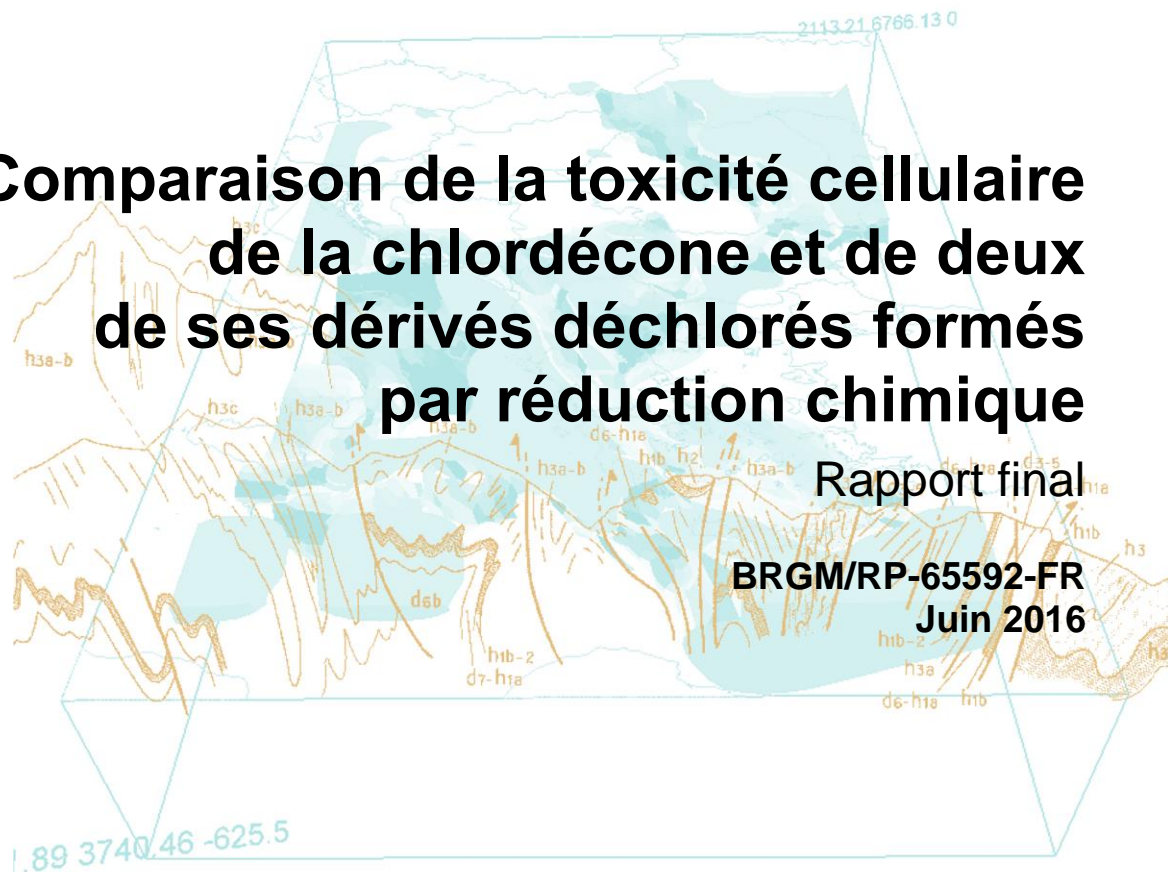


Document public

# 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  
Juin 2016



Géosciences pour une Terre durable

**brgm**



# 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**

Juin 2016

Étude réalisée dans le cadre des opérations (projets)  
de Service public (Recherche) du BRGM 2015


**C. Mouvet, F. Nessler, F. Lobez, S. Legeay, S. Faure**

**Vérificateur :**

Nom : A. Mauffret

Fonction : Microbiologiste

Date : 28/06/2016

Signature : 

**Approbateur :**

Nom : N. Dörfliger

Fonction : Directrice D3E

Date : 11/07/2016

Signature : 

Le système de management de la qualité et de l'environnement  
est certifié par AFNOR selon les normes ISO 9001 et ISO 14001.

**Mots-clés** : Toxicité cellulaire, Micronoyaux TK6, Ames, Angiogenèse, Chlordécone, Dérivés déchlorés,

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

**Mouvet C., Nessler 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.

## 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. La toxicité de ces produits par rapport à celle de la molécule mère est totalement inconnue alors que c'est un des critères importants à prendre en compte pour juger du bénéfice environnemental global de l'ISCR. Parmi les 14 produits déchlorés formés par ISCR identifiés à ce jour, seules la 5a-hydroCLD (monohydroCLD, CLD dont le Cl en position 5a a été remplacé par un H) et une tri-hydroCLD (CLD-3Cl) sont disponibles sous forme d'étalons en masse et pureté suffisante pour permettre des études préliminaires de toxicité.

Trois tests ont été mis en œuvre pour comparer la toxicité de ces deux substances avec celle de la CLD. Le test de génotoxicité par évaluation de l'induction de micronoyaux sur cellules TK6 (lignée lymphoblastoïde humaine) et le test d'Ames (test de mutagenèse réalisé vis-à-vis de différentes souches bactériennes) ont été réalisés par l'Institut Pasteur de Lille. Le test d'angiogenèse a été mené par l'équipe INSERM UMR 1063 SOPAM de Angers qui a également fourni des éléments bibliographiques sur la toxicité de la CLD.

Aucune différence significative de génotoxicité et de mutagenèse n'a été mise en évidence entre la CLD, la 5a-hydroCLD et la tri-hydroCLD, dans les 2 tests complémentaires utilisés ce qui permet de conclure qu'aucun de ces 3 composés n'induit de mutations géniques ou d'aberrations chromosomiques *in vitro*. En revanche, la cytotoxicité de la tri-hydroCLD est 2 fois plus faible que celle de la CLD vis-à-vis des cellules TK6 dans le test des micronoyaux et jusqu'à 20 fois pour une des souches utilisée dans le test d'Ames. La cytotoxicité de la 5a-hydroCLD n'est pas supérieure à celle de la CLD vis-à-vis des cellules TK6 mais elle est jusqu'à 10 fois plus faible pour une des souches utilisée dans le test d'Ames.

Un effet proangiogénique supérieur à celui du témoin est mis en évidence pour la CLD ( $p < 0,001$ ). Pour la 5a-hydroCLD, cet effet est également supérieur au témoin mais de manière moins statistiquement significative ( $p < 0,05$ ) que celui de la CLD. Par contre, l'effet pro-angiogénique de la CLD -3Cl n'est pas significativement plus fort que celui du témoin « solvant ».

L'effet positif de diminution des concentrations en CLD des sols traités par ISCR s'accompagne donc d'un effet positif sur la toxicité *in vitro*, avec une cytotoxicité et un effet proangiogénique de deux des principaux produits de dégradation déchlorés formés par ISCR moindres que ceux de la CLD.



# Sommaire

<b>1. Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Éléments bibliographiques sur la toxicité de la CLD (S. Faure).....</b>	<b>11</b>
2.1. TOXICOCINÉTIQUE.....	11
2.1.1. Absorption .....	11
2.1.2. Distribution.....	14
2.1.3. Métabolisme .....	16
2.1.4. Élimination .....	18
2.2. IMPACT DE LA CHLORDÉCONE SUR LA SANTÉ HUMAINE.....	19
2.2.1. CLD et risque de cancer .....	19
2.2.2. Cancer et angiogenèse.....	23
<b>3. Matériel et méthodes.....</b>	<b>25</b>
3.1. MICRONOYAUX SUR CELLULES HUMAINES TK6 .....	25
3.1.1. But et principe du test .....	25
3.1.2. Choix cellulaire .....	25
3.1.3. Le milieu de culture.....	26
3.1.4. Mise en culture des cellules .....	26
3.1.5. Substances testées.....	26
3.1.6. Essais de génotoxicité .....	27
3.1.7. Critères de validité de l'essai .....	30
3.1.8. Expression des résultats et analyse statistique .....	30
3.1.9. Interprétation des résultats.....	31
3.2. AMES .....	32
3.2.1. But et principe du test .....	32
3.2.2. Justification du choix du système réactif .....	32
3.2.3. Souches de Salmonella typhimurium .....	32
3.2.4. Contrôle des souches bactériennes .....	33
3.2.5. Substances testées et solubilisation .....	33
3.2.6. Essai de stérilité du produit à étudier .....	34
3.2.7. Détermination de la toxicité des substances testées .....	34
3.2.8. Essai de mutagénicité.....	34
3.3. ANGIOGENÈSE <i>IN VITRO</i> .....	37
3.3.1. Culture cellulaire .....	37
3.3.2. Substances étudiées.....	37
3.3.3. Évaluation de l'angiogenèse <i>in vitro</i> .....	38

<b>4. Résultats et discussion .....</b>	<b>39</b>
4.1. MICRONOYAUX.....	39
4.1.1. Critères d'acceptation des résultats .....	39
4.1.2. Cytotoxicité de la chlordécone .....	39
4.1.3. Génotoxicité de la chlordécone .....	40
4.1.4. Cytotoxicité de la 5a-hydroCLD.....	43
4.1.5. Génotoxicité de la 5a-hydroCLD .....	43
4.1.6. Cytotoxicité de la tri-hydrochlordécone (CLD-3Cl).....	45
4.1.7. Génotoxicité de la tri-hydrochlordécone (CLD-3Cl) .....	45
4.2. TESTS D' AMES.....	48
4.2.1. Cytotoxicité de la chlordécone .....	48
4.2.2. Cytotoxicité de la 5a-hydroCLD.....	49
4.2.3. Cytotoxicité de la CLD-3Cl .....	49
4.2.4. Mutagenèse.....	50
4.3. TESTS D'ANGIOGENÈSE.....	54
<b>5. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>57</b>
<b>6. Bibliographie .....</b>	<b>59</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Métabolisme de la CLD chez l'Homme (extrait de Molowa <i>et al.</i> , 1986). .....	17
Figure 2 : Longueur des capillaires générés par les 3 concentrations étudiées des 4 substances testées. Tous les résultats sont exprimés en % du contrôle solvant (Ctrl), avec n = 6. * : p < 0.05; ** : p < 0.01; *** : p < 0.001 : différence significative par rapport au contrôle selon le test de Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn. Ctrl + (SVF 30 %) : contrôle positif.....	54
Figure 3 : Longueur des capillaires générés par 4 substances testées à la concentration de 10 <sup>-11</sup> M. Tous les résultats sont exprimés en % du contrôle (Ctrl), avec n= 6. Les extrémités des traits horizontaux relient les substances différentes entre elles avec un niveau de significativité statistique (test de Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn) de 0,1 % (***), 1 % (**) ou 5 % (*). .....	55
Figure 4 : Longueur des capillaires générés par la concentration de 10 <sup>-9</sup> M des 4 substance testées. Voir légende de la figure précédente pour l'explication des traits horizontaux et étoiles au-dessus des barres d'histogramme.....	55
Figure 5 : Longueur des capillaires générés par la concentration de 5.10 <sup>-8</sup> M des 4 substances testées. Voir légende de la figure précédente pour l'explication des traits horizontaux et étoiles au-dessus des barres d'histogramme.....	56



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Niveaux sanguins en CLD mesurés chez différents types de sujets exposés (ville d'Hopewell).....	12
Tableau 2 : Estimation d'imprégnation par la CLD dans le sang de la population guadeloupéenne. (InVS-Inserm).....	13
Tableau 3 : Distribution de la CLD chez les travailleurs exposés. (Cohn <i>et al.</i> , 1978).....	15
Tableau 4 : Concentration plasmatique de CLD et risque de cancer de la prostate. ....	20
Tableau 5 : Incidence et développement tumoral de carcinome hépatocellulaire chez les rats. ....	21
Tableau 6 : Principales caractéristiques génétiques des souches de <i>Salmonella typhimurium</i> utilisées. ....	32
Tableau 7 : Produits de référence utilisés pour les témoins positifs, avec et sans activation métabolique.....	35
Tableau 8 : Résultats des tests de micro-noyauxTK6 pour la chlordécone. ....	42
Tableau 9 : Résultats des tests de micro-noyaux TK6 pour la 5a-hydroCLD (chlordécone -1 Cl).....	44
Tableau 10 : Résultats des tests de micro-noyaux TK6 pour la chlordécone - 3 Cl.....	47
Tableau 11 : Résultats des tests Ames pour la chlordécone.....	51
Tableau 12 : Résultats des tests Ames pour la 5a-hydroCLD (chlordécone - 1 Cl). ....	52
Tableau 13 : Résultats des tests Ames pour la chlordécone - 3 Cl.....	53
Tableau 14 : Synthèse des effets observés pour les 4 substances par rapport au contrôle négatif. ....	56



# 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 ; Jondreville *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).

La décontamination des sols par voie microbiologique reste actuellement très loin d'un stade opérationnel. Les travaux menés dans le programme DEMICHLOR 2011 - 2013 piloté par l'INRA montrent que même en conditions de laboratoire optimisées la biodégradation de la chlordécone est limitée à quelques pourcents de la concentration initiale en quelques mois (Fernández-Bayo *et al.*, 2013 ; Merlin *et al.*, 2015).

Le potentiel de la réduction chimique (*In Situ* Chemical Reduction) pour décontaminer les sols a, par contre, 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. La monohydroCLD dont le Cl en position 5a a été remplacé par un H (5a-hydroCLD) est le produit formé avec les plus fortes concentrations, pouvant représenter jusqu'à 20 % de la CLD initialement présente.

Pour la 5a-hydroCLD et pour une tri-hydroCLD (CLD – 3 Cl), des étalons étaient disponibles en pureté (92,6 % pour la 5a-hydroCLD, 88,6 % pour la tri-hydroCLD) et masse (100 mg) suffisantes pour en tester la toxicité. Dans une première approche prospective, la toxicité *in vitro* a été évaluée par :

- le test de mutagenèse d'Ames (test de mutation ponctuelle sur système bactérien), incluant une mesure de la cytotoxicité ;
- le test de génotoxicité par l'évaluation de l'induction de micronoyaux sur cellules TK6 (lignée lymphoblastoïde humaine), incluant également une mesure de la cytotoxicité ;
- et l'effet sur l'angiogenèse de cellules endothéliales (ce test quantifie la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui apportent les éléments nutritifs nécessaires au développement des tumeurs).

L'écotoxicité des produits de transformation de la CLD mériterait évidemment d'être également étudiée. Cet aspect n'a pu être traité dans le cadre de la présente étude mais est en perspective pour 2017.

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 MEDDE/BRGM.



## 2. Éléments bibliographiques sur la toxicité de la CLD (S. Faure)

### 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. 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. Les dérivés glucuroconjugés de la CLD, ainsi que la CLD non conjuguée sont lentement excrétés dans la bile et éliminés dans les fèces. L'excrétion fécale est limitée par le cycle entéro-hépatique.

#### 2.1.1. Absorption

L'absorption de la CLD chez l'homme a été démontrée par la mesure des concentrations dans le sang, le tissu adipeux sous-cutané, d'autres fluides corporels suite à une exposition professionnelle subchronique (ingestion, inhalation et contact cutané). Les travailleurs présentant des symptômes neurologiques de la toxicité de la CLD (exemples : nervosité, tremblements, ataxie) possédaient des concentrations dans le sang total comprises entre 0,009 et 11,8 ppm. Les concentrations sanguines en CLD chez les travailleurs sans symptômes neurologiques étaient entre 0,003 et 4,1 ppm. La CLD a également été détectée dans le sang de résidents de la commune d'Hopewell en Virginie (US), vivants proches de l'usine qui produisait la chlordécone, avec des concentrations variant de 0,005 à 0,0325 ppm (Cannon *et al.* 1978). Les voies d'exposition potentielles à la CLD pour les résidents communautaires incluent l'inhalation de particules fines et l'ingestion d'eau contaminée. Des symptômes neurologiques ont été signalés par certains résidents vivant à proximité de l'usine. En général, les concentrations plasmatiques les plus élevées en CLD ont été retrouvées chez les travailleurs affectés par les symptômes neurologiques alors que les concentrations les plus faibles ont été détectées chez les travailleurs non affectés et les habitants de la commune (Tableau 1 ; Cannon *et al.*, 1978).

Chez les Guadeloupéens, les concentrations moyennes plasmatiques sont similaires à celles observées parmi la population américaine générale non exposée professionnellement et sont très inférieures à celles des employés de l'usine fabriquant la CLD à Hopewell. Il est estimé que la charge du compartiment sanguin en CLD représente approximativement 10 % de la charge corporelle (Tableau 2 ; InVS-Inserm).

Groupe	Nombre testé	Nombre de niveau détectable	Pour cent avec un niveau détectable	Gamme de niveau détectable (mg/L)	Moyenne de niveau détectable (mg/L)
LSPC <sup>a</sup> travailleurs affectés	57	57	100	0,009-11,8	2,53
Travailleurs non affectés	49	48	99	0,003-4,1	0,60
Membres de la famille des travailleurs LSPC	32	30	94	0,003-0,39	0,10
Travailleurs de la CLD d'Allied <sup>b</sup>	39	30	77	0,003-0,45	0,06
Travailleurs du quartier	32	23	72	0,003-,031	0,011
Travailleurs de l'usine de traitement des eaux usées	10	6	60	0,004-0,014	0,006
Chauffeurs de taxi	5	1	20	0,003	0,003
Chauffeurs de camion	2	1	50	0,004	0,004
Résidents de communauté d'Hopewell <sup>c</sup>	214	40	19	0,005-0,0325	0,011

Tableau 1 : Niveaux sanguins en CLD mesurés chez différents types de sujets exposés (ville d'Hopewell).

LSPC<sup>a</sup> = travailleurs d'entreprise des produits sanitaires avec symptômes neurologiques cliniquement observés ou autodéclarés.

<sup>b</sup>Allied Chemical Corporation.

<sup>c</sup>Exclut les travailleurs d'usine de CLD.

