Document public Comparaison des propriétés proangiogéniques in vivo de la chlordécone et de trois haa-b de ses dérivés déchlorés formés par réduction chimique Rapport final BRGM/RP-66893-FR hib-2 dy-hta Février 2018 .89 3740,46 -625.5



Document public

Comparaison de la propriété proangiogénique *in vivo* de la chlordécone et de trois de ses dérivés déchlorés formés par réduction chimique

Rapport final

BRGM/RP-66893-FR

Février 2018

Étude réalisée dans le cadre des opérations (projets) de Service public (Recherche) du BRGM 2017

C. Mouvet, E. Alabed Alibrahim, P. A. Billat, S. Faure, S. Legeay, N. Clère, E. Bichon, I. Guiffard et S. Bristeau

| Vérificateur : |
|--|
| Nom : Hellal Jennifer |
| Fonction : chef de projet Date : ユリレン (2015 |
| |

| Approbateur : | | | | | | |
|--------------------------|--|--|--|--|--|--|
| Nom : Dorfliger Nathalie | | | | | | |
| Fonction : DORFUGER P. | | | | | | |
| Date: Directrice D3E | | | | | | |
| Signature : 26/0 2/2018 | | | | | | |
| Not | | | | | | |

Le système de management de la qualité et de l'environnement est certifié par AFNOR selon les normes ISO 9001 et ISO 14001. Contact : <u>qualite@brgm.fr</u>



Mots-clés : Toxicité in vivo, Angiogenèse, Chlordécone, Dérivés déchlorés, ISCR.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Mouvet C., Alabed Alibrahim E., Billat P. A., Faure S., Legeay S., Clère N., Bichon E., Guiffard I. et Bristeau S. (2018) - Comparaison des propriétés proangiogéniques *in vivo* de la chlordécone et de trois de ses dérivés déchlorés formés par réduction chimique. Rapport final. BRGM/RP-66893-FR. 40 p., 12 fig., 4 tab.

© BRGM, 2018, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

Le procédé d'*In Situ Chemical Reduction* (ISCR) appliqué pour la décontamination des sols contenant de la chlordécone (CLD) engendre la formation de produits déchlorés. Parmi les 11 produits déchlorés formés par ISCR identifiés à ce jour, seules une mono-hydroCLD (CLD-1CI ; la position de déchloration, 5a- ou 5- selon la nomenclature CAS, n'est pas connue avec certitude), une tri-hydroCLD (CLD-3CI) et une quadri-hydroCLD (CLD-4CI) sont disponibles sous forme d'étalons en masse et pureté suffisantes pour permettre des études de toxicité.

L'effet proangiogénique des CLD-1 et -3Cl par rapport à celle de la molécule mère n'a été étudiée qu'au niveau cellulaire par des approches *in vitro* (Legeay *et al.*, 2017 ; Mouvet *et al.*, 2016). Ces travaux préliminaires montrent une moindre activité proangiogénique des produits dérivés. Vu les enjeux sanitaires posés par la CLD, une approche complémentaire, plus proche du modèle humain, a été mise en œuvre dans la présente étude.

La CLD augmente la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, appelée néoangiogenèse, favorisant ainsi le développement tumoral (Clere *et al.*, 2012). Cette néoangiogenèse a été comparée entre la CLD et ses métabolites obtenus par ISCR sur un modèle murin de tumeur de prostate humaine.

Les essais *in vivo* décrits dans la présente étude confirment l'impact de la CLD sur la croissance tumorale et le développement des vaisseaux sanguins (effets proangiogéniques). Les souris ayant une tumeur prostatique et gavées avec de l'huile enrichie en CLD présentent une taille de tumeur et une néoangiogenèse tumorale supérieures à celles observées chez les souris témoins. Les déchlorations successives (-1, -3, -4 Cl) de la CLD réduisent la croissance tumorale et la vascularisation des tumeurs, au point que l'effet proangiogénique de la CLD-4Cl ne soit pas différent de celui du témoin. Ces résultats confirment chez l'animal ceux précédemment observés lors d'études *in vitro* (Legeay *et al.*, 2017 ; Mouvet *et al.*, 2016).

Les concentrations plasmatiques montrent une grande différence de comportement entre molécules. En effet, pour une même dose ingérée, la concentration molaire plasmatique résiduelle en CLD est de 2 à 3 fois plus élevée que celle de la CLD-1Cl, elle-même environ 3 à 9 fois plus élevée que celle de la CLD- 3Cl, et elle-même 2 fois plus élevée que celle de la CLD-4Cl. Ces résultats peuvent être expliqués par une accumulation plus importante de la CLD dans l'organisme des animaux, ou une élimination plus rapide des dérivés déchlorés, ou encore une addition de ces deux phénomènes réduisant l'exposition des animaux à ces deux molécules.

Les résultats obtenus suggèrent ainsi que les trois principaux produits de dégradation déchlorés de la CLD formés par ISCR entraînent, par rapport à la CLD, i) un moindre développement *in vivo* des tumeurs prostatiques humaines injectées à des souris nude, ii) un moindre effet proangiogénique, et iii) une accumulation moindre dans le sang des animaux traités. Ces résultats sont à prendre en compte dans l'évaluation globale de l'intérêt de la décontamination des sols par ISCR.

Sommaire

| 1. Introduction | 9 |
|---|----------------|
| 2. Éléments bibliographiques sur la toxicité de la CLD | 11 |
| 2.1. TOXICOCINÉTIQUE | 11 |
| 2.2. IMPACT DE LA CHLORDÉCONE SUR LA SANTÉ HUMAINE 2.2.1.CLD et risque de cancer 2.2.2.Cancer et angiogenèse | 11 11 12 |
| 3. Objectif | 13 |
| 4. Matériel et méthodes | 15 |
| 4.1. MODÈLE CELLULAIRE 4.1.1. Milieu de culture 4.1.2. Mise en culture des cellules | 15 15 15 |
| 4.2. MODÈLE ANIMAL | 16 |
| 4.3. SUBSTANCES TESTÉES | 16 |
| 4.4. MESURE DES CONCENTRATIONS SÉRIQUES 4.4.1. Prélèvement 4.4.2. Méthode analytique | 17 17 17 |
| 4.5. ANALYSE DES COUPES DE TUMEUR PROSTATIQUE | 22 |
| 4.6. FORMATION DU RESÉAU CAPILLAIRE IN VITRO SUR LE GEL ECM | 23 |
| 4.7. ESSAI DE PROLIFÉRATION SUR LES CELLULES TUMORALES PC-3 | 23 |
| 4.8. ANALYSES STATISTIQUES | 23 |
| 5. Résultats | 25 |
| 5.1. EFFET DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS SUR LA CROISSANCE TUMORALE CHEZ LA SOURIS | 25 |
| 5.2. DOSAGES SÉRIQUES DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS | 26 |
| 5.3. EFFET DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS SUR LA NÉOVASCULARISATION | 28 |
| 5.4. EFFET DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES TUMORALES PC-3 | 31 |
| 6. Discussion | 33 |

| 7. Conclusions et perspectives | 35 |
|--------------------------------|----|
| 8. Bibliographie | 37 |

Liste des figures

| Figure 1 : | Répartition des animaux selon les conditions d'exposition aux différents composés 16 |
|-------------|--|
| Figure 2 : | Chromatogramme d'ions caractéristiques d'une injection de 2 μ L de la solution d'étalonnage à 20 pg/ μ L (CLD-4Cl à 0,79 min transition 368,8>350,8 ; CLD-3Cl à 1,01 min transition 402,7>322,7 ; 5- ou 5a-H-CLD à 1,65 min transition 470,7>390,7 ; 5b-H-CLD à 1,97 min transition 472,7>392,7 ; CLD à 2,37 min transition 506,7>426,7 ; ¹³ C-CLD à 2,37 min transition 516,7>435,7 ; CLD-OH à 3,15 min ion 488,7) |
| Figure 3 : | Chromatogramme d'ions d'un extrait de sérum de souris exposée à la CLD-3Cl (CLD-3Cl à 1,06 min transition 402,7>322,7 ; 5- ou 5a-H-CLD à 1,71 min transition 470,7>390,7 ; 5b-H-CLD à 2,05 min transition 472,7>392,7 ; CLD à 2,46 min transition 506,7>426,7 ; 13C-CLD à 2,45 min transition 516,7>435,7 ; CLD-OH à 3,20 min ion 488,7). |
| Figure 4 : | Évolution de la croissance tumorale chez les souris traitées à la concentration la plus élevée, 33 μ g/kg. (**p = 0,01 CLD vs DMSO), (*p=0,035 CLD vs CLD-3Cl) ; (* p = 0,025 CLD vs CLD-4Cl). n = 3 pour DMSO; 4 pour CLD ; 3 pour CLD-1Cl ; 6 pour CLD-3Cl ; 6 pour <i>CLD-4Cl</i> |
| Figure 5 : | Évolution de la croissance tumorale chez les souris traitées à la concentration la plus basse, 1,7 μ g/kg. (*p = 0,028 CLD vs DMSO) ; (*p = 0,035 CLD-1Cl vs DMSO) . n = 3 pour DMSO; 5 pour CLD ; 4 pour CLD-1Cl ; 4 pour CLD-3CL ; 6 pour CLD-4Cl |
| Figure 6 : | Longueur des capillaires formés par des HUVECs traitées avec la CLD et la CLD-4Cl pendant 24 heures aux concentrations 5 x 10 ⁻⁸ M, 10 ⁻⁹ M et 10 ⁻¹¹ M. n = 6. (Échelle : 1 mm) |
| Figure 7 : | Longueur des capillaires formés par des HUVECs traitées avec la CLD et la CLD-4Cl pendant 24 heures aux concentrations 5 x 10^{-8} M, 10^{-9} M et 10^{-11} M. n = 6, **p < 0,01, CLD vs CLD-4Cl; ***p = 0,001, CLD vs Ctrl |
| Figure 8 : | Immunomarquage de coupes de tumeurs. La coloration bleue représente le marquage des noyaux cellulaires au DAPI et le marquage vert correspond au cellules des vaisseaux exprimant le marqueur CD31. (Échelle 50 µm) |
| Figure 9 : | Aire occupée par les néovaisseaux selon les traitements. *p = 0,03, CLD vs CLD-1Cl ; **p = 0,01, CLD vs CLD-1CL ; ***p< 0,001, CLD vs DMSO, CLD vs CLD-3CL, CLD vs CLD-4Cl. 31 |
| Figure 10 : | Prolifération des cellules PC-3 traitées avec la CLD, la CLD-1CI, CLD-3CI et CLD-4CI pendant 24 heures. n = 6 |
| Figure 11 : | Prolifération des cellules PC-3 traitées avec la CLD, la CLD-1CI, CLD-3CI et CLD-4CI pendant 48 heures. n = 6 |
| Figure 12 : | Prolifération des cellules PC-3 traitées avec la CLD, la CLD-1CI, CLD-3CI et CLD-4CI pendant 72 heures. n = 6 |

