

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**COMPRENDRE LES DIFFÉRENCES SEXUELLES EN CE QUI A TRAIT À LA
RÉPONSE HÉPATIQUE FACE AUX COMPOSÉS TOXIQUES DE
L'ENVIRONNEMENT**

Par
Christine Kirady

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Jacques Bernier INRS-IAF
Examineur externe	Sami Haddad Département de santé environnementale et santé au travail Université de Montréal
Directeur de recherche	Daniel G. Cyr INRS-IAF
Codirecteur de recherche	Isabelle Plante INRS-IAF

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs de recherche :

- Daniel G. Cyr, merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir accueilli à bras ouverts dans ton laboratoire. Je te remercie d'avoir été mon mentor et d'avoir été ouvert à mes idées et à mes nombreuses questions.
- Isabelle Plante, merci pour tes conseils et ta confiance.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir pris le temps de lire mon mémoire et d'en faire l'évaluation.

Je voudrais remercier Julie, assistante de recherche du Dr. Cyr, ma deuxième petite maman, ma voisine de bench, merci d'avoir toujours été là pour me conseiller, m'écouter et également pour avoir embarquée dans mes niaiseries. Mon parcours dans le laboratoire n'aurait jamais été le même sans toi, tel un fossile dans une pierre, tu resteras gravée dans ma mémoire.

Je voudrais également remercier Mary, assistante de recherche du Dr. Cyr, merci pour tes précieux conseils et ta disponibilité. Merci d'avoir été là pour nous remonter le moral avec tes chocolats !

Je remercie Laurie, d'avoir été un support moral et une amie tout au long de cette aventure. J'ai appris à connaître une personne formidable, toujours là pour aider et écouter ce que tu as à dire.

J'aimerais remercier mes amis pour leur présence, leur soutien et aussi pour m'avoir fait rire et m'avoir permis de lâcher prise dans les moments plus dure de mon parcours. Je vous adore vous êtes des perles et je suis choyée de vous avoir dans mon entourage.

J'aimerais finalement remercier mes parents, ma sœur et mes grands-parents pour avoir toujours cru en moi et m'avoir encouragée. Un merci particulier à mes parents pour avoir enduré mes sauts d'humeurs et pour leur présence et leur aide. Merci de n'avoir jamais douté de moi et de m'avoir encouragé à poursuivre mes rêves.

Et finalement, merci à tous ceux que j'ai pu côtoyer à l'Institut, mon passage n'aurait pas été le même sans vous.

Résumé

Des études ont rapporté des différences entre les sexes dans le développement et la fonctionnalité des systèmes de détoxification dans des tissus non-reproductifs, tels que le foie. L'objectif principal de mon projet était de mieux comprendre ce dimorphisme sexuel impliqué dans le métabolisme et la communication cellulaire par les jonctions lacunaires dans le foie. Nos données ont indiqué que les rats mâles et femelles démontrent une réponse différente suite à une exposition à l'hexachlorobenzène. Les femelles exprimaient des niveaux plus élevés de cytochrome p450 1A1 et des niveaux plus faibles de l'uroporphyrinogène décarboxylase, comparé aux mâles. De plus, nos résultats ont démontré un dimorphisme sexuel dans l'expression de la Cx32 et la Cx43, dans le foie, au cours du développement. Des cellules souches hépatiques purifiées ont été utilisées afin de développer un modèle *in vitro* de culture tridimensionnelle afin d'étudier les jonctions lacunaires. Les protéines des jonctions lacunaires (Cx26, Cx32 et Cx43) et la protéine des jonctions adhérentes (E-cadhérine) ont été détectées par immunofluorescence dans les organoïdes en prolifération et les organoïdes différenciés. Des niveaux plus élevés de la Cx26, Cx32 et d'E-cadhérine ont été observés dans les organoïdes différenciés comparés aux non différenciés. Les niveaux d'ARNm de la Cx43 étaient plus élevés dans les organoïdes non différenciés que les organoïdes différenciés. À une dose de 100 nM d'estradiol, les niveaux d'ARNm de la Cx26 étaient significativement augmentés. En conclusion, nos données indiquent que les jonctions lacunaires sont partiellement régulées par les hormones stéroïdiennes dans le foie.

Mots clés : Foie, jonctions lacunaires, connexines, organoïdes, hexachlorobenzène, cytochrome, œstrogènes, androgènes.

Abstract

Studies have reported sex differences in the development and functionality of detoxification systems in non-reproductive tissues, such as the liver. The principal objective of my project was to understand the sexual dimorphism that occurs at the metabolism and the gap junctional communication level in the liver. Our data indicate that male and female rats display different responses to hexachlorobenzene exposure. Females express higher levels of cytochrome P450 1A1, and lower levels of uroporphyrinogen decarboxylase, as compared to males. Furthermore, our results show sex differences in levels of Cx32 and Cx43 in the liver of male and female rats during postnatal development. We used purified hepatic stem cells to develop an *in vitro* model and establish 3-dimensional cultures. We were able to detect gap junctional protein Cx26, Cx32, and Cx43 and adherent junction protein E-cadherin by immunofluorescence in proliferating and differentiated organoids. Higher levels of Cx26, Cx32 and E-cadherin were observed in differentiated organoids as compared to proliferating organoids. In contrast, higher levels of Cx43 were observed in proliferating organoids. At 100 nm E₂, mRNA levels of Cx26 were significantly increased. In conclusion, our data indicate that gap junctions are in part regulated by steroid hormones in the liver.

Key words: Liver, gap junctions, connexins, organoids, hexachlorobenzene, cytochrome, oestrogens, androgens.

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	v
Abstract	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xv
INTRODUCTION	17
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	21
SECTION 1 : LE FOIE	21
1.1 Rôles	21
1.2 Développement	26
1.3 Organisation tissulaire.....	21
1.4 Fonctions.....	27
SECTION 2 : LES JONCTIONS CELLULAIRES	29
2.0 La communication cellulaire	29
2.1 Jonctions serrées	29
2.2 Jonctions adhérentes	30
2.3 Jonctions lacunaires	31
SECTION 3 : LA RÉGÉNÉRATION DU FOIE	38
2.1 Cellules souches	38
SECTION 4 : LES ORGANOIDES	40
4.1 Les organoïdes du foie.....	41
SECTION 5 : L'HEXACHLOROBENZÈNE	45
5.1 Classification.....	45
5.2 Propriétés	45
5.3 Utilisation	46
5.4 Exposition.....	47
5.5 ADME.....	48
5.6 Effets sur la santé	49
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	53
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	55
2.0 Animaux.....	55

2.0.1	Expérience hexachlorobenzène (HCB).....	55
2.0.2	Traitement.....	55
2.0.3	Expérience développement.....	55
2.1	Acide ribonucléique (ARN)	56
2.1.2	Extraction	56
2.1.3	Quantification.....	56
2.2	Protéines	57
2.2.1	Extraction	57
2.2.3	Quantification.....	57
2.3	Immunofluorescence	58
2.4	Cellules MH1C1	58
2.4.1	Mise en culture	58
2.4.2	Passage cellulaire.....	58
2.4.3	Traitement à l'hexachlorobenzène (HCB).....	59
2.5	Organoïdes	59
2.5.1	Mise en culture	59
2.5.2	Passage cellulaire.....	59
2.5.3	Différenciation	59
2.5.4	Traitement aux stéroïdes	60
2.5.5	Comptage cellulaire.....	60
2.5.6	Expression génique	61
2.5.7	Immunofluorescence	61
2.5	Statistiques.....	62
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....		65
3.0 Effets d'un traitement à l'hexachlorobenzène (HCB) sur les jonctions lacunaires et les enzymes de détoxification dans le foie des rats mâles et femelles (<i>in vivo</i>).....		65
3.1 Effets d'un traitement à l'HCB sur les jonctions communicantes dans les cellules MH1C1 (<i>in vitro</i>)		70
3.2 Établissement des niveaux protéiques des différentes connexines dans le foie au cours du développement.....		71
3.3 Prolifération et différenciation d'organoïdes issus de cellules souches du foie		76
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....		87
CONCLUSION		97
RÉFÉRENCES.....		99

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1. 1 Développement du foie chez la souris au cours de l'embryogenèse	26
Figure 1. 2 Illustration de l'architecture d'un lobule hépatique.....	22
Figure 1. 3 Illustration de l'architecture d'un lobule hépatique.....	23
Figure 1. 4 Formation des plaques jonctionnelles	32
Figure 1. 5 Représentation schématique d'une connexine	34
Figure 1. 6 Structure chimique de l'hexachlorobenzène (C ₆ Cl ₆)	45

CHAPITRE 2

Figure 2. 1 Schématisation des lobes d'un foie de rat.....	56
Figure 2. 2 Protocole expérimental pour la différenciation des organoïdes et les traitements aux hormones stéroïdiennes.....	60

CHAPITRE 3

Figure 3. 1 Effets d'un traitement à l'HCB (100 mg/kg/jour) sur le poids des animaux	66
Figure 3. 2 Effets d'un traitement à l'HCB sur les niveaux d'ARNm de CYP1A1 (A), UROD (B) et Cx32 (C)	68
Figure 3. 3 Analyse d'immunobuvardage de type Western de la Cx32 (A) et de CDH1 (B) et immunolocalisation de la Cx32 chez les rats femelles contrôles (C1) et traités à l'HCB (C2).	69
Figure 3. 4 Effet d'un traitement à l'HCB (5, 30 et 50 µM) sur les niveaux d'ARNm de la Cx32, chez les cellules MH1C1	70
Figure 3. 5 Analyse d'immunobuvardage de type Western de la connexine 26 (Cx26).....	73
Figure 3. 6 Analyse d'immunobuvardage de type Western de la connexine 32 (Cx32).....	74
Figure 3. 7 Niveaux d'expression protéique de la connexine 43 (Cx43).....	75
Figure 3. 8 Formation et croissance des organoïdes dans le milieu de prolifération Hépaticult (STEMCELL Technologies) et le milieu de différenciation	76
Figure 3. 9 Croissance des organoïdes dans le milieu d'expansion et le milieu de différenciation avec ou sans E ₂	77

Figure 3. 10 Formation des organoïdes dans le milieu d'expansion (haut) et milieu de différenciation (bas) et marquage d'immunofluorescence de Lgr5.....	77
Figure 3. 11 Marquage d'immunofluorescence de la connexine 26 (Cx26) dans les organoïdes de foie	79
Figure 3. 12 Marquage d'immunofluorescence de la connexine 32 (Cx32) dans les organoïdes de foie	80
Figure 3. 13 Marquage d'immunofluorescence de la connexine 43 (Cx43) dans les organoïdes de foie	81
Figure 3. 14 Marquage d'immunofluorescence d'E-cadhérine (CDH1) dans les organoïdes de foie	82
Figure 3. 15 Effets de l'estradiol (E₂) sur les niveaux d'ARNm de Cx26 (A), Cx32 (B), Cx43 (C) et de CDH1 (D) dans les organoïdes de foie	84
Figure 3. 16 Effet de la testostérone sur les niveaux d'ARNm de Cx26 (A), Cx32 (B), Cx43 (C) et de CDH1 (D) dans des organoïdes de foie.....	86

Liste des tableaux

CHAPITRE 2

Table 2. 1 Liste des anticorps utilisés pour les immunobuvardage de type Western	62
Table 2. 2 Liste des amorces utilisées pour les analyses de PCR en temps réel (qPCR) ...	62
Table 2. 3 Liste des anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence	63

Liste des abréviations

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
ARN	Acide ribonucléotidique messenger
CDH1	Cadhérine épithéliale (E-cadhérine)
CLDN	Claudine
CSE	Cellules souches embryonnaires
Cx	Connexine
CYP450	Cytochrome P450
D	Groupe des organoïdes différenciés
DEN	Diéthylnitrosamine
DHT	Dihydrotestostérone
DTT	Dithiothreitol
E ₂	17 β -Estradiol
EtOH	Éthanol
GJA1	Protéine de jonction lacunaire du groupe alpha 1
GJB1	Protéine de jonction lacunaire du groupe bêta 1
GJB2	Protéine de jonction lacunaire du groupe bêta 2
HAP	Hydrocarbures polyaromatiques
HCB	Hexachlorobenzène
HSCs	Cellules Stellates
KCs	Cellules Kupffer
kDa	kiloDalton
LSECs	Cellules endothéliales sinusoïdales
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MHs	Hépatocytes matures
ND	Groupe des organoïdes non différenciés
OCLN	Occludines

SHs	Petits hépatocytes
UROD	Uroporphyrinogène décarboxylase
ZO	Protéines de jonctions (<i>Zonula occludens</i>)

INTRODUCTION

Le foie permet la détoxification de composés qui pourraient être toxiques pour notre corps à leur état naturel. Une partie de cette régulation est effectuée par les enzymes du cytochrome P450 dont l'expression varie d'un individu à un autre, mais également d'un sexe à l'autre (Waxman and Holloway, 2009; Yang et al., 2012). Afin de maintenir ses fonctions métaboliques, telles que la détoxification des drogues et le métabolisme des aliments ingérés, le foie se doit d'être hautement régulé. Cette régulation est entre autres médiée par la communication cellulaire par les jonctions lacunaires qui est essentielle au maintien de l'homéostasie du tissu. Les jonctions lacunaires sont composées des connexines, qui sont de petites protéines régulées en partie par les hormones stéroïdiennes telles que l'estrogène, la testostérone et la progestérone, dans certains tissus (Petrocelli and Lye, 1993; Ren et al., 2013). De plus, une diminution de la communication cellulaire, au niveau de la connexine 26 (Cx26), la connexine 32 (Cx32) et la connexine 43 (Cx43), a souvent été observée dans le processus de carcinogenèse (Yamasaki et al., 1995). Des études antérieures ont démontré qu'une exposition de 5 jours à 100 mg/kg/jour d'hexachlorobenzène (HCB) menait à des baisses dans les niveaux hépatiques de la Cx26 et de la Cx32, uniquement chez les rats femelles (Plante et al., 2002). Les mécanismes qui régulent ce dimorphisme sexuel ne sont pas encore connus.

Les modèles de culture cellulaire en deux dimensions ne permettent pas la reproduction exacte des jonctions lacunaires et du métabolisme du foie. Récemment, un modèle de culture tridimensionnel (3D), nommé les organoïdes, a été établi et permet une représentation physiologique plus exacte des mécanismes moléculaires et cellulaires se produisant *in vivo* si l'on compare aux autres modèles cellulaires en deux dimensions (2D) (Methods, 2018; Nantasanti et al., 2016). Les organoïdes hépatiques permettent de mieux étudier la toxicité et le métabolisme du foie (revue dans Nantasanti et al. (2016)). De ce fait, il constituerait un bon modèle afin d'étudier l'impact des hormones stéroïdiennes sur le développement du foie et sur la régulation des connexines et du métabolisme.

L'hypothèse de recherche de ce projet était que le dimorphisme sexuel observé au niveau de l'expression des connexines hépatique (Plante et al., 2002) était établi pendant le développement. En effet, on observe des fluctuations aux niveaux des hormones entre les mâles et les femelles, ces variations auraient un impact sur les niveaux basaux des connexines chez les animaux adultes. Ainsi, les rats femelles seraient plus sensibles aux effets néfastes d'une exposition à l'HCB. (Plante et al., 2002). L'objectif global de ce projet vise ainsi à mieux

comprendre les différences entre les mâles et les femelles en ce qui a trait à la communication cellulaire par les jonctions lacunaires et à la détoxification afin d'en comprendre la régulation.

Afin de répondre à l'hypothèse, le premier objectif visait à caractériser la réponse à l'HCB *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, un premier traitement, *in vivo*, consistait au gavage de rats mâles et femelles avec une dose d'HCB de 100 mg/kg/jour pendant 5 jours consécutifs tel que décrit dans Plante et al. (2002). Un deuxième traitement, *in vitro*, consistait à l'exposition de cellules de foie MH1C1 à différentes doses d'HCB (30 et 50 μ M) pendant 7 jours consécutifs tel que décrit dans Plante et al. (2005). Les niveaux d'ARNm et les niveaux protéiques des connexines ainsi que d'autres gènes impliqués dans le métabolisme et la détoxification ont été observés par PCR en temps réel et/ou immunobuvardage de type Western.

Le deuxième objectif visait à évaluer la régulation des connexines au cours du développement chez les rats mâles et les rats femelles. Ainsi, les niveaux protéiques de la Cx26, la Cx32 et la Cx43 ont été déterminés, par immunobuvardage de type Western, à différents stades de développement (Jour après la naissance (PND) 14, 21, 42, 60).

Le troisième objectif avait pour but d'évaluer l'effet des hormones stéroïdiennes (estradiol (E_2) et testostérone) sur la localisation et la régulation de l'expression des connexines du foie (Cx26, Cx32 et Cx43) et d'E-cadhérine (CDH1). Pour ce faire, des organoïdes hépatiques ont été utilisés. Au cours de la différenciation, ils ont été exposés à différentes doses (10, 100, 1000 nM) d' E_2 ou de testostérone. La localisation des connexines et de CDH1 a été observée par immunofluorescence tandis que les niveaux d'ARNm ont été quantifiés par PCR en temps réel.

Le premier chapitre de ce mémoire est une revue de littérature qui regroupe les différents thèmes abordés dans ce projet divisée en cinq sections. La première section vise à mettre en évidence certains processus et fonctions essentielles du foie. La deuxième section portera sur la caractérisation des jonctions lacunaires et des jonctions adhérentes qui sont essentielles au maintien des fonctions du foie et dont le rôle semble impliqué à la régulation de la cancérogenèse. La troisième section démontrera l'utilité des cellules souches dans le développement et sera suivie de la section sur les organoïdes qui sont un modèle innovateur démontrant l'utilité des cellules souches pour la recherche *in vitro*. Finalement, la dernière section portera sur l'HCB, polluant induisant un dimorphisme sexuel au niveau des jonctions lacunaires chez le rat. Le deuxième chapitre présentera les matériaux et les méthodes utilisés au cours de ce projet. Le troisième chapitre portera sur les résultats obtenus suite aux différentes analyses effectuées. Finalement,

le dernier chapitre permettra une analyse plus complète des données obtenues et présentera les conclusions générales et perspectives face à ce projet.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

SECTION 1 : LE FOIE

1.1 Rôles

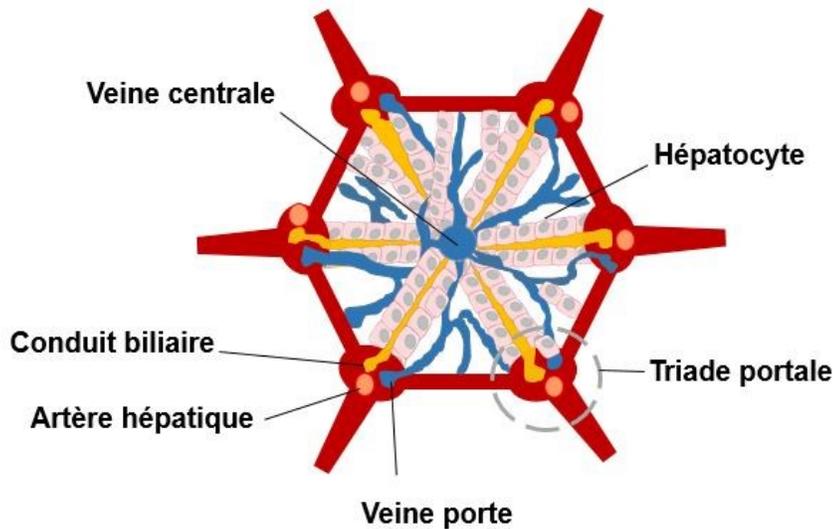
Le foie est la plus grosse glande du corps humain (Gordillo et al., 2015). Le foie, tout comme le pancréas, est une glande amphicrine, c'est-à-dire qu'il exerce des fonctions endocrines et exocrines (Si-Tayeb et al., 2010). La fonction endocrine du foie permet la libération de diverses hormones dont le facteur de croissance à l'insuline, la thrombopoïétine et l'angiotensinogène directement dans le sang (Si-Tayeb et al., 2010). La fonction exocrine permet la sécrétion de diverses substances à l'extérieur du corps, telles que la sécrétion de bile dans le tube digestif qui est nécessaire à la digestion des gras et à l'absorption de certaines vitamines (Doull's, 2013; Si-Tayeb et al., 2010). Le foie est aussi impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques cruciales incluant le métabolisme des nutriments ingérés par notre alimentation, la régulation du cholestérol, le stockage du glycogène, la détoxification des drogues, le métabolisme de l'urée, ainsi que la sécrétion de protéines plasmatiques comme l'albumine (Doull's, 2013; Si-Tayeb et al., 2010). Le métabolisme des médicaments et la détoxification des drogues sont des processus également très importants. Le foie agit comme un filtre pour le sang en récupérant les substances toxiques et en les convertissant en substance moins toxique, ce qui facilite leur élimination par l'organisme (Grant, 1991; Si-Tayeb et al., 2010). Tous ces rôles sont primordiaux pour le maintien de l'homéostasie du corps et doivent de ce fait être hautement régulés (Si-Tayeb et al., 2010).

1.2 Organisation tissulaire

Le foie mature est composé de 4 lobes chez l'humain et 6 chez le rat (Gordillo et al., 2015). Chaque lobe entoure une veine centrale qui permet la sortie du sang. Ils sont généralement de forme hexagonale où chaque sommet est composé de la triade portale (**Figure 1.2**). Comme son nom l'indique, celle-ci est composée de trois conduits, soit une branche issue de la veine porte qui apporte le sang non oxygéné à la triade, une artériole hépatique qui transporte le sang oxygéné et un canal biliaire (Doull's, 2013; Gordillo et al., 2015).

Les lobules et les hépatocytes sont localisés dans trois régions distinctes. La première, la zone périportale, se situe à l'entrée du sang près de la veine porte et de l'artère hépatique et est suivie de la zone intermédiaire. Finalement, on retrouve la zone péricentrale qui se situe à proximité de la veine centrale qui permet la sortie du sang (Gordillo et al., 2015; Rosenberg et al., 1996). Il est intéressant de noter que la concentration en oxygène diminue au cours de l'avancement vers la veine centrale (**Figure 1.3**). Ainsi, les hépatocytes se situant dans la région 3 sont dans des conditions dites hypoxiques. D'ailleurs, plusieurs différences caractéristiques ont

été observées dans ces zones (Kietzmann, 2017). Par exemple, des études démontrent que la zone péricentrale est plus riche en enzyme du cytochrome P450 que la zone périportale et intermédiaire (Rosenberg et al., 1992). L'expression des jonctions lacunaires chez les hépatocytes varie également en fonction de leur localisation (Traub et al., 1989).

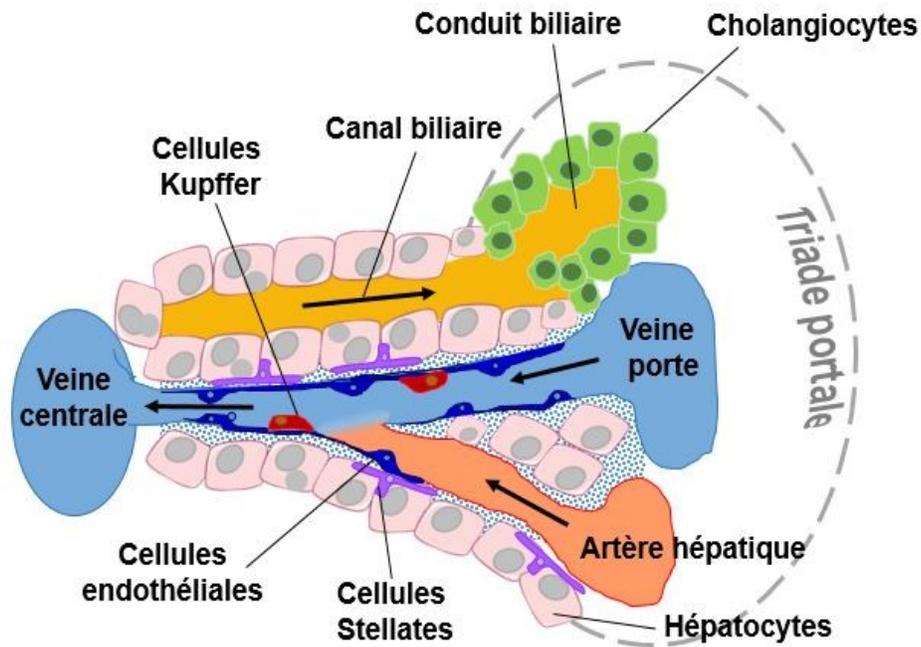


Inspirée par Gordillo M et al. 2015

Figure 1. 1 Illustration de l'architecture d'un lobule hépatique. Vue de haut d'un lobule hépatique. Composition de la triade portale soit une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un conduit biliaire.

1.2.1 Types cellulaires

Le foie est formé de nombreux types cellulaires qui communiquent tous entre eux afin de maintenir adéquatement les fonctions du foie. Dans le premier groupe, soit les cellules non parenchymateuses, on retrouve les cellules dérivant du mésoderme ce qui inclue les fibroblastes, les cellules Stellaire, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales (Si-Tayeb et al., 2010). Le rôle principal de ces cellules est le soutien du tissu. Dans le deuxième groupe, soit les cellules parenchymateuses, on retrouve des cellules épithéliales ayant comme origine l'endoderme (Friedman et Kaestner, 2011; Geerts, 2004). Ces deux groupes dérivent du même type de cellule progénitrice, que l'on nomme hépatoblaste dans le foie fœtal (Friedman et Kaestner, 2011). Les hépatoblastes sont responsables de la formation des hépatocytes et des cholangiocytes qui sont les unités fonctionnelles du foie (Zaret, 2002). La partie suivante caractérise chaque type cellulaire illustré par la **Figure 1.3**.



Inspirée par Gordillo M et al. 2015

Figure 1. 2 Illustration de l'architecture d'un lobule hépatique. Vue de côté et identification des différents types cellulaires composant un lobule de foie. La triade portale est composée de trois conduits : une branche issue de la veine porte, une artériole hépatique et un canal biliaire. Les hépatocytes sont localisés en trois régions. La concentration en oxygène diminue entre les hépatocytes situés dans la région périportale et ceux situés dans la région péricentrale.

1.2.1.1 Cellules non parenchymateuses

Cellules Stellaires (HSCs)

Les HSCs composent environ 5% des cellules totales du foie (Ding et al., 2016). Elles se situent dans une région entre les cellules endothéliales et les hépatocytes appelée l'espace de Disse (Ding et al., 2016; Zheng et al., 2009). Elles ont une forme étoilée avec de longues projections cytoplasmiques et elles sont responsables de la production de la matrice extracellulaire (Orchard, 2015). Elles jouent un rôle très important dans le foie en agissant comme réservoir de la vitamine A et en participant au stockage des lipides (Ding et al., 2016; Gordillo et al., 2015). En cas d'atteinte au foie, les HSCs se différencient afin de former des cellules similaires aux myoblastes. Cette différenciation provoque une accumulation de tissu conjonctif non fonctionnel au niveau de la blessure (Ding et al., 2016; Puche et al., 2013).

Cellules Kupffer (KCs)

Les KCs tapissent le lumen des sinusoides et représentent ~33% des cellules non parenchymateuses du foie (Ding et al., 2016). Elles agissent comme des macrophages en éliminant les microorganismes et autres antigènes se retrouvant dans la circulation sanguine (Orchard, 2015). Les KCs peuvent sécréter des cytokines inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène en réponse à diverses menaces externes, participant ainsi à la réponse inflammatoire de l'organisme (Ding et al., 2016). Finalement, elles participent également à la régénération du foie en participant au processus d'invasion des cellules progénitrices (Van Hul et al., 2011).

Cellules endothéliales sinusoidales (LSECs)

Les LSECs sont de très petites cellules d'environ 6.5 µm. Elles établissent une barrière entre les hépatocytes et le lumen sinusoidal. Les LSECs sont également impliquées dans la régénération tissulaire lors d'un dommage affectant une grande partie des hépatocytes au foie, où elles sont responsables de l'activation de la différenciation des HSCs (Ding et al., 2016).

1.2.1.2 Cellules parenchymateuses

Hépatoblastes

Les hépatoblastes sont communément appelés les cellules progénitrices du foie foetal ou cellules souches du foie (Huch et Koo, 2015). Elles sont présentes en très faible quantité dans le foie adulte et elles sont logées dans la région périportale, plus précisément dans le canal de Hering (**Figure 1.3**). Ces cellules progénitrices sont souvent caractérisées comme étant bipotentes, car elles expriment des marqueurs embryonnaires ainsi que des marqueurs retrouvés chez les hépatocytes (alpha-foetoprotéine, albumine) et les cholangiocytes (cytokératine 7, 8, 19, 19) (Matthews et Yeoh, 2005; Mitaka et al., 1999). Ces cellules semblent d'ailleurs participer à la régénération du foie suite à un dommage ce qui en fait une cible intéressante pour le traitement des dommages physiques des tissus hépatiques.

Hépatocytes

Les hépatocytes forment près de la moitié de la composition cellulaire du foie (Ding et al., 2016). Ces cellules épithéliales occupent environ 80% du parenchyme, l'unité fonctionnelle du foie. (Gordillo et al., 2015). Les hépatocytes s'arrangent en forme de

plaques hépatiques hexagonales qui, lorsqu'elles s'assemblent entre elles, mènent à la formation d'un canal biliaire qui permet la sécrétion de la bile et de l'albumine. Ils interagissent avec les LSECs, les HSCs, les KCs et les lymphocytes (Orchard, 2015). Les hépatocytes sont impliqués dans la majorité des fonctions du foie dont, entre autres, la détoxification des polluants environnementaux (Si-Tayeb et al., 2010).

On distingue deux types d'hépatocytes dans le foie : les petits hépatocytes (SHs) et les hépatocytes matures (MHs) (Mitaka et al., 1999). Les SHs favorisent la prolifération cellulaire et représentent de 1,5-2,0% des hépatocytes dans le foie adulte. La quantité de SH tend à diminuer avec l'âge (Mitaka, 2002). Les MHs jouent un rôle important dans les fonctions hépatiques, telles que dans la synthèse et la sécrétion de bile, le métabolisme des drogues, la détoxification et le stockage de vitamines et du fer (Mitaka, 2002; Mitaka and Ooe, 2010). Étant donné leur fonction spécifique et leur taux de division très faible, on les considère comme étant des hépatocytes différenciés. Une fois différenciés, ces hépatocytes ne subiront plus aucun changement tant que l'organisme ne subit pas un stress quelconque. En cas de stress, induisant une perte d'hépatocytes, des signaux seront transmis afin d'activer la prolifération des SHs (Mitaka, 2002).

De par leur implication dans la plupart des fonctions hépatiques, les hépatocytes sont de très bons candidats pour étudier les pathologies du foie. Toutefois, la disponibilité des hépatocytes primaires est très faible et ils ne s'avèrent pas toujours être de bons modèles *in vitro* du fait qu'ils perdent la majorité de leur capacité métabolique lorsqu'ils sont isolés des autres tissus hépatiques (Iansante et al., 2018). Ainsi, des nouvelles méthodes de culture en 3D ont vu le jour dont les organoïdes. Ceux-ci consistent en la différenciation des cellules dans une matrice extracellulaire ce qui permet la représentation de l'organe cible *in vivo*. L'utilisation des organoïdes a pris de l'ampleur dans le domaine de la recherche sur les pathologies hépatiques et sera discutée dans la section 4. L'utilisation des cellules souches pose cependant plusieurs défis techniques considérables. En effet, ces cellules ne peuvent devenir matures qu'en présence de facteurs moléculaires spécifiques. Dans les cas échéant, les cellules demeurent au stade embryonnaire (Qin et al., 2016).

Cholangiocytes

Les cholangiocytes sont des cellules épithéliales qui tapissent le conduit biliaire et qui représentent seulement 3% des cellules du foie (Gordillo et al., 2015). Ils participent

1.4 Fonctions

1.4.1 Métabolisme

Notre corps est exposé à diverses substances potentiellement toxiques de différentes façons (alimentation, contact cutané, respiration). Ces expositions résultent souvent en la présence de ces substances dans le sang qui sera acheminé vers le foie. Ainsi, on peut dire que les cellules du foie sont les plus exposées à toutes substances potentiellement toxiques auxquelles notre corps a été en contact (Doull's, 2013). C'est également l'un des premiers organes à être exposé aux vitamines, métaux, drogues, bactéries et substances environnementales toxiques contenues dans le sang. En effet, le sang veineux à proximité de l'intestin et de l'estomac récupère ces substances afin de les acheminer directement vers la veine porte du foie (Doull's, 2013). Dans le foie, ces substances sont traitées puis entreposées, détoxifiées ou modifiées et retourneront soit dans la circulation sanguine systémique par la veine centrale ou bien elles seront relâchées dans la bile afin d'être éliminées (Doull's, 2013). La destruction d'une grande population d'hépatocytes peut fortement affecter les fonctions hépatiques et aller jusqu'au dérèglement de l'organe. La perte de fonction peut également survenir lorsqu'une atteinte de type chronique favorise la formation d'un tissu cicatriciel non fonctionnel médié par la transformation des HSCs (Doull's, 2013).

