



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Elise Tabet

Préparée à l'unité de recherche UMR INSERM U1085/IRSET
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail
UFR Sciences de la vie et de l'Environnement

**Impact
d'un pesticide,
le chlordécone,
sur l'évolution de
l'hépatite aigue et
chronique chez la
souris**

**Thèse soutenue à Rennes
le 21 Décembre 2015**

devant le jury composé de :

François SICHEL

PU, Université de Caen / *rapporteur*

Martine AGGERBECK

CR, Université Paris-Descartes / *rapporteur*

Laurent VERNHET

PU, Université de Rennes 1 / *examineur*

Ludovic LE HEGARAT

Chef de projet, Anses / *examineur*

Christophe OLIVIER

MCU, Université de Nantes / *examineur*

Michel SAMSON

DR, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Remerciements

Après trois années de thèse, je voudrais remercier le Dr. Bernard Jegou et le Dr. Dominique Lagadic-Gossmann pour leur accueil au sein de l'unité UMR 1085-IRSET.

Je remercie le Dr. Martine Aggerbeck et le Dr. François Sichel d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs, ainsi que le Dr. Laurent Vernhet, le Dr. Ludovic Le Hegarat et le Dr. Christophe Olivier pour leur participation en tant qu'examineurs dans mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le Dr. Laurent Lagadic qui a accepté d'être mon tuteur et le Dr. Olivier Fardel qui était membre de mon comité de thèse. Une pensée particulière pour le Dr. Marie-Anne Robin, membre de mon comité de thèse, et qui nous a quittés l'année dernière.

Je remercie le Dr. François Tiaho, pour la formation à la technique SHG et pour son aide dans les manipes de microscopie.

Je suis sincèrement reconnaissante à mon directeur de thèse, le Dr. Michel Samson, qui m'a accueillie dans son équipe et qui était toujours disponible et à l'écoute. Merci d'être resté tard au labo plusieurs fois pour m'aider à sacrifier des souris. Merci de m'avoir remonté le moral quand rien ne marchait. Je le remercie également pour la correction de mon manuscrit, sans lui je n'aurais pas pu l'accomplir.

Un grand merci aussi au Dr. Claire Piquet-Pellorce. Merci beaucoup pour ton aide, tes conseils et ta participation dans toutes mes manipes de souris, spécialement les manipes de cytométrie.

L'équipe « Agents infectieux hépatotropes et co-facteurs environnementaux » de l'IRSET est une équipe où le travail est un plaisir et la recherche a un goût spécial. Je tiens à remercier tous les membres de notre équipe, Valentine Genet, Nicolas Vu, Michel Rauch, Jacques Le Seyec, Laurence Amiot, Philippe Gripon, Aveline Filliol, Virginie Carrière, Grégory Noel et François Bénézit. Vous étiez comme une famille pour moi, vous m'avez encouragée, aidée et même supportée. Vous allez tous me manquer !!!

Je tiens à remercier l'ensemble de l'unité INSERM-UMR 1085-IRSET et plus spécialement Brigitte Bardot pour ses encouragements continus.

Je remercie de même les membres du bureau du club des doctorants et des post-doctorants de l'IRSET, UPSET, Charline, Pierre et Aurore, pour ces deux années à vos côtés.

Rien ne vaut d'être entouré par des amis qui sont toujours là dans les bons et les mauvais moments. Un merci spécial à Dohati, la sœur que je n'ai jamais eu, tu étais mon repère quand je perdais la boussole. Sans toi rien n'aurait été pareil. Mudz mon ami spécial, merci pour tout, tu étais toujours là pour moi, tu as passé des heures avec moi au téléphone juste pour m'épauler dans mes moments difficiles. Vous deux vous m'êtes très chers ...

Merci à tous mes amis libanais, spécialement à Salman et Fidaa. Je remercie de même Ayman, Hicham, Muhammad, Hassan, Tony, Nadia, Ahmad, Hussein, Karim I. et Karim K. Je remercie de même les membres de « COR » pour ces 2 années agréables avec vous.

Enfin, mon plus grand merci s'adresse à ma famille, mes parents, mes trois frères et mon oncle Georges. Sans vous je n'aurai pas pu être en France, ni continuer mes études pour arriver à ce niveau. J'espère être à la hauteur de vos attentes, je vous aime et je vous dédie ma thèse.

LISTE DES ABREVIATIONS

ALAT	Alanine aminotransférase
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Breast cancer resistance protein
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CCl4	Carbone tetrachloride
CEF	Cellules étoilées du foie
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Con A	Concanavaleine A
CPA	Cellules presentatrices d'antigène
CYP450	Cytochrome P450
DFMO	Difluorométhylométhine
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPA	Environmental Protection Agency
ER	Estrogen Receptor
FGF	Fibroblast growth factor
HCH	Hexachlorocyclohexane
HDL	High density Lipoprotein
IFN-γ	Interféron gamma
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LH	Hormone lutéinisante
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MEC	Matrice extracellulaire
MHV3	Mouse hepatitis virus 3

MMP	Matrice-métalloprotéinases
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PCR	Polymearase chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
POP	Polluant organique persistant
PXR	Pregnane X Receptor
SHG	Second harmonic generation
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIMP-1	Metalloproteinase inhibitor 1
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
UDP	Uuridine diphosphate
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du foie.....	2
Figure 2. Organisation tissulaire du foie.....	3
Figure 3. Organisation structurale du foie : Acinus et lobule.....	3
Figure 4. Répartition cellulaire dans le foie.....	4
Figure 5. Différentes phases du métabolisme des xénobiotiques.	11
Figure 6. Modification de l'espace périsinusoïdal au cours de la fibrogenèse.	14
Figure 7. Origine des cellules fibrogéniques.	16
Figure 8. Structure chimique du chlordécone.....	25
Figure 9. Schéma de la synthèse du chlordécone.	26
Figure 10. Cartographies des zones contaminées en Guadeloupe et en Martinique.....	28
Figure 11. Métabolisme du chlordécone	34

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Solubilité du chlordécone en fonction du pH.....	26
Table 2. Exposition de la population antillaise au chlordécone.....	32

SOMMAIRE

I. Introduction.....	1
1. Foie, rappel général de l’anatomie et des fonctions hépatiques	2
1.1. Anatomie	2
1.2. Les cellules hépatiques	4
1.2.1. Les hépatocytes	5
1.2.2. Les cellules biliaires ou cholangiocytes	5
1.2.3. Les cellules étoilées	5
1.2.4. Les cellules endothéliales	6
1.2.5. Les cellules de Kupffer	6
1.2.6. Les cellules lymphoïdes résidentes du foie	7
1.3. Les fonctions hépatiques majeures	8
1.3.1. Synthèse et sécrétion de la bile	8
1.3.2. Métabolisme énergétique	9
1.3.3. Détoxification	9
1.4. Régénération hépatique	11
1.5. Principales étiologies des maladies chroniques hépatiques	12
2. La fibrose hépatique	13
2.1. La matrice extracellulaire au cours de la fibrogenèse	13
2.2. Les cellules fibrogéniques	15
2.2.1. L’activation des cellules étoilées du foie (CEFs)	16
2.3. Physiopathologie et évolution de la fibrose hépatique	17
2.4. Diagnostic de la fibrose hépatique	18
2.5. Approches anti-fibrosantes	19
2.6. Modèles expérimentaux d’étude de la fibrose hépatique	20
3. Le chlordécone	23
3.1. Histoire du chlordécone	23
3.1.1. Catastrophe chimique de Hopewell	23
3.1.2. Autorisation du chlordécone en France	24
3.1.3. Application du chlordécone aux Antilles	24
3.1.4. Découverte de la pollution par le chlordécone aux Antilles	25
3.2. Chimie du chlordécone	25

3.2.1.	Nomination et formule chimique	25
3.2.2.	Synthèse	26
3.2.3.	Solubilité.....	26
3.2.4.	Volatilité.....	27
3.2.5.	Utilisation.....	27
3.3.	Contamination du chlordécone dans l'environnement	27
3.3.1.	Contamination des sols	27
3.3.2.	Contamination de l'eau	28
3.3.3.	Contamination des aliments.....	29
3.4.	Impact du chlordécone sur la santé humaine	29
3.5.	Toxicité et toxicocinétique du chlordécone	32
3.5.1.	Absorption	32
3.5.2.	Distribution.....	33
3.5.3.	Métabolisme.....	34
3.5.4.	Elimination.....	34
3.6.	Etudes toxicologiques et mécanismes d'action.....	35
3.6.1.	Au niveau du foie.....	35
3.6.2.	Au niveau du système nerveux.....	36
3.6.3.	Au niveau des fonctions de la reproduction.....	36
3.6.4.	Au niveau du système immunitaire.....	37
3.6.5.	Effets cancérigènes.....	37
3.6.6.	Divers effets.....	37
3.7.	Valeurs toxicologiques de référence VTR.....	38
3.8.	Interactions avec d'autres substances	38
3.9.	Récapitulatif des mécanismes d'action	39
II.	Objectifs.....	40
III.	Résultats.....	43
Article I.....		44
1.	Introduction.....	46
2.	Matériel et méthodes.....	47
3.	Résultats	49
4.	Discussion	57
Article II.....		61
Article III.....		81

IV. Discussion générale.....	84
V. Références bibliographiques.....	93

I. Introduction

1. FOIE, RAPPEL GENERAL DE L'ANATOMIE ET DES FONCTIONS HEPATIQUES

1.1. Anatomie

Le foie est un organe rouge-brun, unique et asymétrique d'une forme vaguement triangulaire, qui se situe sous le diaphragme droit, dans la partie supérieure droite de l'abdomen. Avec un poids aux alentours de 1500 g, le foie est la glande la plus volumineuse du corps humain représentant 2% de la masse corporelle tandis que chez la souris, le foie représente 5% de sa masse corporelle (à peu près 1g de foie/20g de poids total). Avec ses différentes fonctions, le foie est un organe indispensable à la vie (Casing & Veilhan 2008).

Le foie est formé de deux lobes principaux séparés par le ligament falciforme et le ligament rond : le lobe droit qui est le plus volumineux et le lobe gauche qui est le plus étroit. Deux autres lobes forment le foie : le lobe carré et le lobe caudé ou lobe de Spiegel. Ils sont situés entre les lobes gauche et droit et ont une taille plus petite que les deux lobes majeurs. Le tout est enveloppé par une capsule de tissu conjonctif appelée la capsule de Glisson, qui se prolonge à l'intérieur du foie en formant, dans sa partie inférieure, le hile hépatique au niveau duquel se fait l'entrée et la sortie des vaisseaux et des nerfs (Figure 1).

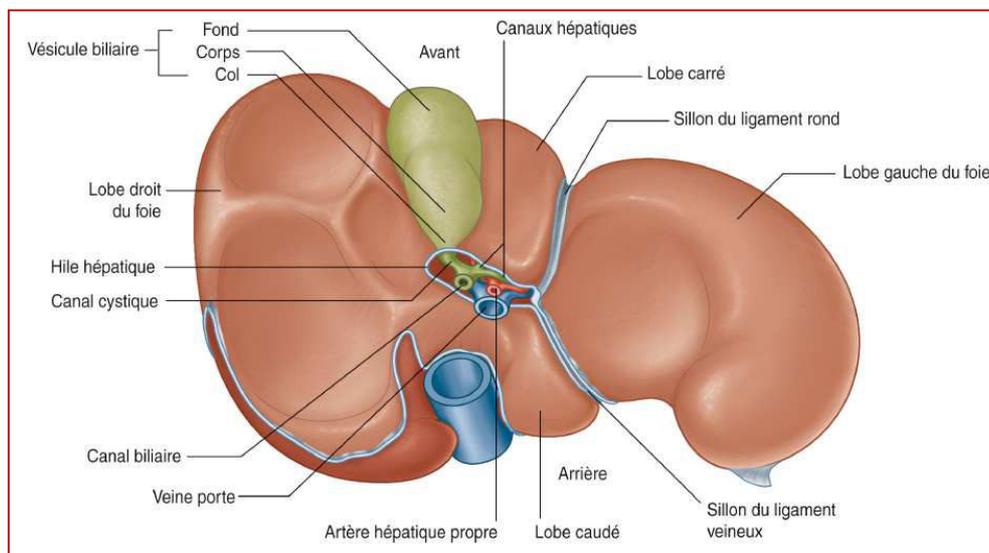


Figure 1. Anatomie du foie

L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Chaque lobule est constitué de lames d'hépatocytes disposées d'une façon radiaire autour d'une veine centrolobulaire. Les capillaires sinusoides se trouvent entre les travées d'hépatocytes et sont séparés de celles-ci par l'espace de Disse.

La constitution des capillaires sinusoides par des cellules fenêtrées permet aux hépatocytes d'entrer en contact avec des grosses molécules. L'extérieur des lobules est délimité par les espaces portes comprenant les ramifications de l'artère hépatique, de la veine porte et d'un canal biliaire (Figure 2).

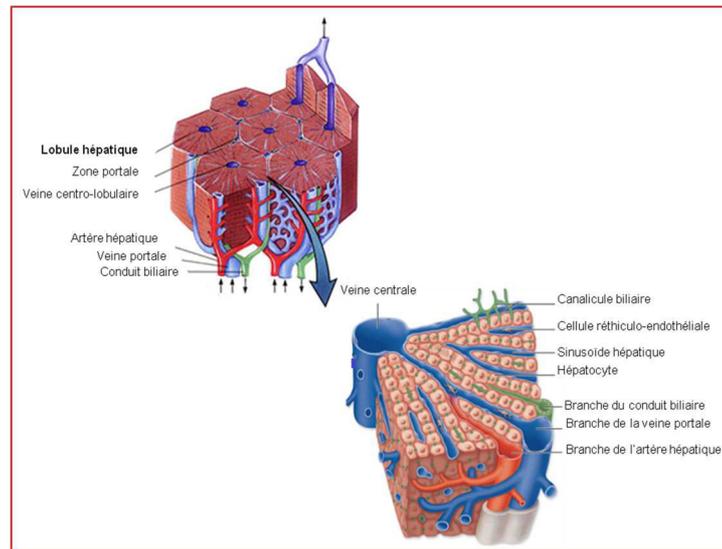


Figure 2. Organisation tissulaire du foie.

Un autre modèle d'organisation du tissu hépatique fut décrit par Rappaport (Rappaport 1976) et dont l'unité de base est l'acinus (Figure 3). Le centre d'un acinus est défini par l'espace porte et constitue la zone périportale tandis que sa terminaison est limitée par les veines centrolobulaires qui constituent la zone périveineuse. Les caractéristiques fonctionnelles des acini hépatiques dépendent de ces deux zones. Ainsi les fonctions de détoxification, de glycolyse et de synthèse des acides gras sont rattachées à la zone périveineuse, alors que le métabolisme oxydatif est rattaché à la zone périportale en contact avec le sang fortement oxygéné.

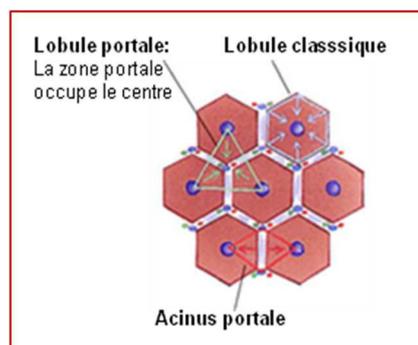


Figure 3. Organisation structurale du foie : Acinus et lobule

Le foie est richement vascularisé, recevant 1500 ml de sang par minute et contenant en permanence entre 800 et 900 ml de sang. Il est caractérisé par une double irrigation provenant de la veine porte et

de l'artère hépatique. La veine porte ramène le sang, riche en métabolites de digestion, du tube digestif, du pancréas et de la rate en assurant ainsi 70 à 80% du débit sanguin hépatique, tandis que l'artère hépatique assure 20 à 30% du débit en ramenant au foie le sang oxygéné de l'aorte, et en irrigant les voies biliaires. L'artère hépatique et la veine porte pénètrent dans le foie, par le hile hépatique, où un réseau dense de capillaires sinusoides assure le transport du sang entre les travées d'hépatocytes. Les sinusoides se jettent dans les veines centrolobulaires qui rejoignent à leur tour les veines sus-hépatiques pour amener le sang aux cavités cardiaques droites à travers la veine cave inférieure.

Le foie contient aussi de nombreuses voies biliaires qui amènent la bile à l'extérieur de l'organe. La bile synthétisée par les hépatocytes passe par les canalicules biliaires pour arriver dans les canaux biliaires des espaces portes. Ensuite, elle sera soit stockée au niveau de la vésicule biliaire, soit versée par le canal cholédoque au niveau du duodénum.

1.2. Les cellules hépatiques

Le foie est constitué de plusieurs types cellulaires qui interagissent entre eux pour assurer les diverses fonctions hépatiques. Les 70 à 80% des cellules hépatiques sont des hépatocytes et le reste est constitué des cellules endothéliales, des lymphocytes, des cellules de Kupffer, des cellules biliaires, et des cellules étoilées (Figure 4).

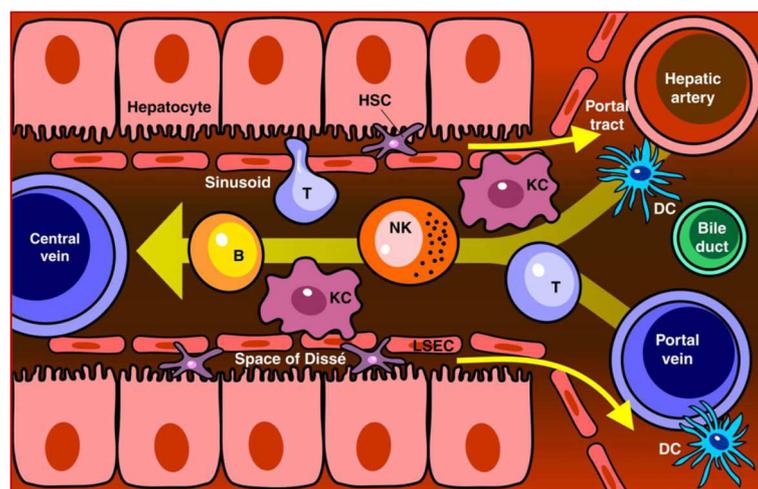


Figure 4. Répartition cellulaire dans le foie (Fainboim, 2007)

1.2.1. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules fonctionnelles du foie. De forme hexagonale volumineuse allant jusqu'à 40 µm, les hépatocytes sont organisés en travées, appelées travées de Remak, autour d'une veine centrolobulaire et délimitées par les espaces portes. Ces cellules parenchymateuses peuvent posséder un ou plusieurs noyaux avec un cytoplasme riche en organites intracellulaires comme les mitochondries, l'appareil de Golgi, les réticulums endoplasmiques et des grains de glycogène, ce qui témoigne d'une activité métabolique importante.

Les hépatocytes sont des cellules polarisées avec un pôle sinusoidal en contact avec l'espace de Disse et un pôle biliaire en contact avec les canalicules biliaires. Le pôle sinusoidal est le siège des échanges entre les hépatocytes et la circulation sanguine et au niveau duquel la sécrétion des molécules synthétisées par le foie se fait. Tandis qu'au niveau du pôle biliaire la bile et ses constituants sont sécrétés dans les canalicules biliaires formés par l'accolement des hépatocytes adjacents et donc dépourvus de membranes propres (Gebhardt 1992).

1.2.2. Les cellules biliaires ou cholangiocytes

Ce sont les cellules épithéliales qui constituent les parois des canaux biliaires, composant entre 3 et 5% des cellules hépatiques. Ces cellules polarisées, de forme cubique, drainent la bile sécrétée par les hépatocytes vers le canal cholédoque pour se retrouver ensuite au niveau de la vésicule biliaire ou bien au niveau du duodénum. Tout le long de son passage en contact des cholangiocytes, la bile subit des modifications de sa composition, elle est de plus en plus diluée et alcalinisée. En effet, les cholangiocytes réabsorbent des acides biliaires, des acides aminés et du glucose et secrètent en revanche de l'eau, des bicarbonates, du chlore et d'autres électrolytes qui représentent environ 30% du volume biliaire. Ces processus d'absorption/sécrétion sont régulés par le système nerveux et par l'action de certaines hormones comme la sécrétine (Esteller 2008; Glaser et al. 2009).