Liste des tableaux

| Tableau 1: | SQ : Standard de quantification ; Ecoll : énergie de collision ; tR : temps de rétention ; Facq : fenêtre d'acquisition. Les tR sont donnés à titre indicatif. Les valeurs peuvent être sujettes à de légères variations selon le lot de colonne, la longueur de tubulure ou encore le type de pompe HPLC | 18 |
|-------------|--|----|
| Tableau 2 : | Valeurs calculées des LOQ pour les six analytes d'intérêt | 20 |
| Tableau 3 : | Taux de récupération moyens pour les six analytes cibles et l'étalon interne ¹³ C-CLD | 21 |
| Tableau 4 : | Concentrations mesurées pour les six analytes cibles dans les échantillons de sérum de souris | 27 |

1. Introduction

Aux Antilles, la chlordécone contamine les sols, les eaux douces souterraines et superficielles, les eaux marines et les organismes terrestres et aquatiques continentaux et marins (Bocquené et Franco, 2005 ; Bertrand *et al.*, 2009 ; Coat *et al.*, 2006, 2011 ; Jondreveille *et al.*, 2014 ; Monti et Coat, 2007). Des effets délétères sur la santé humaine ont été démontrés (Dallaire *et al.*, 2012 ; Kadhel *et al.*, 2014 ; Multigner *et al.*, 2010, Multigner *et al.*, 2016).

Le potentiel de la réduction chimique (*In Situ* Chemical Reduction) pour décontaminer les sols a été démontré (Mouvet *et al.*, 2016). Ce procédé engendre une transformation de la CLD en produits dont le niveau de déchloration varie de 1 à 7. Une monohydroCLD (CLD -1Cl) dont le Cl en position 5 ou 5a (nomenclature CAS ; les données publiées actuellement – Belghit et al, 2015 - ne permettent pas de trancher entre ces 2 positions) a été remplacé par un H (CLD-1Cl, 5- ou 5a-hydroCLD) est le produit formé avec les plus fortes concentrations. Dans un sol alluvial traité par ISCR, il peut représenter jusqu'à 20 % de la CLD initialement présente et 50 % du total des surfaces de pics GC/MS des 11 dérivés déchlorés de la CLD (Mouvet *et al.*, 2016 b). Le deuxième dérivé le plus important est une tri-hydroCLD (CLD -3Cl) dont la position de déchloration n'est pas connue (Belghit *et al.*, 2015) et qui représente 13 % du total des aires relatives des pics GC/MS des 11 dérivés déchlorés (Mouvet *et al.*, 2016b). Un troisième dérivé encore plus déchloré, une quadri-hydroCLD (CLD-4Cl) est également observée, avec une aire relative nettement plus faible que celle de la CLD-3Cl.

In vitro, les effets proangiogéniques de la CLD -1Cl et de la CLD -3Cl sont moindres que ceux de la molécule mère (Legeay *et al.*, 2017).

Afin de confirmer les résultats d'angiogenèse *in vitro* et d'étudier l'impact de l'angiogenèse sur la croissance tumorale, la démarche expérimentale suivante a été mise en place par l'équipe INSERM UMR 1066 CNRS 6021 MINT d'Angers :

- création d'un modèle animal de tumeur de prostate humaine : injection d'environ 1,5 million de cellules cancéreuses de prostate humaine (cellules PC3) à des souris « nude » athymiques ;
- gavage quotidien des animaux à des doses correspondant à une exposition aigüe toxique ou chronique toxique chez l'homme ainsi qu'à l'exposition à l'eau de rivière contaminée : respectivement 33 μg/kg et 1,7 μg/kg (Adir *et al.*, 1978, Cohn *et al.*, 1978, Multigner *et al.*, 2016) ;
- suivi des paramètres physiologiques des animaux (poids, volume de la tumeur, comportement : agressivité, fuite, etc.) ;
- recherche de la présence de tumeurs métastatiques ;
- mesure de l'aire des néovaisseaux par immunomarquage (anti-CD31) dans des coupes de tumeurs (moyenne de 3 champs représentatifs sur 3 coupes par tumeur) ;
- dosage des concentrations résiduelles en CLD, CLD -1Cl, CLD-3Cl et CLD -4Cl dans le sérum, tâche assurée par le Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) d'Oniris (École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique).

L'ensemble des animaux a été divisé en 2 cohortes : une cohorte d'exploration et une cohorte de confirmation, les essais ont été menés en duplicat à deux périodes différentes.

Ce travail a été confié au BRGM par le Bureau de la Prospective et de l'Évaluation des Données dans le cadre d'une action 2015 du programme de subvention MEEM/BRGM.

2. Éléments bibliographiques sur la toxicité de la CLD

Une étude bibliographique assez complète a été fournie dans un rapport précédent (Mouvet *et al.*, 2016). Seuls les éléments les plus en lien avec la présente étude sont repris ci-dessous.

2.1. TOXICOCINÉTIQUE

Les données disponibles chez l'homme et l'animal indiquent que la chlordécone (CLD) est absorbée après une exposition par la voie orale. Une fois absorbée, la CLD est distribuée dans l'organisme et semble se concentrer au niveau hépatique (Kavlock *et al.*, 1980). La CLD est métabolisée dans l'organisme *via* sa fonction cétone par conjugaison avec l'acide glucuronique, une des principales voies d'élimination des xénobiotiques (Fariss *et al.*, 1980). Les dérivés glucuroconjugués de la CLD, ainsi que la CLD non conjuguée sont lentement excrétés dans la bile et éliminés dans les fèces (Cohn *et al.*, 1978). L'excrétion fécale est limitée par le cycle entéro-hépatique.

2.2. IMPACT DE LA CHLORDÉCONE SUR LA SANTÉ HUMAINE

Les données concernant les effets toxiques aigus de la CLD sur la santé humaine proviennent essentiellement d'études sur un seul groupe de 133 hommes exposés professionnellement à la CLD dans une usine de Hopewell en Virginie (US) (Taylor *et al.*, 1985; Cannon *et al.*, 1978 ; Guzelian *et al.*, 1982). Les principaux symptômes étaient neurologiques, notamment une nervosité, des maux de tête et des tremblements persistant parfois jusqu'à 9-10 mois après la cessation de l'exposition (Cannon *et al.*, 1978). Ces effets étaient dus à une réduction du nombre d'axones amyéliniques et à des perturbations dans le métabolisme des cellules de Schwann. Certains travailleurs exposés à des niveaux élevés de CLD ont également développé des éruptions cutanées, une hypertrophie hépatique et des douleurs articulaires.

De plus, il a été montré que l'exposition chronique à la CLD des antillais ayant travaillé dans les bananeraies à l'époque où la CLD était appliquée entraîne une augmentation du risque de cancer (Multigner *et al.,* 2010), notamment de la prostate. Cet aspect est spécifiquement développé dans les sous-sections suivantes.

Des études épidémiologiques récentes ont également montré qu'une exposition chronique à la CLD *via* l'alimentation était susceptible d'entraîner une augmentation du risque de naissances de prématurés et/ou de complications lors de la grossesse, ainsi qu'une augmentation du risque de cancer hépatique et prostatique chez l'homme (Multigner *et al.*, 2010 ; Dallaire *et al.*, 2012 ; Kadhel *et al.*, 2014 ; Multigner *et al.*, 2016).

2.2.1. CLD et risque de cancer

Les produits chimiques associés à des propriétés hormonales et induisant des effets délétères, aussi appelés perturbateurs endocriniens, sont considérés comme étant impliqués dans le développement tumoral (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009 ; Prins *et al.*, 2008). La CLD est un insecticide organochloré doté de propriétés œstrogéniques et peut par conséquent être qualifié de perturbateur endocrinien. Des études ont montré que la CLD est capable de se lier au récepteur des œstrogènes de type alpha (ER α) se comportant comme un agoniste (Eroschenko *et al.*, 1981 ; Kuiper *et al.*, 1998 ; Lemaire *et al.*, 2006). Ce récepteur génère les effets néfastes des œstrogènes sur la prostate, tels qu'une prolifération incontrôlée, une inflammation et un développement tumoral. Ces effets ont été confirmés au niveau

épidémiologique par l'étude de l'équipe de Luc Multigner *et al.,* en 2010 qui a clairement déterminé que la CLD est associée à un risque de cancer de la prostate chez les personnes exposées (antillais travaillant dans les bananeraies).

Les études animales montrent des effets similaires à ceux rapportés chez les humains exposés professionnellement y compris les effets neurologiques, oligospermie, hépatomégalie et l'augmentation de risque de cancer. Dans une expérimentation avec la CLD (NCI, 1976), les chercheurs ont trouvé une augmentation significative de l'incidence de tumeurs hépatiques chez les rats mâles et femelles Osborne-Mendel et les souris B6C3F1 mâles et femelles.