1.4.2 Détoxification

La métabolisation des composés xénobiotiques dans le foie se compose de trois phases impliquant différentes enzymes (Almazroo et al., 2017). Les enzymes de phase I sont responsables de la transformation du composé ou de la drogue en métabolites plus polaires et permettent de rendre la molécule moins active (Almazroo et al., 2017). Les principaux acteurs de la phase I sont les enzymes du cytochrome P450 qui sont des hémoprotéines contenant du fer, dont les rôles sont de produire de l'énergie, effectuer la biosynthèse des stéroïdes et de dégrader les molécules toxiques en effectuant des réactions catalytiques dont l'oxydation, l'hydroxylation, la désalkylation et la déamination (Almazroo et al., 2017; Bradbury, 2017). Il existe plusieurs types de cytochromes qui peuvent varier selon l'espèce, le tissu et le type de molécule à métaboliser. Dans le foie humain adulte, la sous-famille principale est CYP3A (Koch et al., 2002). Les enzymes de cette famille sont responsables du métabolisme de la majorité des médicaments (Koch et al., 2002). Les enzymes de la sous-famille CYP1A sont responsables de l'activation de molécules toxiques parmi lesquelles on retrouve les hydrocarbures poly-aromatiques (HAP) et les amines/amides aromatiques hétérocyclique (Ma et Lu, 2007). Une fois transformées, certaines molécules pourront être directement excrétées via l'urine (Ikegwuonu et al., 1996). Par contre, dans le cas où elles ne seraient pas suffisamment polaires pour être évacuées par cette voie,

elles seront exposées aux enzymes de la phase II. Ces enzymes permettront une polarisation plus importante ce qui rendra la ou les molécules inactives. Ces dernières étapes de transformation permettent le transport des composés afin qu'ils soient éliminés du corps par l'urine ou par les fèces (Almazroo et al., 2017).

Le métabolisme peut être affecté par de nombreux facteurs comme l'âge, le sexe, la médication, la santé, etc. Ces facteurs peuvent favoriser ou défavoriser la métabolisation des drogues (Almazroo et al., 2017). L'âge a un impact sur le métabolisme des drogues (Almazroo et al., 2017). En général, l'expression de plusieurs cytochrome tels que CYP1A2, CYP2E1 est beaucoup moins élevée chez les enfants que chez les adultes, ce qui réduit leur capacité à métaboliser certaines drogues. Chez l'humain, les deux cytochromes dont l'expression diminue avec l'âge (CYP1A2 et CYP2D6) présentent un dimorphisme sexuel significatif (Almazroo et al., 2017). En effet, ces enzymes sont plus exprimées chez les hommes que les femmes. Au contraire, CYP3A4, qui ne semble pas influencé par l'âge, présente également un dimorphisme sexuel, c'est-à-dire qu'il est plus exprimé chez les femmes (Almazroo et al., 2017; Amacher, 2014; Waxman et Holloway, 2009; Zanger et al., 2005).

Il existe plusieurs dimorphismes sexuels au niveau de la métabolisation des composés xénobiotiques (Waxman et Holloway, 2009). L'omission de la différence entre les sexes dans l'étude métabolique d'un médicament peut mener à des problèmes très importants. Il est donc primordial de mieux comprendre les différences sexuelles du métabolisme. Par exemple, les femmes présentent un taux de sécrétion d'acide gastrique et un transit intestinal inférieur aux hommes ce qui augmente la durée d'exposition au composé xénobiotique exposé pouvant affecter l'absorption et la biodisponibilité du médicament (Amacher, 2014). Les femmes sont également sujettes à des variations hormonales plus importantes au cours de leur vie (cycle menstruel, grossesse, prise de contraceptif, etc.) qui ont aussi un effet sur le métabolisme (Harris et al., 1995). Pour ce qui est des enzymes du cytochrome, des études chez des rongeurs tels que les rats Sprague Dawley, ont démontré qu'il y a une prédominance de l'expression hépatique, rénale et pulmonaire de CYP4F chez les femelles par rapport aux mâles (Kalsotra et al., 2002). Dans cette étude, ils ont également démontré que l'ovariectomie provoquait la baisse significative des niveaux de certains cytochromes de cette famille (i.e. CYP4F1, CYP4F4, CYP4F6) qui était restaurés avec l'une administration d'E₂ qui suggère qu'ils sont régulés en parti par les œstrogènes (Kalsotra et al., 2002).

SECTION 2 : LES JONCTIONS CELLULAIRES

2.0 La communication cellulaire

La communication cellulaire est à la base du maintien de l'homéostasie de l'organisme (Mese et al., 2007). Une perte ou une perturbation de celle-ci est souvent observée lors du processus de tumorigenèse (Martin, 2013). Il existe de nombreux modes de communication et de nombreux types de jonctions. Premièrement, la communication autocrine qui consiste au renvoi de l'hormone ou du facteur de croissance sécrété par une cellule à elle-même (Aykan, 2012). Deuxièmement, la communication de type endocrinienne permet l'envoi de messages, par l'entremise d'hormones ou de neurotransmetteurs, sur de très grandes distances (Zheng et al., 2009). Troisièmement, la communication paracrine s'effectue à de courte distance et permet l'envoi de peptides ou de facteurs de croissance entre les cellules adjacentes en relâchant la molécule directement dans l'espace intercellulaire (Zheng et al., 2009). Parmi celle-ci on retrouve la communication juxtacrine qui permet la communication directe ou par les jonctions lacunaires entre les cellules (Aykan, 2012).

Le foie est capable de se régénérer suite à une blessure chez les mammifères (Zheng et al., 2009). Cette régénération ne serait pas possible sans l'envoi de facteurs importants entre les cellules afin de promouvoir la prolifération cellulaire et la différenciation. En effet, la régénération nécessite une communication adéquate entre les hépatocytes et les cellules non parenchymateuses et ce processus doit d'être hautement régulé. De plus, dans de nombreux cas de cancer, il survient une dérégulation de la communication cellulaire ce qui démontre encore une fois l'importance de celle-ci au sein de l'organisme (Aasen et al., 2017). On retrouve trois principaux types de jonctions dans le foie : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires.

2.1 Jonctions serrées

Les jonctions serrées permettent la liaison entre le cytosquelette et les composantes transmembranaires (Zeisel et al., 2018). Dans le foie, elles se retrouvent tout au long des canaux biliaires entre les cholangiocytes et entre les hépatocytes où leur rôle principal est de former une barrière entre le sang et la bile (Kojima et al., 2003; Lee et Luk, 2010). Ces jonctions sont essentielles au maintien de l'intégrité du tissu (Lee et Luk, 2010). Leur degré de perméabilité varie en fonction du tissu où elles se retrouvent et ainsi elles permettent le passage sélectif de soluté et d'eau (Koch et Nusrat, 2009; Schulzke et al., 2012). Parmi les composantes des jonctions serrées, on retrouve des protéines transmembranaires qui ont pour rôle de réguler la perméabilité de la jonction (i.e les occludines, les claudines etc.) et les protéines adaptatrices dont le rôle est

plutôt la formation des jonctions serrées (i.e les protéines avec un domaine PDZ, telles que les protéines de jonctions (ZO) et les protéines associées à la guanylate kinase etc.) (Lee et Luk, 2010; Schulzke et al., 2012). Comme la plupart des jonctions, elles sont souvent dérégulées lors d'une infection ou d'une inflammation, on peut aussi observer des changements dans leur localisation lors des processus de cancérogenèse (Schulzke et al., 2012)

2.1.1 Occludine (OCLN)

L'OCLN est la première protéine des jonctions serrées à avoir été découverte, en 1993 (Furuse et al., 1993; Zeisel et al., 2018). Son rôle précis n'a pas encore été défini, mais elle est souvent utilisée comme marqueur des jonctions serrées et semblerait jouer un rôle dans la stabilité des jonctions serrées (Cummins, 2012; Schulzke et al., 2012). Bien qu'elle soit présente dans la majorité des jonctions serrées, sa présence n'est pas obligatoire. En effet, dans le cas où l'occludine n'est pas fonctionnelle, elle est remplacée par d'autres protéines comme les claudines (Schulzke et al., 2012).

2.1.2 Claudines (CLDNs)

Les CLDNs sont une famille comprenant une vingtaine de membres dont la taille varie entre 22 à 25 kDa (D'Souza et al., 2009; Schulzke et al., 2012). Elles contiennent un domaine permettant la liaison au domaine PDZ des protéines adaptatrices, qui sont les protéines permettant la formation des jonctions serrées (Schulzke et al., 2012). Elles jouent un rôle important dans le maintien de la polarité des hépatocytes (D'Souza et al., 2009). Dans le foie, on retrouve les CDLN 1, 2, 3, 4, 5, 12 et 19 (Hwang et al., 2014). Les niveaux d'ARNm de CDLN1 sont élevés dans le foie et des études démontrent qu'il y a une augmentation de son expression lors d'une cirrhose (Holczbauer et al., 2014; Hwang et al., 2014).

2.2 Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont des structures dynamiques présentes dans de nombreux types cellulaires ainsi que dans diverses espèces animales (Oda et al., 2005). Elles sont essentielles au processus d'adhésion cellulaire et au remodelage des tissus et des organes (Hempel et al., 2015). Leur rôle principal est de maintenir les associations dépendantes du calcium entre les cellules afin de maintenir l'organisation tissulaire. Elles permettent également la formation des jonctions serrées décrites ci-dessus. Les cadhérines et les nectines sont les protéines qui composent ces jonctions et qui se lient à des protéines nommées caténines, qui elles interagissent avec le cytosquelette d'actine (Hempel et al., 2015; Nelson, 2010; Vinken et al., 2006).

2.2.1 Cadhérines

Les cadhérines sont une famille composée d'une centaine de protéines transmembranaires classées dans différents groupes selon le tissu où elles sont exprimées. Par exemple, E-cadhérine (CDH1) est pour la cadhérine épithéliale, N-cadhérine identifie les cadhérines neuronales et P-cadhérine est pour les cadhérines placentaires (Takeichi, 1988; van Roy et Berx, 2008). L'ouverture et la fermeture des jonctions sont ainsi régulées par le calcium qui peut se lier à sa séquence cible (Meng and Takeichi, 2009). Le domaine cytoplasmique est également hautement conservé entre les différents groupes de cadhérines et permet l'interaction de celles-ci avec les caténines, qui sont des protéines d'ancrages se retrouvant sur les filaments d'actine. Ces caténines vont ensuite agir avec d'autres molécules, dont les protéines du cytosquelette, et permettent le mouvement de la jonction (Alberts B, 2002; Hartsock et Nelson, 2008). De plus, les jonctions adhérentes sont nécessaires à la sécrétion de la bile dans le foie (Gonzalez-Sanchez et al., 2015; Vinken et al., 2006).

Dans le foie, CDH1 est exprimée par les hépatocytes et les cholangiocytes (Gonzalez-Sanchez et al., 2015). Des études rapportent que la perte d'E-cadhérine permet l'expansion des tumeurs (Berx et van Roy, 2009; Jiao et al., 2002; Nakagawa et al., 2014; Schneider et al., 2014). En effet, l'absence de CDH1 favorise la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion tissulaire des cellules cancéreuses (Gonzalez-Sanchez et al., 2015). La formation de jonctions adhérentes constituées de CDH1 et de l' α -caténine permettrait l'établissement des jonctions lacunaires composées de la Cx32 (Gonzalez-Sanchez et al., 2015; Willebrords et al., 2015).

2.3 Jonctions lacunaires

Le foie est le premier organe dans lequel les jonctions lacunaires ont été découvertes (Loewenstein et Kanno, 1967; Willebrords et al., 2015). Les jonctions lacunaires se situent à la membrane plasmique et sont impliquées dans la communication intercellulaire par les jonctions lacunaires (GJIC), c'est-à-dire l'envoi des signaux métaboliques et électriques entre le cytoplasme de deux cellules voisines (Goodenough et al., 1996; Willebrords et al., 2015).

2.1.1 Formation

Une jonction lacunaire est formée d'une centaine de pores transmembranaires. Ces pores sont formés par l'association de deux hémicanaux, ou connexons, de cellules adjacentes. Ces connexons sont eux-mêmes formés par l'oligomérisation de petites protéines appelées connexines (Das Sarma et al., 2002). Ces connexons peuvent être de deux types, soit homomérique ou hétéromérique, c'est-à-dire constitué d'un ou plusieurs types de connexines, respectivement. Une fois formés, les connexons sont transportés à la membrane plasmique où ils

pourront s'associer au connexon d'une cellule avoisinante afin de former un canal jonctionnel (Dedek et al., 2006; Mese et al., 2007; Willebrords et al., 2015). Toutefois, ce ne sont pas tous les types de connexines qui peuvent s'associer entre elles. Le type d'association aura donc un impact sur le type de signaux envoyés (Falk et al., 1997; Segretain et Falk, 2004).

2.1.2 Rôles

Les jonctions lacunaires permettent le passage par diffusion passive de petites molécules (<1.5 kDa) et de molécules hydrophobiques entre le cytoplasme des cellules voisines (Oyamada et al., 2013; Willebrords et al., 2015). La GJIC est essentielle au bon fonctionnement du tissu et au bon développement des organes. Elles aident dans de nombreux processus (prolifération, croissance, différenciation, mort cellulaire) et contribuent également à l'échange de seconds messager, tels que le calcium et l'adénosine triphosphate (ATP) (Willebrords et al., 2015).

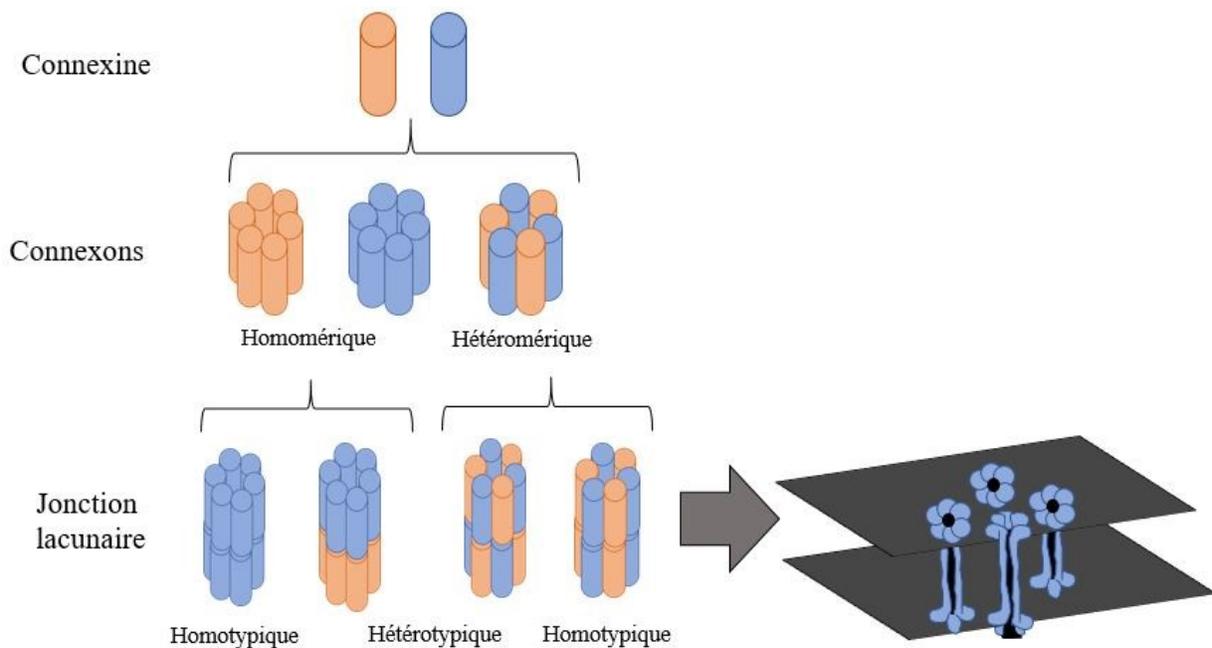


Figure 1. 4 Formation des plaques jonctionnelles. Les plaques jonctionnelles sont constituées de l'assemblage d'un ou plusieurs canaux jonctionnels. Ces canaux peuvent être de type homotypique ou hétérotypique selon le type de connexons dont ils sont composés. Un connexon est formé par l'oligomérisation de six connexines entre elles qui peuvent être pareilles (homomériques) ou différentes (hétéromériques).

Inspirée par Mese et al. 2001

2.1.3 Connexines

Les connexines sont une famille de protéines transmembranaire comprenant vingt et un membres chez l'humain et vingt chez les rongeurs (Oyamada et al., 2013; Willebrords et al.,

2015). La nomenclature des connexines est basée sur leur poids moléculaire en kilodaltons (kDa) s'étendant de 23 à 62 kDa (Oyamada et al., 2013). Toutefois, le poids moléculaire de certaines connexines peut varier en fonction de l'espèce et du tissu où on la retrouve. Ainsi, une deuxième classification a été mise en place et permet de classer les connexines selon l'homologie de leur séquence. Dans cette classification on retrouve cinq différents groupes (alpha, bêta, gamma, delta et epsilon) (Oyamada et al., 2013). Les connexines du foie peuvent ainsi être retrouvées sous deux appellations. Par exemple, la connexine 26 (Cx26) peut aussi être nommée GJB2 étant donné qu'elle est la deuxième connexine dans le groupe bêta. La connexine 32 (Cx32) est aussi nommée GJB1 et la connexine 43 (Cx43) est aussi nommée GJA1 (Oyamada et al., 2013).

Les connexines sont constituées de 4 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, une boucle cytosolique, une queue cytosolique carboxy-terminale et une queue cytosolique comportant un groupement amine tel que démontré ci-dessous (**Figure 1.5**) (Willebrords et al., 2015). La boucle extracellulaire permet la reconnaissance cellulaire. Elle est également hautement conservée au cours de l'évolution, comme les domaines transmembranaires et la queue N-terminale. La boucle cytosolique et la queue carboxyterminale sont responsables des propriétés physiques propres à chaque connexine telles que le pH et la perméabilité (Willebrords et al., 2015).

Lors de la formation des jonctions lacunaires, seul les connexines ayant des caractéristiques semblables peuvent s'associer afin de former un connexon (Falk et al., 1997; Segretain and Falk, 2004). D'ailleurs, les jonctions lacunaires composées de différentes connexines permettent l'acquisition de nouvelles propriétés physiologiques incluant changement dans la conductance et/ou la perméabilité (Elfgang et al., 1995; Takens-Kwak et Jongasma, 1992). Des canaux hétéromériques composés de la Cx26 et la Cx32 peuvent se former dans le foie. Par contre, la Cx43 ne forme pas de canaux avec la Cx26 ou la Cx32 (**Figure 1.4**) (Vinken et al., 2008). Au niveau du foie, les hépatocytes expriment majoritairement la Cx26 et la Cx32 (Maes et al., 2014). On retrouve également la Cx43 dans les cellules non parenchymateuses et dans le foie fœtal, ainsi que la Cx37 et Cx40 dans les cellules vasculaires (Maes et al., 2014; Vinken et al., 2008).

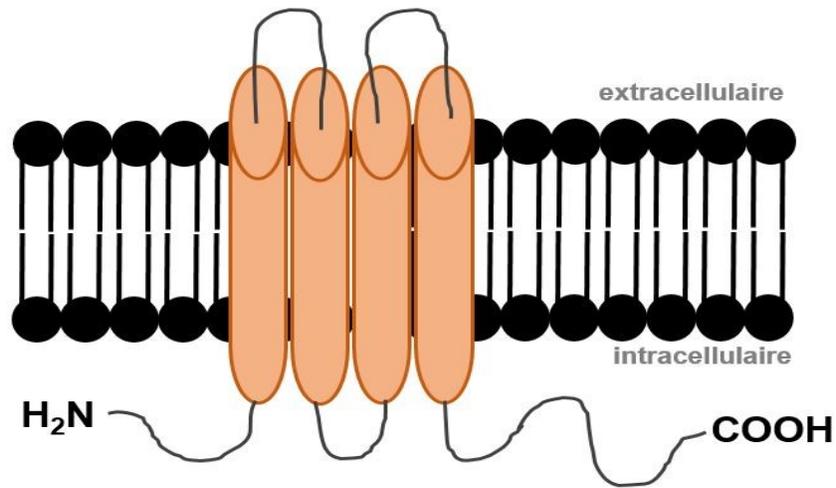


Figure 1. 5 Représentation schématique d'une connexine. Une connexine est composée d'un groupement amine cytoplasmique, de 4 domaines transmembranaires, de 2 boucles extracellulaires et d'une queue carboxy-terminale.

Inspirée par Mese et al. 2007

Cx26 (GJB2)

Le gène GJB2 (*Gap junction protein beta 2*) code pour la Cx26 et se situe sur le chromosome 13 (Oyamada et al., 2013). Il est composé de 2 exons, un non codant (exon 1) et un codant (exon 2) (Oyamada et al., 2013). La Cx26 est fortement exprimée dans la cochlée où elle joue un rôle majeur dans les fonctions auditives (Batissoco et al., 2018). Toutefois, l'expression de Cx26 se retrouve aussi dans de nombreux tissus dont que le foie, la peau, les glandes mammaires, les testicules, la thyroïde, l'utérus, le pancréas, les poumons, le cerveau (Batissoco et al., 2018). Dans le foie, la Cx26 est exprimée en grande partie par les hépatocytes, mais également par les LSECs, les HSCs et les KCs (Willebrords et al., 2015). Au niveau des hépatocytes, son expression est prédominante dans les régions périportales (Berthoud et al., 1992; Kojima et al., 1995).

Il a été démontré que les niveaux de Cx26 ne semblent pas varier dans leur expression avec l'âge (Naiki-Ito et al., 2012). De plus, des études réalisées dans le laboratoire ont permis de constater que les niveaux de Cx26 sont trois fois plus élevés dans le foie adulte de rat femelle que chez les rats mâles suggérant une régulation par les œstrogènes ou les androgènes (Plante et al., 2002). Suite à une ovariectomie, on remarque également une diminution de 3 fois des

niveaux d'ARNm de la Cx26 chez les rats femelles ovariectomisées comparées aux témoins (Plante et al., 2002). Des études démontrent aussi que l'œstrogène influence la distribution de la Cx26 dans le foie (Kojima et al., 1994). Finalement, il a été démontré que la Cx26 est induite par le glucagon dans le foie (Kojima et al., 1995; Willebrords et al., 2015).

Cx32 (GJB1)

Le gène GJB1 (*Gap junction protein beta 1*) code pour la Cx32 et se situe sur le chromosome X (Oyamada et al., 2013). Chez l'humain et le rat, il est composé de trois exons (E1, E1B et E2). L'épissage alternatif est régulé par différents promoteurs selon le tissu cible. Ainsi, le promoteur 1 (P1) permet la transcription complète de l'exon 1 à l'exon 2 et est actif dans le foie et dans le pancréas. Le promoteur 2 (P2) est situé en aval de l'exon 2 et permet la transcription de l'exon 1B à l'exon 2 et permet la transcription de la Cx32 au niveau du cerveau (Oyamada et al., 2013; Willebrords et al., 2015). D'autres études démontrent également que la régulation de la Cx32 peut se faire au niveau de la méthylation de l'ADN ou bien au niveau de la modification des histones (Willebrords et al., 2015). D'ailleurs, dans de nombreux cas de tumeurs, une hyperméthylation des sites CpG au niveau du promoteur de la Cx26, Cx32 et la Cx43 est souvent observée (Vinken et al., 2009). Finalement, la Cx32 peut également être phosphorylée par la protéine kinase A et la protéine kinase C qui favoriseront ou non la communication cellulaire par les jonctions lacunaires (Willebrords et al., 2015).

Plus de la moitié des jonctions lacunaires retrouvées au niveau du foie sont composées de la Cx32, qui est majoritairement retrouvée au niveau des hépatocytes et plus faiblement au niveau des LSECs (Oyamada et al., 2013; Sakamoto et al., 1992; Willebrords et al., 2015). Les niveaux de Cx32 atteignent leur plus haut seuil à PND21 pour ensuite diminuer avec l'âge. Par contre, la localisation reste inchangée (Berthoud et al., 1992; Naiki-Ito et al., 2012). Des études effectuées par Plante et al. (2002) démontrent que les niveaux de Cx32 dans le foie des rats femelles sont 8 fois plus faibles que chez les mâles. Encore une fois, une régulation hormonale par les œstrogènes et/ou les androgènes semble être liée à ce dimorphisme sexuel, puisque l'ovariectomie des rats femelles provoque une augmentation de 6 fois les niveaux d'ARNm de la Cx32 si l'on compare à des rats femelles témoins (Plante et al., 2002). De plus, bien que la testostérone semble avoir une influence positive sur l'expression de la Cx32 au niveau du cerveau, aucune donnée n'indique, à ce jour, l'effet de la testostérone sur les niveaux de Cx32 au niveau des hépatocytes (Matsumoto et al., 1991). Contrairement à la Cx26, l'expression de la Cx32 est très peu régulée par le glucagon (Willebrords et al., 2015). De plus, il a été démontré

que la Cx32 est régulée par certains glucocorticoïdes, tels que la dexaméthasone dans les hépatocytes (Kwiatkowski et al., 1994; Ren et al., 1994)

L'expression de certaines enzymes du cytochrome P450, dont CYP2B6 et CYP3A4, requièrent la formation de jonctions lacunaires formées de la Cx32 afin d'être fonctionnelle (Willebrords et al., 2015). D'autres tels que CYP1A1/2 et CYP2B1/2 sont activées en cas d'une diminution des niveaux protéiques de Cx32, démontrant l'importance de la Cx32 dans la défense contre les composés xénobiotiques (Neveu et al., 1994; Shoda et al., 1999).

Cx43 (GJA1)

Le gène GJA1 (*Gap junction protein alpha 1*) code pour la Cx43 et se situe sur le chromosome 6 (Oyamada et al., 2013). Il est composé de deux exons : le premier inclut la partie 5'UTR, tandis que le deuxième est composé de la séquence protéique ainsi que du 3'UTR. Ce gène varie énormément entre les espèces. Chez les rongeurs comme le rat, l'épissage alternatif permet de générer six transcrits d'ARNm (Oyamada et al., 2013). La régulation de la Cx43 peut également se faire par des processus épigénétiques. Par exemple, il a été rapportée que dans des cellules cancéreuses du foie humain, une inhibition des histones désacétylases réduit l'expression de la Cx43 et n'a aucun effet sur la Cx26 et la Cx32 (Vinken et al., 2009).

Au niveau du foie, la Cx43 est exprimée par les KCs, les HSCs, les LSECs et les cholangiocytes (Willebrords et al., 2015). Son expression est marquée dans certains tissus incluant le cœur, les ovaires, l'embryon etc. (Oyamada et al., 2013). Les niveaux hépatiques de la Cx43 ne semblent pas varier avec l'âge (Berthoud et al., 1992). Toutefois, on remarque une forte expression de la Cx43 dans le foie embryonnaire qui est diminuée au cours de la maturation, suggérant un rôle lors du développement embryonnaire (Ding et al., 2016). Plusieurs études démontrent que la Cx43 est régulée à la hausse par l'œstrogène et à la baisse par la progestérone dans le myomètre (Kojima et al., 1994; Petrocelli et Lye, 1993; Ren et al., 1994). Dans les ovaires, il a été démontré que la Cx43 était diminuée par l'augmentation des niveaux de l'hormone lutéinisante (LH) et augmentée par une augmentation des niveaux de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Gershon et al., 2008).

2.1.4 La communication par les jonctions lacunaires et les carcinomes hépatocellulaires

En 2017, au Canada, 206 200 cas de cancer et 80 800 cas de décès ont été recensés et reliés à cette maladie. Parmi ceux-ci, 3 700 cas ont été attribués au cancer du foie (Statistiques Canada, Statistiques canadiennes sur le cancer, 2018). La carcinogenèse est un processus comprenant trois grandes étapes : initiation, promotion, progression. La phase

d'initiation peut être déclenchée par une exposition à un carcinogène génotoxique, cette exposition peut mener à une ou plusieurs mutations sur un ou plusieurs gènes critiques, qui sont irréversibles. L'exposition continue à l'agent promoteur induira la croissance sélective des cellules initiées. Dans la phase de progression, l'instabilité chromosomique pourra mener à l'acquisition de nouvelles altérations géniques/épigéniques leur permettant d'acquérir de nouvelles propriétés (Trosko et Chang, 2001). Dans la phase de progression, les cellules acquièrent un caractère invasif et métastatique (Trosko et Chang, 2001). Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le type de cancer du foie le plus courant (Feitelson et al., 2002). Les CHC sont très variés; dans certains cas, il peut y avoir une dérégulation des gènes impliqués dans le développement du foie et la différenciation (Feitelson et al., 2002). De plus, dans certains cas, il a été observé que la β -caténine était mutée, ce qui mène à des altérations dans l'adhésion cellulaire par CDH1 et dans les interactions entre les cellules (Feitelson et al., 2002). Il a également été démontré que la communication par les jonctions lacunaires est souvent affectée lors du développement de tumeurs, ce qui explique, entre autre, pourquoi les connexines ont souvent été classées comme des suppresseurs de tumeurs (Yamasaki et al., 1995). Il a été observé que la localisation de la Cx32 et de la Cx43 était affectée lors du développement de tumeurs. En effet, ces protéines membranaires se retrouvent dans le cytoplasme plutôt qu'à la membrane des cellules (Krutovskikh et al., 1994; Yamasaki et al., 1995). En effet, dans le cas de tumeur hépatique on remarque des défaillances soit au niveau de l'expression des connexines, au niveau de leur phosphorylation ou bien au niveau de la formation des connexons (Janssen-Timmen et al., 1986; Ren et al., 1994; Sakamoto et al., 1992).

La GJIC est inhibée ou diminuée par de nombreuses molécules incluant les promoteurs de tumeurs (i.e DTT, phénobarbital) et certains oncogènes (Trosko et Chang, 2001). À l'inverse, elle est améliorée par certains gènes suppresseurs de tumeurs, par des promoteurs antitumoraux (i.e rétinoïdes, thé vert etc.) et par certains antioncogènes, tels que la lovastatine (Trosko et Chang, 2001). Des traitements avec des polluants environnementaux tels que l'HCB ou le dinéthylnitrosamine (DEN) ont pour effet la diminution de l'expression de la Cx26 et Cx32 dans le foie de rat adulte (Naiki-Ito et al., 2012; Plante et al., 2002; Plante et al., 2007). Il a aussi été démontré que l'HCB favorisait le développement de tumeurs hépatiques chez les rats femelles en diminuant la GJIC et plus précisément par une dérégulation de la transcription de la Cx32 (Krutovskikh et al., 1995; Naiki-Ito et al., 2012; Plante et al., 2002; Plante et al., 2007). De plus, une inactivation du gène de la Cx32 ou de la Cx43 chez les souris les rend plus susceptibles à la formation de tumeurs (King et Bertram, 2005; King et Lampe, 2004). Malgré tout, la régulation des connexines dans le processus de carcinogenèse demeure nébuleuse. Toutefois, il est possible

de restaurer la GJIC dans les cellules cancéreuses en leur transmettant par transfection des gènes codant pour les connexines (Trosko et Chang, 2001; Yamasaki et al., 1999).

SECTION 3 : LA RÉGÉNÉRATION DU FOIE

L'administration d'un produit chimique induisant une toxicité au niveau du foie peut avoir comme conséquence la perte de tissu hépatique (Zheng et al., 2009). Cette perte sera comblée par la régénération tissulaire du foie (Zheng et al., 2009). La régénération du foie est hautement régulée et permettrait de rétablir le poids et les fonctions du foie en cas de dommage (Zheng et al., 2009). Deux voies peuvent être activées lors de la régénération. Dans la première, les acteurs clés sont les hépatocytes matures qui demeurent habituellement dans un état quiescent et non prolifératif dans un foie en santé (Xu et al., 2016). Un dommage affectant une grande population d'hépatocytes, ou touchant les canaux biliaires, aura comme effet l'activation de cascades de signalisation favorisant l'expansion de ces hépatocytes matures (Xu et al., 2016). Dans la deuxième, dans le cas où la réplication des hépatocytes serait bloquée, ce sont les cellules progénitrices qui prendront le contrôle (Doull's, 2013). Pour rappel, ces hépatoblastes ont la capacité de proliférer et de se différencier en hépatocyte ou en cholangiocyte (Guy Orchard, 2015; Matthews et Yeoh, 2005). Les hépatocytes sont donc le premier type cellulaire à entrer en réplication et leur maturation permettra la production de facteurs mitogènes qui à leur tour permettront l'activation des autres types cellulaires (Michalopoulos, 2007).

2.1 Cellules souches

2.1.1 Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires (CSEs) ou pluripotentes ont été découvertes dans les années 1980. Elles sont reconnues pour leur potentiel de renouvellement continu et pour leur capacité à générer tous les types cellulaires se retrouvant dans les trois couches germinales (le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme), excluant les types cellulaires reliés à l'embryogenèse (Mitalipov et Wolf, 2009; Mizumoto et al., 2008). Ces cellules sont isolées de la masse cellulaire interne des blastocystes (**Figure 3.1**) (Daley, 2015). Elles ne sont d'ailleurs présentes qu'une courte période de temps, car elles se différencient éventuellement en cellules souches multipotentes (Biehl et Russell, 2009).