1.2.3. Les cellules étoilées

Plusieurs noms ont été attribués à ce type de cellules hépatiques, cellules de Ito puisqu'elles étaient décrites la première fois par Ito, cellules périnusoidales vu leur localisation dans l'espace de Disse,

péricytes en tant que régulateurs du flux sanguin sinusoidal, « fat storing cells » dû à la richesse de leur cytoplasme en lipide et « hepatic stellate cells » (ou cellules étoilées hépatiques) à cause de leur forme étoilée. Elles représentent à peu près 3% des cellules hépatiques. Les cellules étoilées émettent des prolongements en contact direct avec les hépatocytes et les sinusoides. Dans des conditions normales, les cellules étoilées sont quiescentes et servent comme cellules de stockage de la vitamine A et des rétinoïdes (Hendriks et al. 1987); elles synthétisent des composants normaux de la matrice extracellulaire comme la laminine (Loreal et al. 1991), les protéoglycanes (Arenson et al. 1988) et le collagène de type III et IV (Milani et al. 1990; Friedman et al. 1985). Une fois activées, ces cellules perdent leur contenu en rétinol et acquièrent un phénotype myofibroblastique en exprimant l' α -actine de type musculaire lisse (α -SMA) et en augmentant la production des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) notamment le collagène de type I et III. Lors d'une lésion, ces cellules activées jouent un rôle important dans l'initiation de l'inflammation en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme le TGF- β , l'IL-6 et l'IL-10 (Friedman 2008) .

1.2.4. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sinusoides constituent un type cellulaire unique qui forme les parois des capillaires sinusoides. Dépourvues d'une lame basale et fenêtrées, ces cellules possèdent des pores de diamètre moyen de 0,1 μ m qui favorisent les échanges des macromolécules et des nutriments entre les hépatocytes et le sang des capillaires sinusoides. Dû au diamètre de leurs pores, ces cellules sinusoides jouent un rôle dans la filtration du sang qui arrive aux hépatocytes empêchant ainsi les molécules comme les triglycérides d'arriver au sein de l'espace de Disse (Wisse et al. 1985). Les cellules sinusoidales hépatiques sont des cellules présentatrices d'antigènes exprimant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (Lohse et al. 1996; Rubinstein et al. 1986), elles interviennent dans le recrutement des cellules inflammatoires circulantes, dans le métabolisme des lipoprotéines et dans l'endocytose des molécules permettant ainsi de nettoyer le sang (Oie et al. 2008; Smedsrød 2004).

1.2.5. Les cellules de Kupffer

Localisées dans la lumière des sinusoides, les cellules de Kupffer représentent aux alentours de 6% des cellules hépatiques. Ces cellules macrophagiques qui résident dans le foie, constituent 80% de

l'ensemble des macrophages du corps humain (Bilzer et al. 2006). Leur importante capacité phagocytaire leur permet d'éliminer les particules étrangères et les agents pathogènes qui traversent la barrière intestinale pour arriver au sang sinusoidal. Ces cellules éliminent aussi les hépatocytes après leur mort ainsi que les hématies âgées (Terpstra & van Berkel 2000). Les cellules de Kupffer sont des cellules présentatrices d'antigène jouant ainsi un rôle important dans les réactions immunitaires. Ces cellules activées, sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines telles que la TNF- α , TGF- β , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-12 qui augmente l'activité des NK et des NKT, ainsi que des chimiokines comme CCL3 (Kamimura & Tsukamoto 1995).

1.2.6. Les cellules lymphoïdes résidentes du foie

Dans le foie, les cellules lymphoïdes se retrouvent dans les sinusoides et représentent 8% des cellules hépatiques dont 6% de lymphocytes B, 31% de cellules NK et 63% de lymphocytes T (Racanelli & Rehermann 2006). Ces cellules sont dites résidentes du foie et sont au contact des cellules endothéliales, des cellules de Kupffer (Nakatani et al. 2004), des hépatocytes et des cellules étoilées du foie.

Les lymphocytes T sont le type majoritaire des cellules lymphoïdes hépatiques et sont divisés en deux types, conventionnels et non conventionnels. Les lymphocytes T conventionnels sont les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ qui sont présents dans le sang à un état natif. Lors d'une stimulation par des cellules présentatrices d'antigène (CPA), les T CD4⁺ acquièrent une fonction auxiliaire et servent ainsi comme intermédiaires dans la réponse immunitaire par la sécrétion des cytokines. Selon les cytokines environnantes, les CD4⁺ peuvent se différencier en plusieurs types de lymphocytes Th ou Helper, Th1, Th2, Th17 ou iTreg. Quant aux lymphocytes T CD8⁺, ces cellules acquièrent une fonction cytotoxique. La composition hépatique en lymphocytes T est différente de celle du sang avec un rapport CD4⁺/CD8⁺ de 2/3 dans le foie pour un rapport de 3/2 dans le sang (Lapierre & Alvarez 2007).

Les cellules NKT font partie des lymphocytes T non conventionnels. Abondantes dans le foie, représentant 3 à 10% des lymphocytes hépatiques chez l'Homme et 30% chez la souris. Elles ont la caractéristique d'exprimer à la fois certains marqueurs des cellules NK, comme le NK1.1, et un TCR, par lequel ces cellules reconnaissent des glycolipides apparentés aux molécules du CMH I tels que le CD1d (Swain 2010; Swain 2008). L'activation des cellules NKT, principalement par l'IL-12 ou l'IL-18, engendre une sécrétion d'autres cytokines telles que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et l'IFN- γ . Les

lymphocytes NKT sont impliqués dans des hépatopathies immuno-dépendantes notamment celles induites par la Concanavaleine A chez la souris (Beldi et al. 2008).

Les cellules NK ou Natural Killer, sont des cellules immunitaires exprimant le marqueur CD56 à leur surface. Ces cellules possèdent à la fois une capacité de synthétiser des cytokines et une activité cytotoxique (Saito et al. 1993). Les cellules NK reconnaissent plusieurs cellules cibles notamment les cellules infectées et celles tumorales qui ont une faible expression du CMH-I (Wu & Lanier 2003; Biron et al. 1999). Après activation, ces cellules sont capables de sécréter plusieurs cytokines comme l'IL-3, l'IL-6 et l'IFN- γ .

1.3. Les fonctions hépatiques majeures

Le foie est considéré comme un organe vital dû au fait qu'il assure un large panel de fonctions majeures indispensables à la vie d'un organisme. Il est responsable du maintien de l'homéostasie et de la sécrétion de la bile jouant ainsi un rôle important dans la digestion. Il constitue un milieu de stockage de plusieurs molécules telles que le glycogène et les vitamines. Il intervient dans le métabolisme énergétique et il est responsable de la détoxification des toxiques provenant de la circulation splanchnique. Pour cela sa capacité de régénération est essentielle pour le conserver longtemps en bon état et conserver par la suite ses fonctions.

1.3.1. Synthèse et sécrétion de la bile

En synthétisant la bile, le foie assure une fonction digestive importante. Cette substance jaune verdâtre est synthétisée exclusivement par les hépatocytes et est conduite par les canalicules et les canaux biliaires vers le duodénum. A ce niveau, la bile sert à émulsifier les graisses par l'action dégradante des lipases intestinales et pancréatiques qui transforment ces graisses en particules absorbables par la muqueuse intestinale. Elle participe de même à éliminer les substances de l'organisme en évacuant par les selles l'excès des ions inorganiques, du cholestérol et des produits de la détoxification des xénobiotiques. La bile est constituée à 85% d'eau et des acides biliaires, des phospholipides, du cholestérol, de la bilirubine conjuguée, du glutathion et des électrolytes en quantité égale à ceux du plasma. La bile stockée dans la vésicule biliaire a une composition 5 à 10 fois plus concentrée que celle sécrétée, due à l'absorption d'eau et d'électrolytes. En moyenne, 620 ml de bile est excrétée par jour et sa libération au niveau du duodénum est provoquée lors d'un apport alimentaire riche en graisse par la libération d'une hormone, la cholécystokinine, causant une décharge cholinergique qui entraîne la contraction de la vésicule biliaire et la libération de son contenu. Le flux biliaire est un mécanisme

osmotique entraîné essentiellement par la sécrétion des acides biliaires qui sont synthétisés exclusivement dans le foie à partir du cholestérol. Ces acides biliaires vont en partie retourner dans le foie par un cycle entéro-hépatique pour à nouveau être sécrétés dans la bile (Esteller 2008).

1.3.2. Métabolisme énergétique

Le foie est impliqué dans le maintien de l'homéostasie glucidique en régulant le taux de glucose dans le sang. Il engendre des processus de glycogénolyse et de glycogénèse pour maintenir un taux de glycémie normal entre 0,8 et 1,2 g/L dans le sang. Lorsque ce taux est élevé, le pancréas sécrète une hormone hypoglycémiante, l'insuline, dont la présence dans le sang est captée par des récepteurs spécifiques à la surface des hépatocytes. Ainsi le foie induit un mécanisme de glycogénèse qui permet de stocker le glucose dans les cellules hépatiques sous forme de glycogène. En revanche, lorsque le taux de glycémie est bas, une hormone hyperglycémiante, le glucagon, est sécrétée par le pancréas, et un processus de glycogénolyse est mis en place au niveau hépatique pour dégrader le glycogène stocké en glucose et assurer les quantités énergétiques nécessaires pour le bon fonctionnement cellulaire. Lors des carences importantes en glycogène, le foie peut assurer le maintien du taux de la glycémie en synthétisant du glucose à partir des sources non glucidiques comme les acides aminés et les lipides (Thomson & Shaffer 2005)

Le foie intervient dans le métabolisme lipidique en transformant les lipides parvenant de l'apport alimentaire en triglycérides. Ces triglycérides stockés peuvent être oxydés et dégradés en acides gras pour répondre aux besoins énergétiques du corps. Le foie peut de même synthétiser des phospholipides et une grande partie du cholestérol dont le catabolisme génère les acides biliaires (Nguyen et al. 2008)

Une grande partie des protéines plasmatiques est synthétisée par le foie, notamment l'albumine, les lipoprotéines et des facteurs de coagulation comme le fibrinogène et la prothrombine. Le foie est capable de stocker plusieurs vitamines comme la vitamine A et la vitamine B12 et de stocker du fer par la présence d'une protéine de stockage de fer, la ferritine. A partir de ce stock, le foie peut synthétiser de l'hémoglobine. Le foie est responsable d'une grande partie du catabolisme des acides aminés permettant ainsi la synthèse de l'urée à partir de l'ammoniac circulant (Thomson & Shaffer 2005).

1.3.3. Détoxification

Le corps humain est continuellement exposé à différents types de molécules qui peuvent se révéler nuisibles à la santé comme les polluants environnementaux, les médicaments, les aliments et d'autres.

Ces molécules étrangères à l'organisme, nommées xénobiotiques, arrivent au niveau du foie par la circulation splanchnique et peuvent avoir des effets délétères sur l'organe. Si ces xénobiotiques sont des substances hydrophiles, ils peuvent être éliminés directement par des transporteurs membranaires, par contre si ils sont lipophiles, ils vont facilement franchir la membrane cellulaire pour s'accumuler et augmenter la toxicité dans les cellules. Face à ces effets toxiques, le foie possède une fonction de détoxification qui sert à métaboliser toutes ces substances et les transformer en molécules plus hydrophiles afin de faciliter leur élimination du corps.

Le métabolisme des xénobiotiques se compose en trois phases. La première consiste à modifier les fonctions chimiques de ces substances dans le but d'inhiber leurs effets toxiques. Les métabolites électrophiles générés de cette modification vont passer à la deuxième phase, nommée phase de conjugaison, où ils vont se lier à d'autres composés pour faciliter ainsi leur excrétion hors de la cellule par l'intermédiaire des protéines d'efflux de la phase III (Figure 5).

1.3.3.1. La phase I

Egalement nommée phase de fonctionnalisation, elle correspond à un ensemble de réactions d'oxydo-réduction, d'hydrolyse ou d'hydratation dont l'acteur principal est une famille de mono-oxygénases appelées cytochromes P450 (Hasler 1999; Nelson 1999). Les CYP 450 sont des hémoprotéines, constituées d'une apoprotéine et d'un hème, qui ont la capacité d'émettre un spectre d'absorbance à 450 nm (Omura & Sato 1962). Ces enzymes sont capables d'accomplir plusieurs réactions qui peuvent varier en fonction de la nature de leurs apoprotéines. Pour accomplir ces réactions, les CYPs ont besoin d'une source d'électrons qui est généralement la NADPH. Présentes majoritairement dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, ces protéines peuvent aussi se retrouver dans l'intestin, les reins, le cerveau, les poumons et la peau (Krishna & Klotz 1994). Chez l'homme, 57 gènes codent pour différents CYPs, dont seulement 15, appartenant essentiellement aux familles 1, 2 et 3, participent au métabolisme des xénobiotiques (Lewis 2004). Les cytochromes P450 sont impliqués, non seulement, dans le métabolisme des substances exogènes mais aussi dans celui des substances endogènes comme les stéroïdes, les acides biliaires, l'acide arachidonique et la vitamine D. La biotransformation des xénobiotiques par les enzymes de la phase I, peut générer des produits réactifs qui peuvent être encore plus toxiques que les substances d'origines (Guéguen et al. 2006).

1.3.3.2. La phase II

Les réactions de la phase II sont des réactions de conjugaison qui impliquent l'activité de plusieurs enzymes telles que les UDP-glucuronosyltransférases, les sulfotransférases, les N-acétyltransférases et

les glutathion S-transférases (Jancova et al. 2010). Au niveau de cette étape, le produit de la phase I est conjugué à un autre composé qui augmente sa polarité et facilite son excrétion de la cellule.

1.3.3.3. La phase III

Cette phase correspond au transport des produits de la phase I et II hors des cellules. Ce transport se fait à l'aide des transporteurs membranaires tels que les glycoprotéines membranaires appartenant à la famille des transporteurs ATP dépendants (Yamazaki et al. 1996). A travers ces transporteurs, les molécules métabolisées sont éliminées par les urines ou la bile.

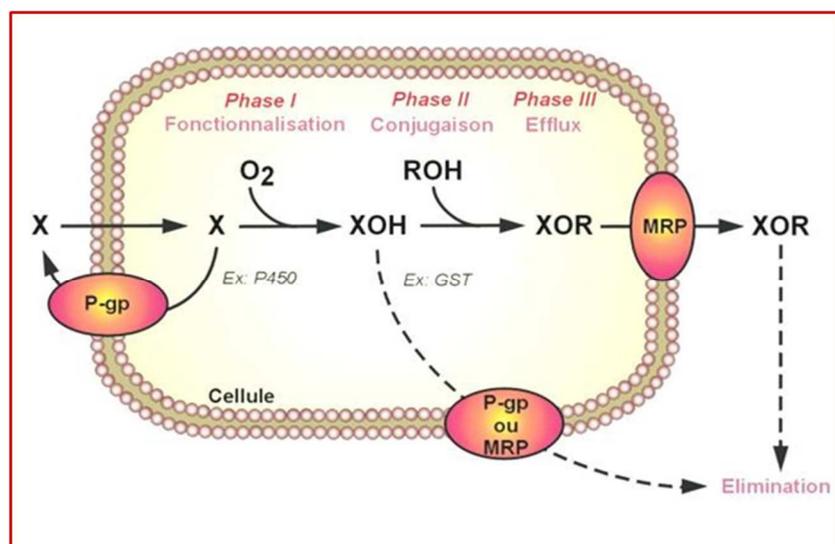


Figure 5. Différentes phases du métabolisme des xénobiotiques.

1.4. Régénération hépatique

Le foie possède la capacité de se régénérer. En cas de perte d'une partie du foie suite à une chirurgie ou bien sous l'action des toxiques, le foie peut s'auto-renouveler pour reconstituer sa structure et regagner sa masse d'origine. Il a été montré que chez l'Homme une perte de 75% du volume hépatique peut être régénérer au bout de quatre mois.

Dans un foie normal, les hépatocytes se trouvent à la phase G₀ du cycle cellulaire. Ces cellules s'activent et entrent dans le cycle en réponse à différents stimuli. En effet, lors d'une agression hépatique, les cellules de Kupffer et les cellules étoilées du foie s'activent et augmentent la production de cytokines telles que le TNF α et l'IL-6. Les effets des facteurs de croissance, tels que l'EGF et le HGF sécrétés par d'autres organes, s'additionnent à ceux des cytokines pour contrôler la division

cellulaire des hépatocytes. Une fois la masse normale du foie rétabli, la division des hépatocytes s'arrête et ils reviennent à la phase G0 (Black et al. 2004). Des études dans un modèle de souris transgéniques, ont montré qu'il existe une hétérogénéité dans la capacité de renouvellement entre les hépatocytes. Il a été montré que des hépatocytes diploïdes localisés à proximité de la veine centrale, se divisent plus rapidement que les autres et peuvent servir comme cellules souches pour conserver la masse hépatique (Wang et al. 2015).

Une autre voie de régénération peut être stimulée dans le cas d'une perte importante d'hépatocytes ou de leur capacité à se diviser. Cette voie implique les cellules ovales ou les cellules précurseurs intra-hépatiques qui, une fois stimulées, peuvent se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires (Fausto 2004).

1.5. Principales étiologies des maladies chroniques hépatiques

Les principales maladies chroniques hépatiques sont dues aux infections virales, et aux problèmes métaboliques, voire à des troubles immunitaires. Les infections virales sont la cause majeure des atteintes hépatiques dans le monde avec plus de 240 millions de porteurs chroniques du virus de l'hépatite B (VHB) et plus de 130 millions infectés par le virus de l'hépatite C (VHC). L'infection par ces virus engendre une inflammation du foie qui peut être aiguë engageant ainsi le pronostic vital des patients ou qui peut être chronique et progresser vers des états de fibrose, de cirrhose ou même vers le développement de carcinomes hépatocellulaires (OMS 2015b; OMS 2015a). L'alcool figure parmi les premières causes de morbidité et de mortalité dans le monde avec 3,3 millions de morts par an liés principalement à une consommation abusive d'alcool (WHO 2015). La première manifestation, de la consommation d'alcool, dans le foie est le développement d'une stéatose caractérisée par une accumulation excessive de lipides dans les cellules hépatiques, cette maladie est réversible si la consommation d'alcool s'arrête. Une inflammation du foie est observée lors des hépatites alcooliques aiguës et peut évoluer vers des stades de fibroses hépatiques ou bien de cirrhoses lors des consommations alcooliques chroniques (Tilg & Day 2007; O'Shea et al. 2010). Un apport alimentaire riche en graisses peut aussi être à l'origine de maladies hépatiques. Les stéatoses hépatiques non alcooliques se caractérisent par une accumulation excessive de lipides tels que les triglycérides dans le foie et peuvent causer des lésions des cellules hépatiques ainsi qu'une inflammation du foie. L'obésité est un facteur qui augmente le risque du développement des stéato-hépatites à partir de ces stéatoses et qui peuvent évoluer vers des états de cirrhose. Plusieurs autres facteurs sont à l'origine de maladies hépatiques, tels que les hépatites auto-immunes qui se caractérisent par une augmentation des taux de

transaminases hépatiques dans le sang ainsi que par la présence d'auto-anticorps sériques. En l'absence de traitements, ces hépatites auto-immunes peuvent également évoluer vers des états plus sérieux, comme les cirrhoses (Gossard & Lindor 2012).

2. LA FIBROSE HÉPATIQUE

Au regard de ses nombreuses fonctions et son importante irrigation sanguine, le foie est en contact avec de nombreuses molécules ou même des agents pathogènes (virus, parasites, etc...) qui peuvent causer des lésions et la mort des cellules hépatiques. La réponse naturelle aux agressions hépatiques, est un processus de cicatrisation qui vise à remplacer les régions lésées. Ce processus devient excessif lors des agressions hépatiques chroniques et se transforme en un processus de fibrogenèse conduisant à l'apparition d'une fibrose hépatique. Etant la principale complication des maladies chroniques du foie, la fibrose hépatique peut évoluer vers un stade de cirrhose ou même vers un cancer de foie.

La fibrose hépatique se définit principalement par l'accumulation excessive de la MEC dans le foie, et est un mécanisme évolutif qui au bout de 10 à 20 ans peut transformer un foie normal en un foie cirrhotique perdant ainsi ses principales fonctions (Bataller & Brenner 2005). Elle résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC remplaçant le parenchyme normal hépatique par un tissu fibreux.