Source: Cannon *et al.* (1978).

Étude	Population	Période	Mesure de l'exposition	Limite de détection (µg/L)	% de détection	Médiane (µg/L)	Maximum (µg/L)
Hommes	Hommes adultes comprenant des travailleurs de la banane (n = 100)	1999 à 2001	Sang veineux périphérique	1	88	5,2	104
Hibiscus	Femmes enceintes (n = 115)	2003	Sang veineux périphérique	0,5	87	2,2	16,6
Hibiscus	Nouveau-né (n = 109)	2003	Sang du cordon	0,5	61	0,7	3,7
Timoun	Femmes enceintes (= 191)	2004 à 2007	Sang veineux périphérique	0,25	76	0,6	13,2

Tableau 2 : Estimation d'imprégnation par la CLD dans le sang de la population guadeloupéenne. (InVS-Inserm).

Aucune donnée n'est disponible pour évaluer l'absorption de la CLD après une inhalation chez des animaux de laboratoire.

Des études sur la distribution et l'excrétion de la CLD chez la souris, le rat, la gerbille et le cochon après administration orale de la CLD dissoute dans l'huile de maïs indiquent que ce produit chimique est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal chez les animaux. Une étude a tenté d'estimer quantitativement l'absorption orale. Des rats mâles Sprague-Dawley ont reçu une dose orale unique de 40 mg/kg par jour de CLD marqué [<sup>14</sup>C] en solution dans l'huile de maïs. Le pourcentage de radioactivité excrétée dans les matières fécales a été mesuré au cours de temps. Environ 10 % de la dose a été détecté dans les fèces le premier jour après l'administration, ce qui suggère que 90 % de la dose administrée par voie orale est absorbé à partir du véhicule (huile de maïs, Egle *et al.*, 1978).

Les études animales suggèrent que la CLD est absorbée seulement dans une mesure limitée à travers la peau (Heatherington *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1987). L'absorption percutanée *in vivo* de la CLD a été évaluée chez des rats, jeunes (33 jours) ou adultes (82 jours) (Shah *et al.*, 1987). Pour cela, une solution d'acétone contenant de la CLD marquée [<sup>14</sup>C] a été appliquée sur le dos rasé des animaux, avec la zone de traitement constituant 3,2 % de la surface totale du corps. L'urine et les fèces ont été recueillis sur une période de 72 heures, après laquelle les animaux ont été sacrifiés pour déterminer la récupération de la radioactivité et l'absorption percutanée de la CLD. Trois niveaux de dose ont été utilisés pour comparer l'absorption cutanée chez les rats, jeunes et adultes (trois rats /groupe de dose). Aucune différence liée à l'âge dans l'absorption cutanée de la CLD n'a été notée dans cette étude. L'absorption cutanée diminue par contre quand la dose appliquée augmente, chez les rats jeunes et adultes, suggérant un effet de saturation de l'absorption à travers la peau. Chez les adultes, 9 % de la dose appliquée a été absorbée à la dose la plus faible (0,26 µmol/cm<sup>2</sup>), 6 % d'absorption est retrouvé à la dose moyenne (0,54 µmol/cm<sup>2</sup>), et 1 % d'absorption a eu lieu à la dose plus élevée (2,68 µmol/cm<sup>2</sup>). Chez les jeunes rats, 10 % de la dose a été absorbé à la dose plus faible (0,34 µmol/cm<sup>2</sup>), 7 % d'absorption est produit à la dose moyenne (0,54 µmol/cm<sup>2</sup>), et 2 % a été absorbé à la dose plus élevée (2,68 µmol/cm<sup>2</sup>). Les rats ont été sacrifiés à 6, 24, 48, 72 et 120 heures après le traitement. Chez les rats adultes, l'absorption cumulée moyenne était de 0, 4, 3, 6, 9 et 14 %, mesurée respectivement à 6, 24, 48, 72 et 120 heures. Chez les jeunes rats, l'absorption était de 0,6, 4, 7, 10 et 14 %, mesurée à 6, 24, 48, 72 et 120 heures, respectivement. Seulement 1 % de la dose de CLD appliquée pénètre la peau dorsale excisée chez les rats, jeunes et adultes, dans des conditions *in vitro* (Heatherington *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1987).

### 2.1.2. Distribution

Chez 32 travailleurs exposés à la CLD pendant une période variant entre 3 à 16 mois, les concentrations les plus élevées de CLD ont été retrouvées dans le sang, le foie et le tissu adipeux. À l'inverse, des quantités modestes de CLD ont été détectées dans les muscles, la bile et les selles tandis que seulement des quantités infimes ont été mesurées dans les fluides corporels aqueux tels que le liquide céphalo-rachidien, l'urine, la salive et le suc gastrique (Cohn *et al.*, 1978). Le rapport de la concentration de CLD dans le tissu adipeux par rapport à sa concentration dans le sang était de 7 :1 (Tableau 3).



Tissu	Nombre de patients	Gamme de concentration (µg/g)	partage	
			tissu	sang
Sang total	32	0,6 - 32,0	1,0	
Foie	10	13,3 - 173,0	15,0	4,6
Graisse sous cutanée	29	1,7 - 62,1	6,7	3,8 - 12
Muscle	5	1,2 - 11,3	2,9	1,8 - 4,5
Vésicule biliaire	6	2,5 - 30,0	2,5	1,4 - 4,1

Tableau 3 : Distribution de la CLD chez les travailleurs exposés. (Cohn et al., 1978).

La captation préférentielle et une élimination lente de la CLD par le foie ont été confirmées chez des animaux du laboratoire (Belfiore *et al.*, 2007 ; Hewitt *et al.*, 1985 ; Egale *et al.*, 1978). Les concentrations en CLD dans le plasma, les reins, le foie et le tissu adipeux de rat ont été déterminées entre 6 et 32 jours suivant une dose orale unique de 50 mg/kg (Hewitt *et al.*, 1985). Les concentrations de la CLD ont persisté dans les tissus de rat durant la période d'étude de 32 jours. Les concentrations tissulaires les plus élevées ont été observées dans le foie et cet organe présentait le taux d'élimination le plus lent. Entre 8 et 32 jours, les concentrations hépatiques ont été réduites de 73 %, tandis qu'au niveau de plasma, des reins et du tissu adipeux, elles étaient réduites de 90, 88 et 81 % respectivement. La distribution de la CLD a également été étudiée chez les rats recevant une dose orale unique de 40 mg/kg par jour de CLD marqué [<sup>14</sup>C] dissoute dans l'huile de maïs (Egle *et al.*, 1978). Initialement, les niveaux plus élevés de radioactivité ont été trouvés dans les glandes surrénales suivies par le foie, le poumon et le tissu adipeux. En 3 jours suivant l'administration, la concentration la plus élevée était retrouvée dans le foie. La CLD est éliminée plus lentement du foie par rapport aux autres tissus. Le ratio entre le foie et le sang a augmenté de 28 :1 au jour 1 à 126 :1 au jour 84. Le ratio entre le tissu adipeux et le sang atteint un maximum de 31 :1 au jour 7 et diminue par la suite, tandis que des ratios entre d'autres organes et le sang restent constants.

Belfiore *et al.* (2007) ont confirmé les résultats précédents après une dose orale unique de 40 mg/kg (CLD dissoute dans l'huile de maïs). La rétention préférentielle de la CLD par le foie est liée à la liaison de la CLD aux protéines plasmatique et aux lipoprotéines. La filtration sur gel de sérum indique que la CLD est principalement liée à l'albumine et aux lipoprotéines chez les travailleurs exposés. Des électrophorèses de plasma humain normal auquel a été ajouté de la CLD marquée au [<sup>14</sup>C] ont permis de démontrer que 80 % de la CLD était lié aux lipoprotéines, en particulier de haute densité (HDL) (Skalsky *et al.*, 1979). Dans le plasma humain, la CLD marquée au [<sup>14</sup>C] était distribuée à 46 % aux protéines, 30 % aux HDL, 20 % aux lipoprotéines de faible densité (LDL) et 6 % aux lipoprotéines de très faible densité (vLDL). L'albumine a été identifiée comme la principale protéine à laquelle se lie la CLD. La liaison préférentielle de la CLD à l'albumine et aux HDL a été également confirmée chez l'homme, le rat et le porc. Au niveau cérébral, la CLD est distribuée dans des zones spécifiques chez des souris gavées avec une dose unique de 50 mg/kg (Fujimori *et al.*, 1982). Ainsi, les auteurs ont retrouvé de plus grandes quantités de CLD dans le striatum que dans le cortex, le mésencéphale ou le cervelet.

Kavlock *et al.* (1980) ont étudié la distribution de la CLD sur des rats *in utero* ou nouveaux nés. Pour cela, les rates gestantes ont reçu une dose orale de 5 mg/kg de CLD aux jours de gestation 15, 18 ou 20 (durée de gestation : environ 20 jours). Au cours de l'étude prénatale, les animaux ont été euthanasiés 4, 24 ou 48 heures après l'administration et des tissus maternels et fœtaux ont été prélevés pour le dosage de la CLD. Dans l'étude postnatale, la CLD était administrée à une dose de 1 ou 10 mg/kg par jour, les jours 2 et 5 de la période de la lactation. Le lait maternel a été obtenu suite à une injection d'ocytocine aux jours de gestation 5, 9 et 15. Les animaux ont été sacrifiés pour le dosage tissulaire de la CLD aux jours 3, 5, 7, 9, 12, 15 et 17 de la lactation. La CLD traversait la barrière placentaire et était retrouvé dans les tissus fœtaux dès 4 heures suite à l'administration maternelle. Les concentrations maximales de CLD dans le placenta étaient de 3,5 à 4,0 ppm. Les teneurs dans les tissus maternels étaient 4 à 5 fois supérieures aux concentrations chez le fœtus, indiquant un certain retard dans la distribution de la CLD pour le fœtus, lié au rôle protecteur du placenta. Les concentrations de CLD retrouvées chez le fœtus étaient plus fortes au niveau du foie, puis du cerveau, du cœur ou des reins. L'excrétion de la CLD dans le lait constituait une importante voie d'élimination. Chez les nouveau-nés, la CLD était principalement distribué au niveau du foie, du cerveau et des yeux. Les concentrations tissulaires étaient corrélées avec les niveaux de CLD dans le lait.

### 2.1.3. Métabolisme

Bien que la CLD ne soit pas largement métabolisée chez les mammifères, la réduction du groupe carbonyle hydraté forme un alcool de CLD chez l'Homme et certaines espèces d'animaux (gerbilles et porcs), mais pas chez les rats, les souris, les cochons d'Inde ou les hamsters (Fariss *et al.*, 1980). Une aldo-céto réductase cytosolique semble être responsable de cette formation (Figure 1 ; Molowa *et al.*, 1986). Cet alcool de CLD est excrété dans la bile principalement comme un conjugué glucuronide, tandis que la CLD est excrétée dans la bile principalement sous forme non conjuguée (Houston *et al.*, 1981 ; Fariss *et al.*, 1980). Des réactions de conjugaison (phase II) ont lieu avec la CLD chez l'Homme, mais pas chez les gerbilles ou les rats (Houston *et al.*, 1981). Chez l'Homme, une forme réduite de la CLD, l'alcool chlordécol ( $C_{10}Cl_{10}OH_2$ ) a été identifiée pour la première fois dans les selles des travailleurs exposés à la CLD et présentant des symptômes de type nervosité, maux de tête et tremblements (Blanke *et al.*, 1978).

Fariss *et al.* (1980) ont utilisé des échantillons de bile humaine pour une analyse approfondie de la CLD et de ses métabolites.

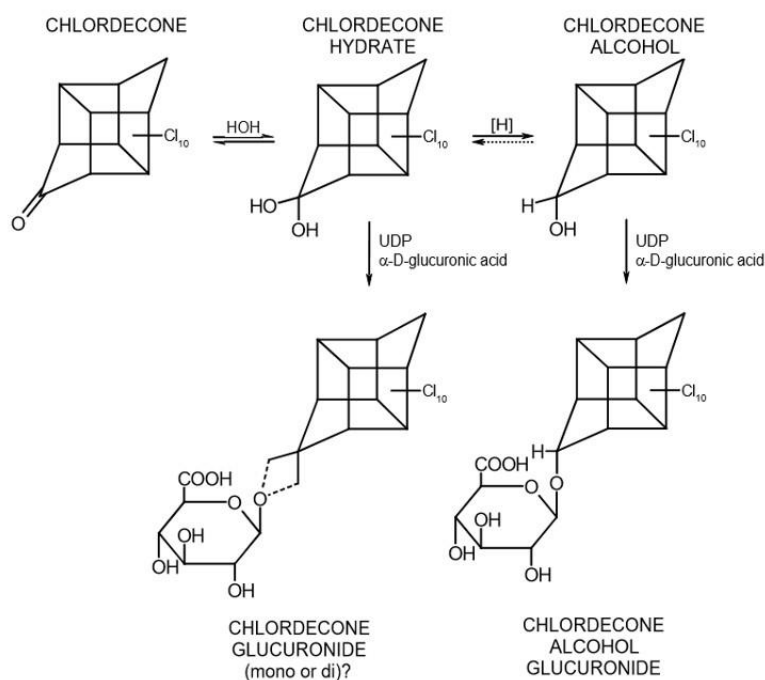


Figure 1 : Métabolisme de la CLD chez l'Homme (extrait de Molowa et al., 1986).

L'analyse de bile humaine obtenue chez des travailleurs exposés soit par l'aspiration du contenu duodéal soit directement à partir d'un tube en T implanté au cours d'une chirurgie de la vésicule biliaire, a révélé des quantités importantes de CLD libre (non conjuguée) et de faibles teneurs en alcool de CLD libre chez les travailleurs exposés. Le traitement ultérieur des échantillons de bile par la  $\beta$ -glucuronidase a généré de fortes quantités d'alcool de CLD. Il est ainsi estimé que plus de 90 % de l'alcool de CLD dans la bile humaine est présent sous forme d'un conjugué glucuronide, tandis que moins de 10 % de la molécule mère de CLD est conjugué avant l'excrétion biliaire. Le rapport CLD/alcool de CLD était compris entre 2 :1 et 1 :4 dans la bile humaine. En revanche, la bile de rat ne contenait que des traces d'alcool de CLD avec un rapport CLD/alcool de CLD de 150 :1. Molowa *et al.* (1986) ont caractérisé l'enzyme aldo-céto réductase cytosolique responsable de la conversion de la CLD en alcool de CLD. L'activité de cette réductase a été détectée dans le cytosol des hépatocytes de lapin, des gerbilles et des humains, mais était absente chez les souris, les rats, les hamsters et les cochons d'Inde. Le prétraitement des gerbilles avec une dose orale unique de CLD (20 mg/kg) a entraîné une augmentation de 38 % de l'activité spécifique de la réductase 7 jours plus tard.

La CLD peut induire les cytochromes 450 (CYP<sub>450</sub>) du système enzymatique d'oxydation chez les rats mâles et femelles. Mehendale *et al.* (1978) ont exposé les rats mâles et femelles à 0, 50, 100 ou 150 ppm de CLD dans l'alimentation pendant 16 jours. L'activité enzymatique de la cytochrome C réductase était augmentée pour chaque dose de CLD, tandis que l'activité de la NADPH déshydrogénase et du cytochrome P450 B5 n'était pas affectée par le traitement par la CLD. Hzewitt *et al.* (1985) ont démontré une augmentation des CYP<sub>450</sub> microsomaux et de la NADPH cytochrome c réductase suite à une dose orale de 50 mg/kg (de 2 à 32 jours). L'activité du cytochrome P450 B5 était également augmentée mais pas avant 24 à 32 jours après l'administration de la CLD. L'administration d'une dose orale unique de 15 mg/kg à des rats Sprague-Dawley a conduit à une augmentation de l'activité enzymatique de CYP<sub>450</sub> et de l'ethoxycoumarine-O-déséthylase (Gilroy *et al.*, 1994).

#### 2.1.4. Élimination

La CLD et l'alcool de CLD sont éliminés principalement par l'excrétion biliaire dans les fèces chez les mammifères ? Chez l'Homme, la CLD est éliminée lentement du sang. Les estimations de la demi-vie sérique de la CLD ( $t_{1/2}$ ) chez les travailleurs des usines chimiques variaient de 63 à 128 jours (Adir *et al.*, 1978). L'analyse des fluides excrétés chez les travailleurs exposés a montré qu'alors que la CLD est indétectable dans la sueur et présente seulement en quantités mineures dans l'urine, les teneurs dans la salive, le suc gastrique ou la bile étaient approximativement équivalentes à celles retrouvées dans le sang (Cohn *et al.*, 1978). Les taux d'excrétion biliaire variaient considérablement parmi les travailleurs (~1-10 mg/jour) ; cependant, la quantité excrétée est exprimée en fonction de la teneur totale en CLD du corps était relativement constante (de 0,29 à 0,85 %). Pour les travailleurs ayant subi une aspiration duodénale, seulement 5-10 % de la CLD entrée dans la lumière duodénale par la bile a été détecté dans les fèces. De même, le taux de CLD excrétée dans la bile recueillie par l'intermédiaire d'un tube en T implanté chirurgicalement était 19 fois plus élevé que le taux d'élimination dans les fèces. Ces résultats suggèrent que le recyclage entéro-hépatique joue un rôle important dans l'excrétion lente de la CLD. Afin de prévenir la réabsorption de la CLD dans le tractus gastro-intestinal, la cholestyramine a été étudiée comme un traitement possible de l'intoxication à la CLD. La cholestyramine est une résine échangeuse d'anion qui lie la CLD mais sans être absorbé dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, le traitement par la cholestyramine a réduit la  $t_{1/2}$  chez les travailleurs de 165 à 80 jours ( $n = 22$ ) (Cohn *et al.*, 1978). La sécrétion gastro-intestinale de la CLD semble également jouer un rôle dans l'excrétion fécale chez l'Homme (Boylan *et al.*, 1979). L'excrétion de la CLD dans les fèces était multipliée par huit lorsque la bile était détournée de l'intestin avec un tube en T implanté chirurgicalement. Ce mécanisme non biliaire pour l'excrétion fécale ne semble pas être lié à la salive ou le suc gastrique car les concentrations en CLD dans ces fluides ont été minimales chez les travailleurs exposés. La CLD est transférée de la circulation sanguine à la lumière gastro-intestinale par diffusion (Bungay *et al.*, 1979). Des concentrations plus élevées de CLD dans la lumière inhibent sa sécrétion gastro-intestinale.