2.1.2 Cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes peuvent donner naissance à un seul des trois groupes tissulaires (mésoderme, endoderme, ectoderme). Ainsi, une cellule souche multipotente a la capacité de générer toutes les cellules issues d'un même tissu et c'est ce qui la rend attrayante pour les utilisations cliniques (Biehl et Russell, 2009). Ces cellules sont confinées à des endroits

bien précis, nommé les niches de cellules souches, où elles sont hautement régulées afin de maintenir l'homéostasie du tissu.

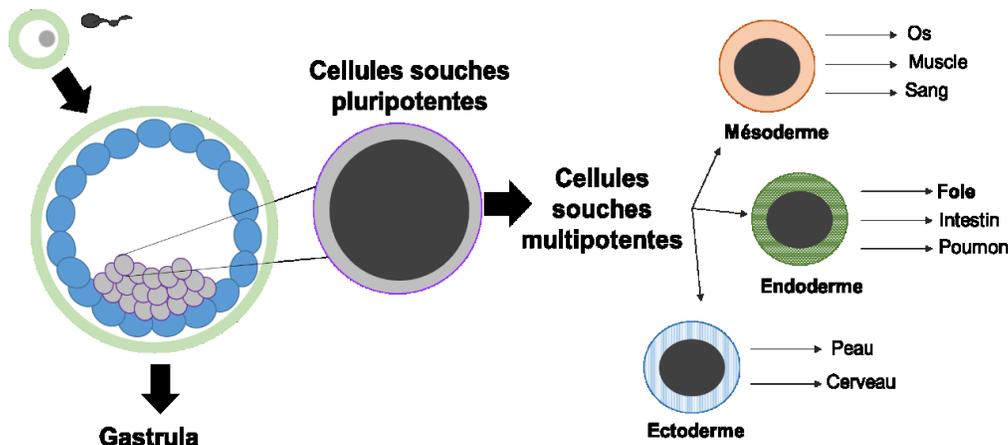


Figure 1. 6 Développement des cellules souches. La fécondation d'un ovocyte avec un spermatozoïde mène à la formation d'un blastocyste. À l'intérieur de ce blastocyste se trouve une masse cellulaire interne responsable de la formation de la structure embryonnaire. Cette masse de cellules donne naissance aux cellules souches pluripotentes, capables de générer n'importe quel type cellulaire. Ces cellules se différencient ensuite en cellules souches multipotentes qui elles ne peuvent générer qu'un seul type de population de cellules.

2.1.4 Rôles

Les cellules souches sont essentielles au développement des organismes. Dans des tissus comme le foie ou les poumons, les cellules souches sont responsables de la réparation tissulaire suite à l'atteinte de l'organe (Daley, 2015). Le potentiel des cellules souches dans la recherche est immense. Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses sont de plus en plus utilisées afin de réparer des lésions tissulaires, comme des dommages à la cornée (Wei et al., 2013). Les cellules souches hépatiques, quant à elles, sont surtout utilisées pour la régénération tissulaire suite à de dommages au foie, tel que dans le cas d'une cirrhose du foie (Habeeb et al., 2015).

2.1.3 Cellules souches du foie

Au niveau du foie, les cellules souches ou progénitrices ont été découvertes suite à des études portant sur la régénération (Matthews et Yeoh, 2005). Ces cellules sont logées dans le Canal d'Herring (**Figure 1.3**) qui se situe à proximité de la triade du portail (Matthews et Yeoh, 2005). On considère les hépatoblastes comme étant des cellules progénitrices/-souches étant donné qu'ils sont capables de générer plusieurs types cellulaires et qu'ils ont un potentiel de

réplication illimité (Rosenberg et al., 1996). Aujourd'hui, on utilise ces cellules pour la croissance de mini-foies *in vitro*, aussi appelées des organoïdes (Hindley et al., 2016).

SECTION 4 : LES ORGANOÏDES

L'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans le développement des organes et le développement des maladies chez l'humain et chez les autres mammifères est complexe et nécessite beaucoup de temps. Vers 1907, un groupe de chercheurs a mis en place un système de culture en deux dimensions (2D) qui permettait de mieux étudier ces mécanismes (Harrison RG, 1907). Toutefois, ce type de culture ne reproduisait pas exactement les mécanismes *in vivo* ce qui pouvait être expliqué par l'absence de la structure tridimensionnelle du tissu. De plus, les cultures en 2D ne permettent pas de recréer toutes les interactions cellulaires, incluant les jonctions lacunaires, qui sont importantes afin maintenir certaines fonctions tissulaires. Ainsi, des études ont été consacrées au développement d'un modèle de culture cellulaire tridimensionnelle (3D) qui permettrait de représenter plus adéquatement l'architecture et le fonctionnement des organes *in vivo* (Methods, 2018). Les organoïdes sont considérés comme des mini-organes étant donné que les cellules dans la matrice s'associent de façon à former une morphologie et une architecture spécifique à un tissu. Cette auto-organisation leur permet d'accomplir des fonctions spécifiques à leur tissu incluant la sécrétion d'albumine par les organoïdes de foie (Lancaster et Knoblich, 2014; Mitaka, 2002). Ce type de culture permet donc de générer une réponse physiologique plus similaire à ce qui se passe réellement dans le corps humain. On s'aperçoit également que ce type de culture permet de mieux recréer les interactions cellulaires internes (entre les cellules) et externe (entre les cellules et l'environnement) et ainsi permet de récapituler les fonctions de l'organe (Li et al., 2013). Finalement, même si les modèles animaux *in vivo* permettent la récapitulation physiologique du corps humain, on sait que la métabolisation des différents composés xénobiotiques se fait différemment chez les animaux et les humains. Ainsi, l'utilisation des organoïdes permet de mieux récapituler le métabolisme et les différentes fonctions propres au corps humains (Yin et al., 2016). Finalement, Lancaster and Knoblich (2014) ont émis une liste de règles qui doivent être respectées afin d'utiliser le terme organoïde :

- (1) La culture doit contenir plus d'un type cellulaire du même organe
- (2) Les cellules doivent accomplir des fonctions spécifiques à l'organe
- (3) Les cellules doivent être capables de s'auto-organiser de la même façon que dans le tissu d'origine

De nombreux protocoles ont été établis afin de cultiver divers types d'organoïdes soit : le cerveau (Lancaster et al., 2013), le foie (Takebe et al., 2013), l'estomac (Barker et al., 2010), l'intestin (Sato et al., 2009), l'endomètre (Boretto et al., 2017), la prostate et plusieurs autres organes (Clevers, 2016). Ces divers modèles peuvent tous être utilisés afin de mieux comprendre le fonctionnement biologique de l'organe en question, ainsi que pour évaluer les effets de divers médicaments sur le développement d'une maladie. De plus, on peut même utiliser ces organoïdes afin de tester l'effet de divers polluants environnementaux (Calderon-Gierszal et Prins, 2015). Finalement, les organoïdes hépatiques pourraient éventuellement être utilisés comme moyen de transplantation (Nantasanti S et al., 2015).

4.1 Les organoïdes du foie

Le foie est un organe primordial pour la survie humaine et des modèles expérimentaux d'hépatocytes sont nécessaires afin mieux comprendre le métabolisme et la réaction du corps face aux composés xénobiotiques. Il existe de nombreuses maladies associées à une défaillance du foie (carcinomes, cirrhose, hépatite, etc.) dont le traitement requiert une transplantation. Les modèles mis en place pour les tests de toxicité ou bien la transplantation ont quelques lacunes. Par exemple, avec la culture d'hépatocytes primaires, il est difficile de maintenir les fonctions hépatiques, car ils perdent rapidement l'expression de nombreux gènes. De plus, ils ont une courte durée de vie et ainsi ne sont pas un très bon modèle pour les études d'hépatotoxicité et de métabolisme (Mitaka, 2002). Des études portant sur la transplantation ont révélé que l'utilisation d'hépatocytes primaires n'était pas toujours efficace (Iansante et al., 2018). En effet, il est difficile d'obtenir des cellules de qualité et, bien évidemment, il y a toujours un risque de réaction du système immunitaire (Iansante et al., 2018). Finalement, la culture en 2D ne permet pas de reproduire le développement d'une tumeur *in vivo* et pose ainsi des problèmes dans la recherche sur le cancer (Shamir and Ewald, 2014).

La découverte des organoïdes de foie s'est faite lors de l'étude de la culture de cryptes intestinales. En effet, Sato et Clevers (2013) ont mis en place un système de culture d'organoïdes à partir des cellules intestinales exprimant le marqueur Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5), un marqueur clé des cellules souches (Khan et al., 2017). Lgr5 est un récepteur membranaire impliqué dans la voie de signalisation de Wnt qui est stimulé par la présence du ligand R-spondin (RSPO) (Kumar et al., 2014). Le marqueur Lgr5 est observé dans de nombreux tissus en régénération incluant l'intestin, la peau, les glandes mammaires, etc (Kumar et al., 2014). Des études plus poussées ont permis de découvrir la présence de cellules

positives pour ce marqueur au niveau du foie. Toutefois, on remarque les cellules positives pour Lgr5+ ne sont pas toujours présentes dans le foie (Khan et al., 2017). En effet, l'induction de ces cellules se produit uniquement dans les cas de carcinomes hépatocellulaires ou autres pathologies impliquant la régénération (Khan et al., 2017; Koo et Clevers, 2014). Les cellules souches hépatiques se situent dans le canal de Herring. D'ailleurs, Huch et al. (2013a) ont identifié que ces cellules souches prolifératives sont en fait les hépatoblastes et expriment le marqueur Lgr5+. Toutefois, les cellules souches quiescentes du foie n'ont pas encore été caractérisées (Cao et al., 2017).

Les avantages liés à la culture des organoïdes ont résulté en leur nomination en tant que technique de l'année 2017, par la revue *Nature Methods*, offrant de nouvelles possibilités dans le domaine des sciences (Methods, 2018). Contrairement aux autres techniques *in vitro*, Huch et al. (2015) ont démontré qu'il était possible de faire la culture d'organoïdes à partir de tissus de patients sains ou cancéreux (Broutier et al., 2017). L'utilisation des cellules souches issues directement du patient afin de former des organoïdes permettrait de réduire les risques de non-compatibilité lors des transplantations (Broutier et al., 2017). De plus, les organoïdes peuvent être cultivés *in vitro* et *in vivo* à long terme et ils sont capables d'accomplir les mêmes fonctions qu'un foie en plus d'avoir le même patron de transcription (Broutier et al., 2016; Broutier et al., 2017).

Des protocoles sont désormais en place afin de promouvoir la prolifération et la différenciation de ces cellules souches (Broutier et al., 2016). Afin d'obtenir une culture organoïdes de foie fonctionnelle, il est important de maintenir les interactions entre les différents types cellulaires ainsi que les interactions entre les hépatocytes et la matrice extracellulaire. Pour ce faire, les jonctions communicantes sont cruciales et permettent au foie d'envoyer et de recevoir les bons signaux. Malheureusement, la culture hépatocyte primaire ne permet pas de garder l'expression de la Cx26 et de la Cx32 lorsqu'ils sont mis en culture ce qui démontre encore une fois l'importance des organoïdes de foie (Chitrangi et al., 2017; Mitaka et al., 1999; Ren et al., 1994; Sgodda et al., 2017).

4.1.1 Utilités

4.1.1.1 Toxicologique

Une des étapes très importante pour la mise en place d'un nouveau médicament est les tests de toxicité. En effet, tous nouveaux médicaments ou autres substances doivent subir des tests de toxicité afin d'évaluer les risques potentiels associés à la prise de la drogue (Sgodda et al., 2017). Les nouveaux médicaments sont toujours testés, au préalable, dans un modèle cellulaire 2D suivi d'un test sur des modèles animaux et ensuite sur les humains. Toutefois, on

remarque qu'il y a un haut taux d'échec suite à l'entrée des médicaments en phase II ou III, ce qui suggère que la réponse obtenue *in vitro* n'est pas représentative de la réponse physiologie *in vivo* (Amacher, 2014).

Ainsi, l'utilisation de cellules souches afin de générer une culture en 3D d'hépatocytes a eu un grand impact dans le monde de la toxicologie. En effet, ce type de culture est plus représentatif autant sur le plan physique, moléculaire et physiologique que n'importe quels autres modèles connus de culture cellulaire pour le tissu de foie. Par ce fait, ils peuvent être utilisés afin de tester l'efficacité des drogues *in vitro* avant de les tester sur des modèles animaux. Des études démontrent d'ailleurs que les cytochromes P450 sont présents et actifs dans les organoïdes (Chitrangi et al., 2017; Miyamoto et al., 2005). Même si cette technique permet d'obtenir un grand nombre d'hépatocytes qui sont capables de s'auto-organiser et d'interagir les uns avec les autres (Au et al., 2014), on remarque toutefois que les fonctions et l'expression de gènes associés au métabolisme sont plus faibles. C'est pourquoi la mise en place d'un protocole de différenciation et de meilleurs systèmes de culture sont très importants afin d'améliorer l'utilisation des cellules souches (Chitrangi et al., 2017). Somme toute, les organoïdes du foie permettraient d'effectuer des analyses toxicologiques et pharmacologiques qui refléteraient davantage ce qui se passe dans le corps humain tout en réduisant l'utilisation des animaux au laboratoire (Tong et al., 1990).

4.1.1.2 Traitements de maladie

Les atteintes au niveau du foie sont souvent graves et irréversibles. Dans de nombreux cas, le patient nécessitera une greffe de foie ce qui est une démarche difficile (Iansante et al., 2018). De plus, la transplantation de foie est une technique dispendieuse où les risques encourus par le patient sont élevés en raison de la possibilité de rejet par le système immunitaire. Toutefois, il a été découvert que certaines atteintes au foie pouvaient être restaurées par une transplantation partielle d'un lobe de foie (Michalopoulos, 2007). Ainsi, l'utilisation de thérapie cellulaire afin de traiter les atteintes au foie a été mise de l'avant (Iansante et al., 2018). Aujourd'hui, la recherche se pousse vers l'utilisation de cellules souches afin de restaurer une population d'hépatocyte ou afin de pallier une défaillance du foie (Mizumoto et al., 2008).

On est désormais capable d'établir des cultures 3D de tissus adultes sains et atteints. Les cultures en 3D de tissus atteints permettent de mieux étudier la maladie et de mieux comprendre sa progression et trouver un traitement efficace (Underhill et Khetani, 2018). Ainsi, dans le foie, mais également dans divers organes, les organoïdes pourront éventuellement être utilisés afin de contrer des problèmes développementaux, des conditions dégénératives et même le cancer (Lancaster et Knoblich, 2014). Des études portant sur la transplantation d'organoïdes hépatiques

démontrent que ceux-ci survivent et aident à la restauration des fonctions (Huch et al., 2013a; Huch et al., 2015).

4.1.2 Culture

Les organoïdes sont une méthode de culture cellulaire en trois dimensions. En effet, les cellules souches cultivées dans une matrice extracellulaire ont la capacité de proliférer afin de former des sphères contenant plusieurs cellules. L'ajout de certains facteurs peut également permettre la différenciation de ces cellules souches en cellules plus spécialisées.

4.1.2.1 Prolifération

Afin de promouvoir la croissance des organoïdes, un milieu d'expansion a été mis en place. Dans ce milieu, on retrouve du nicotinamide, R-spondine 1 (RSpo1), des facteurs de croissance épithéliale (EGF), hépatocytaires (HGF), transformant (TGF- α) et des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF10), (Huch et al., 2013a; Mitaka, 2002). La nicotinamide est une vitamine qui permet la division et la prolifération accrue des hépatocytes (Mitaka et al., 1999). Rspo1 est une protéine qui joue un rôle dans le développement sexuel activant la voie de signalisation Wnt/ β -caténine afin de favoriser le développement des glandes femelles, en plus d'interagir avec les protéines LGR (Jin et Yoon, 2012). L'HGF et les ligands du récepteur à l'EGF, tels que l'EGF et le TGF α , sont les facteurs qui permettent une forte activation de la croissance des hépatocytes *in vitro* (Michalopoulos, 2007). Les facteurs de croissance des fibroblastes aident à la prolifération et à la formation de colonie des MHs (Mitaka, 2002). D'ailleurs, Wnt et FGF seraient très importants pour le processus de régénération du foie (Huch et Koo, 2015). Toutefois, Huch et al. (2013a) ont démontré que malgré la présence de marqueurs de cholangiocytes ainsi que de marqueurs hépatocytaires sur les cellules Lgr5+, le milieu d'expansion favorise la croissance de cholangiocytes. Pour cette raison, ils ont mis en place un milieu de différenciation qui permet d'induire la différenciation des cellules vers des cellules de type hépatocyte plutôt que cholangiocyte (Broutier et al., 2016).

4.1.2.2 Différenciation

Dans un milieu de base, les cellules reçoivent des signaux de prolifération et de division par la voie de signalisation Notch ainsi que par le facteur de croissance TGF α . Ces voies de signalisation sont inhibées dans le milieu de différenciation afin de permettre l'induction de gènes clés nécessaires à la maturation des hépatocytes. L'inhibition de Notch et l'ajout de dexaméthasone et de Bmp sont importants afin de promouvoir la différenciation des cellules en hépatocytes. Suite à la différenciation, les sphéroïdes acquièrent certaines fonctions d'hépatocytes matures incluant la sécrétion d'albumine et de transferrine, ainsi que l'activation

des enzymes du cytochrome P450 telles que CYP3A11 (Huch et al., 2013a; Tong et al., 1990). De plus, les hépatocytes matures expriment des marqueurs dont la connexine 32 (Cx32), la connexine 26 (Cx26) (Sugiyama et al., 2007), le tryptophane 2,3-dioxygénase (TO), les cytokératines 8 et 18 (CK8; CK18) (Mitaka et al., 1999). De plus, la transition des cellules souches vers des hépatocytes se témoigne par la perte de Lgr5+ (Huch et al., 2013a).

SECTION 5 : L'HEXACHLOROBENZÈNE

5.1 Classification

Les hydrocarbures aromatiques polyhalogénés (HAP) sont une classe de composés organiques largement étudiée étant donné leur potentiel cancérigène et mutagène. Parmi cette classe, on retrouve les composés ayant 1 ou plusieurs anneaux aromatiques, ce qui rend leur structure extrêmement stable. Ces composés sont souvent le produit d'une combustion incomplète de la matière organique. Ils se différencient également des autres molécules chimiques par leur caractère lipophile et semi-volatile (Berntssen, 2012). De plus, ces composés sont souvent bioaccumulables, ce qui rend leurs études encore plus importantes (Aramandla, 2011).

Dans cette famille, on retrouve l'HCB de formule chimique C_6Cl_6 , qui consiste à un benzène autour duquel sont reliées 6 molécules de chlores (**Figure 1.7**) (**Canada, 1993a**).

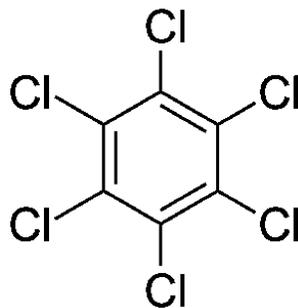


Figure 1. 6 Structure chimique de l'hexachlorobenzène (C_6Cl_6). La liaison du chlore se fait par leur association avec chaque atome de carbone de la molécule aromatique, le benzène.

5.2 Propriétés

L'hexachlorobenzène (HCB) est formé par l'ajout de molécules de chlore à une molécule de benzène à des températures très élevées (150-200°C) (Merck, 2006; Starek-Swiechowicz et al., 2017). L'HCB se présente sous forme d'un solide cristallin blanc et a un poids moléculaire de 284,79 g/mol. Il est pratiquement insoluble dans l'eau (0,005 mg/L à 25°C) et soluble dans les gras, les huiles et les solvants organiques (ATSDR, 2015). Sa solubilité maximale dans

l'huile de maïs a été reportée à 10 mg/ml (Gouvernement du Canada, 1993b; Krishnan et al., 1991).

5.3 Utilisation

5.3.1 Pesticide

L'HCB a fait son apparition sur le marché agricole en 1940 où il était majoritairement utilisé comme agent antifongique sur différentes semences soit; le blé, l'orge, l'avoine et le seigle afin de les protéger de la moisissure (Gouvernement du Canada, 1993b). La période de consommation la plus importante se situe entre 1948 et 1972, où l'on répertoriait que 17 fongicides sur le marché, utilisés entre autre pour la culture du blé, pouvaient contenir jusqu'à 80% d'HCB (Tuttle, 1979). D'ailleurs, il y eut une épidémie d'empoisonnement en Turquie de 1955 à 1959 causée, entre autres, par de fortes concentrations en HCB dans les céréales où les doses ingérées estimées d'HCB étaient de 0,7 à 2,9 mg/kg/jour pour une personne moyenne d'environ 70 kg (Aramandla, 2011). Il a également été reporté que 95% des enfants de moins de deux ans qui étaient allaités sont décédés suite à une exposition à de fortes concentrations d'HCB par le lait de mères contaminées (ATSDR, 2015). De plus, des lésions de la peau, une photosensibilité, une augmentation du volume de la thyroïde, de l'hirsutisme, l'arthrite, une *porphyria cutanea tarda* et plusieurs autres symptômes ont été reportés suite à l'exposition au HCB (ATSDR, 2015). C'est suite à des incidents de la sorte qu'en 1973 plusieurs pays industrialisés, dont le Canada, ont décidé de bannir l'HCB, en signant la convention de Stockholm, car on le soupçonnait d'être dommageable pour la santé humaine.

5.3.2 Industries

L'HCB était présent dans de nombreuses industries incluant; les industries pyrotechniques pour la fabrication de feux d'artifice, les industries chimiques pour la fabrication du caoutchouc synthétique, les industries de coloration, mais il était aussi utilisé comme agent de conservation du bois (INERIS, 2011). De plus, l'HCB était un sous-produit émis par les producteurs de pièces pyrotechniques, les producteurs de savons, de textiles, les usines de pâte et papier, etc. (Gouvernement du Canada, 1993b). Finalement, l'HCB est également un rejet important des usines de magnésium (Gouvernement du Québec, 1998).

5.3.3 Persistance

De nos jours l'utilisation directe de l'HCB est interdite, et il n'y a aucune activité de production qui a été reportée depuis 1980. Toutefois, on retrouve encore des quantités détectables d'HCB dans l'environnement, et ce partout sur la planète, que ce soit dans l'eau, le sol, les sédiments, le biote (ATSDR, 2015). Ainsi, il constitue toujours un risque pour la santé

humaine, car il s'accumule dans les tissus adipeux et le lait maternel humain (ATSDR, 2015). De plus, il a la capacité de passer la barrière placentaire et ainsi être en contact avec le sang fœtal, ce qui pourrait engendrer des risques pour le fœtus. (ATSDR, 2015; Pronczuk et al., 2002).

De plus, même si l'HCB n'est plus actuellement produit depuis 1970 (Beyer, 1996; EPA, 1986b), il est encore aujourd'hui un déchet émis lors de la production d'hydrocarbures chlorinés, tel que le tétrachloroéthylène, et demeure un contaminant de certains pesticides, dont le pentachlorophénol (ATSDR, 2015).

5.4 Exposition

En 2015, l'ATSDR a établi que des traces ou métabolites du HCB ont été retrouvés dans tous les individus testés, ce qui n'est pas très étonnant si l'on considère ses propriétés ainsi que ces sources d'expositions (ATSDR, 2015).

5.4.1 Eau

L'HCB a été détecté dans l'eau souterraine, l'eau potable et aussi dans l'eau de surface. Toutefois, étant donné sa faible solubilité dans l'eau, les concentrations sont généralement très faibles, on parle de partie par billions (ppb) et partie par trillion (ppt) (ATSDR, 2015). Le danger vient plutôt du fait qu'il tend à s'accumuler dans les sédiments marins où il finit par se bioaccumuler dans les organismes aquatiques (ATSDR, 2015). En Amérique du Nord, vers 1980, il a été rapporté que la concentration moyenne d'HCB dans le lac Ontario était de 0,1 ng/L et que l'HCB n'était pas détectable dans l'eau potable issue de d'autre cours d'eau (ATSDR, 2015).

5.4.2 Sol et sédiment

L'HCB est toujours détecté dans les sols agricoles où il a été utilisé, mais aussi dans certaines régions rurales près des industries de production ou des sites de déchets (ATSDR, 2015). D'ailleurs, sur des sites hautement contaminés, des concentrations pouvant aller jusqu'à 53 ppm ont été détectées (ATSDR, 2015).

5.4.3 Air

L'HCB a également été détecté dans l'air à de très faible niveau (pg/m^3 - ng/m^3). Sa présence dans l'air est la conséquence de l'incinération de déchets contaminés à l'HCB provenant d'industrie de produits chlorés (ATSDR, 2015). Étant donné sa très faible dégradation dans l'air, l'HCB peut se répandre à des régions plus éloignées de ces sites de production (ATSDR, 2015).

5.4.4 Alimentation

Un sondage effectué par le FDA (The Food and Drug Administration Total Diet Study) a permis de déterminer que de nombreux aliments avaient des concentrations en HCB plus petites

qu'un ppb. Toutefois, la concentration d'HCB dans les aliments gras, tels que les poissons provenant de régions contaminées, pouvait atteindre 100 ppb (ATSDR, 2015). En effet, les organismes marins sont plus exposés étant donné qu'ils s'alimentent des sédiments où l'HCB a tendance à s'accumuler. De plus, il se produit un phénomène de bioamplification plus on augmente dans la chaîne trophique (Breysse, 2015).

5.4.5 Exposition journalière

L'HCB se retrouve dans les tissus adipeux, le sang, le lait maternel et le follicule pileux (ATSDR, 2015). En 2003, les concentrations moyennes en HCB dans les sérums humains étaient de 0,097 ng/g pour les adultes (ATSDR, 2015) et plus petit que 1 mg/kg dans les tissus adipeux (Toft, 2004). La consommation moyenne annuelle d'HCB par l'alimentation est estimée à 68 µg pour les adultes, 22 µg pour les adolescents et 5 µg pour les enfants. L'air ambiant contient en général entre 0,1 pg/m³ et 1,5 ng/m³ d'HCB (Toft, 2004). L'eau potable peut contenir environ 0.1 partie par trillion (ppt) d'HCB. Les doses d'HCB ingérées par l'air, l'eau et les aliments se situent entre 0,0004 et 0,003 µg/kg de poids corporel par jour (Toft, 2004). Les enfants sont plus à risques d'être exposés à l'HCB soit par les sols contaminés ou bien par le lait maternel. Des échantillons de lait maternel humain provenant de la population générale contenaient en moyenne 11-70 ng d'HCB par gramme de tissus adipeux (ATSDR, 2015).

5.5 Absorption-Distribution-Métabolisme-Élimination (ADME)

5.5.1 Absorption

L'HCB peut entrer dans notre corps par différentes voies (inhalation, ingestion, contact cutané) et ainsi être absorbé soit par les poumons ou par le tractus digestif (ATSDR, 2015). Malgré tout, la voie d'exposition la plus probable et celle permettant d'assimiler la plus forte dose est l'ingestion via notre alimentation. Les enfants qui sont nourris au lait maternel sont également plus à risques d'être exposés à l'HCB (Breysse, 2015). L'absorption de l'HCB par le tractus gastro-intestinal varie selon le solvant dans lequel il est dissous; cette absorption peut être aussi faible que 6% dans une solution aqueuse et 82% avec de l'huile (ATSDR, 2015).

5.5.2 Distribution

Une fois à l'intérieur de l'organisme, il est distribué dans plusieurs tissus (i.e le sang, le foie, les organes endocriniens, les ovaires) avec une accumulation maximale dans les tissus adipeux. Chez les femmes enceintes, l'HCB peut également être transféré du sang et passer la barrière placentaire et ainsi affecter le fœtus (Breysse, 2015).

5.5.3 Métabolisme

L'HCB qui entre dans le corps sera métabolisé très lentement par le foie où il subira des modifications, soit la soustraction des molécules de chlore, par des enzymes spécialisées (ATSDR, 2015). Il a été démontré que l'HCB induisait certaines enzymes du cytochrome P450 dont CYP1A1 et CYP1A2 chez les rongeurs. D'ailleurs, le premier métabolite produit par les enzymes P450 est le pentachlorophénol qui serait ensuite conjugué à la glutathione afin d'être excrété (ATSDR, 2015). Une étude de 1982 a également démontré que l'excrétion urinaire de certains métabolites du HCB, tel que le pentachlorophénol, était plus élevée chez les femelles que chez les mâles (Rizzardini et Smith, 1982). De plus, tout comme d'autres substances chimiques incluant le tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), il a été démontré que l'HCB pouvait se lier aux récepteurs aryl hydrocarbure (AhR) et ainsi réguler l'activité des cytochromes (de Tomaso Portaz et al., 2015; Miret et al., 2016). Ces enzymes sont également impliquées dans le développement de la porphyrie observée suivant un traitement à l'HCB (Hahn et al., 1989). Les enzymes du cytochrome CYP3A1, CYP3A2 et CYP3A4 sont également activées lors de la détoxification de l'HCB (ATSDR, 2015).

5.5.4 Élimination

Une partie (34%) de l'HCB ingéré sera excrétée du corps par les fèces. Toutefois, certains sous-produits comme le pentachlorophénol créé lors du métabolisme seront excrétés via l'urine (ATSDR, 2015). En effet, l'HCB est rarement excrété par l'urine due à son caractère lipophile qui l'empêche de subir la filtration glomérulaire. La plupart de l'HCB dans l'urine ou dans la bile est passivement réabsorbé avant l'excrétion (Morris, 1985).

5.6 Effets sur la santé

5.6.1 Exposition à court-terme

Une exposition à de fortes concentrations d'HCB à court terme a pour conséquences des troubles du système nerveux tels que des convulsions, une hypothyroïdie et une atteinte au foie se déclarant par le développement d'une porphyrie (ATSDR, 2015).

5.6.1.2 Porphyrie

La porphyrie est causée par un dérèglement enzymatique dans la voie de biosynthèse de l'hème et est diagnostiquée par une concentration élevée en porphyrine, des petites protéines cycliques impliquées dans le transport du dioxygène, dans le sang, les fèces ou l'urine (ATSDR, 2015). L'HCB provoque la porphyrie en inhibant l'enzyme l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD) provoquant ainsi cette accumulation accrue de porphyrines qui ne peuvent plus être converties en hème. Ces accumulations sont responsables de dommages au foie (cirrhose,

hyperplasie, nécrose), au rein et aussi des lésions de la peau (ATSDR, 2015). L'intensité de la porphyrie varie en fonction du temps d'exposition et les rats femelles sont significativement plus affectés que les mâles (Kennedy et Wigfield, 1990; Krishnan et al., 1991). Il a été démontré que celle-ci débute également environ 40 jours après un traitement à l'HCB (Krishnan et al., 1991). Le diagnostic d'une porphyrie par une augmentation des niveaux de porphyrines dans le sang, les fèces et/ou l'urine (Breysse, 2015). D'ailleurs, des études chez l'humain ont également démontré le développement d'une porphyrie suite à une ingestion de sémences contaminées à l'HCB. Des 204 patients ayant été analysés, ils ont démontré que 8.3% de ceux-ci avaient des niveaux élevés de porphyrines et 3.9% de ceux-ci sont demeurés porphyrinogène 25 à 30 ans après l'exposition (Gocmen et al., 1986).

5.6.2 Exposition à long terme

Une exposition à long terme à l'HCB peut être causée par son accumulation dans les tissus adipeux résultant d'une exposition cumulative (ATSDR, 2015). Les effets sont similaires à ceux d'une exposition à court terme, mais souvent tendent à devenir plus sérieux. Des données démontrent qu'une exposition de plusieurs mois/années peut causer le cancer au niveau des reins, de la thyroïde et du foie (ATSDR, 2015).

5.6.2.1 Hépatocarcinogénèse

Plusieurs études animales témoignent de l'augmentation de l'incidence de la formation de tumeurs, majoritairement hépatiques, suite à un traitement oral à l'HCB (ATSDR, 2015). On dénote une diminution de la communication cellulaire par les jonctions lacunaires dans le foie de femelles traitées à l'HCB avec une dose de 100 mg/kg/jour pendant 5 jours (Plante et al., 2002). Dans la même étude, on remarque que la diminution de la communication cellulaire semble être reliée à une diminution des niveaux d'ARNm et des niveaux protéiques de la Cx26 et de la Cx32. La voie de signalisation impliquant la kinase liée à l'intégrine est souvent surexprimée dans le développement de tumeur. Il a été démontré qu'il y avait une augmentation des niveaux protéiques de la kinase liée à l'intégrine (voie ILK) ainsi qu'une augmentation d'une de ces cibles, soit la protéine kinase B (voie Akt), dans le foie des rats femelles traitées à l'HCB comparé aux contrôles, ; par contre, les mâles n'étaient pas affectés (Plante et al., 2005). Cette surexpression de la voie ILK est responsable de la diminution des niveaux de CDH1 dans le foie des rats femelles traitées à l'HCB, mais ne semble pas être impliquée dans la régulation de la Cx32 (Plante et al., 2005). La perte de la communication entre les cellules avoisinantes dérégule le contrôle apoptotique et ainsi favorise le développement de tumeurs (DeoCampo et al., 2000).