2.1. La matrice extracellulaire au cours de la fibrogenèse

La MEC représente 3% du volume hépatique et joue un rôle important dans l'adhésion des cellules, leur migration, leur différenciation et dans la communication entre les cellules assurant ainsi le bon fonctionnement cellulaire. Dans le foie, la MEC est localisée au niveau des espaces portes, entourant les canaux biliaires et les vaisseaux, ainsi que dans la paroi des veines centrolobulaires et au niveau de l'espace de Disse, qui sépare les hépatocytes des cellules endothéliales. Elle est constituée principalement par l'assemblage de deux types de macromolécules, les polysaccharides englobant les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes, et les protéines fibreuses constituées des protéines de structure comme l'élastine et le collagène, et des protéines d'adhérences, comme la laminine et la fibronectine.

La MEC se présente dans l'espace de Disse sous forme d'une lame basale discontinue permettant les échanges entre les hépatocytes et le sang et comportant principalement du collagène de type III et V,

de la fibronectine (Burt et al. 1990), du collagène du type IV et des protéoglycanes riches en héparane-sulfate (Schuppan 1990).

Quand le foie est attaqué, une réaction inflammatoire se met en place initiant un processus de cicatrisation qui se manifeste par une synthèse des composants matriciels permettant ainsi la cicatrisation de la lésion (Friedman 2003). Lorsque ces attaques persistent, la réaction inflammatoire devient chronique et la composition de la MEC commence à changer quantitativement et qualitativement pour transformer progressivement le foie en foie fibreux où l'accumulation de la MEC devient de plus en plus importante pour devenir 6 fois plus importante dans des stades avancés de fibrose. Le dépôt initial de la fibrose dépend de l'agent agresseur du foie, il est portal dans le cas des agents viraux et il est péricentral quand l'agression est due à l'alcool (Ramadori & Saile 2004).

Au cours de la fibrogenèse, le dépôt de collagène fibrillaire de type I augmente considérablement ainsi que celui de type III et IV. La synthèse d'autres composants de la MEC augmente pareillement notamment la laminine et la fibronectine qui précède le dépôt du collagène interstitiel (Schuppan et al. 2001). L'élastine, l'acide hyaluronique et les protéoglycanes augmentent de même. Ce changement dans la composition de la MEC entraîne une activation des CEF ainsi qu'une disparité des microvillosités hépatocytaires et une perte de la fenestration des cellules endothéliales empêchant les échanges des substances entre les hépatocytes et le sang (McGuire et al. 1992) et conduisant par la suite à une hypertension portale et une insuffisance hépatique.

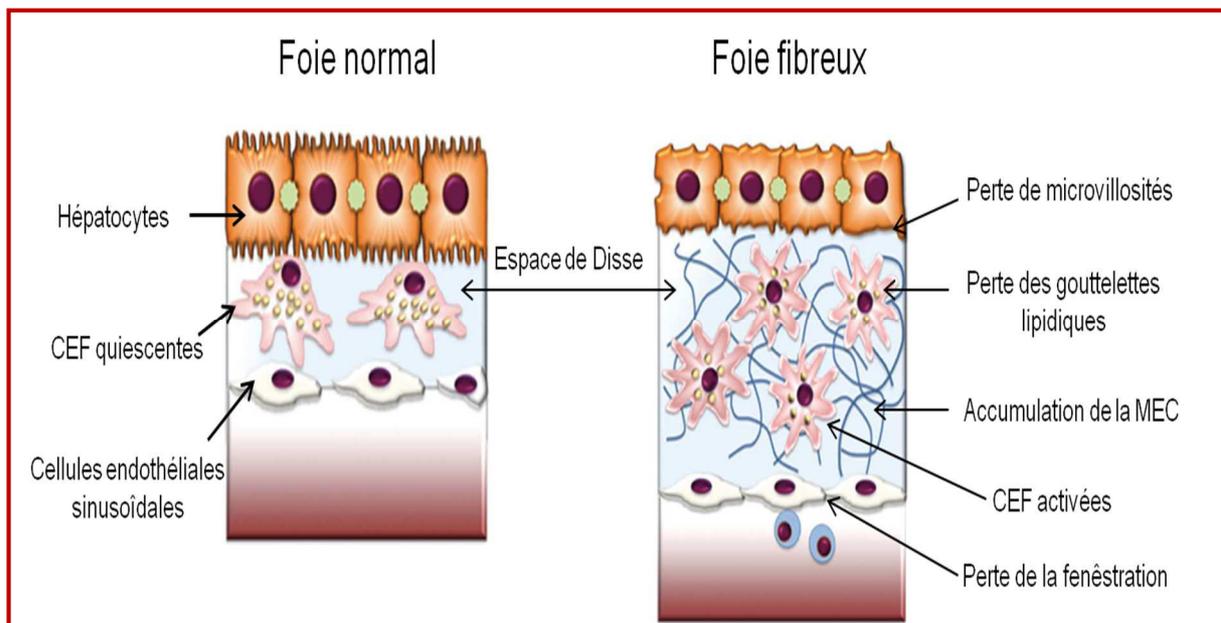


Figure 6. Modification de l'espace péricentral au cours de la fibrogenèse.

Adapté (Elpek 2014)

L'accumulation excessive de la MEC lors d'une fibrose est causée non seulement par l'augmentation de la synthèse de ses composants mais aussi par la diminution de leur dégradation. Les principales enzymes de dégradation impliquées sont les matrice-métalloprotéinases (MMP) qui à leur tour sont régulées par leurs inhibiteurs, les TIMPs ou tissue inhibitor of metalloproteinases. Les MMP-2, MMP-3 et MMP-9 sont connues pour dégrader les composants normaux des membranes basales comme le collagène de type IV tandis que la MMP-1 dégrade le collagène fibrillaire (Arthur 2000). L'expression de cette dernière diminue dans les foies fibreux tandis que l'expression des TIMP-1 et TIMP-2 augmente (Benyon et al. 1996).

2.2. Les cellules fibrogéniques

Les cellules effectrices de la fibrose hépatique sont des cellules mésenchymateuses qui ont la capacité de produire de la MEC et d'être contractiles. Ce sont des cellules myofibroblastiques exprimant l' α -SMA. Dans un foie normal, les myofibroblastes sont présents juste autour des vaisseaux portaux et des veines centrolobulaires, en revanche, lors d'une lésion hépatique chronique, ces cellules myofibroblastiques vont s'accumuler dans le foie et leur nombre va augmenter avec la gravité de la fibrose. Jusqu'aujourd'hui, plusieurs sources de cellules fibrogéniques ont été identifiées avec deux principaux types que sont les cellules étoilées du foie considérées comme acteurs majeurs dans la fibrose (Kisseleva & Brenner 2006; Puche et al. 2013), et les fibroblastes portaux (Iwaisako et al. 2014) localisés dans l'espace porte. D'autres cellules comme les cellules de la moelle osseuse et les fibrocytes circulants peuvent de même être à l'origine des myofibroblastes hépatiques (Russo et al. 2006). A leur tour, les hépatocytes et les cholangiocytes peuvent aussi acquérir un phénotype myofibroblastique en se transformant en cellules mésenchymateuses issues de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Choi & Diehl 2009; Kalluri 2009) (Figure 7).

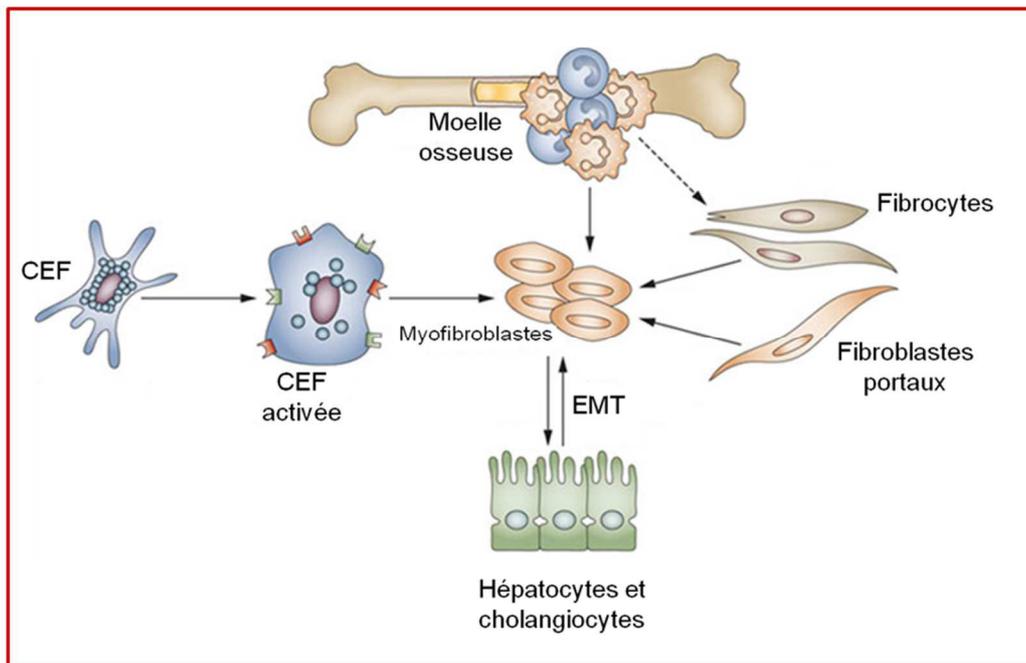


Figure 7. Origine des cellules fibrogéniques.

(Friedman 2010)

2.2.1. L'activation des cellules étoilées du foie (CEFs)

Longtemps considérées comme les uniques myofibroblastes hépatiques, les CEFs jouent un rôle clef dans l'établissement et l'évolution de la fibrose hépatique. Influencées, d'une part, par les stimulations paracrines des cellules adjacentes et, d'autre part, par la composition de la MEC, les CEFs s'activent en réponse à des atteintes hépatiques et acquièrent un phénotype myofibroblastique. L'activation des CEFs se fait en deux phases, l'initiation et la perpétuation. L'initiation correspond à la stimulation paracrine par les cellules de Kupffer, les cellules sinusoidales, les plaquettes et les hépatocytes. Lors d'une agression hépatique, des foyers inflammatoires apparaissent avec des cellules de Kupffer, des plaquettes et des leucocytes. Les hépatocytes endommagés induisent un signal pro-fibrogénique activant les cellules de Kupffer, et donc la phagocytose des cellules mortes et la production de certain nombre de cytokines pro-fibrosantes notamment TGF β . Cette cytokine joue un rôle principal dans l'activation des CEFs et dans l'augmentation de production des composants matriciels comme le collagène de type I par ces cellules. La phagocytose des hépatocytes apoptotiques par les CEFs même peut aussi être à l'origine de leur activation suite à l'interaction de l'ADN des hépatocytes avec le « Toll-like receptor 9 » (TLR9) exprimé par les CEFs (Guicciardi & Gores 2010). L'activation des CEFs peut être aussi initiée par les cellules sinusoidales qui transforment le TGF β inactif en une forme active, et par les plaquettes qui produisent des facteurs de croissance notamment le PDGF, l'EGF et le TGF β . Les CEFs peuvent être activées par les espèces réactives de l'oxygène générées par les

hépatocytes, les cholangiocytes, les cellules inflammatoires ou par les macrophages en augmentant l'expression des gènes associés à la fibrose comme ceux du Col1A1, Col1A2, TIMP-1 et MCP-1. L'activation des cytochromes P450, notamment le CYP2E1 est une source importante de stress oxydatif, activant ainsi les CEFs et augmentant leur production de collagènes de type I.

Durant le processus d'activation, les CEFs quiescentes perdent leur contenu en rétinol excrétés sous forme de rétinol (Friedman 2008), elles expriment le α -SMA et deviennent ainsi contractiles. Cette contractilité va avoir un impact important dans les maladies hépatiques chroniques en empêchant la circulation sanguine dans les espaces portes induisant ainsi une hypertension portale. Ces cellules activées sont capables de contrôler la vasomotricité sinusoidale en synthétisant des vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 (Pinzani et al. 1996), qui est surexprimée dans les foies fibreux, et des vasodilatateurs comme le NO (Rockey & Chung 1995). Ces cellules activées migrent vers les sites de lésions sous l'effet des facteurs chimioattractants comme le PDGF (Kinnman et al. 2000), le MCP-1 (Marra et al. 1999), *via* CXCR4 et CXCR3 (Bonacchi et al. 2001). Leur prolifération est médiée principalement par le PDGF ainsi que par d'autres facteurs de croissances tels que le TGF α , l'EGF et le bFGF (Yu et al. 2003).

Les CEFs activées contribuent aussi à la modulation de la MEC en augmentant leur production, en collagènes de type I, III et VI, en fibronectine (Ramadori et al. 1992), en protéoglycanes de type héparane-sulfate (Roskams et al. 1996), en acide hyaluronique et en d'autres protéines composantes de la MEC. Elles augmentent de même la synthèse de TIMP-1 (Benyon et al. 1996) et du PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) (Ghosh & Vaughan 2012) qui inhibe la transformation du plasminogène en plasmine inhibant ainsi la fibrolyse.

2.3. Physiopathologie et évolution de la fibrose hépatique

Au cours de la fibrogenèse, le tissu hépatique normal est remplacé par un tissu fibreux qui perturbe l'activité hépatique. L'accumulation des quantités excessives de collagène interstitiel dans l'espace périsinusoïdal, entraîne une diminution de la perméabilité sinusoidale empêchant ainsi les échanges avec les hépatocytes qui deviennent incapables d'accomplir leurs activités métaboliques. Les cellules endothéliales perdent leur fenestration entraînant une rigidification des sinusoides qui participe, avec les propriétés contractiles des CEFs activées, à augmenter la pression portale (Rockey et al. 1993). Ces changements fonctionnels sont accompagnés par des changements anatomiques qui peuvent se manifester par l'apparition des ponts fibreux à des niveaux avancés de la fibrose. La fibrose hépatique peut s'aggraver en cas de persistance de l'agent causal pour évoluer vers une cirrhose. Cette dernière

est considérée comme la 14^{ème} cause de mort chez les adultes dans le monde et la 4^{ème} en Europe avec 170 000 mort par an (Blachier et al. 2013). L'évolution de la fibrose vers une cirrhose est généralement asymptomatique et se fait sur une durée de 15 à 30 ans. Elle est caractérisée par la formation de nodules de régénération (Friedman 2003) dépourvus de vascularisation et des septa fibreux qui se transforment en ponts fibreux reliant les veines centrolobulaires avec les espaces portes et reliant ces derniers entre eux isolant par suite les nodules hépatiques. Les complications majeures d'une cirrhose hépatique se manifestent par, une insuffisance hépatique due à la diminution du nombre d'hépatocytes et de la vascularisation au niveau du foie, une hypertension portale qui peut être à l'origine de la formation des varices œsogastriques et de leur rupture, une formation d'ascite ou une évolution vers un carcinome hépatocellulaire (Tsochatzis et al. 2014). Le carcinome hépatocellulaire est un cancer primitif du foie qui se développe dans 75 à 80% des cas sur des cirrhoses hépatiques provenant de différentes maladies chroniques du foie tels que les hépatites virales (Lok et al. 2009; Yuen et al. 2009) et les hépatites alcooliques (Fattovich et al. 2004).

2.4. Diagnostic de la fibrose hépatique

La détection des stades d'évolution de la fibrose est nécessaire pour surveiller l'évolution des maladies chroniques du foie et pour pouvoir préciser la décision thérapeutique à prendre. Il est important de détecter le développement d'une fibrose dans des stades précoces ce qui n'est pas facile puisque l'évolution des maladies hépatiques chroniques reste silencieuse pour plusieurs années. Le diagnostic de la fibrose se fait par des méthodes invasives ou non-invasives mais dans la plupart des cas la combinaison des deux méthodes est nécessaire pour préciser la stratégie thérapeutique qui convient.

La biopsie hépatique est traditionnellement considérée comme la méthode de référence pour détecter, les lésions hépatiques, leur cause et la distribution de la fibrose dans le tissu. L'interprétation des résultats de la biopsie repose sur des scores semi-quantitatifs comme le score METAVIR (Bedossa & Poynard 1996), le score Knodell (Knodell et al. 1981) ou bien le score d'Ishak (Ishak et al. 1995). C'est une méthode invasive coûteuse qui n'est pas facilement renouvelable et qui engendre plusieurs complications pouvant aller de la simple sensation de douleur jusqu'à la mort du patient dans des cas trop rares (Bravo et al. 2001). Malgré l'information importante apportée par la biopsie sur l'étiologie de la maladie et le stade d'évolution, cette méthode ne peut être toujours crédible en évaluant la fibrose. En fait, le fragment prélevé lors de la biopsie peut ne pas représenter le véritable état du foie (Regev et al. 2002) vu la différence de distribution de la fibrose dans le tissu, de même l'interprétation peut varier d'un observateur à l'autre. Toutes ces limitations ont amené au développement des

méthodes non-invasives qui avec la biopsie assure un meilleur diagnostic et une meilleure prise en charge du patient. Ces méthodes non-invasives peuvent être basées sur des systèmes d'imagerie comme les échographies, l'IRM ou la mesure d'élasticité hépatique. Cette élasticité est évaluée par le FibroScan qui permet de mesurer par ultrasons la vitesse de propagation d'une onde de choc dans le tissu hépatique. Plus la vitesse est rapide, plus le tissu est fibreux. D'autres méthodes non-invasives reposent sur le dosage sanguin de plusieurs marqueurs en relation directe ou indirecte avec la fibrose. Les principaux marqueurs indirects sont le taux des transaminases hépatiques, de prothrombine ou le nombre des plaquettes. L'acide hyaluronique, le pro-peptide N-terminal du procollagène de type III, la laminine, les métalloprotéases notamment la MMP-2, le TIMP-1, la glycoprotéine YKL-40 (Tao et al. 2014), peuvent être considérés comme marqueurs directs de la fibrose puisque leur augmentation est positivement corrélée à la progression de la fibrose. Tous ces paramètres sanguins sont combinés en scores, comme le FibroTest et le Fibromètre, qui en associant plusieurs dosages permettent une meilleure évaluation de l'état de la maladie (Castera 2011; EASL-ALEH 2015) .

2.5. Approches anti-fibrosantes

L'avancement dans les études des causes et des mécanismes moléculaires de la fibrose hépatique, ouvre les portes pour diverses stratégies anti-fibrosantes qui pourraient réduire sa progression ou même induire sa régression. La suppression de l'agent causal, même si pas suffisante, reste, de nos jours, la plus importante vu le dynamisme de la fibrose et sa réversibilité. Les principales stratégies anti-fibrosante se dirigent vers l'inactivation des cellules fibrosantes et l'arrêt de l'inflammation. Des études actuelles se font sur des molécules hépato-protectrices ayant pour but de diminuer la libération des signaux induisant la réponse inflammatoire (Lee et al. 2015) et la fibrose comme l'Emiricasan (IDN-6556), un inhibiteur de caspases, qui empêche l'apoptose des hépatocytes (Barreyro et al. 2015; Pockros et al. 2007) et le PBI-4050 qui inhibe l'expression de α -SMA et du collagène du type I et qui s'est révélé efficace sur des fibroblastes humains (Leduc et al. 2013). De même, les corticoïdes sont bien étudiés pour leur effet dans les hépatites auto-immunes (Czaja & Carpenter 2004). L'inhibition de la fibrogenèse et la fibrolyse sont aussi de bonnes visées thérapeutiques. En effet, le TGF- β 1 qui joue un rôle important dans le développement de la fibrose et dans la synthèse des composants matriciels fibreux, est une cible de traitement anti-fibrotique en inhibant son activation ou bien son action par des antagonistes (Gressner & Weiskirchen 2006). L'augmentation de la dégradation de la MEC se fait en augmentant l'activité des métalloprotéases matricielles ou bien en diminuant l'activité des TIMPs, leurs inhibiteurs. Dans un modèle de fibrose hépatique induite par le CCl₄ chez les rats, l'application d'un anti-TIMP-1 a permis de diminuer le taux d'activation des CEFs et celui des MMP-2 avec une

diminution du dépôt de collagène dans le foie (Parsons et al. 2004). Les Antioxydants comme la vitamine E peuvent aussi réduire la fibrose hépatique dans plusieurs modèles (Sanyal et al. 2010). Une autre stratégie pour réduire la fibrose dans les maladies chroniques du foie est l'induction de l'apoptose des cellules fibrogéniques. Des études ont montré que l'inhibition du facteur de transcription anti-apoptotique, NF- κ B, augmente l'apoptose des cellules myofibroblastiques (Chakraborty & Mann 2010). De même, la production de l'IFN- γ par les cellules NK activées peut avoir des effets anti-fibrotiques (Gao et al. 2009).

