. Les flèches sur la figure pointent le marquage des connexons. On constate que les connexons sont situés en périphérie des hépatocytes. C'est précisément là où on attend le marquage étant donné que les connexines sont des protéines membranaires impliquées dans la formation de canaux intercellulaires. L'ensemble de ces résultats démontre que le marquage de la Cx32 est spécifique, ce qui permet d'entreprendre l'analyse de la localisation tissulaire de la Cx32.

### **3.1.2 Effets du traitement HCB sur la localisation de la connexine 32**

On peut voir l'effet du traitement à l'HCB chez les rats femelles au jour 50 du protocole à la figure 3.2; les figures 3.2A et C présentent les animaux témoins observés à faible grossissement au microscope (100x). Comme précédemment, les plaques jonctionnelles, indiquées par des flèches sur les figures, indiquent l'emplacement des connexons formés par la Cx32. Chez les témoins, on retrouve ces connexons à la grandeur de la coupe, bien que ceux présents aux alentours des vaisseaux du foie semblent plus gros et le marquage plus intense.

Les figures 3.2B et D présentent les rats traités à l'HCB observés à 100x au microscope. L'observation la plus évidente est que l'on retrouve beaucoup moins de marquage chez les traités. Ceci vient confirmer les résultats obtenus par notre laboratoire quant aux niveaux de l'ARNm et de la protéine Cx32. Sur la figure 3.2B, les flèches indiquent les endroits où le marquage est normalement présent chez les rats témoins mais absent ici. Les flèches de la figure 3.2D montrent la présence de marquage de la Cx32, mais on notera que le marquage est moins intense et les points lumineux moins gros que chez les témoins. On notera également que la diminution du marquage ne se limite pas à la région portale ou centro-lobulaire du lobule hépatique. La baisse de l'expression ne se limite pas non plus à des foyers de cellules où la Cx32 n'est pas exprimée. La baisse de l'expression de la Cx32 est généralisée à l'ensemble des cellules du lobule.



**Figure 3.2** Marquage immunohistochimique de la connexine 32 sur des cryosections de foie de rats femelles au jour 45 tel qu'observé en microscopie à fluorescence à 100x. Chez les animaux témoins (A, C), on retrouve les connexons à la grandeur de la section mais le marquage aux alentours de la région centro-lobulaire et portale et plus intense et les connexons plus gros. Chez les rats traités à l'HCB (B,D), on observe une baisse du marquage dans l'ensemble de la section. Le marquage est fortement diminué dans l'ensemble de la section, tant dans la région portale que dans la région centro-lobulaire (flèches).  
 RP = Région Portale; RCL = Région Centro-Lobulaire

## **3.2 Prolifération cellulaire suite au traitement à l'HCB**

### **3.2.1 Reproductibilité des analyses par cytométrie en flux**

Il a été important de déterminer au tout début de l'expérience si l'on pouvait obtenir des lectures reproductibles des échantillons analysés. Une des premières assises que nous avons voulu établir a été d'assurer une constance dans la qualité des suspensions cellulaires analysées. Plusieurs chercheurs utilisant l'isolation d'hépatocytes dans le but d'en faire des cultures primaires estiment qu'une viabilité initiale de 85% est nécessaire afin d'assurer une sensibilité des cellules aux agents mitogènes (Maier et Schawalder, 1993). Nous avons utilisé ce même seuil afin de standardiser la qualité des échantillons. L'expérience nous a d'ailleurs démontré qu'un faible taux de viabilité rend difficile l'analyse d'une suspension cellulaire. Tous les échantillons retenus pour analyse avaient une viabilité se situant entre 85 % et 95 %.

En second lieu, nous avons voulu nous assurer que la lecture des échantillons en cytométrie serait reproductible, et ce pour un même échantillon analysé à répétition ainsi que pour différents échantillons provenant d'un même animal. Le tableau 3.1 résume les résultats d'un même échantillon analysés à trois reprises. Les valeurs de pourcentage de ploïdies demeurent les mêmes à chaque lecture pour les classes 2N, 4N et 8N.

Au tableau 3.2, on retrouve l'analyse de trois échantillons provenant d'un même animal. Encore une fois, nous constatons que la distribution des cellules selon leur ploïdie est la même chez les trois échantillons. La variation entre les lectures d'un même échantillon ainsi que la lecture de différents échantillons de cellules isolées d'un même animal sont minimales et que les analyses au cytomètre fournissent des lectures reproductibles et fiables.

**Tableau 3.1** Comparaison de trois lectures consécutives d'un même échantillon cellulaire

	2N	4N	8N
1 <sup>re</sup> lecture	3,1%	59,0%	29,4%
2 <sup>re</sup> lecture	3,1%	59,7%	29,8%
3 <sup>re</sup> lecture	3,0%	59,7%	29,2%

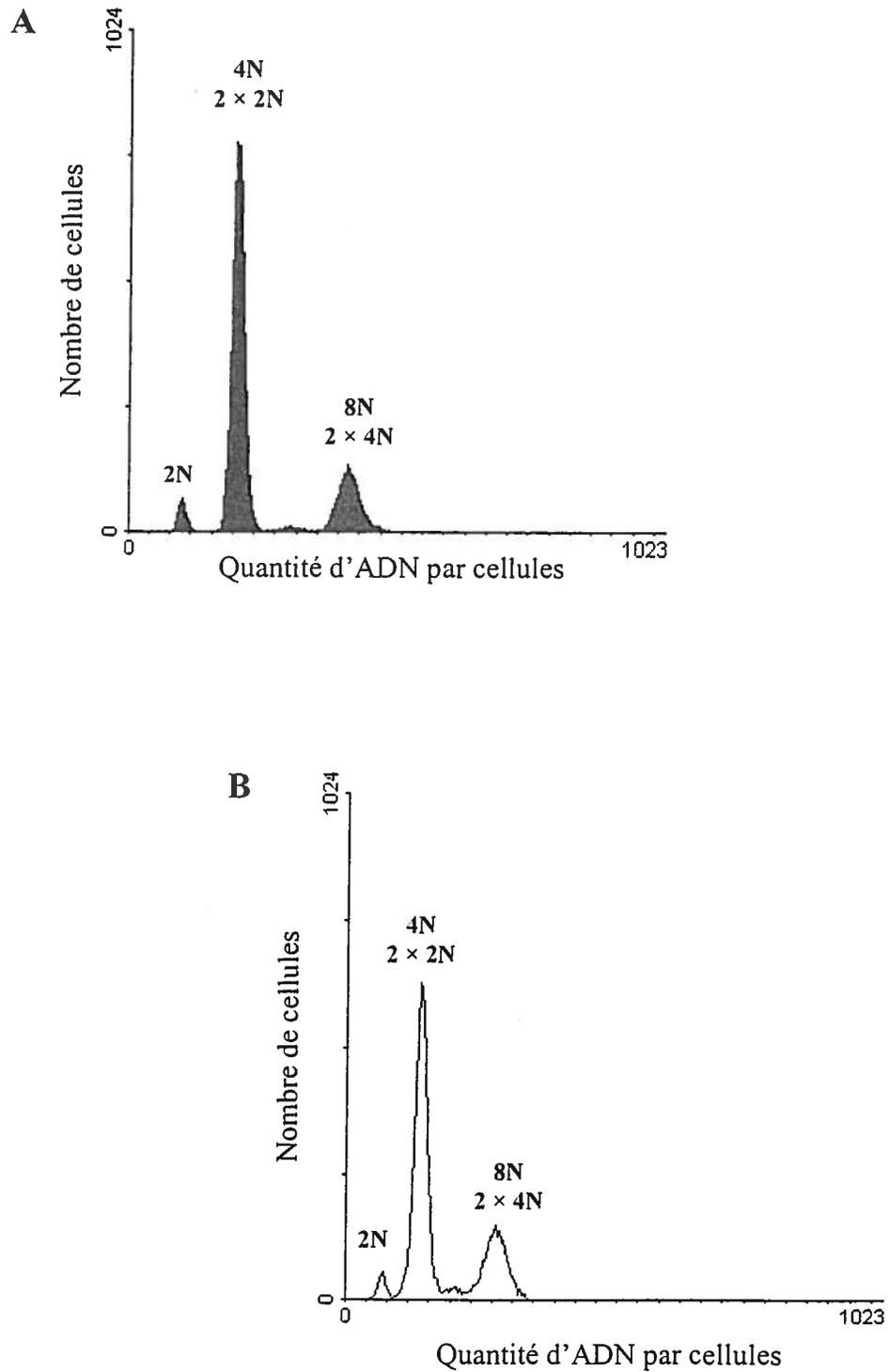
**Tableau 3.2** Comparaison de l'analyse consécutive de trois échantillons provenant d'un même individu