Les données expérimentales chez les rats ont confirmé la présence d'une voie non biliaire pour l'excrétion fécale de la CLD. Bungay *et al.* (1979) ont évalué le transport de la CLD dans et hors de l'intestin et ont utilisé un modèle de PBTK (Physiologically Based Toxicokinetic) pour décrire les résultats. Les études animales ont évalué l'élimination de la CLD après une exposition par voie orale. Egle *et al.* (1978) ont étudié l'excrétion de la CLD chez les rats Sprague-Dawley recevant une dose orale unique de 40 mg/kg par jour de CLD marquée au [ $^{14}\text{C}$ ] dans une solution d'huile de maïs. La radioactivité excrétée dans les matières fécales a été mesurée au cours du temps. Environ 30 % de la CLD administrée a été excrétée dans les 7 premiers jours après lesquels le taux d'excrétion diminuait de façon constante. Après 12 semaines, 65,5 % de la dose avait été excrétée dans les matières fécales alors qu'après 26 semaines, l'excrétion cumulative dans les matières fécales était seulement de 69,8 %. Une faible quantité de la CLD administrée était excrétée dans les urines. Seulement 1,6 % de la dose administrée a été retrouvé dans les urines de 12 semaines, soit un tiers de ce qui avait été excrétée dans les urines pendant les 24 premières heures. Par ailleurs la CLD a été mesurée dans l'air expiré aux jours 1 et 9 après l'administration. Moins de 1 % de la dose administrée avait été détectée dans l'air expiré. Heatherington *et al.* (1998) ont étudié l'excrétion de la CLD après l'absorption par la voie cutanée chez des rats, jeunes ou adultes. Des concentrations plus élevées de CLD ont été détectées dans l'urine des rats jeunes par rapport aux adultes. L'élimination de la CLD s'effectuait là encore principalement dans les fèces, avec une excrétion urinaire limitée. Le ratio entre les matières fécales et les urines après application cutanée de CLD était de 3 : 1 et 3 : 8 respectivement chez les rats jeunes et adultes.

## 2.2. IMPACT DE LA CHLORDÉCONE SUR LA SANTÉ HUMAINE

Les données concernant les effets 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, 1985; Cannon *et al.*, 1978 ; Guzelian, 1982). Sur ces 133 hommes, 79 ont présenté des symptômes 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). En outre, certains de ces hommes expérimentés présentaient une oligospermie. La motilité de nombre des spermatozoïdes était revenue à la normale 5 à 7 ans suivants la fin de l'exposition à la CLD et avec un traitement par la cholestyramine utilisée pour réduire les concentrations plasmatiques de CLD (Taylor, 1982). Certains travailleurs exposés à des niveaux élevés de CLD ont développé des éruptions cutanées, une hypertrophie hépatique et des douleurs articulaires. Les symptômes neurologiques ont été signalés chez les travailleurs exposés à de fortes doses de CLD lors d'une période allant de plusieurs mois à plusieurs années (Taylor, 1985; Cannon *et al.*, 1978 ; Guzelian, 1982). Ces symptômes incluent tremblements, maux de tête, irritabilité, troubles de la mémoire, mouvements oculaires rapides aléatoires, faiblesse musculaire, ataxie locomotrice, incoordination et troubles de l'élocution. Ces effets étaient dus à une réduction du nombre d'axones amyéliniques et des perturbations dans le métabolisme des cellules de Schwann. De plus, il a été montré que l'exposition dans un cadre professionnel à la CLD entraîne une augmentation du risque de cancer (Multigner *et al.*, 2010), notamment de la prostate et cet aspect est spécifiquement développer dans les sous-sections suivantes.

### 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 $\alpha$ ) 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. Une étude réalisée par l'équipe de Luc Multigner *et al.*, en 2010 a permis de déterminer clairement que la CLD est associée à un risque de cancer de la prostate chez les personnes exposées (antillais travaillant dans les bananeraies). Les auteurs ont étudié 623 hommes atteints de cancer de la prostate et 671 personnes saines. Cette étude cas-témoins s'est intéressée soit à la concentration plasmatique de CLD, soit à un indice d'exposition cumulée sur la base des années d'exposition. Ils ont trouvé en particulier une augmentation significative du risque de cancer de la prostate chez les personnes présentant une concentration plasmique maximale de CLD (odds ratio [OR], 1,77 ; IC 95 %, 1,21 à 2,58 pour le tertile le plus élevé des valeurs au-dessus de la limite de détection ;  $p = 0,002$ ) et pour l'indice d'exposition cumulée (OR, 1,73 ; IC 95 %, 1,04 à 2,88 pour le quartile le plus élevé,  $p = 0,004$  ; Tableau 4). Des associations plus fortes entre la concentration plasmique en CLD et l'apparition de cancer ont été observées chez les personnes présentant des antécédents familiaux positifs de cancer de la prostate et parmi ceux qui avaient vécu dans un pays occidental. De plus, les auteurs ont génotypé deux polymorphismes nucléotidiques simples (rs3829125 et rs17134592) dans le gène codant pour la CLD réductase. Parmi les sujets associés à des concentrations plasmatiques de CLD au-dessus de la limite de détection, les porteurs de variantes d'allèle présentaient un risque plus élevé de cancer de prostate (OR, 5,23, IC 95 %, 0,82 à 33,32).

CLD	Nb des patients	Nb des contrôles	Ajusté selon l'âge		Multi variables *	
			OR	IC 95%	OR	IC 95 %
<b>Concentration plasmiq ue, µg/L</b>						
≤ 0,25 (LD)	195	223		1,00		1,00
>0,25-0,47	128	150	0,95	0,69 à 1,31	1,11	0,75 à 1,65
>0,47-0,96	139	149	1,16	0,84 à 1,59	1,22	0,82 à 1,83
>0,96	161	149	1,27	0,93 à 1,72	1,77	1,21 à 2,58
<b>Indice d'exposition cumulative par quartile, µg/L x Nb d'années<sup>\$</sup></b>						
1 (plus basse)	88	112		1,00		1,00
2	101	112	1,05	0,69 à 1,58	1,06	0,62 à 1,82
3	101	112	1,15	0,76 à 1,74	1,23	0,72 à 2,11
4	134	112	1,33	0,89 à 1,99	1,73	1,04 à 2,88

Tableau 4 : Concentration plasmiq ue de CLD et risque de cancer de la prostate.

Abréviati on : OR, odds ratio ; LD, limit of detection.

\* le modèle statistique multivarié inclut l'âge (intervalles de 5 ans), la concentration lipidique plasmiq ue totale (en continu), le rapport taille-hanches (≤ 0,95, >0,95) et l'histoire de dépistage du cancer de prostate (non, oui).

<sup>\$</sup>pour les sujets avec des valeurs supérieures LD.

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, 1979a), 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. Les tumeurs hépatiques décrites comme des carcinomes hépatocellulaires ont été observées à la dose la plus élevée de CLD chez les rats femelles avec une incidence significativement plus élevée par rapport à l'incidence du groupe contrôle (0/100, 0/10, 1/49 et 10/45 dans le contrôle regroupé, témoins appariés, groupe exposé à faible dose et groupe exposé à forte dose, respectivement). Les incidences des carcinomes hépatocellulaires chez les rats mâles étaient de 0/105, 0/10, 1/50 et 3/44, respectivement. Avec la forte dose de CLD, les animaux mâles présentaient une incidence de tumeurs significativement plus importante ( $p = 0,049$ ) en comparaison des animaux contrôles. Il est à noter toutefois que l'incidence des carcinomes hépatocellulaires n'était pas statistiquement plus élevée en comparaison avec des témoins appariés pour les rats des deux sexes confondus, même si une tendance à l'augmentation était observée selon la dose administrée. Des tumeurs hépatiques décrites comme des nodules néoplasiques ont également été observées, mais avec une fréquence similaire dans les groupes exposés et les groupes témoins (Tableau 5 ; NCI, 1976a).

Rats Osborne-Mendel	Exposition de groupe			
	Témoins appariés	Contrôle regroupé	Faible dose	Haute dose
Mâles (0, 0,6 ou 1,7 mg/kg/j) <sup>a</sup>	0/10	0/105	1/50	3/44 <sup>b,c</sup>
Délai de première tumeur (semaines)	NA <sup>d</sup>	NA	112 semaines	108 semaines
Femelle (0, 1,4 ou 2 mg/kg/j) <sup>a</sup>	0/10	0/100	1/49	10/45 <sup>c</sup>
Temps de première tumeur (semaines)	NA	NA	87 semaines	83 semaines

Tableau 5 : Incidence et développement tumoral de carcinome hépatocellulaire chez les rats.

<sup>a</sup>les doses ont été calculées en utilisant l'équation allométrique pour la consommation alimentaire par les animaux de laboratoire avec des concentrations pondérées dans le temps de NCI (1979a) et la référence de poids corporel de U.S EPA (1988).

<sup>b</sup>Marginal augmentation ( $p = 0,049$ ) par rapport aux contrôles regroupés.

<sup>c</sup>Augmentation statistiquement significative de l'incidence par rapport aux contrôles regroupés ( $p < 0,05$ ) test de Fischer pour 2 x 2 tableau de contingence (NCI, 1979).

<sup>d</sup>NA = non applicable.

Dans une autre étude, l'effet de la CLD a été évalué dans un modèle de cancérogenèse hépatique en deux étapes chez les rats Sprague-Dawley mâles et femelles (Sirica *et al.*, 1989). Ainsi des rats mâles ont été soumis à une hépatectomie des deux tiers et 24 heures plus tard, ils se sont vus administrer par gavage une dose unique de diéthylnitrosamine (20 mg/kg), responsable d'une carcinogenèse hépatique. Dix jours après l'initiation, les rats ont commencé à recevoir toutes les deux semaines des injections de CLD à des doses de 0,17, 0,34, 1,7 et 3,4 mg/kg sur un total de 44 semaines. Pour cette expérience, les différents groupes contrôles étaient constitués de rats ayant reçu la diéthylnitrosamine après hépatectomie partielle sans administration de CLD, les rats recevant une administration toutes les deux semaines de CLD sans initiation par la diéthylnitrosamine et les rats recevant uniquement le véhicule de la CLD à base d'huile de maïs. La CLD (30 mg/kg) a également été administrée 24 h après l'hépatectomie partielle par gavage comme un produit chimique initiant. Ce traitement a été suivi, 10 jours plus tard par l'administration d'un puissant inducteur enzymatique, le phénobarbital de sodium à une concentration de 0,05 % par jour pendant 44 semaines. Une deuxième expérience a été menée afin de comparer les résultats de l'essai en deux étapes chez les rats mâles et femelles, avec des administrations de CLD toutes les deux semaines à des doses les plus élevées (3 ou 9 mg/kg) pendant 27 semaines. À la fin de chaque expérience, les rats ont été sacrifiés et leurs foies prélevés afin d'évaluer histologiquement la présence de lésions pré-néoplasiques et de tumeurs (carcinomes hépatocellulaires). Une augmentation dose-dépendante du nombre de lésions hépatiques pré-néoplasiques a été observée chez les rats mâles ayant reçu la CLD à des doses comprises entre 0,17 et 3,4 mg/kg toutes les deux semaines pendant 44 semaines. De plus, des nodules hyperplasiques ont également été observés chez 19 % des rats mâles traités alors qu'aucune lésion nodulaire hépatique n'a été observée chez les rats témoins. Une différence significative entre les sexes a été notée quant à la réponse à la CLD aux doses de 3 et 9 mg/kg. Aussi, des carcinomes hépatocellulaires ont été observés chez les rats femelles (11 % à 3 mg/kg et 62 % à 9 mg/kg) mais n'ont pas été retrouvés chez les rats mâles ayant reçu le même traitement. En effet, les rats mâles présentaient uniquement des foyers pré-néoplasiques et des hyperplasies nodulaires suite à l'essai en deux étapes alors que des concentrations similaires de CLD ont pourtant été mesurées dans les foies des rats mâles et femelles. Cela suggère que l'augmentation de la réponse tumorale chez les femelles est due à une sensibilité accrue et non à des modifications pharmacocinétiques entre les deux sexes.

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<sup>®</sup> forment des structures en forme de treillis qui étaient perturbées par l'incubation avec 0,1 et 1  $\mu\text{M}$  de CLD (0,1  $\mu\text{M}$  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  $\beta$ -caténine, qui sont des composants des jonctions adhérentes permettant l'interaction entre cellules et pouvant jouer un rôle dans le développement de lésions néoplasiques.

C'est ainsi que 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. Ces caractéristiques sont les suivantes :

- (1) La CLD induit l'induction des enzymes hépatiques (Trosko *et al.*, 1983) ;
- (2) Chez l'animal (rat ou souris), les tumeurs se trouvent principalement dans le foie (NCI, 1976a) ;



- (3) La CLD dispose de peu de groupes fonctionnels réactifs et ainsi n'est pas génotoxique ;
- (4) Il n'y a aucune preuve de liaison covalente de la CLD à l'ADN ;
- (5) La CLD induit une activité ornithine-décarboxylase (Mitra *et al.*, 1990 ; Kitchin and Brown, 1989) ;
- (6) La CLD réduit les gap-jonctions impliquées dans les communications intracellulaires (Caldwell and Loch-Carusso, 1992).

### 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. Ainsi, pour survivre, ces cellules doivent se trouver à moins de 200 µm d'une source vasculaire (Lovett *et al.*, 2009). Cette vascularisation indispensable est conditionnée par la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments au travers des tissus. Le processus de recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau pré-existant 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). En effet, la prolifération rapide des cellules tumorales crée un environnement hypoxique et appauvri en glucose. Ces stress environnementaux déclenchent un *switch* angiogénique, lors duquel les cellules tumorales commencent à sécréter des facteurs de croissance, pro-angiogéniques, tels que (*vascular endothelial growth factor*, *VEGF*) le facteur de croissance des fibroblastes (*FGF*) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*PDGF*). La sécrétion de ces facteurs de croissance déséquilibre la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques, en faveur des premiers, ce qui stimule les cellules endothéliales quiescentes des vaisseaux sanguins à proximité pour débiter leur prolifération et leur migration vers la tumeur. 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).

Le VEGF est largement reconnu comme un acteur clé dans la tumorigenèse et l'angiogenèse tumorale, notamment en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le VEGF exerce ses effets biologiques par son interaction avec ses récepteurs spécifiques de type tyrosine kinase VEGF-R1 et VEGF-R2. Les propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales de l'interféron alpha peuvent être expliquées, au moins en partie, par l'inhibition de la transcription du gène codant pour le VEGF. Une étude a montré que des lignées cellulaires de cancer du côlon sur-exprimant VEGF-R1 présentaient une augmentation de leurs capacités de migration, d'invasion et de formation de colonies, mais pas de prolifération, lorsqu'elles étaient stimulées par le VEGF. Ces effets étaient prévenus par un anticorps spécifique anti-VEGF-R1 (Fan *et al.*, 2005). D'autres études ont également suggéré que le VEGF endogène est un régulateur physiologique négatif de l'érythropoïèse adulte et que l'inhibition systémique de VEGF conduit à une augmentation de la production hépatique d'érythropoïétine (EPO) par un mécanisme impliquant VEGF-R2 (Tam *et al.*, 2006). Du fait de l'hypoxie tumorale, les cellules inflammatoires du microenvironnement tumoral peuvent également constituer une source de VEGF (Ribatti *et al.*, 1999). Une augmentation de l'expression du VEGF dans les cellules tumorales supporte également un rôle de facteur paracrine stimulant l'angiogenèse tumorale pour le VEGF (Ferrara *et al.*, 2004). Les premières études impliquant le VEGF et son récepteur dans la régulation positive de l'angiogenèse ont été menées sur un modèle de carcinome intracanalair invasif du sein (Valtola *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été montré dans un modèle murin de cancer du sein métastatique, que l'expression de VEGF était associée à un modèle agressif de

métastases impliquant le système lymphatique pulmonaire (Das *et al.*, 2010). Dans ce modèle, le VEGF pourrait accroître le risque métastatique par la promotion de la lymphangiogenèse au niveau de la tumeur avec une dissémination vers le système lymphatique, ainsi que par l'augmentation du potentiel de croissance et de propagation des cellules tumorales qui ont déjà colonisé les poumons (Das *et al.*, 2010). Enfin, une étude récente a montré que la répression stable de l'expression de VEGF était associée à plusieurs caractéristiques favorables au contrôle du développement tumoral de cellules cancéreuses de côlon et de poumon, comprenant l'inhibition de la prolifération et de l'invasion *in vitro*, la diminution de la lymphangiogenèse, de l'invasion tumorale et du potentiel métastatique *in vivo* (Khromova *et al.*, 2012).

Depuis la commercialisation du bevacizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, ou le sunitinib, inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux VEGF, le VEGF et/ou sa voie de signalisation impliquant les VEGFRs constituent une cible utile pour le développement des traitements anticancéreux.

## 3. Matériel et méthodes

Cette partie du rapport consiste en la mise en forme aux standards BRGM des comptes-rendus d'études fournis par l'Institut Pasteur de Lille pour le test d'Ames et le test micronoyaux sur cellules TK6, et des documents fournis par S. Legeay et S. Faure (INSERM UMR 1063 SOPAM de Angers) pour l'angiogénèse. De légères modifications du texte ont été apportées en accord avec les auteurs initiaux.