5.6.3 Effets hormonaux

L'HCB affecte également la reproduction. En effet, en plus du foie et des tissus adipeux, l'HCB peut également s'accumuler dans les ovaires (ATSDR, 2015). Dans une étude où ils ont administré une dose d'HCB de 50 mg/kg/jour pendant 5 jours à des rats Sprague-Dawley, une augmentation des niveaux de progestérone dans le sérum a été mesurée, en plus d'une augmentation du poids des ovaires chez les femelles super-ovulées (Foster et al., 1992a; Foster et al., 1992b). À des doses relativement élevées (30-221 mg/kg/jour), on remarque également des altérations dans la reproduction chez les mâles (Hansen et al., 1979). Finalement, on dénote aussi une perturbation dans la stéroïdogénèse chez des singes exposés à de fortes concentrations d'HCB (Breysse, 2015).

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Ce projet de mémoire repose sur l'hypothèse que le dimorphisme sexuel observé au niveau de l'expression des connexines hépatique est établi pendant le développement. Les hormones stéroïdiennes joueraient ainsi un rôle et créant une différence dans les niveaux basaux des connexines chez les animaux adultes ce qui rendraient les femelles plus sensibles à une exposition à l'HCB (Plante et al., 2002).

L'objectif global de ce projet vise ainsi à mieux comprendre les différences entre les mâles et les femelles en ce qui a trait à la régulation de la communication cellulaire par les jonctions lacunaires et à la régulation métabolisme. Des sous-objectifs ont ainsi été établis d'afin de répondre à l'hypothèse :

- (1) Caractériser la réponse à l'HCB in vivo et in vitro
- (2) Évaluer la régulation des connexines au cours du développement chez les rats mâles et les rats femelles
- (3) Évaluer l'effet des hormones stéroïdiennes (estradiol et testostérone) sur la localisation et la régulation de l'expression des connexines du foie (Cx26, Cx32 et Cx43) et d'E-cadhérine

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.0 Animaux

2.0.1 Expérience hexachlorobenzène (HCB)

Des rats Sprague-Dawley mâles et femelles adultes (45 jours) ont été obtenus auprès des laboratoires Charles River Canada Inc. avec une semaine d'intervalle entre les deux groupes. Les animaux ont été acclimatés pendant 7 jours avant le début de l'expérience. Ils ont été hébergés avec un cycle lumière/noirceur de 12 heures. La température de la pièce a été maintenue à 21°C et les animaux ont reçu de l'eau et de la nourriture *ad libitum* pendant cette période. Les animaux ont été hébergés en paire et séparés selon le sexe et le traitement. Au total, quatre groupes expérimentaux ont été utilisés soit : les mâles témoins (n=4), les femelles témoins (n=4), les mâles traités avec une solution d'HCB (n=4) et les femelles traitées avec une solution d'HCB (n=4). À noter qu'un mâle HCB est décédé pendant le traitement, réduisant le groupe à 3.

2.0.2 Traitement

Suite à la période d'acclimatation, les animaux ont reçu, par gavage, de l'huile de maïs (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) pour les groupes témoins ou une dose équivalente à 100 mg/kg/j d'HCB 118-74-1 (Sigma-Aldrich) dissoute dans l'huile de maïs pour les groupes traités, pendant 5 jours consécutifs. Les groupes témoins ont reçu de l'huile de maïs (10 ml/kg/jour) et les groupes traités ont reçu une dose d'HCB dissous dans l'huile de maïs (10 ml/kg/jour). La solution d'HCB a été préalablement soniquée et chauffée (37°C) afin de favoriser sa solubilisation. Les gavages ont tous été effectués entre 10h00-12h30 avec une aiguille de gavage de 16G. Les animaux ont été sacrifiés 45 jours après la fin du traitement par inhalation de CO₂ et rupture du diaphragme. Le foie de chaque animal a été échantillonné, séparé par lobe (**Figure 2.1**) et immédiatement congelé dans l'azote liquide et conservé -80°C.

2.0.3 Expérience développement

Des rats Sprague-Dawley mâles et femelles à différents âges (14 jours, 21 jours, 42 jours, 60 jours) ont été obtenus auprès des laboratoires Charles River Canada Inc. (Senneville, Montréal, QC, CA). Ils ont été hébergés avec un cycle lumière/noirceur de 12 heures. La température de la pièce a été maintenue à 21°C et les animaux ont reçu de l'eau et de la nourriture *ad libitum* pendant cette période. Les animaux ont été euthanasiés par inhalation au CO₂ et rupture du diaphragme. Les foies ont été échantillonnés et immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés -80°C. Chaque groupe était composé de 4 animaux. Tous les protocoles animaliers utilisés dans cette étude ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux de l'INRS.

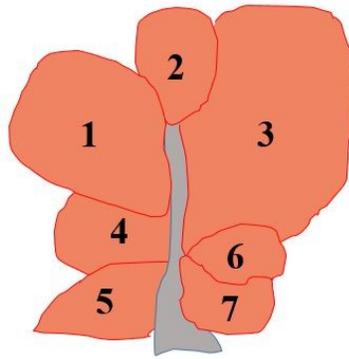


Figure 2. 1 Schématisation des lobes d'un foie de rat

2.1 Acide ribonucléique (ARN)

2.1.2 Extraction

L'ARN total a été extrait d'un morceau de foie (30 mg) avec la trousse NucleoSpin RNA Plus (Machery-Nagel, Bethlehem, PA, USA) dans le but de pouvoir quantifier l'expression génique des connexines et d'autres gènes impliqués dans le métabolisme et la détoxification du foie. Un morceau de foie a été homogénéisé dans 350 μ l de tampon de lyse (LBP) en suivant les instructions provenant de la trousse NucleoSpin (Machery-Nagel). Les ARNs ont par la suite été traités à la DNase I 1U/ μ l (Sigma-Aldrich) 15 min à température pièce afin d'éliminer les contaminations. La quantité des ARNs a été mesurée par densité optique à 260/280 nm et leur intégrité a été analysée sur un gel d'agarose 1,5%.

2.1.3 Quantification

Une aliquote de 500 ng d'ARN a été utilisée pour une réaction de transcription inverse afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) avec la trousse qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA). Par la suite, un volume de 2 μ l d'ADNc de chaque échantillon a été utilisé pour une réaction de PCR en temps réel avec le Perfecta SYBR Green Supermix (Quanta Biosciences) et le Rotor Gene RG-3000A (Corbett Research, Mortlake, SYD, AU). Les amorces utilisées pour chaque réaction sont listées à la **Table 2.2** et proviennent d'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Les gènes de référence utilisés pour la quantification sont Rn18S (*In vivo*) et GAPDH (*In vitro*). L'expression génique a été déterminée à l'aide de la méthode $\Delta\Delta$ Ct. La méthode $\Delta\Delta$ Ct permet de déterminer le fold-change entre les échantillons en fixant le contrôle à une valeur de 1.

2.2 Protéines

2.2.1 Extraction

Afin de déterminer les niveaux protéiques des connexines, les protéines totales ont été extraites d'un morceau de foie (100-300 mg) du lobe #3 (**Figure 2.1**) à l'aide du tampon de lyse RIPA filtré (0,45 µm)(50 mM Tris-HCl pH 7.8; Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) contenant 1% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), 0.5% sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich), 0.1% Sodium Dodeccul Sulfate (SDS) (Fisher Scientific), 2 mM de chlorure de calcium (CaCl₂) (Fisher Scientific), 10 µg/ml fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) (Sigma Aldrich), 5% cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma Aldrich), 100 µM sodiumorthovanadate (Sigma Aldrich). Le volume de tampon RIPA utilisé pour l'homogénéisation correspondait à 3 fois le poids de l'échantillon (300-900 µl) et a été utilisé conjointement à une méthode physique (Potter) afin d'extraire les protéines des cellules. L'homogénat obtenu a été incubé sur la glace pendant 30 min et centrifugé (10 000g; 10 min; 4°C). Le surnageant a été récupéré, aliquoté et entreposé à -80°C. Les concentrations protéiques ont été déterminées à l'aide de la trousse Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Newington, CO, USA). L'absorption a été mesurée à 562 nm afin de déterminer la concentration protéique de chaque échantillon.

2.2.3 Quantification

Une aliquote de 50 µg de protéines a été utilisée pour un immunobuvardage de type Western. Les échantillons protéiques ont été dilués avec de l'eau stérile et une solution de bleu de bromophénol 6X (50 mM Tris-HCl 1M pH 6.8; Fisher Scientific), 2% SDS (Fisher Scientific), 5% glycérol (FisherScientific), 0.0004% bleu de bromophénol (Fisher Scientific) à laquelle a été ajouté du β-mercaptoéthanol 100X (Fisher Scientific), pour l'analyse de la Cx32 et Cx43 ou du dithiothreitol (DTT) 0,1M (Fisher Scientific) pour l'analyse de la Cx26. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 98°C (β-mercaptoéthanol) ou à 70°C (DTT). Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 1.5 mm préparé comme suit : gel de résolution 15% (15% acrylamide 29 :1; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA), 0.375 M Tris 1.5M pH 8.8 (Fisher Scientific), 0.1% SDS (Fisher Scientific), 0.1% Ammonium persulfate (APS) (Fisher Scientific), 0.07% tétraméthyléthylènediamine (TEMED)(Fisher Scientific) et gel de compactage à 4% d'acrylamide (Bio-Rad Laboratories), 0.125 M Tris pH 6.8 (Fisher Scientific), 0.1% SDS (Fisher Scientific), 0.1% APS (Fisher Scientific), 0.07% TEMED (Fisher Scientific). La migration a été effectuée de 70V-130V dans du tampon Tris-Glycine-SDS (Bio-Rad Laboratories) avec l'appareil PowerPac 300 (Bio-rad Laboratories) jusqu'à ce que le front de migration atteigne la fin du gel. Une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) (Bio-Rad Laboratories) a été activée en l'immergeant dans du méthanol 100% (Fisher Scientific). Les protéines ont ensuite été transférées sur la membrane de

PVDF en utilisant un appareil Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories). Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 1h avec 5% de lait ou 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) dissous dans du TBST (solution saline tamponnée au tris avec 0.1% de Tween-20 (Fisher Scientific)). Les anticorps primaires et secondaires ainsi que les conditions utilisées sont listés dans le **Table 2.1**.

Pour la révélation, les membranes ont été incubées 5 min à température pièce dans une solution de Clarity ou Clarity Max Western ECL substrate (Bio-Rad Laboratories) et analysées avec le système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories) et le logiciel ImageLab (Bio-Rad Laboratories).

2.3 Immunofluorescence

Des sections de foie des rats femelles témoins et traitées à l'HCB ont été conservées dans de la cryomatrice O.C.T (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) à -80°C. Des coupes de 7 µm ont été effectuées à l'aide d'un cryostat. Les lames ont été fixées 10 min dans l'acétone froide et rehydratées dans du PBS. Les lames ont ensuite été bloquées 1h à température pièce avec 3% BSA/PBS. L'anticorps primaire de Cx32 (Sigma C3470) (**Table 2.3**) a été ajouté toute la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire fluorescent Alexa Fluor 488 a par la suite été ajouté 45 min à température pièce. Les noyaux ont été colorés avec 1 µg/ml d'Hoescht (Biotium, Fremont, CA, USA).

2.4 Cellules MH1C1

2.4.1 Mise en culture

Les cellules MH1C1 sont des cellules épithéliales issues d'hépatomes de rat. Un vial de cellule a été décongelé rapidement à 37°C. Le contenu du vial a été transféré dans un tube de 15 ml auquel 9 ml de milieu de culture DMEM (ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (Corning, Corning, NY, USA) a été ajouté doucement. Le tube a été centrifugé à 125 g pendant 7 min. Le surnageant a été enlevé et le culot resuspendu dans 7 ml de milieu de culture, puis les cellules ont étéensemencées dans un flacon de 25 cm² (T25) et incubées à 37°C avec 5% CO₂ jusqu'à confluence.

2.4.2 Passage cellulaire

Les cellules ont été passées lorsque la confluence atteignait 90-95%. Le T25 a été rincé avec du PBS1X. Afin de resuspendre les cellules, 3 ml de trypsine-EDTA 1X (ThermoFisher Scientific) a été ajouté et le flacon a été incubé à 37°C pendant 5 min. Pour arrêter la réaction, 8 ml de milieu de culture a été ajouté. Les cellules ont été comptées à l'aide d'un hématimètre. 1 x 10⁵ cellules par ml ont étéensemencées afin de maintenir la culture.

2.4.3 Traitement à l'hexachlorobenzène (HCB)

Pour les traitements à l'HCB, 33 000 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque 12 puits. La solution d'HCB à 30 mM a été préparée dans du DMSO (100%). Les cellules ont par la suite été traitées avec une dose de 5, 30 ou 50 µM d'HCB pendant 7 jours consécutifs, tel que décrit dans Plante et al. (2005). Le milieu de culture a été changé chaque jour. L'ARN a été extrait par les méthodes décrites ci-dessus (2.2.1) avec l'utilisation de 350 µl de solution de lyse (LBP) par puits. L'expression génique a été déterminée par PCR en temps réel tel que décrit dans la section 2.2.2

2.5 Organoïdes

2.5.1 Mise en culture

Les fragments des progéniteurs hépatiques de souris ont été achetés de STEMcell Technologies (Vancouver, CA), décongelées et maintenues en culture dans un dôme de matrigel (Corning) autour duquel le milieu d'expansion Hépaticult OGM Mouse Basal Medium #06031 (STEMcell technologies) supplémenté avec 5% de supplément #06032 (STEMcell technologies) et 50 µg/µl de gentamycine (VWR, Sanborn, NY, USA) a été ajouté pour la prolifération et formation d'organoïdes.

2.5.2 Passage cellulaire

Lors des passages, le milieu de culture a été retiré et 1 ml d'Advanced D-MEM/F-12 (Life Technologies, Burlington, ON, CA) froid a été ajouté directement sur la goutte de matrigel. Lors de la dissociation, la taille des fragments a été observée au microscope afin d'obtenir des fragments entre 30 – 100 µM. Les fragments ont par la suite été comptés afin de déterminer la concentration (fragments/µl). Un ou plusieurs puits d'une plaque 12 puits ont étéensemencés avec 3 dômes de matrigel (40 µl), chacun contenant entre 200-400 fragments, autour desquels 1 ml de milieu basal complet Hépaticult (STEMcell Technologies) a été ajouté. Le milieu pour la prolifération des organoïdes a été changé aux 2 jours. Pour la congélation, 800 fragments ont été resuspendus dans 1 ml de CryoStor CS10 (STEMcell technologies) et congelés à -150°C.

2.5.3 Différenciation

Afin de favoriser le développement d'organoïdes de type hépatocytaire, un milieu de différenciation a été utilisé tel que décrit dans Broutier et al. (2016). Les organoïdes ont été cultivés pendant 2 jours dans le milieu d'expansion, suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation (Advanced D-MEM/F-12 (LifeTechnologies) avec Glutamax 1X (STEMcell technologies), HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich), gentamycine 50 µg/µl (VWR), 1X supplément B27 sans vitamine A (ThermoFisher Scientific), 1X supplément N2 (ThermoFisher Scientific), 1,25 mM N-acetyl-L-

cysteine (Sigma-Aldrich A9165), 10 nM [Leu¹⁵]-Gastrin I humaine (Sigma-Aldrich G9145), 50 ng/ml EGF de souris (Peprotech, Québec, CA), 100 ng/ml FGF10 (Peprotech), 50 nM A83-01 (Sigma-Aldrich, SML0788), 10 µM DAPT (Sigma-Aldrich, D5942). Le DAPT a été tempéré 1h à température pièce avant d'être utilisé et il a été ajouté le jour même du changement de milieu. Le milieu de culture a été changé aux deux jours et le protocole expérimental est illustré à la figure 2.2.

2.5.4 Traitement aux stéroïdes

De manière à observer l'effet des hormones stéroïdiennes sur la différenciation des hépatocytes et sur l'expression des connexines, des traitements à la β -estradiol et à la testostérone ont été effectués. Pour les traitements, le même protocole que pour la différenciation a été utilisé (**Figure 2.2**), mais une solution de β -estradiol (E₂) ou de testostérone a été ajoutée au milieu de différenciation, afin d'obtenir des concentrations finales de traitement de 10, 100 ou 1000 nM. Les solutions de 1, 10, 100 µM ont été préparées le jour même et diluées dans le milieu de culture de façon à avoir une concentration finale en éthanol de 0.1%.

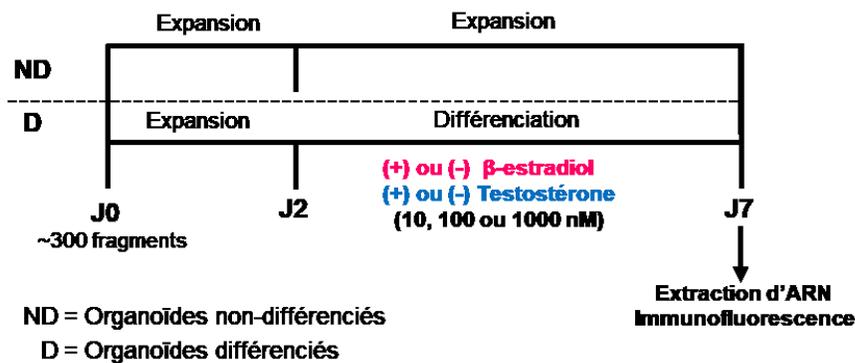


Figure 2. 2 Protocole expérimental pour la différenciation des organoïdes et les traitements aux hormones stéroïdiennes. Les organoïdes ont étéensemencés à environ 300 fragments à J0 dans du milieu d'expansion Hépaticult. À J2, le milieu a été changé pour le milieu de différenciation, afin d'obtenir des organoïdes à caractère hépatocytaire ou est resté le même soit du milieu d'expansion, afin d'obtenir des organoïdes non différenciés. Au cours de la différenciation, les organoïdes ont été traités avec 10, 100 ou 1000 nM de β -estradiol ou de testostérone jusqu'à la récolte soit J7. Tous les organoïdes ont été récupérés à J7 afin d'effectuer des analyses d'ARN et d'immunofluorescence.

2.5.5 Comptage cellulaire

Au cours des traitements, les organoïdes ont été comptés et mesurés à l'aide d'un microscope inversé Nikon Eclipse Ti-S (Mississauga, ON, CA) et l'appareil photos Ds-Ri2 (Nikon).

2.5.6 Expression génique

Afin d'analyser l'expression génique de différents gènes, nous avons également eu recours à l'extraction d'ARN et aux analyses de PCR en temps réel décrites ci-dessus (*Section 2.2*). Toutefois, afin d'obtenir une quantité suffisante d'ARN, 3 dômes de cellules contenant environ 300 fragments ont étéensemencés dans un puits d'une plaque douze puits. Le protocole expérimental qui a été utilisé est démontré par la **Figure 2.2**. À la fin du traitement, les puits ont été lavés avec 3 fois 1 ml de PBS froid. Ensuite, 1 ml de Cell Recovery (Corning) a été ajouté et la plaque a été incubée à 4°C pendant 1h afin de permettre la dissolution du matrigel. En utilisant un embout en biseau d'une pipette de 1000 µl, les organoïdes ont été récupérés dans des microtubes avec précaution. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 300 g pendant 5 min. Les culots ont été lavés 2 fois avec 500 µl de PBS et 350 µl de tampon de lyse (LBP) provenant de la trousse NucleoSpin (Machery-Nagel). Les échantillons ont ensuite été vortexés 30 sec. Les ARNs ont été extraits en suivant les instructions du kit NucleoSpin (Machery-Nagel) et traités à la DNase tel qu'expliqué ci-dessus. Un aliquot de 100 ng d'ARN a été converti en ADNc par la transcriptase inverse. Les ADNc ont été traités de la même façon que dans la première partie (2.2.2). Les amorces de souris utilisées sont listées dans la **Table 2.2**.

2.5.7 Immunofluorescence

La détection et la localisation des connexines ont été déterminées par immunofluorescence. Les organoïdes ont étéensemencés à environ 200-300 fragments par goutte de 40 µl de matrigel dans des chambres Labtek II (ThermoFisher Scientific). Le protocole expérimental qui a été utilisé est décrit par la **Figure 2.2**. À la fin du traitement, les organoïdes ont été fixés avec du méthanol 100% froid (Fisher Scientific) et incubés 10 min à 4°C et 10 min à la température pièce. Une solution de blocage 3% BSA avec 5% sérum de chèvre dans du PBS a été ajoutée et les chambres ont été incubées dans une boîte humide 1h30 à température pièce avec faible agitation. Les organoïdes ont ensuite été incubés avec des anticorps dans une boîte humide toute la nuit à 4°C et les concentrations utilisés sont listés dans la **Table 2.3**. Le lendemain, les lames ont été stabilisées à température pièce (environ 30 min) avant de débiter les lavages. L'anticorps secondaire approprié a été ajouté à chaque chambre et incubé 1h à température pièce dans une boîte humide avec faible agitation. Par la suite, l'anticorps secondaire a été remplacé par une solution de 1 µg/ml d'Hoescht (Biotium) dans 3% BSA et 5% sérum de chèvre et incubée pendant 10 min dans une boîte humide afin de colorer les noyaux. Les lames ont été montées avec du fluoromount (Southernbiotech, Birmingham, AL, USA). Les photomicrographes ont été prises par un microscope confocale Nikon A1R+ et analysées avec le logiciel NIS-élément AR (Nikon).

2.5 Statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Des tests Student (test T) ou des tests d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivis du test d'un test de comparaison multiple de Tukey's ont été utilisés pour analyser les données. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

Table 2. 1 Liste des anticorps utilisés pour les immunobuvardage de type Western

	Anticorps	Compagnie	#Catalogue	Espèce	[μ g/ml]	Diluant	Incubation
Anticorps primaires	Cx26	EMD Millipore, Etobicoke, ON, USA	MABT198 (3B12.1)	Souris	1.0	3% BSA/ TBST 0.1%	1h, TP
	Cx32	Sigma-Aldrich	C3470	Lapin	1.0	5% lait/ TBST 0.1%	ON, 4°C
	Cx43	Sigma-Aldrich	C6219	Lapin	0.64	5% lait/ TBST 0.1%	ON, 4°C
	Tubuline	Abcam, Toronto, ON, CA	Ab4074	Lapin	0.40	5% lait/ TBST 0.1%	1h, TP
	E-cadhérine	SantaCruz, Dallas, TX, USA	Sc-8426 (G10)	Souris	0.20	5% lait/ TBST 0.1%	1h, TP
Anticorps secondaires	Goat anti-rabbit IgG-HRP	Abcam	Ab6721	Chèvre contre lapin	0.2	5% lait/ TBST 0.1%	1h, TP
	Rabbit anti-mouse IgG-HRP	Abcam	Ab6728	Lapin contre souris	0.2	5% lait/ TBST 0.1%	1h, TP

ON : Toute la nuit
TP : Température pièce

Table 2. 2 Liste des amorces utilisées pour les analyses de PCR en temps réel (qPCR)

Amorces			
	Gène	Sens (5' – 3')	Anti-sens (5' – 3')
Amorces de rat	Cx32	AGACAGACACGCCTGCATAC	CTCGCCAATGGCTGTAGAA
	CYP1A1	TGTGGCCCTTCTCAAATGTCC	TCAGTCCTTCTCACAGCCA
	Cdh1	CTCCCTGAGCTCGCTGAA	GTGCCACACAGGAACGACTT
	GAPDH	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	AACTTGCCGTGGGTAGAGTC
	UROD	GCCGCTACTTACCAGAGTT	GGGGTACAACAAGGATGTCA
	Rn18S	GGCGGAAAATAGCCTTCGCT	AGCCCTCTTGGTGAGGTCAA
	Amorces de souris	Cx26	GACCCATTTTCGGACCAACCC
Cx32		ACGGAGCTCTATGCTGGCTT	GATTCACGCCACTGAGCAAG
Cx43		GCCCGAACTCTCCTTTTCCT	AAGCTGACTCAACCGCTGTC
E-cadhérine		GCTCTCATCATCGCCACAGA	CTCAGCAGTAAAGGGGGACG
GAPDH		AGGTCGGTGTGAACGGAT	GGGGTCGTTGATGGCAAC

Table 2. 3 Liste des anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence

Anticorps primaires	Compagnie	#Catalogue	Espèce	[µg/ml]	Diluant
Albumine	Proteintech, Rosemont, USA	16475-1-AP	Lapin	1.3	5% sérum de chèvre/PBS
Cx26	EMD Millipore	MABT198 (3B12.1)	Souris	1.0	3% BSA, 5% sérum de chèvre, PBS
Cx32	Sigma-Aldrich	C3470	Lapin	2.0	
Cx 43	Sigma-Aldrich	C5219	Lapin	1.2	
E-cadhérine	Cell Signaling Technology, Carlsbad, CA, USA	24E10	Lapin	1.0	
Lgr5	Origen	OTI2A2	Souris	1.0	5% BSA/ PBS
Anticorps secondaires	Compagnie	#Catalogue	Espèce	[µg/ml]	Diluant
Goat anti-rabbit AF488	Life Technologies, Eugene, OR, USA	A11008	Chèvre contre lapin	4.0	3% BSA, 5% sérum de chèvre, PBS
Goat anti-mouse AF594	Life Technologies, Eugene, OR, USA	A11005	Chèvre contre souris	4.0	

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.0 Effets d'un traitement à l'hexachlorobenzène (HCB) sur les jonctions lacunaires et les enzymes de détoxification dans le foie des rats mâles et femelles (*in vivo*)

Les poids des rats ont été calculés avant, pendant et après le traitement de 5 jours à l'HCB (100 mg/kg/jour). Les poids des rats mâles témoins (MCTL) ou traités à l'HCB (MHCB) étaient 1.3 fois plus élevés que celui des femelles témoins (FCTL) ou traitées à l'HCB (FHCB), au début du traitement. À la fin du traitement (PND102), une augmentation significative de 2.1 fois a été observée entre les poids des mâles témoins comparés au poids des femelles témoins et une augmentation significative de 1.8 fois a été observée dans le poids des mâles traités à l'HCB comparés aux femelles traitées à l'HCB. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée dans les poids des groupes contrôles comparés aux groupes traités, tant chez les mâles que chez les femelles, que ce soit au début ou à la fin du traitement (**Figure 3.1A**). Néanmoins, il semble y avoir eu une tendance à la diminution dans le poids des mâles traités comparés aux contrôles et le contraire a été observé chez les femelles. De plus, une différence significative a été observée dans l'index hépatosomatique, qui correspond au poids du foie sur le poids total de l'animal, chez les femelles traitées à l'HCB comparées aux femelles témoins (**Figure 3.1B**). En effet, les résultats ont démontré que le foie des femelles traitées à l'HCB occupait environ 5.7% du poids total ce qui était significativement plus élevé que le foie des femelles témoins qui occupait environ 5.0% du poids total. Aucune différence significative n'a été observée chez les mâles où le poids du foie occupait environ 4.9% du poids total chez les mâles témoins et 5.1% du poids total chez les mâles traités à l'HCB.

Afin de déterminer si l'HCB stimulait les fonctions hépatiques, nous avons regardé les niveaux d'ARN de CYP1A1 dans le foie. Une induction significative de CYP1A1 a été observée, suivant un traitement à l'HCB, chez les mâles et chez les femelles. Les analyses ont démontré que les niveaux basaux de CYP1A1 chez les femelles témoins étaient 2.4 fois plus élevés que chez les mâles témoins et 7.3 fois plus élevés chez les femelles traitées à l'HCB que les mâles traités à l'HCB (**Figure 3.2A**). De plus, l'induction de CYP1A1 s'est révélée être plus importante chez les femelles traitées à l'HCB avec des niveaux 897 fois plus élevés de CYP1A1 par rapport aux femelles contrôles comparés à des niveaux 294 fois plus élevés chez les mâles traités à l'HCB comparés aux mâles témoins (**Figure 3.2A**).

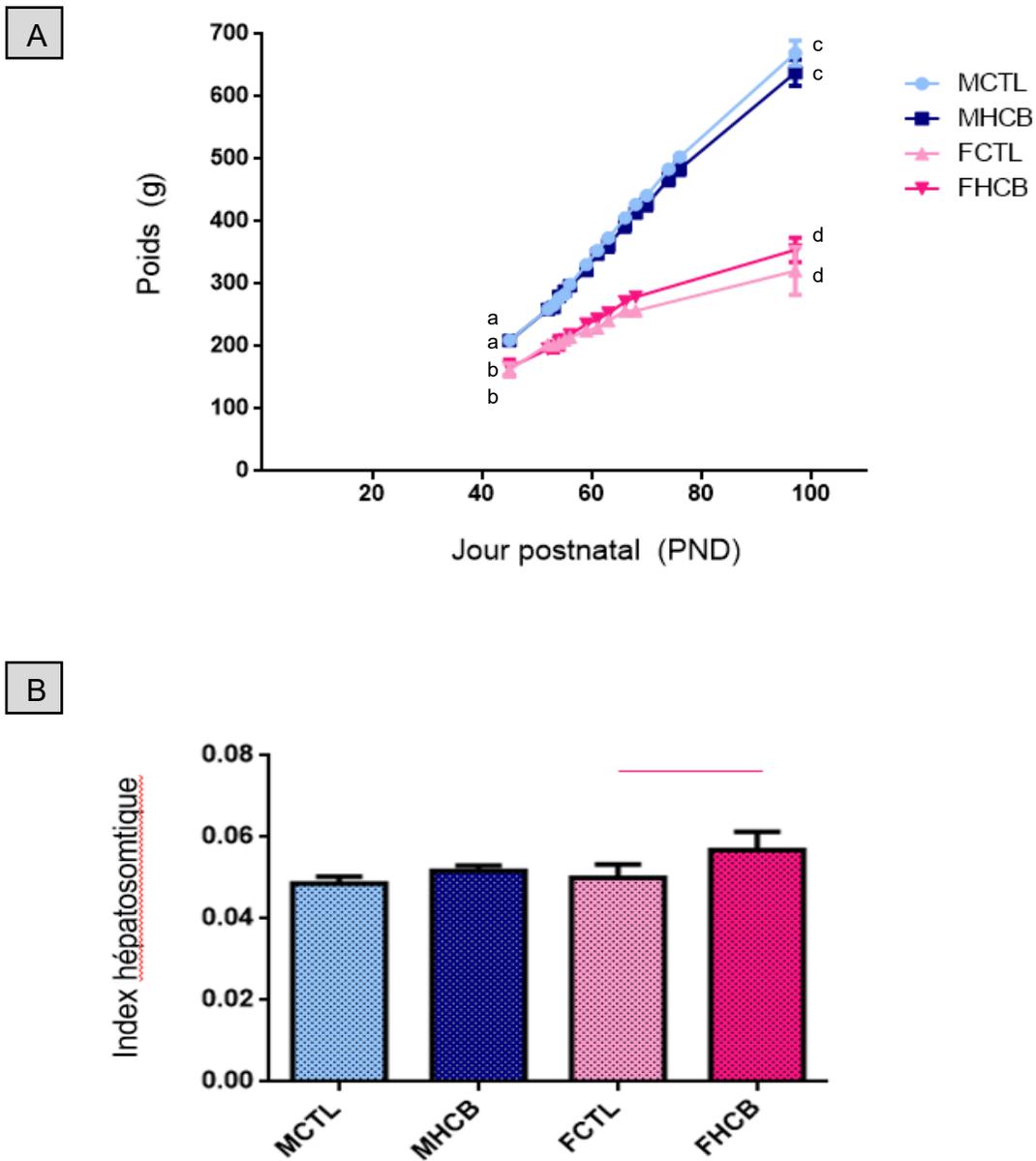


Figure 3. 1 Effets d'un traitement à l'HCB (100 mg/kg/jour) sur le poids des animaux et sur l'index hépatosomatique. (A) Variation du poids (g) des rats mâles et femelles à différents jours, tout au long de l'expérience (B) À la fin du traitement, les animaux ont été pesés et euthanasiés. Le foie complet a été retiré et pesé avant de procéder aux autres expérimentations. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. Les différences significatives sont démontrées par des lettres différentes ou une barre rose. (n=4, excluant les MHCB où n=3).

Le développement d'une porphyrie est également observé suivant un traitement à l'HCB, celle-ci est causée par l'inhibition de l'activité enzymatique de l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD), une enzyme clé dans la voie de signalisation de l'hème (Warby et al., 2009). Afin de vérifier l'inhibition d'UROD, l'ARNm a été mesuré par PCR en temps réel et aucune différence significative n'a été observée entre les groupes contrôles et les groupes traités, chez les mâles et les femelles (**Figure 3.2B**). Toutefois, une tendance à la diminution de 2.2 fois dans les niveaux d'ARNm d'UROD a été observée chez les femelles traitées comparées aux contrôles. De plus, une diminution significative de 1.9 fois a été observée entre les femelles traitées à l'HCB comparées aux mâles traités à l'HCB, bien que les niveaux basaux des deux groupes ne fussent pas significativement différents (**Figure 3.2B**).

Par la suite, nous voulions savoir si l'expression de la Cx32 était affectée par un traitement à l'HCB, nous avons donc regardé les niveaux d'ARNm, les niveaux protéiques et la localisation de celle-ci. Aucune différence significative dans les niveaux d'ARNm de la Cx32 entre les mâles et les femelles tant chez les rats témoins que chez les rats traités à l'HCB a été notée (**Figure 3.2C**). Pour ce qui est des niveaux protéiques et de la localisation de la Cx32, seules les femelles témoins et traitées ont été analysées. Une bande spécifique à 28 kDa a été détectée, dans tous les groupes, par des analyses d'immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques de foie de rat (**Figure 3.3A**). Aucune variation dans les niveaux protéiques de la Cx32 n'a été observée, suite au traitement à l'HCB, dans aucun des groupes testés. Finalement, des petits points fluorescents, typique des canaux de connexines, ont été détectés à la membrane dans le foie des rats femelles témoins et traitées à l'HCB (**Figure 3.3C**).