Par ailleurs, il a été montré que la CLD est capable de perturber les jonctions d'adhésion au niveau des cellules épithéliales mammaires humaines (Starcevic *et al.,* 2001). En effet, ces cellules épithéliales de sein cultivées sur une matrice extracellulaire de type Matrigel[®] forment des structures en forme de treillis qui étaient perturbées par l'incubation avec 1 μ M de CLD (0,1 μ M de CLD était sans effet). De même, des auteurs ont pu montrer que la CLD pouvait réduire les niveaux d'expressions de protéines transmembranaires de type E-cadhérine et β -caténine, qui sont des composants des jonctions adhérentes permettant l'interaction entre cellules et pouvant jouer un rôle dans le développement de lésions néoplasiques.

Les données disponibles suggèrent que la CLD, comme beaucoup d'autres hydrocarbures halogénés, n'est pas génotoxique directement, mais peut agir comme un cancérogène épigénétique et un promoteur de tumeur. De ce fait, la CLD possède les mêmes caractéristiques que de nombreux autres promoteurs tumoraux connus.

2.2.2. Cancer et angiogenèse

À l'origine du développement d'un cancer, les tumeurs se présentent sous forme de masses de cellules qui ont subi une transformation maligne. Pour qu'une tumeur se développe, elle doit recruter des vaisseaux sanguins pour permettre l'apport d'oxygène et de nutriments et l'élimination des déchets. Le processus de recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau préexistant au niveau d'une tumeur est connu comme l'angiogenèse tumorale, une caractéristique du cancer identifiée comme un élément essentiel de la progression tumorale (Hanahan *et al.,* 2011). Suite à cette néo-vascularisation, les tumeurs sont capables d'une croissance rapide impliquant la vascularisation nécessaire au maintien de la prolifération tumorale (Baeriswyl *et al.,* 2009 ; Hanahan *et al.,* 1996).

C'est ainsi qu'actuellement plusieurs types de cancers sont pris en charge avec des médicaments anti-angiogéniques, capables de contrôler la croissance tumorale en régulant la vascularisation des masses cancéreuses. L'étude de l'angiogenèse constitue donc une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes de développement tumoral, en particulier dans les cancers solides très vascularisés dont l'évolution est associée au potentiel angiogénique des molécules cancérogènes.

3. Objectif

Les modèles *in vivo* de pathologies humaines permettent de simuler au mieux une pathologie replacée dans un contexte physiologique global là ou un simple modèle cellulaire serait trop incomplet. Ces modèles permettent d'évaluer l'efficacité ou la toxicité de molécules dans ce contexte global.

L'objectif de la présente étude est de comparer les métabolites de la CLD par rapport à la molécule mère en ce qui concerne le développement tumoral et le potentiel angiogénique dans le cas du cancer de la prostate. Dans ce contexte, le modèle le plus pertinent est un modèle murin xénogreffé de tumeur prostatique humaine.

Les modèles animaux sont exposés à deux doses : 33 µg/kg ou 1,7 µg/kg des différentes substances testées : CLD ou ses métabolites CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl. À la fin de la période d'exposition, les animaux sont euthanasiés. Les périodes de traitement sont de l'ordre de 2 mois, le temps pour la tumeur d'atteindre la taille critique de 1,2 cm³, taille maximale tumorale tolérable pour une souris.

Après euthanasie, les tumeurs sont excisées, et congelées dans de l'azote liquide, milieu permettant une conservation sans altération jusqu'à l'examen des tissus. Le sang total est prélevé par ponction intracardiaque, puis après coagulation et centrifugation, le sérum est isolé pour y doser les molécules testées.

4. Matériel et méthodes

4.1. MODÈLE CELLULAIRE

La lignée cellulaire PC3 est une lignée de cellules cancéreuses prostatiques humaine isolée à partir d'une culture de métastase osseuse chez un patient de 62 ans en 1979 (Kaighn et *al.*, 1979). Elles ne semblent pas sensibles à l'effet des androgènes, glucocorticoïdes ou fibroblast growth factors (Karan *et al.*, 2002). Ces cellules permettent d'obtenir le modèle de xénogreffe de tumeur prostatique le plus utilisé dans la littérature scientifique.

Un stock de cellules PC3 est conservé dans l'azote liquide au laboratoire. Les cellules ont été fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules ont été mises en culture entre le passage 21 et le passage 26 et maintenues dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO_2 .

4.1.1. Milieu de culture

Milieu du Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (milieu de culture de base)

Le milieu de culture de base utilisé est le milieu RPMI 1640 contenant du bicarbonate de sodium, L-glutamine 2.05 mM, HEPES 20 mM, du rouge de phénol et des acides aminés non essentiels.

Milieu de RPMI 1640 complet

Pour préparer le RPMI 1640 complet, le milieu RPMI 1640 est supplémenté de sérum de veau fœtal décomplémenté (10 % en concentration finale), de pénicilline (100 UI/mL) et de streptomycine (100 µg/mL).

4.1.2. Mise en culture des cellules

Une ampoule conservée à -180 °C contenant 1 à 2 x 10⁶ cellules a été décongelée. Les cellules ont été remises en suspension dans une flasque avec 10 mL de milieu de RPMI1640 complet afin d'éliminer le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) contenu dans le liquide de congélation. Après 24 h, le surnageant a été retiré et remplacé par 10 ml de RPMI 1640 complet. Lorsque la confluence cellulaire atteint environ 80 % de la surface de la boîte de culture, le milieu est retiré, les cellules sont rincées avec du tampon salin isotonique (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS) puis mises en incubation 3 à 5 min avec de la trypsine. Les cellules décollées sont transférées dans un tube de 15 mL, centrifugées et remises en suspension avec du milieu RPMI1640 complet. Enfin, les cellules sont remises en culture dans plusieurs flasques de manière à avoir environ 1 à 2 x 10⁶ cellules par flasque. Les flasques ont été replacées en étuve à 5 % de CO₂ à 37 °C pendant 2 à 3 semaines afin d'obtenir un pool d'environ 1,5 x 10⁶ cellules par animal.

4.2. MODÈLE ANIMAL

Les travaux d'expérimentation animale ont été approuvés par le Comité d'Éthique de la région Pays de la Loire et ont reçu l'autorisation ministérielle le 10/11/2016 (numéro d'enregistrement 5 872). Les 41 animaux utilisés sont des souris Nude athymiques de 4 semaines facilitant ainsi la xénogreffe de tumeur humaine mais également la mesure précise du volume tumoral. Le plan d'expérimentation suivi est décrit en figure 1. Environ 1,5 x 10⁶ cellules PC3 par animal ont été injectées en sous-cutané au niveau du flanc droit afin de ne pas gêner la mobilité de l'animal.



Figure 1 : Répartition des animaux selon les conditions d'exposition aux différents composés.

4.3. SUBSTANCES TESTÉES

Les 4 substances ont été fournies par le BRGM. La chlordécone présente une pureté de 99,5 % (référence N12291 : Sigma-Aldrich) ; pour prendre en compte la pureté, un facteur de correction de 1,004 a été appliqué aux masses mises en œuvre pour obtenir les concentrations cibles réelles en matière active. La CLD -1Cl a une pureté de 97,2 % ; un facteur de correction de 1,03 a été appliqué pour les mêmes raisons qu'exposées ci-dessus. La CLD -3Cl présentant une pureté de 97,4 %, un facteur de correction de 1,031 a été appliqué. La CLD - 4Cl présentait une pureté plus faible de de 95,8 %, un facteur de correction de 1,047 a ainsi été appliqué.

Les 4 substances testées ont été mises en solution dans le DMSO à la concentration initiale de 0,002 g/L. Cette concentration mère a ensuite été diluée dans de l'huile d'olive alimentaire (Puget[®], France) de façon à obtenir des concentrations de 33 μ g/kg et 1,7 μ g/kg.

Le choix des doses administrées aux animaux constituait un point critique pour refléter au mieux l'effet des molécules en conditions réelles. Les doses administrées par voie orale présentées dans la littérature étaient très élevées (jusqu'à 65 mg/kg) et les animaux présentaient alors des concentrations plasmatiques très nettement supérieures à celles trouvées chez les humains exposés : 10-25 g/L versus 2,53 mg/L (concentration médiane retrouvée chez les travailleurs d'entreprise de produits sanitaires présentant des symptômes neurologiques cliniquement observés ou autodéclarés) (Wang *et al.*, 1981 ; Cannon *et al.*, 1978). Le choix a donc été fait de cibler des concentrations sanguines de 500 µg/L comme reflet de la toxicité aiguë chez l'homme et 25 µg/L comme reflet de l'intoxication chronique (Adir *et al.*, 1978 ; Cohn *et al.*, 1978). Peu de données permettaient de calculer précisément la dose à administrer chez la souris pour obtenir de telles concentrations sériques. Sachant que la biodisponibilité de la molécule est de 90 % chez le rat (Egle *et al.*, 1978), les doses pour

l'administration orale ont été calculées sur la base de l'administration intraveineuse ou intrapéritonéale chez les souris, soit pour une souris d'environ 30 g avec environ 2 mL de sang (volume pris comme volume de distribution en l'absence de données de la littérature), 33 μ g/kg et 1,7 μ g/kg pour les niveaux d'exposition haut et bas, respectivement.

4.4. MESURE DES CONCENTRATIONS SÉRIQUES

4.4.1. Prélèvement

Le sang total a été prélevé, 24 heures après le dernier gavage, par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue à insuline de 1 mL sur les animaux sous anesthésie générale. Environ 1 mL de sang total a été prélevé par animal dans des microtubes secs de 1,5 mL. Le sang a ensuite été laissé à température ambiante jusqu'à coagulation. Après centrifugation (1 300 rpm, 10 minutes) environ 400 µL de sérum a ainsi pu être collecté pour chaque animal.

4.4.2. Méthode analytique

- Solutions étalons

Le LABERCA s'est procuré les composés de référence suivants en solution dans le nonane, le cyclohexane ou l'acétonitrile :

- CLD à 100 ng/µL dans le nonane, provenant de Cambridge Isotope Laboratories ;
- 13C10-CLD à 100 ng/µL dans le nonane, provenant de Cambridge Isotope Laboratories ;
- 5b-H-CLD à 10 ng/µL dans le cyclohexane, provenant de Dr Ehrenstorfer.