### 3.1. MICRONOYAUX SUR CELLULES HUMAINES TK6

#### 3.1.1. But et principe du test

Le test du micronucleus *in vitro* est un test de génotoxicité qui permet la détection de substances chimiques ou physiques génotoxiques qui induisent la formation de micronoyaux visibles dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ces micronoyaux peuvent provenir de fragments acentriques (fragments de chromosomes sans centromère) ou de chromosomes entiers, qui sont incapables de migrer avec l'ensemble des chromosomes au cours de l'anaphase lors de la division cellulaire (Fenech et Morley, 1985). L'objectif du test du micronoyau *in vitro* est donc de détecter les substances qui modifient la structure et / ou la ségrégation des chromosomes, conduisant à l'induction de micronoyaux dans les cellules en interphase. Le test du micronucleus utilisant la microméthode a été validé par Nesslany et Marzin (1999).

Les cultures de cellules (voir 3.1.2) sont exposées à la substance testée avec et sans activation métabolique. À la fin de la période d'exposition, les cultures de cellules sont soit remises en culture (période de recouvrement sans l'élément d'essai) pour les traitements courts ou exposées pendant une période suffisante. Les périodes de traitement (avec ou sans recouvrement) couvrent au moins 1,5 cycle de division cellulaire pour permettre la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase le cas échéant.

Après les périodes de traitement et/ou traitement suivi d'un recouvrement, les cellules sont recueillies, fixées, étalées sur lames et collorées. Des essais de cytotoxicité sont réalisés en utilisant le test du MTT (3-[4,5-diMéthylThiazol-2-yl]-2,5diphényl Tétrazolium bromide). La mesure de la réduction du MTT correspond à une activité enzymatique mitochondriale et reflète donc indirectement le nombre et la viabilité cellulaire (exprimée sous forme de pourcentage par rapport au témoin négatif). Par ailleurs, le nombre de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées est déterminé par lecture au microscope pour les concentrations non ou modérément cytotoxiques (toxicité ne dépassant pas  $55 \pm 5$  %).

Une substance testée est considérée génotoxique si i) au moins l'une des concentrations présente une augmentation significative du nombre de micronoyaux par rapport au témoin négatif et ii) si l'effet est dose dépendant dans au moins une condition expérimentale (avec ou sans activation métabolique d'une part, durée de traitement d'autre part) lorsqu'il est évalué avec un test de tendance approprié, et iii) l'un des résultats doit être en dehors de la distribution des données historiques pour le témoin négatif (95 percentile).

#### 3.1.2. Choix cellulaire

La lignée cellulaire TK6 est une lignée lymphoblastoïde humaine isolée à partir d'une culture de lymphoblastes spléniques WIL2 immortalisés spontanément. Elle possède un statut p53 normal et stable (p53 + / +). Cette lignée cellulaire est actuellement utilisée à I-IPL et est l'une des lignées cellulaires recommandées dans la ligne directrice de l'OCDE n° 487.

Un stock de cellules TK6 est conservé dans l'azote liquide au laboratoire. Les cellules ont été fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC). Elles ont un caryotype stable et ont un temps de doublement de 16 à 18 heures. L'absence de contamination par des mycoplasmes est vérifiée pour chacun des lots utilisés.

### **3.1.3. Le milieu de culture**

#### ***a) Milieu de RPMI 0 (milieu de culture de base)***

Le milieu de culture de base utilisé est le milieu RPMI contenant du bicarbonate de sodium, des acides aminés non essentiels, de la pénicilline (200 UI/mL) et de la streptomycine (50 µg/mL).

#### ***b) Milieu de RPMI 10***

Pour préparer le RPMI 10, le milieu RPMI 0 est supplémenté de sérum de cheval décomplémenté (10 % en concentration finale), d'acide pluronique, de L-glutamine, de pyruvate de sodium et d'amphotéricine B à une en concentration finale de 1,2 µg/mL.

### **3.1.4. Mise en culture des cellules**

Une ampoule conservée à ca. -180 °C contenant 4 à 6 x 10<sup>6</sup> cellules a été décongelée. Les cellules ont été remises en suspension dans un tube 50 ml à usage unique avec 30 ml de milieu de RPMI10 afin d'éliminer le DMSO contenu dans le liquide de congélation. Après une centrifugation de 6 minutes à 1 000 tr/mn, le surnageant a été retiré et remplacé par 30 ml de RPMI 10. Les cellules ont été remises en suspension par aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette de 10 ml à usage unique puis transvasées dans un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Le flacon a été vissé légèrement et placé en étuve à 5 % de CO<sub>2</sub> à 37 °C pendant 24 à 48 heures afin d'obtenir environ 4 à 5.10<sup>5</sup> cellules / ml.

### **3.1.5. Substances testées**

Les 3 substances ont été fournies par le BRGM. La chlordécone avec une pureté de 93,5 % (référence C11220000, Dr Ehrenstorfer) ; pour prendre en compte la pureté des substances, un facteur de correction de 1,07 a été appliqué aux masses mises en œuvre pour obtenir les vraies concentrations cibles en matière active. La 5a-hydroCLD avec une pureté de 92,6 % ; un facteur de correction de 1,08 a été appliqué pour les mêmes raisons que ci-dessus. La CLD-3Cl avait une pureté de 88,6 % ; un facteur de correction de 1,12 a été appliqué (cf. ci-dessus).

Les 3 substances d'essai ont été mises en solution dans le DMSO à la concentration initiale maximale de 200 mg/ml. Cette concentration mère limpide provoque l'apparition d'un précipité laiteux non-homogène une fois ajoutée à 1 % dans le milieu de culture. La concentration nominale initiale immédiatement inférieure, 100 mg/ml, a provoqué l'apparition d'un précipité laiteux homogène acceptable une fois ajoutée à 1 % dans le milieu de culture, générant une concentration nominale finale de 1 µg/ml. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à étudier dans le test du micronoyau. Onze dilutions successives ont ensuite été réalisées pour obtenir les concentrations nominales finales allant de 500 à 0,49 µg/ml. La plupart de ces concentrations sont supérieures à la solubilité aqueuse de la chlordécone mais la présence de 1 % de DMSO permet de dépasser ce seuil sans apparition visuelle de trouble indicateur d'une solubilisation incomplète.

### 3.1.6. Essais de génotoxicité

#### a) Schémas de traitement

Trois essais de génotoxicité couplés à des essais de cytotoxicité ont été réalisés en duplicat : deux traitements de 3 heures avec ou sans activation métabolique suivi d'un temps de recouvrement de 24 heures.

Les schémas de traitement ont été déterminés selon la ligne directrice de l'OCDE n° 487.

#### b) Essai avec activation métabolique

- **Préparation de la fraction S9**

S9 est un système exogène d'activation métabolique permettant de mimer ce qui se passe au niveau hépatique, centre de métabolisme. Une substance pas nécessairement mutagène ni génotoxique en tant que telle pourrait très bien générer des métabolites mutagènes. La fraction de S9 (système d'activation métabolique avec ajout des cofacteurs pour que les enzymes présentes soient fonctionnelles) a été préparée à l'Institut Pasteur de Lille (IPL) selon la méthode décrite par Ames et coll. (1975) chez les rats Sprague Dawley OFA mâles induits par Aroclor 1254 (origine 6 Monsanto, Saint Louis, U.S.A), et selon les procédures standards opératoires de l'Institut Pasteur de Lille.

Le lot de S9 IPL 15-C a été utilisé au cours de cette étude.

- **Préparation du S9 mix**

Le S9 mix préparé selon Kirkland et coll. (1989) contient pour 5 ml :

- S9 2 ml ;
- KCl 150 mM 1 ml ;
- NADP 25 mg/ml 1 ml;
- Glucose-6-phosphate 180 mg/ml 1 ml.

Tous les cofacteurs ont été filtrés sur membrane stérilisante avant utilisation. La fraction S9 n'a pas subi cette filtration. Le mélange S9 mix a été préparé immédiatement avant chaque test et conservé dans un endroit réfrigéré jusqu'à utilisation.

Le S9 mix a été préparé dans un tube à usage unique stérile extemporanément à l'essai. Celui-ci a été ensuite dilué au 1/10ème dans le RPMI 10 pour obtenir le [RPMI 10+10 % S9].

#### c) Contrôles

Des témoins solvants et des témoins positifs ont été inclus en parallèle dans les mêmes conditions.

- **Témoins positifs**

##### *Essai sans activation métabolique*

La mitomycine C a été utilisée en duplicat comme témoin positif à 0,2 µg/ml dans le traitement continu de 27 heures sans période de recouvrement (S9- 27 h/+0 h) et à 0,5 µg/ml dans le traitement de 3 heures suivi de 24 h de recouvrement (S9- 3 h/+24 h).

La griséofulvine a également été utilisée en duplicat comme témoin positif à 5 µg/ml dans le traitement continu de 27 heures sans période de recouvrement (S9- 27 h/+0 h). Les témoins positifs permettent de vérifier que le système d'essai est apte à détecter des mécanismes génotoxiques direct de la molécule mère génotoxique et « indirect après métabolisation », ce qui permet de vérifier aussi que le système d'activation exogène d'activation métabolique S9 fonctionne.

#### *Essai avec activation métabolique*

La cyclophosphamide (composé pouvant engendrer une perte chromosomique) a été utilisée en duplicat comme témoin positif à 5 µg/ml dans le traitement de 3 heures suivi de 24 h de recouvrement (S9 + 3 h/ + 24 h).

#### • **Témoins négatifs**

Des cultures cellulaires réalisées en triplicat en présence du solvant ont été utilisées comme témoin solvant pour l'essai sans activation métabolique et réalisées en présence du solvant et de S9 mix pour l'essai avec activation métabolique.

#### **d) Dilutions en microplaques**

Les trois traitements ont été effectués simultanément, 6 microplaques ont été utilisées : 3 pour la détermination de la cytotoxicité et 3 pour le test de génotoxicité.

1. Distribution de 100 µl (cytotoxicité) ou 200 µl (génotoxicité) de la solution-fille dans le premier puits des 2 premières rangées (duplicata),
2. Distribution de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) de RPMI 10 (S9-) ou RPMI 10 + 10 % S9 (S9+) dans tous les autres puits, sauf la dernière rangée réservée aux témoins positifs et négatifs,
3. Prélèvement de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) du premier puits à l'aide d'une pipette multicanaux et dilutions de puits en puits par aspiration-refoulement,
4. Rejet de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) du dernier puits.

#### **e) Adjonction des cellules**

Des cellules TK6 ont été dénombrées à l'hématimètre de Mallassez. Une suspension cellulaire à 6.10<sup>5</sup> cellules/ml a été préparée dans du RPMI 10. Un volume de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) de la suspension a été distribué dans les plaques correspondantes à l'aide d'une pipette multicanaux.

#### **f) Fin de traitement**

À la fin de la période de traitement, les plaques ont été centrifugées 6 minutes à 1 000 tr/min. Le milieu de traitement a été retiré par retournement. Un lavage a été effectué par remise en suspension des cellules et en ajoutant 200 µl de RPMI 10 dans tous les puits. Après le lavage, 100 µl (cytotoxicité) ou 200 µl (génotoxicité) de RPMI 10 ont été à nouveau ajoutés, les cellules remises en suspension puis les plaques incubées à nouveau pour 24 heures (Essais S9- 3 h/ + 24 h, S9+).

## **g) Récolte**

### **• Essai de cytotoxicité**

Les plaques de cytotoxicité ont été centrifugées 6 minutes à 1 000 tr/min et le surnageant a été éliminé par retournement. Celui-ci a été remplacé par 100 µl de MTT à 0,5 mg/ml par puits dans du milieu sans rouge de phénol pendant au moins 90 minutes dans une étuve à CO<sub>2</sub> à 37 °C. Après ce temps de contact, les plaques ont de nouveau été centrifugées pendant 15 minutes à 1 500 tr/min et le milieu au MTT a été enlevé et remplacé par 100 µl d'un mélange isopropanol/HCl. Les plaques ont ensuite été placées sous agitation sur agitateur de plaques jusqu'à dissolution complète des cristaux de formazan. Les solutions ont été transférées dans une plaque à fond plat à l'aide d'une pipette multicanaux.

Les absorbances ont été mesurées sur un lecteur de plaques (Diagnostic Pasteur, LP400) à 550 nm de longueur d'onde de mesure et 620 nm de longueur d'onde de référence. Le pourcentage de survie relative a été calculé pour chaque concentration par le rapport [Absorbance moyenne de la concentration] / [Absorbance moyenne du témoin] x 100. Trois concentrations ont été analysées pour l'incidence de cellules micronucléées dans l'étude de génotoxicité.

Selon la ligne directrice de l'OCDE n° 487, quand le produit testé présente une toxicité, la concentration maximale ne doit pas produire plus de 55 ± 5 % de cytotoxicité par rapport au témoin (à savoir au moins 40% de la survie cellulaire).

### **• Essais de génotoxicité**

Les réactifs utilisés sont :

- milieu de lavage = Milieu RPMI 0 + 0,1 % d'une solution d'acide pluronique ;
- milieu hypotonique = Milieu RPMI 0 dilué au ½ dans l'eau stérile + 0,1 % d'une solution d'acide pluronique ;
- Fixateur = Mélange 3 vol. d'éthanol absolu + 1 vol. d'acide acétique.

Pour la récolte, chaque étape de centrifugation a été effectuée à 1 000 tr/min pendant 6 minutes suivi de l'élimination du surnageant par retournement.

À la fin de la période de recouvrement, les microplaques ont été centrifugées. Les cellules ont d'abord été lavées (milieu de lavage), puis doucement remises en suspension et centrifugées à nouveau avant le traitement hypotonique (milieu hypotonique). Après exactement 4 minutes à température du laboratoire, le fixateur a été ajouté. Après une nouvelle centrifugation, les cellules ont été fixées par ajout du fixateur pendant au moins 10 minutes. Les cellules ont été finalement remises en suspension par aspiration-refoulement, puis déposées sur des lames préalablement embuées. Les lames sont laissées à température ambiante pour sécher.

## **h) Coloration**

Après au moins 12 heures de séchage à l'air ambiant, les lames ont été colorées pendant 10 minutes dans une solution à 2 % de Giemsa dans l'eau. Elles ont ensuite été abondamment rincées à l'eau courante puis brièvement à l'eau déminéralisée.

### ***i) Lecture***

Après codage des lames par une personne non impliquée dans la lecture, les cellules ont été examinées au microscope à immersion pour comptabiliser le nombre de micronoyaux dans les cellules mononucléées.

Une lame par culture a été codée et le nombre de cellules micronucléées a été déterminé pour au moins 1000 cellules mononucléées par culture (soit un total d'au moins 2 000 cellules mononucléées /concentration).

L'aspect général des lames a été estimé au faible grossissement (objectif x 10) puis celles-ci ont été observées à l'objectif x 50 sous immersion (grossissement total de x 500). Les critères de détermination d'un micronoyau sont ceux définis par B. Miller *et coll.* (1995) :

- **intensité de coloration du micronoyau inférieure à celle du noyau principal ;**
- **diamètre inférieur au 1/3 de l'aire du noyau principal ;**
- **clairement entouré par une membrane nucléaire ;**
- **non réfringent, non rattaché au noyau principal par un pont nucléoplasmique ;**
- **pas de contact avec le noyau principal et situé à l'intérieur du cytoplasme.**

Pour exclure les phénomènes d'apoptose ou de fragmentation d'ADN (pouvant être étudiés par le biais d'autres méthodes), les cellules mononucléées contenant plus de 5 micronoyaux n'ont pas été comptabilisées.

#### **3.1.7. Critères de validité de l'essai**

Une étude est acceptée si les critères suivants sont remplis :

- le nombre moyen de micronuclei observé chez les sujets témoins négatifs sont inclus dans l'intervalle à 95 % des témoins historiques du laboratoire ;
- le nombre moyen de micronuclei observé chez les sujets témoins positifs est inclus dans l'intervalle des témoins historiques du laboratoire et produit une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs correspondants ;
- un nombre suffisant de cellules (idéalement 2 000 cellules) doit être analysé pour au moins 3 concentrations de produit.

Pour qu'un produit soit déclaré toxique, la plus forte concentration de l'élément d'essai doit présenter une survie relative des cellules TK6 de  $45 \pm 5$  %, i.e.  $55 \pm 5$  % de cytotoxicité.

#### **3.1.8. Expression des résultats et analyse statistique**

##### ***a) Expression des résultats***

Les résultats obtenus lors des différents schémas de traitement sont présentés sous forme de tableau donnant le nombre moyen de micronoyaux pour 2 000 cellules mononucléées, et le pourcentage de survie relative des cellules TK6 par rapport au témoin négatif par concentration.



## **b) Analyse statistique**

Pour chacune des concentrations testées, une comparaison statistique du pourcentage de survie et du nombre moyen de micronoyaux pour 2 000 cellules mononucléées par rapport au contrôle négatif (solvant) a été réalisée en utilisant le test du  $\chi^2$ . Un test de tendance a également été appliqué, en utilisant le logiciel statistique Stat View® version 5.

### **3.1.9. Interprétation des résultats**

Le produit testé est considéré comme clairement génotoxique si, dans l'une des conditions expérimentales examinées :

1. au moins une des concentrations présente une augmentation du nombre de micronoyaux statistiquement significative ( $\chi^2$ ) par rapport au témoin négatif et,
2. l'augmentation est dose-reliée lorsqu'elle est évaluée avec un test de tendance approprié et,
3. si le nombre de micronoyaux dans la (ou les) culture(s) traitée(s) est supérieur à la limite des témoins historiques du laboratoire pour les témoins négatifs (intervalle à 95 %).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit testé est alors considéré comme capable d'induire des cassures et/ou gains ou pertes chromosomiques dans ce système d'essai.