Nous nous sommes également intéressés à savoir les jonctions adhérentes étaient affectées par le traitement. Les niveaux d'E-cadhérine (CDH1) ont aussi été analysés par immunobuvardage de type Western (**Figure 3.3B**). Une bande spécifique à CDH1 a été détectée à 110 kDa, dans tous les groupes. Nos résultats ont démontré une augmentation significative des niveaux protéiques de CDH1 de 1.7 fois chez les FHCB comparées aux FCTL.

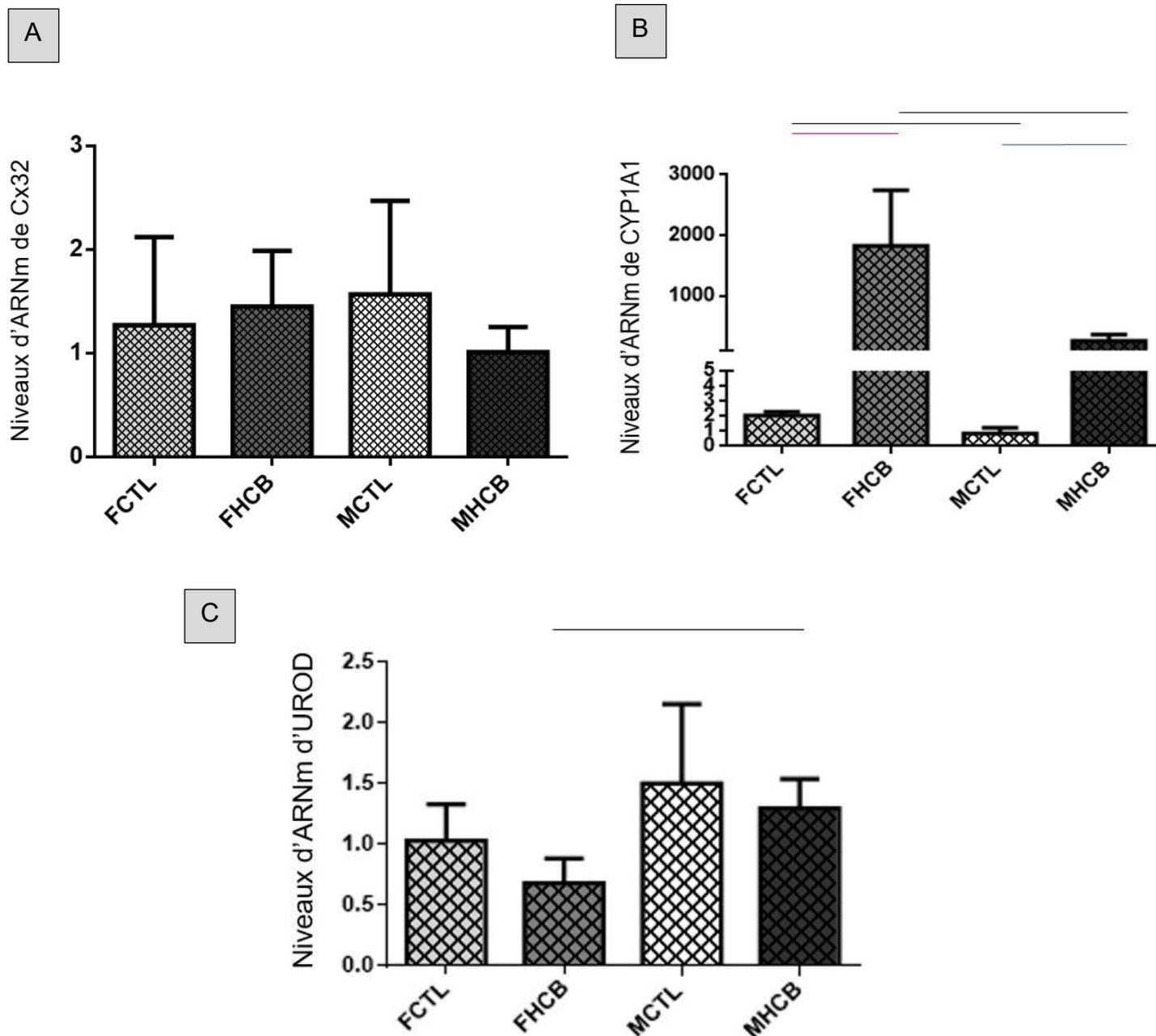


Figure 3. 2 Effets d'un traitement à l'HCB sur les niveaux d'ARNm de CYP1A1 (A), UROD (B) et Cx32 (C). Des rats mâles et femelles ont reçu de l'huile de maïs (CTL) ou une dose d'HCB (100 mg/kg/jour) pendant 5 jours. L'ARN total a été extrait des foies et l'ARNm a été utilisé pour réaction de PCR temps réel avec des amorces spécifiques. Les données ont été normalisées en utilisant le gène de référence Rn18S puis quantifiées par la méthode $\Delta\Delta Ct$. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. La barre noire indique une différence significative entre deux groupes ($p < 0.05$). (n=4, excluant les MHCB où n=3)

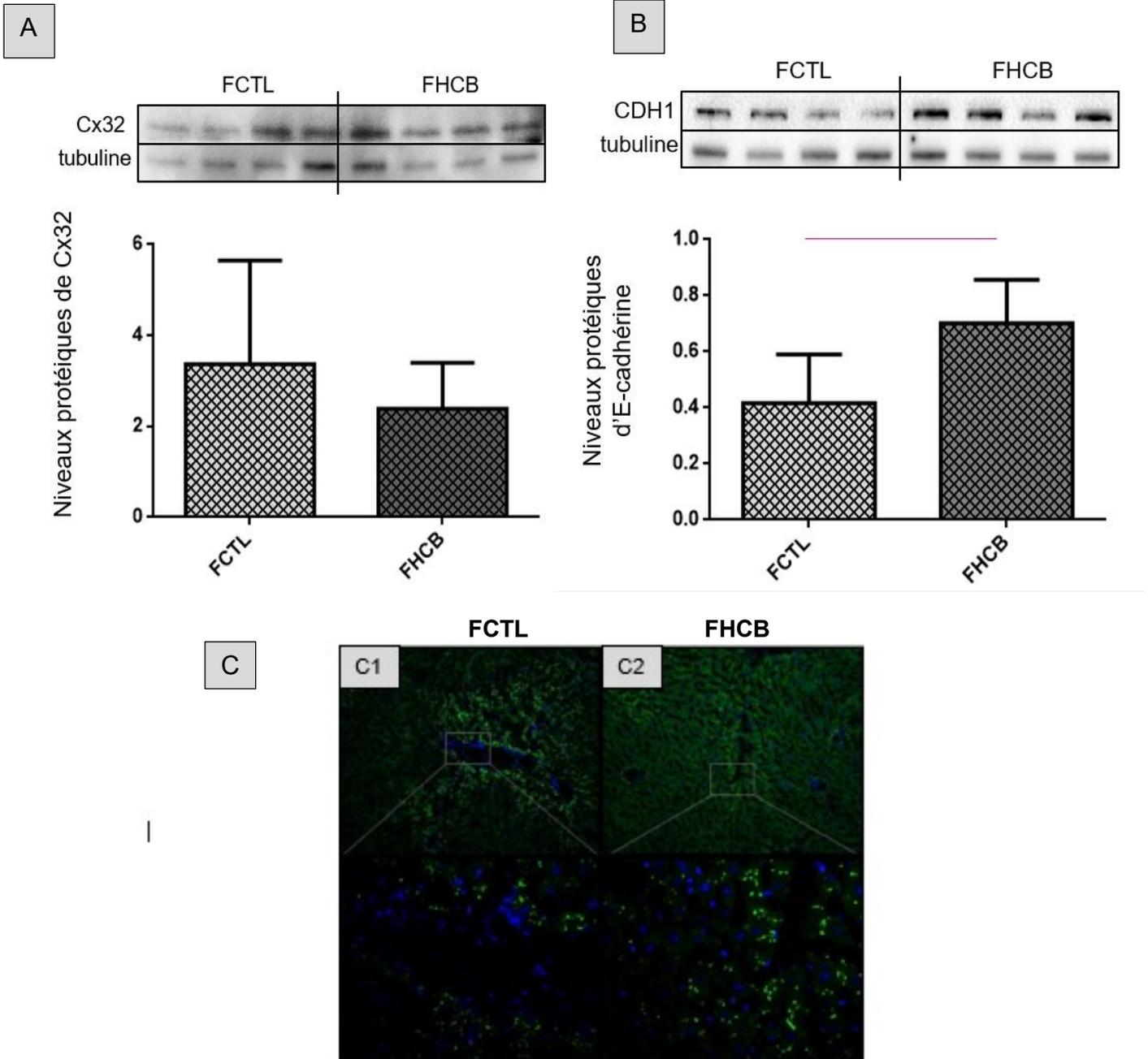


Figure 3. 3 Analyse d'immunobuvardage de type Western de la Cx32 (A) et de CDH1 (B) et immunolocalisation de la Cx32 chez les rats femelles contrôles (C1) et traités à l'HCB (C2). Des rats mâles et femelles ont reçu de l'huile de maïs (CTL) ou une dose d'HCB (100 mg/kg/jour) pendant 5 jours. (A-B) Les protéines totales ont été extraites et une aliquote de 50 µg a été séparé sur un gel de polyacrylamide, transféré sur une membrane de nitrocellulose, puis visualisé à l'aide d'anticorps primaire spécifique. Les données ont été normalisées avec la tubuline et quantifiées à l'aide du logiciel Image Lab. Les données sont exprimées en la moyenne ± erreur standard. La barre rose indique une différence significative entre deux groupes de femelles ($p < 0.05$). (n=4). (C) Des sections de foies ont été conservées dans de la cryomatrice O.C.T à partir de laquelle des coupes et un marquage d'immunofluorescence a été effectués avec un anticorps Cx32 (vert) ou du Hoescht (bleu).

3.1 Effets d'un traitement à l'HCB sur les jonctions communicantes dans les cellules MH1C1 (*in vitro*)

La communication cellulaire est réduite suite à un traitement à l'HCB dans la lignée cellulaire MH1C1 (Plante et al., 2005). Ainsi, l'activité du HCB utilisé *in vivo* a également été analysée *in vitro*. Aucune différence significative n'a été observée dans les niveaux d'ARNm de la Cx32 suite au traitement à l'HCB (**Figure 3.4**). Toutefois, seule la concentration de 5 μM permettait de garder l'HCB en solution pendant le traitement.

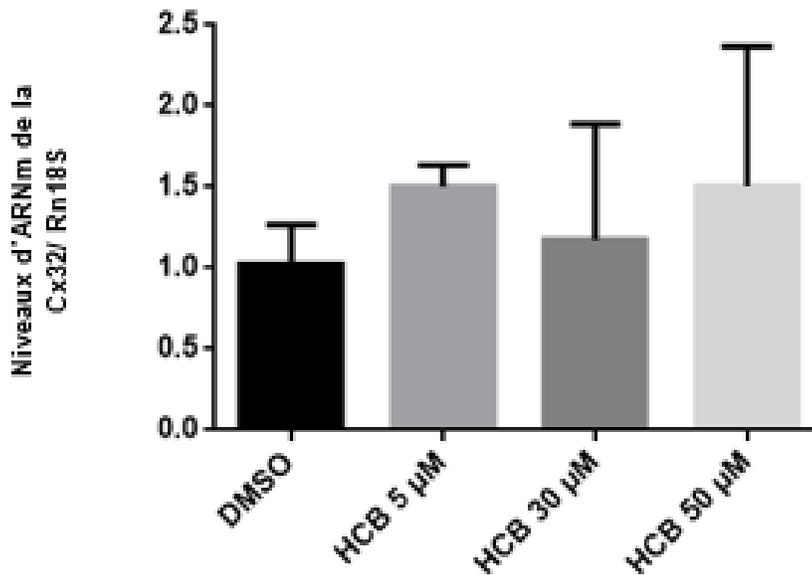


Figure 3. 4 Effet d'un traitement à l'HCB (5, 30 et 50 μM) sur les niveaux d'ARNm de la Cx32, chez les cellules MH1C1. Les cellules MH1C1 ont reçu une dose d'HCB (5, 30 ou 50 μM) pendant 7 jours. À la fin du traitement, les cellules ont été lysées et l'ARN a été extrait et utilisé dans une analyse de PCR en temps réel. Les données ont été normalisées avec le gène de référence Rn18S et quantifiées par la méthode $\Delta\Delta\text{Ct}$. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard ($p < 0.05$). ($n=1$ (5 μM) ou 3 (DMSO, 30 et 50 μM))

3.2 Établissement des niveaux protéiques des différentes connexines dans le foie au cours du développement

3.2.1 Connexine 26

Une analyse d'immunobuvardage de type Western a été effectuée afin de déterminer l'expression de Cx26 dans le foie des rats mâles et femelles (**Figure 3.5A**). Une bande spécifique à 26 kDa a été détectée pour tous les âges testés, nous indiquant la détection spécifique de cette connexine (**Figure 3.5A**). Des différences significatives ont été observées pendant le développement. Chez les femelles, une augmentation significative de 1.8 fois a été observée entre PND14 et PND21 suivie d'une diminution significative de 2.7 fois entre PND21 et PND42 et d'une diminution significative de 10.3 fois entre PND42 et PND60. De plus, il y a aussi eu une diminution significative de 1.7 fois entre PND14 et PND60 et une diminution significative de plus de 20 fois entre PND21 et PND60. Chez les mâles, une baisse significative de plus de 20 fois dans les niveaux de Cx26 a été observée entre PND14 et PND60, une diminution significative de 3.3 fois entre PND21 et PND42 et une diminution significative de plus de 20 fois entre PND21 et PND60. Ces résultats ont démontré qu'il y avait une diminution significative des niveaux protéiques de la Cx26 entre les jeunes animaux et les animaux adultes. Aucune différence significative n'a été observée entre les mâles et les femelles pour les différents groupes d'âges (**Figure 3.5B**)

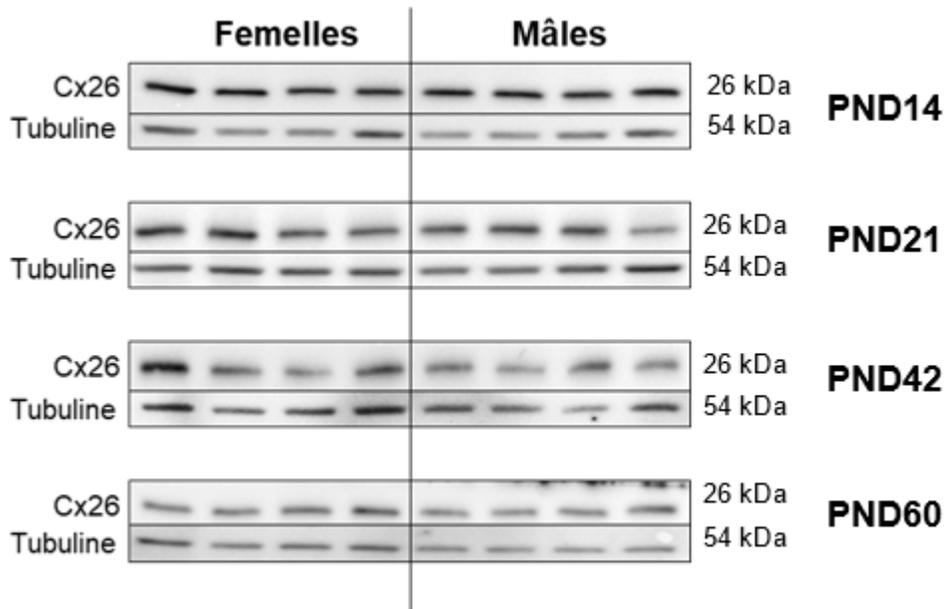
3.2.2 Connexine 32

Une analyse d'immunobuvardage de type Western a été effectuée afin de déterminer l'expression de Cx32 dans le foie des rats mâles et femelles (**Figure 3.6A**). La détection spécifique de la Cx32 a été observée à 28 kDa tant chez les femelles que chez les mâles. Durant la période de développement chez les femelles, une baisse significative de 2.3 fois a été observée dans les niveaux de Cx32 entre PND14 et PND42, une baisse significative de 2.8 fois entre PND14 et PND60, une de 2.6 fois entre PND21 et PND42 et une de 3.1 fois entre PND21 et PND60 (**Figure 3.6B**). Chez les mâles, il y a également eu des variations significatives dans les niveaux de Cx32. Une baisse significative de 2.7 fois été observée dans le développement entre PND14 et PND60, une baisse significative de 1.6 fois entre PND21 et PND42 et une baisse significative de 3.5 fois entre PND21 et PND60 (**Figure 3.6B**). Ces résultats ont démontré qu'il se produisait une baisse significative des niveaux de Cx32 entre le jeune âge et l'âge adulte. Un dimorphisme sexuel a été observé dans les niveaux protéiques de la Cx32 entre les mâles et les femelles à PND42 (**Figure 3.6B**). À PND42, les mâles avaient des niveaux de Cx32 1.8 fois supérieurs que les femelles.

3.2.3 Connexine 43

Une analyse d'immunobuvardage de type Western a été effectuée afin de déterminer l'expression protéique de la Cx43 dans le foie des rats mâles et femelles (**Figure 3.7A**). Une seule bande spécifique à la Cx43 a été détectée à ~43 kDa. Au cours du développement, chez les femelles, une diminution significative de 4.0 fois dans les niveaux de Cx43 a été observée entre PND14 et PND21 et une diminution de 2.9 fois a été observée entre PND14 et PND42 (**Figure 3.7B**). Toutefois, aucune différence significative n'a été observée dans l'expression de Cx43, chez le mâle, au cours du développement (**Figure 3.7B**). Des différences significatives entre les mâles et les femelles ont été observées dans les niveaux protéiques de Cx43 dans le foie entre PND21 et PND42 (**Figure 3.7B**). Les femelles ont des niveaux 2.6 fois moins élevés que les mâles à PND21 et 1.4 fois moins élevés que les mâles à PND42.

A



B

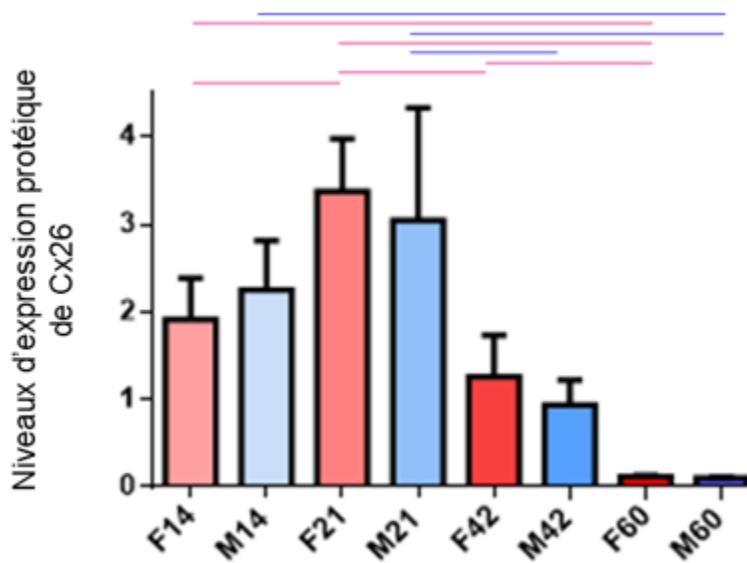
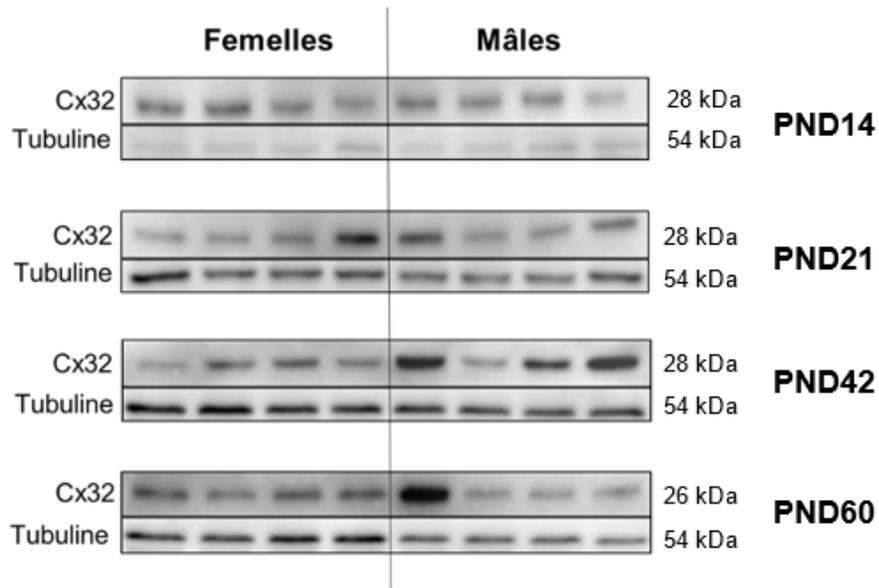


Figure 3. 5 Analyse d'immunobuvardage de type Western de la connexine 26 (Cx26). (A) Détection de la Cx26 (26 kDa) dans des extraits de protéines totales de foie de rats femelles (gauche) et mâles (droite) à différents jours après la naissance soit de PND14 à PND60. Les données ont été normalisées avec la tubuline (54 kDa). (B) Quantification des niveaux d'expression normalisés à l'aide du logiciel Image Lab. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. Les barres roses, bleues ou noires indiquent les différences significatives entre les femelles, les mâles ou entre les sexes, respectivement ($p < 0.05$). (n=4)

A



B

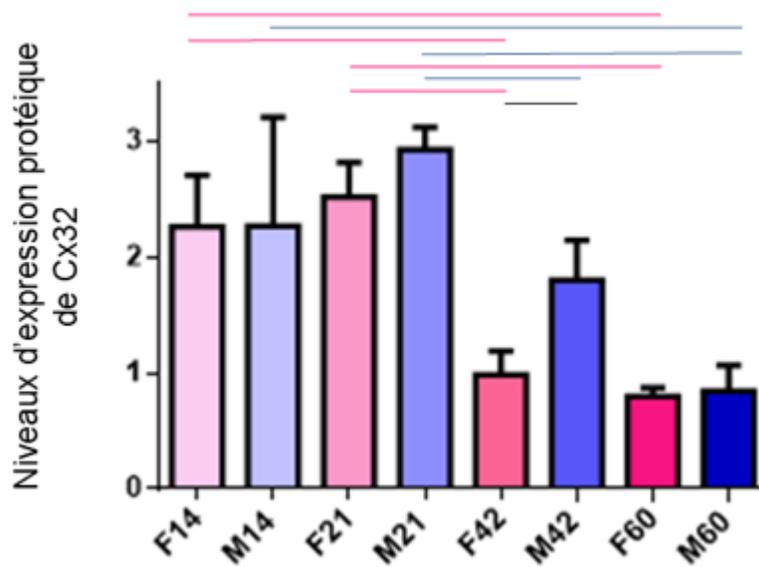
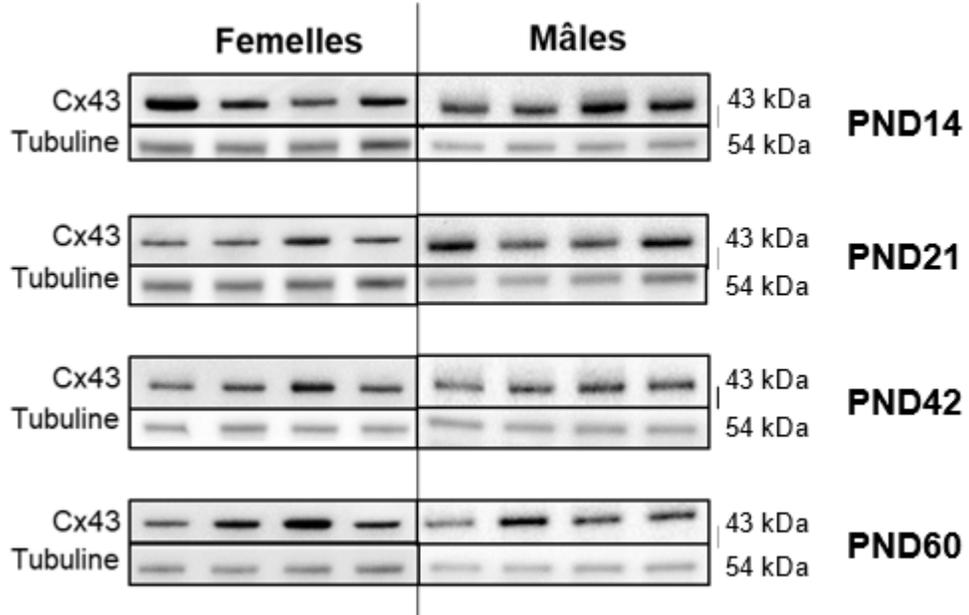


Figure 3. 6 Analyse d'immunobuvardage de type Western de la connexine 32 (Cx32). (A) Détection de la Cx32 (28 kDa) dans des extraits de protéines totales de foie de rats femelles (gauche) et mâles (droite) à différents jours après la naissance soit de PND14 à PND60. Les données ont été normalisées avec la tubuline (54 kDa). (B) Quantification des niveaux d'expression normalisés à l'aide du logiciel Image Lab. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. Les barres roses, bleues ou noires indiquent les différences significatives entre les femelles, les mâles ou entre les sexes, respectivement ($p < 0.05$). (n=4)

A



B

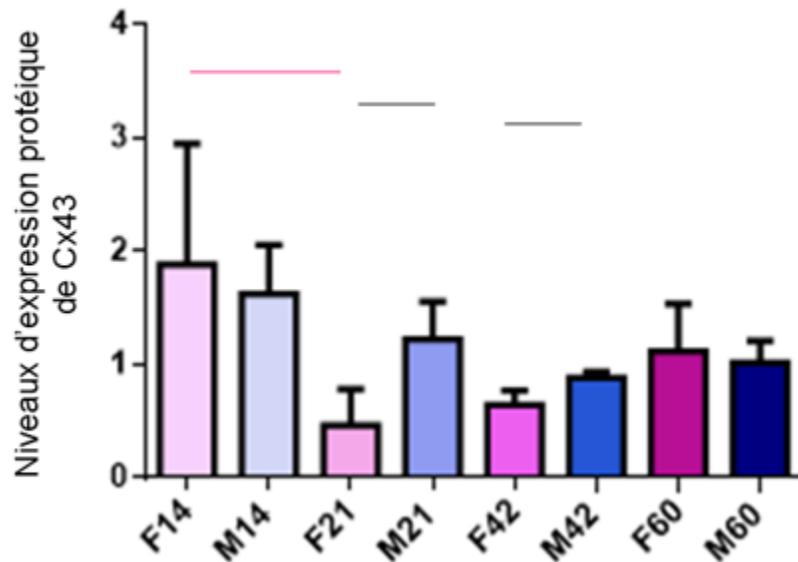


Figure 3. 7 Niveaux d'expression protéique de la connexine 43 (Cx43). (A) Détection de la Cx43 (43 kDa) dans des extraits de protéines totales de foie de rat femelles (gauche) et mâles (droite) par immunobuvardage de type western à différents jours après la naissance soit de PND14 à PND60. Les données ont été normalisées avec la tubuline (54 kDa). (B) Quantification des niveaux d'expression normalisés à l'aide du logiciel Image Lab. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. Les barres roses ou noires indiquent les différences significatives entre les femelles ou entre les sexes respectivement ($p < 0.05$). ($n=4$)

3.3 Prolifération et différenciation d'organoïdes issus de cellules souches du foie

Formation des organoïdes

Les organoïdes hépatiques de souris ont été maintenus en culture sur une longue période (**Figure 3.8**). Dans le milieu d'expansion, les organoïdes ont proliféré et se sont allongés. On observe également que ceux-ci avaient différentes formes et tailles (**Figure 3.8**). Dans le milieu de différenciation, il a été observé que les organoïdes avaient des tailles inférieures et ils ont cessés de prendre de l'expansion comparés au groupe contrôle (**Figure 3.9**). Il a également été observé que les organoïdes devenaient plus foncés et qu'il se produisait un changement dans la morphologie des cellules dans le milieu de différenciation (**Figure 3.10**). Des changements dans la forme et la taille des cellules ont également été observés (**Figure 3.10**). De plus, un marquage de Lgr5, marqueur de cellules souches a été observé à la membrane uniquement chez les organoïdes non différenciés (**Figure 3.9C**), aucun marquage n'a été observé dans les organoïdes différenciés (**Figure 3.10F**).

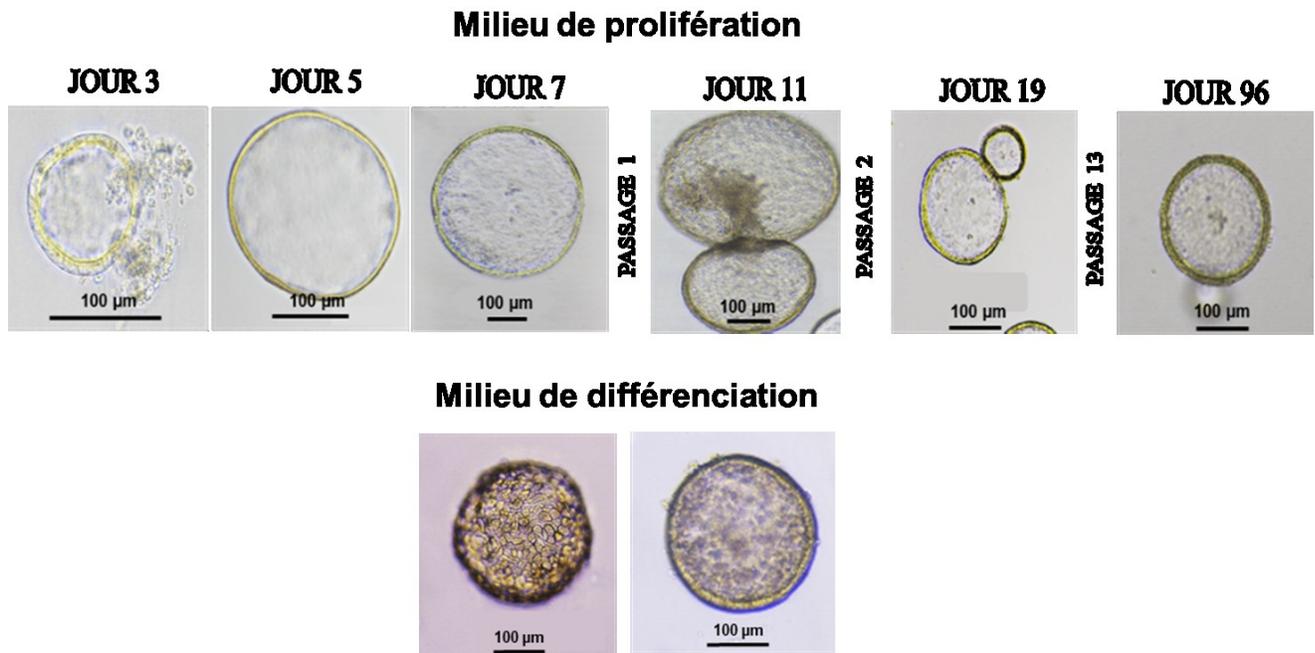


Figure 3. 8 Formation et croissance des organoïdes dans le milieu de prolifération Hépaticult (STEMCELL Technologies) et le milieu de différenciation. Les organoïdes hépatiques ont été cultivés et passés dans du milieu de prolifération à de nombreuses reprises selon le protocole de STEMCELL Technologies.