Le BRGM a fourni les composés en solution suivants :

- CLD-1CL (5- ou 5a-H-CLD) à 104,6 ng/µL dans l'acétonitrile ;
- CLD-3Cl à 103,2 ng/µL dans l'acétonitrile ;
- CLD-4CI à 104,2 ng/µL dans l'acétonitrile ;
- CLDOH à 82,8 ng/µL dans l'acétonitrile.

Les solutions commerciales réalisées dans le nonane et dans le cyclohexane ont été évaporées et reprises dans un mélange eau/acétonitrile (50/50). Toutes les dilutions et mélanges ont été réalisés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50). Des solutions d'étalonnage contenant les composés natifs à des concentrations variables $(0/1/2/5/10/20/50/100 \text{ pg/}\mu\text{L})$ et le composé marqué à concentration fixe (20 pg/ μ L) ont été préparées.

- Analyse par LC-MS/MS

Les mesures ont été conduites sur un système LC-MS/MS de type triple quadipolaire (Waters Xevo TQ-S) équipé d'une source d'ionisation électrospray utilisée dans le mode négatif (ESI⁻).

Les conditions LC d'analyse ont été les suivantes :

- colonne de type Accucore C_{30} (Thermo), de longueur 100 mm, de diamètre 2,1 mm, et de granulométrie 2,6 μm ;
- température du four : 40 °C ;

- phase mobile : mélange eau / acétonitrile (ACN). Le programme utilisé a consisté en une isocratique à 50 % d'ACN (1 min), puis un gradient linéaire jusqu'à 95 % d'ACN à 5 min de temps d'acquisition. Le débit a été fixé à 0,6 mL/min ;
- volume d'injection : 2 µL.

Les conditions de mesure spectrométrique ont été les suivantes :

- tension de cône : 40 V ;
- gaz de désolvatation 500 °C, 650 L/h ;
- gaz de nébulisation : 7 bars ;
- température de source : 150 °C ;
- tension appliquée au capilaire ESI : 2,5 V ;
- débit du gaz de collision (Argon) : 0,15 mL/min.

Les composés recherchés ont été analysés dans le mode d'acquisition SRM (MS²), excepté le chlordécol. En effet, ce composé (natif ou deutéré) ne se fragmente pas dans les conditions appliquées. Aussi, son analyse a été assurée dans le mode d'acquisition SIM (MS¹). Les signaux diagnostiques suivis pour les différents composés cibles sont présentés dans le Tableau 1.

| Molécule | Signal 1 | E _{coll} (eV) | Signal 2 | E _{coll} (eV) | Signal 3 | t _R (min) | Temps d'acquisition (min) | |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|-------------|----------------------|---------------------------------|--|
| CLD-4CI | 368,8>350 ,8 | 15 | 370,8>352, 8 | 370,8>352, 15 8 | | 0,79 | [0-2,83] | |
| CLD-3CI | 402,7>322 ,7 | 15 | 404,7>324, 7 | 15 | | 1,01 | [0-2,83] | |
| 5a-H-CLD | 470,7>390 ,7 | 15 | 472,7>392, 7 | 15 | | 1,65 | [0-2,83] | |
| 5b-H-CLD | 472,7>392 ,7 | 15 | 470,7>390, 7 | 15 | | 1,97 | [0-2,83] | |
| ¹³ C-CLD (SQ) | 516,7>435 ,7 | 20 | 518,7>437, 7 | 20 | | 2,37 | [0-2,83] | |
| CLD | 506,7>426 ,7 | 20 | 508,7>428, 7 | 20 | | 2,37 | [0-2,83] | |
| CLD-OH | 488,7 | | 490,7 | | 492,7 | 3,15 | [2,83-5] | |

Tableau 1: SQ : Standard de quantification ; Ecoll : énergie de collision ; tR : temps de rétention ; Facq : fenêtre d'acquisition. Les tR sont donnés à titre indicatif. Les valeurs peuvent être sujettes à de légères variations selon le lot de colonne, la longueur de tubulure ou encore le type de pompe HPLC.

Les ions diagnostiques du chlordécol deutéré ne sont pas reportés dans le tableau ci-dessus. En effet, avec une différence d'une seule unité de masse entre le composé natif et le composé deutéré, la résolution unitaire fournie avec le spectromètre de masse utilisé n'est pas suffisante pour les séparer. L'utilisation de ce composé marqué a donc été abandonnée au profit de la chlordécone marquée. Deux exemples de chromatogrammes d'ions sont donnés en figures 2a° et 2b.



Figure 2 : Chromatogramme d'ions caractéristiques d'une injection de 2 μL de la solution d'étalonnage à 20 pg/μL (CLD-4Cl à 0,79 min transition 368,8>350,8 ; CLD-3Cl à 1,01 min transition 402,7>322,7 ; 5- ou 5a-H-CLD à 1,65 min transition 470,7>390,7 ; 5b-H-CLD à 1,97 min transition 472,7>392,7 ; CLD à 2,37 min transition 506,7>426,7 ; ¹³C-CLD à 2,37 min transition 516,7>435,7 ; CLD-OH à 3,15 min ion 488,7).

- Extraction

Les volumes des prélèvements de sérum de souris collectés sont faibles vu que la quantité prélevable est très limitée. Les prises d'essai de sérum de souris non gavées disponibles pour la mise au point s'échelonnaient de 20 à 100 µL ; elles ont été regroupées en un seul lot à partir duquel ont été réalisées des prises d'essai de 50 µL. Pour le sérum de souris gavée avec la CLD-3CI, les volumes testés ont été de 20 et 50 µL. La prise d'essai (1 V) est introduite dans un tube en verre borosilicaté de 6 mL puis 10 µL du standard de quantification sont ajoutés (solution de $^{13}C_{10}$ -CLD à 100 pg/µL dans eau/ACN), ainsi que le même volume (1 V) d'acide formique. Après agitation manuelle légère, la réaction d'hydrolyse de la matière grasse s'effectue à température ambiante pendant 20 min précisément. Pour stopper la réaction, un même volume (1 V) d'eau ultrapure est ajouté. Après agitation manuelle légère, le mélange est déposé sur une cartouche SPE C₁₈ (100 mg / 3 mL) préalablement conditionnée avec 3 mL d'ACN puis 3 mL d'eau ultrapure. La cartouche est lavée par 1 mL d'eau ultrapure ayant préalablement rincé le tube. Un deuxième rinçage de la cartouche avec 1 mL d'eau ultrapure est réalisé avant séchage par pompage sous vide pendant 45 min pour éliminer l'eau. Un troisième rinçage avec 2 mL d'hexane suivi d'un rapide séchage par le vide permet d'éliminer d'éventuels interférents (sans entraîner les composés d'intérêt). L'élution de la chlordécone et de ses dérivés est assurée en déposant 2 mL d'ACN récupérés en totalité à l'aide d'un rapide séchage par le vide dans un tube en verre. L'extrait ACN est évaporé à sec sous courant d'azote à 40 °C avant d'être repris dans 25 µL d'un mélange eau/ACN (50/50).

- Suivi des solutions

La comparaison des pentes des droites d'étalonnage interne (par rapport à la ¹³C-CLD) par composé pour chaque série d'analyses n'indique pas de différence significative entre les anciennes et les nouvelles solutions injectées dans une même série comme au cours des différentes séries. La stabilité des solutions est confirmée sur une période minimale de 16 mois pour ces conditions de conservation à +4 °C.

- Limites de quantification

Les rapports signaux sur bruits (S/N) ont été calculés pour chaque composé dans un échantillon de sérum de souris non exposée et supplémentée à un équivalent de 8 pg injectés sur la colonne (sérum dopé low, sdl) (ou 160 pg injectés (sdh) pour la CLD-4Cl). Ces valeurs S/N permettent d'estimer la limite de quantification (LOQ). La LOQ sur sérum est estimée comme étant la concentration pour laquelle le signal 2 du sdl présente un rapport S/N de 3. Les valeurs de LOD et LOQ ainsi obtenues pour les différents composés cibles sont présentées dans le Tableau 2.

| Composé | Abbréviation | LOQ serum |
|----------------------------|----------------|--------------|
| tétrahydro-Chlordécone | CLD-4Cl | 3.83 pg/µL S |
| trihydro-Chlordécone | CLD-3Cl | 0.20 pg/µL S |
| 5- ou 5a-hydro-Chlordécone | 5- ou 5a-H-CLD | 0.06 pg/µL S |
| 5b-hydro-Chlordécone | 5b-H-CLD | 0.07 pg/μL S |
| Chlordécone | CLD | 0.02 pg/µL S |
| Chlordécol | CLDOH | 0.16 pg/µL S |

Tableau 2 : Valeurs calculées des LOQ pour les six analytes d'intérêt.

Pour la CLD-4Cl, la sensibilité est moins élevée (facteur 20 environ avec la CLD-3Cl qui ellemême est inférieure d'un facteur 3 environ avec la CLD-1Cl). Cette sensibilité inférieure sur la CLD-4Cl est probablement liée à une perte d'efficacité d'ionisation sur les composés les moins chlorés.

- Blancs de procédure et de matrice d'étude non supplementée

Des blancs de procédure ont été réalisés à partir d'une prise d'essai d'eau ultrapure de même volume que celle considérée pour les prélèvements de sérum analysés (1 V). Tous les blancs de procédure analysés dans l'intégralité des séries d'essais ne présentent aucune contamination en CLD et ses dérivés.

Le pool de sérums de souris non gavées utilisé comme matrice pour les essais de supplémentation a aussi été testé sans supplémentation. Aucun des composés cibles n'a été détecté.