2.6. Modèles expérimentaux d'étude de la fibrose hépatique

Les études de la fibrose, de son évolution et des mécanismes moléculaires mis en place chez l'Homme peuvent se faire en se basant sur la biopsie hépatique et en se référant aux scores de marqueurs sanguins. Ces études se font une fois que la fibrose est installée et a évolué. En revanche, pour étudier l'initiation du processus de fibrogenèse, des modèles d'hépatite sont développés chez les animaux de laboratoire, en administrant différentes molécules induisant des dommages hépatiques ou en inactivant certains gènes amenant à une fibrose. Différentes étiologies de fibrose ont ainsi été étudiées avec des modèles de fibroses d'origine chimique, cholestatique, immunitaire, virale ou des modèles d'animaux transgéniques.

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est le toxique chimique le plus utilisé pour induire une fibrose hépatique chez les rats et les souris. L'administration répétée du CCl₄ par voie intrapéritonéale ou orale induit des lésions hépatiques, laissant s'installer une fibrose au bout de 4 à 6 semaines. Son métabolisme au niveau des hépatocytes se fait essentiellement par le Cyp2e1 et génère des métabolites réactifs comme le radical trichlorométhyl pouvant se lier à des protéines et des lipides induisant ainsi une peroxydation lipidique à l'origine d'une nécrose centrolobulaire massive avec une augmentation des taux d'ALAT dans le sérum au bout de 12h (Weber et al. 2003). Le modèle CCl₄ peut être utilisé pour induire des hépatites chroniques et aiguës. Une simple dose de CCl₄ peut induire une réaction inflammatoire médiée par l'activation des cellules de Kupffer (Muriel & Escobar 2003) et des mécanismes de régénération qui s'installent 48h après son administration. Ce modèle rassemble toutes les propriétés d'une fibrose hépatique chez l'Homme avec une inflammation, un processus de fibrogenèse et un mécanisme de régénération, d'où son utilisation importante dans les études de la fibrose.

Le thioacétamide (TAA) est un deuxième modèle expérimental de fibrose chez les souris et les rats. Sa bioactivation en sulfoxyde de thioacétamide par les Cyp2e1 (Ramaiah et al. 2001) est à l'origine de ses

effets hépatotoxiques (Hajovsky et al. 2012). Le TAA entraîne une nécrose hépatique centrolobulaire (Li et al. 2002) et une fibrose au bout de 6 semaines, selon les doses et la fréquence de son administration. Les taux d'ALAT dans le sang n'augmentent pas à des valeurs très importantes mais une fibrose s'installe.

La consommation d'alcool est une cause importante des maladies hépatiques chroniques chez l'Homme mais l'étude de ce modèle n'est pas toujours facile chez les animaux, vu l'aversion naturelle des rongeurs pour l'alcool et donc des difficultés pour contrôler les niveaux de consommation d'une part et le métabolisme rapide de l'alcool qui empêche de maintenir des concentrations élevées dans le sang d'autre part. Deux principaux modèles sont utilisés pour étudier les maladies alcooliques chroniques, le modèle Tsukamoto-French (French et al. 1984) et le modèle Lieber DeCarli (Lieber et al. 1965). Le premier est basé sur le gavage des quantités précises d'alcool et le deuxième est basé sur un régime alimentaire *ad libitum* contrôlé en quantités d'alcool et de calories. Le métabolisme d'alcool par l'alcool déshydrogénase et le Cyp2e1 est accompagné par une libération des espèces réactives de l'oxygène à l'origine de son hépatotoxicité. Une nécrose centrolobulaire est observée avec accumulation de lipides. La fibrose peut être observée après plusieurs semaines de traitement.

Le modèle expérimental de ligature du canal biliaire, est un modèle d'induction d'une choléstase et de fibrose utilisé chez les souris et les rats dans lequel une augmentation des acides biliaires hépatiques entraîne la mort des hépatocytes et l'installation, au bout de quelques semaines, d'une fibrose dans la zone périportale (Wallace et al. 2008).

Les hépatites auto-immunes sont de même étudiés dans des modèles animaux. Le modèle le plus utilisé est celui de la Concanavaleine A (Con A), une molécule purifiée à partir d'une plante, la *Canavalia brasiliensis*, et appartenant à la famille des lectines. Une simple administration de ConA chez les souris peut induire une hépatite aiguë avec des taux de transaminases hépatiques qui augmentent dans le sang après 8h. Des doses répétées de ConA peuvent induire une fibrose au niveau centrolobulaire et périportale (Wallace et al. 2008). L'hépatotoxicité de la ConA se fait par activation des lymphocytes. Après injection intrapéritonéale, la ConA se lie aux cellules endothéliales sinusoidales en induisant des modifications permettant sa traversée pour arriver au niveau des cellules de Kupffer. La liaison de la ConA à ces cellules induit leur activation et l'installation d'une inflammation et la mort des hépatocytes après recrutement des neutrophiles et des lymphocytes, notamment les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules NKT (Wang et al. 2012).

Pour mieux comprendre les désordres immunologiques qui se manifestent dans les hépatites virales chez l'Homme, des modèles murins d'hépatite virale ont été développés en utilisant le virus murin

MHV3. Le virus MHV3 appartient à la famille des coronavirus et il est le plus virulent des virus murins. Son action toxique touche, en plus du foie (Taguchi et al. 1986), plusieurs organes notamment les organes lymphoïdes (Lamontagne & Dupuy 1984) et le système nerveux central (Tardieu et al. 1986). Le MHV3 peut induire une hépatite aigue et chronique selon la génétique de l'espèce utilisée (Lévy-Leblond et al. 1979). Chez les souris C57BL6, ce virus induit une nécrose hépatique dans les 48h après infection et provoque la mort des souris au bout de 4 à 5 jours.

3. LE CHLORDECONE

Le chlordécone est un pesticide organochloré, utilisé principalement dans des buts agricoles pour la lutte du charançon des bananiers. Il est classé comme polluant organique persistant (POP), vu sa longue persistance dans l'environnement, et son pouvoir de bioaccumulation tout le long de la chaîne alimentaire. La contamination humaine au chlordécone a touché plusieurs fonctions physiologiques de l'individu et a entraîné beaucoup de perturbations induisant des pathologies. Même si l'utilisation du chlordécone a été arrêtée dans le monde depuis 1993, l'intérêt des études sur son implication dans l'environnement et sur la santé humaine reste nécessaire.

3.1. Histoire du chlordécone

Le chlordécone a été inventé en 1951 par Everett Gilbert, un chercheur américain au sein de la société Allied Chemicals (Reich & Spong 1983). Ce composé breveté en 1952, a été synthétisé par trois usines américaines qui se situaient en Pennsylvanie, dans le Delaware et à Hopewell en Virginie. Cinquante-cinq formulations avec des doses différentes de chlordécone ont été commercialisées pour couvrir un spectre large d'utilisation de la molécule. Etant donné cette utilisation variée, le marché du chlordécone a grandi pour atteindre l'Asie, l'Afrique, l'Amérique latine et l'Europe. La demande très importante pour cette molécule a nécessité une augmentation forte de la production à l'usine de Hopewell réalisée en 1974 par la société Life Science.

3.1.1. Catastrophe chimique de Hopewell

Mille six cent tonnes de chlordécone à 94.5% de matière active ont été produits de 1966 jusqu'à 1975. Cette production importante et accélérée pour répondre aux besoins du marché, a entraîné une inattention vis-à-vis des règles d'hygiène et sécurité. L'entreprise Life Science n'a pas bien formé ses employés comme le faisait Allied Chemicals, ce qui a abouti à des défaillances importantes dans le dispositif d'hygiène et de sécurité (Reich & Spong 1983). Les travailleurs de l'usine de Hopewell commençaient à avoir des symptômes bizarres de maladies notamment des tremblements excessifs qui les empêchaient de travailler. Les symptômes observés lors de cette intoxication aiguë à Hopewell, ont été connus sous le nom de « syndrome de kepone » et regroupaient des troubles neurologiques notamment des tremblements, des convulsions et des troubles de vision et de la mémoire récente. Ce syndrome regroupait aussi une hépatotoxicité et des troubles de la reproduction. Suite à ces problèmes de santé humaine, les investigations menées par l'EPA (Agence de Protection Environnementale) pour préciser l'ampleur de la pollution par le chlordécone ont révélé une atteinte de l'environnement voisin

de l'usine, avec une pollution de l'air, du sol et de l'eau. Les rejets de l'usine de Hopewell ont pollué le James River qui est le plus grand fleuve traversant la Virginie et qui se jette dans la baie de Chesapeake, le plus grand estuaire des Etats-Unis. Suite à cette pollution, la pêche dans ce fleuve a été interdite pour de nombreuses années.

Cette pollution de l'environnement et l'atteinte de la santé des travailleurs et des habitants aux alentours de l'usine ont amené à l'interdiction de la production et de la commercialisation du chlordécone aux Etats-Unis en 1976.

3.1.2. Autorisation du chlordécone en France

Le charançon ou *Cosmopolites sordidus*, insecte ravageur de culture, était considéré comme l'ennemi majeur des bananiers. La lutte contre cet insecte était principalement menée par l'utilisation des pesticides à base de l'hexachlorocyclohexane (HCH) dont l'utilisation permanente a permis l'apparition de souches de charançons résistantes qui nécessitaient l'augmentation des doses utilisées. Le chlordécone a été proposé pour substituer le HCH après avoir montré son efficacité dans la lutte contre le charançon des bananiers. Deux demandes d'autorisation commerciale du chlordécone aux Antilles françaises ont été rejetées en 1968 et en 1969 à cause de sa toxicité sur modèles animaux. Mais dès 1971, l'utilisation du HCH a été interdite vu sa forte persistance dans la nature. Une troisième demande d'autorisation du chlordécone a été présentée à la Commission des Toxiques dont le rapport a donné l'accord d'une autorisation provisoire de l'utilisation du chlordécone par le ministre d'agriculture en février 1972 sous la nomination commerciale de Kepone.

Au début des années 80, deux cyclones, Allen en 1979 et David en 1980, ont favorisé la multiplication des populations de charançons, ce qui a appuyé l'homologation d'une nouvelle formule à base de chlordécone, le Curlone, en 1981. Suite à un nouvel examen des dossiers, la Commission des Toxiques a interdit l'utilisation du Curlone en 1990. Le temps que la molécule soit retirée du marché, le Curlone a été autorisé une nouvelle fois jusqu'à février 1992. L'arrêt définitif de l'application du Curlone aux Antilles françaises n'a été effectif qu'en septembre 1993 puisque les agriculteurs ont eu des délais supplémentaires pour finir leurs stocks en Curlone (Joly 2010).

3.1.3. Application du chlordécone aux Antilles

L'application du Curlone se faisait au niveau du bulbe du bananier au moment de sa plantation puis au niveau du pied de la plante (Snegaroff 1977b). La dose appliquée était de 30 g de Curlone à 5% de substance active de chlordécone par plante donc 1,5 g de chlordécone. Les épandages se faisaient 2

fois ou plus par an en dépôt direct du Curlone au niveau des plantes et jamais en épandage aérien (Le Deaut & Procaccia 2009)

3.1.4. Découverte de la pollution par le chlordécone aux Antilles

Les études sur la contamination des eaux des Antilles françaises par les pesticides ont commencé depuis 1991. Mais à partir de 1999, le développement des techniques d'analyse qui peuvent détecter plusieurs contaminants sur un même échantillon ont amené à une recherche d'information plus élargie sur la contamination des eaux brutes et traitées et qui proviennent des eaux de surface ou de celles souterraines. Les premières études ont permis la découverte d'une forte contamination en β -HCH et des pics de contamination en chlordécone (Bonan & Prime 2001), ce qui a nécessité une surveillance importante de la qualité d'eau avec la fermeture des captages les plus pollués, la distribution des eaux en bouteilles et l'installation de la filtration au charbon actif (InVS-Inserm 2009) .

3.2. Chimie du chlordécone

3.2.1. Nomination et formule chimique

Le chlordécone est un insecticide organochloré appartenant à la famille des bishomocubanes avec une structure en cage. Il se présente comme un cristal inodore de couleur blanche (NIOSH 2004), avec une masse moléculaire de 490,64 g/mol et une formule brute de $C_{10}Cl_{10}O$ (Figure 8). Son nom chimique est le 1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-décachloro-octahydro-1,3,4-méthéno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one (O'Neil 2001). Commercialisé principalement sous les noms de Kepone et de GC-1189, il est connu aussi sous le nom de Curlone. Son numéro CAS est de 143-50-0 et il est classé comme « Toxique » et « Dangereux pour l'environnement ».

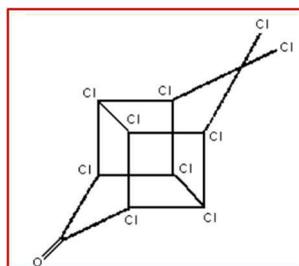


Figure 8. Structure chimique du chlordécone.

3.2.2. Synthèse

Dans l'environnement, le chlordécone n'existe pas naturellement. Ce pesticide est synthétisé chimiquement par une réaction de condensation de l'hexachlorocyclopentadiène avec le trioxyde de soufre. Cette réaction est catalysée par le pentachlorure d'antimoine et se déroule sous pression et à une température de 60°C (Bell et al. 1978; Epstein 1978). Le produit de la réaction est hydrolysé en milieu basique puis neutralisé à l'acide, le chlordécone est obtenu ensuite par séchage à l'air chaud après filtration ou centrifugation (Figure 9).

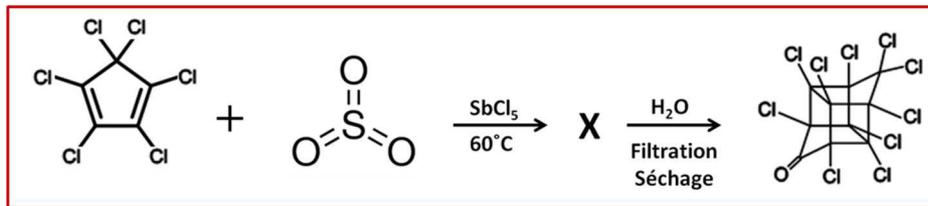


Figure 9. Schéma de la synthèse du chlordécone.

3.2.3. Solubilité

Le chlordécone est peu soluble dans l'eau mais sa solubilité augmente dans des milieux de plus en plus basiques. A un pH supérieur à 9, le chlordécone devient considérablement plus soluble (Tableau 1). Ce pesticide de caractère lipophile est soluble dans les solvants organiques avec un coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) entre 4,5 et 5,40 (ATSDR 1995).

pH	Kepone (mg/L)
4	1.75
7	2.22
8	2.37
8.5	2.44
9	3.96
9.4	4.79
9.4 (NaHCO ₃)	15.8
9.6	24.8
9.8	46.8
10	68.8
10.9	176

Table 1. Solubilité du chlordécone en fonction du pH.

(Dawson et al. 1979)

3.2.4. Volatilité

Le chlordécone est faiblement volatil avec une pression de vapeur de l'ordre de $2,5 \cdot 10^{-5}$ mm Hg. Il est thermiquement stable avec une température de fusion de 350°C, au-delà de cette température, le chlordécone subit un processus d'oxydation conduisant à la libération de grande quantité des dérivés d'hexachlorobenzène.

3.2.5. Utilisation

Le chlordécone a été utilisé dans plusieurs régions du monde pour son large panel d'efficacité. Il a été utilisé comme insecticide contre le charançon de bananiers, contre les acariens, les vers des plantes de tabac et contre le doryphore. De même, il a été utilisé comme larvicide contre les mouches et comme fongicide contre la tavelure et l'oïdium des pommiers. L'utilisation du chlordécone sur des produits alimentaires a été restreinte aux bananiers.

3.3. Contamination du chlordécone dans l'environnement

3.3.1. Contamination des sols

Les défaillances dans l'usine à Hopewell, ont entraîné une forte contamination des sols qui entouraient l'usine dans un rayon de 1 Km. Tandis qu'aux Antilles, le chlordécone a contaminé préférentiellement les sols riches en matière organique. Des cartographies de zone de contamination ou à risque de contamination montrent bien l'ampleur de la pollution 20 ans après l'arrêt de l'utilisation du chlordécone. En Martinique, 14 500 hectares sur 25 000 de surface agricole sont contaminés. Les zones de forte contamination se situent principalement dans le Nord et le Centre Atlantique de l'île, dans les régions agricoles spécifiées pour les bananeraies. En Guadeloupe, les zones à risque de contamination se situent dans le sud de l'île, dans les régions qui étaient utilisées principalement pour la culture de bananes et dont l'utilisation du chlordécone a contaminé environ 6 500 hectares de terres (Figure 10).

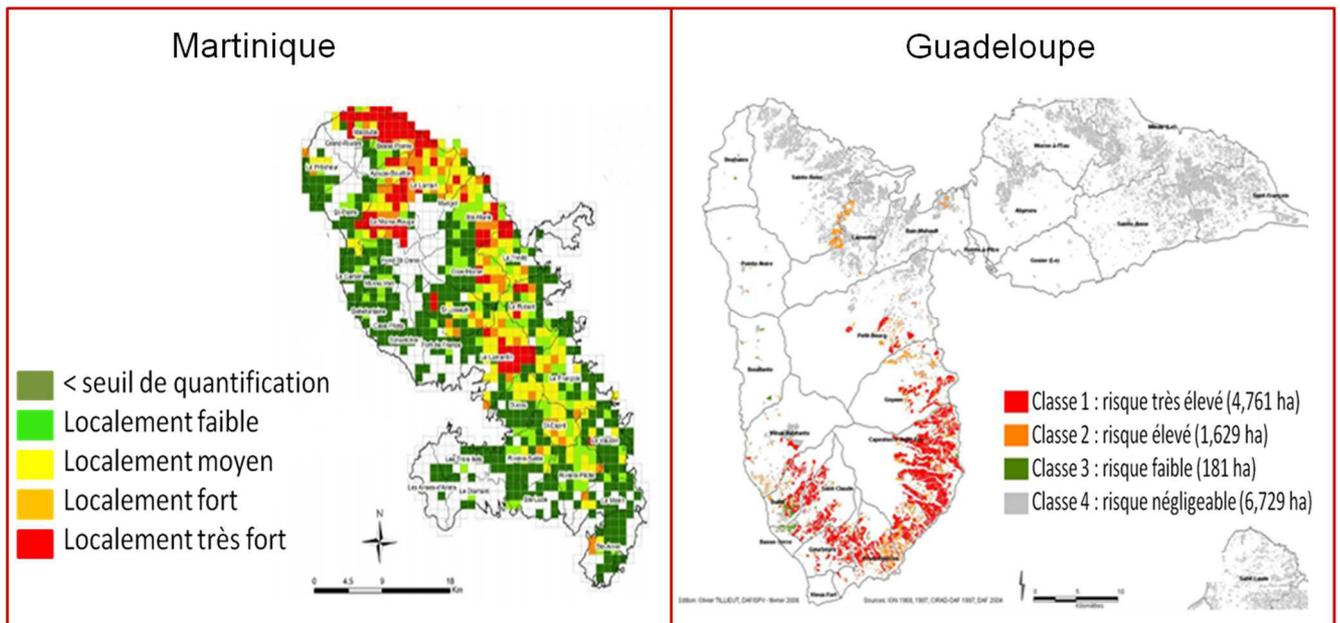


Figure 10. Cartographies des zones contaminées en Guadeloupe et en Martinique. Ces cartographies représentent les risques de pollutions fondés sur l'occupation en bananeraies pendant la période d'application du chlordécone (Cabidoche & Lesueur Jannoyer 2011).

Les propriétés physico-chimiques du chlordécone expliquent sa forte accumulation dans les sols. Sa grande affinité à la matière organique et sa faible solubilité dans l'eau sont à l'origine de cette accumulation. Plus les sols sont riches en matière organique, plus ils fixent le chlordécone qui a une faible dégradation aérobie et anaérobie. Le travail des terres peut aider à diluer les concentrations du chlordécone dans le sol, mais sa principale élimination se fait par le lessivage des eaux de drainage qui est un processus très lent. Ce qui fait que le chlordécone peut persister dans les sols pendant des siècles (Cabidoche & Lesueur Jannoyer 2011).

