

# Comparaison de la toxicité cellulaire de la chlordécone et de deux de ses dérivés déchlorés formés par réduction chimique

**Mouvet C.<sup>1</sup>, Bristeau S.<sup>1</sup>, Nessler F.<sup>2</sup>, Lobez F.<sup>2</sup>, Akagah B.<sup>3</sup>, Legeay S.<sup>4, 5</sup>, Faure S.<sup>4, 5</sup>**

*(1) Brgm ; (2) Institut Pasteur de Lille ; (3) Alpha-Chimica ; (4) UFR Santé, Département pharmacie, Laboratoire de pharmacologie, LUNAM Université ; (5) INSERM U1063, Stress oxydant et pathologies métaboliques, LUNAM Université.*

**Subvention MEEM/DGPR 2015**

# Contexte de l'étude

## > Contamination des écosystèmes antillais par la chlordécone

- Sols, ESO, ESU, eaux de mer...
- Productions végétales, bovines, avicoles, piscicoles, crustacés...
- Impacts sanitaires : cancer prostate, retards cognitifs, prématurés...
- Situation gérée (arrêtés préfectoraux, conseils aux agriculteurs...) mais source du problème non éliminée

## > Décontamination des sols ?

- Biodégradation ?  $\leq 3\%$  en conditions optimales labo...
- Laisser faire la nature ? X décennies...
- Phytoremédiation ? Taux de transfert  $\ll \dots$
- Séquestration ? Oui mais au-delà de 6 mois ?
- Procédés physico-chimiques ? **ISCR**

# Procédé d'In Situ Chemical Reduction ( ISCR)

## > Principe

- Action sur le sol en place (pas dig & dump !)
- Ajout d'amendements entraînant chute de redox
- Déchloration réductive
- Machinerie agricole (labour, irrigation) standards

## > Tests en laboratoire

- BRGM 2011 – 2012
- Mésocosmes 60 kg, 6 mois traitement
- Daramend (luzerne + fer zéro valent)
- Andosol (AND), Ferralsol (FRL), Nitisol (NIT)
- 25 (AND) à 70 % (NIT et FRL) de baisse de conc. en CLD
- Formation de 14 produits dérivés déchlorés (jusque – 5 Cl)

# Procédé d'In Situ Chemical Reduction ( ISCR)

## > Validation de terrain

- BRGM 2013 – 2015 (+ CIRAD et IRD, transfert sol – plantes)
- 2 parcelles de bananeraie sur nitisol (NIT)
- 1 parcelle de sol alluvionnaire en contexte NIT
- Après 3 mois, **≈ 65 % de baisse de conc. en CLD dans les 3 essais indépendants**
- Formation de produits dérivés déchlorés ( $\geq -3$  Cl)
- CLD -1 Cl et CLD -3 Cl majoritaires
- CLD – 7 Cl détectées dans les eaux du sol
- Diminution de la contamination ( $< \text{LMR}$ ) de certains végétaux cultivés sur les sols traités

# Et la toxicité des dérivés ???

## > Quels dérivés ?

- Les deux majoritaires formés par ISCR : 5a-H-CLD (CLD – 1Cl ) et CLD – 3 Cl
- Etalons disponibles grâce à synthèse à façon

## > Quels tests ?

- Toxicité cellulaire *in vitro* (1<sup>e</sup> approche)
- Standardisés *OCDE* : Ames (471) et  $\mu$ noyaux TK6 (487)
- Angiogenèse : effet de la CLD démontré

# Matériel et méthodes

- > **Tests des micronoyaux sur cellules humaines TK6**
  - Cytotoxicité (test colorimétrique MTT)
  - Génotoxicité (modification de structure et / ou ségrégation des chromosomes)
  - 12 conc., de 1000 à 0,49  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans le milieu de culture à partir de solutions mères dans le DMSO
  - Duplicate
  - Avec et sans activation métabolique
  - Critères de validité :  $n$  moyen chez témoins positifs et négatifs,  $n$  suffisant de cellules (2000) observées, survie relative de  $45 \pm 5 \%$  pour la + forte conc. testée