	2N	4N	8N
1 <sup>er</sup> échantillon	4,5%	57,7%	31,8%
2 <sup>re</sup> échantillon	4,4%	57,0%	31,2%
3 <sup>re</sup> échantillon	4,5%	56,9%	30,6%

### 3.2.2 Validation de la technique utilisée pour détecter la prolifération cellulaire *in vivo*

Dans le but de valider la méthode d'isolation d'hépatocytes et de marquage de l'ADN à l'iodure de propidium pour détecter la prolifération de hépatocytes *in vivo*, nous avons induit une croissance cellulaire de compensatrice suite à un traitement cytotoxique de CCl<sub>4</sub>. Ce traitement a provoqué une nécrose au niveau du foie et il a entraîné l'induction d'une prolifération de compensatrice afin de régénérer l'organe. En se basant sur les travaux de Charbonneau *et al.* (1985), nous avons fixé à 61 heures après l'injection de CCl<sub>4</sub> le moment où les hépatocytes doivent être isolés, étant donné que c'est entre la 48<sup>e</sup> et la 72<sup>e</sup> heure après injection que la prolifération des hépatocytes est à son maximum.

La prémisse de notre méthode repose sur le fait que la ploïdie des augmente avec le nombre de divisions qu'elles subissent (section 1.3.6.2). Les résultats obtenus corroborent les analyses publiées dans la littérature (Hasmall *et al.*, 1997; Rizzardini *et al.*, 1990) en ce qui a trait aux proportions d'hépatocytes de chaque classe de ploïdie dans les hépatocytes d'un animal traité au CCl<sub>4</sub>. Les populations d'hépatocytes analysées se composent d'une majorité de cellules tétraploïdes, d'une faible proportion de cellules diploïdes et d'une population intermédiaire de cellules octoploïdes. La distribution des cellules selon leur classe de ploïdie est illustrée chez les rats témoins et les rats traités au CCl<sub>4</sub> à la figure 3.3. Chez les témoins, les cellules diploïdes représentaient  $4,0 \pm 0,9\%$  de la population, les cellules tétraploïdes composaient  $72,0 \pm 3,5 \%$ , et les cellules octoploïdes,  $20,9 \pm 3,2 \%$ . Suite à l'injection de CCl<sub>4</sub>, on a observé chez les rats traités une diminution significative de 6 points du pourcentage de cellules tétraploïdes ( $66,0 \pm 1,4 \%$ ) accompagnée d'une augmentation de 4,9 points du pourcentage de cellules octoploïdes ( $25,8 \pm 2,5 \%$ ). Nous n'avons pas détecté d'effets sur le pourcentage de cellules diploïdes chez les traités ( $3,9 \pm 0,7 \%$ ). Ce résultat nous permet donc d'établir que la méthode employée est en mesure de déceler les effets de la prolifération cellulaire *in vivo* induite par un traitement hépatotoxique et qu'elle possède la sensibilité requise pour repérer ces mêmes effets dans le foie de rats traités à l'HCB.



**Figure 3.3** Effet du traitement  $\text{CCl}_4$  sur la ploïdie des hépatocytes. A) Profil type chez les rats témoins et B) Profil type pour les rats traités au  $\text{CCl}_4$ . On observe chez les rats injectés au  $\text{CCl}_4$  une diminution du pourcentage de cellules 4N accompagnée d'une augmentation des cellules 8N.

### 3.2.3 Effets du traitement HCB

La prolifération cellulaire est un facteur important dans le développement de tumeurs hépatiques. C'est la raison pour laquelle nous avons observé cet aspect chez les rats traités à l'HCB. Nous avons cherché à déterminer si le traitement à l'HCB causait une stimulation accrue de la prolifération cellulaire entre la fin du traitement et le jour 50 ou le jour 100 et si cette prolifération était spécifique aux femelles. Nous avons donc analysé la ploïdie des populations d'hépatocytes au jour 50 et au jour 100 du protocole pour les rats mâles et femelles.

L'analyse de la ploïdie des hépatocytes chez les rats femelles au jour 50 est présentée au tableau 3.3A. Les proportions des différentes classes de ploïdies des hépatocytes témoins sont conformes avec ce qui est connu dans la littérature (Hasmall *et al.*, 1997; Rizzardini *et al.*, 1990), c'est à dire qu'on retrouve une majorité de cellules tétraploïdes, une faible proportion de cellules diploïdes et une proportion de cellules octoploïdes intermédiaire. Cependant, le traitement à l'HCB n'a pas causé de changement significatif dans la distribution de la ploïdie au jour 50 (tableau 3.3A).

La distribution de la ploïdie des rats mâles sacrifiés au jour 50 du protocole (tableau 3.3A) est aussi conforme à ce que l'on retrouve en littérature (Hasmall *et al.*, 1997; Rizzardini *et al.*, 1990), avec une majorité de cellules tétraploïdes, une minorité de cellules diploïdes et une population intermédiaire de cellules octoploïdes. À l'instar de la situation observée chez les femelles du jour 50, le traitement à l'HCB n'a pas causé de modification significative dans la distribution de la ploïdie des hépatocytes.

L'analyse de la ploïdie des hépatocytes chez les rats femelles au jour 100 du protocole est présentée au tableau 3.3B. Encore une fois, la distribution des hépatocytes selon leur ploïdie correspond à ce qu'on retrouve dans la littérature (Hasmall *et al.*, 1997; Rizzardini *et al.*, 1990), soit une population majoritaire de cellules tétraploïdes, une population minoritaire de cellules diploïdes et une population intermédiaire de cellules

octoploïdes. Il n'y a pas de différences significatives dans la ploïdie des population d'hépatocytes entre les rats témoins et les rats traités

Les résultats obtenus chez les rats mâles sacrifiés au jour 100 corroborent ce qui a été observé au jour 50, c'est à dire que l'HCB ne semble pas avoir eu d'effet sur la prolifération cellulaire. Bien que l'échantillonnage ne permette pas d'effectuer d'analyse statistique, on n'observe pas de modification remarquable dans la ploïdie des population.

**Tableau 3.3A** Effet de l’HCB sur la ploïdie des populations d’hépatocytes chez les rats mâles et femelles au jour 50 du protocole de traitement. Les données sont présentées sous la forme de pourcentage de l’ensemble des cellules comprises dans l’ensemble 3 de la figure 2.2B. *ns* indique l’absence de différence significative dans les données suite au traitement à l’HCB tel qu’analysé par le test de t de Student.

	2N	4N	8N
<b>Témoins femelles (n=4)</b>	3,0 ± 0,7%	59,0 ± 1,0%	31,1 ± 2,1%
<b>Traités femelles (n=4)</b>	3,2 ± 0,4%	56,7 ± 2,4%	31,0 ± 2,1%
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Témoins mâles (n=5)</b>	2,6 ± 0,7%	57,3 ± 2,9%	31,5 ± 4,6%
<b>Traités mâles (n=4)</b>	3,3 ± 0,8%	58,8 ± 2,4%	27,7 ± 2,7%
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

**Tableau 3.3B** Effet de l’HCB sur la ploïdie des populations d’hépatocytes chez les rats femelles au jour 100 du protocole de traitement.