- Sérums supplémentés

Des essais sur matrice sérum sans supplémentation et avec supplémentations à différents niveaux ont été réalisés. Les niveaux de supplémentations correspondent à 2 et 40 pg/µL de sérum pour une prise d'essai de 50 µL. Les résultats des essais permettent de calculer les taux de récupération de la ¹³C₁₀-CLD, de la CLD et de ses dérivés. Les taux de récupération moyens obtenus sont présentés dans le Tableau 3.

| | Composé | Abbréviation Rendement Abbréviation Rendement (%) Taux de Ecart moyen (%) moyen (%) récupération taux | | Ecart-type taux de récupération | Nombre de déterminations (tous niveaux confondus) | |
|--------|----------------------------|--|-----|---------------------------------------|--|----|
| Marqué | Chlordécone marquée | ¹³ C-CLD | | 79 | 18 | 11 |
| Natifs | tétrahydro-Chlordécone | CLD-4Cl | 91 | 63 | 29 | 6 |
| | trihydro-Chlordécone | CLD-3Cl | 104 | 81 | 19 | 11 |
| | 5- ou 5a-hydro-Chlordécone | 5- ou 5a-H-CLD | 122 | 99 | 34 | 11 |
| | 5b-hydro-Chlordécone | 5b-H-CLD | 114 | 91 | 35 | 11 |
| | Chlordécone | CLD | 96 | 75 | 20 | 11 |
| | Chlordécol | CLDOH | 90 | 72 | 20 | 11 |

Tableau 3 : Taux de récupération moyens pour les six analytes cibles et l'étalon interne ¹³C-CLD.

Les performances analytiques sont conformes aux exigences européennes en vigueur qui prennent en compte les principales recommandations et les principaux critères analytiques de la décision 2002/657/EC : http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&gid=1479221617499&from=EN et du règlement 589/2014 portant fixation des méthodes de prélèvement et d'analyse d'échantillons à utiliser pour le contrôle des teneurs en dioxines, en PCB de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine de certaines denrées alimentaires : http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0589&from=EN

Les rendements (corrigés par rapport à la ¹³C-CLD) sont très satisfaisants de 90 à 114 %. Les taux de récupération (non corrigés par rapport à la ¹³C-CLD) sont satisfaisants de 72 à 99 %.

Pour la CLD-OH, le taux de récupération plus faible, 65 %, s'explique par le fait qu'une petite fraction de CLD-OH, de l'ordre de 10 à 20 %, est entrainée dans la fraction hexanique précédant la fraction ACN d'élution. L'utilisation d'un standard de quantification spécifique à la CLD-OH serait idéal, mais la CLD-OH-D₁ fournie par le BRGM n'est pas adaptée puisque, comme nous l'avons vu, la différence d'une seule unité de masse entre le composé natif et le composé marqué n'est pas suffisante pour assurer une sélectivité de mesure satisfaisante sur ce composé avec le matériel utilisé.

- Analyse préliminaire d'un sérum de souris exposée a la CLD-3cl

Des essais sur matrice sérum de souris exposée à la CLD-3Cl au niveau haut ont été réalisés sur la base de 2 prises d'essais (PE) différentes, respectivement de 20 et 50 μ L de sérum. Un chromatogramme type de l'extrait obtenu à partir d'une prise d'essai de 50 μ L est présenté en figure 3.

sg50 ACN 20160705023 1: SIR of 3 Channels ES 3.09 488.7 (CLD-OH 3) 1.04e 3.03 3 30 3.61 3.68 3 74 29 0.80 1.00 1.20 1.40 1.60 1.80 2.00 2.20 2.40 2.60 2.80 3.00 3.20 3.60 3 40 20160705023 MRM of 8 Channels ES-2 4 5 516.7 > 435.7 (13C-CLD 1) 100 2.23e7 0 2 00 2 20 2 40 2 80 3 00 3 20 0 80 1 00 1 20 $1\dot{4}0$ 1 60 1 80 2 60 $3\dot{4}0$ 3 60 20160705023 2: MRM of 8 Channels ES-2.68, 2.71 506.7 > 426.7 (CLD 1) 100 2.51 2.53 9.38e3 MA 2,76 2.49 8 2.81 2.13^{2.21} 2.34 1.21 1.26 1.37 1.45 1.54 1.59 1.82 0.96,0.98 1.07 1.89 1.99 79 0 1.40 3.60 0.80 1.60 1.80 2.00 2 40 2 60 2.80 3.00 3 20 3.40 1.00 1.20 2 20 2: MRM of 8 Channels ES-20160705023 472.7 > 392.7 (5a et 5b-H-CLD 1) .174 1.69 9.89e 1 83 60 1.351.43 1.48 1.29 _1.86 2.00 8 2,10 1.20 2.33 2.35 2.37 2.52 2.54 2.70 2.73 W 0.82 0.98.1.02 0 80 2 20 3.00 3 20 3 60 1 00 1 20 1 40 1 60 1 80 2 00 2 40 2 60 2 80 3 40 20160705023 2: MRM of 8 Channels ES-470.7 > 390.7 (5a et 5b-H-CLD 2) 100 9.02e3 1.77 1.25 1.28 1.30 1.63 1.81 1.48 1,91 0.76 2.38 2.49 2.54 2.66 0.90 1.03 2.13 2.15 2.25 2,79,2,81 0 0.80 2 60 1 00 1 20 1 40 1.60 1.80 2.00 2 20 2 40 2 80 3 00 3 20 3 40 3 60 2: MRM of 8 Channels ES-402.7 > 322.7 (CLD-3CI 1) 1.06 8 0 Time 0 80 1.00 1.20 1.40 1.60 1.80 2.00 2 20 2 40 2.60 2 80 3 00 3.20 3.40 3 60

Figure 3 : Chromatogramme d'ions d'un extrait de sérum de souris exposée à la CLD-3Cl (CLD-3Cl à 1,06 min transition 402,7>322,7 ; 5- ou 5a-H-CLD à 1,71 min transition 470,7>390,7 ; 5b-H-CLD à 2,05 min transition 472,7>392,7 ; CLD à 2,46 min transition 506,7>426,7 ; 13C-CLD à 2,45 min transition 516,7>435,7 ; CLD-OH à 3,20 min ion 488,7).

4.5. ANALYSE DES COUPES DE TUMEUR PROSTATIQUE

La protéine CD31, appelée également PECAM1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1), est exprimée au niveau des jonctions intercellulaires des artérioles ainsi que de certaines cellules sanguines (DeLisser *et al.*, 1997). Le marquage immunochimique par anticorps anti-CD31 cible donc les marqueurs CD31 présents au niveau des vaisseaux. Ce marquage a été effectué selon les protocoles standards.

Brièvement, la tumeur prostatique a été coupée en tranches de 7 µm d'épaisseur à -20 °C à l'aide d'un cryostat. Ces sections ont été déposées sur une lame puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 10 minutes. Enfin, pour éviter tout marquage non spécifique, les tissus ont été bloqués avec de l'albumine de sérum bovin à 4 % pendant 1 heure à température ambiante.

Si la tumeur est composée de cellules humaines, les vaisseaux en revanche proviennent de la souris. Ce sont donc des anticorps anti-souris qui ont été utilisés. Les sections bloquées par l'albumine ont été incubées toute la nuit avec des anticorps anti CD-31 (1:500, 10 µg/mL, Purified Rat Anti-Mouse CD31, BD Biosciences) à 4 °C. Dans un second temps, après lavages au PBS, un anticorps secondaire biotinylé (1:200, Biotinylated Goat Anti-Rat IgG Antibody, mouse adsorbed, Vector BA-9401) reconnaissant le précédent anticorps permet la révélation

sous fluorescence à l'aide du kit Streptavidin, Alexa Fluor[®] 488 conjugate (1:500, ThermoFisher Scientific). Enfin, un marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) au 1:10000 a été effectué pendant 3 minutes. Cette molécule se lie à l'ADN de toutes les cellules en émettant une fluorescence entre 450-490 nm permettant ainsi de visualiser les noyaux des cellules présentes dans la coupe.

Les vaisseaux ont été quantifiés dans les zones les plus représentatives, identifiées par balayage des coupes de tumeurs à l'objectif x40 avec un microscope confocal. Les surfaces totales occupées par les vaisseaux tumoraux identifiés par la coloration de CD31 dans 3 spots par tumeur ont été calculées avec le logiciel ImageJ.

4.6. FORMATION DU RESÉAU CAPILLAIRE *IN VITRO* SUR LE GEL ECM

Après 24 heures d'incubation avec la CLD et CLD-4Cl aux concentrations 5 x 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M et 10⁻¹¹ M [l'effet des deux métabolites CLD-1Cl et CLD-3Cl avait été préalablement étudié aux mêmes concentrations et présenté dans le rapport de 2016 (Mouvet *et al.*, 2016)], les HUVECs ont été détachées avec la trypsine / acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA). Les cellules ont été cultivées avec une densité de 10⁴ cellules par puit puis ont été recouvertes avec le gel ECM[®] (Sigma-Aldrich). Brièvement, 10 µL de gel ont été ajoutés dans une plaque Ibidi[®] de quinze puits qui a été solidifié pendant 45 minutes à 37 °C. Ensuite, les cellules ont été incubées avec le milieu de culture contenant 10 % de SVF à 37 °C pendant 24 heures. La formation des tubes a été examinée par un microscope à contraste de phase (MOTIC AE21) après 24 heures et la longueur moyenne de capillaires a été quantifiée en utilisant le logiciel image J.

4.7. ESSAI DE PROLIFÉRATION SUR LES CELLULES TUMORALES PC-3

L'effet de la CLD, la CLD-1 Cl, la CLD-3Cl et la CLD-4Cl sur la prolifération des cellules prostatiques humaines PC-3 (ATCC[®], CRL-1435) a été analysé en utilisant le kit CYQUANT[®] DIRECT CELL PROLIFERATION ASSAY KIT (Invitrogen[®]). Brièvement, 5 x 10³ cellules ont été cultivées dans une plaque 96 puits pendant 24 heures et ensuite les cellules ont été traitées avec la CLD, la CLD-1 Cl, CLD-3Cl ou CLD-4Cl aux concentrations 10⁻⁶ M et 5 x 10⁻⁸ M (celles-ci reflètent les concentrations plasmatiques qui étaient ciblées par les doses de gavage de 33 µg/kg et 1,7 µg/kg) pendant 24 heures. Ont alors été ajoutés 100 µL de mélange de réactif de détection (Cyquant[®] direct nucleic acid stain et Cyquant[®] direct Direct background suppressor 1) à 100 µL de milieu de culture par puits et les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 60 minutes. Les niveaux de la fluorescence ont été lus par un lecteur de microplaques fluorescent (Clariostar) avec un filtre à 508 nm d'excitation et 527 nm d'émission.