# Matériel et méthodes

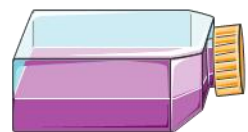
## > Tests d'Ames

- 4 souches de *Salmonella typhimurium* : TA1537, TA98, TA100 et TA102.
- Dose finale maximale de 200 µg/boîte et dilutions successives dans le DMSO
- Témoins solvants, témoins positifs et témoin de stérilité des milieux
- Cytotoxicité : examen au microscope de la pousse de fond
- Génotoxicité : dénombrement manuel des colonies de révertants prototrophes
- n Critères de validité

# Matériel et méthodes

## > Angiogenèse

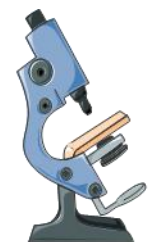
- cellules endothéliales primaires de veine de cordon ombilical humain (HUVECs)
- exposées 24h à 3 concentrations :
  - ESO/ESU fortement contaminées ( $10^{-8}$  M = 4,9  $\mu\text{g/L}$ )
  - sang veineux de femmes Gdp ( $5 \cdot 10^{-9}$  M = 2,5  $\mu\text{g/L}$  ; étude Hibiscus)
  - 500 fois plus faible ( $10^{-11}$  M = 4,9 ng/L)
- longueur moyenne des capillaires formés quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ
- tests répétés sur 6 lames



HUVEC



Matrigel®



Photo



# Résultats micronoyaux cellules humaines TK6

## > Cytotoxicité CLD

- très importante à partir de 62,5 µg/ml
- taux de survie relative de 0 à 2,5 - 13,3 %

## > Cytotoxicité 5a-H-CLD

- très importante à partir de 62,5 µg/ml
- taux de survie relative de 67 - 130 %

## > Cytotoxicité CLD – 3 CI

- très importante à partir de 125 µg/ml
- taux de survie relative de 42 à 70 %

⇒ **Cytotoxicité CLD – 1 CI < CLD**

⇒ **Cytotoxicité CLD - 3 CI << CLD**

# Résultats micronoyaux cellules humaines TK6

## > Génotoxicité CLD

- non génotoxique, quelque soit le traitement
  - 3 h en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement
  - 3 h avec activation métabolique
  - continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement

## > Génotoxicité 5a-H-CLD

- idem

## > Génotoxicité CLD – 3 Cl

- idem

⇒ ***aucune des 3 substances n'a d'effet génotoxique pour le test utilisé***

## Résultats Ames : cytotoxicité

*Dose ( $\mu\text{g}/\text{boîte}$ ) de chaque substance entraînant une cytotoxicité modérée à faible pour les 4 souches étudiées*

Substance	TA 1537	TA 98	TA 100	TA 102
CLD	10 - 30	10 - 30	10 - 30	10 - 30
5a-H-CLD	30 - 100	10 - 200	30	30
CLD - 3 CI	> 200	> 200	> 200	> 200

⇒ **Cytotoxicité CLD - 1 CI < CLD**

⇒ **Cytotoxicité CLD - 3 CI << CLD**

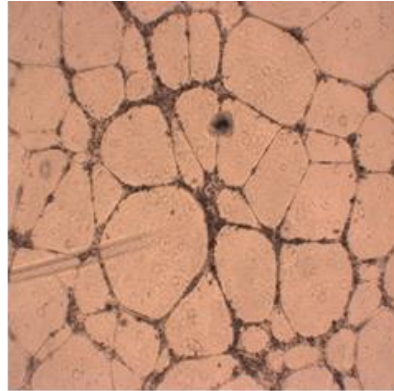
# Résultats Ames : mutagénéicité

## > CLD, 5a-H-CLD, CLD – 3 CI

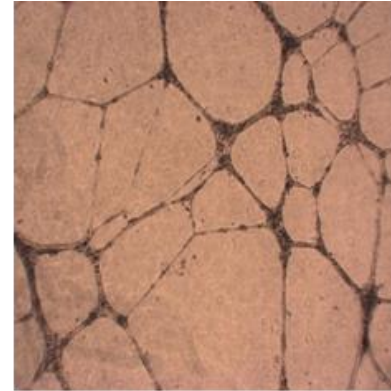
- Aucune activité mutagène ; aucune augmentation significative (stat. ou bio.) du nb révertants (*ex. 5a-H-CLD*)