	2N	4N	8N
<b>Témoins femelles (n=4)</b>	2,6 ± 1,8%	62,0 ± 2,6%	28,7 ± 3,3%
<b>Traités femelles (n=4)</b>	3,0 ± 1,0%	62,1 ± 0,7%	27,1 ± 2,6%
	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Témoins mâles (n=5)</b>	2,1%	62,6%	26,8%
<b>Traités mâles (n=3)</b>	2,5%	64,5%	27,8%

## Chapitre 4 : DISCUSSION

Il a été démontré que l'HCB a un effet de promotion sur le développement de tumeurs hépatiques et que, chez le rat, cette action vise principalement les femelles. Les objectifs principaux des travaux présentés dans ce mémoire sont de mieux caractériser les mécanismes par lesquels l'HCB agit chez la femelle, en étudiant particulièrement son effet sur la prolifération de hépatocytes. Nous avons également voulu caractériser par immunohistochimie la baisse de l'expression de la protéine de la Cx32 déjà observée par notre laboratoire dans le but de déterminer si il est possible de localiser un foyer de cellules particulier à partir duquel une tumeur pourrait se développer. Nous avons employé un modèle dans lequel des rats sont exposés au promoteur HCB sans qu'il y ait initiation de tumeurs par l'administration d'un produit comme le DEN. Ainsi, toutes les modulations observées dans l'homéostasie tissulaire du foie sont causées par l'action de l'HCB seul. Dans le but de mieux comprendre l'importance des résultats présentés dans ce mémoire dans le contexte de l'étude de la promotion de tumeurs hépatiques, nous allons d'abord discuter de la localisation de la baisse de l'expression de la Cx32 pour ensuite la lier à l'effet de l'HCB sur la prolifération cellulaire.

### 4.1 L'expression de la Cx32 suite au traitement à l'HCB

Un des objectifs des travaux présentés dans ce mémoire est de caractériser la diminution de l'expression de la Cx32 observée dans notre laboratoire au jour 50 du protocole, durant la période de latence (Plante *et al.*, 2002). La baisse de la communication cellulaire via les jonctions lacunaires est une caractéristique commune à pratiquement toutes les tumeurs. Dans les tumeurs hépatiques, les cellules néoplastiques expriment la Cx32 beaucoup moins que les cellules normales. En immunohistochimie, le marquage de la Cx32 permet de localiser ces cellules puisqu'elles sont focalisées en points précis de la coupe (Neveu *et al.*, 1994). Nous avons donc voulu déterminer par immunohistochimie si la baisse d'expression observée pour la Cx32 par notre laboratoire est le fait d'un groupe de cellules ayant perdu la capacité de communiquer ensemble et focalisées ponctuellement dans le foie, ou, au contraire, si c'est l'ensemble des hépatocytes qui causent cette diminution sans égard à leur localisation.

Les résultats que nous avons obtenus confirment la baisse de l'expression de la Cx32 déjà observée par les techniques de Western et Northern effectuées dans notre laboratoire (Plante *et al.*, 2002). Cependant, ils infirment l'hypothèse de la focalisation des cellules en un point où l'expression de la Cx32 est diminuée. Cette diminution ne correspond pas non plus à un endroit spécifique du lobule hépatique, car on n'observe pas de baisse préférentiellement dans la région portale ou dans la région centro-lobulaire. Au contraire, nos observations montrent que la baisse de l'expression de la Cx32 est répartie sur l'ensemble des hépatocytes. En ce qui a trait à l'expression de la Cx32, l'HCB n'agit donc pas sur un nombre restreint de cellules localisées en points précis du foie, mais il provoque une baisse sur l'ensemble des hépatocytes. L'effet de l'HCB sur la communication intercellulaire n'a pas permis d'identifier un site spécifique où des cellules pourraient potentiellement former des tumeurs hépatiques.

Pourtant, d'autres promoteurs de tumeurs hépatiques sont connus pour réduire l'expression de la Cx32 dans des régions précises du foie. Chez les rats traités au  $\beta$ -naphthoflavone suite à une initiation de tumeurs au DEN, on observe une diminution de l'expression de la Cx32 dans la région centro-lobulaire (Shoda *et al.*, 2000). Le même phénomène est observé chez les rats traités au phénobarbital suite à l'initiation par le DEN (Neveu *et al.*, 1990). Le fenbendazole, un autre promoteur de tumeurs hépatiques, cause une baisse des niveaux d'ARNm de la Cx32 dans la région centro-lobulaire des rats initiés au DEN (Shoda *et al.*, 1999a). Le  $\beta$ -naphthoflavone, le phénobarbital et le fenbendazole sont tous des inducteurs de cytochromes (Shoda *et al.*, 2000; Neveu *et al.*, 1994; Shoda *et al.*, 1999b). Or, ces enzymes sont principalement actives dans la région centro-lobulaire du lobule hépatique (Smith *et al.*, 1990). L'HCB est aussi un inducteur de cytochrome chez le rat et la souris (Linko *et al.*, 1986), mais la localisation de la baisse de l'expression de la Cx32 ne correspond pas aux patrons obtenus avec ces autres promoteurs de tumeurs.

La baisse de l'expression de la Cx32 provoquée par le traitement de cinq jours se prolonge sur une période de 50 et même 100 jours après la fin du traitement, à des

moments où l'HCB n'est présent qu'en très faible quantité dans l'organisme. Ceci diffère également de l'effet du phénobarbital où on observe que la baisse de l'expression de la Cx32 est réversible dès le quatrième jour après l'arrêt du traitement au phénobarbital, et qu'elle est indissociable du niveau d'expression chez les animaux témoins 20 jours après le traitement. Ceci suggère que l'HCB agit par un mécanisme distinct par lequel la baisse de l'expression de la Cx32 provoquée par les autres promoteurs s'observe dans la région périportale et centro-lobulaire et sur une période de temps prolongée.

#### **4.2 L'effet du HCB sur la prolifération cellulaire**

La prolifération cellulaire est un facteur important dans la promotion de tumeurs hépatiques. C'est ce qui permet aux cellules néoplastiques et prénéoplastiques de prendre de l'expansion. Plusieurs cancérigènes épigénétiques ont démontré leur capacité à induire la prolifération cellulaire. Cependant, les résultats que nous avons obtenus n'indiquent pas que l'HCB module le taux de prolifération cellulaire durant la période de latence du protocole employé (tableau 3.3A, B). Les femelles présentent une même distribution de la ploïdie des hépatocytes au jour 50 et au jour 100 qu'elles aient reçu le traitement ou non, ce qui indique qu'il n'y a pas eu d'épisode d'hyperprolifération durant la période de latence. D'autre part, il n'y a pas de différences significatives entre la distribution ploïdique des hépatocytes chez les mâles traités et témoins au jours 50 et 100. En somme, le traitement de cinq jours consécutifs à l'HCB n'a pas d'effet mitogène durant la période de latence tant chez les rats mâles que femelles. Ainsi, nos résultats démontrent que la prolifération cellulaire n'est pas impliquée dans la promotion de tumeurs hépatiques du HCB durant la période de latence, ni dans les mécanismes qui expliquent le dimorphisme sexuel observé. L'HCB ne semble pas utiliser la prolifération cellulaire afin de permettre la propagation des cellules modifiées par son effet.

Il peut sembler intrigant que l'on ne retrouve pas de corrélation entre l'absence de modulation sur le taux de croissance cellulaire et la diminution de la communication intercellulaire. Une des raisons qui ont motivé l'étude de la prolifération cellulaire est que de nombreux auteurs prêtent aux jonctions lacunaires un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire (Yamasaki *et al.*, 1999; Evans et Martin, 2002; Loewenstein,

1990). Un des exemples les plus marquant est la réponse du foie suite à une hépatectomie partielle, où on observe une baisse de la communication intercellulaire précédant la synthèse de l'ADN (Dermietzel *et al.*, 1987), ce qui a fait suggérer aux auteurs que cette baisse initiait la réponse compensatrice du foie.