À l'inverse, le produit testé est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

1. aucune des concentrations d'essai ne présente d'augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux par rapport au témoin négatif et,
2. il n'y a pas d'augmentation reliée à la concentration lorsqu'elle est évaluée avec un test de tendance approprié et,
3. les résultats sont compris dans l'intervalle des données historiques du témoin négatif (intervalle à 95 %).

L'élément d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures et/ou gain ou perte chromosomiques dans ce système d'essai.

Dans tous les autres cas, les résultats sont discutés en envisageant éventuellement la lecture de lames des concentrations inférieures ou une étude complémentaire dans un essai indépendant en modifiant la gamme de concentrations et en tenant compte des résultats obtenus sur d'autres systèmes d'essais.

L'ensemble de ces critères n'est pas absolu. Cependant, il constitue une aide à la décision qui permet de conclure dans la majorité des cas.

## 3.2. AMES

### 3.2.1. But et principe du test

L'objectif du test est de rechercher un effet mutagène potentiel sur un modèle bactérien comme le proposent B.N. Ames *et coll.* (1975), Maron et Ames (1983), et conformément aux recommandations de l'OCDE N° 471 (OCDE, 1997) et de la ligne directrice CE (440/2008).

La substance testée a été étudiée à la fois en absence et en présence d'activation métabolique par une fraction microsomiale de foie, permettant la mise en évidence des mutagènes directs et des agents promutagènes (mutagènes exclusivement après activation métabolique), respectivement.

L'étude a été réalisée sans répétition dans un test de dépistage primaire pour évaluer le potentiel mutagène de l'élément d'essai.

Les produits mutagènes sont mis en évidence par les mutations reverses qu'ils induisent au niveau du locus *his*- des souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes pour l'histidine. L'augmentation, par rapport au taux spontané, du nombre de révertants non exigeants en histidine (prototrophes) se développant en présence de la substance testée dans un milieu pauvre en histidine est une indication de l'activité mutagène de ce dernier. Les différentes souches utilisées permettent de mettre en évidence les différents mécanismes de mutations géniques.

### 3.2.2. Justification du choix du système réactif

Le test d'AMES sur les souches de *Salmonella typhimurium* a été validé par de nombreuses études internationales et bien standardisées (Maron et Ames, 1983). Ce test a fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE n° 471 (OCDE, 1997) et de la CE (2008).

### 3.2.3. Souches de *Salmonella typhimurium*

Les souches suivantes sont utilisées pour le test : TA1537, TA98, TA100 et TA102.

Mutation du gène histidine				Autres		
his G 46	his C 3076	his D 3052	his G 428	LPS	Réparation de l'ADN	Facteur
TA100	TA1537	TA98	TA102 TA102	rfa rfa rfa	uvr B <sup>-</sup> uvr B <sup>-</sup> +	- R R pAQ1

Facteur R = plasmide pKM 101 de résistance à l'ampicilline contenant les gènes *muc AB*.

pAQ1 = plasmide de résistance à la tétracycline portant le gène muté.

+: Pas de mutation; -: non concerné

Tableau 6 : Principales caractéristiques génétiques des souches de *Salmonella typhimurium* utilisées.

La souche TA100 présente dans le gène *his G* une substitution de paires de bases (G-C à la place de A-T). Cette souche permet de mettre en évidence des produits provoquant la substitution reverse de paires de bases. Au contraire, la souche TA102 contient une mutation de type ochre (T-A-A) dans son gène *his G* ce qui permet de détecter non seulement plusieurs types de mutation par substitution reverse de paires de bases mais aussi de petites délétions.

La souche TA1537 présente dans le gène *his C* une boucle de plusieurs cytosines provoquant un décalage du cadre de lecture du code génétique (mutation frameshift). La souche TA98 contient dans le gène *his D* une séquence de 4 paires de bases cytosine-guanine (C-G) provoquant également un décalage du cadre de lecture du code génétique. Ces 2 souches permettent de mettre en évidence les produits provoquant la mutation reverse de type frameshift.

Les 4 souches portent également 2 autres types de mutation : elles sont déficientes en mécanismes de réparation de l'ADN (*uvrB*-) (à l'exception de la souche TA102 qui conserve intact son système de réparation par excision de l'ADN) et présentent une altération de la structure des lipopolysaccharides (LPS) de paroi (*rfa*-). Ces deux mutations confèrent aux bactéries une plus grande sensibilité aux agents génotoxiques et une plus forte perméabilité à la pénétration cellulaire pour les grosses molécules.

Le facteur R (présent dans les souches TA98, TA100 et TA102), qui est le plasmide de résistance à l'ampicilline pKM 101, augmente la sensibilité aux agents mutagènes par l'intermédiaire de mécanismes de réparations fautives ("error-prone"). De plus, la souche TA102 contient un autre plasmide en multicopie, le pAQ1, qui porte la mutation *his G428* amplifiant sa sensibilité aux agents mutagènes et un gène résistant à la tétracycline (Maron et Ames, 1983).

Les souches bactériennes, obtenues auprès du Professeur B.N. AMES (Université de Californie Berkeley, USA), sont entretenues au laboratoire et conservées dans l'azote liquide.

### 3.2.4. Contrôle des souches bactériennes

Les différents caractères des souches sont contrôlés régulièrement :

- exigence en histidine ;
- sensibilité aux agents mutagènes de référence ;
- perte des lipopolysaccharides de paroi : mutation *rfa* (sensibilité au cristal violet) ;
- mutation *uvrB*- (sensibilité aux *uvB*), à l'exception de la souche TA102 ;
- présence du plasmide pKM 101 (résistance à l'ampicilline) ;
- présence du plasmide pAQ1 (résistance à la tétracycline).

### 3.2.5. Substances testées et solubilisation

Les 3 substances ont été fournies par le BRGM. La chlordécone avec une pureté de 93,5 % (référence C11220000, Dr Ehrenstorfer) ; vu cette pureté, un facteur de correction de 1,07 a été appliqué aux masses mises en œuvre pour obtenir les vraies concentrations cibles en matière active. La 5a-hydroCLD avec une pureté de 92,6 % ; un facteur de correction de 1,08 a été appliqué pour les mêmes raisons que ci-dessus. La CLD-3Cl avait une pureté de 88,6 % ; vu cette pureté, un facteur de correction de 1,12 a été appliqué (cf. ci-dessus).

La chlordécone, la 5a-hydroCLD et la tri-hydroCLD (CLD-3Cl) ont été solubilisées dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO, lot K45609278532) à la concentration initiale nominale maximale de 2 mg/ml. Cette concentration est très supérieure à la solubilité aqueuse de la chlordécone mais dans du DMSO pur cette concentration ne s'accompagne pas d'apparition visuelle de trouble indicateur d'une solubilisation incomplète. La dose nominale finale maximale de 200 µg/boîte a été obtenue par addition de 100 µl/boîte de cette solution à 2 mg/ml.

Des dilutions successives ont également été préparées dans le DMSO et utilisées à raison de 100 µl/boîte.

Le facteur limitant la dose maximale testée est la solubilité de l'élément d'essai. Les solutions de traitement ont été préparées juste avant usage.

Lors de cet essai, aucun précipité n'a été observé dans les boîtes de Pétri quelle que soit la dose et la souche testée, en présence et en absence d'activation métabolique.

### **3.2.6. Essai de stérilité du produit à étudier**

0,1 ml des 3 plus fortes concentrations du produit à étudier ont été ajoutés à 2 ml de gélose de surface en surfusion. Le mélange a été étalé sur 1 boîte de Pétri contenant 20 ml de gélose de fond. Les boîtes ont été incubées 44 heures à ca. 37 °C. Le développement d'une éventuelle pousse de microorganismes a été recherché. Aucune colonie n'a été observée ; les résultats sont considérés comme satisfaisants.

### **3.2.7. Détermination de la toxicité des substances testées**

Aucun essai de toxicité préliminaire n'a été effectué mais la toxicité a été évaluée au cours de l'essai principal de mutagénicité par un examen microscopique de la pousse de fond et a été notée comme suit :

- : non toxique

+ : faiblement toxique

++ : moyennement toxique

+++ : fortement toxique

N : pousse nulle

### **3.2.8. Essai de mutagénicité**

#### **a) Sans activation métabolique**

La technique suivante est appliquée sur chacune des souches à étudier : 0,1 ml d'une suspension bactérienne provenant d'une culture agitée pendant une nuit à ca. 37 ° C et 0,1 ml du produit à étudier à la concentration retenue sont ajoutés successivement à 2 ml de gélose de surface, à laquelle ont été ajoutés 10 % d'une solution d'histidine biotine 0,5 mM, maintenue en surfusion à ca. 45 °C. Le contenu de chaque tube a été agité, puis étalé dans une boîte de Pétri contenant 20 ml de gélose de fond. Chaque point expérimental a été effectué en triplicat. Les boîtes ont ensuite été placées à ca. 37 °C pendant environ 44 heures, puis le nombre de colonies révertantes a été déterminé pour chaque boîte.

Parallèlement, des témoins négatifs (contenant 0,1 ml/boîte du solvant utilisé) ont été effectués dans les mêmes conditions, à raison de 6 boîtes par solvant (Gatehouse *et coll.*, 1994). Des témoins positifs de référence appropriés ont été également effectués (cf. Tableau 7).

À chaque essai, 3 boîtes de Pétri contenant 20 ml de gélose de fond ont reçu 2 ml de gélose de surface et ont ensuite été incubées dans les mêmes conditions que l'essai pour le contrôle de la stérilité des milieux. Les contrôles de stérilité sont présentés en Annexe n° 2, Tableau 2. Aucune colonie n'a été observée après 44 heures à ca.37 °C ; les résultats sont satisfaisants.

### **b) Avec activation métabolique**

La méthodologie est la même que celle décrite ci-dessus (cf. 3.2.8 a) sauf qu'immédiatement avant étalement, 500 µl du système d'activation métabolique S9 mix ont été ajoutés à la gélose de surface.

Les mêmes contrôles (témoins solvants, témoins positifs et stérilité des milieux) ont été effectués comme dans le cas de l'essai sans activation métabolique.

### **c) Produits de référence utilisés pour les témoins positifs**

Souches	Sans activation métabolique		Avec activation métabolique	
	Produit	Dose µg/boîte	Produit	Dose µg/boîte
<b>TA1537</b>	9-amino-acridine	50	2-anthramine	2
<b>TA98</b>	2-nitro fluorène	2	2-anthramine	2
<b>TA100</b>	Azide de sodium	1	2-anthramine	2
<b>TA102</b>	Mitomycine C	0,125	benzo[a]pyrène	2

Tableau 7 : Produits de référence utilisés pour les témoins positifs, avec et sans activation métabolique.

### **d) Système d'activation métabolique**

La fraction S9 et le S9 mix ont été préparés de la même manière que pour le test de génotoxicité (cf. 3.1.6 b). À chaque essai, 3 boîtes sont additionnées uniquement de S9-mix afin de vérifier la stérilité du S9-mix.

### **e) Lecture des résultats et critères de validité de l'essai**

#### **• Expression des résultats et analyse statistiques**

Après environ 44 heures d'incubation à ca. 37 °C, les colonies de révertants prototrophes qui se sont développées dans les boîtes sont dénombrées manuellement. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de mutants (= révertants) par boîte et, pour chaque dose de produit, est établi le ratio (rapport d'induction) : Nombre moyen de révertants par boîte en présence du produit / Nombre moyen de révertants par boîte en présence du solvant seul.

En parallèle, les moyennes des nombres de mutants par boîte pour chaque concentration testées sont comparées à la moyenne du témoin solvant par ANOVA avec le test de DUNNETT (Mahon *et coll.*, 1989).

- **Critères d'acceptation des résultats**

À la dose de CLD la plus élevée, aucune colonie ne doit être visible après étalement dans les conditions de l'essai principal et après 44 heures d'incubation à 37 °C, ou du moins l'éventuelle contamination ne doit pas interférer avec le système de test.

La fréquence moyenne des révertants spontanés (témoin solvant) de chaque souche doit être contenue entre les valeurs extrêmes des valeurs témoins historiques du laboratoire.

La fréquence moyenne des révertants, pour chaque souche, induite par les produits de référence (en présence et en absence d'activation métabolique) doit être supérieure à la limite inférieure des valeurs historiques.

**f) Critères de décision du pouvoir mutagène**

Étant donné que les procédures à utiliser pour évaluer l'activité mutagène sont semi-quantitatives, les critères utilisés pour déterminer un effet positif sont obligatoirement subjectifs et fondés principalement sur l'expérience. Toutefois, dans nos conditions expérimentales et lorsque les critères de validité sont remplis, les critères de décision suivants peuvent être utilisés :

- **Critères basés sur la significativité biologique**

Souche TA1537: Un produit qui provoque une réponse (i.e. une augmentation du nombre de révertants) positive proportionnelle à la dose sur au moins 3 concentrations avec, pour la plus forte augmentation, une valeur supérieure ou égale à 3 fois la valeur du témoin solvant, est considéré comme positif.

Souches TA98, TA100, TA102 : Un produit qui provoque une réponse positive proportionnelle à la dose sur au moins 3 concentrations avec, pour la plus forte augmentation, une valeur supérieure ou égale à 2 fois la valeur du témoin solvant, est considéré comme positif.

- **Comparaison aux témoins historiques**

Dans quelques cas limites, un critère supplémentaire à considérer est la comparaison entre le nombre de révertants induits par le produit testé et les témoins historiques du laboratoire. En effet, une augmentation de chaque valeur individuelle qui est au-dessus de la plus haute valeur des témoins historiques peut aider à supporter une conclusion comme « équivoque » ou « faiblement » mutagène.

L'ensemble de ces critères n'est pas absolu, cependant, ils constituent une aide à la décision qui permet de conclure dans la majorité des cas (Brusick, 1980).

- **Critères basés sur la significativité statistique**

En parallèle, les résultats obtenus peuvent être interprétés statistiquement (Mahon *et coll.*, 1989) par la méthode de DUNNETT qui permet de comparer la moyenne des valeurs par dose étudiée avec celle du témoin solvant.

À condition que l'ensemble des critères de validité ait été rempli, un produit est considéré clairement positif si, dans une des conditions expérimentales (avec ou sans activation métabolique d'une part, type de souches test d'autre part), les critères suivants sont remplis :

- au moins une des doses testées démontre une augmentation biologiquement significative (ratio d'induction de 2 ou 3 du nombre de révertants) comparée au témoin négatif correspondant et ;
- cette augmentation est dose-reliée ;
- et le nombre moyen de révertants aux doses testées est en dehors de la distribution des données historiques pour les témoins négatifs.

La substance testée est considérée alors comme capable d'induire des mutations dans le système d'essai.

Si, dans aucune des conditions testées, aucun de ces critères n'est atteint, la substance testée est considérée comme clairement négatif et incapable d'induire des mutations dans le système d'essai.

### **3.3. ANGIOGENÈSE *IN VITRO***

#### **3.3.1. Culture cellulaire**

Les HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells) proviennent de cordons ombilicaux mâles (Lonza® CC-2517) et ont été mises en culture dans des flasques Corning® CellBind® (Sigma-Aldrich® CLS3290) dans du milieu EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium, Lonza® CC-3162) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco®, 10270-106) décomplémenté. Elles ont été utilisées entre leur 2<sup>ème</sup> et leur 4<sup>ème</sup> passage après incubation dans une atmosphère contrôlée à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub> et saturée en H<sub>2</sub>O.

#### **3.3.2. Substances étudiées**

En plus de la 5a-hydroCLD et d'une CLD-3Cl formés par ISCR, le chlordécol a également été étudié pour disposer de résultats avec une substance au même nombre de chlores que la molécule mère mais avec la fonction cétone transformée en fonction alcool (des contraintes financières ont empêché l'étude de cette 4<sup>ème</sup> substance par les tests TK6 et Ames). Pour comparer au mieux les molécules entre elles, les mêmes concentrations molaires (M) ont été utilisées et non les concentrations massiques (µg/L). En effet, si la différence de masse entre CLDOH et CLD n'est que de 1 (0,2 % de différence par rapport à la CLD), elle est par contre de 106 pour CLD-3Cl (22 % de différence par rapport à la CLD) et de 34,5 pour CLD-1Cl (7 % de différence par rapport à la CLD).

La gamme de concentrations a été choisie pour couvrir à la fois des valeurs en CLD susceptibles d'être présentes dans des eaux souterraines ou superficielles fortement contaminées ( $10^{-8}$  M = 4,9 µg/L), des valeurs analogues et 200 fois plus faibles à celles mesurées dans des matrices biologiques humaines ( $5.10^{-9}$  M = 2,5 µg/L et  $10^{-11}$  M = 4,9 ng/L, respectivement ; voir Tableaux 1 et 2). Cette gamme de concentrations en CLD couvre également celle étudiée dans la seule étude publiée à ce jour sur l'effet proangiogénique de la CLD (Clere *et al.*, 2012).