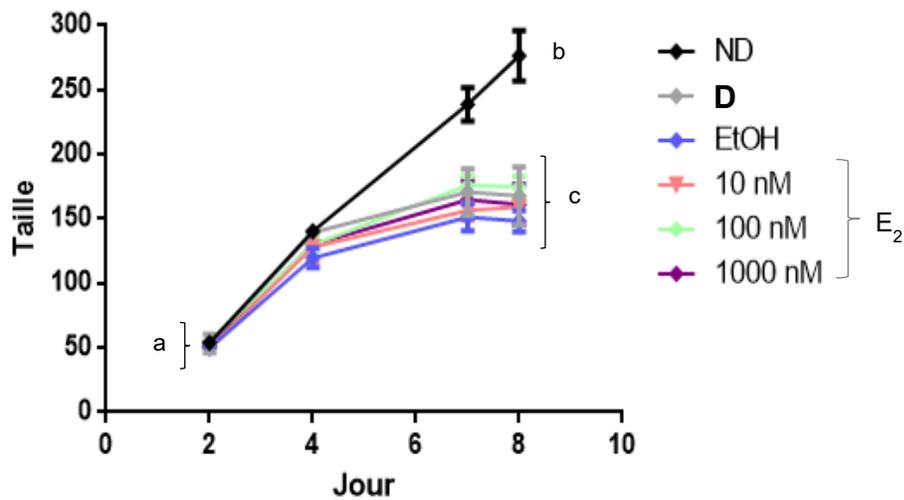


Figure 3. 9 Croissance des organoïdes dans le milieu d'expansion (ND) et le milieu de différenciation (D) avec ou sans E₂ (10,100 et 1000 nM). Le protocole expérimental illustré à la Figure 2.1 a été utilisé pour cette expérience. La taille des organoïdes a été mesurée à l'aide d'un microscope inversé (Nikon). Les données sont exprimées en la moyenne ± erreur standard. (n=3)

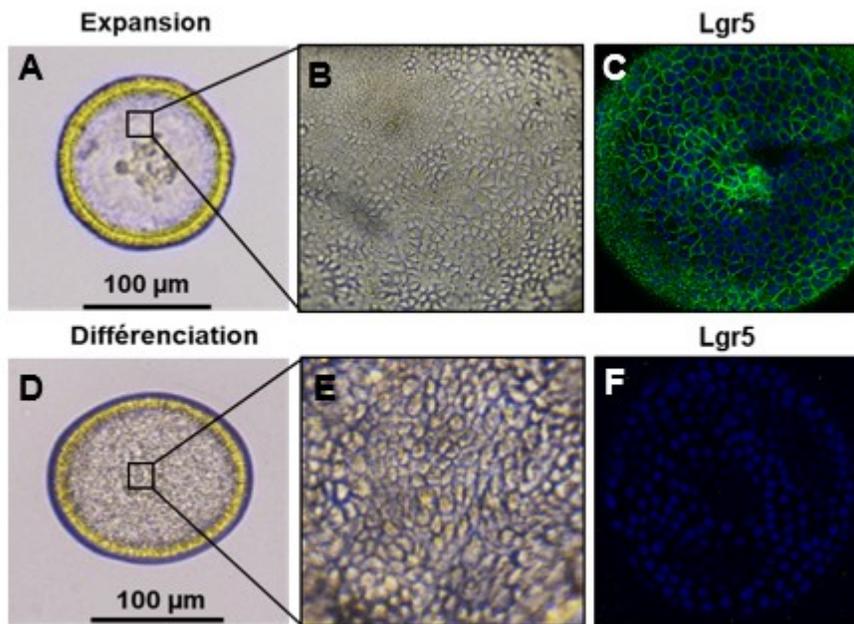


Figure 3. 10 Formation des organoïdes dans le milieu d'expansion (haut) et milieu de différenciation (bas) et marquage d'immunofluorescence de Lgr5. Les organoïdes hépatiques ont été cultivés et passés dans le milieu d'expansion Hépaticult (STEMcell Technologies) pendant 7 jours (A) ou dans du milieu d'expansion 2 jours suivie de 5 jours dans le milieu de différenciation (B). Un grossissement (B, E) permet d'observer les changements morphologiques se produisant au cours de la différenciation. Un marquage d'immunofluorescence de Lgr5 chez les organoïdes non différenciés (C) et différenciés (F).

Effet d'un traitement à l'estradiol (E₂)

Afin de déterminer si l'estradiol (E₂) joue un rôle dans la régulation de l'expression des connexines et de CHD1 au cours de la différenciation des organoïdes en hépatocytes, une dose (10, 100 ou 1000 nM) d'E₂ a été ajoutée au milieu de culture au cours de la différenciation. Le traitement est illustré par la **Figure 2.1** dans la section Matériels et méthodes. La concentration finale d'éthanol dans le milieu des groupes traités (10, 100 et 1000 nM) et du groupe contrôle pour le traitement (EtOH) était de 0.1%. Cette concentration d'EtOH n'a pas eu d'effet sur la croissance des organoïdes (**Figure 3.9**). La localisation des connexines et de CDH1 a été déterminée par immunofluorescence et les niveaux d'ARNm ont été déterminés par PCR en temps réel.

Immunofluorescence

Les résultats d'immunofluorescence ont démontré que la Cx26 est faiblement exprimée à la membrane des organoïdes non différenciés (**Figure 3.11A**). La différenciation a mené à la déstabilisation de la Cx26 dont le marquage est devenu cytoplasmique (**Figure 3.11B**). Aucune différence dans la localisation de la Cx26 n'a été observée suite à l'ajout de 0.1% d'éthanol au milieu de différenciation (**Figure 3.11C**). Une très faible relocalisation de la Cx26 à la membrane a été observée dans les groupes traités avec 10 nM d'E₂ (**Figure 3.11D**). Une induction importante de la Cx26 à la membrane a été observée pour les groupes traités avec 100 µM d'E₂ au cours de la différenciation (**Figure 3.11E**). De plus, une relocalisation de la Cx26 a également été observée dans le groupe traité avec 1000 nM d'E₂ (**Figure 3.11F**).

La localisation de la Cx32 a été observée par la présence de petits points fluorescents à la membrane des organoïdes différenciés (**Figure 3.12B**) contrairement aux organoïdes en prolifération où le marquage n'était pas présent (**Figure 3.12A**). Une concentration de 10 nM d'E₂ n'a pas affecté la localisation de la Cx32 (**Figure 3.12D**). Les concentrations de 100 et 1000 nM d'E₂ n'ont pas eu d'effet sur la localisation de la Cx32 (**Figure 3.12E et 3.12F**).

Tout comme la Cx32, la présence de petits points fluorescents, spécifiques au marquage de la Cx43, a été observés à la membrane des organoïdes en différenciation (**Figure 3.13B**) contrairement aux organoïdes en prolifération où le marquage n'était pas présent (**Figure 3.13A**). Le dose contrôle de 0.1% d'éthanol n'a pas eu d'effet sur la localisation de la Cx43 qui est demeurée membranaire (**Figure 3.13C**). La dose de 10 nM d'E₂ n'a pas affecté la localisation de la Cx43. Cependant, les doses de 100 nM et 1000 nM d'E₂ ont déstabilisé la Cx43 qui est devenue cytoplasmique que membranaire (**Figure 3.13E et 3.13F**).

Finalement, les résultats ont démontré que CDH1, une protéine de jonction adhérente, est exprimée de façon membranaire chez les organoïdes non différenciés (**Figure 3.14A**) et plus fortement à la membrane des organoïdes différenciés (**Figure 3.14B**). La dose de 0.1% d'éthanol n'a pas eu d'effet sur la localisation de CDH1 (**Figure 3.14C**). Les traitements à l'E₂ (10, 100 ou 1000 nM) n'ont également pas eu d'impact sur la localisation de CDH1 qui est demeurée membranaire (**Figure 3.14D**, **3.14E** et **3.14F**).

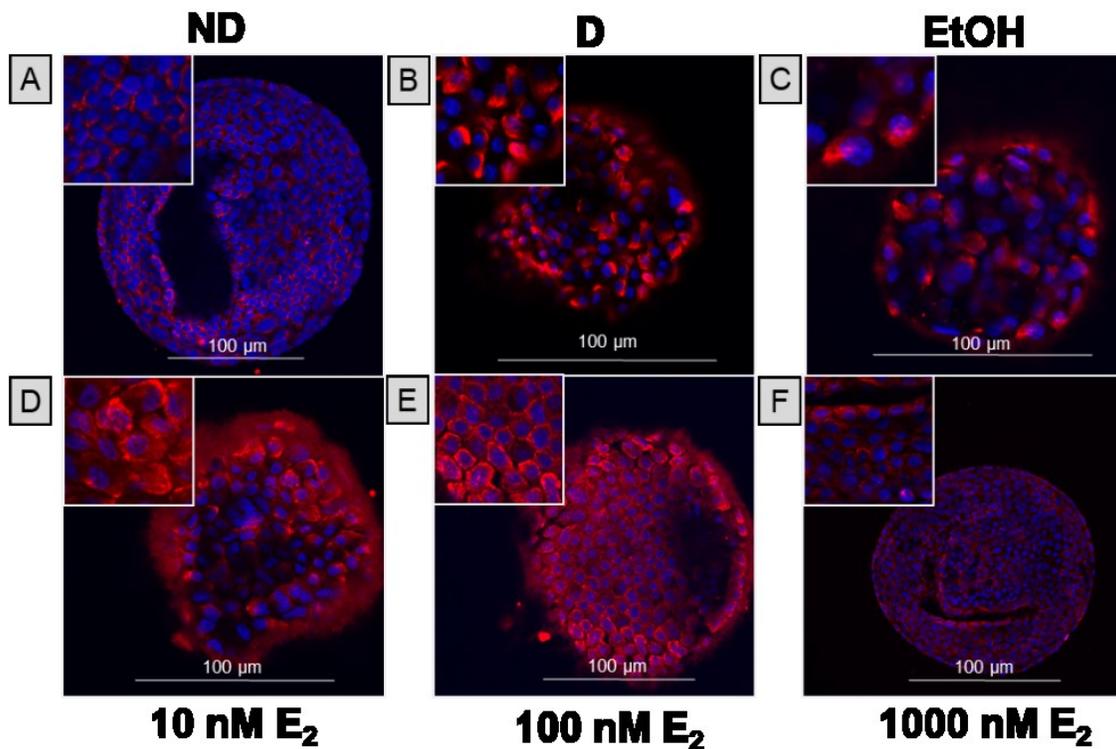


Figure 3. 11 Marquage d'immunofluorescence de la connexine 26 (Cx26) dans les organoïdes de foie. Cx26 (rouge) et noyau-Hoeschst (bleu). (A) Organoïdes non différenciés (ND) qui ont été cultivés 7 jours dans le milieu d'expansion Hépaticult (STEMCELL Technologies). (B) Organoïdes différenciés cultivés 2 jours dans le milieu d'expansion suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation. (C) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 0.1% d'éthanol (D) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 10 nM d'E₂. (E) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 100 nM d'E₂. (F) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 1000 nM d'E₂. (n=2)

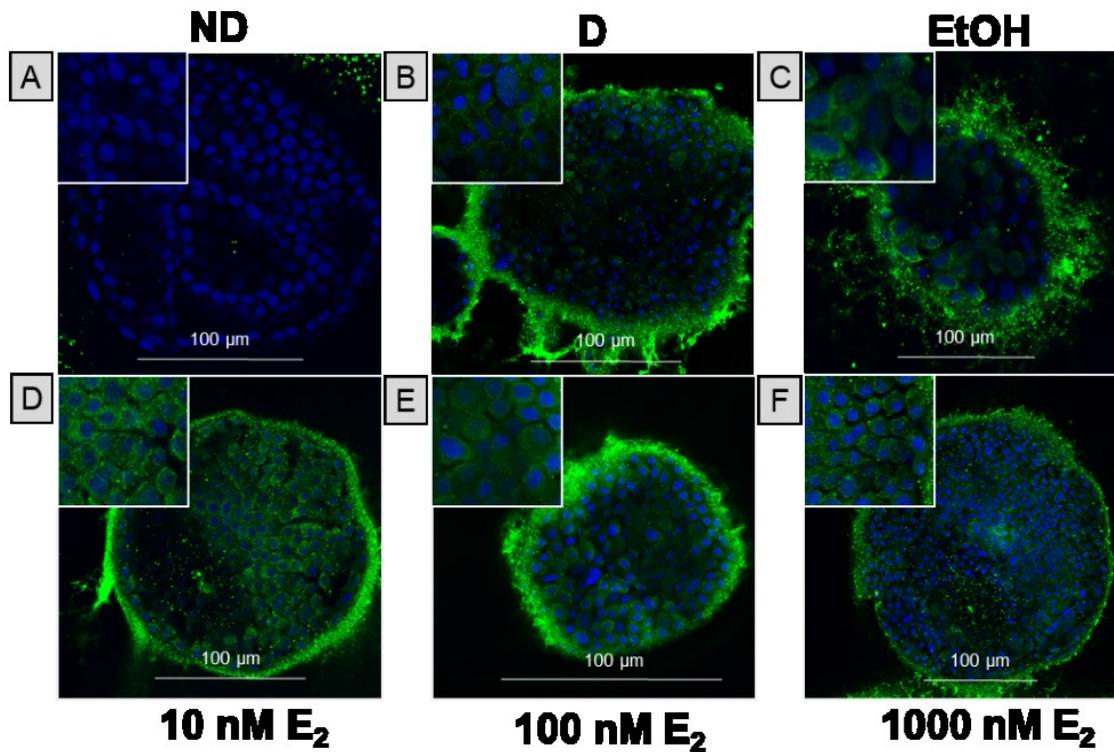


Figure 3. 12 Marquage d'immunofluorescence de la connexine 32 (Cx32) dans les organoïdes de foie. . Cx32 (vert) et noyau-Hoeschst (bleu). (A) Organoïdes non différenciés (ND) qui ont été cultivés 7 jours dans le milieu d'expansion Hépaticult (STEMCELL Technologies). (B) Organoïdes différenciés cultivés 2 jours dans le milieu d'expansion suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation. (C) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 0.1% d'éthanol (D) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 10 nM d'E₂. (E) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 100 nM d'E₂. (F) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 1000 nM d'E₂. (n=2)

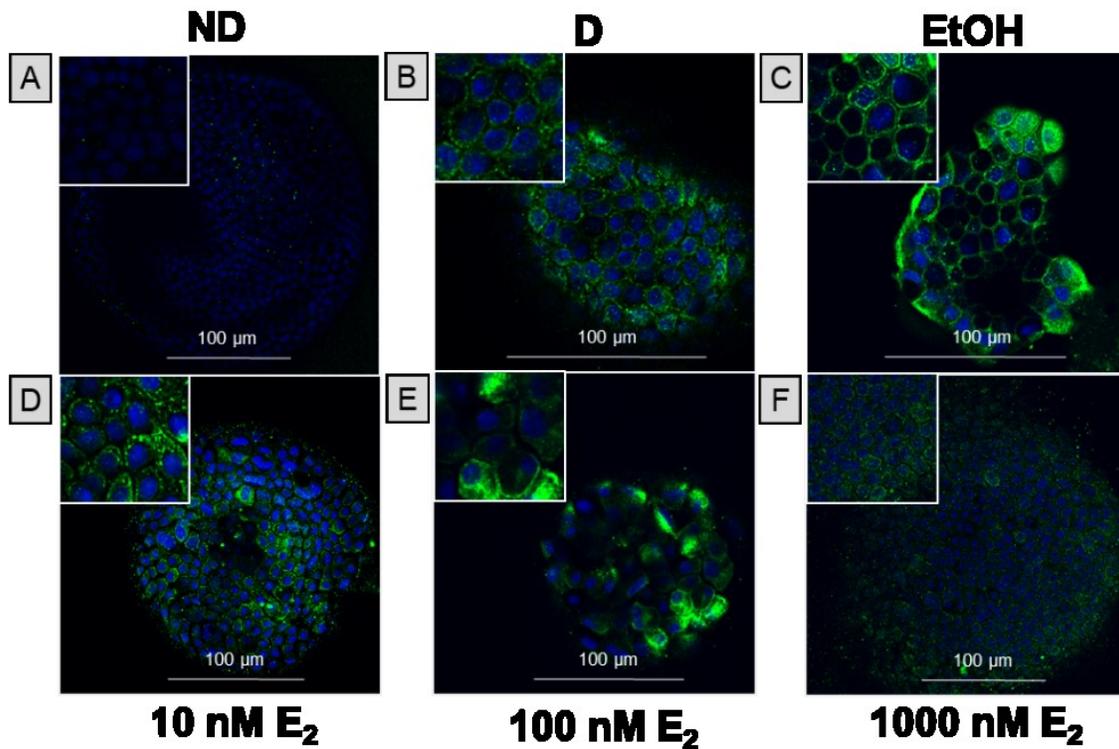


Figure 3. 13 Marquage d'immunofluorescence de la connexine 43 (Cx43) dans les organoïdes de foie. . Cx43 (vert) et noyau-Hoeschst (bleu). (A) Organoïdes non différenciés (ND) qui ont été cultivés 7 jours dans le milieu d'expansion Hépaticult (STEMCELL Technologies). (B) Organoïdes différenciés cultivés 2 jours dans le milieu d'expansion suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation. (C) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 0.1% d'éthanol (D) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 10 nM d'E₂. (E) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 100 nM d'E₂. (F) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 1000 nM d'E₂. (n=2)

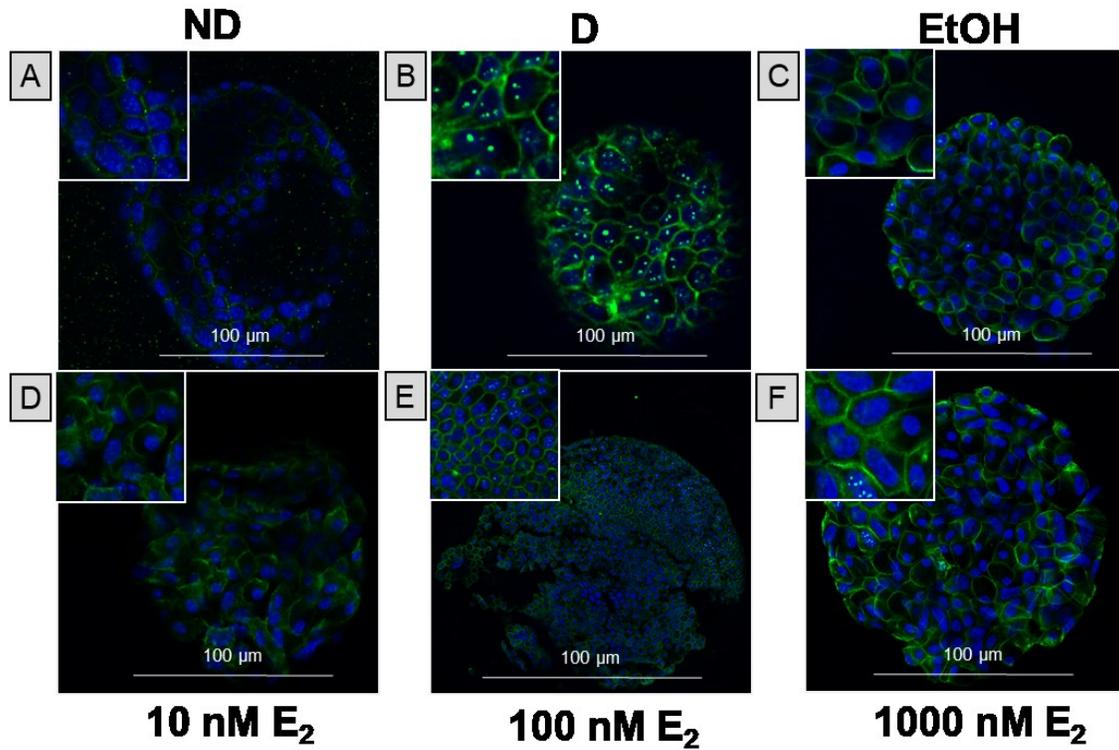


Figure 3. 14 Marquage d'immunofluorescence d'E-cadhérine (CDH1) dans les organoïdes de foie. . CDH1 (vert) et noyau-Hoeschst (bleu). (A) Organoïdes non différenciés (ND) qui ont été cultivés 7 jours dans le milieu d'expansion Hépaticult (STEMCELL Technologies). (B) Organoïdes différenciés cultivés 2 jours dans le milieu d'expansion suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation. (C) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 0.1% d'éthanol (D) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 10 nM d'E₂. (E) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 100 nM d'E₂. (F) Organoïdes différenciés dont le milieu de différenciation contenait 1000 nM d'E₂. (n=2)

PCR en temps réel

Les résultats démontrent que les niveaux d'ARNm de la Cx26 sont 4.0 fois plus élevés dans les organoïdes différenciés comparés aux non différenciés. La dose contrôle de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur l'expression de la Cx26. De plus, une augmentation proportionnelle à la dose d'E₂ a également été observée par rapport aux groupes contrôles de traitement (EtOH). Une tendance à l'augmentation de 1.3 fois a été observée pour une dose de 10 nM d'E₂. Une augmentation significative des niveaux d'ARNm de la Cx26 de 1.8 fois a été observée pour une dose de 100 nM et une augmentation significative de 2.6 fois a été observée pour une dose de 1000 nM (**Figure 3.15A**).

Une différence significative a été observée dans les niveaux d'ARNm de la Cx32 entre les organoïdes non différenciés (ND) et différenciés (D), soit une augmentation de 12.1 fois les niveaux de Cx32 chez les organoïdes différenciés. L'EtOH n'a pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la Cx32. Aucune différence significative n'a été observée dans les traitements à l'E₂ (**Figure 3.15B**).

Pour ce qui est de la Cx43, une diminution de 2.0 fois les niveaux d'ARNm a été observée chez les organoïdes dans un milieu de différenciation (D) comparés aux organoïdes dans un milieu de prolifération (ND). Une concentration de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la Cx43. Aucune différence significative n'a été observée dans les niveaux d'ARNm de la Cx43 dans les groupes traités avec différentes dose d'E₂ (**Figure 3.15C**).

Finalement, aucune différence significative dans les niveaux d'ARNm de CDH1 n'a été observée entre les organoïdes non différenciés et différenciés. Une concentration de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur l'expression de CDH1 si l'on compare aux organoïdes différenciés. Toutefois, il est intéressant de noter que les niveaux de CDH1 sont 1.7 fois plus élevés chez le groupe EtOH comparé au groupe non différencié. Finalement, aucune différence significative n'a été observée suite aux traitements à l'E₂ (**Figure 3.12D**).

En résumé, la différenciation induit l'expression de la Cx26, de la Cx32 et de CDH1 au détriment de l'expression de la Cx43 qui est, elle, exprimée majoritairement dans les organoïdes non différenciés. Finalement, l'exposition à une dose de 100 nM d'E₂ semble réguler positivement l'expression de la Cx26 et semble avoir un impact sur la localisation de la Cx32 et la Cx43.

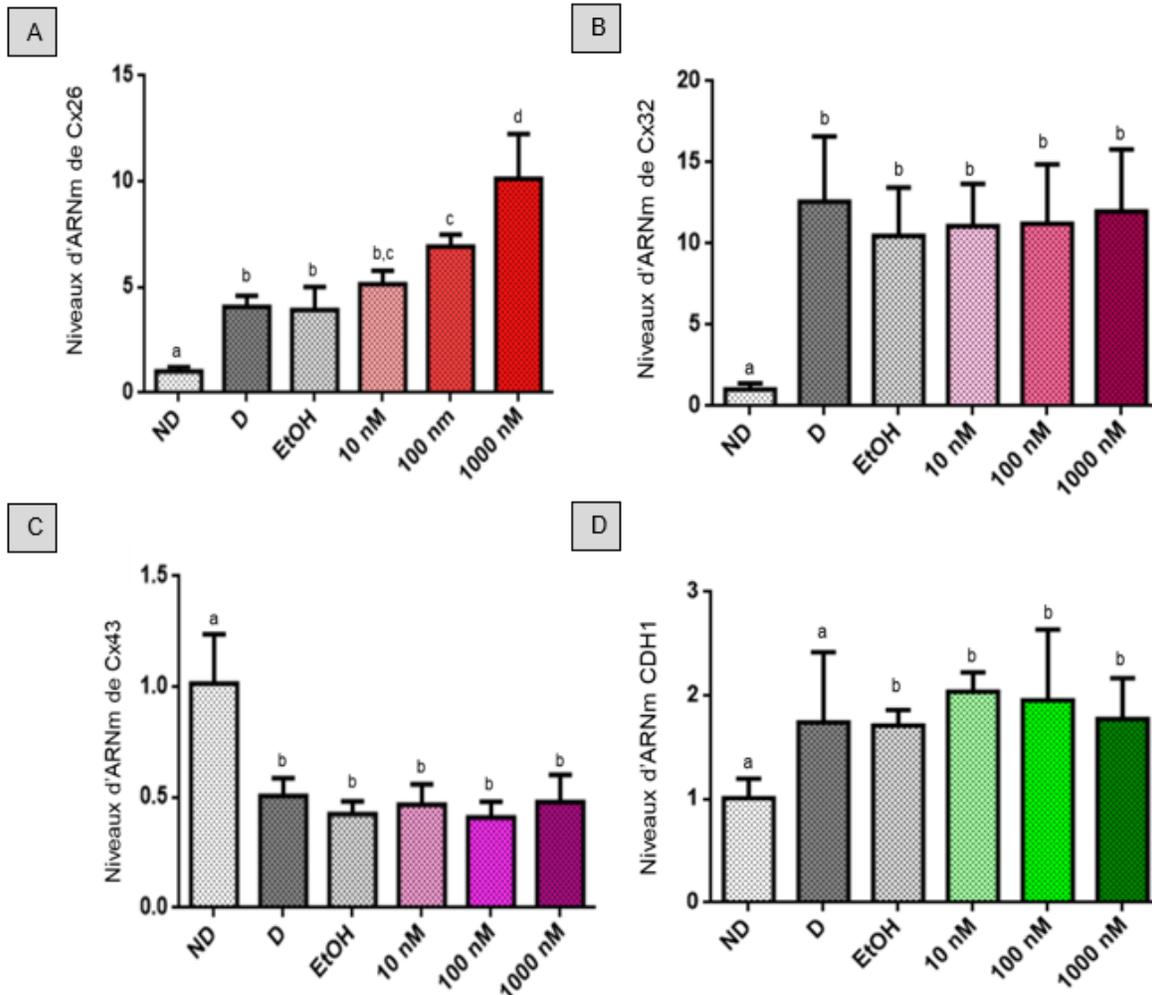


Figure 3. 15 Effets de l'estradiol (E₂) sur les niveaux d'ARNm de Cx26 (A), Cx32 (B), Cx43 (C) et de CDH1 (D) dans les organoïdes de foie. Les organoïdes non différenciés (ND) ont été maintenus 7 jours dans le milieu d'expansion. Les organoïdes différenciés (D) ont été maintenus 2 jours dans le milieu d'expansion suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation avec ou sans E₂. Les organoïdes ont été lysés et l'ARNm a été extrait avec un kit commercial. L'ARNm a ensuite été utilisé dans une analyse de PCR en temps réel avec des amorces spécifiques à chaque gène. Les niveaux d'expression de Cx26 (A), Cx32 (B), Cx43 (C) et de CDH1 (D) chez les organoïdes non différenciés (ND) ou différenciés (D) avec ou sans traitement à l'E₂ ont été déterminés par la méthode $\Delta\Delta C_t$. Les données ont été normalisées en utilisant le gène GAPDH. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0.05$). (n=3)

Effet d'un traitement à la testostérone

Afin de favoriser le développement d'hépatocyte à caractère mâle et d'évaluer si la testostérone joue un rôle dans la régulation des niveaux d'ARNm des connexines et de CDH1 au cours de la différenciation des organoïdes en hépatocytes, des doses (10, 100 ou 1000 nM) de testostérone ont été ajoutées au milieu de culture au cours de la différenciation. Le traitement est illustré par la **Figure 2.1** dans la section *Matériels et méthodes*. La concentration finale d'EtOH dans le milieu des groupes traités et du groupe témoins du traitement (EtOH) était de 0.1%.

Une tendance à l'augmentation de 2.8 fois ($p=0.068$) a été observée dans les niveaux d'ARNm de la Cx26 chez les organoïdes différenciés comparés aux non-différenciés. Une dose de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la Cx26. Les différentes doses de testostérone n'ont également pas eu d'effets significatifs sur les niveaux d'ARNm de la Cx26. Toutefois, une tendance à la diminution de 1.4 fois a été observée avec la dose de 100 nM.

Une augmentation significative de 7.2 fois dans les niveaux d'ARNm de la Cx32 a été observée chez les organoïdes différenciés comparés aux organoïdes non différenciés. Une dose de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la Cx32. Les différentes doses (10, 100 et 1000 nM) de testostérone n'ont pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la Cx32.

Une diminution significative de 2.3 fois a été observée dans les niveaux d'ARNm de la Cx43 chez les organoïdes différenciés comparés aux organoïdes non différenciés. Une dose de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de la Cx43. Les différentes doses (10, 100 et 1000 nM) de testostérone n'ont pas eu d'effets significatifs sur les niveaux d'ARNm de la Cx43. Toutefois, une tendance à l'augmentation de 1.5 fois a été observée chez les organoïdes avec 10 nM de testostérone dans leur milieu de différenciation.

Une tendance à l'augmentation de 2.1 fois a été observée dans les niveaux de CDH1 ($p=0.086$) chez les organoïdes différenciés comparés aux organoïdes non différenciés. Une dose de 0.1% d'EtOH n'a pas eu d'effet sur les niveaux d'ARNm de CDH1. Les niveaux de CDH1 n'ont également pas été affectés par les différentes doses (10, 100 et 1000 nM) de testostérone, mais les niveaux tendent à diminuer lorsque la concentration de testostérone augmente.

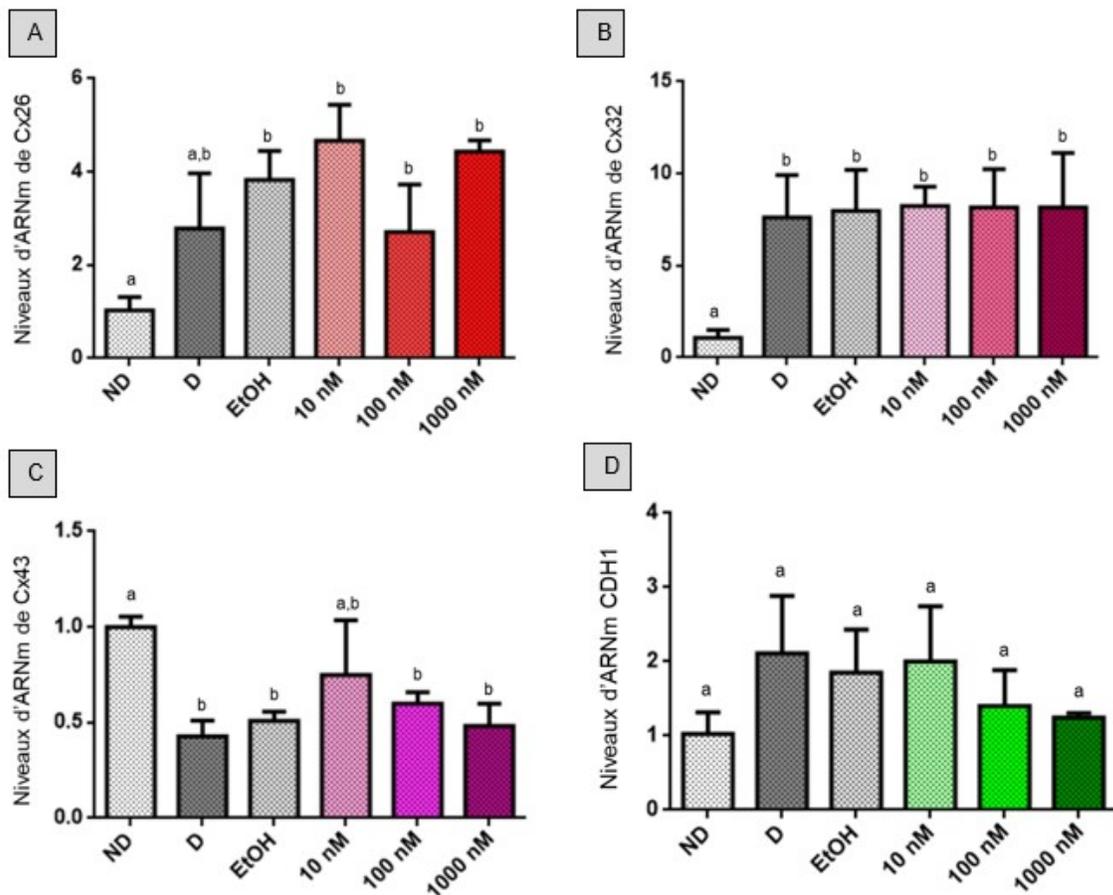


Figure 3. 16 Effet de la testostérone sur les niveaux d'ARNm de Cx26 (A), Cx32 (B), Cx43 (C) et de CDH1 (D) dans des organoïdes de foie. Les organoïdes non différenciés (ND) ont été maintenus 7 jours dans le milieu d'expansion. Les organoïdes différenciés (D) ont été maintenus 2 jours dans le milieu d'expansion suivi de 5 jours dans le milieu de différenciation avec ou sans testostérone. Les organoïdes ont été lysés et l'ARNm a été extrait avec un kit commercial. L'ARNm a ensuite été utilisé dans une analyse de PCR en temps réel avec des amorces spécifiques à chaque gène. Les niveaux d'expression de Cx26 (A), Cx32 (B), Cx43 (C) et de CDH1 (D) chez des organoïdes non différenciés (ND) ou différenciés (D) avec ou sans traitement à testostérone ont été déterminés par la méthode $\Delta\Delta Ct$. Les données ont été normalisées en utilisant le gène GAPDH. Les données sont exprimées en la moyenne \pm erreur standard. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0.05$). ($n=3$)

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Effets d'un traitement à l'hexachlorobenzène sur les jonctions communicantes et le métabolisme dans le foie des rats mâles et femelle (*in vivo*)

Afin de mieux comprendre la régulation des connexines et l'implication des hormones stéroïdiennes dans le développement d'un dimorphisme sexuel suivant un traitement à l'HCB, le premier objectif visait à identifier quels gènes étaient activés ou réprimés de façon différentielle entre les sexes. Ces données nous permettraient de mieux comprendre par quels mécanismes l'HCB rend les rats femelles plus sensibles au développement de tumeur.