D'autre part, une baisse dans la communication intercellulaire et une hyperprolifération sont deux phénomènes concomittants qui accompagnent généralement dans le développement de tumeurs. Les travaux de Tsuda *et al.* (1995) sur l'avancement de l'hépatocarcinogénèse dans le foie chez le rat ont démontré une corrélation entre la synthèse de l'ADN et la baisse dans l'expression de la Cx32. De même, la transfection de gènes de la connexine dans de cellules tumorales restaure le contrôle sur le taux de croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Rose *et al.*, 1993; Eghbali *et al.*, 1991; Naus *et al.*, 1992). Chez les rats Fisher 344, le phénobarbital, le PCB, le DDT et le clofibrate causent à la fois une augmentation de la prolifération des hépatocytes et une localisation aberrante de la connexine 32 à l'intérieur du cytoplasme (Krutovskikh *et al.*, 1995). Enfin, chez les souris knockout de la Cx32 que la répllication cellulaire est plus rapide au niveau du foie (Temme *et al.*, 1997).

Des études récentes ont apporté un regard neuf sur cette problématique en démontrant que la diminution de la communication intercellulaire n'impliquait pas nécessairement une induction de la prolifération. Par exemple, chez les souris cx32-déficientes ayant subi une hépatectomie partielle et où le niveau de Cx32 est abaissé, la réponse proliférative du foie est retardée par rapport aux souris normales (Temme *et al.*, 2000). Fait très intéressant, Mally *et al.* (2002), pour un traitement au TCDD chez le rat, ont observé les mêmes effets que ceux que nous avons obtenus dans les présents travaux, soit une diminution de l'expression de la Cx32 au niveau du foie qui ne s'accompagnait pas d'une modulation du taux de prolifération. À l'inverse, le DCB et le chloroforme aussi à l'étude dans leur travaux ont provoqué une augmentation de la prolifération sans qu'il ait de baisse dans les niveaux de Cx32. D'autre part, en incorporant un gène mutant dominant négatif de la Cx32 dans le foie, le groupe de Omori (2001) a réussi à produire une souris où l'expression de la Cx32 est diminuée seulement au niveau du foie.

Contrairement aux souris Cx32-déficientes de Temme *et al.* (1997) où l'on observait un taux de prolifération des hépatocytes plus élevé, les souris du groupe d'Omori n'ont pas démontré un taux de prolifération significativement plus élevé. Bien que ces souris ne développaient pas plus de tumeurs hépatiques spontanées que les souris normales, leur susceptibilité à l'action d'agents hépatocarcinogènes demeure plus élevée. À ce titre, il est intéressant de constater que notre protocole de traitement produit des effets qui sont similaires à ceux observés chez les souris déficientes en Cx32 hépatiques. En somme, nos résultats suggèrent que la baisse de la communication intercellulaire n'induit pas nécessairement la prolifération cellulaire. Si le HCB a eu pour effet de diminuer l'expression de la Cx32 et la fonction des jonctions lacunaires, un autre facteur demeure essentiel pour induire l'hyperprolifération de hépatocytes.

Ainsi, l'HCB diffère d'autres promoteurs de tumeurs hépatiques telles que le DCB, le phénobarbital et le DDT. Ces substances ont démontré leur capacité à induire la prolifération cellulaire au niveau du foie par elles-mêmes (Eldridge *et al.*, 1992; Kolaja *et al.*, 2000; Krutovskikh *et al.*, 1995). Ces substances peuvent hausser la prolifération avant même l'initiation de tumeurs par des agents génotoxiques tels que le DEN. L'HCB quant à lui pourrait nécessiter la présence d'un autre facteur afin d'effectuer une quelconque influence sur le taux de division cellulaire; ceci pourrait être le cas dans un modèle "complet" d'initiation/promotion.

Nos résultats sur l'effet de l'HCB sur la prolifération au niveau du foie sont supportés par ce que l'on retrouve dans la littérature scientifique. Dans leur étude, Rizzardini *et al.* (1990) n'ont observé qu'une augmentation non significative de la proportion d'hépatocytes diploïdes en phase S, de 1,8% à 3,2%, dans une étude portant sur les effets de l'HCB sur le foie du rat. Les rats femelles employés dans cette étude avaient alors reçues une diète contenant 0,1% de HCB durant 15 jours, soit une dose quotidienne évaluée à 100 mg/kg pour un animal adulte mangeant 15 g de nourriture. Aucune autres populations d'hépatocytes n'a montré de variation suite au traitement. La dose employée par le groupe de Rizzardini est supérieure à celle employée dans nos travaux (100 mg/kg au total) et pourtant la distribution de la ploïdie des hépatocytes

demeure semblable entre les traités et les témoins. Cette étude démontre donc aussi que l'HCB n'induit pas la prolifération cellulaire au niveau du foie aux doses utilisées.

Il est intrigant que le groupe de Rizzardini ait pu démontrer une augmentation de la proportion de cellules en phase S après un traitement à l'HCB alors que la ploïdie dans l'ensemble des autres catégories demeure stable. Cette observation va à l'encontre des concepts actuels sur lesquels nous avons fondée notre prémisse de recherche. Il est possible de croire que cette apparente contradiction soit due à l'emploi, par le groupe de Rizzardini, de logiciels de cytométrie non discriminants pour l'analyse de populations d'hépatocytes et que cette augmentation n'ait donc été créée que par cette analyse informatique.

Un effet de l'HCB sur la prolifération cellulaire a été rapporté par Ou *et al.* (2001). Des rats Fisher 344 mâles ont été traités à l'HCB durant 8 semaines, à raison d'une dose quotidienne de 0,1 mmol/kg par gavage. Cependant, à la différence de notre protocole, ces rats ont aussi reçu une injection de DEN au tout début de l'expérience, afin d'initier le développement de tumeurs hépatiques, et ils ont subi une hépatectomie partielle durant la période de traitement au HCB, afin de démarrer une régénération du foie. On a observé que les rats ayant reçu le traitement DEN+HCB montraient un taux de prolifération cellulaire supérieur aux rats n'ayant reçu que l'injection au DEN. À titre de comparaison, les rats traités au pentachlorobenzène (PECB), un autre promoteur de tumeurs hépatiques étudié dans les travaux par ces chercheurs, n'ont pas montré un taux de prolifération significativement différent aux rats traités uniquement au DEN. Un effet de l'HCB sur la modulation de la prolifération cellulaire semble possible si la prolifération est démarrée en initiant les tumeurs hépatiques et en provoquant une régénérescence du tissu. La question de l'effet de l'HCB sur les mécanismes de la division cellulaire demeure, mais nous savons maintenant qu'une aide est nécessaire pour initier la prolifération.

Bien que nos résultats indiquent que le HCB ne provoque pas d'hyperprolifération durant la période de latence de notre protocole de traitement, il se pourrait très bien qu'il

en soit autrement lorsque l'initiateur de tumeurs est administré aux animaux. L'injection du DEN pourrait être l'élément qui déclencherait la prolifération cellulaire au niveau du foie. Cette utilisation du DEN nous permettrait alors de déterminer si, effectivement, l'HCB module le taux de prolifération des hépatocytes et, d'autre part, si cette modulation est particulière aux rats femelles, ce qui s'ajouterait à la listes des observations du dimorphisme sexuel sur les effets de l'HCB chez le rat. La réponse à ces questions ouvrirait de nombreuses avenues de recherche sur les mécanismes d'action de l'HCB dans la promotion de tumeurs hépatiques.