3.3.2. Contamination de l'eau

La contamination de l'eau par le chlordécone se fait par son adsorption aux particules en suspension pour se fixer ensuite sur la matière organique des sédiments. Cette contamination est causée principalement par les ruissellements. La découverte de la pollution d'eau à Hopewell a entraîné une interdiction de la pêche tout au long du James River tandis qu'aux Antilles tous les captages d'eau potable contaminés ont été fermés. Des mesures de protection et de traitement de l'eau potable ont été mises en place, notamment la filtration au charbon. En ce qui concerne les eaux souterraines, leur contamination dépend de la nature du sol et de la teneur du chlordécone qu'ils contiennent. Les sols

argileux ont tendance à favoriser cette contamination. Les courants d'eau peuvent amener les eaux des rivières vers la mer entraînant ainsi une contamination avec le chlordécone.

3.3.3. Contamination des aliments

La contamination des aliments se fait soit par la contamination des végétaux soit par la contamination de la faune aquatique. La contamination des végétaux se fait directement par un transfert sol-plante. Cette contamination dépend de la nature des végétaux et du taux du chlordécone dans le sol. Les végétaux dont la partie consommable est souterraine, sont les plus contaminés notamment la patate douce et les carottes. Les taux de chlordécone retrouvés dans la faune aquatique dépendaient de l'endroit de pêche, plus c'est proche des sols contaminés par le chlordécone plus les animaux aquatiques sont contaminés. Les crustacés comme la langouste sont les plus touchés.

3.4. Impact du chlordécone sur la santé humaine

Depuis la découverte de la contamination par le chlordécone à Hopewell et ses effets sur les travailleurs et les habitants de la région, la recherche de son impact sur la santé humaine a pris une certaine importance. Depuis 1975, l'effet nocif du chlordécone sur la santé a été révélé. Le taux élevé du chlordécone retrouvé dans le sang des travailleurs exposés à Hopewell a été corrélé avec les signes de maladie retrouvés chez eux. Au-delà de 11,8 mg/L les travailleurs présentaient des troubles neurologiques divers qui sont regroupés sous le nom de « kepone shake syndrome ». Les études menées sur 133 travailleurs ont montré qu'ils souffraient de maux de têtes, d'une mauvaise mémoire récente, de nervosité, d'irritabilité, d'anxiété, de mouvements oculaires rapides et aléatoires, de troubles auditifs, d'hallucinations, d'une faiblesse musculaire et des tremblements de membres qui se présentaient lorsque la concentration du chlordécone dans le sang excède les 0,2 mg/L. Des biopsies de muscles squelettiques et des nerfs ont montré une diminution du nombre des axones non myélinisés et une perturbation du métabolisme des cellules de Schwann (Martinez et al. 1978). De même des hypertensions intracrâniennes ont été reportées chez des ouvriers qui présentaient des céphalées. La sévérité de ces troubles au niveau du système nerveux était dose-dépendante. Certains travailleurs présentaient d'autres symptômes gênants comme des éruptions cutanées qui apparaissaient à certaines périodes de leur exposition au chlordécone.

Le chlordécone qui s'accumule préférentiellement dans le foie, produisait chez les sujets testés une hépatomégalie. Des biopsies de foie, chez ces sujets, ont montré une prolifération du réticulum

endoplasmique lisse. Les mesures des transaminases hépatiques n'ont pas révélé de perturbations à ce niveau, ce qui témoigne d'aucune atteinte des cellules hépatiques et ensuite une absence des processus de nécrose ou de fibrose hépatique (Guzelian et al. 1980).

Même si les effets majeurs du chlordécone se concentraient sur le système nerveux et le foie, les travailleurs de Hopewell présentaient des toxicités au niveau d'autres organes. Certains ouvriers présentaient une splénomégalie, d'autres avaient des troubles de la reproduction. En effet, l'exposition au chlordécone provoquait une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes, sans avoir des effets sur la fertilité (Guzelian 1982; Taylor et al. 1978).

Même si la contamination à Hopewell n'a pas causé des morts directs, son impact sur la vie quotidienne et future des travailleurs a pu être important. Pour vérifier le changement avec le temps de l'état des exposés au chlordécone, 11 ouvriers ont été suivis sur une période de 10 ans. Cette étude a montré qu'une fois l'exposition au chlordécone arrêtée, les ouvriers pouvaient retrouver une santé normale, avec une disparition de tous les symptômes préalablement observés (Guzelian 1992). L'intoxication accidentelle des ouvriers de l'usine de Hopewell a été un événement important dans la prise au sérieux des effets nuisibles du chlordécone sur la santé. Même si, en premier temps, ces problèmes de santé humaine ont été négligés, pour poursuivre l'utilisation de la molécule, les études faites chez les ouvriers contaminés ont constitué des pistes importantes pour explorer l'effet chronique du chlordécone.

Les habitants des Antilles françaises présentent le cas d'une contamination chronique au chlordécone. La persistance de la molécule dans l'environnement antillais engendre une exposition continue de la population à ce pesticide. Le dosage du chlordécone dans le sang des antillais témoigne de cette contamination (Tableau 2). Aux Antilles françaises, le syndrome de Kepone, retrouvé chez les ouvriers de Hopewell, n'a pas été reporté jusqu'aujourd'hui. Ceci est sûrement dû au fait qu'aux Antilles, l'exposition au chlordécone est plus faible, ce qui ne permet pas de trouver, dans le sang, la quantité de chlordécone nécessaire pour engendrer ces symptômes.

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées aux Antilles pour mettre en évidence le taux de contamination et ses impacts sur la santé de la population antillaise. « Timoun » est une étude épidémiologique qui a été réalisée et se poursuit encore, en Guadeloupe, sur une cohorte mère-enfant afin de vérifier l'impact d'une exposition au chlordécone sur la grossesse et sur le développement des enfants. Le chlordécone a été retrouvé dans le sang de 88% des femmes enceintes de la cohorte avec une moyenne de 0,39 µg/L. La durée de grossesse et le risque de naissance prématurée ont été vérifiés sur ces femmes (Kadhel et al. 2014). Les résultats de cette étude ont montré que l'augmentation du taux de chlordécone dans le sang est associée à une diminution du temps de grossesse et une

augmentation du risque de naissance prématurée. Le chlordécone est considéré comme un perturbateur endocrinien et peut se lier aux récepteurs oestrogéniques, cette propriété peut être à l'origine de ses effets sur la grossesse (Hammond et al. 1979). Une autre étude a été faite sur cette même cohorte pour examiner l'impact de l'exposition pré- et postnatale au chlordécone sur le développement et la croissance des enfants. Cette étude a montré que l'exposition au chlordécone est associée à des problèmes de croissance chez les enfants touchant principalement les filles avec une diminution de taille qui pourra affecter leur indice de masse corporelle (Costet et al. 2015). De même l'exposition prénatale au chlordécone augmentait le taux de TSH (Thyroïde Stimulating Hormone) chez les garçons et celle postnatale augmentait le niveau des hormones thyroïdiennes T4 chez les filles (Cordier et al. 2015).

La persistance du chlordécone aux Antilles françaises et ses différents effets aigus sur la santé peuvent souligner la question sur son rôle dans les maladies chroniques qui se développent sur plusieurs années, notamment les cancers. Des études sur les rongeurs ont montré que le chlordécone peut être à l'origine des cancers hépatiques et donc il est classé comme carcinogène potentiel (Reuber 1979). En effet, le cancer le plus répandu chez les hommes aux Antilles est le cancer de prostate, pour cela une étude a été menée pour chercher une relation potentielle entre l'exposition au chlordécone et l'incidence d'un cancer de prostate. Effectivement, une corrélation positive a été mise en évidence avec un risque plus grand de développer un cancer de prostate lorsque la concentration sanguine du chlordécone augmente (Multigner et al. 2010).

Le chlordécone pourrait avoir beaucoup plus d'effets chroniques sur la santé humaine, mais il faut réaliser des études épidémiologiques qui sont difficiles et longues à mettre en place. L'étude de son effet sur les hépatites chroniques et les maladies neurologiques chez l'Homme peut être des pistes de recherche intéressantes.

Population	Âge	Période	Effectifs	Limite de détection (µg/L)	% de valeurs > LDD***	Distribution (µg/L)				
						Minimum	p25	p50	p75	Maximum
Hommes										
Ensemble			100		88	< LDD	3,3	5,2	9,3	104,5
dont salariés agricoles de la banane*	20-45	1999-2001	42	1,50	90	< LDD	4,3	6,3	17,1	104,5
dont salariés hors secteur agricole			45		91	< LDD	2,3	5,5	9,0	24,3
Ensemble (Étude Karuprostate)										
dont travailleurs agricoles de la banane*	45-90	2004-2007	66	0,25	79	< LDD	0,3	1,0	2,3	49,1
dont travailleurs hors secteur agricole			406		65	< LDD	0,3	0,5	1,3	44,4
Femmes enceintes										
Ensemble (Étude Hibiscus)	17-45	2003	112	0,50	87	< LDD	1,2	2,2	3,9	16,6
Ensemble (Étude Timoun)	17-46	2004-2007	371	0,25	62	< LDD	< LDD	0,4	0,9	19,3
Nouveau-nés										
Ensemble (Étude Hibiscus)	0**	2003	109	0,50	61	< LDD	< LDD	0,7	1,2	3,7
Ensemble (Étude Timoun)	0**	2004-2007	265	0,25	28	< LDD	< LDD	< LD	0,3	22,9

* Exclusivement activité agricole dans la culture bananière; ** À la naissance; *** Limite de détection de la méthode analytique.

Table 2. Exposition de la population antillaise au chlordécone. Les résultats représentés dans ce tableau sont issus de trois études épidémiologiques, l'étude Karuprostate, l'étude Hibiscus et l'étude Timoun. Pour chaque groupe de population étudié, l'âge des sujets, la période de réalisation des prélèvements, le nombre de sujets (Effectifs), la limite de détection (LDD), le pourcentage des valeurs au-dessus de la limite de détection et la distribution des concentrations du chlordécone dans le sang, ont été déterminés. p25, p50 et p75 correspondent respectivement au 25^{ème} percentile, 50^{ème} percentile et 75^{ème} percentile. (Guldner et al. 2011)

3.5. Toxicité et toxicocinétique du chlordécone

3.5.1. Absorption

La voie d'absorption majoritaire du chlordécone est l'ingestion. La contamination continue de la population antillaise, jusqu'à nos jours, par ce pesticide provient essentiellement de l'ingestion alimentaire contaminée dans cette région. Des études sur des rats ont validé cette voie d'absorption qui se révèle principale. Des études sur des rats gavés avec du chlordécone marqué au carbone 14, ont montré que 90% de la quantité gavée du chlordécone était bien absorbée par le tube digestif (Egle et al. 1978).

Bien que, la contamination des travailleurs de l'usine de Hopewell, témoigne de l'absorption du chlordécone par voie respiratoire (Taylor 1982; Cohn et al. 1978; Cannon et al. 1978), les symptômes cliniques observés étaient plus importantes chez les personnes qui travaillaient à la production de la molécule. Les quantités les plus élevées du chlordécone étaient détectées dans le sang des travailleurs qui présentaient des symptômes neurologiques, des quantités moins élevées chez ceux qui n'avaient

pas de symptômes de maladies et les quantités les plus basses étaient retrouvés chez les résidents des alentours de l'usine de fabrication (Cannon et al. 1978). Donc la contamination par inhalation du chlordécone est possible à condition d'une exposition excessive à des concentrations élevées de chlordécone.

La voie cutanée d'absorption est aussi possible mais limitée (Shah et al. 1987; Heatherington et al. 1998). Les études sur des rats ont montré que cette voie d'absorption dépend de la dose et du temps d'application du chlordécone. A des doses élevées, l'absorption du chlordécone était moins que celle à des doses plus petites. De même, le prolongement du temps d'exposition de la peau au chlordécone augmente le taux d'absorption de cette molécule.

3.5.2. Distribution

Après son absorption, le chlordécone se distribue dans plusieurs tissus de l'organisme. Suite à la catastrophe de Hopewell, le chlordécone a été retrouvé en grande quantité dans le foie, le sang et le tissu adipeux des travailleurs exposés. Le chlordécone a été également retrouvé en moindre quantité au niveau de la bile et de la vésicule biliaire, au niveau des muscles, de la salive, de l'urine, du liquide céphalo-rachidien et d'autres (Cohn et al. 1978). Cette distribution se fait préférentiellement dans le foie avec un rapport de concentration de 15/1 dans le foie par rapport au sang. Les études chez les rats ont de même montré que le chlordécone est accumulé principalement dans le foie (Belfiore et al. 2007; Hewitt et al. 1986; Plaa et al. 1987) suivi du tissu adipeux et des reins, après absorption par voie orale ou cutanée (Heatherington et al. 1998).

Le cerveau des souris accumule également le chlordécone suite à une dose unique ou répétitive (Fujimori et al. 1982; Wang et al. 1981; Fujimori et al. 1986). Cette accumulation se fait préférentiellement dans la moelle et le striatum au niveau desquelles les quantités de chlordécone sont beaucoup plus importantes qu'au niveau du cervelet, du cortex cérébral et du mésencéphale (Fujimori et al. 1982).

Le chlordécone est également distribué au niveau du système reproducteur mâle (Simon et al. 1986) et des études chez des rats femelles ont montré qu'il franchit la barrière placentaire pour atteindre les tissus du fœtus, et du chlordécone a été mesuré dans le lait maternel (Kavlock, RJ; Chemoff, N; Rogers 1980). Cette propriété a également été validée dans des études chez l'Homme.

3.5.3. Métabolisme

Au niveau hépatique, le chlordécone se métabolise par hydratation suivie d'une conjugaison à l'acide glucuronique (Figure 11). Chez l'Homme et certains animaux comme les lapins et les gerbilles, il est réduit en chlordécone alcool, chlordécanol, sous l'action d'une enzyme aldo-céto réductase, la chlordécone réductase qui est absente chez les rongeurs (Fariss et al. 1980; Blanke et al. 1978; Houston et al. 1981; Molowa et al. 1986). Le chlordécanol se retrouve dans la bile sous forme conjuguée, tandis que le chlordécone se retrouve sous forme non conjuguée.

Le chlordécone induit le système enzymatique des cytochromes P450. L'augmentation de l'activité des cytochromes P450 a été montrée chez des rats de sexe mâle ou femelle (Mehendale et al. 1977; Mehendale et al. 1978). La NADPH cytochrome c réductase est également augmentée et le cyp2b2 est principalement induit par l'exposition à ce pesticide (Kocarek et al. 1994).

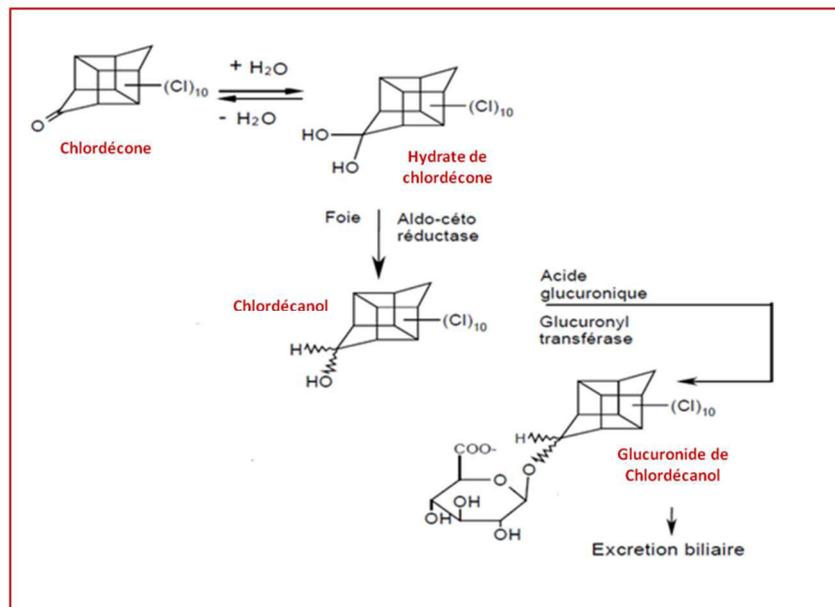


Figure 11. Métabolisme du chlordécone

3.5.4. Elimination

Le chlordécone a une demi-vie sanguine moyenne de 165 jours chez l'Homme et de deux mois chez les rongeurs. Son élimination du corps se fait principalement dans les fèces par voie biliaire. Des études menées sur des travailleurs exposés au chlordécone ont montré que leur bile contenait 19 fois plus de chlordécone que leurs fèces, ce qui explique l'élimination trop lente du chlordécone, du fait qu'une grande partie du chlordécone regagne la bile par le cycle entéro-hépatique (Cohn et al. 1978).

Dans la sueur, le chlordécone n'est pas détectable tandis que de très petites quantités peuvent être éliminées dans les urines. La salive aussi peut être une voie possible d'excrétion du chlordécone. Des études chez les rats ont montré que le chlordécone arrive au niveau de la salive par diffusion passive et ne s'accumule pas dans les glandes salivaires (Borzelleca & Skalsky 1980; Skalsky et al. 1980).

3.6. Etudes toxicologiques et mécanismes d'action

Les effets du chlordécone observés chez l'Homme ont été examinés dans des études toxicologiques chez l'animal pour pouvoir déterminer ses mécanismes d'action dans les différents organes sur lesquels il agit. Les effets observés suite à l'intoxication aigue de Hopewell sont aussi retrouvés chez les animaux avec une neurotoxicité, une oligospermie, des lésions rénales et des troubles hépatiques. Par la suite, les études ont ciblé principalement le foie, le système nerveux et le système reproducteur.

3.6.1. Au niveau du foie

Le chlordécone a une forte affinité à des protéines sanguines tels que l'albumine et les lipoprotéines de haut poids moléculaires (HDL), ce qui explique sa forte accumulation au niveau des cellules hépatiques (Soine et al. 1982). Comme chez l'Homme, les études toxicologiques chez l'animal ont montré une hépatomégalie avec prolifération du réticulum endoplasmique lisse et une induction de l'activité enzymatique des cytochromes P450.

L'accumulation excessive du chlordécone dans le foie, suggère une certaine toxicité vis-à-vis de ce tissu. En fait, le chlordécone induit au niveau hépatique une perturbation de l'homéostasie du cholestérol. En présence de ce pesticide, le pourcentage du cholestérol hépatique diminue fortement dû à l'augmentation de son transport par les sels biliaires (Lee, Scheri & Curtis 2008). Le chlordécone est un agoniste des récepteurs nucléaires, PXR (Pregnane X Receptor) et ER (Estrogen Receptor) (Lee, Scheri, Zhang, et al. 2008), de ce fait il peut moduler le métabolisme du cholestérol en augmentant l'expression de la protéine Apo A1 qui va permettre le recrutement du cholestérol-HDL au niveau du foie.

L'activation des PXR par le chlordécone peut de même moduler l'activité des transporteurs hépatiques biliaires. Il se trouve que le chlordécone bloque les transporteurs hépatobiliaires, MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) et BCRP (breast cancer resistance protein) ce qui entraîne une inhibition de l'efflux biliaire (Bucher et al. 2014).

L'activité des enzymes de détoxification du foie est de même induite par l'exposition et l'accumulation hépatique du chlordécone. Les Cyp2B1 et 2B2 sont particulièrement induites (Kocarek et al. 1994). D'autres cytochromes P450 tels que le Cyp3A4 et le Cyp2B6 pourraient être induits par le chlordécone étant donné leur régulation par le PXR (Lemaire et al. 2004).