4.8. ANALYSES STATISTIQUES

L'évolution de la taille des tumeurs, les différentes concentrations dans le sérum et l'aire occupée par les néovaisseaux ont été comparées entre les différents groupes avec le test d'ANOVA. P < 0,05 a été considéré comme significatif statistiquement.

5. Résultats

5.1. EFFET DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS SUR LA CROISSANCE TUMORALE CHEZ LA SOURIS

Chez les souris traitées avec la plus forte dose (33 µg/kg), la croissance du volume tumoral pour la CLD est significativement supérieure à celle des animaux témoins (p = 0,01). Par contre, la croissance tumorale par rapport aux animaux traités par CLD est moindre chez ceux ayant reçu les deux dérivés CLD-3Cl (p = 0,035) et CLD-4Cl (p = 0,025), mais pas ceux traités par la CLD-1CL (p = 0,11) (Figure 4). La croissance tumorale des souris traitées par la CLD-1Cl n'est pas augmentée de façon significative par rapport à celle des animaux traités par la CLD -3Cl (p = 0,7), ni par rapport à celle des souris témoins (p = 0,058) et celles traitées par CLD-4Cl (p = 0,3). Dans le groupe des souris traitées par la CLD-3Cl, la croissance tumorale ne présente pas de différence significative par rapport à celle des souris traitées par la CLD-4Cl (p = 0,59) et à celle des souris témoins (p = 0,06). Le volume tumoral des souris traitées avec la CLD-4Cl n'a aucune différence significative par rapport à celui des témoins (p = 0,07).

Chez les souris traitées à la dose ingérée plus faible (1,7 µg/kg), une forte augmentation du volume tumoral est retrouvée chez les animaux traités par la CLD par rapport aux témoins (p = 0,028). La croissance du volume tumoral des animaux traités par la CLD est similaire à celle des souris traitées par la CLD-1Cl mais elle est, pour la CLD et CLD-1CL, significativement supérieure à celle des souris témoins (p = 0,028 pour CLD vs Ctrl et p = 0,035 pour CLD-1Cl vs Ctrl). À l'inverse, cette croissance tumorale n'est pas augmentée de façon significative chez les souris traitées par la CLD-3Cl (p = 0,3) et la CLD-4Cl (p = 0,1) (Figure 5). La croissance tumorale dans le groupe des souris traitées par la CLD-3Cl est similaire à celle des souris traitées par la CLD-4Cl et n'a aucune différence significative par rapport à celle des souris témoins (p = 0,18 pour CLD-3Cl vs Ctrl et p = 0,11 pour CLD-4Cl vs Ctrl).



Figure 4 : Évolution de la croissance tumorale chez les souris traitées à la concentration la plus élevée, 33 μg/kg. (**p=0,01 CLD vs DMSO), (*p=0,035 CLD vs CLD-3Cl) ; (*p=0,025 CLD vs CLD-4Cl). n= 3 pour DMSO; 4 pour CLD ; 3 pour CLD-1Cl ; 6 pour CLD-3Cl ; 6 pour CLD-4Cl.



Figure 5 : Évolution de la croissance tumorale chez les souris traitées à la concentration la plus basse, 1,7 µg/kg. (*p=0,028 CLD vs DMSO) ; (*p=0,035 CLD-1Cl vs DMSO) . n= 3 pour DMSO; 5 pour CLD ; 4 pour CLD-1Cl ; 4 pour CLD-3CL ; 6 pour CLD-4Cl.

5.2. DOSAGES SÉRIQUES DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS

Les résultats montrent une concentration sérique moyenne de CLD de 192,8 et 26,3 μ g/L selon la dose ingérée (Tableau 4). Bien que la valeur la plus élevée soit en deçà de la concentration visée (500 μ g/), les valeurs observées restent cependant dans l'ordre de grandeur de celles retrouvées dans la littérature.

Les animaux traités par la CLD-1CI, la CLD-3CI et la CLD-4CI ont une concentration plasmatique beaucoup plus faible que ceux traités par CLD à des doses administrées identiques. Les CLD-1CI, CLD-3CI et CLD-4CI sont moins absorbées ou plus rapidement éliminées que la CLD. Il est à noter qu'avec la dose ingérée de 1,7 µg/kg la concentration en CLD-4CI est passée sous la limite de détection de l'appareillage utilisé.

| Gavage | | Conc. moy. (pg/µL sérum) | | | Ecart-Type (pg/μL sérum) | | | Ratio Conc. | |
|-------------------|-------|--------------------------|---------|--------------------|--------------------------|----------------|---------|-------------|----------|
| molécule / niveau | CLD | 5- ou 5a-H-CLD | CLD-3Cl | CLD-4Cl | CLD | 5- ou 5a-H-CLD | CLD-3Cl | CLD-4Cl | haut/bas |
| contrôle | 3.2 | 0.3 | | | 0.9 | 0.1 | | | |
| CLD / bas | 26.3 | 1.3 | | | 12.7 | 0.7 | | | 7.3 |
| CLD / haut | 192.8 | 1.1 | | | 73.6 | 0.6 | | | |
| CLD-1Cl / bas | 1.0 | 11.9 | | | 0.2 | 3.2 | | | 5.7 |
| CLD-1Cl / haut | 1.3 | 67.1 | 0.5 | | 0.1 | 21.2 | 0.3 | | |
| CLD-3Cl / bas | 0.6 | 0.9 | 4.0 | | 0.3 | 0.2 | 5.5 | | |
| CLD-3Cl / haut | 0.3 | 1.1 | 6.1 | | 0.2 | 0.9 | 4.3 | | 1.5 |
| CLD-4Cl / bas | 0.3 | 0.3 | | | 0.1 | 0.1 | | | |
| CLD-4Cl / haut | 0.3 | 0.2 | | 2.2 | 0.1 | 0.1 | | 0.9 | |
| | | | | < LOQ mais détecté | | | | | |

Tableau 4 : Concentrations mesurées pour les six analytes cibles dans les échantillons de sérum de souris.

5.3. EFFET DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS SUR LA NÉOVASCULARISATION

IN VITRO

Les essais *in vitro* réalisés dans une étude précédente (Legeay *et al.*, 2017) suggèrent que la CLD-1Cl et la CLD-3Cl possèdent un effet pro-angiogénique plus faible que la molécule mère CLD sur des cellules HUVECs (cellules endothéliales de la veine ombilicale humaines). La présente étude disposant d'un dérivé supplémentaire, la CLD-4Cl, par rapport aux travaux susmentionnés, l'occasion a été saisie de compléter les données in vitro en traitant des cellules HUVECs en présence ou absence de la CLD ou de CLD-4Cl, utilisées comme par Legeay et coll. à trois concentrations 5 x 10⁻⁸ M (concentrations qui a été trouvée dans le plasma des patients exposés), 10⁻¹¹ M (concentration qui a été trouvée dans l'eau potable), et 10⁻⁹ M (concentration intermédiaire) pendant 24 heures. Les résultats indiquent que la CLD-4Cl n'augmente pas significativement la longueur moyenne unitaire des capillaires par rapport au contrôle pour les trois concentrations utilisées (5 x 10⁻⁸ M, p = 0,064 ; 10⁻⁹ M, p = 0,063 ; 10⁻¹¹ M, p = 0,003 ; 10⁻¹¹ M, p = 0,009) (Figures 6 et 7).

IN VIVO

Pour les deux concentrations utilisées (33 et 1,7 μ g/kg), le traitement des souris par la CLD augmente très significativement la vascularisation des tumeurs (p = 0,0009 et 0,0007) (Figures 8 et 9). Cette densité capillaire tumorale est réduite pour les métabolites CLD-1Cl (p = 0,031 et 0,01) et encore plus pour CLD-3Cl (p = 0,0005 et 0,0003), mais reste toujours significativement supérieure par rapport aux animaux contrôle traités seulement par le solvant (DMSO) (p = 0,0009 et 0,0007). La vascularisation des tumeurs traitées par la CLD-4Cl aux deux doses est encore plus faible (p = 0,0001 et 0,0001) par rapport à la CLD que la vascularisation engendrée par la -1 et la -3 Cl, et ne montre même plus de différence avec celle des animaux ne recevant que le solvant (DMSO) (p = 0,5 et 0,45).



Figure 6 : Longueur des capillaires formés par des HUVECs traitées avec la CLD et la CLD-4Cl pendant 24 heures aux concentrations 5×10^8 M, 10^9 M et 10^{11} M. n = 6. (Échelle : 1 mm).



Figure 7 : Longueur des capillaires formés par des HUVECs traitées avec la CLD et la CLD-4Cl pendant 24 heures aux concentrations $5 \times 10^8 M$, $10^9 M$ et $10^{11} M$. n = 6, **p < 0.01, CLD vs CLD-4Cl; ***p = 0,001, CLD vs Ctrl.

CLD

CLD-4 CI

n

Ctrl





Les aires des néovaisseaux au sein de la tumeur ont été mesurées sur trois champs de vue représentatifs du la tumeur (exceptionnellement 2 si la coupe était trop petite). Cette analyse a été effectuée pour chaque animal. Des résultats d'immunomarquage représentatifs sont donnés à titre d'exemple sur la figure 8.



Figure 9 : Aire occupée par les néovaisseaux selon les traitements. *p = 0,03, CLD vs CLD-1Cl; **p = 0,01, CLD vs CLD-1CL ; ***p<0,001, CLD vs DMSO, CLD vs CLD-3CL, CLD vs CLD-4Cl.