### 3.3.3. Évaluation de l'angiogenèse *in vitro*

Après décongélation à 4 °C pendant 16 h, 10µl de matrigel® (ECM-gel, Sigma-Aldrich® E1270) ont été répartis dans chaque puits interne des lames 15 puits d'angiogenèse Ibi® (Biovalley® 81506). Les lames ont ensuite été mises à l'incubateur (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, atmosphère saturée en H<sub>2</sub>O) pendant environ 45 min. Par ailleurs, les HUVEC ont été rincées 2 fois avec une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile puis détachées du flasque avec de la trypsine (Lonza® CC-5012). Après neutralisation de la trypsine, les HUVEC ont été centrifugées pendant 5 min à 500 g. Le surnageant est ensuite jeté et le culot est repris par du milieu puis les HUVEC sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Quatorze solutions sont alors préparées : contrôle négatif (solvant DMSO), contrôle positif (milieu contenant 30 % de SVF), chlordécone (CLD) à 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M et 5.10<sup>-8</sup> M, 5a-hydroCLD (CLD-1Cl) à 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M et 5.10<sup>-8</sup> M, chlordécone-3Cl (CLD-3Cl) à 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M et 5.10<sup>-8</sup> M et chlordécol (CLDOH) à 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M et 5.10<sup>-8</sup> M. Ces concentrations nominales en substances tests sont très inférieures à la solubilité aqueuse de la chlordécone. La concentration en cellule est ajustée à 200 000 cellules/ml pour chacune des 14 solutions tests. 50µl, soit 10 000 cellules, sont déposées dans chaque puits de la lame d'angiogenèse. La lame est ensuite mise à l'incubateur (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, atmosphère saturée en H<sub>2</sub>O). Au bout de 24 h, les puits sont pris en photos au microscope à contraste de phase grossissement X 10 et la longueur moyenne des capillaires formés par les HUVEC est quantifiée après analyse à l'aide du logiciel ImageJ. Les tests ont été répétés sur 6 lames de manière à permettre un traitement statistique. La distribution des valeurs pour chaque condition expérimentale ne suivant pas une loi normale, un test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn a été utilisé.



## 4. Résultats et discussion

### 4.1. MICRONOYAUX

#### 4.1.1. Critères d'acceptation des résultats

Pour les trois substances, les résultats obtenus avec le témoin négatif ont été comparables à ceux habituellement observés au laboratoire dans les mêmes conditions expérimentales. De plus, le nombre moyen de micronoyaux observé avec les substances tests ne s'est trouvé que très rarement dans l'intervalle à 95 % des témoins historiques.

Parallèlement aux essais principaux, des tests ont été effectués sur des produits génotoxiques de référence clastogènes (mitomycine C en absence d'activation métabolique et cyclophosphamide en présence d'activation métabolique par le S9 mix) et avec un produit de référence aneugène (griseofulvine lors du traitement long en absence d'activation métabolique). Des augmentations statistiquement significatives du nombre de micronoyau par rapport au témoin négatif ont bien été observées. Les valeurs observées sont incluses dans l'intervalle des témoins historiques.

Un nombre suffisant de cellules (au moins 2 000 cellules) a été analysé pour 3 concentrations de chaque produit testé.

Pour les 3 substances et dans les 3 schémas de traitement, la plus forte concentration de l'élément d'essai pour évaluer la génotoxicité a présenté une survie relative supérieure à l'intervalle de 45 +/- 5 % par rapport au témoin négatif correspondant comme cela est recommandé dans la ligne directrice de l'OCDE n° 487.

Pour les trois substances, aucune cellule micronucléée /2 000 cellules mononucléées n'a été observée pour le témoin solvant négatif au cours de l'essai en présence d'activation métabolique. Une lecture complémentaire a donc été réalisée sur 2 000 autres cellules mononucléées. En compilant les 2 lectures, une moyenne de 2 cellules micronucléée /2 000 cellules mononucléées a été obtenue pour le témoin solvant négatif. Cette valeur est incluse dans l'intervalle des témoins historiques (*i.e.* 1 - 12).

Tous les critères d'acceptation des résultats ont donc été remplis.

#### 4.1.2. Cytotoxicité de la chlordécone

Le traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi de 24 heures de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 5 plus fortes concentrations testées de 62,5 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 0 à 13,3 %. La concentration immédiatement inférieure de 31,25 µg/ml n'a induit aucune toxicité avec 99,7 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

Le traitement de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement a révélé une activité cytotoxique importante aux 5 plus fortes concentrations testées de 62,5 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 0 à 3,4 %. La concentration immédiatement inférieure de 31,25 µg/ml n'a induit aucune toxicité avec 112,4 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

Le traitement de 3 heures avec activation métabolique suivi de 24 heures de recouvrement a révélé une activité cytotoxique importante aux 4 plus fortes concentrations testées de 125 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 0,5 à 2,5 %. La concentration immédiatement inférieure de 62,5 µg/ml a induit une toxicité modérée avec 76,9 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

#### 4.1.3. Génotoxicité de la chlordécone

Le résumé des résultats est présenté dans le Tableau 8.

Lors du traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement, la chlordécone a montré une augmentation non statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées à la concentration intermédiaire de 15,63 µg/ml avec 14 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées, vs. 8 dans le témoin solvant. Étant donnée l'hétérogénéité des résultats entre les 2 cultures à cette concentration quant au nombre de micronoyaux comptabilisés (*i.e.* 12 et 2 cellules micronucléées /1 000 cellules mononucléées pour les cultures 1 et 2, respectivement), une lecture complémentaire a été réalisée à nouveau sur 2 000 autres cellules mononucléées à cette concentration et pour le témoin négatif correspondant. Lors de cette seconde lecture, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de micronoyaux n'a été observée avec 9 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées, vs. 6 dans le témoin solvant. Après compilation des résultats des 2 lectures, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative n'a été observée avec 11,5 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 7 dans le témoin solvant. Cette valeur est supérieure à la valeur maximale de l'intervalle de confiance de 95 % (*i.e.* 7,27) mais comprise dans l'intervalle des données historiques pour le témoin négatif dans les mêmes conditions expérimentales (*i.e.* 2 - 13) et aucune relation dose-effet n'a été observée.

La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement court de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement.

Lors du traitement continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement, la chlordécone n'a induit aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées aux concentrations testées de 7,81 à 31,25 µg/ml avec 1 ou 7 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées, vs. 9 dans le témoin solvant. Par ailleurs, des diminutions statistiquement significatives ont été observées aux 2 plus fortes concentrations analysées de 31,25 and 15,63 µg/ml avec 1 cellule micronucléée /2 000 cellules mononucléées, vs. 9 dans le témoin solvant. Ces effets n'ont aucune signification en termes de génotoxicité et la substance testée est considérée comme non génotoxique après un traitement continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement.

Enfin, lors du traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique, la chlordécone a induit une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées à la plus forte concentration de 62,5 µg/ml avec 9 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées, vs. 0 dans le témoin solvant. Néanmoins, il est à noter que le nombre de cellules micronucléées dans le témoin négatif est particulièrement faible. De plus, une hétérogénéité des résultats entre les 2 cultures à 62,5 µg/ml quant au nombre de micronoyaux comptabilisés a été observée. Pour les raisons évoquées, une lecture complémentaire a été réalisée sur 2 000 autres cellules mononucléées dans ces conditions.

Lors de cette seconde lecture, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de micronoyaux n'a été observée avec 5 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 4 dans le témoin solvant. Après compilation des résultats des 2 lectures, une augmentation statistiquement significative a été observée avec 7 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées, vs. 2 dans le témoin solvant. Néanmoins, cette valeur est comprise dans l'intervalle de confiance de 95 % (*i.e.* 5,44 – 7,27) et aucune relation dose-effet n'a été observée. La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique.

Produit	Essai SANS activation métabolique										Essai AVEC activation métabolique				
	Traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement					Traitement de 27 heures sans recouvrement					Traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement				
	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (MTT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	<i>p</i>	ANOVA	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (MTT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	<i>p</i>	ANOVA	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (MTT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	<i>p</i>	ANOVA
Témoin solvant	0	-	7	-	-	0	-	9	-	-	0	-	2	-	-
Mitomycine C	0,5	98,5	95	<0,001	-	0,2	90,9	116	<0,001	-					
Griseofulvine						5	86,2	41	<0,001	-					
Cyclophosphamide											5	100,6	42	<0,001	-
Chlordécone	31,25	99,7	5	N.S.	N.S.	31,25	112,4	1	<0,05	N.S.	62,5	76,9	7	<0,05	N.S.
	15,63	104,1	11,5	N.S.		15,63	124,4	1	<0,05		31,25	86,5	3	N.S.	
	7,81	102,4	2	N.S.		7,81	118,3	7	N.S.		15,63	92,5	4	N.S.	

Tableau 8 : Résultats des tests de micro-noyauxTK6 pour la chlordécone.

N.S.= non significativement différent du contrôle au seuil de  $p < 0,05$  d'après le test post hoc de DUNNETT.

#### 4.1.4. Cytotoxicité de la 5a-hydroCLD

Le traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi de 24 heures de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 4 plus fortes concentrations testées de 125 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 0 à 3,8 %. La concentration immédiatement inférieure de 62,5 µg/ml a induit une toxicité modérée avec 66,9 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

Le traitement de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 5 plus fortes concentrations testées de 62,5 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 0 à 4,0 %. La concentration immédiatement inférieure de 31,25 µg/ml n'a induit aucune toxicité avec 129,7 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

Le traitement de 3 heures avec activation métabolique suivi de 24 heures de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 4 plus fortes concentrations testées de 125 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 0,5 à 3,3 %. La concentration immédiatement inférieure de 62,5 µg/ml a induit une toxicité modérée avec 73,4 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

#### 4.1.5. Génotoxicité de la 5a-hydroCLD

Le résumé des résultats est présenté dans le Tableau 9.

Lors du traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement, la 5a-hydroCLD n'a induit aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées aux concentrations testées de 15,63 à 62,5 µg/ml avec 1 à 4 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 8 dans le témoin solvant. De plus une diminution statistiquement significative a été observée à la plus forte concentration de 62,5 µg/ml avec 1 cellule micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 8 dans le témoin solvant. Néanmoins, cet effet n'a aucune significativité en termes de génotoxicité. La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement court de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement.

Lors du traitement continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement, la 5a-hydroCLD n'a induit aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées aux concentrations testées de 7,81 à 31,25 µg/ml avec 5 à 8 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 9 dans le témoin solvant. La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement.

Enfin, lors du traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique, la 5a-hydroCLD n'a induit aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées aux concentrations testées de 15.63 à 62.5 µg/ml avec 0 à 5 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 2 dans le témoin solvant. Néanmoins, il est à noter que le nombre de micronoyau dans le témoin négatif est particulièrement faible. La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique.

Produit	Essai SANS activation métabolique										Essai AVEC activation métabolique				
	Traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement					Traitement de 27 heures sans recouvrement					Traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement				
	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (MTT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	<i>p</i>	ANOVA	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (MTT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	<i>p</i>	ANOVA	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (MTT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	<i>p</i>	ANOVA
Témoin solvant	0	-	8	-	-	0	-	9	-	-	0	-	2	-	-
Mitomycine C	0,5	98,5	95	<0,001	-	0,2	90,9	116	<0,001	-					
Griseofulvine						5	86,2	41	<0,001	-					
Cyclophosphamide											5	100,6	42	<0,001	-
5a-Chlordécone (CLD-1CL)	62,5	66,9	1	<0,05	N.S.	31,25	129,7	7	N.S.	N.S.	62,5	73,4	0	N.S.	<0,05
	31,25	100,0	4	N.S.		15,63	125,4	8	N.S.		31,25	81,9	5	N.S.	
	15,63	96,2	3	N.S.		7,81	118,0	5	N.S.		15,63	84,5	2	N.S.	

Tableau 9 : Résultats des tests de micro-noyaux TK6 pour la 5a-hydroCLD (chlordécone -1 Cl).

N.S.= non significativement différent du contrôle au seuil de  $p < 0,05$  d'après le test post hoc de DUNNETT.

#### 4.1.6. Cytotoxicité de la tri-hydrochlordécone (CLD-3CI)

Le traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi de 24 heures de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 3 plus fortes concentrations testées de 250 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 2,7 à 16,6 %. La concentration immédiatement inférieure de 125 µg/ml a induit une toxicité modérée avec 70,1 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

Le traitement de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 4 plus fortes concentrations testées de 125 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 4,9 à 5,9 %. La concentration immédiatement inférieure de 62,5 µg/ml a induit une toxicité importante mais acceptable avec 41,9 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

Le traitement de 3 heures avec activation métabolique suivi de 24 heures de recouvrement a révélé une activité cytotoxique très importante aux 3 plus fortes concentrations testées de 250 à 1 000 µg/ml, avec des taux de survie relative allant de 3,8 à 33 %. La concentration immédiatement inférieure de 125 µg/ml a induit une toxicité modérée avec 66,6 % de survie relative. Cette concentration a donc été retenue comme la concentration maximale à analyser dans l'essai de génotoxicité.

#### 4.1.7. Génotoxicité de la tri-hydrochlordécone (CLD-3CI)

Le résumé des résultats est présenté dans le Tableau 10.

Lors du traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement, la CLD-3CI n'a induit aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées aux concentrations testées de 31,25 à 125 µg/ml avec 1 à 7 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 8 dans le témoin solvant. De plus une diminution statistiquement significative a été observée à la plus forte concentration de 62,5 µg/ml avec 1 cellule micronucléées /2 000 cellules mononucléées, vs. 8 dans le témoin solvant. Cet effet n'a aucune signification en termes de génotoxicité. La substance testée est considérée comme non génotoxique après un traitement court de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement.

Lors du traitement continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement, la CLD-3CI a montré une augmentation non-statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées à la plus forte concentration de 62,5 µg/ml avec 17 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 9 dans le témoin solvant. Étant donnée l'hétérogénéité des résultats entre les 2 cultures à cette concentration quant au nombre de micronoyaux comptabilisés (*i.e.* 12 et 5), une lecture complémentaire a été réalisée sur 2 000 cellules mononucléées à cette concentration et pour le témoin négatif correspondant. Lors de cette deuxième lecture, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de micronoyaux n'a été observée avec 9 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 5 dans le témoin solvant. Après compilation des résultats des 2 lectures, une augmentation non-statistiquement significative a été observée avec 13 cellules micronucléées /2 000 cellules mononucléées vs. 7 dans le témoin solvant. Cette valeur est légèrement supérieure à la valeur maximale déjà observée dans les données historiques pour le témoin négatif dans les mêmes conditions expérimentales (*i.e.* 12). Compte tenu de l'ensemble des résultats, en l'absence de significativité biologique lors

de la deuxième lecture, l'effet observé lors de la première lecture n'a pas été considéré comme biologiquement pertinent. L'effet a été observé exclusivement à une concentration présentant une forte toxicité (*i.e.* 41,9 % de survie relative) et uniquement pour la 1ère culture peut être dû à une distribution non homogène des cellules micronucléées exclusivement lors de la première lecture. La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement.

Enfin, lors du traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique, la CLD-3Cl n'a induit aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de cellules micronucléées aux concentrations testées de 31,25 à 125 µg/ml avec 2 à 4 cellules micronucléées / 2 000 cellules mononucléées vs. 2 dans le témoin solvant. (Il est à noter qu'une deuxième lecture sur 2 000 autres cellules a été réalisée pour le contrôle négatif). La substance testée est donc considérée comme non génotoxique après un traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique.



Produit	Essai SANS activation métabolique										Essai AVEC activation métabolique				
	Traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement					Traitement de 27 heures sans recouvrement					Traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement				
	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (M TT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	$p$	ANOVA	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (M TT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	$p$	ANOVA	Conc. en $\mu\text{g/mL}$	% de survie relative / témoin (M TT)	Nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées	$p$	ANOVA
Témoin solvant	0	-	8	-	-	0	-	7	-	-	0	-	2	-	-
Mitomycine C	0,5	98,5	95	<0,001	-	0,2	90,9	116	<0,001	-					
Griseofulvine						5	86,2	41	<0,001	-					
Cyclophosphamide											5	100,6	42	<0,001	-
Trihydrochlorodécone CLD-3CL	125	70,1	1	<0,05	N.S.	62,5	41,9	13	N.S.	N.S.	125	66,6	2	N.S.	N.S.
	62,5	89,9	7	N.S.		31,25	112,7	5	N.S.		62,5	78,2	3	N.S.	
	31,25	103,8	2	N.S.		15,63	114,9	4	N.S.		31,25	86,0	4	N.S.	

Tableau 10 : Résultats des tests de micro-noyaux TK6 pour la chlordécone – 3 Cl.

N.S.= non significativement différent du contrôle au seuil de  $p < 0,05$  d'après le test post hoc de DUNNETT.

## 4.2. TESTS D' AMES

Pour les 3 substances testées, dans les conditions de l'essai principal et après environ 44 heures d'incubation à ca. 37 °C, aucune colonie n'était visible. Le contrôle de la stérilité est conforme.

En parallèle des essais principaux, des tests ont été réalisés sur des produits de référence de manière à démontrer la sensibilité des souches testées et l'efficacité du système d'activation métabolique. Comme attendu, des augmentations statistiquement et biologiquement significatives ont été observées en présence des produits positifs de référence. De plus, les valeurs observées sont plus élevées que la plus basse limite des témoins historiques.

Les taux de révertants spontanés (contrôles solvant) se sont situés dans l'intervalle des valeurs généralement observées dans les conditions expérimentales.

Les critères de validité ont donc été remplis.

### 4.2.1. Cytotoxicité de la chlordécone

Vis-à-vis de la souche TA1537 en absence d'activation métabolique, une cytotoxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 30 µg/boîte a également induit une forte cytotoxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin la dose de 10 µg/boîte a induit une légère toxicité compatible avec le système d'essai. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 100 µg/boîte a induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin les 2 doses de 30 et 10 µg/boîte ont induit respectivement une toxicité modérée à faible.

Vis-à-vis de la souche TA98 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. Les 2 doses immédiatement inférieures de 100 et 30 µg/boîte ont induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, la dose de 10 µg/boîte a induit une légère toxicité compatible avec le système d'essai. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin les 2 doses de 30 et 10 µg/boîte ont induit respectivement une toxicité modérée à faible.

Vis-à-vis de la souche TA100 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 30 µg/boîte a induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin la dose de 10 µg/boîte a induit une toxicité modérée. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. Les 2 doses immédiatement inférieures de 100 et 30 µg/boîte ont induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, les 2 doses de 10 et 3 µg/boîte ont induit une toxicité faible.