### 4.3 L'apoptose

Nos travaux ne présentent aucune donnée sur l'effet de l'HCB sur l'apoptose durant la période de latence. L'apoptose est pourtant une autre facette du maintien du taux de croissance dans un tissu. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui a pour but l'élimination de cellules excédentaires ou endommagées (Schulte-Hermann *et al.*, 1997) dans un tissu, ce qui permet le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ce mécanisme est caractérisé par la condensation des cellules et de leur noyaux et la fragmentation de la molécule ADN. Ces cellules sont alors phagocytées par les cellules avoisinantes (Alberts *et al.*, 1994). L'apoptose est régulée par un réseau complexe de signaux de survie ou de morts qui est perturbé lors du développement de tumeurs. Une caractéristique commune des populations de cellules prénéoplastiques et néoplastiques est l'excès de cellules en division par rapport au nombre de cellules en apoptose.

Il a été démontré que des agents épigénétiques ont la capacité d'inhiber l'apoptose des hépatocytes chez le rat. La suppression de l'apoptose a été observée *in vitro* chez des lignées cellulaires d'hépatocytes par le traitement au nafenopin (Bayly *et al.*, 1994) (James et Roberts, 1996), au DCB (James *et al.*, 1998). Dans chacun des cas, le traitement à ces agents épigénétiques a causé la prolifération cellulaire des hépatocytes. *In vivo*, le diéthylhexyl phthalate (DEHP) peut inhiber l'apoptose au niveau du foie chez le rat, de même que le DCB, quoique moins efficacement (James *et al.*, 1998). De plus,

le nafenopin et le l'acétate cyproterone inhibe l'apoptose basale du foie (Roberts *et al.*, 1995 a, b).

Le rôle des agents épigénétiques en ce qui a trait à l'apoptose dans le développement de tumeurs hépatiques semble être de permettre la survie des cellules néoplastiques et prénéoplastiques (Schulte-Hermann *et al.*, 1997). Dans leur expérience, le groupe de Grasl-Kraupp (1997) ont traité des rats porteurs de foyers néoplastiques spontanés au nafenopin durant 17 mois, après quoi le traitement a été interrompu. On a alors observé une augmentation du taux d'apoptose préférentiellement chez les cellules néoplastiques. Ceci a conduit à la réduction de la masse du foie de 20% et de la diminution du nombre de carcinomes et d'adénomes de 80%. Ces résultats démontrent que le nafenopin offre aux cellules tumorales une protection contre l'apoptose, ce qui représente un avantage majeur pour ces cellules et qui leur donne un net avantage de propagation.

Au niveau du foie, l'apoptose est un phénomène rapide et peu fréquent; le temps du processus d'apoptose chez les hépatocytes a été calculé à environ trois heures, et la proportion d'hépatocytes qui empruntent cette voie est faible (1/2000) (Feldmann, 1997). Ce taux est suffisant pour balancer le taux de divisions cellulaire des hépatocytes. Pour que l'apoptose joue un rôle significatif dans la promotion de tumeurs dans ce contexte, une prolifération cellulaire soutenue apparaît nécessaire. L'apoptose ne sera pas un facteur déterminant sur le taux de croissance net d'un organe dans un contexte où le taux de prolifération cellulaire de cet organe demeure faible. Or, comme nos résultats n'indiquent pas d'épisode d'hyperprolifération durant la période de latence, il semble peu probable que l'HCB ait un effet sur le taux d'apoptose qui permettrait d'expliquer le dimorphisme sexuel observé ailleurs (Krishnan *et al.*, 1991; Plante *et al.*, 2002). C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas entrepris de démarches afin d'étudier la relation entre le HCB et l'apoptose. Cependant, il demeure possible que le HCB ait un effet sur le taux d'apoptose dans le foie lors du développement de tumeurs hépatiques lorsqu'il y a une prolifération cellulaire initiée par le DEN ou un autre moyen.

## Conclusion

Les résultats obtenus de la caractérisation tissulaire de la Cx32 démontrent que l'HCB provoquait une baisse de l'expression de la Cx32 sur l'ensemble des hépatocytes. D'autre part, l'HCB n'induit pas de prolifération cellulaire chez les rats mâles ou femelles durant la période de latence du protocole de traitement. Ainsi, le HCB ne semble pas agir via la prolifération cellulaire afin de permettre la propagation de cellules susceptibles de devenir tumorales. L'ensemble, les résultats suggèrent que la baisse de la Cx32 n'est pas suffisante en elle-même pour d'initier la division cellulaire. Enfin, nos résultats sur la prolifération ont permis de suggérer l'importance d'initier les cycles de divisions à l'aide d'un facteur tel que le DEN afin de pouvoir évaluer si l'HCB y a un rôle à jouer.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994. Molecular biology of the cell, third edition. New York. Garland Publishing, Inc.
- ARNOLD, D. L., C. A. Moodie, S. M. Charbonneau, H. C. Grice, P. F. McGuire, F. R. Bryce, B. T. Collins, Z. Z. Zawadzka, D. R. Krewski, E. A. Nera et a. l. et. 1985. "Long-term toxicity of hexachlorobenzene in the rat and the effect of dietary vitamin A". Food and Chemical Toxicology, vol. 23, p. 779-93.
- BABINEAU, K. A., A. Singh, J. F. Jarrell et D. C. Villeneuve. 1991. "Surface epithelium of the ovary following oral administration of hexachlorobenzene to the monkey". Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, vol. 23, p. 457-64.
- BAYLY, A. C., R. A. Roberts et C. Dive. 1994. "Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin". Journal of Cell Biology, vol. 125, p. 197-203.
- BERTHOUD, V. M., V. Iwanij, A. M. Garcia et J. C. Saez. 1992. "Connexins and glucagon receptors during development of rat hepatic acinus". American Journal of Physiology, vol. 263, p. G650-8.
- BRODSKY, W. Y. et I. V. Uryvaeva. 1977. "Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function". International Review of Cytology, vol. 50, p. 275-332.
- BURSCHE, W., B. Lauer, I. Timmermann-Trosiener, G. Barthel, J. Schuppler et R. Schulte-Hermann. 1984. "Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters". Carcinogenesis, vol. 5, p. 453-8.
- BUTTERWORTH, B. E. 1990. "Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential". Mutation Research, vol. 239, p. 117-32.
- BUTTERWORTH, B. E. et T. L. Goldsworthy. 1991. "The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 198, p. 683-7.
- CABRAL, J. R., T. Mollner, F. Raitano et P. Shubik. 1979. "Carcinogenesis of hexachlorobenzene in mice". International Journal of Cancer, vol. 23, p. 47-51.
- CABRAL, J. R., P. Shubik, T. Mollner et F. Raitano. 1977. "Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in hamsters". Nature, vol. 269, p. 510-11.

CHARBONNEAU, M., M. Iijima, M. G. Cote et G. L. Plaa. 1985. "Temporal analysis of rat liver injury following potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity with ketonic or ketogenic compounds". Toxicology, vol. 35, p. 95-112.

CHEVALIER, S. et R. A. Roberts. 1998. "Perturbation of rodent hepatocyte growth control by nongenotoxic hepatocarcinogens: mechanisms and lack of relevance for human health (review)". Oncology Reports, vol. 5, p. 1319-27.

COLE, M. D. 1986. "The myc oncogene: its role in transformation and differentiation". Annual Review of Genetics, vol. 20, p. 361-84.

COURTNEY, K. D. 1979. "Hexachlorobenzene (HCB): a review". Environmental Research, vol. 20, p. 225-66.

CRIPS, D.J., H.A. Peters, A. Gocme 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.

DANG, C. V. 1991. "c-myc oncoprotein function". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1072, p. 103-13.

DERMIETZEL, R., S. B. Yancey, O. Traub, K. Willecke et J. P. Revel. 1987. "Major loss of the 28-kD protein of gap junction in proliferating hepatocytes". Journal of Cell Biology, vol. 105, p. 1925-34.

EGHBALI, B., J. A. Kessler, L. M. Reid, C. Roy et D. C. Spray. 1991. "Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 10701-5.