5.4. EFFET DE LA CHLORDÉCONE ET DE SES DÉRIVÉS DÉCHLORÉS SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES TUMORALES PC-3

Afin de conforter l'hypothèse selon laquelle l'effet de la CLD et ses trois dérivés déchlorés sur le développement de la croissance tumorale provenait de leur effet pro-angiogénique et non de leur effet sur la croissance des cellules PC-3, la prolifération de ces dernières a été quantifiée en les traitant en présence ou absence de la CLD, CLD-1Cl, CLD-3Cl ou CLD-4Cl pendant des périodes de temps séquentielles de 24, 48 et 72 heures à 37 °C (Figures 10, 11 et 12).

La prolifération des cellules traitées par la CLD, la CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl est similaire à celle des cellules traitées avec le seul solvant (DMSO), quelle que soit la durée du traitement :

- à 24 h, 10^{-6} M, p = 0,39 et à 5 x 10^{-8} M, p = 0,39 ;
- à 48 h, 10⁻⁶ M, p = 0,34 et à 5 x10⁻⁸ M, p = 0,39 ;
- à 72 h, 10^{-6} M, p = 0,31 et à 5 x 10^{-8} M, p = 0,20.

Ces résultats suggèrent que l'effet observé sur le développement de volume tumoral de la CLD et de ses trois dérivés déchlorés ne provient pas de la prolifération des cellules tumorales prostatiques et renforcent ainsi l'hypothèse de leur impact sur l'angiogenèse.



Figure 10 : Prolifération des cellules PC-3 traitées avec la CLD, la CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl pendant 24 heures. n = 6.



Figure 11 : Prolifération des cellules PC-3 traitées avec la CLD, la CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl pendant 48 heures. n = 6.



Figure 12 : Prolifération des cellules PC-3 traitées avec la CLD, la CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl pendant 72 heures. n = 6.

6. Discussion

Bien que la raison d'être majeure de cette étude était l'approche *in vivo*, des résultats *in vitro* ont été obtenus, complétant ceux des études antérieures (Mouvet *et al.*, 2016 ; Legeay *et al.*, 2017). Pour la CLD-4CI, nouveau dérivé étudié ici, la formation des capillaires *in vitro* est significativement réduite par rapport à celle de la CLD. La diminution de l'angiogenèse *in vitro* associée à la diminution du niveau de chloration de la molécule est observée dans 2 études totalement indépendantes mettant en œuvre les 4 substances aux mêmes concentrations : CLD> CLD-1Cl> CLD-3Cl, Legeay *et al.* 2017 ; CLD >> CLD-4Cl, présente étude. Il s'agit donc d'une tendance indéniable, mais que l'approche *in vivo* aurait pu invalider.

Ce n'est pas le cas, les expérimentations *in vivo* de la présente étude montrant que la déchloration de la CLD par *In Situ Chemical Reduction* (ISCR) conduit à une diminution des effets pro-angiogéniques résultant en une réduction de la croissance de tumeurs prostatiques chez la souris.

Avec un niveau de déchloration de 1 (CLD-1Cl), les souris traitées *in vivo* à deux concentrations 33 µg/kg et 1,7 µg/kg, reflétant respectivement une exposition aiguë et chronique chez l'homme (Adir *et al.*, 1978 ; Cohn *et al.*, 1978), l'effet pro-angiogénique n'est pas différent de celui de la molécule mère, ce qui confirme les données *in vitro* publiées précédemment. On pouvait craindre un effet négatif plus fort du dérivé : ce n'est pas le cas. Cet effet pro-angiogénique de la CLD et de la CLD-1Cl est associé à une croissance rapide de tumeurs de cellules prostatiques humaines par rapport à des souris témoins.

Une déchloration de niveau 3 (CLD-3Cl) expose à des effets pro-angiogéniques plus faibles que ceux de la CLD-1CL, associés à une évolution du volume tumoral moins importante. Les effets sont encore plus réduits avec la CLD-4Cl qui n'a pas montré d'effets pro-angiogéniques par rapport au contrôle. Ces résultats indiquent donc que la déchloration de la CLD réduit ses propriétés pro-angiogéniques quand 3 Cl ou 4 Cl ont été remplacées par un H. Cependant, le remplacement d'un seul Cl par un H n'a pas d'effet statistiquement significatif. L'absence d'étalons en pureté et masse suffisante n'a pas permis de tester le niveau 2 de déchloration (CLD-2Cl).

Le mécanisme responsable de la diminution de l'effet pro-angiogénique par la déchloration de la CLD reste à ce jour inconnu. Il a été démontré que le blocage pharmacologique du récepteur de type alpha aux estrogène (ERa) ou le *silencing* d'ERa par un siRNA prévient l'angiogenèse induite par la CLD, *in vitro* sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs) cultivées sur le gel ECM[®], et *in vivo* sur un modèle de Matrigel[®] plug utilisé chez la souris (Clere *et al.,* 2012). Il serait donc intéressant d'estimer la possibilité d'interaction entre les dérivés déchlorés de CLD et le récepteur ERa.

Dans la présente étude, l'augmentation significative de la concentration sérique de la CLD chez les animaux traités par les deux doses d'exposition est associée à une croissance de tumeurs plus forte que chez les animaux témoins. Ces résultats confirment les données *in vivo* publiées précédemment pour la CLD. Plus important, la concentration sérique de CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl retrouvée chez les souris est significativement plus faible que celle de la CLD (CLD > CLD-1Cl> CLD-3Cl> CLD-4Cl) et cette faible teneur dans le sérum est associée de manière parallèle à une plus faible croissance tumorale (CLD > CLD-1Cl> CLD-3Cl> CLD-4Cl).

Le mécanisme responsable de la diminution de la concentration sérique des dérivés déchlorés de la CLD par rapport à la molécule mère n'est pas identifié dans cette étude, dont ce n'était pas l'objectif. Des études sur la distribution et l'excrétion de la CLD chez la souris après administration orale de CLD indiguent une absorption facile par le tractus gastro-intestinal (Egle et al., 1978), les concentrations les plus élevées étant trouvées dans le sang, le tissu adipeux et le foie (Kavlock et al., 1980). Cependant, une élimination lente de CLD par le foie a été confirmée chez les animaux (Egle et al., 1978 ; Hewitt et al., 1986 ; Belfiore et al., 2007). Chez l'homme, la CLD est éliminé lentement du sang. Les estimations de la demi-vie sérique de la CLD $(t_{1/2})$ chez les travailleurs des industries de chimie ont varié de 63 à 128 jours (Adire et al., 1978). Cohn et al., 1978 ont utilisé la cholestyramine comme traitement possible de l'intoxication à la CLD afin de prévenir la réabsorption de la CLD dans le tractus gastrointestinal par le recyclage entéro-hépatique. La cholestyramine est une résine échangeuse d'ion qui lie la CLD sans être absorbée dans le tractus gastro-intestinal. Le traitement par la cholestyramine a réduit la t_{1/2} de la CLD chez les travailleurs de 165 à 80 jours. La différence de concentration sérique entre la CLD et ses dérivés déchlorés peut être expliquée par une moindre absorption ou une élimination plus rapide de CLD-1CI, CLD-3CI et CLD-4CI (voire l'association des deux phénomènes) réduisant l'exposition des animaux à ces trois molécules. Les mécanismes responsables de la réduction de la concentration sérique des différents métabolites de CLD par rapport à la molécule mère mériteraient d'être étudiés de manière plus approfondie.

Une information majeure et novatrice est étayée par les travaux de cette étude *in vivo* : la déchloration de la CLD suite à la mise en œuvre du procédé de décontamination des sols par ISCR diminue significativement son effet proangiogénique résultant en une diminution significative de la croissance tumorale. La déchloration de la CLD diminue son effet proangiogénique de façon d'autant plus importante que le nombre de CI remplacés par un H est élevé. La genèse par ISCR de dérivés déchlorés de la CLD n'est donc pas une source de toxicité accrue, au contraire. Le traitement des sols contaminés par la CLD par la technique ISCR pourrait donc contribuer, certes indirectement, à limiter certains effets sanitaires délétères de la contamination des sols par la CLD.

7. Conclusions et perspectives

Des études ont montré que la néoangiogenèse serait impliquée dans le développement de cancers de la prostate induits par la CLD. Une diminution de l'effet cancérigène de la CLD passerait donc notamment par une diminution de son potentiel pro-angiogénique.

La méthode *In Situ Chemical Reduction* (ISCR) appliquée pour la décontamination des sols contenant de la chlordécone (CLD) génère des métabolites partiellement déchlorés de la CLD. Une étude précédente a permis de montrer que 2 composés déchlorés de la CLD, la 5- ou 5a-hydroCLD (monohydroCLD, CLD dont le Cl en position 5 ou 5a a été remplacé par un H) et une tri-hydroCLD (CLD-3Cl), possédaient des propriétés pro-angiogéniques *in vitro* plus faibles que la CLD (Legeay *et al.*, 2017). Par contre, rien n'était connu au début de la présente étude sur l'effet pro-angiogénique *in vivo* de ces produits déchlorés. L'objectif de cette étude était donc de confirmer les résultats préliminaires *in vitro* sur un modèle *in vivo* de cancer de prostate humain.

L'effet pro-angiogènique de dérivés déchlorés de la CLD a été évalué sur un modèle murin de tumeur prostatique humaine traité par CLD, CLD-1Cl, CLD-3Cl et CLD-4Cl à deux niveaux d'exposition : 33 µg/kg et 1,7 µg/kg reflétant respectivement une exposition toxique aiguë et chronique chez l'Homme (Adir *et al.*, 1978 ; Cohn *et al.*, 1978).

Les résultats des dosages des concentrations sériques montrent que, pour une même dose ingérée, ces trois métabolites sont significativement moins présents dans le sérum que la CLD.

Les tumeurs de cellules prostatiques ont évolué moins rapidement dans les groupes traités par les trois métabolites que dans celui traité par la CLD et ce quelle que soit la concentration utilisée. La vascularisation mesurée sur les coupes de tumeurs était inversement proportionnelle au taux de déchloration, le traitement par la CLD-4Cl ne montrant pas de différence avec les animaux témoins traités avec l'huile, véhicule utilisé pour toutes les substances testées.