	TA 1537			TA 98			TA 100		
	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	302.2	(b)	480.0	24.6	(b)	701.3	5.7
ELEMENT D'ESSAI  SANS S9-mix	0	4.5	-	0	19.5	-	0	122.0	-
	1	4.7	1.0	1	16.0	0.8	1	117.3	1.0
	3	3.7	0.8	3	13.3	0.7	3	119.3	1.0
	10	5.7	1.3	10	12.7	0.7	10	109.0	0.9
	30	6.0	1.3	30	15.0	0.8	30	61.3	0.5
	100	*	*	100	*	*	100	*	*
	200	-	-	200	-	-	200	-	-
Témoin positif	(c)	261.3	52.3	(c)	1616.0	78.1	(c)	2032.0	17.2
ELEMENT D'ESSAI  AVEC S9-mix  SANS PRE-INCUBATION	0	5.0	-	0	20.7	-	0	118.0	-
	1	4.3	0.9	1	14.3	0.7	1	113.7	1.0
	3	5.3	1.1	3	19.7	1.0	3	109.3	0.9
	10	6.7	1.3	10	13.7	0.7	10	112.7	1.0
	30	4.0	0.8	30	19.7	1.0	30	88.3	0.7
	100	2.7	0.5	100	9.3	0.4	100	*	*
	200	*	*	200	9.3	0.4	200	*	*