ELDRIDGE, S. R., T. L. Goldsworthy, J. A. Popp et B. E. Butterworth. 1992. "Mitogenic stimulation of hepatocellular proliferation in rodents following 1,4-dichlorobenzene administration". Carcinogenesis, vol. 13, p. 409-15.

ELFGANG, C., R. Eckert, H. Lichtenberg-Frate, A. Butterweck, O. Traub, R. A. Klein, D. F. Hulser et K. Willecke. 1995. "Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells". Journal of Cell Biology, vol. 129, p. 805-17.

EVANS, W. H. et P. E. Martin. 2002. "Gap junctions: structure and function (Review)". Molecular Membrane Biology, vol. 19, p. 121-36.

FALK, P. G., L. V. Hooper, T. Midtvedt, and J. I. Gordon. 1998. "Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology". Microbiol Mol Biol Rev, vol. 62, p. 1157-70.

FARBER, E. 1987. "Liver cell cancer: insights into the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in humans from experimental hepatocarcinogenesis in the rat". Monographs in

Pathology, vol. 199-222.

FARBER, E. 1995. "Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity". Cancer Research, vol. 55, p. 3759-62.

FELDMANN, G. 1997. "Liver apoptosis". Journal of Hepatology, vol. 26 Suppl 2, p. 1-11.

FITZGERALD, D. J. et H. Yamasaki. 1990. "Tumor promotion: models and assay systems". Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, vol. 10, p. 89-102.

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". Journal of Applied Toxicology, vol. 13, p. 79-83.

FREY, S., A. Buchmann, W. Bursch, R. Schulte-Hermann et M. Schwarz. 2000. "Suppression of apoptosis in C3H mouse liver tumors by activated Ha-ras oncogene". Carcinogenesis, vol. 21, p. 161-6.

FURUYA, K., Y. Maeura et G. M. Williams. 1984. "Abnormalities in liver iron accumulation during N-2-fluorenylacetamide hepatocarcinogenesis that are dependent or independent of continued carcinogen action". Toxicologic Pathology, vol. 12, p. 136-42.

GABRIEL, H. D., D. Jung, C. Butzler, A. Temme, O. Traub, E. Winterhager et K. Willecke. 1998. "Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice". Journal of Cell Biology, vol. 140, p. 1453-61.

GONG, X., E. Li, G. Klier, Q. Huang, Y. Wu, H. Lei, N. M. Kumar, J. Horwitz et N. B. Gilula. 1997. "Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice". Cell, vol. 91, p. 833-43.

Gouvernement du Canada, Environnement Canada, Santé et Bien-être social Canada. 1993. Loi canadienne sur la protection de l'environnement – Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation de l'hexachlorobenzène. Ottawa. Groupe Communication Canada.

GRASL-KRAUPP, B., B. Ruttkay-Nedecky, L. Mullauer, H. Taper, W. Huber, W. Bursch et R. Schulte-Hermann. 1997. "Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression". Hepatology, vol. 25, p. 906-12.

GUAN, X., W. J. Bonney et R. J. Ruch. 1995. "Changes in gap junction permeability, gap junction number, and connexin43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 130, p. 79-86.

HAM, A. et T.S. Leeson. 1961. Histology, 4th edition. London. Lippincott Company.

HASMALL, S. C. et R. A. Roberts. 1997. "Hepatic ploidy, nuclearity, and distribution of DNA synthesis: a comparison of nongenotoxic hepatocarcinogens with noncarcinogenic

- liver mitogens". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 144, p. 287-93.
- HOLDER, J. W., E. Elmore et J. C. Barrett. 1993. "Gap junction function and cancer". Cancer Research, vol. 53, p. 3475-85.
- JACKSON, M. A., H. F. Stack et M. D. Waters. 1993. "The genetic toxicology of putative nongenotoxic carcinogens". Mutation Research, vol. 296, p. 241-77.
- JAMES, N. H. et R. A. Roberts. 1996. "Species differences in response to peroxisome proliferators correlate in vitro with induction of DNA synthesis rather than suppression of apoptosis". Carcinogenesis, vol. 17, p. 1623-32.
- JAMES, N. H., A. R. Soames et R. A. Roberts. 1998. "Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB)". Archives of Toxicology, vol. 72, p. 784-90.
- JOU, Y. S., B. Layhe, D. F. Matesic, C. C. Chang, A. W. de Feijter, L. Lockwood, C. W. Welsch, J. E. Klaunig et J. E. Trosko. 1995. "Inhibition of gap junctional intercellular communication and malignant transformation of rat liver epithelial cells by neu oncogene". Carcinogenesis, vol. 16, p. 311-7.
- KIMURA, N. T. et T. Baba. 1973. "Neoplastic changes in the rat liver induced by polychlorinated biphenyl". Gann, vol. 64, p. 105-8.
- KITCHIN, K. T. et J. L. Brown. 1989. "Biochemical studies of promoters of carcinogenesis in rat liver". Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, vol. 9, p. 273-85.
- KMIEC, Z. 2001. "Cooperation of liver cells in health and disease". Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, vol. 161, p. III-XIII, 1-151.
- KNASMULLER, S., W. Parzefall, C. Helma, F. Kassie, S. Ecker et R. Schulte-Hermann. 1997. "Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment". Critical Reviews in Toxicology, vol. 27, p. 495-537.
- KOCIBA, R. J., D. G. Keyes, J. E. Beyer, R. M. Carreon, C. E. Wade, D. A. Dittenber, R. P. Kalnins, L. E. Frauson, C. 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 in rats". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 46, p. 279-303.
- KOLAJA, K. L., D. T. Engelken et C. D. Klaassen. 2000. "Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens". Toxicology, vol. 146, p. 15-22.
- KRISHNAN, K., J. Brodeur et M. Charbonneau. 1991. "Development of an experimental model for the study of hexachlorobenzene- induced hepatic porphyria in the

rat". Fundamental and Applied Toxicology, vol. 17, p. 433-41.

KRUTOVSKIKH, V., G. Mazzoleni, N. Mironov, Y. Omori, A. M. Aguelon, M. Mesnil, F. Berger, C. Partensky et H. Yamasaki. 1994. "Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32". International Journal of Cancer, vol. 56, p. 87-94.

KRUTOVSKIKH, V. A., M. Mesnil, G. Mazzoleni et H. Yamasaki. 1995. "Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins". Laboratory Investigation, vol. 72, p. 571-7.

KUIPER-GOODMAN, T., D. L. Grant, C. A. Moodie, G. O. Korsrud et I. C. Munro. 1977. "Subacute toxicity of hexachlorobenzene in the rat". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 40, p. 529-49.

LAMBRECHT, R.W., E. Ertük, 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 hamster (H) after subchronic administration". Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. Vol. 42, p.786.

LEBLOND, C.P. 1965. "The time dimension in histology". Am. J. Anat., vol. 116, p. 1-27.

LEDDA-COLUMBANO, G. M., P. Coni, M. Curto, L. Giacomini, G. Faa, S. Oliverio, M. Piacentini et A. Columbano. 1991. "Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide". American Journal of Pathology, vol. 139, p. 1099-109.

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

LERCHE-LANGRAND, C. et H. J. Toutain. 2000. "Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology". Toxicology, vol. 153, p. 221-53.

LINDER, R. E., T. R. Edgerton, D. J. Svendsgaard et R. F. Moseman. 1983. "Long-term accumulation of hexachlorobenzene in adipose tissue of parent and filial rats". Toxicology Letters, vol. 15, p. 237-43.

LINKO, P., H. N. Yeowell, T. A. Gasiewicz et J. A. Goldstein. 1986. "Induction of cytochrome P-450 isozymes by hexachlorobenzene in rats and aromatic hydrocarbon (Ah)-responsive mice". Journal of Biochemical Toxicology, vol. 1, p. 95-107.

LOEWENSTEIN, W. R. 1990. "Cell-to-cell communication and the control of growth". American Review of Respiratory Disease, vol. 142, p. S48-53.