Vis-à-vis de la souche TA102 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 30 µg/boîte a induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, la dose de 10 µg/boîte a induit une toxicité faible. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. Les 2 doses immédiatement inférieures de 100 et 30 µg/boîte ont induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, la dose de 10 µg/boîte a induit une toxicité faible.

#### **4.2.2. Cytotoxicité de la 5a-hydroCLD**

Dans les conditions de l'essai principal et après environ 44 heures d'incubation à ca. 37 °C, aucune colonie n'était visible. Le contrôle de la stérilité est conforme.

Vis-à-vis de la souche TA1537 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 100 µg/boîte a induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, les 2 doses de 100 et 30 µg/boîte ont induit une toxicité modérée à faible.

Vis-à-vis de la souche TA98 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 100 µg/boîte a induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante à faible a été observée aux doses allant de 200 à 10 µg/boîte.

Vis-à-vis de la souche TA100 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée à la plus forte dose testée de 200 µg/boîte avec une absence de pousse de fond. La dose immédiatement inférieure de 100 µg/boîte a induit également une forte toxicité avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, la dose de 30 µg/boîte a induit une toxicité faible. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, la dose de 30 µg/boîte a induit une faible toxicité.

Vis-à-vis de la souche TA102 en absence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. En présence d'activation métabolique, une toxicité importante a été observée aux 2 plus fortes doses testées de 200 et 100 µg/boîte avec une absence totale de colonies révertantes et la présence de microcolonies de toxicité. Enfin, la dose de 30 µg/boîte a induit une faible toxicité.

#### **4.2.3. Cytotoxicité de la CLD-3CI**

Aucune toxicité n'a été observée quelle que soit la souche testée en absence et en présence d'activation métabolique.

#### 4.2.4. Mutagenèse

Par rapport au plan expérimental prévu au départ, le test de stérilité a été légèrement modifié pour les 3 substances. Lors de l'essai de stérilité, 0,1 ml des 3 plus fortes concentrations du produit à étudier ont été ajoutés à 2 ml de gélose de surface en surfusion. Le mélange a été étalé sur 1 boîte de Pétri contenant 20 ml de gélose de fond au lieu de 3 boîtes de Pétri. Néanmoins, comme la substance testée est stérile, cette déviation n'a aucune incidence sur l'étude.

Pour la CLD, la forte cytotoxicité a poussé à analyser seulement 3 ou 4 doses au lieu des 5 doses recommandées par la ligne directrice de l'OCDE n° 471. Néanmoins, cette déviation n'a eu aucune incidence sur l'interprétation des résultats.

Le résumé des résultats est présenté au Tableau 11 pour la CLD, Tableau 12 pour la 5a-hydroCLD et tableau 13 pour la CLD-3Cl.

Dans les essais réalisés avec et sans activation métabolique, aucune augmentation statistiquement ou biologiquement significative du nombre de révertants n'a été notée vis-à-vis des 4 souches de *Salmonella typhimurium* TA1537, TA98, TA100 et TA102 en présence de la chlordécone, la 5a-CLD et la CLD-3Cl. Par ailleurs, pour la CLD, des diminutions statistiquement significatives du nombre de révertants ont été observées vis-à-vis de la souche TA98 en présence d'activation métabolique et vis-à-vis des souches TA100 et TA102 en absence et en présence d'activation métabolique à la plus forte dose analysable. Pour la 5a-hydroCLD, des diminutions statistiquement significatives du nombre de révertants ont été observées vis-à-vis des souches TA98, TA100 et TA102 en absence et en présence d'activation métabolique. Pour la CLD-3CL, des diminutions statistiquement significatives du nombre de révertants ont été observées vis-à-vis des souches TA100 et TA102 en absence d'activation métabolique. Néanmoins ces diminutions n'ont aucune signification en termes de mutagénicité.

La chlordécone, la 5a-hydroCLD et la CLD-3Cl sont donc considérées comme non mutagènes dans les conditions testées.

	TA 1537			TA 98			TA 100			TA102		
	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)
Témoin positif	(b)	1360,0	<b>302,2</b>	(b)	480,0	<b>24,6</b>	(b)	701,3	<b>5,7</b>	(b)	1232,0	<b>6,3</b>
<b>Chlordécone  SANS S9-mix</b>	0	4,5	-	0	19,5	-	0	122,0	-	0	194,3	-
	1	7,3	<b>1,6</b>	1	21,3	<b>1,1</b>	1	118,3	<b>1,0</b>	1	197,3	<b>1,0</b>
	3	5,0	<b>1,1</b>	3	15,3	<b>0,8</b>	3	115,7	<b>0,9</b>	3	164,0	<b>0,8</b>
	10	3,7	<b>0,8</b>	10	10,0	<b>0,5</b>	10	37,3	<b>0,3</b>	10	53,7	<b>0,3</b>
	30	*	*	30	*	*	30	*	*	30	*	*
	100	**	**	100	*	*	100	**	**	100	**	**
	200	**	**	200	**	**	200	**	**	200	**	**
Témoin positif	(c)	261,3	<b>52,3</b>	(c)	1616,0	<b>78,1</b>	(c)	2032,0	<b>17,2</b>	(c)	1573,3	<b>5,1</b>
<b>Chlordécone AVEC S9-mix  SANS PRE-INCUBATION</b>	0	5,0	-	0	20,7	-	0	118,0	-	0	307,3	-
	1	6,3	<b>1,3</b>	1	17,0	<b>0,8</b>	1	117,0	<b>1,0</b>	1	234,7	<b>0,8</b>
	3	7,7	<b>1,5</b>	3	22,3	<b>1,1</b>	3	114,0	<b>1,0</b>	3	256,7	<b>0,8</b>
	10	4,7	<b>0,9</b>	10	15,3	<b>0,7</b>	10	87,3	<b>0,7</b>	10	201,3	<b>0,7</b>
	30	3,0	<b>0,6</b>	30	9,7	<b>0,5</b>	30	*	*	30	*	*
	100	*	*	100	*	*	100	*	*	100	*	*
	200	**	**	200	*	*	200	**	**	200	**	**

Tableau 11 : Résultats des tests Ames pour la chlordécone.

\*: Présence de microcolonies de toxicité ; \*\*: absence de pousse de fond.

	TA 1537			TA 98			TA 100			TA102			
	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	
Témoin positif	(b)	1360,0	<b>302,2</b>	(b)	480,0	<b>24,6</b>	(b)	701,3	<b>5,7</b>	(b)	1232,0	<b>6,3</b>	
<b>5a-Chlordécone (CLD-1Cl)</b>	0	4,5	-	0	19,5	-	0	122,0	-	0	194,3	-	
	1	4,7	<b>1,0</b>	1	16,0	<b>0,8</b>	1	117,3	<b>1,0</b>	1	221,3	<b>1,1</b>	
	3	3,7	<b>0,8</b>	3	13,3	<b>0,7</b>	3	119,3	<b>1,0</b>	3	188,7	<b>1,0</b>	
	10	5,7	<b>1,3</b>	10	12,7	<b>0,7</b>	10	109,0	<b>0,9</b>	10	184,7	<b>1,0</b>	
	<b>SANS S9-mix</b>	30	6,0	<b>1,3</b>	30	15,0	<b>0,8</b>	30	61,3	<b>0,5</b>	30	101,3	<b>0,5</b>
		100	*	*	100	*	*	100	*	*	100	*	*
		200	**	**	200	**	**	200	**	**	200	*	*
Témoin positif	(c)	261,3	<b>52,3</b>	(c)	1616,0	<b>78,1</b>	(c)	2032,0	<b>17,2</b>	(c)	1573,3	<b>5,1</b>	
<b>5a-Chlordécone (CLD-1Cl) AVEC S9-mix</b>	0	5,0	-	0	20,7	-	0	118,0	-	0	307,3	-	
	1	4,3	<b>0,9</b>	1	14,3	<b>0,7</b>	1	113,7	<b>1,0</b>	1	217,3	<b>0,7</b>	
	3	5,3	<b>1,1</b>	3	19,7	<b>1,0</b>	3	109,3	<b>0,9</b>	3	262,0	<b>0,9</b>	
	10	6,7	<b>1,3</b>	10	13,7	<b>0,7</b>	10	112,7	<b>1,0</b>	10	220,7	<b>0,7</b>	
	30	4,0	<b>0,8</b>	30	19,7	<b>1,0</b>	30	88,3	<b>0,7</b>	30	198,7	<b>0,6</b>	
	<b>SANS PRE-INCUBATION</b>	100	2,7	<b>0,5</b>	100	9,3	<b>0,4</b>	100	*	*	100	*	*
		200	*	*	200	9,3	<b>0,4</b>	200	*	*	200	*	*

Tableau 12 : Résultats des tests Ames pour la 5a-hydroCLD (chlordécone – 1 Cl).

\*: Présence de microcolonies de toxicité ; \*\*: absence de pousse de fond.

	TA 1537			TA 98			TA 100			TA102		
	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)	DOSES en µg/boîte	revertants /boîte	Rapport d'induction (a)
Témoin positif	(b)	1360,0	<b>302,2</b>	(b)	480,0	<b>24,6</b>	(b)	701,3	<b>5,7</b>	(b)	1232,0	<b>6,3</b>
<b>Chlordécone -3 Cl</b>  <b>SANS</b> <b>S9-mix</b>	0	4,5	-	0	19,5	-	0	122,0	-	0	194,3	-
	1	8,3	<b>1,8</b>	1	15,0	<b>0,8</b>	1	111,7	<b>0,9</b>	1	191,3	<b>1,0</b>
	3	6,7	<b>1,5</b>	3	12,7	<b>0,7</b>	3	128,3	<b>1,1</b>	3	215,3	<b>1,1</b>
	10	4,3	<b>1,0</b>	10	16,7	<b>0,9</b>	10	113,7	<b>0,9</b>	10	208,7	<b>1,1</b>
	30	5,3	<b>1,2</b>	30	11,7	<b>0,6</b>	30	102,7	<b>0,8</b>	30	199,3	<b>1,0</b>
	100	3,7	<b>0,8</b>	100	16,7	<b>0,9</b>	100	87,3	<b>0,7</b>	100	172,0	<b>0,9</b>
	200	5,3	<b>1,2</b>	250	16,3	<b>0,8</b>	200	101,0	<b>0,8</b>	200	150,0	<b>0,8</b>
Témoin positif	(c)	261,3	<b>52,3</b>	(c)	1616,0	<b>78,1</b>	(c)	2032,0	<b>17,2</b>	(c)	1573,3	<b>5,1</b>
<b>Chlordécone -3 Cl</b> <b>AVEC</b> <b>S9-mix</b>  <b>SANS</b> <b>PRE-INCUBATION</b>	0	5,0	-	0	20,7	-	0	118,0	-	0	307,3	-
	1	7,3	<b>1,5</b>	1	22,7	<b>1,1</b>	1	100,7	<b>0,9</b>	1	326,0	<b>1,1</b>
	3	5,0	<b>1,0</b>	3	24,3	<b>1,2</b>	3	110,0	<b>0,9</b>	3	366,0	<b>1,2</b>
	10	5,3	<b>1,1</b>	10	21,0	<b>1,0</b>	10	109,3	<b>0,9</b>	10	360,0	<b>1,2</b>
	30	5,7	<b>1,1</b>	30	19,0	<b>0,9</b>	30	94,7	<b>0,8</b>	30	356,0	<b>1,2</b>
	100	3,7	<b>0,7</b>	100	19,3	<b>0,9</b>	100	116,0	<b>1,0</b>	100	344,7	<b>1,1</b>
	200	7,7	<b>1,5</b>	200	14,7	<b>0,7</b>	200	93,7	<b>0,8</b>	200	285,3	<b>0,9</b>

Tableau 13 : Résultats des tests Ames pour la chlordécone – 3 Cl.

### 4.3. TESTS D'ANGIOGENÈSE

La figure 2 rassemble l'ensemble des résultats obtenus pour les 3 concentrations des 4 substances cibles, le contrôle négatif et le contrôle positif. Les comparaisons sont systématiquement effectuées par rapport au témoin solvant (contrôle négatif).

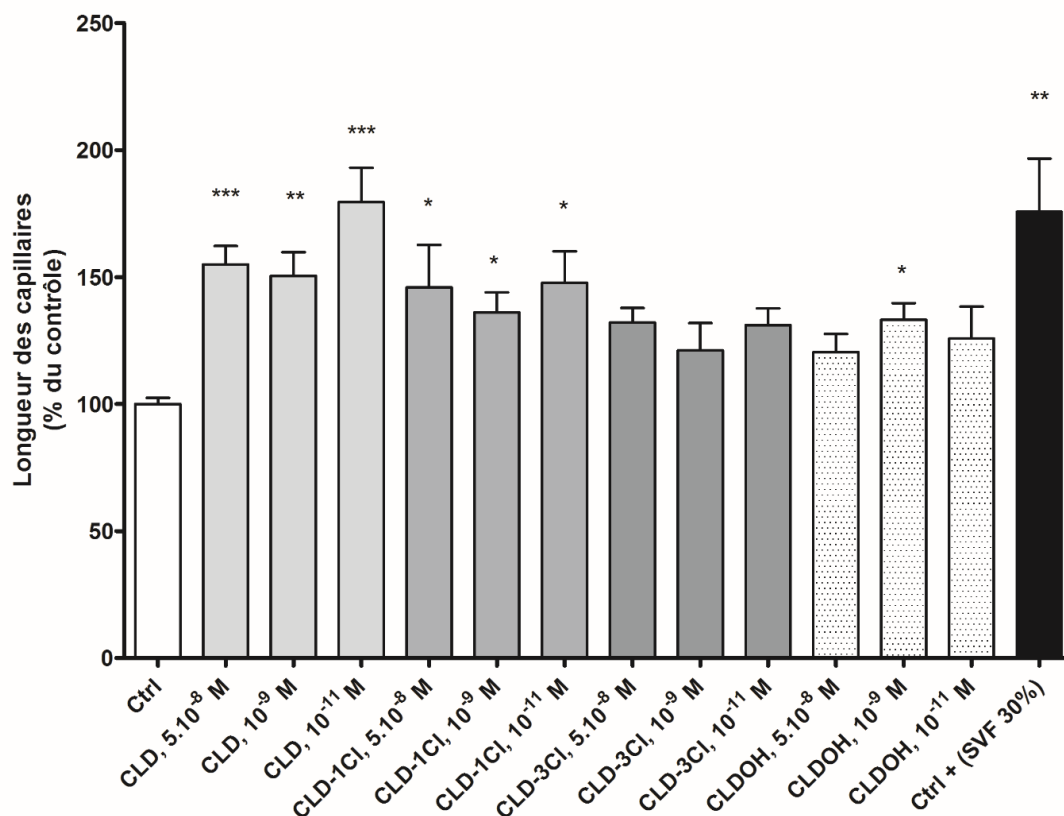


Figure 2 : Longueur des capillaires générés par les 3 concentrations étudiées des 4 substances testées. Tous les résultats sont exprimés en % du contrôle solvant (Ctrl), avec  $n = 6$ . \* :  $p < 0.05$ ; \*\* :  $p < 0.01$ ; \*\*\* :  $p < 0.001$  : différence significative par rapport au contrôle selon le test de Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn. Ctrl + (SVF 30 %) : contrôle positif.

La distribution des valeurs pour chaque condition expérimentale ne suivant pas une loi normale, le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn a été utilisé.

Aucune relation dose-effet n'est mise en évidence pour les 4 substances, bien que 2 ordres de grandeur soient couverts par la gamme de concentrations étudiées. Le plus fort effet proangiogénique de la CLD est observé pour la concentration la plus faible, ce qui est parfois observé pour certains perturbateurs endocriniens (Beronius & Vandenberg, 2015 ; Kabir *et al.*, 2015).

La CLD et la 5a-hydroCLD ont un effet proangiogénique plus élevé que celui du témoin négatif solvant, la différence étant significative au plus faible risque d'erreur pris en compte ( $p < 0,001$ ) pour deux des trois concentrations en CLD, et à un niveau nettement plus élevé ( $p < 0,05$ ) pour les trois concentrations en 5a-hydroCLD. L'effet proangiogénique de la CLD-3Cl n'est par contre pas plus élevé ( $p > 0,05$ ) que celui du témoin négatif solvant. Le chlordécol ne montre un effet proangiogénique supérieur au témoin solvant que pour la concentration intermédiaire  $10^{-9}$  M.



Les figures 3 à 5 comparent chaque molécule à la même concentration molaire.

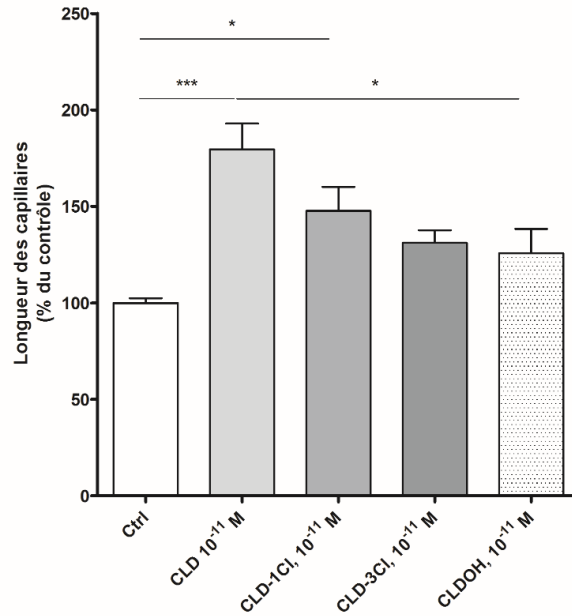


Figure 3 : Longueur des capillaires générés par 4 substances testées à la concentration de 10<sup>-11</sup> M. Tous les résultats sont exprimés en % du contrôle (Ctrl), avec n= 6. Les extrémités des traits horizontaux relient les substances différentes entre elles avec un niveau de significativité statistique (test de Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn) de 0,1 % (\*\*\*), 1 % (\*\*) ou 5 % (\*).