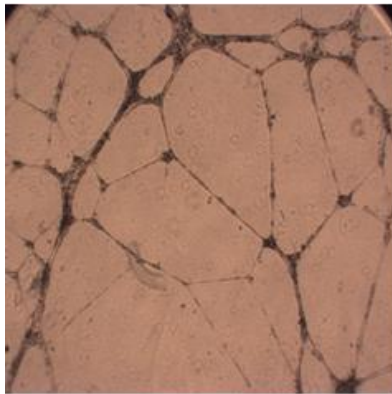
# Résultats Angiogenèse



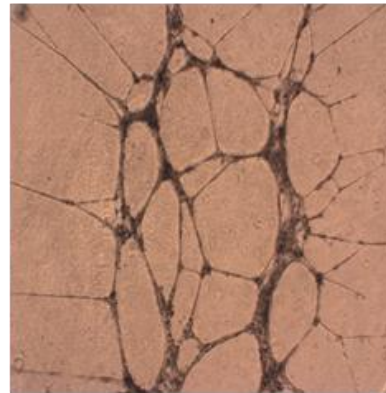
Contrôle  
négatif



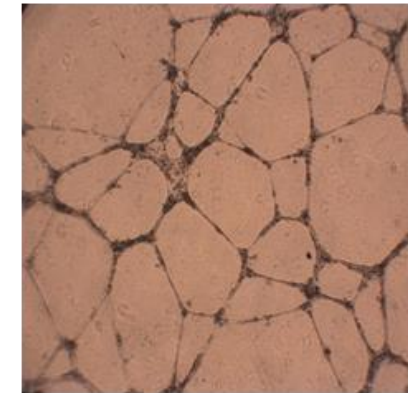
Contrôle  
positif



CLD  $10^{-11}$  M



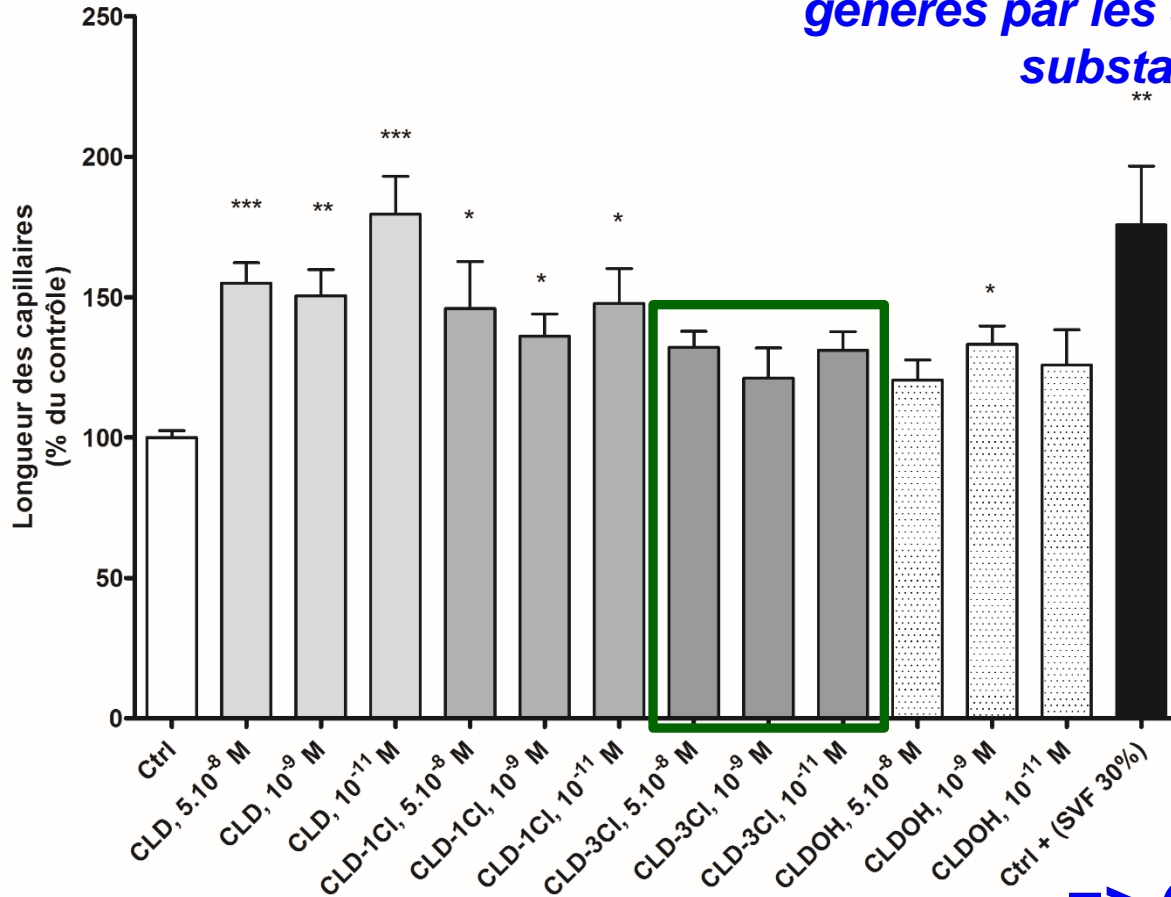
CLD-1Cl  $10^{-11}$  M



CLD-3Cl  $10^{-11}$  M

# Résultats Angiogenèse

Longueur des capillaires (% CTRL négatif)  
générés par les 3 concentrations des 4  
substances testées.



**=> CLD ≠ CTRL**

**=> 5a-H-CLD ≠ CTRL**

**=> CLD – 3 CI = CTRL**

# Conclusions

## > Cytotoxicité

- dérivés déchlorés < à << molécule mère

## > Génotoxicité

- Aucune pour le 3 molécules sur 2 tests

## > Effet pro-angiogénique

- CLD-3 Cl < témoin

***=> Pas d'effet négatif des dérivés formés par ISCR***

## Perspectives 2016 - 2017

### > **Test *in vivo*** (UFR Santé, labo. Pharmacologie - INSERM U1063, LUNAM)

- risque de dissémination de tumeurs de prostate chez des souris immunodéprimées

### > **Tests de stéroïdogénèse (IPL)**

- Tests OCDE « TA ER BG1Luct test » et test sur cellules H295R permettant l'évaluation de potentiel perturbateur endocrinien à différents niveaux

### > **Ecotox Ouassous** (S. Lemoine, DYNACAR)