MAIER, P. et H. Schawalder. 1993. "Physiological oxygen tension modulates the chemically induced mitogenic response of cultured rat hepatocytes". Journal of Cellular Physiology, vol. 156, p. 119-29.

MALLY, A., C. Cowles et J.K. Chipman. 2002. "Connexin plaque expression in relation to proliferative response to non-genotoxic carcinogens". Society of toxicology annual meeting 2002, Abstract 303, p. 62-63.

MARIEB, E.N. et G. Laurendeau. 1993. Anatomie et Physiologie humaines. Saint-Laurent. Les Éditions du nouveau pédagogique.

MATTHEWS, H. B. 1986. "Factors determining hexachlorobenzene distribution and persistence in higher animals". IARC Scientific Publications, vol. 253-60.

MAYOL, X., G. E. Neal, R. Davies, A. Romero et J. Domingo. 1992. "Ethinyl estradiol-induced cell proliferation in rat liver. Involvement of specific populations of hepatocytes". Carcinogenesis, vol. 13, p. 2381-8.

MEHTA, P. P., B. L. Lokeshwar, P. C. Schiller, M. V. Bendix, R. C. Ostenson, G. A. Howard et B. A. Roos. 1996. "Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP". Molecular Carcinogenesis, vol. 15, p. 18-32.

MILLS, J.J., R.L. Jirtle et I.J. Boyer. 1995. Liver Regeneration and carcinogenesis. Academic Press.

MIYASHITA, T., A. Takeda, M. Iwai et T. Shimazu. 1991. "Single administration of hepatotoxic chemicals transiently decreases the gap-junction-protein levels of connexin 32 in rat liver". European Journal of Biochemistry, vol. 196, p. 37-42.

MURRAY, S. A., K. Davis, L. M. Fishman et S. R. Bornstein. 2000. "Alpha1 connexin 43 gap junctions are decreased in human adrenocortical tumors". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 85, p. 890-5.

MYLCHREEST, E. et M. Charbonneau. 1994. "Ultrasound-induced epileptiform activity in rats treated with hexachlorobenzene". Neurotoxicology, vol. 15, p. 273-8.

NAKASHIMA, Y., S. Ohsawa, K. Umegaki et S. Ikegami. 1997. "Hexachlorobenzene accumulated by dams during pregnancy is transferred to suckling rats during early lactation". Journal of Nutrition, vol. 127, p. 648-54.

NAUS, C. C., K. Elisevich, D. Zhu, D. J. Belliveau et R. F. Del Maestro. 1992. "In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA". Cancer Research, vol. 52, p. 4208-13.

National Cancer Institute. 2002. "What you need to know about liver cancer". [www.nci.nih.gov/cancerinfo/wyntk/liver](http://www.nci.nih.gov/cancerinfo/wyntk/liver)

NEVEU, M. J., J. R. Hully, K. L. Babcock, E. L. Hertzberg, B. J. Nicholson, D. L. Paul et H. C. Pitot. 1994. "Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver". Journal of Cell Science, vol. 107 ( Pt 1), p. 83-95.

NEVEU, M. J., J. R. Hully, D. L. Paul et H. C. Pitot. 1990. "Reversible alteration in the expression of the gap junctional protein connexin 32 during tumor promotion in rat liver and its role during cell proliferation". Cancer Communications, vol. 2, p. 21-31.

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

NGUYEN-BA, G. et P. Vasseur. 1999. "Epigenetic events during the process of cell transformation induced by carcinogens (review)". Oncology Reports, vol. 6, p. 925-32.

OMORI, Y., M. Mesnil et H. Yamasaki. 1996. "Connexin 32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects". Molecular Biology of the Cell, vol. 7, p. 907-16.

OMORI, Y., M. L. Zaidan Dagli, K. Yamakage et H. Yamasaki. 2001. "Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice". Mutation Research, vol. 477, p. 191-6.

OU, Y. C., R. B. Conolly, R. S. Thomas, Y. Xu, M. E. Andersen, L. S. Chubb, H. C. Pitot et R. S. Yang. 2001. "A clonal growth model: time-course simulations of liver foci growth following penta- or hexachlorobenzene treatment in a medium-term bioassay". Cancer Research, vol. 61, p. 1879-89.

PALMER, J. R., L. Rosenberg, D. W. Kaufman, M. E. Warshauer, P. Stolley et S. Shapiro. 1989. "Oral contraceptive use and liver cancer". American Journal of Epidemiology, vol. 130, p. 878-82.

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 Letters, vol. 15, p. 95-101.

PETERS, H. A. 1976. "Hexachlorobenzene poisoning in Turkey". Federation Proceedings, vol. 35, p. 2400-3.

PETERS, H.A., D.J. Cripps et A. Gocmen. 1978. "Porohyria 20 years after hexachlorobenzene exposure." Neurology. Vol. 28, p. 333.

PITOT, H. C., Y. P. Dragan, J. Teegarden, S. Hsia et H. Campbell. 1996. "Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver". Toxicologic Pathology, vol. 24, p. 119-28.

PLANTE, I., M. Charbonneau et D. G. Cyr. 2002. "Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor

formation in the rat". Carcinogenesis, vol. 23, p. 1243-9.

REAUME, A. G., P. A. de Sousa, S. Kulkarni, B. L. Langille, D. Zhu, T. C. Davies, S. C. Juneja, G. M. Kidder et J. Rossant. 1995. "Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43". Science, vol. 267, p. 1831-4.

REN, P., P. P. Mehta et R. J. Ruch. 1998. "Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells: cell specificity and role of protein kinase C". Carcinogenesis, vol. 19, p. 169-75.

REUBER, M. D. et C. W. Lee. 1968. "Effect of age and sex on hepatic lesions in Buffalo strain rats ingesting diethylnitrosamine". Journal of the National Cancer Institute, vol. 41, p. 1133-40.

REUBER, M. D., K. Stromberg et E. L. Glover. 1972. "Influence of age and sex on hepatic lesions induced by chemical carcinogens: ingestion of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene by Buffalo strain rats". Journal of the National Cancer Institute, vol. 48, p. 675-83.

RIPPEN, G. et R. Frank. 1986. "Estimation of hexachlorobenzene pathways from the technosphere into the environment". IARC Scientific Publications, vol. 45-52.

RIZZARDINI, M., L. Cantoni, P. Villa et P. Ubezio. 1990. "Biochemical, morphological and flow-cytometric evaluation of the effects of hexachlorobenzene on rat liver". Cell Biology and Toxicology, vol. 6, p. 185-203.

RIZZARDINI, M. et A. G. Smith. 1982. "Sex differences in the metabolism of hexachlorobenzene by rats and the development of porphyria in females". Biochemical Pharmacology, vol. 31, p. 3543-8.

ROBERTS, R. A., A. R. Soames, J. H. Gill, N. H. James et E. B. Wheeldon. 1995a. "Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations". Carcinogenesis, vol. 16, p. 1693-8.

ROBERTS, R. A., A. R. Soames, N. H. James, J. H. Gill et E. B. Wheeldon. 1995b. "Dosing-induced stress causes hepatocyte apoptosis in rats primed by the rodent nongenotoxic hepatocarcinogen cyproterone acetate". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 135, p. 192-9.

ROSE, B., P. P. Mehta et W. R. Loewenstein. 1993. "Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity". Carcinogenesis, vol. 14, p. 1073-5.

SAI, K., B. L. Upham, K. S. Kang, R. Hasegawa, T. Inoue et J. E. Trosko. 1998. "Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro". Cancer Letters, vol. 130, p. 9-17.

SCHECHTER A., J. Mes, et D. Davies. 1989. "Polychlorinated biphenyl (PCB),

DDT, DDE and hexachlorobenzene (HCB) and PCDD/PCDF isomer levels in various organs in autopsy tissue from North American patients". Chemosphere, vol. 18, p. 811-818.