On peut donc conclure que l'effet pro-angiogénique de la CLD est significativement diminué suite à la déchloration résultant de l'ISCR, et penser que l'effet cancérigène sera logiquement réduit. Des investigations plus poussées seraient nécessaires pour élucider les mécanismes moléculaires par lesquels la déchloration de la CLD réduit ses effets cancérogènes et pro-angiogéniques.

8. Bibliographie

Adir J., Caplan YH., Thompson BC. (1978) - Kepone serum half-life in humans. Life Sci 22(8):699-702.

Baeriswyl V., Christofori G. (2009) - The angiogenic switch in carcinogenesis, Semin. Cancer Biol. 19 329-337.

Belfiore, C.J., Yang, R.S.H., Chubb, L.S., Lohitnavy, M., Lohitnavy, O.S., and Andersen, M.E. (2007) - Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling. Toxicology 234, 59-72.

Belghit H., Colas C., Bristeau S., Mouvet C., Maunit B. (2015) - Liquid chromatographyhigh-resolution mass spectrometry for identifying aqueous chlordecone hydrate dechlorinated transformation products formed by reaction with zero-valent iron. International Journal of Environmental Analytical Chemistry Vol. 95, Iss. 2.

Bertrand J. A., Abarnou A., Bocquené G., Chiffoleau J. F., Reynal L. (2009) - Diagnostic de la contamination chimique de la faune halieutique des littoraux des Antilles françaises. Campagnes 2008 en Martinique et en Guadeloupe. Ifremer, Martinique. ; http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2009/rapport-6896.pdf.

Bichon E., Guiffard I., Venisseau A., Marchand P., Antignac J. P., Le Bizec B., (2015). "Ultra-trace quantification method for chlordecone in human fluids and tissues." J Chromatogr A 1408: 169-177.

Bocquené G., Franco A. (2005) - Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Mar. Poll. Bull.*, *51* (5-7), 612-619.

Caldwell V., Loch-Caruso R., (1992) - Chlordecone rapidly and reversibly inhibits gap junctional communication in human embryonic palatal mesenchyme cells. In Vitro Toxicol 5(2):113-122

Cannon S.B., Veazey J.M., Jackson R.S., Burse V.W., Hayes C., Straub W.E., Landrigan P.J., Liddle J.A. (1978) - Epidemic Kepone poisoning in chemical workers. Am J Epidemiol 107:529-537.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011) - Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 473, 298-307.

Coat S., Bocquené G., Godard E. (2006) - Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquat. Living Resour.* 19 (2), 181-187.

Coat S., Monti D., Legendre P., Bouchon C., Massat, F., Lepoint G. (2011) - Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environ. Pollut., 159* (6), 1692-1701.

Cohn, W.J., Boylan, J.J., Blanke, R.V., Fariss, M.W., Howell, J.R., and Guzelian, P.S. (1978). Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. N. Engl. J. Med. 298, 243-248.

Clere N., Lauret E., Malthiéry Y, Andriantsitohaina R., Faure S. (2012) - Estrogen receptor alpha as a key target of organochlorines to promote angiogenesis. Angiogenesis;15(4):745-60.

Cohn WJ., Boylan JJ., Blanke RV *et al.* (1978) - Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine: results of a controlled trial. N Engl J Med 298:243-248.

Dallaire R., Muckle G., Rouget F., Kadhel P., Bataille H., Guldner L. *et al.* (2012) - Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. *Environ. Res.*, *118*, 79-85.

DeLisser H.M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R.M., Burdick M.D., Robinson C.S., Wexler R.S., Kerr J.S., Garlanda C., Merwin J.R., Madri J.A., Albelda S.M. (1997) - Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis., Am. J. Pathol. 151 671-677.

Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon JP., Giudice LC., Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. (2009) - Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev 30:293-342, 2009.

Egle JL., Jr. Fernandez JB., Guzelian PS. *et al.* (1978) - Distribution and excretion of chlordecone (Kepone) in the rat. Drug Metab Dispos 6(1):91-95.

Eroschenko VP (1981) - Estrogenic activity of the insecticide chlordecone in the reproductive tract of birds and mammals. J Toxicol Environ Health 8:731742.

Fariss MW., Blanke RV., Saady V. et al. (1980) - Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (Kepone) in humans. Drug Metab Dispos 8:434-438.

Guzelian PS. (1982) - Chlordecone poisoning: a case study in approaches for the detoxification of humans exposed to environmental chemicals. Drug Metab Rev 13:663-679.

Hanahan D., Folkman J. - Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, Cell 86 (1996) 353-364.

Hanahan D. - R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, Cell 144 (2011) 646-674.

Hewitt, L.A., Caillé, G., and Plaa, G.L. (1986). Temporal relationships between biotransformation, detoxication, and chlordecone potentiation of chloroform-induced hepatotoxicity. Can. J. Physiol. Pharmacol. 64, 477-482.

InVS-Inserm (2009) - Impact sanitaire de l'utilisation du chlordécone aux Antilles françaises -Recommandations pour les recherches et les actions de santé publique - Synthèse - Octobre 2009. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire, janvier 2010, 26 p.

Jondreville C., Lavigne A., Jurjanz S., Dalibard C., Liabeuf J. M., Clostre F., Lesueur-Jannoyer M. (2014) - Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West Indies): a field study. *Sci. Tot. Environ*, *493*, 336-341.

Kadhel P., Monfort C., Costet N., Rouget F., Thomé J. P., Multigner L., Cordier S. (2014) -Chlordecone exposure, length of gestation and risk of preterm birth. *Am. J. Epidemiol.*, *179* (5), 536-544.

Kaighn, M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., Lechner J. F., Jones L.W. (1979) - Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol. 17 (1): 16-23.

Karan D, Kelly D.L, Rizzino A., Lin M.F, Batra S.K. (2002) - Expression profile of differentially-regulated genes during progression of androgen-independent growth in human prostate cancer cells.Carcinogenesis; 23(6):967-75.

Kavlock R.J., Chemoff N., Rogers E., Whitehouse D. (1980) - Comparative tissue distribution of mirex and chlordecone in fetal and neonatal rats. Pestic Biochem Physiol 14(3):227-235.

Kitchin K.T., Brown J.L. (1989) - Biochemical studies of promoters of carcinogenesis in rat liver. Teratogen Carcinogen Mutagen 9:273-285.

Legeay S., Billat P. A., Clere N., Nesslany F., Bristeau S., Faure S., Mouvet C., 2017. Two dechlorinated chlordecone derivatives formed by in situ chemical reduction are devoid of genotoxicity and mutagenicity and have lower proangiogenic properties compared to the parent compound. Env. Sci. Poll. Res., DOI 10.1007/s11356-017-8592-6.

Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B., Gustafsson J.A. (1998) - Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139:4252-4263.

Lagarrigue M., Lavigne R., Tabet E., Genet V., Thomé J.P., Rondel K., Guével B., Multigner L., Samson M., Pineau C. (2014) - Localization and in situ absolute quantification of chlordecone in the mouse liver by MALDI imaging. Anal Chem.; 86(12):5775-83.

Lemaire G., Mnif W., Mauvais P., Balaguer P., Rahmani R. (2006) - Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. Life Sci 79: 1160-1169, 2006.

Mitra A., Richards I., Kitchin K., Conolly R., Kulkarni A.P. (1990) - Mirex induces ornitine decarboxylase in female rat liver. J Biochem Toxicol 5(2):119-124.

Monti D., Coat S. (2007) - La contamination des espèces d'eau douce. *Les Cahiers du Pram.*, 7, 29-33.

Mouvet C., Collet B., Gaude J M. (2016) - Décontamination par In Situ Chemical Reduction d'un nitisol et d'un sol alluvionnaire pollués par la chlordécone. Résultats physico-chimiques et agronomiques. Rapport final. BRGM/RP-65462-FR, 188p., 61 ill., 61 tabl., 1 ann. http://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-58704-FR.pdf. Téléchargé le 2 mai 2017.

Mouvet C., Collet B., Gaude J. M., Bristeau S., Rangon L., Lesueur-Jannoyer M., Jestin A., (2016) - Décontamination par *In Situ* Chemical Reduction d'un nitisol et d'un sol alluvionnaire pollués par la chlordécone. Résultats physico-chimiques et agronomiques. Rapport BRGM/RP-65462–FR, sous presse.

Mouvet C., Nesslany F., Lobez F., Legeay S., Faure S. (2016) - Comparaison de la toxicité cellulaire de la chlordécone et de deux de ses dérivés déchlorés formés par réduction chimique. Rapport final. BRGM/RP-65592-FR. 64 p., 5 fig., 14 tab.

Multigner L, Jean-Rodrigue Ndong, Arnaud Giusti, Marc Romana, Hélène Delacroix-Maillard, Sylvaine Cordier, Bernard J'egou, Jean-Pierre Thome and Pascal Blanchet (2010) - Chlordecone Exposure and Risk of Prostate Cancer. Journal of Clinical Oncology 28: 28:3457-3462.

Multigner L, Kadhel P, Rouget F, Blanchet P, Cordier S (2016) Chlordecone exposure and adverse effects in French West Indies populations. Environ Sci Pollut Res Int 23:3-8.

NCI (National Cancer Institute) (1976) - Report on carcinogenesis bioassay of technical grade chlordecone (Kepone) (CAS No. 143-50-0). Carcinogenesis Program, Division of Cancer Cause and Prevention, National Cancer Institute, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services; NTP TR-00. Available online at http://ntp.niehs.nih.gov/ (accessed June 25, 2009).

Prins GS (2008) - Endocrine disruptors and prostate cancer risk: Endocr Relat Cancer 15:649-656.

Starcevic SL., Bortolin S., Woodcroft KJ. *et al.* (2001) - Kepone (chlordecone) disrupts adherens junctions in human breast epithelial cells cultured on Matrigel. In Vivo 15:289-294.

Taylor JR. (1985) - Neurological manifestations in humans exposed to chlordecone: follow-up results. Neurotoxicology 6(1):231-236.



Centre scientifique et technique Direction Eau, Environnement & Écotechnologies 3, avenue Claude-Guillemin BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34 www.brgm.fr