Ainsi, des rats mâles et femelles ont reçu par gavage de l'huile de maïs (témoin) ou une solution d'HCB (100 mg/kg/jour) pendant 5 jours consécutifs suivis d'une période de latence de 45 jours avant d'être euthanasiés. Aucune variation dans le poids corporels des animaux n'a été observée avant, pendant et après le traitement. Toutefois, une différence majeure entre le poids corporels des mâles et des femelles a été observée. Ceci est attendue étant donné la régulation différentielle de l'hormone de croissance entre les sexes (Ahluwalia et al., 2004; Piao et al., 2013). De plus, une augmentation significative de l'indice hépatosomatique chez les femelles traitées à l'HCB par rapport aux rats femelles témoins et aux mâles a été observée. D'ailleurs, une exposition à des organochlorés ou autres polluants environnementaux, tel le 1,1 bis (p-chlorophényl) 2,2,2 trichloroéthane (DDT) provoquent une augmentation de l'index hépatosomatique (Ben Rhouma et al., 2000; Ohbayashi et al., 2007). De plus, dans les études sur la porphyrie causée par l'HCB on remarque également une augmentation dans le poids du foie (Gocmen et al. 1996; Hall et al., 2012).

Afin d'évaluer si l'HCB a bien activé les fonctions métaboliques du foie et afin de déterminer si l'augmentation du poids du foie pouvait être causé par une exposition à l'HCB, les niveaux d'ARNm d'une enzyme de détoxification de phase I, soit CYP1A1, ont été analysés. Les résultats qui ont été obtenus ont permis de démontrer que le foie a bel et bien été exposé à l'HCB étant donné que l'enzyme CYP1A1 est demeurée induite 45 jours suivant un traitement de 5 jours à 100 mg/kg/jour d'HCB. En effet, une augmentation dans l'induction des niveaux d'ARNm hépatiques de CYP1A1 a été observée autant chez les mâles que chez les femelles traités à l'HCB. Les résultats ont démontré que les niveaux d'ARNm hépatiques de CYP1A1 étaient 3 fois plus prononcés chez les femelles traitées à l'HCB avec des niveaux significativement plus élevés

que ceux des mâles traités à l'HCB, ce qui concorde parallèlement avec l'augmentation de l'index hépatosomatique qui était également significativement plus élevé chez les femelles traitées à l'HCB. De plus, les résultats concordent avec le fait que l'enzyme CYP1A1 est responsable du métabolisme de l'œstrogène et des hydrocarbures polycycliques aromatiques, tel que l'HCB. Des études ont démontré que l'HCB provoque l'induction enzymatique CYP1A1 et CYP1A2 chez les rats femelles traitées à l'HCB (Hahn et al., 1989; Ikegwonu et al., 1996). D'ailleurs, il a également été démontré que les niveaux d'ARNm et l'activité enzymatique des CYP1As sont fortement corrélés, ce qui nous permet de pouvoir comparer les résultats obtenues en ARNm avec des données en activités enzymatique obtenues dans d'autres études (Temesvari et al., 2012). Finalement, les dioxines ou les composés ressemblant à la dioxine, tel que l'HCB, ont la capacité de se lier aux récepteurs aux hydrocarbures aromatiques et ainsi d'induire l'activité des cytochromes CYP1A1 et CYP1A2 (Androutsopoulos et al., 2009; Mahiout et al., 2017).

Le rôle premier des enzymes du cytochrome P450 est de produire des métabolites qui seront plus facilement excrétés par l'organisme. Toutefois, dans certains cas, les enzymes P450 peuvent convertir le composé xénobiotique en composé plus actif et ainsi avoir des effets néfastes plutôt que bénéfiques (Almazroo et al., 2017). Il a été démontré que l'enzyme CYP1A1 a la capacité d'activer les propriétés carcinogènes de certains composés xénobiotiques (Androutsopoulos et al., 2009; Ma et Lu, 2007). Ainsi, les niveaux d'ARNm hépatiques de CYP1A1 significativement plus élevés observés chez les femelles traitées pourraient être la cause de la plus grande sensibilité des rats femelles à développer des tumeurs hépatiques suite à un traitement à l'HCB, en plus de concorder avec l'augmentation significative de l'indice hépatosomatique. En d'autres mots, dans le cas d'un traitement à l'HCB, on pourrait émettre hypothèse que CYP1A1 pourrait produire des métabolites actifs qui seraient produits en plus grande quantité chez les femelles que chez les mâles, ce qui les rendraient plus vulnérables aux développements de tumeurs hépatiques. Par exemple, il est connu que l'excrétion biliaire d'un des métabolites du HCB soit le pentachlorothiophénol est plus élevé chez les rats mâles que chez les rats femelles ce qui pourrait également expliquer la plus grande résistance des rats mâles à l'HCB (D'Amour et Charbonneau, 1992).

Aucune différence significative n'a été observée lors de l'analyse des niveaux d'ARNm d'UROD entre les mâles témoins et traités et entre les femelles témoins et traitées. Toutefois, on remarque qu'autant chez les mâles que les femelles, il y a une tendance à la diminution des niveaux d'UROD dans les groupes traités par rapport aux groupes témoins. De plus, une diminution significative dans les niveaux d'ARNm d'UROD a été observée entre les femelles

traitées à l'HCB et les mâles traités à l'HCB ce qui porte à croire que l'HCB a eu un impact plus prononcé chez les femelle étant donné que sans traitement à l'HCB les niveaux d'ARNm d'UROD chez les mâles et chez les femelles témoins ne sont pas significativement différents. Ainsi, nos résultats ne concordent pas tout à fait avec les études antérieures ayant rapporté le développement d'une porphyrie chez les rats femelles, 5 à 6 semaines suivant une exposition à l'HCB de 5 jours à 100 mg/kg/jour (Krishnan et al., 1991; Mylchreest et Charbonneau, 1997; Stonard et al., 1998). En effet, la porphyrie est souvent reliée à une inhibition complète de l'activité enzymatique d'UROD, une enzyme clé dans la voie de l'hème, suite à un traitement à l'HCB (Mylchreest et Charbonneau, 1997; Starek-Swiechowicz et al., 2017). Toutefois, nos analyses d'ARNm concordent avec les analyses des niveaux protéiques qui n'étaient pas affectés par un traitement à l'HCB dans l'étude de Mylchreest et Charbonneau (1997).

Par la suite, les niveaux d'ARNm de la Cx32 ont été observés dans le foie des animaux témoins et traités à l'HCB. Aucune différence significative dans les niveaux de Cx32 n'a été observée entre les groupes. Afin de confirmer les résultats obtenus, des analyses des niveaux protéiques et la localisation de la Cx32 ainsi qu'une analyse des niveaux protéiques de CDH1 ont été effectués chez les femelles témoins et traitées. Une bande à 28 kDa spécifique à la Cx32 et une bande à 110 kDa spécifique à CDH1 ont bel et bien été observées. Aucune différence significative dans les niveaux protéiques, ni dans la localisation de la Cx32 n'a été observée. Par contre, une augmentation significative des niveaux protéiques de CDH1 chez les femelles traitées à l'HCB a été observée par rapport aux niveaux des femelles témoins. Ces résultats concordent avec ce qu'il a été observé pour la Cx32, par PCR en temps réel. Toutefois, les données obtenues dans la présente étude ne concordent pas avec les résultats observés par (Plante et al. (2002) et Plante et al. (2006) où le même traitement à l'HCB de 5 jours à 100 mg/kg/jour a été effectué. En effet, dans ces études il y avait une diminution significative des niveaux protéiques de la Cx32 et CDH1 chez les groupes traités. Toutefois, nos données concordent avec une étude dans laquelle des rats Sprague Dawley ont été exposés à 100 mg/kg/jour d'HCB pendant 5 jours consécutifs. Les glandes mammaires ont été analysées 45 jours plus tard et ils ont observé une augmentation des niveaux de CDH1 et aucune régulation de la Cx43 par l'HCB, tel que nous l'avons observé dans le foie (Delisle et al., 2015). Les données ne concordent pas non plus avec la baisse des niveaux de CDH1 généralement observée suivant une induction de CYP1A1 et une exposition aux dioxines (Yun et al., 2018) ou les baisses de la Cx32 observées avec d'autres polluants (Chipman et al., 2003; Neveu et al., 1990).

Afin d'évaluer l'effet de l'HCB sur les niveaux d'ARNm de la Cx32 *in vitro*, des traitements à l'HCB de 5, 30 et 50 μM , sur une période de 7 jours, ont été effectués avec des cellules MH1C1. Dans notre étude, aucune différence significative au niveau de l'ARNm de la Cx32 n'a été observée. En effet, les niveaux de Cx32 avaient une tendance à la hausse contrairement à ce qui était attendu, soit une diminution significative des niveaux d'ARNm de la Cx32 chez les cellules traitées (Plante et al., 2005). Toutefois, il est à noter que l'HCB semblait sortir de solution pendant les traitements avec les doses de 30 et 50 μM , car on observait la présence de cristaux dans le milieu de culture. Ces cristaux n'étaient pas visibles dans les puits traités avec 5 μM d'HCB. Néanmoins, ces résultats ont permis de confirmer les résultats obtenus *in vivo* dans mon étude et ainsi permet de confirmer que la formulation du HCB, de nos jours, n'affecte pas les niveaux de la Cx32.

Ainsi, tous ces résultats portent à croire que certaines variables peuvent avoir changé depuis les expériences réalisées précédemment dans notre laboratoire. Des problèmes de solubilité ont été rencontrés et nous laissent croire que la composition et la qualité du HCB ont changé depuis le temps, ce qui pourrait être la cause des différences observées. De plus, l'HCB utilisé auparavant ne provenait pas de la même compagnie que celui utilisé dans nos expériences, car celui-ci n'était plus disponible. En comparant la courbe de poids attendue pour les rats Sprague Dawley à environ PND102 de Charles River, on remarque que les poids des rats qui ont été obtenus à la fin de l'expérience sont supérieurs à ceux attendus tant chez les mâles que chez les femelles ce qui nous laisse croire qu'il y a eu un changement dans la nourriture donnée aux rats, une réduction de l'activité physique ou bien une différence dans les rats en tant que tel. Finalement, une autre hypothèse serait que l'HCB utilisé auparavant contenait des traces non détectables de contaminants ressemblant à la dioxine (Mundy, 2011) qui pourraient être responsables des effets ayant été observés auparavant et qui ne seraient pas observés dans le HCB de grade analytique qui a été utilisé dans les expériences.

Caractérisation des niveaux protéiques des différentes connexines dans le foie au cours du développement

Notre hypothèse était qu'il y avait des différences entre les mâles et les femelles dans les niveaux des connexines avant même le traitement à l'HCB et ce sont ces différences qui seraient impliquées dans la plus grande susceptibilité des rats femelles à développer des tumeurs hépatiques. Ainsi, notre deuxième objectif était de démystifier la régulation des connexines au cours du développement afin de déterminer à quel âge s'établissait la différence entre les mâles et les femelles en ce qui a trait aux niveaux hépatiques de connexines dans le foie.

Les connexines 26, 32 et 43 ont toutes été détectées dans le foie des mâles et des femelles à leur poids moléculaire respectif soit 26 kDa, 28 kDa et 43 kDa. Une augmentation significative des niveaux d'ARNm hépatiques de la Cx26 a été observée entre PND14 et PND21 et ce uniquement chez les femelles. Parallèlement, il est intéressant de noter qu'il y a une augmentation dans la concentration plasmatique d'estradiol jusqu'à PND20 chez les rats femelles suivie d'une baisse dramatique jusqu'à l'âge adulte (Herath et al., 2001). Cette régulation par l'estradiol pourrait donc expliquer le pic observé exclusivement chez les femelles ainsi que la diminution dramatique des niveaux de Cx26 avec l'âge. De plus, il a également été observé que les niveaux de Cx26 diminuaient drastiquement avec l'âge dans l'épididyme (Dufresne et al., 2003). Dans notre étude, il a été observé que les niveaux protéiques de la Cx32 diminuaient également avec l'âge et les niveaux maximums ont aussi été observés à PND21. La diminution des niveaux des connexines avec l'âge concorde avec la baisse de la communication cellulaire dans le foie reportée par Naiki-Ito et al. (2012). Il a également été démontré que les niveaux de Cx32 hépatiques plafonnent à PND21 et c'est également ce que nous avons observés (Vinken et al., 2012). Dans la présente étude, les niveaux hépatiques de la Cx43 n'ont pas variés significativement au cours du développement chez les mâles. Ces résultats sont étonnant considérant que la Cx43 est régulée par les androgènes dans l'épididyme (Cyr, 2011) et la prostate. Chez la femelle, une diminution significative des niveaux protéiques de la Cx43, entre PND14 et PND21, a été observée. Encore une fois, on se serait attendu à une plus grande variation étant donné les nombreuses études démontrant la régulation de la Cx43 par les œstrogènes dans plusieurs tissus (Firestone et Kapadia, 2012; Ren et al., 2013). On sait que plusieurs hormones telles que les glucocorticoïdes régulent les récepteurs aux œstrogènes ainsi que les connexines au niveau du foie et pourraient donc avoir un impact sur les niveaux protéiques observés. Ainsi, il est fort probable que d'autres hormones viennent balancer les effets des androgènes et/ou des œstrogènes ce qui expliquerait pourquoi il y a peu ou pas de variation de la Cx43 dans le foie des rats au cours du développement (Freyschuss et al., 1994; Ren et al., 1994; Siddiqui et al., 1999).

Tel que montré dans la section résultats, nous n'avons pas obtenu de différence significative entre les mâles et les femelles dans les niveaux protéiques de la Cx26 au cours du développement. Ainsi, nous ne pouvons pas affirmer que la plus grande susceptibilité des femelles à l'HCB est due à une plus faible expression de la Cx26 avant le traitement. De plus, ces résultats ne concordent pas avec ce qui a été observé par Plante et al. (2002). Toutefois, nous avons observé un dimorphisme sexuel pour la Cx32 à PND42 ainsi que pour la Cx43 à PND21 et à PND42. Dans les deux cas, les femelles avaient des niveaux significativement plus faibles que

les mâles. Les différences spécifiques au sexe observées pour la Cx32 et la Cx43 pourraient être expliquées par les variations hormonales au cours de ces périodes. De plus, il existe également un dimorphisme sexuel au niveau de la Cx43 dans les cardiomyocytes où les femelles ont des niveaux plus élevés de la Cx43 comparés aux mâles (Stauffer et al., 2011) On peut également émettre l'hypothèse que les rats utilisés dans les études précédentes (Plante et al., 2002) étaient plus jeunes que ceux qui ont été utilisés dans notre expérience.

Ces différences pourraient également expliquer la plus grande susceptibilité des rats femelles au développement de tumeur hépatique suivant un traitement à l'HCB (Plante et al., 2002). Toutefois, il aurait été intéressant de prêter une attention plus particulière au cycle œstral chez le rat femelle. Il a été rapporté que les niveaux de Cx26 et Cx32 sont faibles dans la phase de prolifération, augmentent pendant l'ovulation et la phase sécrétoire et diminuent dans la phase tardive dans l'endomètre (Firestone et Kapadia, 2012; Saito et al., 1997). Ces données auraient permis de savoir approximativement les niveaux hormones stéroïdiennes auxquels les foies étaient exposés et pourraient potentiellement affecter la régulation des connexines (Nilsson et al., 2015).

Prolifération et différenciation d'organoïdes issus de cellules souches du foie

Le troisième objectif avait pour but d'évaluer les effets des hormones stéroïdiennes (estradiol et testostérone) sur la localisation et la régulation des connexines du foie (Cx26, Cx32 et Cx43) et d'E-cadhérine. Pour ce faire, un nouveau modèle expérimental, plus représentatif d'un foie *in vivo* que d'autres modèles *in vitro*, a été utilisé. Le nouveau modèle utilisé consiste à l'utilisation d'organoïdes hépatiques. Les résultats de notre étude ont permis de démontrer que les organoïdes hépatiques pouvaient être maintenus sur de nombreux passages. De plus, les résultats ont démontré que les organoïdes cultivés dans le milieu de différenciation avaient des tailles inférieures aux organoïdes cultivés dans le milieu d'expansion. Ces données concordent avec ce qui est attendu dans la littérature, car le milieu de différenciation proposé par Broutier et al. (2017) inhibe la voie de signalisation Wnt qui est impliquée dans la prolifération cellulaire. De plus, il a été démontré que les organoïdes de foie maintiennent leur intégrité génomique à long terme (Huch et al., 2013a).

Nous avons également démontré que les organoïdes cultivés dans le milieu d'expansion exprimaient fortement le marqueur Lgr5 à la membrane cellulaire tandis que les organoïdes dans le milieu de différenciation avaient des niveaux indétectables de Lgr5. Les résultats que nous avons obtenus concordent avec ceux de la littérature (Cao et al., 2017; Huch et al., 2013b; Huch et al.,

2015). En effet, la voie de signalisation Wnt est également impliquée dans la régulation des cellules souches (Robert, 2010). Le marqueur Lgr5 est d'ailleurs souvent utilisé afin de marquer les cellules souches en division qui sont régulées par la voie de signalisation Wnt (Huch et al., 2013b). Il est à noter que Lgr5 n'est pas exprimé en temps normal dans le foie adulte. Toutefois, en cas de dommage au foie, les cellules progénitrices, positives pour Lgr5, sont activées afin de contribuer à la régénération cellulaire (Huch et al., 2013a; Khan et al., 2017).

Par la suite, il a été démontré que les protéines des jonctions lacunaires Cx26, Cx32, Cx43 et une protéine de jonctions adhérentes CDH1 étaient toutes présentes de façon membranaire chez les organoïdes hépatiques. Ces données concordent avec ce qui est attendu selon la littérature. En effet, ce modèle de culture cellulaire en 3D favorise la formation des jonctions lacunaires contrairement aux les lignées cellulaires qui ne sont pas capable de former toutes les jonctions lacunaires et parfois seul un type de connexine est exprimé (Chipman et al., 2003). De plus, il a été démontré que les fonctions métaboliques du foie ne sont pas similaires aux fonctions *in vivo* dans la culture 2D de cellules du foie (Soto-Gutierrez et al., 2010).

Les analyses de PCR en temps réel ont permis de constater qu'il y avait des variations dans les niveaux d'ARNm entre les organoïdes cultivés dans du milieu d'expansion (organoïdes non différenciés) et ceux cultivés dans du milieu de différenciation (organoïdes différenciés). En effet, les niveaux d'ARNm chez les organoïdes non différenciés étaient plus élevés pour la Cx43 et plus faibles pour la Cx26, la Cx32 et de CDH1. Ces résultats démontrent pour la première fois l'expression des connexines dans les organoïdes de foie non différenciés et différenciés. De plus, les résultats concordent avec ce qui est attendu selon la littérature. D'abord, le milieu d'expansion contient des signaux de prolifération dont que l'induction de Wnt qui stimule la division et la croissance cellulaire. Le gène Cx43 est d'ailleurs une cible de Wnt, contrairement à la Cx32 et la Cx26, ce qui permet d'expliquer sa plus forte expression dans les organoïdes non différenciés (Oyamada et al., 2005). De plus, il a été démontré qu'au cours de la différenciation en hépatocyte, les niveaux de Cx43 diminuent afin de laisser place à la Cx26 et à la Cx32 (Ding et al., 2016; Maes et al., 2014).

Par la suite, les effets de l'E₂ sur la différenciation des organoïdes vers des cellules ressemblant aux hépatocytes ont été observés. Les résultats d'immunofluorescence ont démontré qu'une dose de 100 nM d'E₂ amène la localisation de la Cx26 à la membrane plutôt que dans le cytoplasme. Les résultats ont aussi démontré que la Cx26 est régulée de façon dose-dépendante par l'E₂. Ces données concordent en partie avec les études réalisées par Plante et al. (2002) où ils ont démontré que les rats femelles avaient des niveaux d'ARNm hépatiques plus élevés de

Cx26 que les mâles et où l'ovariectomie des rats femelles causait la diminution des niveaux hépatiques de Cx26. De plus, l'induction des niveaux d'ARNm de la Cx26 a été observée chez les rats ovariectomisés ayant reçu une dose d'E₂ (Kojima et al., 1994; Plante et al., 2002). D'ailleurs, dans les tissus reproducteurs, tel que l'endomètre, il a été rapporté que les niveaux d'ARNm et les niveaux protéiques de Cx26 augmentaient avec l'estrogène (Firestone et Kapadia, 2012). La progestérone semble aussi augmenter les niveaux protéiques de la Cx26 dans l'endomètre (Firestone et Kapadia, 2012; Grummer et al., 1994). Finalement, les résultats obtenus *in vitro* démontrent pour la première fois la régulation de la Cx26 par l'E₂ dans les organoïdes hépatiques. Pour ce qui est du traitement à la testostérone, les résultats de cette étude ont démontré que la testostérone n'induisait aucune différence significative dans les niveaux d'ARNm de la Cx26. Toutefois, il y a une tendance à la diminution des niveaux d'ARNm hépatique de la Cx26 qui a été observée avec une dose de 100 nM. La régulation de la Cx26 par la testostérone ou la dihydrotestostérone (DHT) n'a pas été rapportée dans le foie. Il a été démontré que les androgènes sont responsables de l'inhibition des jonctions lacunaires dans des lignées cellulaires humaines de carcinomes de la vessie tandis qu'ils sont responsables de l'augmentation des jonctions lacunaires au cours du développement dans l'hypophyse des rats mâles (Firestone and Kapadia, 2012). Des études ont démontré que les androgènes inhibaient l'expression de la Cx26 dans l'épididyme (Adam, 2017). En effet, une orchidectomie provoquait une augmentation dans les niveaux de Cx26, tandis qu'un traitement à la testostérone diminuait les niveaux de Cx26 au niveau de l'épididyme (Adam, 2017). Cette régulation à la baisse pourrait donc expliquer la tendance à la diminution des niveaux hépatiques de la Cx26 avec un traitement de 100 nM de testostérone.

Pour ce qui est de la Cx32, aucune variation significative n'a été observée suite au traitement à l'E₂ ou à la testostérone. Toutefois, il a été démontré qu'une ovariectomie chez le rat cause une augmentation significative des niveaux hépatiques de la Cx32 (Plante et al., 2002). Il est connu que, dans la prostate, les niveaux de Cx32 sont affectés à la baisse par l'augmentation d'une exposition à l'E₂ (Habermann et al., 2001). Ces études porteraient donc à croire que la Cx32 serait régulée négativement par une hormone produite par les ovaires, telle que l'E₂ ce qui ne correspond pas avec ce qu'il a été observé dans la présente étude. Toutefois, il a été démontré que les niveaux protéiques de la Cx32 étaient régulés à la hausse par l'estrogène et à la baisse par la progestérone dans l'endomètre (Grummer et al., 1994) ce qui démontre que son expression est régulée différemment selon le tissu qu'elle occupe. Les niveaux d'ARNm et les niveaux protéiques de Cx32 au niveau de la prostate ne sont pas affectés par la castration ou par une administration de testostérone ou de DHT (Huynh et al., 2001). Toutefois, il a été démontré que

la Cx32 est régulée à la hausse par les androgènes dans l'épididyme (Adam, 2017). Dans cette étude les niveaux de Cx32 sont diminués dans l'épididyme suite à une orchidectomie et les niveaux sont rétablit avec un traitement à la testostérone (Adam, 2017). Aucune autre étude ne témoigne de la régulation de la Cx32 par les androgènes dans le foie, ainsi il est fort probable que les androgènes n'agissent pas sur sa régulation dans le foie (Adam, 2017).

Les niveaux d'ARNm de la Cx43 ne sont pas non plus régulés par l'E₂ ni la testostérone dans les organoïdes de foie de mon étude. Toutefois, il semble y avoir une tendance à l'augmentation des niveaux de Cx43 avec une dose de 10 nM de testostérone. Les résultats obtenus ne concordent pas tout à fait avec ce qui était attendu. En effet, plusieurs études rapportent l'augmentation des niveaux d'ARNm et des niveaux protéiques de la Cx43 par l'estrogène dans certains tissus reproducteurs, incluant le myomètre, ainsi que dans le cerveau et les tissus cardiaques (Firestone et Kapadia, 2012; Oyamada et al., 2005). Les niveaux de la Cx43 sont augmentés par la présence d'estrogène et diminués par la présence de progestérone (Oyamada et al., 2005; Petrocelli and Lye, 1993). Pour ce qui est des androgènes, il a été démontré que dans les ovaires, un traitement à la testostérone produit une baisse significative des niveaux de la Cx43 (Yang et al., 2015). Dans le même ordre d'idée, il a également été démontré que les niveaux d'ARNm et les niveaux protéiques de la Cx43 dans la prostate sont régulés à la baisse par une augmentation de la concentration de testostérone ou de DHT (Huynh et al., 2001). À l'inverse, il a été démontré que les niveaux protéiques de la Cx43 augmentent de façon dose dépendante aux androgènes dans le testicule et dans l'épididyme (Cyr et al., 1996; Firestone et Kapadia, 2012). Cette régulation pourrait concorder avec l'augmentation des niveaux hépatiques de Cx43 qui a été observée avec une dose de 10 nM. Ainsi, ces résultats portent à croire que de faibles niveaux de testostérone pourraient participer à la régulation des niveaux de la Cx43 dans le foie.

Finalement, les résultats ont également démontré qu'E-cadhérine n'était pas affectée par un traitement à l'E₂ ou à la testostérone. Toutefois, il a été observé qu'E-cadhérine tend à diminuer de façon dose-dépendante à la concentration de testostérone. Ces résultats sont étonnants étant donné que les niveaux d'E-cadhérine sont régulés à la baisse par l'estrogène dans les cellules de la glande mammaire, des ovaires et de l'endomètre (Cardamone et al., 2009; Oesterreich et al., 2003). Toutefois, aucunes études ne rapportent une régulation d'E-cadhérine par l'E₂ dans le foie. Pour la testostérone, les effets observés concordent avec les résultats attendus. En effet, des études ont démontré que l'activation du récepteur aux androgènes par la DHT permet sa liaison avec le promoteur d'E-cadhérine ce qui mène à la dérégulation des niveaux d'E-cadhérine dans

le foie et la prostate (Liu et al., 2008; Nightingale et al., 2003). Ainsi, les résultats portent à croire qu'E-cadhérine serait en partie régulée par la testostérone dans les cellules du foie.

CONCLUSION

On sait que les femmes sont environ 1.5 à 1.7 fois plus à risque de subir les effets indésirables des médicaments que les hommes, possiblement due aux nombreuses variations hormonales (menstruations, grossesse, contraceptif oraux, ménopause etc.) au cours de leur vie (Amacher, 2014). Les femmes ont souvent été exclues de tests cliniques dus à ces variations et on commence à se rendre compte que les femmes et les hommes devraient être analysés différemment lors des tests pour de nouvelles drogues. Outre les hormones, les femmes ont généralement un plus haut pourcentage de gras. Dans le cas de l'HCB, qui s'accumule dans les graisses, ceci pourrait être la cause d'une plus grande exposition chez les rats femelles, ce qui pourrait expliquer les effets observés. Les connexines sont essentielles au maintien de la communication cellulaire par les jonctions lacunaires, qui elles-mêmes sont essentielles au maintien de l'homéostasie des tissus. Ainsi, mieux comprendre pourquoi et comment se fait leur régulation de façon spécifique au sexe serait un atout dans le développement de futures drogues. Nos études ont démontré qu'il y avait des différences entre les mâles et les femelles dans l'induction de l'enzyme CYP1A1 suite à un traitement à l'HCB. Nous avons également démontré pour la première fois qu'il y avait un dimorphisme sexuel au niveau hépatique de la Cx32 et la Cx43 à PND42 chez les rats. Nos études ont également permis de démontrer pour la première fois la régulation des connexines dans les organoïdes de foie. Les organoïdes différenciés répondent à l'E₂ de façon similaire aux animaux *in vivo* avec une augmentation significative des niveaux de la Cx26 de façon dose dépendante à l'E₂. Pour des études futures, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la progestérone sur la régulation des connexines au niveau du foie étant donné qu'elle régule les connexines dans d'autres tissus. D'ailleurs, une étude a démontré les effets de la progestérone sur la toxicité induite par le benzène chez les rats (Verma and Rana, 2008). Dans cette étude, la progestérone a un impact sur les mécanismes de détoxification de la molécule de benzène dans le foie des rats femelles. De plus, l'HCB, contient une molécule de benzène et une étude a démontré qu'il y avait une augmentation de la concentration de progestérone dans les sérums d'animaux exposés à l'HCB (Foster et al., 1992a; Foster et al., 1992b). Pour finir, la culture d'organoïdes est une technique innovatrice et la mise au point de la différenciation des organoïdes en hépatocytes à caractère mâle et femelle serait un atout pour le dépistage de nouvelles drogues. Ceci pourrait aussi permettre de mieux comprendre les mécanismes régulant le métabolisme et la communication cellulaire dans le foie en plus de réduire l'utilisation des animaux en laboratoire.

RÉFÉRENCES

1. Aaron M. Zorn (2009). Liver development. In StemBook, A.F. Schier, ed. (Ohio, USA).
2. Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C.C., Lampe, P.D., and Laird, D.W. (2017). Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nature reviews Cancer* 17, 74.
3. Adam, C. (2017). Régulation de l'expression des connexines dans la différenciation de l'épithélium épидидymaire. In *Biologie* (Laval: INRS-Institut Armand Frappier).
4. Ahluwalia, A., Clodfelter, K.H., and Waxman, D.J. (2004). Sexual dimorphism of rat liver gene expression: regulatory role of growth hormone revealed by deoxyribonucleic Acid microarray analysis. *Mol Endocrinol* 18, 747-760.
5. Alberts B, J.A., Lewis J (2002). *Molecular Biologie of the Cell*, 4th edn (New York: Garland Science).
6. Almazroo, O.A., Miah, M.K., and Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in liver disease* 21, 1-20.
7. Amacher, D.E. (2014). Female gender as a susceptibility factor for drug-induced liver injury. *Human & experimental toxicology* 33, 928-939.
8. Androutopoulos, V.P., Tsatsakis, A.M., and Spandidos, D.A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* 9, 187.
9. ATSDR (2015). Toxicological profile for hexachlorobenzene, U.S.D.o.H.a.H. Services, ed. (Atlanta, Georgia).
10. Au, S.H., Chamberlain, M.D., Mahesh, S., Sefton, M.V., and Wheeler, A.R. (2014). Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab on a chip* 14, 3290-3299.
11. Aykan, N.F. (2012). Intercellular Communication. In *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*, S. Najman, ed. (InTech).
12. Barcellos-Hoff MH, J.A., TG Ram and MJ Bissell (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105, 223-235.
13. Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., *et al.* (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell stem cell* 6, 25-36.
14. Batissoco, A.C., Salazar-Silva, R., Oiticica, J., Bento, R.F., Mingroni-Netto, R.C., and Haddad, L.A. (2018). A Cell Junctional Protein Network Associated with Connexin-26. *International journal of molecular sciences* 19.
15. Ben Rhouma, K., Tebourbi, O., and Sakly, M. (2000). Acute hepatotoxicity of DDT: effect on glucocorticoid receptors and serum transcortin. *Indian J Exp Biol* 38, 452-456.
16. Berthoud, V.M., Iwanij, V., Garcia, A.M., and Saez, J.C. (1992). Connexins and glucagon receptors during development of rat hepatic acinus. *The American journal of physiology* 263, G650-658.
17. Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a003129.
18. Beyer, W.N. (1996). Accumulation of chlorinated benzenes in earthworms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 57, 729-736.

19. Biehl, J.K., and Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing* 24, 98-103; quiz 104-105.
20. Boretto, M., Cox, B., Noben, M., Hendriks, N., Fassbender, A., Roose, H., Amant, F., Timmerman, D., Tomassetti, C., Vanhie, A., *et al.* (2017). Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development* 144, 1775-1786.
21. Bradbury, N.A. (2017). All Cells Have a Sex : Studies of Sex Chromosome Function at the Cellular level In *Principles of Gender-Specific Medicine* M.J. Legato, ed. (Academic Pres), pp. 269-290.
22. Breyse, P.N. (2015). Toxicological profile for hexachlorobenzene, U.S.D.o.h.a.h. services, ed.
23. Broutier, L., Andersson-Rolf, A., Hindley, C.J., Boj, S.F., Clevers, H., Koo, B.K., and Huch, M. (2016). Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature protocols* 11, 1724-1743.
24. Broutier, L., Mastrogianni, G., Verstegen, M.M., Francies, H.E., Gavarro, L.M., Bradshaw, C.R., Allen, G.E., Arnes-Benito, R., Sidorova, O., Gaspersz, M.P., *et al.* (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature medicine* 23, 1424-1435.
25. Calderon-Gierszal, E.L., and Prins, G.S. (2015). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Prostate Organoids In Vitro and its Perturbation by Low-Dose Bisphenol A Exposure. *PLoS One* 10, e0133238.
26. Gouvernement du Canada. (1993a). Hexachlorobenzène (Ottawa, Canada: Ministre des Approvisionnements et Service Canada).
27. Gouvernement du Canada . (1993b). Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste de substances d'intérêt prioritaire : rapport de l'évaluation, S.e.B.-ê.s. Canada, ed. (Ottawa, Canada).
28. Cao, W., Chen, K., Bolkestein, M., Yin, Y., Verstegen, M.M.A., Bijvelds, M.J.C., Wang, W., Tuysuz, N., Ten Berge, D., Sprengers, D., *et al.* (2017). Dynamics of Proliferative and Quiescent Stem Cells in Liver Homeostasis and Injury. *Gastroenterology* 153, 1133-1147.
29. Cardamone, M.D., Bardella, C., Gutierrez, A., Di Croce, L., Rosenfeld, M.G., Di Renzo, M.F., and De Bortoli, M. (2009). ERalpha as ligand-independent activator of CDH-1 regulates determination and maintenance of epithelial morphology in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7420-7425.
30. Chipman, J.K., Mally, A., and Edwards, G.O. (2003). Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *Toxicol Sci* 71, 146-153.
31. Chitrangi, S., Nair, P., and Khanna, A. (2017). 3D engineered In vitro hepatospheroids for studying drug toxicity and metabolism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 38, 8-18.
32. Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165, 1586-1597.
33. Cummins, P.M. (2012). Occludin: one protein, many forms. *Molecular and cellular biology* 32, 242-250.
34. Cyr, D.G. (2011). Connexins and pannexins: Coordinating cellular communication in the testis and epididymis. *Spermatogenesis* 1, 325-338.