SCHULTE-HERMANN, R., W. Bursch, A. Low-Baselli, A. Wagner et B. Grasl-Kraupp. 1997. "Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis". Cell Biology and Toxicology, vol. 13, p. 339-48.

SCHULTE-HERMANN, R., W. Bursch, B. Marian et B. Grasl-Kraupp. 1999. "Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens". IARC Scientific Publications, vol. 273-85.

SCHWARZE, P. E., E. O. Pettersen, M. C. Shoaib et P. O. Seglen. 1984. "Emergence of a population of small, diploid hepatocytes during hepatocarcinogenesis". Carcinogenesis, vol. 5, p. 1267-75.

SEGLEN, P. O. 1979. "Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis". Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 5, p. 551-60.

SELDEN, A., G. Jacobson, P. Berg et O. Axelson. 1989. "Hepatocellular carcinoma and exposure to hexachlorobenzene: a case report". British Journal of Industrial Medicine, vol. 46, p. 138-40.

SHODA, T., K. Mitsumori, H. Onodera, K. Toyoda, C. Uneyama, T. Imazawa et M. Hirose. 1999. "The relationship between decrease in Cx32 and induction of P450 isozymes in the early phase of clofibrate hepatocarcinogenesis in the rat". Archives of Toxicology, vol. 73, p. 373-80.

SHODA, T., K. Mitsumori, H. Onodera, K. Toyoda, C. Uneyama, K. Takada et M. Hirose. 2000. "Liver tumor-promoting effect of beta-naphthoflavone, a strong CYP 1A1/2 inducer, and the relationship between CYP 1A1/2 induction and Cx32 decrease in its hepatocarcinogenesis in the rat". Toxicologic Pathology, vol. 28, p. 540-7.

SHODA, T., H. Onodera, M. Takeda, C. Uneyama, T. Imazawa, K. Takegawa, K. Yasuhara, T. Watanabe, M. Hirose et K. Mitsumori. 1999. "Liver tumor promoting effects of fenbendazole in rats". Toxicologic Pathology, vol. 27, p. 553-62.

SIEKEL, P., I. Chalupa, J. Beno, M. Blasko, J. Novotny et J. Burian. 1991. "A genotoxicological study of hexachlorobenzene and pentachloroanisole". Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, vol. 11, p. 55-60.

SIGAL, S. H., P. Rajvanshi, G. R. Gorla, R. P. Sokhi, R. Saxena, D. R. Gebhard Jr, L. M. Reid et S. Gupta. 1999. "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events". American Journal of Physiology, vol. 276, p. G1260-72

SIMON, A. M. et D. A. Goodenough. 1998a. "Diverse functions of vertebrate gap junctions". Trends in Cell Biology, vol. 8, p. 477-83.

SIMON, A. M., D. A. Goodenough, E. Li et D. L. Paul. 1997. "Female infertility in mice lacking connexin 37". Nature, vol. 385, p. 525-9.

SIMON, A. M., D. A. Goodenough et D. L. Paul. 1998b. "Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block". Current Biology, vol. 8, p. 295-8.

SMITH, A. G., J. E. Francis, D. Dinsdale, M. M. Manson et J. R. Cabral. 1985. "Hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene in rats and the sex difference in hepatic iron status and development of porphyria". Carcinogenesis, vol. 6, p. 631-6.

SMITH, A. G., J. E. Francis, J. A. Green, J. B. Greig, C. R. Wolf et M. M. Manson. 1990. "Sex-linked hepatic uroporphyrin and the induction of cytochromes P450IA in rats caused by hexachlorobenzene and polyhalogenated biphenyls". Biochemical Pharmacology, vol. 40, p. 2059-68.

SMITH, A. G., J. R. Cabral, P. Carthew, J. E. Francis et M. M. Manson. 1989. "Carcinogenicity of iron in conjunction with a chlorinated environmental chemical, hexachlorobenzene, in C57BL/10ScSn mice". International Journal of Cancer, vol. 43, p. 492-6.

SOSINSKY, G. 1995. "Mixing of connexins in gap junction membrane channels". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 9210-4.

Statistique Canada. 2001. "Statistiques canadiennes sur le cancer 2001".  
<http://66.59.133.166/stats/mainf.htm>

STAUFFER, K. A. 1995. "The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2- connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 6768-72.

STEWART, F. P., M. M. Manson, J. R. 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. 1225-30.

STEWART, F. P. et A. G. Smith. 1987. "Metabolism and covalent binding of hexachlorobenzene by isolated male and female rat hepatocytes". Biochemical Pharmacology, vol. 36, p. 2232-4.

STROMBERG, K. et M. D. Reuber. 1970. "Influence of age and sex on hepatic lesions induced by chemical carcinogens: ingestion of N-4-(4'-fluorobiphenyl)acetamide by Buffalo strain rats". Journal of the National Cancer Institute, vol. 44, p. 1047-54.

TATENO, C., S. Ito, M. Tanaka, M. Oyamada et A. Yoshitake. 1994. "Effect of DDT on hepatic gap junctional intercellular communication in rats". Carcinogenesis, vol. 15, p. 517-21.

TEMME, A., A. Buchmann, H. D. Gabriel, E. Nelles, M. Schwarz et K. Willecke. 1997. "High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32". Current Biology, vol. 7, p. 713-6.

TEMME, A., T. Ott, F. Dombrowski et K. Willecke. 2000. "The extent of synchronous initiation and termination of DNA synthesis in regenerating mouse liver is dependent on connexin32 expressing gap junctions". Journal of Hepatology, vol. 32, p. 627-35.

TRAUB, O., J. Look, R. Dermietzel, F. Brummer, D. Hulser et K. Willecke. 1989. "Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes". Journal of Cell Biology, vol. 108, p. 1039-51.

TSUDA, H., M. Asamoto, H. Baba, Y. Iwahori, K. Matsumoto, T. Iwase, Y. Nishida, S. Nagao, K. Hakoi, S. Yamaguchi et a. l. et. 1995. "Cell proliferation and advancement of hepatocarcinogenesis in the rat are associated with a decrease in connexin 32 expression". Carcinogenesis, vol. 16, p. 101-5.

WILD, C. P. et P. C. Turner. 2002. "The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions". Mutagenesis, vol. 17, p. 471-81.

WILLECKE, K., S. Kirchhoff, A. Plum, A. Temme, E. Thonnissen et T. Ott. 1999. "Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse". Novartis Foundation Symposium, vol. 219, p. 76-88; discussion 88-96.

WILLIAMS, D. T., G. L. LeBel et E. Junkins. 1988. "Organohalogen residues in human adipose autopsy samples from six Ontario municipalities". Journal - Association of Official Analytical Chemists, vol. 71, p. 410-4.

WILLIAMS, G. M. 1980. "The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 605, p. 167-89.

WILLIAMS, G. M. et M. J. Iatropoulos. 2002. "Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity". Toxicologic Pathology, vol. 30, p. 41-53.

WILLIAMS, G. M. et J. Whysner. 1996. "Epigenetic carcinogens: evaluation and risk assessment". Experimental and Toxicologic Pathology, vol. 48, p. 189-95.

WOGAN, G. N. et P. M. Newberne. 1967. "Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat". Cancer Research, vol. 27, p. 2370-6.

World Health Organization. 1997. "Environmental Health Criteria 195 – Hexachlorobenzene". [www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc195.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc195.htm)

YAGER, J. D. et J. G. Liehr. 1996. "Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis". Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 36, p. 203-32.

YAGER, J. D., J. Zurlo et N. Ni. 1991. "Sex hormones and tumor promotion in liver". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 198, p. 667-74.

YAMASAKI, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil, T. Tanaka, M. L. Zaidan-Dagli et Y. Omori. 1999. "Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis". Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III. Sciences de la Vie, vol. 322, p. 151-9.

ZEIGER, E. 1987. "Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity". Cancer Research, vol. 47, p. 1287-96.

ZHANG, M. et S. S. Thorgeirsson. 1994. "Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes". Experimental Cell Research, vol. 213, p. 37-42.