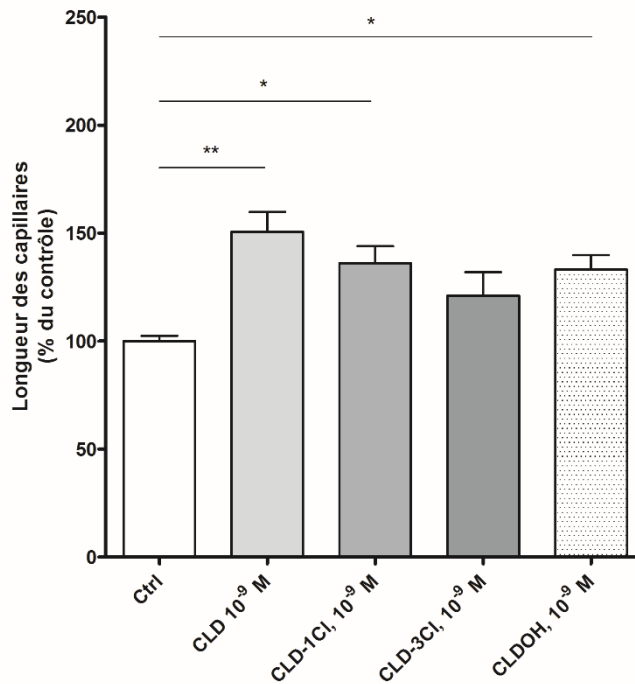


Figure 4 : Longueur des capillaires générés par la concentration de 10<sup>-9</sup> M des 4 substances testées. Voir légende de la figure précédente pour l'explication des traits horizontaux et étoiles au-dessus des barres d'histogramme.

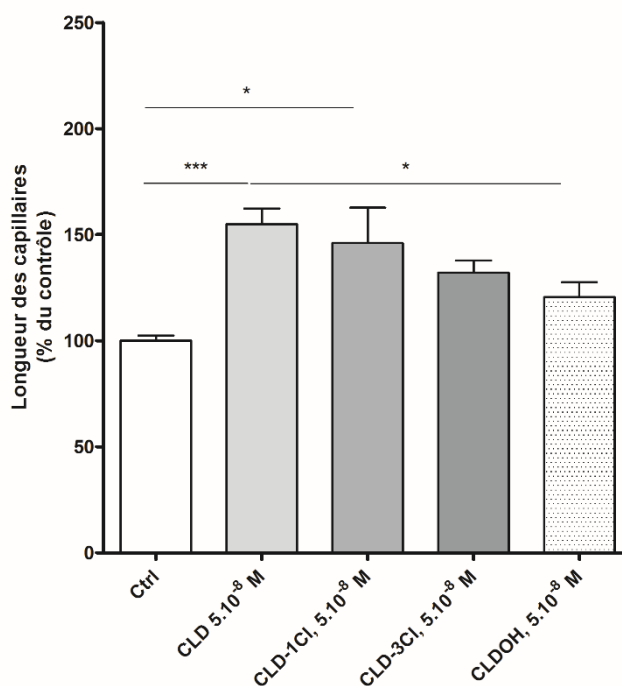


Figure 5 : Longueur des capillaires générés par la concentration de  $5.10^{-8}$  M des 4 substances testées. Voir légende de la figure précédente pour l'explication des traits horizontaux et étoiles au-dessus des barres d'histogramme.

Le tableau 14 permet une comparaison rapide de tous les résultats.

Concentration (M)	Effet par rapport au contrôle négatif (Ctrl)			
	CLD	5a-hydroCLD	CLD – 3 Cl	CLD-OH
$10^{-11}$	> ***	> *	=	=
$10^{-9}$	> **	> *	=	> *
$5 \times 10^{-8}$	> ***	> *	=	=

Tableau 14 : Synthèse des effets observés pour les 4 substances par rapport au contrôle négatif.

La déchloration entraîne donc une diminution de l'effet proangiogénique, tout comme la transformation de la fonction cétone en fonction alcool. Les mécanismes responsables de l'effet proangiogénique de la CLD n'étant pas bien connus à ce jour, aucune explication scientifiquement fondée ne peut être donnée quant à l'atténuation de cet effet. Il est toutefois incontestable que les produits de transformation de la CLD résultant de l'ISCR ont un potentiel angiogénique moindre par rapport à la chlordécone, ce qui est une avancée majeure dans l'évaluation des divers bénéfices potentiels du procédé d'ISCR.

## 5. Conclusion et perspectives

Au lancement de cette étude, rien n'était connu sur la toxicité des produits déchlorés formés par le procédé d'In Situ Chemical Reduction (ISCR) appliqué pour la décontamination des sols contenant de la chlordécone (CLD). Les travaux sur des mésocosmes de laboratoire avec des sols antillais avait montré l'absence d'effet écotoxicologique pour une gamme assez large de tests standardisés (Mouvet *et al.*, 2016), mais ces tests ne ciblaient pas de molécules spécifiques.

Parmi les 14 produits déchlorés de la CLD formés par ISCR identifiés à ce jour, la toxicité de 2 d'entre eux, la 5a-hydroCLD (monohydroCLD, CLD dont le Cl en position 5a a été remplacé par un H) et une tri-hydroCLD (CLD-3Cl), a été étudiée par trois tests.

Le test de génotoxicité par évaluation de l'induction de micronoyaux sur cellules TK6 (lignée lymphoblastoïde humaine) et le test d'Ames (test de mutation ponctuelle vis-à-vis de souches bactériennes) ne montrent aucune différence significative de génotoxicité et de mutagenèse entre la CLD, la 5a-hydroCLD et la tri-hydroCLD, les 3 substances n'exprimant pas d'effet toxique de ce type dans les tests utilisés. Par contre, la cytotoxicité de la 5a-hydroCLD est nettement plus faible que celle de la CLD, la cytotoxicité de la tri-hydroCLD étant encore nettement moindre que celle de la 5a-hydroCLD.

Le test relatif à l'effet pro-angiogénique montre une différence très significative ( $p < 0,001$ ) entre la CLD et le témoin, et un effet également supérieur au témoin pour la 5a-hydroCLD, mais de manière moins statistiquement significative ( $p < 0,05$ ) que celui de la CLD. Par contre, l'effet pro-angiogénique de la CLD -3Cl n'est pas significativement plus fort que celui du témoin.

L'effet positif de diminution des concentrations en CLD des sols traités par ISCR s'accompagne donc d'un effet positif sur la toxicité *in vitro*, avec une cytotoxicité et un effet pro-angiogénique de deux des principaux produits de dégradation déchlorés formés par ISCR moindres que ceux de la CLD.

Des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'écotoxicité de ces dérivés doivent maintenant être réalisés afin de confirmer ces résultats encourageants. Des travaux en ce sens sont prévus en 2016 et 2017 dans le cadre du programme de subvention MEDDE/Bureau de la Prospective et de l'Évaluation des Données/BRGM.



## 6. Bibliographie

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

**AMES B.N., Mc CANN J. and YAMASAKI E.** - Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian – microsome mutagenicity test - *Mutation Res.*, 31 (1975), 347-364.

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

**Beaugendre M.J.** - Rapport d'information déposé en application de l'Article 145 du Règlement par la Commission des Affaires Économiques, de l'Environnement et du Territoire sur l'utilisation du chlordécone et des autres pesticides dans l'agriculture martiniquaise et guadeloupéenne. N° 2 430, enregistré à la Présidence de l'Assemblée nationale le 30 juin 2005.

**Belfiore CJ., Yang RS., Chubb LS et al.** (2007) - Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling. *Toxicology* 234(1–2):59–72.

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

**Beronius A., Vandenberg L. N.** (2015) - Using systematic reviews for hazard and risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Rev Endocr Metab Disord*.

**Blanke RV., Fariss MW., Guzelian PS et al.** (1978) - Identification of a reduced form of chlordecone (Kepone) in human stool. *Bull Environ Contam Toxicol* 20:782–785.

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

**Bodiguel X, J.A. Bertrand et J. Fremery.** - Devenir de la chlordécone dans les réseaux trophiques des espèces marines consommées aux Antilles. Délégation des Antilles - Station du Robert. 2011.

**Boylan JJ., Cohn WJ., Egle JL., Jr et al.** (1979) - Excretion of chlordecone by the gastrointestinal tract: evidence for a nonbiliary mechanism. *Clin Pharmacol Ther* 25:579–585.

**BRUSICK D.** Principles of genetic toxicology - Plenum Press London New York, (1980), 195-196.

**Bungay PM., Dedrick RL., Matthews HB.** (1979) - Pharmacokinetics of halogenated hydrocarbons. *Ann NY Acad Sci* 320:257–270.

**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 SB., Veazey JM., Jackson RS et al.** (1978) - Epidemic Kepone poisoning in chemical workers. *Am J Epidemiol* 107:529–537.

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

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

**CE Règlement (CE) n° 440/2008 de la Commission - B13/14.** Mutagénicité : Essai de mutation réverse sur bactéries - Journal officiel n° L142 du 31 mai 2008.

**Cirad** – PRAM -Transfert de la chlordécone du sol vers la plante.

**Clere N<sup>1</sup>, Lauret E, Malthiery Y, Andriantsitohaina R, Faure S.** - Estrogen receptor alpha as a key target of organochlorines to promote angiogenesis. *Angiogenesis.* 2012 Dec;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.

**Das S., Ladell DS., Podgrabinska S. et al.** - Vascular endothelial growth factor-C induces lymphangitic carcinomatosis, an extremely aggressive form of lung metastases. *Cancer Res* 2010;70:1814–24.

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

**Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon JP., Giudice LC. et al** - 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.

**Epstein, Samuel S.** - Kepone-hazard evaluation. *Science of the Total Environment.* 1978.

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

**Fan F., Wey JS., McCarty MF et al.** - Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005;24:2647–53.

**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

**Fenech M., Morley A.** - Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 147, (1985), 29-36.

**Ferrara N.** - Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004 ; 9 (Suppl.1) :2–10.

**Fernández-Bayo J.D., Saison C., Voltz M., Disko U., Hofmann D., Berns A. E.-** Chlordecone fate and mineralisation in a tropical soil (andosol) microcosm under aerobic conditions. *Sci. Tot. Environ.* (2013), 463-464, 395–403.

**Fujimori K., Benet H., Mehendale HM. et al.** (1982a) - Comparison of brain discrete area distributions of chlordecone and mirex in the mouse. *Neurotoxicology* 3(2):125–129.

**Gatehouse D., Haworth S., Cebula T., Gocke E. et al.** - Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures (6th ICEM, Melbourne 1993) - Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Research*, 312, (1994) 217-233.

**Gilroy DJ., Carpenter HM., Curtis LR.** (1994) - Chlordecone pretreatment alters [14C]chlordecone and [14C]cholesterol transport kinetics in the perfused rat liver. *Fundam Appl Toxicol* 22(2):286–292.

**Guzelian PS.** (1982a) - 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.

**Heatherington AC., Fisher HL., Sumler MR. et al.** (1998) - Percutaneous absorption and disposition of [14C] chlordecone in young and adult female rats. *Environ Res* 79(2):138–155.

**Hewitt LA., Caille G., Plaa GL. et al.** (1985) - Temporal relationships between biotransformation, detoxication, and chlordecone potentiation of chloroform-induced hepatotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 64:477–482.

**Houston TE., Mutter LC., Blanke RV. et al.** (1981) - Chlordecone alcohol formation in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): A model for human metabolism of chlordecone (Kepone). *Fundam Appl Toxicol* 1(3):293–298.

**InVS-Inserm** - 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.** - Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West Indies): a field study. *Sci. Tot. Environ.* **2014**, 493, 336–341.

**Kabir E. R., Rahman M. S., Rahman I.A.,** (2015) - Review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol*.

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

- Kavlock R.J., Chemoff N., Rogers E. et al.** (1980) - Comparative tissue distribution of mirex and chlordecone in fetal and neonatal rats. *Pestic Biochem Physiol* 14(3):227–235.
- Khromova N., Kopnin P., Rybko V., Kopnin B.P.** - Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms. *Oncogene* 2012;31:1389–97.
- Kirkland D.J., Marshall R.R., McEnaney S., Bilgoog J., Rutter A. and Mullineux S.** (1989) - Aroclor-1254-induced rat-liver causes chromosomal aberrations in CHO cells but not human lymphocytes: A role for active oxygen? *Mutat. Res.*, 214, 115-122.
- Kitchin K.T., Brown J.L.** (1989) - Biochemical studies of promoters of carcinogenesis in rat liver. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 9:273–285.
- Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B. et al** - Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263, 1998.
- Lemaire G., Mnif W., Mauvais P. et al** - Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci* 79: 1160-1169, 2006.
- Lovett M., Lee K., Edwards A., Kaplan D.L.** - Vascularization strategies for tissue engineering, *Tissue Eng. Part B.* 15 (2009) 353–370.
- Mahon G.A.T., Middleton B., Robinson W.D., Green M.H.L et al.** - Analysis of data from microbial colony assays in: KIRKLAND D.J. (Ed). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data - UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Report. Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, (1989) 26-65.
- Maron D.M., AMES B.N.** - Revised methods for the Salmonella mutagenicity test *Mutation Research*, 113, 1983, 173-215.
- Mehendale H.M., Takanaka A., Desai D. et al.** (1978) - Effect of preexposure to Kepone on hepatic mixed function oxidases in the female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 44:171-180.
- Merlin C., Devers M., Crouzet O., Heraud C., Steinberg C., Mouglin, C., Martin-Laurent F.** - Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environ. Sci. Poll. Res.* **2014**, 21 (7), 4914-4927.
- Miller B.M., Pujadas E. and Gocke E.** (1995) - Evaluation of the micronucleus test *in vitro* using Chinese hamster cells: Results of four chemicals weakly positive in the *in vivo* micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.*, 26, 240-247.
- Mitra A., Richards I., Kitchin K. et al.** (1990) - Mirex induces ornithine decarboxylase in female rat liver. *J Biochem Toxicol* 5(2):119–124.
- Molowa D.T., Wrighton S.A., Blanke R.V et al.** (1986) - Characterization of a unique aldo-keto reductase responsible for the reduction of chlordecone in the liver of the gerbil and man. *J Toxicol Environ Health* 17:375–384.
- Monti D., Coat S.** - La contamination des espèces d'eau douce. *Les Cahiers du Pram.* **2007**, 7, 29–33.



**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.

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

**NCI** (National Cancer Institute). (1976a) - 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).

**Nessler F., Marzin D.** - A micromethod for *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*,14 (4), 1999, 403-410.

**Nessler F., Marzin D** - Cytosine arabinoside, vinblastine, diethylstilboestrol and 2-aminoanthracene tested in the *in vitro* human TK6 cell line micronucleus test (MNvit) at Institut Pasteur de Lille in support of OECD draft test guideline 487. *Mutation Res.*, 702(2), (2010):212-218.

**O.C.D.E.** Ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 471 - Essai de mutation réverse sur des bactéries - 21 Juillet 1997.

**O.C.D.E** Ligne directrice n° 487 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : test du micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères, 26 septembre 2014.

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

**Ribatti D., Vacca A., Dammacco F.** - The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review. *Neoplasia* 1999;1:293–302.

**Shah PV., Fisher HL., Sumler MR. et al.** (1987) - Comparison of the penetration of 14 pesticides through the skin of young and adult rats. *J Toxicol Environ Health* 21(3):353–366.

**Sirica AE., Wilkerson CS., Wu LL. et al.** (1989) - Evaluation of chlordecone in a two-stage model of hepatocarcinogenesis: a significant sex difference in the hepatocellular carcinoma incidence. *Carcinogenesis* 10(6):1047–1054.

**Skalsky HL., Farris MW., Blanke RV. et al.** (1979) - The role of plasma proteins in the transport and distribution of chlordecone (Kepone ) and other polyhalogenated hydrocarbons. *Ann NY Acad Sci* 320:231–237.

**Soine PJ., Blanke RV., Guzelian PS. et al.** (1982) - Preferential binding of chlordecone to the protein and high density lipoprotein fractions of plasma from humans and other species. *J Toxicol Environ Health* 9:107–118.

**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.

**Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants** - Draft risk management evaluation for chlordecone. 2007.

**TamBY., Wei K., Rudge JS. et al.** - VEGF modulates erythropoiesis through regulation of adult hepatic erythropoietin synthesis. *Nat Med* 2006;12:793–800.

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

**Trosko JE., Jone C., Chang CC.** (1983) - The role of tumor promoters on phenotypic alterations affecting intercellular communication and tumorigenesis. *Ann NY Acad Sci.* 407:316–327.

**U.S. Environmental Protection Agency** Washington, DC. - TOXICOLOGICAL REVIEW OF CHLORDECONE (KEPONE).

**U.S. EPA.** (Environmental Protection Agency). (1998) - Guidelines for neurotoxicity risk assessment. *Federal Register* 63(93):26926–26954. Available online at <http://www.epa.gov/ncea/raf/rafguid.htm> (accessed January 15, 2009).

**United Nations Environment Programme** (2006) - UNEP/POPS/POPRC.2/8, Draft risk profile: chlordecone, Persistent Organic Pollutants Review Committee, Second meeting, Geneva, 6-10 November 2006.

**Valtola R., Salven P., Heikkilä P. et al.** - VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999;154:1381–90.

**Xiaohui Xu., Amy B., Dailey, Evelyn O., Talbott Vito A., Ilacqua, Greg Kearney, and Nabih R.** - Asal: Associations of Serum Concentrations of Organochlorine Pesticides with Breast Cancer and Prostate Cancer in U.S. Adults. *Environmental Health Perspectives* 118:61-66,2010.



**Centre scientifique et technique**  
**Direction Eau, Environnement & Écotechnologies (D3E)**  
3, avenue Claude-Guillemin  
BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34  
[www.brgm.fr](http://www.brgm.fr)