35. Cyr, D.G., Hermo, L., and Laird, D.W. (1996). Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology* *137*, 1474-1484.
36. D'Amour, M., and Charbonneau, M. (1992). Sex-related difference in hepatic glutathione conjugation of hexachlorobenzene in the rat. *Toxicology and applied pharmacology* *112*, 229-234.
37. D'Souza, T., Sherman-Baust, C.A., Poosala, S., Mullin, J.M., and Morin, P.J. (2009). Age-related changes of claudin expression in mouse liver, kidney, and pancreas. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* *64*, 1146-1153.
38. Daley, G.Q. (2015). Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *370*, 20140376.
39. Das Sarma, J., Wang, F., and Koval, M. (2002). Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *The Journal of biological chemistry* *277*, 20911-20918.
40. de Tomaso Portaz, A.C., Caimi, G.R., Sanchez, M., Chiappini, F., Randi, A.S., Kleiman de Pisarev, D.L., and Alvarez, L. (2015). Hexachlorobenzene induces cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression (AhR) in rat liver preneoplastic foci, and in the human hepatoma cell line HepG2. AhR is a mediator of ERK1/2 signaling, and cell cycle regulation in HCB-treated HepG2 cells. *Toxicology* *336*, 36-47.
41. Dedek, K., Schultz, K., Pieper, M., Dirks, P., Maxeiner, S., Willecke, K., Weiler, R., and Janssen-Bienhold, U. (2006). Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci* *24*, 1675-1686.
42. Delisle, A., Ferraris, E., and Plante, I. (2015). Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast. *Environ Res* *143*, 229-240.
43. DeoCampo, N.D., Wilson, M.R., and Trosko, J.E. (2000). Cooperation of bcl-2 and myc in the neoplastic transformation of normal rat liver epithelial cells is related to the down-regulation of gap junction-mediated intercellular communication. *Carcinogenesis* *21*, 1501-1506.
44. Ding, C., Li, Y., Guo, F., Jiang, Y., Ying, W., Li, D., Yang, D., Xia, X., Liu, W., Zhao, Y., *et al.* (2016). A Cell-type-resolved Liver Proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *15*, 3190-3202.
45. Doull's, C.a. (2013). *Toxicology : The Basic Science of Poisons*, 8th edn (McGraw - Hill Education).
46. Dufresne, J., Finnson, K.W., Gregory, M., and Cyr, D.G. (2003). Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *Am J Physiol Cell Physiol* *284*, C33-43.
47. Eifgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hulser, D.F., and Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *The Journal of cell biology* *129*, 805-817.
48. EPA, U.S. (1986b). *Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures* U.S.E.P. Agency, ed. (Washington, D.C: EPA).
49. Falk, M.M., Buehler, L.K., Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1997). Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *The EMBO journal* *16*, 2703-2716.
50. Feitelson, M.A., Sun, B., Lale Satiroglu Tufan, N., Liu, J., Pan, J., and Lian, Z. (2002). Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* *21*, 2593.
51. Firestone, G.L., and Kapadia, B.J. (2012). Minireview: regulation of gap junction dynamics by nuclear hormone receptors and their ligands. *Mol Endocrinol* *26*, 1798-1807.

52. Foster, W.G., McMahon, A., Villeneuve, D.C., and Jarrell, J.F. (1992a). Hexachlorobenzene (HCB) suppresses circulating progesterone concentrations during the luteal phase in the cynomolgus monkey. *Journal of applied toxicology : JAT* *12*, 13-17.
53. Foster, W.G., Pentick, J.A., McMahon, A., and Lecavalier, P.R. (1992b). Ovarian toxicity of hexachlorobenzene (HCB) in the superovulated female rat. *Journal of biochemical toxicology* *7*, 1-4.
54. Freyschuss, B., Sahlin, L., Masironi, B., and Eriksson, H. (1994). The hormonal regulation of the oestrogen receptor in rat liver: an interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *The Journal of endocrinology* *142*, 285-298.
55. Friedman, J.R., and Kaestner, K.H. (2011). On the origin of the liver. *The Journal of clinical investigation* *121*, 4630-4633.
56. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* *123*, 1777-1788.
57. Geerts, A. (2004). On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *Journal of hepatology* *40*, 331-334.
58. Gershon, E., Plaks, V., and Dekel, N. (2008). Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Molecular and cellular endocrinology* *282*, 18-25.
59. Gocmen, A., Peters, H.A., Cripps, D.J., Morris, C.R., and Dogramaci, I. (1986). Porphyria turcica: hexachlorobenzene-induced porphyria. *IARC Sci Publ*, 567-573.
60. Gonzalez-Sanchez, E., Vaquero, J., Fouassier, L., and Chignard, N. (2015). E-cadherin, guardian of liver physiology. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* *39*, 3-6.
61. Goodenough, D.A., Goliger, J.A., and Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry* *65*, 475-502.
62. Gordillo, M., Evans, T., and Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development* *142*, 2094-2108.
63. Grant, D.M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis* *14*, 421-430.
64. Grummer, R., Chwalisz, K., Mulholland, J., Traub, O., and Winterhager, E. (1994). Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones. *Biol Reprod* *51*, 1109-1116.
65. Guy Orchard, B.N. (2015). *CELL STRUCTURE & FUNCTION* (Oxford University Press).
66. Habeeb, M.A., Vishwakarma, S.K., Bardia, A., and Khan, A.A. (2015). Hepatic stem cells: A viable approach for the treatment of liver cirrhosis. *World journal of stem cells* *7*, 859-865.
67. Habermann, H., Chang, W.Y., Birch, L., Mehta, P., and Prins, G.S. (2001). Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate. *Endocrinology* *142*, 359-369.
68. Hahn, M.E., Goldstein, J.A., Linko, P., and Gasiewicz, T.A. (1989). Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo. Evidence that hexachlorobenzene is a weak Ah receptor agonist. *Archives of biochemistry and biophysics* *270*, 344-355.
69. Hall, A.P., Elcombe, C.R., Foster, J.R., Harada, T., Kaufmann, W., Knippel, A., Kuttler, K., Malarkey, D.E., Maronpot, R.R., Nishikawa, A., *et al.* (2012). Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse

- and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic pathology* *40*, 971-994.
70. Hansen, L.G., Teske, R.H., Sundlof, S.M., and Simon, J. (1979). Hexachlorobenzene and feline reproduction: effects of ground pork contaminated by dietary exposure or spiked with purified HCB. *Veterinary and human toxicology* *21*, 248-253.
 71. Harris, R.Z., Benet, L.Z., and Schwartz, J.B. (1995). Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs* *50*, 222-239.
 72. Harrison RG, G.M., Mall FP, Jackson CM (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Anatomy Research* *1*, 116-128.
 73. Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* *1778*, 660-669.
 74. Hempel, M., Schmitz, A., Winkler, S., Kucukoglu, O., Bruckner, S., Niessen, C., and Christ, B. (2015). Pathological implications of cadherin zonation in mouse liver. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *72*, 2599-2612.
 75. Herath, C.B., Yamashita, M., Watanabe, G., Jin, W., Tangtrongsup, S., Kojima, A., Groome, N.P., Suzuki, A.K., and Taya, K. (2001). Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Secretion by Estradiol and Dimeric Inhibins in the Infantile Female Rat¹. *Biology of Reproduction* *65*, 1623-1633.
 76. Hindley, C.J., Cordero-Espinoza, L., and Huch, M. (2016). Organoids from adult liver and pancreas: Stem cell biology and biomedical utility. *Developmental biology* *420*, 251-261.
 77. Holczbauer, A., Gyongyosi, B., Lotz, G., Torzsok, P., Kaposi-Novak, P., Szijarto, A., Tatrai, P., Kupcsulik, P., Schaff, Z., and Kiss, A. (2014). Increased expression of claudin-1 and claudin-7 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* *20*, 493-502.
 78. Huch, M., Boj, S.F., and Clevers, H. (2013a). Lgr5(+) liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine. *Regenerative medicine* *8*, 385-387.
 79. Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., *et al.* (2013b). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* *494*, 247-250.
 80. Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M.M., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S.A., de Ligt, J., *et al.* (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* *160*, 299-312.
 81. Huch, M., and Koo, B.K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* *142*, 3113-3125.
 82. Huynh, H.T., Alpert, L., Laird, D.W., Batist, G., Chalifour, L., and Alaoui-Jamali, M.A. (2001). Regulation of the gap junction connexin 43 gene by androgens in the prostate. *Journal of molecular endocrinology* *26*, 1-10.
 83. Hwang, I., Yang, H., Kang, H.S., Ahn, C.H., Lee, G.S., Hong, E.J., An, B.S., and Jeung, E.B. (2014). Spatial expression of claudin family members in various organs of mice. *Molecular medicine reports* *9*, 1806-1812.
 84. Iansante, V., Chandrashekar, A., and Dhawan, A. (2018). Cell-based liver therapies: past, present and future. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *373*.

85. Ikegwuonu, F.I., Ganem, L.G., Larson, M.C., Shen, X., and Jefcoate, C.R. (1996). The regulation by gender, strain, dose, and feeding status of the induction of multiple forms of cytochrome P450 isozymes in rat hepatic microsomes by 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl. *Toxicology and applied pharmacology* *139*, 33-41.
86. INERIS (2011). Hexachlorobenzène (France).
87. James W Nelson, E.F. (2010). *Cell-Cell Junctions (Cold Spring Harbord Perspectives in Biology)*.
88. Janssen-Timmen, U., Traub, O., Dermietzel, R., Rabes, H.M., and Willecke, K. (1986). Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody. *Carcinogenesis* *7*, 1475-1482.
89. Jiao, W., Miyazaki, K., and Kitajima, Y. (2002). Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *British journal of cancer* *86*, 98-101.
90. Jin, Y.R., and Yoon, J.K. (2012). The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling. *Int J Biochem Cell Biol* *44*, 2278-2287.
91. Kaestner, K.H. (2005). The making of the liver: developmental competence in foregut endoderm and induction of the hepatogenic program. *Cell Cycle* *4*, 1146-1148.
92. Kalsotra, A., Anakk, S., Boehme, C.L., and Strobel, H.W. (2002). Sexual dimorphism and tissue specificity in the expression of CYP4F forms in Sprague Dawley rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* *30*, 1022-1028.
93. Kennedy, S.W., and Wigfield, D.C. (1990). Dose-response relationships in hexachlorobenzene-induced porphyria. *Biochem Pharmacol* *40*, 1381-1388.
94. Khan, Z., Orr, A., Michalopoulos, G.K., and Ranganathan, S. (2017). Immunohistochemical Analysis of the Stem Cell Marker LGR5 in Pediatric Liver Disease. *Pediatr Dev Pathol* *20*, 16-27.
95. Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox biology* *11*, 622-630.
96. King, T.J., and Bertram, J.S. (2005). Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochimica et biophysica acta* *1719*, 146-160.
97. King, T.J., and Lampe, P.D. (2004). Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis* *25*, 669-680.
98. Koch, I., Weil, R., Wolbold, R., Brockmoller, J., Hustert, E., Burk, O., Nuessler, A., Neuhaus, P., Eichelbaum, M., Zanger, U., *et al.* (2002). Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* *30*, 1108-1114.
99. Koch, S., and Nusrat, A. (2009). Dynamic regulation of epithelial cell fate and barrier function by intercellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1165*, 220-227.
100. Kojima, T., Mitaka, T., Shibata, Y., and Mochizuki, Y. (1995). Induction and regulation of connexin26 by glucagon in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Journal of cell science* *108 (Pt 8)*, 2771-2780.
101. Kojima, T., Sawada, N., Oyamada, M., Chiba, H., Isomura, H., and Mori, M. (1994). Rapid appearance of connexin 26-positive gap junctions in centrilobular hepatocytes without induction

- of mRNA and protein synthesis in isolated perfused liver of female rat. *Journal of cell science* 107 (Pt 12), 3579-3590.
102. Kojima, T., Yamamoto, T., Murata, M., Chiba, H., Kokai, Y., and Sawada, N. (2003). Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* 36, 157-164.
 103. Koo, B.K., and Clevers, H. (2014). Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology* 147, 289-302.
 104. Krishnan, K., Brodeur, J., and Charbonneau, M. (1991). Development of an experimental model for the study of hexachlorobenzene-induced hepatic porphyria in the rat. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 17, 433-441.
 105. Krutovskikh, V., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A.M., Mesnil, M., Berger, F., Partensky, C., and Yamasaki, H. (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* 56, 87-94.
 106. Krutovskikh, V.A., Mesnil, M., Mazzoleni, G., and Yamasaki, H. (1995). Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. *Lab Invest* 72, 571-577.
 107. Kumar, K.K., Burgess, A.W., and Gulbis, J.M. (2014). Structure and function of LGR5: an enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. *Protein science : a publication of the Protein Society* 23, 551-565.
 108. Kwiatkowski, A.P., Baker, T.K., and Klaunig, J.E. (1994). Comparison of glucocorticoid-mediated changes in the expression and function of rat hepatocyte gap junctional proteins. *Carcinogenesis* 15, 1753-1757.
 109. Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345, 1247125.
 110. Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373-379.
 111. Lee, N.P., and Luk, J.M. (2010). Hepatic tight junctions: from viral entry to cancer metastasis. *World journal of gastroenterology* 16, 289-295.
 112. Lemaigre, F.P. (2009). Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 137, 62-79.
 113. Li, Y.S., Harn, H.J., Hsieh, D.K., Wen, T.C., Subeq, Y.M., Sun, L.Y., Lin, S.Z., and Chiou, T.W. (2013). Cells and materials for liver tissue engineering. *Cell transplantation* 22, 685-700.
 114. Liu, Y.N., Liu, Y., Lee, H.J., Hsu, Y.H., and Chen, J.H. (2008). Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Molecular and cellular biology* 28, 7096-7108.
 115. Loewenstein, W.R., and Kanno, Y. (1967). Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J Cell Biol* 33, 225-234.
 116. M Berntssen, A.M.a.A.-K.L. (2012). Contamination of fi nfi sh with persistent organic pollutants and metals. In *Chemical Contaminants and Residues in Food* (Woodhead).

117. Ma, Q., and Lu, A.Y. (2007). CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 1009-1016.
118. Maes, M., Decrock, E., Cogliati, B., Oliveira, A.G., Marques, P.E., Dagli, M.L., Menezes, G.B., Menecier, G., Leybaert, L., Vanhaecke, T., *et al.* (2014). Connexin and pannexin (hemi)channels in the liver. *Frontiers in physiology* 4, 405.
119. Mahiout, S., Linden, J., Esteban, J., Sanchez-Perez, I., Sankari, S., Pettersson, L., Hakansson, H., and Pohjanvirta, R. (2017). Toxicological characterisation of two novel selective aryl hydrocarbon receptor modulators in Sprague-Dawley rats. *Toxicology and applied pharmacology* 326, 54-65.
120. Matsumoto, A., Arai, Y., Urano, A., and Hyodo, S. (1991). Androgen regulates gap junction mRNA expression in androgen-sensitive motoneurons in the rat spinal cord. *Neuroscience letters* 131, 159-162.
121. Matthews, V.B., and Yeoh, G.C. (2005). Liver stem cells. *IUBMB life* 57, 549-553.
122. McLachlan, E., Shao, Q., Wang, H.L., Langlois, S., and Laird, D.W. (2006). Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer research* 66, 9886-9894.
123. Meng, W., and Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002899.
124. Merck (2006). *An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, W. Station, ed. (N.J., USA: Merck & Co., Inc), pp. 808.
125. Mese, G., Richard, G., and White, T.W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *The Journal of investigative dermatology* 127, 2516-2524.
126. Methods, N. (2018). Method of the Year 2017: Organoids. *Nature Methods* 15, 1.
127. Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *Journal of cellular physiology* 213, 286-300.
128. Miret, N., Pontillo, C., Ventura, C., Carozzo, A., Chiappini, F., Kleiman de Pisarev, D., Fernandez, N., Cocca, C., and Randi, A. (2016). Hexachlorobenzene modulates the crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and transforming growth factor-beta1 signaling, enhancing human breast cancer cell migration and invasion. *Toxicology* 366-367, 20-31.
129. Mitaka, T. (2002). Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9, 697-703.
130. Mitaka, T., and Ooe, H. (2010). Characterization of hepatic-organoid cultures. *Drug metabolism reviews* 42, 472-481.
131. Mitaka, T., Sato, F., Mizuguchi, T., Yokono, T., and Mochizuki, Y. (1999). Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 29, 111-125.
132. Mitalipov, S., and Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 114, 185-199.
133. Miyamoto, S., Hirata, K., Sugimoto, S., Harada, K., and Mitaka, T. (2005). Expression of cytochrome P450 enzymes in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology* 20, 865-872.
134. Mizumoto, H., Aoki, K., Nakazawa, K., Ijima, H., Funatsu, K., and Kajiwara, T. (2008). Hepatic differentiation of embryonic stem cells in HF/organoid culture. *Transplantation proceedings* 40, 611-613.

135. Morris CR, C.J. (1985). Hexachlorobenzene : Proceedings of an international symposium International Agency For Research on Cancer 24-28.
136. Mundy, L. (2011). Cytochrome P4501A induction by highly purified hexachlorobenzene in primary cultures of avians hepatocytes In *Biology* (Ottawa: University of Ottawa).
137. Mylchreest, E., and Charbonneau, M. (1997). Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced porphyria in the female rat. *Toxicology and applied pharmacology* 145, 23-33.
138. Naiki-Ito, A., Kato, H., Asamoto, M., Naiki, T., and Shirai, T. (2012). Age-dependent carcinogenic susceptibility in rat liver is related to potential of gap junctional intercellular communication. *Toxicologic pathology* 40, 715-721.
139. Nakagawa, H., Hikiba, Y., Hirata, Y., Font-Burgada, J., Sakamoto, K., Hayakawa, Y., Taniguchi, K., Umemura, A., Kinoshita, H., Sakitani, K., *et al.* (2014). Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 1090-1095.
140. Nantasanti, S., de Bruin, A., Rothuizen, J., Penning, L.C., and Schotanus, B.A. (2016). Concise Review: Organoids Are a Powerful Tool for the Study of Liver Disease and Personalized Treatment Design in Humans and Animals. *Stem cells translational medicine* 5, 325-330.
141. Neveu, M.J., Babcock, K.L., Hertzberg, E.L., Paul, D.L., Nicholson, B.J., and Pitot, H.C. (1994). Colocalized alterations in connexin32 and cytochrome P450IIB1/2 by phenobarbital and related liver tumor promoters. *Cancer research* 54, 3145-3152.
142. Neveu, M.J., Hully, J.R., Paul, D.L., and Pitot, H.C. (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* 2, 21-31.
143. Nightingale, J., Chaudhary, K.S., Abel, P.D., Stubbs, A.P., Romanska, H.M., Mitchell, S.E., Stamp, G.W., and Lalani el, N. (2003). Ligand activation of the androgen receptor downregulates E-cadherin-mediated cell adhesion and promotes apoptosis of prostatic cancer cells. *Neoplasia* 5, 347-361.
144. Nilsson, M.E., Vandenput, L., Tivesten, A., Norlen, A.K., Lagerquist, M.K., Windahl, S.H., Borjesson, A.E., Farman, H.H., Poutanen, M., Benrick, A., *et al.* (2015). Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology* 156, 2492-2502.
145. Oda, H., Tagawa, K., and Akiyama-Oda, Y. (2005). Diversification of epithelial adherens junctions with independent reductive changes in cadherin form: identification of potential molecular synapomorphies among bilaterians. *Evolution & development* 7, 376-389.
146. Oesterreich, S., Deng, W., Jiang, S., Cui, X., Ivanova, M., Schiff, R., Kang, K., Hadsell, D.L., Behrens, J., and Lee, A.V. (2003). Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer research* 63, 5203-5208.
147. Ohbayashi, H., Sasaki, T., Matsumoto, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Aiso, S., Nagano, K., Arito, H., and Yamamoto, S. (2007). Dose- and time-dependent effects of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin on rat liver. *J Toxicol Sci* 32, 47-56.
148. Oyamada, M., Oyamada, Y., and Takamatsu, T. (2005). Regulation of connexin expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1719, 6-23.

149. Oyamada, M., Takebe, K., and Oyamada, Y. (2013). Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* *1828*, 118-133.
150. Petrocelli, T., and Lye, S.J. (1993). Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* *133*, 284-290.
151. Piao, Y., Liu, Y., and Xie, X. (2013). Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. *Journal of toxicologic pathology* *26*, 29-34.
152. Plante, I., Charbonneau, M., and Cyr, D.G. (2002). Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis* *23*, 1243-1249.
153. Plante, I., Charbonneau, M., and Cyr, D.G. (2006). Activation of the integrin-linked kinase pathway downregulates hepatic connexin32 via nuclear Akt. *Carcinogenesis* *27*, 1923-1929.
154. Plante, I., Cyr, D.G., and Charbonneau, M. (2005). Involvement of the integrin-linked kinase pathway in hexachlorobenzene-induced gender-specific rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci* *88*, 346-357.
155. Plante, I., Cyr, D.G., and Charbonneau, M. (2007). Sexual dimorphism in the regulation of liver connexin32 transcription in hexachlorobenzene-treated rats. *Toxicol Sci* *96*, 47-57.
156. Pronczuk, J., Akre, J., Moy, G., and Vallenias, C. (2002). Global perspectives in breast milk contamination: infectious and toxic hazards. *Environmental health perspectives* *110*, A349-351.
157. Puche, J.E., Saiman, Y., and Friedman, S.L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology* *3*, 1473-1492.
158. Qin, J., Chang, M., Wang, S., Liu, Z., Zhu, W., Wang, Y., Yan, F., Li, J., Zhang, B., Dou, G., *et al.* (2016). Connexin 32-mediated cell-cell communication is essential for hepatic differentiation from human embryonic stem cells. *Scientific reports* *6*, 37388.
159. Québec, G.d. (1998). Projet d'usine de production du magnésium par Métallurgie Magnola Inc., à Magnola. In *Rapport d'enquête et d'audience publique*
160. Ramesh Aramandla, E.A.A. (2011). *Reproductive and developmental toxicology* (Elsevier).
161. Ren, J., Wang, X.-H., Wang, G.-C., and Wu, J.-H. (2013). 17 β Estradiol regulation of connexin 43-based gap junction and mechanosensitivity through classical estrogen receptor pathway in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *Bone* *53*, 587-596.
162. Ren, P., de Feijter, A.W., Paul, D.L., and Ruch, R.J. (1994). Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis* *15*, 1807-1813.
163. Rizzardini, M., and Smith, A.G. (1982). Sex differences in the metabolism of hexachlorobenzene by rats and the development of porphyria in females. *Biochem Pharmacol* *31*, 3543-3548.
164. Robert, J. (2010). La voie Wnt. In *Signalisation cellulaire et cancer: Un manuel pour les étudiants et les oncologues* (Paris: Springer Paris), pp. 103-110.
165. Rosenberg, E., Faris, R.A., Spray, D.C., Monfils, B., Abreu, S., Danishefsky, I., and Reid, L.M. (1996). Correlation of expression of connexin mRNA isoforms with degree of cellular differentiation. *Cell adhesion and communication* *4*, 223-235.
166. Rosenberg, E., Spray, D.C., and Reid, L.M. (1992). Transcriptional and posttranscriptional control of connexin mRNAs in periportal and pericentral rat hepatocytes. *European journal of cell biology* *59*, 21-26.

167. Saito, T., Oyamada, M., Yamasaki, H., Mori, M., and Kudo, R. (1997). Co-ordinated expression of connexins 26 and 32 in human endometrial glandular epithelium during the reproductive cycle and the influence of hormone replacement therapy. *International journal of cancer* *73*, 479-485.
168. Sakamoto, H., Oyamada, M., Enomoto, K., and Mori, M. (1992). Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 and 32 during hepatocarcinogenesis in rats. *Japanese journal of cancer research : Gann* *83*, 1210-1215.
169. Sato, T., and Clevers, H. (2013). Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. *Methods Mol Biol* *945*, 319-328.
170. Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262-265.
171. Schneider, M.R., Hiltwein, F., Grill, J., Blum, H., Krebs, S., Klanner, A., Bauersachs, S., Bruns, C., Longerich, T., Horst, D., *et al.* (2014). Evidence for a role of E-cadherin in suppressing liver carcinogenesis in mice and men. *Carcinogenesis* *35*, 1855-1862.
172. Schulzke, J.D., Gunzel, D., John, L.J., and Fromm, M. (2012). Perspectives on tight junction research. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1257*, 1-19.
173. Segretain, D., and Falk, M.M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et biophysica acta* *1662*, 3-21.
174. Sgodda, M., Dai, Z., Zweigerdt, R., Sharma, A.D., Ott, M., and Cantz, T. (2017). A Scalable Approach for the Generation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatic Organoids with Sensitive Hepatotoxicity Features. *Stem cells and development* *26*, 1490-1504.
175. Shamir, E.R., and Ewald, A.J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 647-664.
176. Shoda, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Toyoda, K., Uneyama, C., Imazawa, T., and Hirose, M. (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* *73*, 373-380.
177. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Developmental cell* *18*, 175-189.
178. Siddiqui, M.U., Benatmane, S., Zacharyus, J.L., and Plas, C. (1999). Gap junctional communication and regulation of the glycogenic response to insulin by cell density and glucocorticoids in cultured fetal rat hepatocytes. *Hepatology* *29*, 1147-1155.
179. Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N., Yagi, H., Nahmias, Y., Yarmush, M.L., and Kobayashi, N. (2010). Engineering of an hepatic organoid to develop liver assist devices. *Cell transplantation* *19*, 815-822.
180. Starek-Swiechowicz, B., Budziszewska, B., and Starek, A. (2017). Hexachlorobenzene as a persistent organic pollutant: Toxicity and molecular mechanism of action. *Pharmacological reports : PR* *69*, 1232-1239.
181. Stauffer, B.L., Sobus, R.D., and Sucharov, C.C. (2011). Sex differences in cardiomyocyte connexin43 expression. *Journal of cardiovascular pharmacology* *58*, 32-39.
182. Stonard, M.D., Poli, G., and De Matteis, F. (1998). Stimulation of liver heme oxygenase in hexachlorobenzene-induced hepatic porphyria. *Archives of toxicology* *72*, 355-361.

183. Sugiyama, Y., Koike, T., and Shiojiri, N. (2007). Immunohistochemical analyses of cell-cell interactions during hepatic organoid formation from fetal mouse liver cells cultured in vitro. *Histochemistry and cell biology* 128, 521-531.
184. Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., *et al.* (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481-484.
185. Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102, 639-655.
186. Takens-Kwak, B.R., and Jongsma, H.J. (1992). Cardiac gap junctions: three distinct single channel conductances and their modulation by phosphorylating treatments. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 422, 198-200.
187. Temesvari, M., Kobori, L., Paulik, J., Sarvary, E., Belic, A., and Monostory, K. (2012). Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther* 341, 294-305.
188. Toft, P. (2004). Hexachlorobenzene in Drinking-Water, W.G.f.D.-w. Quality, ed.
189. Tong, J.Z., Bernard, O., and Alvarez, F. (1990). Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Experimental cell research* 189, 87-92.
190. Tracey A Martin, L.Y., Andrew J. Sanders, Jane Lane, and Wen G. Jiang (2013). Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In *Madame Curie Bioscience* (UK: Landes Bioscience).
191. Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hulser, D., and Willecke, K. (1989). Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* 108, 1039-1051.
192. Trosko, J.E., and Chang, C.C. (2001). Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutation research* 480-481, 219-229.
193. Tuttle, J.R. (1979). A survey of the sources, uses and environmental distribution of hexachlorobenzene in Alberta, Saskatchewan, Manitoba and the Northwest territories, S.d.l.p.d. *l'environnement*, ed. (Edmonton (Alberta): Environnement Canada).
194. Underhill, G.H., and Khetani, S.R. (2018). Bioengineered Liver Models for Drug Testing and Cell Differentiation Studies. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 5, 426-439 e421.
195. Van Hul, N., Lanthier, N., Espanol Suner, R., Abarca Quinones, J., van Rooijen, N., and Leclercq, I. (2011). Kupffer cells influence parenchymal invasion and phenotypic orientation, but not the proliferation, of liver progenitor cells in a murine model of liver injury. *Am J Pathol* 179, 1839-1850.
196. van Roy, F., and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 3756-3788.
197. Verma, Y., and Rana, S.V. (2008). Effects of progesterone on benzene toxicity in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 59, 1-9.
198. Vinken, M., De Kock, J., Oliveira, A.G., Menezes, G.B., Cogliati, B., Dagli, M.L., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2012). Modifications in connexin expression in liver development and cancer. *Cell communication & adhesion* 19, 55-62.

199. Vinken, M., De Rop, E., Decrock, E., De Vuyst, E., Leybaert, L., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2009). Epigenetic regulation of gap junctional intercellular communication: more than a way to keep cells quiet? *Biochimica et biophysica acta* 1795, 53-61.
200. Vinken, M., Henkens, T., De Rop, E., Fraczek, J., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2008). Biology and pathobiology of gap junctional channels in hepatocytes. *Hepatology* 47, 1077-1088.
201. Vinken, M., Papeleu, P., Snykers, S., De Rop, E., Henkens, T., Chipman, J.K., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2006). Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. *Critical reviews in toxicology* 36, 299-318.
202. Warby, C.A., Phillips, J.D., Bergonia, H.A., Whitby, F.G., Hill, C.P., and Kushner, J.P. (2009). Structural and kinetic characterization of mutant human uroporphyrinogen decarboxylases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 55, 40-45.
203. Waxman, D.J., and Holloway, M.G. (2009). Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular pharmacology* 76, 215-228.
204. Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L., and Shi, Y.F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica* 34, 747-754.
205. Willebrords, J., Crespo Yanguas, S., Maes, M., Decrock, E., Wang, N., Leybaert, L., da Silva, T.C., Veloso Alves Pereira, I., Jaeschke, H., Cogliati, B., *et al.* (2015). Structure, Regulation and Function of Gap Junctions in Liver. *Cell communication & adhesion* 22, 29-37.
206. Xu, A.T., Tong, J.L., and Ran, Z.H. (2016). Organoids derived from digestive tract, liver, and pancreas. *Journal of digestive diseases* 17, 3-10.
207. Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N., and Krutovskikh, V. (1995). Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutation research* 333, 181-188.
208. Yamasaki, H., Omori, Y., Krutovskikh, V., Zhu, W., Mironov, N., Yamakage, K., and Mesnil, M. (1999). Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis Found Symp* 219, 241-254; discussion 254-260.
209. Yang, L., Li, Y., Hong, H., Chang, C.W., Guo, L.W., Lyn-Cook, B., Shi, L., and Ning, B. (2012). Sex Differences in the Expression of Drug-Metabolizing and Transporter Genes in Human Liver. *Journal of drug metabolism & toxicology* 3, 1000119.
210. Yang, M., Li, J., An, Y., and Zhang, S. (2015). Effects of androgen on immunohistochemical localization of androgen receptor and Connexin 43 in mouse ovary. *Tissue Cell* 47, 526-532.
211. Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., and Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell stem cell* 18, 25-38.
212. Yun, C., Katchko, K.M., Schallmo, M.S., Jeong, S., Yun, J., Chen, C.H., Weiner, J.A., Park, C., George, A., Stupp, S.I., *et al.* (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Mitigate the Effects of Dioxin on Critical Cellular Functions in Differentiating Human Osteoblast-Like Cells. *International journal of molecular sciences* 19.
213. Zanger, U.M., Klein, K., Richter, T., Toscano, C., and Zukunft, J. (2005). Impact of genetic polymorphism in relation to other factors on expression and function of human drug-metabolizing p450s. *Toxicology mechanisms and methods* 15, 121-124.
214. Zaret, K.S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nature reviews Genetics* 3, 499-512.

215. Zeisel, M.B., Dhawan, P., and Baumert, T.F. (2018). Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut*.
216. Zhao, R., and Duncan, S.A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* *41*, 956-967.
217. Zheng, Z.Y., Weng, S.Y., and Yu, Y. (2009). Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World journal of gastroenterology* *15*, 5776-5783.