3.6.2. Au niveau du système nerveux

Les symptômes observés chez l'Homme lors d'une intoxication au chlordécone, notamment, le syndrome de Kepone ou « Kepone shake syndrome », ont été, pour une grande partie causés par des atteintes du système nerveux central. De ce fait, les études menées chez l'animal ont été importantes pour comprendre l'effet neurologique du chlordécone. Comme chez l'Homme, des études chez l'animal ont montré que les tremblements des membres étaient le symptôme le plus observé lors des intoxications au chlordécone. De même, des études chez le rat ont montré qu'une exposition néonatale au chlordécone engendrait une neurotoxicité et des altérations neurocomportementales (Mactutus & Tilson 1984; Mactutus et al. 1984; Rosecrans et al. 1982). De ce fait, plusieurs études se sont intéressées à la mécanistique et à l'aspect moléculaire de ces effets neurologiques. Les tremblements des membres ont été associés aux taux des neurotransmetteurs cérébraux dopaminergiques et noradrénergiques (Desaiah 1982; Desaiah 1985). Certaines études témoignaient de la diminution du neurotransmetteur GABA (Gandolfi et al. 1984) et de l'inhibition de son activité, d'autres montraient une diminution de la dopamine (Ho et al. 1981). Ce mécanisme n'est pas certain vu les résultats contradictoires des études menées mais ce qui est probable, c'est qu'il y a un changement au niveau des quantités des récepteurs aux neurotransmetteurs. A un niveau plus cellulaire, le chlordécone a été associé à une perturbation de l'homéostasie calcique et des ATPases du système nerveux central. Suite aux traitements avec le chlordécone, il y a inhibition, d'une part, de la Mg^{+} -ATPase mitochondriale ce qui entraîne une augmentation du calcium cytosolique favorisant ainsi la sécrétion des neurotransmetteurs et d'autre part, de la Na^{+}/K^{+} ATPase du cerveau qui est plus sensible au chlordécone que dans d'autres tissus (Desaiah 1981; End et al. 1981).

3.6.3. Au niveau des fonctions de la reproduction

Les effets toxiques du chlordécone sur le système reproducteur mâle étaient représentés principalement par une diminution de la mobilité et du nombre des spermatozoïdes. Ces effets étaient réversibles chez l'homme une fois l'exposition arrêtée. Des études chez l'animal ont recherché cet effet et ont conclu que lors d'une exposition au chlordécone, il y a une diminution de la mobilité, de la viabilité et de la réserve de spermatozoïdes dans l'épididyme. Une atrophie testiculaire parvient de même pour des

doses élevées de chlordécone (Larson et al. 1979; Linder et al. 1983). Les souris femelles présentaient une atrésie des ovaires avec diminution de taux de LH (hormone lutéinisante) et altération du cycle œstral amenant à des troubles de la fertilité (Ali et al. 1982; Eroschenko 1981). Le chlordécone comme perturbateur endocrinien, ne se comporte pas toujours comme agoniste du récepteur de l'œstradiol. Des études ont montré qu'il se lie aux deux récepteurs de l'œstradiol, ER α et ER β , en se comportant comme agoniste sur le premier et antagoniste sur le deuxième (Lemaire et al. 2006). Le chlordécone peut de même se lier aux récepteurs d'androgènes et de progestérone (Scippo et al. 2004).

3.6.4. Au niveau du système immunitaire

L'effet du chlordécone sur l'immunité a été étudié chez des souris (NZB \times NZW) F1 susceptibles à une maladie auto-immune, le lupus érythémateux disséminé. Cette maladie chronique peut évoluer sous l'effet de l'œstradiol et de la prolactine. Effectivement, les études ont montré l'accélération de l'évolution de cette maladie sous l'effet du chlordécone suggérant un impact de celui-ci sur les maladies auto-immunes (Sobel et al. 2006). L'effet du chlordécone sur l'immunité n'a pas été étudié chez l'Homme mais plusieurs études chez les rongeurs ont essayé de comprendre son impact. Certaines études ont mentionné une diminution de poids du thymus avec une diminution du nombre des cellules NK dans la rate et des diminutions du nombre des leucocytes et des neutrophiles. Ces études ont été faites avec des doses très toxiques qui entraînaient des grandes pertes de poids chez les animaux. Pour cela, il est difficile de conclure à un vrai effet du chlordécone sur l'immunité (Smialowicz et al. 1985). D'autres études ont montré que le chlordécone active les lymphocytes B de la rate et augmente l'expression des protéines GL7, CXCR4 et CXCR5 et les protéines d'adhésion VCAM-1.

3.6.5. Effets cancérigènes

Le chlordécone n'est ni mutagène ni génotoxique, mais il peut être considéré comme un promoteur de cancérogenèse. Les tumeurs trouvées chez les souris et les rats étaient exclusivement dans le foie (Sirica et al. 1989; NCI 1976).

3.6.6. Divers effets

Dans les études chroniques sur l'exposition au chlordécone chez les rongeurs, un effet sur les reins a été observé. Les animaux traités présentaient une protéinurie avec une glomérulosclérose rénale. D'autres effets ont été observés chez les animaux notamment une faiblesse musculaire et une anémie.

3.7. Valeurs toxicologiques de référence VTR

Etant donné les différents effets du chlordécone sur la santé lors des expositions aiguës et chroniques, des valeurs d'exposition ont été définies pour limiter ces effets. La limite d'exposition aiguë à ne pas dépasser est de 10 µg/Kg/jour. Cette limite est précisée en prenant en considération les effets neurologiques et reproducteurs, tandis que la limite d'exposition chronique est établie à 0,5 µg/Kg/jour en prenant compte des effets rénaux.

3.8. Interactions avec d'autres substances

Le chlordécone est connu pour sa capacité à interagir avec d'autres molécules. Différents toxiques chimiques et substances pharmacologiques ont été étudiés pour leur interaction avec le chlordécone. Plusieurs molécules pharmacologiques testées chez les rats (Gerhart et al. 1985; Herr et al. 1987), sont capables d'inhiber les tremblements causés par le chlordécone. Parmi ces molécules, le muscimol, un agoniste GABAnergique, le phénoxybenzamine qui est un antagoniste α -noradrénergique, le DFMO et la choléstyramine. Les patients qui prennent du difluorométhylomithine (DFMO) pour le traitement d'un cancer ne présenteront pas les tremblements neurologiques s'ils sont exposés au chlordécone puisque ces tremblements seront inhibés par le DFMO (Tilson et al. 1986). De même pour les patients qui prennent de la choléstyramine pour régler leurs taux plasmatiques de cholestérol. Cette molécule sert comme chélateur de chlordécone qui va agir au niveau de l'intestin pour empêcher la réabsorption du chlordécone par le cycle entéro-hépatique (Cohn et al. 1978; Boylan et al. 1978). Par contre, le quipazine, qui est un agoniste sérotoninergique, augmente les tremblements induits par le chlordécone. Par exemple, les patients traités avec le Prozac (médicament à base de floxetine) pour des problèmes de dépression, peuvent présenter des tremblements neurologiques importants, si ils sont exposés au chlordécone (Gerhart et al. 1983).

L'acétaminophène, ou plus couramment le paracétamol, le médicament le plus utilisé en France fait partie des molécules testées. En effet, le métabolisme de l'acétaminophène, produit des métabolites réactifs induisant une toxicité et des nécroses hépatiques, sous l'action des enzymes de détoxification, notamment le CYP2E1 et le CYP3A4. Le chlordécone augmente la toxicité induite par l'acétaminophène en augmentant l'activité enzymatique des cytochromes impliqués (Fouse & Hodgson 1987).

L'interaction du chlordécone avec des toxiques chimiques a été aussi étudiée comme sur les halométhanes dont le chloroforme (Iijima et al. 1983; Cianflone et al. 1980), le bromotrichlorométhane

(Agarwal & Mehendale 1982; Faroon et al. 1991; Klingensmith & Mehendale 1981) et le tétrachlorure de carbone (Agarwal & Mehendale 1983; Klingensmith et al. 1983; Klingensmith & Mehendale 1982). L'effet hépatotoxique aigu de ces trois toxiques est fortement potentialisé par le chlordécone. Beaucoup de travaux ont étudié le mécanisme de cette potentialisation, notamment dans le cas du CCl₄. Le chlordécone potentialise les effets hépatotoxiques du CCl₄ en augmentant sa biotransformation en métabolites toxiques d'une part, et en inhibant la régénération des hépatocytes lésés d'autre part. L'inhibition de la régénération hépatique est accompagnée par un manque d'ATP, une diminution du taux de glycogène et une perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire (Agarwal & Mehendale 1984; Bell & Mehendale 1987; Chaudhury & Mehendale 1991; Hegarty et al. 1986; Klingensmith & Mehendale 1983).

3.9. Récapitulatif des mécanismes d'action

Etant donné son large panel de distribution dans l'organisme, le chlordécone peut agir sur différentes cibles. Dans le foie, il perturbe le transport biliaire en bloquant certains transporteurs, il perturbe le métabolisme lipidique et induit les cytochromes P450, qui sont des enzymes de détoxification, ce qui le rend potentialisateur de l'effet toxique de plusieurs molécules. En tant que perturbateur endocrinien, le chlordécone se lie sur les récepteurs de l'œstradiol pour moduler le système reproducteur. Dans le cerveau, le chlordécone bloque des ATPases mitochondriales perturbant ainsi l'homéostasie calcique ce qui peut expliquer les convulsions et les tremblements observés chez l'Homme et les rongeurs. Le chlordécone est cancérigène chez le rongeur et cancérigène potentiel chez l'Homme. Le chlordécone peut moduler aussi le système immunitaire, mais les mécanismes engendrés restent à découvrir.

II. Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse, était d'étudier l'impact du chlordécone sur l'évolution des hépatites. Le chlordécone est un pesticide organochloré persistant ayant un potentiel élevé de bioaccumulation. Après son entrée dans l'organisme, il se distribue dans plusieurs compartiments tissulaires dont le tissu adipeux, le cerveau, les testicules et les reins (Egle et al. 1978). Sa liaison aux lipoprotéines sanguines (HDL), favorise son accumulation importante dans le foie. Puisque le foie est impliqué dans le processus de détoxification, il est exposé à différentes molécules qui peuvent, soit être hépatotoxiques par elles-mêmes, soit interagir entre elles pour induire une hépatotoxicité. Des études ont montré que le chlordécone n'est pas hépatotoxique à faibles doses mais il a un pouvoir important de potentialiser les effets hépatotoxiques d'autres molécules médicamenteuses ou toxiques, telles que l'acétaminophène (Paracétamol) et le tétrachlorure de carbone.

Dans la première partie de notre travail, nous avons voulu étudier l'impact du chlordécone sur des hépatites aiguës courantes chez l'Homme, telles que l'hépatite alcoolique, l'hépatite auto-immune et l'hépatite virale. Nous avons développé trois modèles murins de co-exposition au chlordécone et à des agents induisant ces hépatites. Dans le premier modèle, les souris prétraitées au chlordécone, ont été soumises à un régime alimentaire liquide contenant 5% d'alcool (Lieber-DeCarli) suivi d'un gavage avec une dose importante d'alcool de façon à reproduire l'effet « Binge drinking ». Ce protocole en effet peut mimer, chez l'Homme, une consommation régulière et modérée d'alcool avec une prise occasionnelle de plus fortes doses. Le deuxième modèle mis au point et étudié est le modèle d'hépatite auto-immune aiguë induite par la Concanavaleine A (Con A). Les souris pré-exposées au chlordécone ont reçu une dose unique de Con A par voie retro-orbitale. Enfin pour le modèle d'hépatite virale aiguë, les souris ont été prétraitées avec le chlordécone, avant qu'elles soient infectées par une injection unique péritonéale de virus de l'hépatite murine MHV3. Dans ces trois modèles d'hépatite aiguë, l'impact du chlordécone sur l'évolution de la maladie a été évalué par le dosage des transaminases hépatiques dans le sérum des souris et l'analyse histologique des foies. En plus, une étude phénotypique des cellules immunitaires hépatiques a été réalisée pour évaluer l'impact d'une exposition au chlordécone sur les cellules immunitaires hépatiques. Une évaluation de l'effet du chlordécone sur l'entrée du virus MHV3 dans le cerveau des souris a aussi été menée par PCR quantitative.

Il est connu que des intoxications chroniques par le chlordécone conduisent à l'apparition de tumeurs hépatiques chez les rongeurs. C'est pourquoi, le chlordécone a été classé comme cancérigène chez les rongeurs et potentiel cancérigène chez l'Homme. L'intoxication chronique par le chlordécone à l'échelle d'une population humaine peut être étudiée dans la population des Antilles françaises, car l'ancienne utilisation du chlordécone dans l'agriculture des bananeraies dans la région antillaise a

entraîné une pollution environnementale importante qui persiste jusqu'au nos jours. La contamination de la chaîne alimentaire via le sol contaminé est la principale voie de contamination humaine dans cette région et la présence du chlordécone dans le sang des habitants des Antilles en témoigne. D'après des études épidémiologiques menées aux Antilles, le chlordécone a été associé à un risque important de développement d'un cancer de prostate (cohorte « Karuprostate ») et de troubles de la grossesse et du développement chez l'enfant (cohorte « Timoun »). Comme rappelé, l'accumulation du chlordécone dans le foie comme principal lieu de stockage, conduit à s'intéresser à l'importance que cette contamination pourrait jouer dans la survenue et l'évolution des maladies chroniques du foie telles que les hépatites chroniques.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons souhaité étudier l'impact du chlordécone sur l'évolution de la fibrose dans les hépatites chroniques. Nous avons mis en place, pour la première fois, un modèle murin chronique de co-exposition au chlordécone et au tétrachlorure de carbone, induisant une hépatite chronique fibrosante. Durant les 12 semaines de cette étude, les souris ont été gavées quotidiennement par le chlordécone, et une fois par semaine, par le CCl₄. A partir de la cinquième semaine de l'étude, l'évolution de l'hépatite chronique induite par le CCl₄, a été évaluée par le dosage des transaminases hépatiques dans le sérum des souris, ainsi que par l'analyse histologique des foies. La progression de la fibrose hépatique a été étudiée par la quantification des dépôts de collagène dans les foies de souris. Deux approches ont été utilisées pour cette étude, la première est celle d'une coloration au rouge Sirius des coupes de foies et la deuxième est une étude, en microscopie optique, par génération du second harmonique (SHG). Le niveau d'expression des gènes associés à la fibrose (Col1A2, TIMP-1, MMP-2, PAI-1) a été étudié par PCR quantitative. Enfin, le niveau d'expression de la protéine α -SMA, dans les foies, a été étudié par immunohistochimie.

III. Résultats

Article I

Le chlordécone impacte les hépatites aiguës murines induites par la Concanavaline A et le virus MVH3 mais peu par l'alcool.

Elise Tabet, Moana Gelu-Simeon, Valentine Genet, Catherine Lucas-Clerc, Claire Piquet-Pellorce et Michel Samson.

Manuscrit en préparation

Le chlordécone impacte les hépatites aiguës murines induites par la Concanavaline A et le virus MHV3 mais peu par l'alcool.

Elise Tabet^{1,2,3}, Moana Gelu-Simeon^{1,5}, Valentine Genet^{1,2,3}, Catherine Lucas-Clerc^{2,4}, Claire Piquet-Pellorce^{1,2,3} and Michel Samson^{1,2,3}.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U.1085, Institut de Recherche Santé Environnement et Travail (IRSET), F-35043 Rennes, France.

² Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France.

³ Structure Fédérative BioSit UMS 3480 CNRS-US18 Inserm, F-35043 Rennes, France.

⁴ Service de Biochimie CHU Rennes, Université de Rennes 1; F-35043 Rennes, France.

⁵ Service d'Hépatogastroentérologie CHU Pointe à Pitre; F-97159 Pointe à Pitre Cedex, France.

Résumé

Le chlordécone est un polluant organochloré qui cible principalement le foie où il s'accumule entraînant une hépatomégalie. Administré à de faibles doses, il ne se révèle pas hépatotoxique par lui-même mais est capable de potentialiser l'hépatotoxicité d'autres molécules toxiques ou médicamenteuses. Nous avons étudié l'impact du chlordécone sur l'évolution des hépatites aiguës en développant des modèles murins de co-exposition au chlordécone et à différents agents tels que l'alcool, la Concanavaline A (Con A) et le virus de l'hépatite murine (MHV3). Nous avons examiné l'évolution de ces différents types d'hépatite par le dosage des transaminases hépatiques dans le sérum ainsi que par l'analyse histologique des foies. Nous avons montré que le chlordécone sensibilise les foies de souris à la toxicité de l'alcool, il amplifie l'hépatite auto-immune induite par la Con A, et accélère la mort des souris induite par le virus MHV3. Nous avons étudié le profil immunitaire hépatique des souris exposées au chlordécone par cytométrie en flux et nous avons montré que le chlordécone augmente de deux fois le nombre de cellules NKT dans le foie. Enfin, l'analyse du niveau d'expression du virus MHV3 par PCR quantitative, a montré que le chlordécone favorise l'entrée des virus dans les cerveaux des souris infectées entraînant ainsi une atteinte neurologique plus importante. En conclusion, le chlordécone joue un rôle dans la potentialisation des hépatites aiguës de différentes étiologies ainsi que dans l'atteinte cérébrale par les virus neurotropes.

1. Introduction

Le foie est un organe vital soumis à différents types d'agressions : chimiques (xénobiotiques ou médicamenteuses), virales ou parasitaires. Il peut être aussi soumis à des stress métaboliques comme l'abus d'alcool ou une alimentation quotidienne trop riche. Ces différents types de stress se traduisent, si ils sont répétés sur une longue période, par une apparition d'une mort cellulaire des hépatocytes, une inflammation, une cicatrisation du tissu, appelée fibrose, et qui peut aboutir à une perte de la fonctionnalité du foie ou à l'apparition de cancer du foie. Parmi les xénobiotiques impactant le foie, le chlordécone induit une hépatomégalie que cela soit chez l'Homme ou chez les animaux dans des études toxicologiques (Guzelian 1982; Egle et al. 1978). Le chlordécone est un composé chimique organochloré considéré comme polluant persistant de l'environnement qui était utilisé principalement à des fins agricoles. Sa fabrication et son utilisation ont entraîné des fortes contaminations, notamment aux Etats Unis et aux Antilles françaises qui ont touché l'environnement et l'Homme. Les personnes contaminées par ce pesticide, présentaient des signes d'atteintes neurologiques qui se manifestaient par des convulsions, de l'excitabilité et des tremblements de membres (Cannon et al. 1978; Taylor et al. 1978). Ces mêmes effets ont été retrouvés dans des études chez les rongeurs (Huang et al. 1981). Le foie est l'organe le plus ciblé par le chlordécone où il s'accumule de façon excessive puisqu'il a la capacité de se lier aux lipoprotéines plasmatiques responsables du transport du cholestérol vers le foie, les HDL (Soine et al. 1982; Skalsky et al. 1979). Le rôle que joue le foie dans la détoxification des molécules, fait de lui une cible principale de leur toxicité. Des études ont montré que le chlordécone interagit avec certaines molécules pour potentialiser leur hépatotoxicité, comme c'est le cas pour le chloroforme (Iijima et al. 1983), l'acétaminophène (Fouse & Hodgson 1987) et pour le tétrachlorure de carbone (CCl₄) (Klingensmith & Mehendale 1982; Klingensmith et al. 1983).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact du chlordécone au cours d'hépatites aiguës de différentes étiologies, qui sont à l'origine des hépatites les plus courantes chez l'Homme, comme les hépatites induites par les agents viraux, les maladies auto-immunes du foie ou les maladies métaboliques dues à la consommation excessive d'alcool. Ainsi, nous avons développé des modèles murins d'hépatites aiguës de co-exposition au chlordécone et à des agents hépatotoxiques, l'alcool (Bondy 1992) pour les agents toxiques d'origine chimique, la Concanavaline A pour induire une hépatite auto-immune (Tiegs et al. 1992) et le virus murin MHV3 pour induire une hépatite fulminante virale (Martin et al. 1994).

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux et protocoles expérimentaux

Les souris utilisées sont des souris C57Bl/6 âgées de 8 semaines et qui proviennent de l'élevage Janvier (Le Genest sur-Isle, France). Elles ont été élevées dans des conditions spécifiques sans organisme pathogène (SPF) à l'animalerie locale selon les lois françaises et les directives institutionnelles pour la gestion et l'entretien des animaux de laboratoire (Accréditation de M. Samson #3596). Les souris ont été réparties d'une façon aléatoire en plusieurs groupes selon la nécessité des études. Celles traitées au chlordécone (Santa Cruz Biotechnology) ont reçu des doses quotidiennes de 5mg/Kg dilué dans l'huile d'olive. Les souris contrôles ont reçu des gavages à l'huile d'olive seule.

Pour le modèle de co-exposition chlordécone-Alcool, les groupes exposés aux différents traitements se composaient de 7 souris par groupe. Dans cette étude, les souris ont reçu un gavage quotidien pendant 10 jours avec du chlordécone ou de l'huile. Elles ont été acclimatées pendant 5 jours à un régime liquide Lieber-DeCarli contrôle (Lieber-DeCarli '82 Shake and Pour control liquid diet, BioServ, produit numéro: F1259SP). Ensuite, les souris ont été divisées en 2 groupes; un groupe qui recevait un régime liquide contenant de l'alcool à 5 % (Lieber-DeCarli '82 Shake and Pour ethanol liquid diet (Bio-Serv, produit numéro: F1258SP) et un groupe contrôle qui continuait à recevoir le régime liquide contrôle pendant 10 jours. Neuf heures avant les sacrifices des souris, le premier groupe a reçu un gavage avec 3g/Kg d'alcool (Ethanol VWR 20821-310) et le deuxième groupe a reçu un gavage de maltose en quantité iso-calorique (Maltose dextrine, BioServ, 10DE, numéro: 3585).

Pour le modèle de co-exposition chlordécone-Concanavaline A (Con A), chaque lot de souris se composait de 10 sujets. Pour cette étude, les souris ont reçu un gavage quotidien pendant 10 jours avec du chlordécone ou de l'huile. Elles ont été injectées par voie rétro orbitale avec 12 mg/Kg de Con A (SIGMA C2010) ou du PBS et sacrifiées 10 heures après.

Pour le modèle de co-exposition chlordécone-MHV3, les souris ont reçu un gavage quotidien pendant 10 jours avec du chlordécone ou de l'huile. Elles ont été injectées chacune avec 1000 copies du virus MHV3 (fourni par le Prof. Lucie Lamontagne, UQAM, Université de Québec à Montréal) ou bien avec du PBS comme contrôle. Le sang des souris a été prélevé à 48h et à 72h après infection au moment du sacrifice. Pendant l'étude de survie, les souris ont été pesées quotidiennement, le matin et le soir, et leurs températures corporelles étaient mesurées. Dans cette étude, les groupes contrôles, chlordécone et huile, sont constitués de 5 souris par groupe. Les souris traitées au MHV3 étaient au nombre de 12 par lot et celles utilisées pour l'étude de la survie étaient au nombre de 15 par lot.

Durant toutes les études, les souris ont été bien observées, pesées régulièrement et leur sang était prélevé aux moments des sacrifices. Le taux des transaminases hépatiques ASAT et ALAT mesurés dans le sang ont été déterminés avec l'Olympus AU2700 Autoanalyser® (Olympus Optical Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan). Des sections des foies de souris prélevés ont été congelés à - 80°C ou fixés au paraformaldéhyde 4% pour être ensuite inclus dans de la paraffine.

2.2. Etudes histologiques des foies et PCR quantitatives

Les matériels et méthodes utilisés pour ces études sont expliqués dans la section « materials and methods » de l'article II. Les amorces de PCR quantitatives utilisées pour cette étude sont :

18S (forward: 5'CGCCGCTAGAGGTGAAATTC3', reverse: 5'ATGCACATCAATGTGGAGGA3'),

MHV3 (forward: 5'-TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3', reverse: 5'-TTTGGCCCACGGGATTG-3')

2.3. Analyse des cellules immunitaires par cytométrie en flux

Le foie est écrasé sur un filtre de 70 µm. Les cellules immunitaires sont ensuite isolées après sédimentation et fractionnement sur un gradient de Percoll à 35%. Les érythrocytes sont lysés avec un tampon ACK (ammonium-chloride-potassium). Pour exclure les cellules mortes de l'analyse, la suspension cellulaire est marquée pendant 30 min avec le marqueur LIVE/DEAD (Life technologies, L34959). Les cellules sont pré-incubées avec l'anticorps anti-CD16/32 (BD Pharmingen) pour bloquer les sites (reconnait le récepteur au fragment Fc) non spécifiques avant incubation avec les anticorps couplés aux fluorochromes (BD Pharmingen, eBioscience): anti-CD3-V500 (clone 500A2), anti-TCRβ-V450 (clone H57-597), anti-CD69-FITC (clone H1.2F3), anti-CD19-APC (clone 1D3), anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5 (clone PK136), anti-CD4-PE-Cy7 (clone RM4-5), anti-CD8-APC-Cy7 (clone 53-6.7). Les cellules marquées sont analysées sur le cytomètre en flux Aria II et le logiciel BD FACSDiva, les données sont ensuite analysées avec le logiciel CXP. Les doublets et les cellules mortes sont exclus respectivement sur une base taille/structure et par le marquage LIVE/DEAD. Le phénotypage immunitaire utilisé est : LT4 : CD3+/TCRVβ+/NK1.1-/CD4+ ; LT8 : CD3+/TCRVβ+/NK1.1-/CD8+ ; NKT: CD3+/ TCRVβ+/NK1.1+ ; NK: CD3-/NK1.1+ ; LB : CD19+/CD3- ; Macrophages : CD11b+/GR1^{int} ; Neutrophiles : CD11b+/GR1^{high}. Le marqueur CD69 est utilisé pour étudier l'activation des cellules lymphoïdes.

2.4. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne \pm l'écart-type. La différence entre les groupes de traitements a été évaluée par le logiciel GraphPad Prism5 en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Pour toutes les analyses statistiques, * indique que $p < 0,05$, ** indique que $p < 0,01$ et *** indique que $p < 0,001$.

3. Résultats

3.1. Impact du chlordécone sur l'hépatite aiguë induite par l'alcool

L'étude de l'impact du chlordécone sur l'évolution d'une hépatite aiguë induite par l'alcool n'avait à ce jour jamais été rapporté. Après un traitement journalier par gavage de 10 jours avec 5mg/Kg de chlordécone ou bien de l'huile (témoins), les souris ont été soumises à une alimentation liquide Lieber-DeCarli contenant 5% d'alcool ou du maltose en quantité iso-calorique (témoins), suivie d'une dose importante d'alcool (3g/kg) ou de maltose avant d'être sacrifiées 9h après (Annexe 1).

Une hépatomégalie a été observée chez toutes les souris traitées au chlordécone mais pas chez les souris témoins. La co-exposition, chlordécone et alcool, a augmenté significativement cette hépatomégalie par rapport aux traitements contrôles, chlordécone seul ou chlordécone et maltose (Figure 1A). Les différents traitements, reçus par les souris, n'ont pas induit des variations significatives des taux de transaminases hépatiques dans leur sérum, à l'exception du co-traitement chlordécone et alcool, qui a induit une forte augmentation des taux d'ASAT et d'ALAT chez 4 souris sur 7 (Figure 1B et 1C). Cependant, l'analyse histologique des foies n'a pas montrée d'importantes zones de nécrose au niveau du parenchyme hépatique de ces souris (Figure 1D).

Cette étude n'a pas permis de démontrer un effet potentialisateur majeur du chlordécone sur l'hépatite alcoolique, même si chez 4 souris sur 7, le chlordécone a sensibilisé les foies soumis à l'agression par l'alcool.

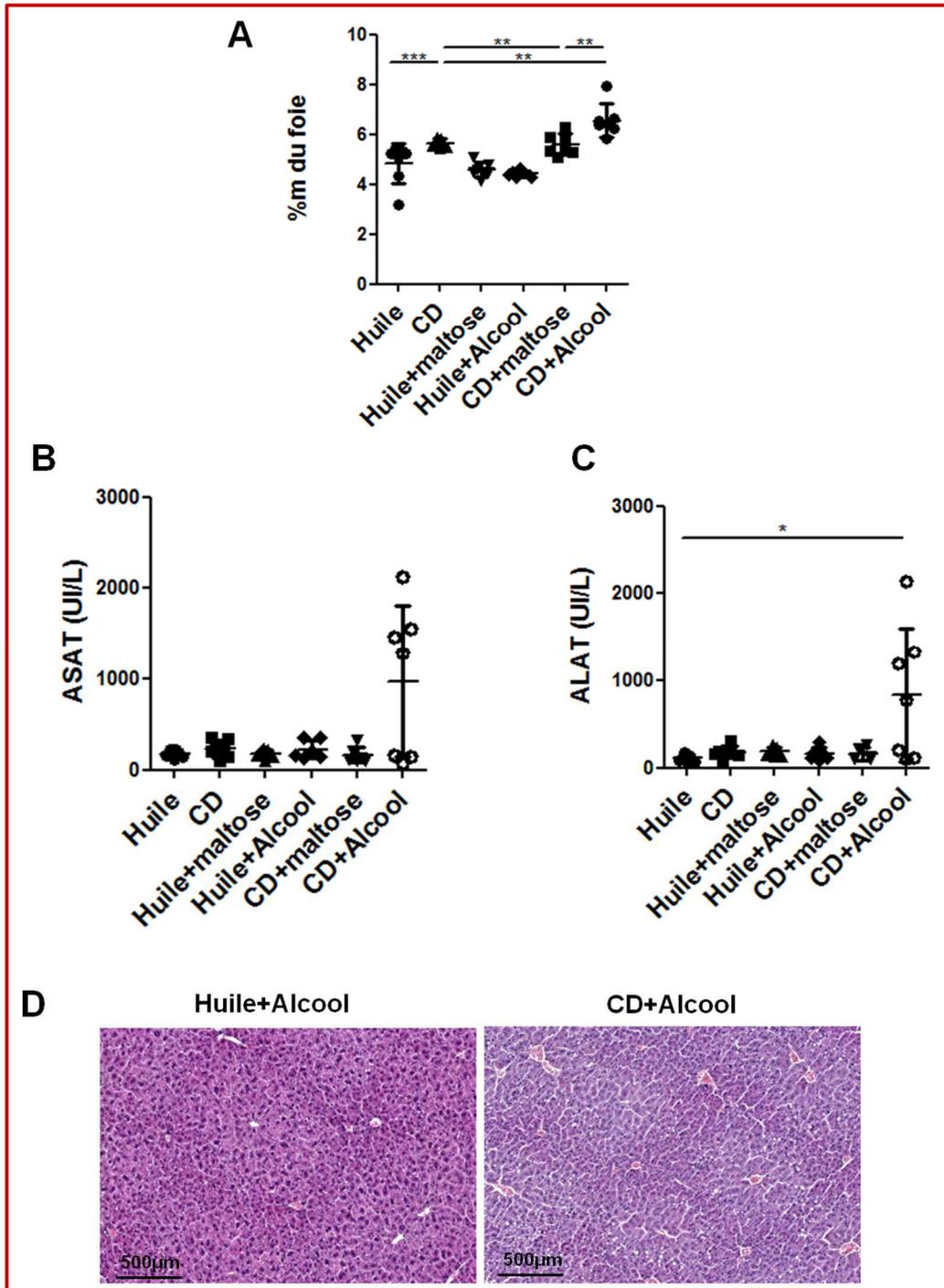


Figure 1. Effet du chlordécone sur l'hépatite aigue induite par l'alcool. Les souris ont reçu un prétraitement à l'huile ou à 5mg/Kg de chlordécone (CD) pendant 10 jours. Les souris ont ensuite été mises ou non à l'alcool selon le protocole de Lieber-DeCarli. A) Pourcentage massique du foie par rapport au poids de la souris. B) Taux d'ASAT dans le sérum des souris. C) Taux d'ALAT dans le sérum des souris. D) Coupes histologiques de foie de souris colorées à l'hématoxyline-éosine.

3.2. Impact du chlordécone sur un modèle d'hépatite aigue de type auto-immun chez la souris

L'effet du chlordécone sur les hépatites aigues auto-immunes a été étudié dans un modèle murin de co-exposition au chlordécone et à la Concanavaline A (ConA). Les souris ont reçu, pendant dix jours, des gavages quotidiens de 5mg/Kg de chlordécone, suivis d'une dose unique de 12mg/Kg de ConA administrée avant le sacrifice de 10 heures (Annexe 2A).

Une hépatomégalie a été induite par les gavages au chlordécone (Figure 2A). L'administration de la ConA a généré une élévation des taux d'ASAT (Figure 2B) et d'ALAT (Figure 2C) dans le sérum des souris avec une augmentation significative de ces derniers chez celles co-exposées au chlordécone. L'analyse histologique des coupes de foies montre des zones de nécroses plus importantes dans les foies des souris co-exposées au chlordécone et à la ConA que celles contrôles, Huile et ConA (Figure 2D). Ces résultats suggèrent que le chlordécone potentialise l'hépatite induite par ConA chez les souris.

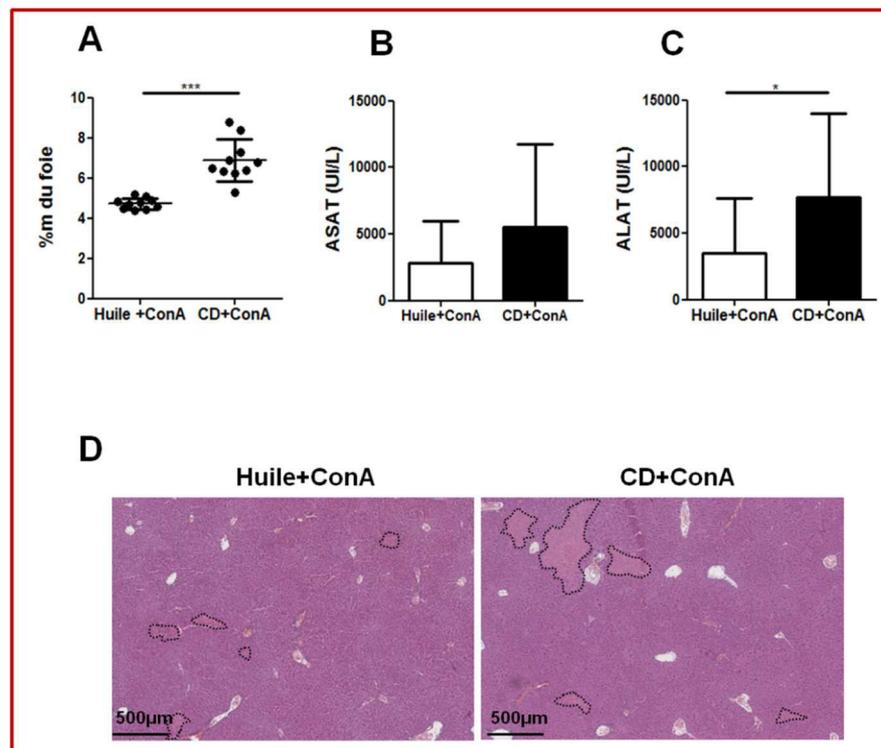


Figure 2. Effet du chlordécone sur l'hépatite aigue induite par la ConA. Les souris ont reçu un prétraitement à l'huile ou à 5mg/Kg de chlordécone (CD) pendant 10 jours. Elles ont reçu ensuite une administration de 12 mg/Kg de ConA et sacrifiées 8h après. A) Pourcentage massique du foie par rapport au poids de la souris. B) Taux d'ASAT dans le sérum des souris. C) Taux d'ALAT dans le sérum des souris. D) Coupes histologiques de foie de souris colorées à l'hématoxyline-éosine, montrant les zones nécrotiques.

Pour comprendre les mécanismes par lesquels le chlordécone participe à l'évolution de cette hépatite, une analyse phénotypique des cellules immunitaires hépatiques a été faite chez des souris exposées ou non au chlordécone. Le chlordécone entraîne une hépatomégalie comme précédemment observée et attendue (Figure 3A) mais n'affecte pas le nombre total des cellules immunitaires hépatiques (Figure 3B). Par contre, le chlordécone augmente significativement le nombre des cellules NKT dans le foie (Figure 3E) sans affecter le reste des différentes populations immunitaires hépatiques comme les lymphocytes T4 et T8, les cellules NK, les lymphocytes B, les macrophages résidents et les neutrophiles (Figure 3D). L'analyse du marqueur d'activation des lymphocytes T, le CD69, exprimé au niveau basal sur les cellules NKT, montre que les cellules NKT sont significativement plus activées dans les foies des souris traitées au chlordécone comparées aux souris témoins (Figure 3F). Ces résultats montrent donc que les cellules NKT, qui sont les cellules effectrices dans l'hépatite à la Concanavaleine A, sont plus nombreuses et déjà activées sous l'effet du chlordécone, avant même l'effet de la Concanavaleine A.

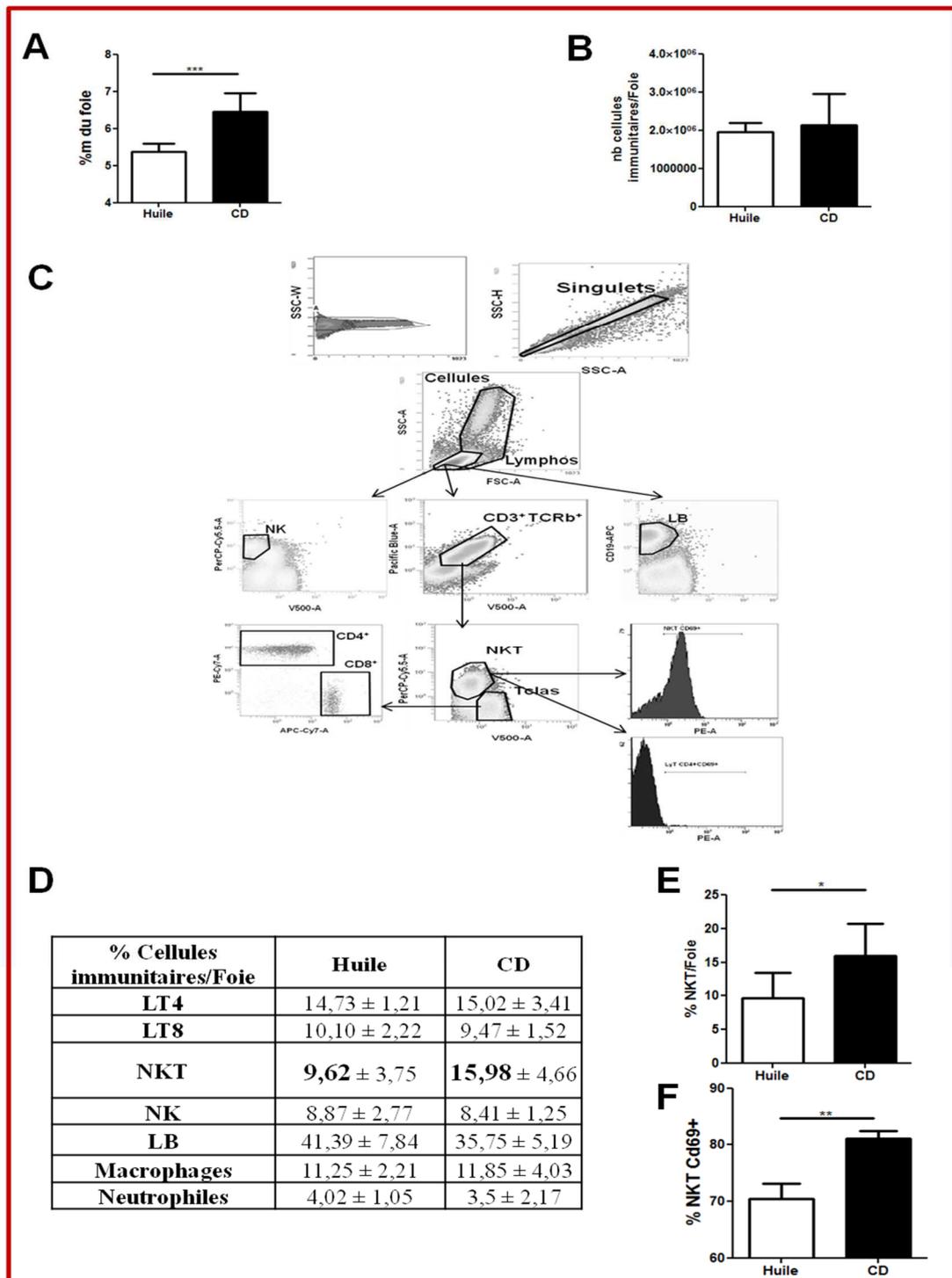


Figure 3. Impact du chlordécone *in vivo* sur la répartition des cellules immunitaires hépatiques. Les souris ont reçu des gavages avec de l'huile (contrôle) ou de 5mg/Kg de chlordécone (CD), pendant 10 jours. A) Pourcentage massique du foie par rapport au poids de la souris. B) Nombre des cellules immunitaires hépatiques. C) Stratégie de caractérisation des populations immunitaires en cytométrie en flux. D) Pourcentage des populations immunitaires dans le foie. E) Pourcentage des cellules NKT dans le foie. F) Pourcentage des cellules NKT CD69⁺ dans le foie.

3.3. Impact du chlordécone sur l'hépatite virale fulminante induite par le MHV3

Dans ce présent travail, l'impact du chlordécone sur une hépatite d'origine virale, a été étudié dans un modèle murin de co-exposition au chlordécone et au virus de l'hépatite murine, le MHV3 (Murine Hepatitis Virus Type 3). Les souris ont été gavées pendant 10 jours avec 5mg/Kg de chlordécone ou avec de l'huile (témoin) puis ont été infectées par le MHV3 et sacrifiées 72h après infection (Annexe 3). Le traitement au chlordécone a induit une hépatomégalie (Figure 4A). Les dommages hépatiques observés par le dosage des transaminases dans le sérum des souris (Figure 4B et 4C), et l'analyse histologique des foies (Figure 4D), n'ont montré aucune différence significative entre les deux groupes de traitement Huile+MHV3 et chlordécone+MHV3, suggérant ainsi que le chlordécone ne potentialise pas l'hépatite virale induite par le MHV3.

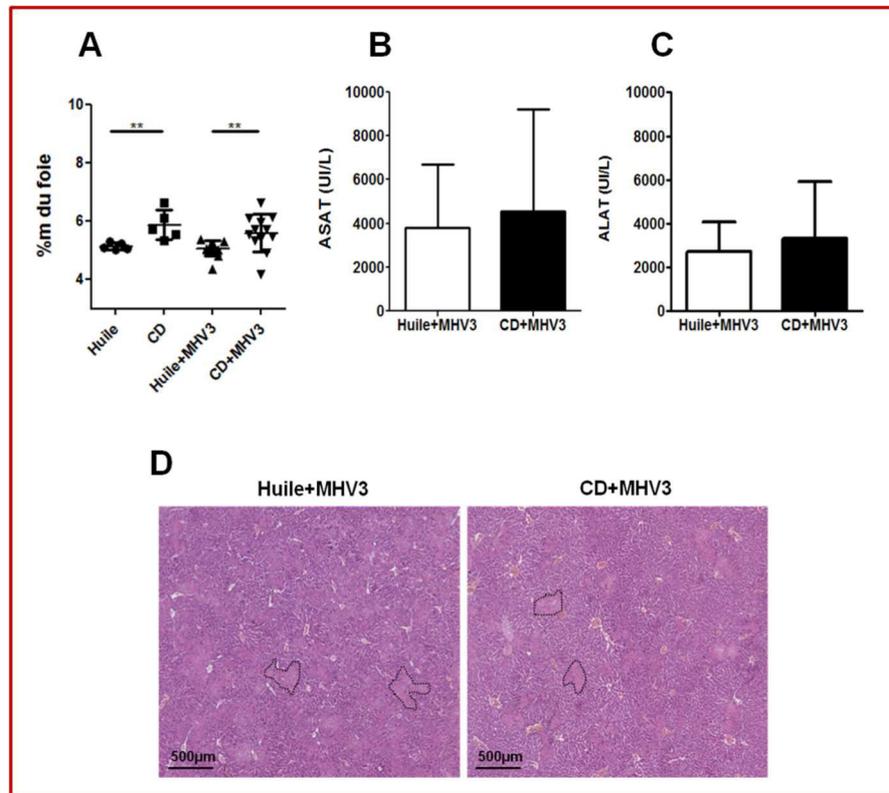


Figure 4. Effet du chlordécone sur l'hépatite aiguë induite par le MHV3. Les souris ont reçu un prétraitement à l'huile ou à 5mg/Kg de chlordécone (CD), pendant 10 jours. Elles ont été ensuite infectées par le virus MHV3 puis sacrifiées 72h après infection. A) Pourcentage massique du foie par rapport au poids de la souris. B) Taux des ASAT dans le sérum des souris. C) Taux des ALAT dans le sérum des souris. D) Coupes histologiques de foie de souris colorées à l'hématoxyline-éosine.

Compte tenu de la mort induite par le virus MHV3 au bout de quelques jours, une étude a été réalisée pour comparer la survie des souris traitées Huile+MHV3 à celle des souris traitées chlordécone+MHV3. Les deux groupes de souris ne présentent pas de différence au niveau de la perte de poids et de la chute de température induites par le MHV3 (Figure 5A et 5B). En revanche, les souris prétraitées au chlordécone, meurent plus rapidement, de manière significative, que celles ayant reçu l'huile (Figure 5C).

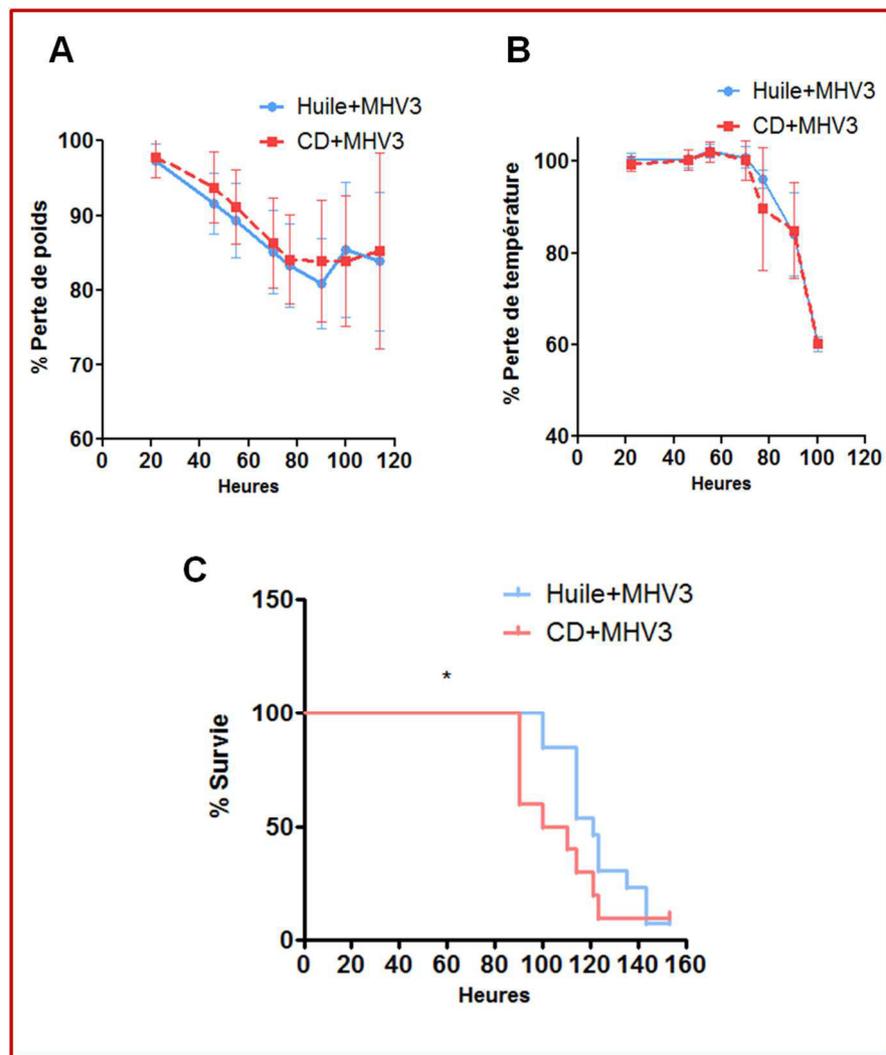


Figure 5. Impact du chlordécone sur la survie des souris ayant une hépatite induite par le virus MHV3. A) Pourcentage de perte de poids au cours de l'étude. B) Pourcentage de perte de température. C) Pourcentage de survie des souris.

La présence du virus MHV3 au niveau hépatique et cérébrale a été analysée par mesure de l'expression du gène de la nucléocapside du virus MHV3, par PCR quantitative en temps réel. Au niveau hépatique, aucune différence significative sur le niveau d'expression du virus n'a été induite par le prétraitement au chlordécone (Figure 6A), tandis que dans le cerveau, le niveau d'expression du gène de la nucléocapside a été significativement et nettement plus élevé chez les souris prétraitées au chlordécone (Figure 6B).

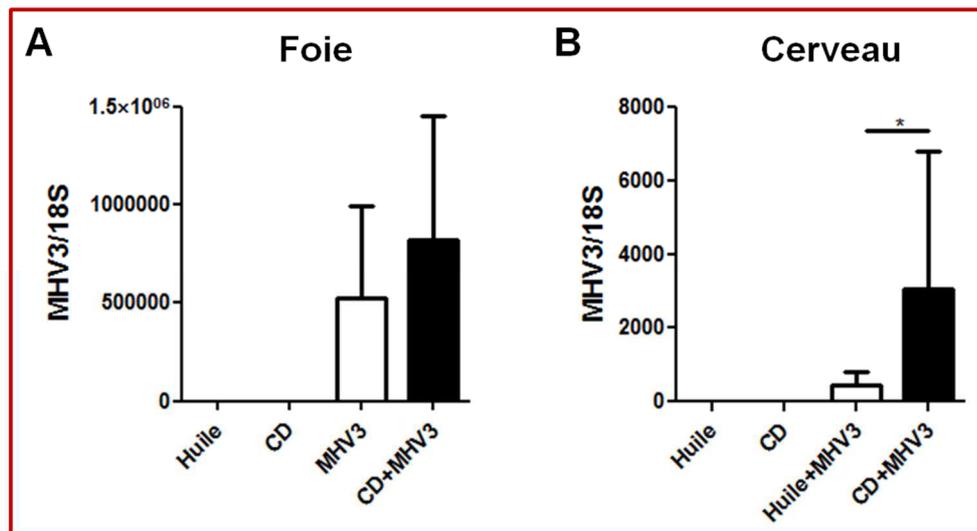


Figure 6. Expression du gène de la nucléocapside du virus MHV3. A) Niveau d'expression dans le foie. B) Niveau d'expression dans le cerveau.

4. Discussion

Jusqu'à présent les seules études publiées sur la co-exposition au chlordécone et à d'autres agents toxiques, ont montré qu'il potentialise l'hépatotoxicité induite par ces agents. Les agents hépatotoxiques utilisés dans ces études étaient exclusivement des substances chimiques ou médicamenteuses telles que l'acétaminophène, le chloroforme et le tétrachlorure de carbone (Fouse & Hodgson 1987; Cianflone et al. 1980; Bell & Mehendale 1985). Aucune étude n'avait été menée pour mesurer l'impact du chlordécone sur des hépatites d'autres étiologies telles que les hépatites alcooliques, les hépatites auto-immunes ou bien les hépatites virales. Dans cette étude, nous avons testé l'effet du chlordécone sur ces différents types d'hépatites aiguës chez la souris.

Le premier modèle mis en place, représente une co-exposition au chlordécone et à une hépatite aiguë induite par l'alcool dans un protocole de « Binge drinking » consistant en une exposition chronique à l'alcool avec une prise soudaine et excessive d'alcool sur un temps court (Bertola et al. 2013). Dans cette étude, nous avons pu observer un effet sensibilisateur du chlordécone vis-à-vis de l'hépatite alcoolique puisque 4 souris sur 7, présentaient des taux de transaminases hépatiques élevés dans leur sérum après co-exposition à l'alcool et au chlordécone. Le chlordécone semble avoir un rôle dans la sensibilisation des foies aux maladies d'origine alcoolique, mais d'autres études seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

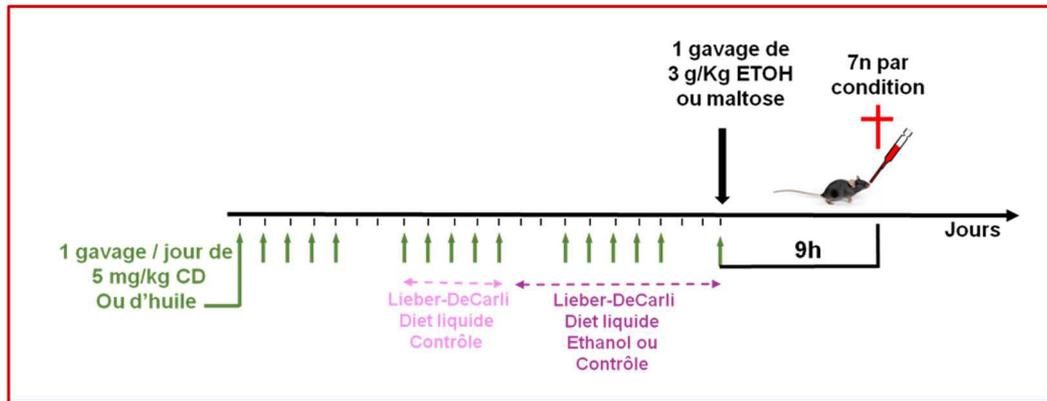
Le deuxième modèle mis en place, est un modèle murin d'exposition au chlordécone au cours d'une hépatite auto-immune induite par la Concanavaline A (Con A). Des études précédentes avaient montré que le chlordécone accélérât les maladies auto-immunes systémiques telles que le lupus érythémateux (Sobel et al. 2006), mais aucune étude n'avait été menée pour les maladies hépatiques auto-immunes. Dans notre étude, nous avons montré que le chlordécone potentialise l'hépatite auto-immune induite par la Con A, avec un taux élevé des transaminases hépatiques dans le sérum et une nécrose hépatique plus importante chez les souris co-exposées au chlordécone et à la Con A que celles traitées par la Con A seule. L'analyse phénotypique des cellules immunitaires résidentes dans les foies des souris, a montré que dans les foies exposés au chlordécone, parmi les cellules immunes analysées, seul le nombre de cellules NKT variait et qu'il était deux fois plus élevé que dans ceux non exposés. Cela pourra expliquer l'effet potentialisateur du chlordécone sur l'hépatite induite par Con A qui dépend de la stimulation des cellules NKT (Wang et al. 2012; Takeda et al. 2000).

Le troisième modèle expérimental mis en œuvre dans cette étude, est un modèle murin d'exposition au chlordécone au cours d'une infection par le virus de l'hépatite murine (MHV3). Nous montrons que l'hépatite induite par ce virus n'était pas amplifiée par le chlordécone dans ce modèle, comme

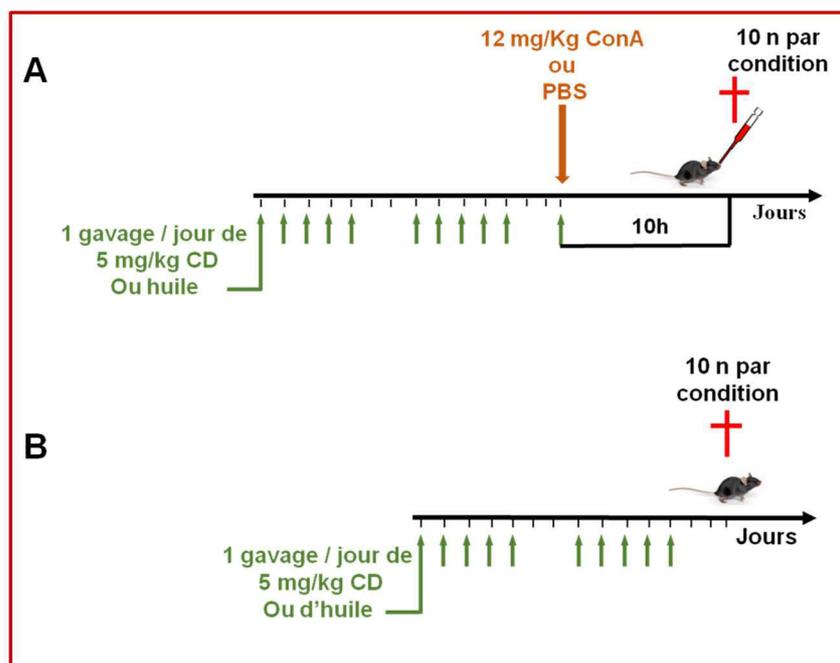
l'indique le dosage des taux des transaminases hépatiques dans le sérum des souris et l'analyse histologique des foies. En revanche, les souris co-exposées au chlordécone et au MHV3 présentaient une mort plus précoce que celles juste infectées par le virus. De plus, le niveau d'expression du virus dans le cerveau des souris était beaucoup plus élevé quand elles étaient co-exposées au chlordécone. Dans notre modèle, l'entrée du virus MHV3 dans le cerveau des souris était favorisée par le chlordécone. Le cerveau est un organe cible du chlordécone et le chlordécone est connu pour engendrer des troubles neurologiques (Huang et al. 1981; Tilson & Mactutus 1982). Ainsi, une atteinte neurologique générale plus importante chez les souris co-exposées au chlordécone et au virus MHV3 que celles exposées au virus seul, pourra expliquer leur mort précoce.

En conclusion, l'ensemble de ces approches ouvre de nouvelles pistes de recherches sur les mécanismes de co-exposition du chlordécone, et de nouvelles voies de recherche en épidémiologie chez les patients atteints d'hépatopathies aiguës ou chroniques.

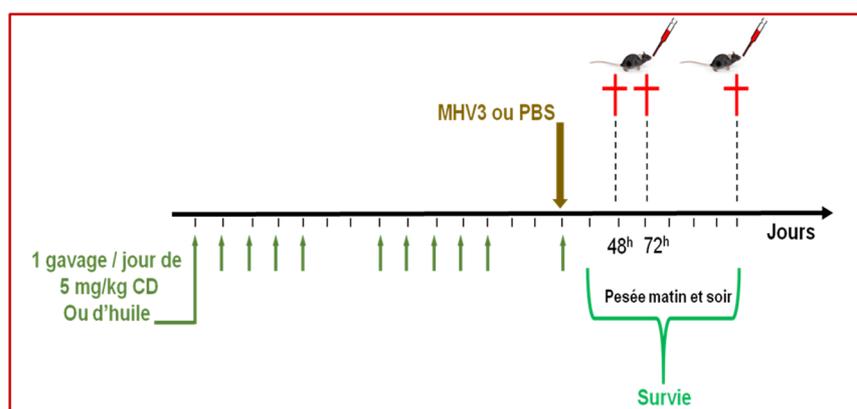
Annexes



Annexe 1 : Schéma représentant le protocole expérimental de la co-exposition au chlordécone et à l'alcool. Les souris ont été gavées avec 5 mg/Kg de chlordécone ou avec de l'huile. Après 10 jours, les souris ont été acclimatées au régime liquide Lieber-DeCarli contrôle. Après 5 jours d'acclimatation, les souris ont été divisées en deux groupes. Le premier groupe correspond au groupe de souris contrôles dans lequel elles continuaient à recevoir le régime alimentaire Lieber-DeCarli contrôle. Le deuxième groupe correspond aux souris recevant le régime liquide Lieber-DeCarli contenant de l'alcool à 5%. Après 10 jours, les souris ont été gavées avec 3g/Kg d'alcool ou avec du maltose en quantité iso-calorique. Le sang des souris a été prélevé 9 h après les gavages avec l'alcool ou le maltose, au moment des sacrifices. Pendant toute la durée de l'étude, les souris recevaient des gavages quotidiens au chlordécone ou à l'huile.



Annexe 2 : Schéma représentant les protocoles expérimentaux. A) Protocole expérimental de la co-exposition au chlordécone et à la Con A. Les souris ont été gavées quotidiennement avec 5mg/Kg de chlordécone. Après 10 jours, 12 mg/Kg de Con A ou bien du PBS ont été administrés aux souris, par voie intrapéritonéale. Le sang des souris a été prélevé, 10 h après, au moment des sacrifices. B) Protocole expérimental représentant les traitements des souris qui ont servi pour la manipe de cytométrie en flux. Les souris ont été gavées quotidiennement avec 5 mg/Kg de chlordécone ou avec de l'huile. Après 10 jours, les souris ont été sacrifiées et leurs foies ont été prélevés pour les extractions des cellules immunitaires.



Annexe 3 : Schéma représentant le protocole expérimental de la co-exposition au chlordécone et au virus MHV3. Les souris ont été gavées quotidiennement avec 5mg/Kg de chlordécone ou avec de l'huile. Après 10 jours de gavage, elles ont été injectées par le virus MHV3 ou par du PBS comme contrôle. Le sang a été prélevé des souris 48h après infection, et au moment des sacrifices, 72h après infection. La survie des souris a été étudiée pendant 8 jours après infection avec le virus. Les souris ont été pesées deux fois par jour, le matin et le soir et les souris survivantes ont été sacrifiées le dernier jour de l'étude.

Article II

Le chlordécone potentialise la fibrose hépatique dans un modèle murin d'hépatite chronique induite par le tétrachlorure de carbone.

Elise Tabet, Valentine Genet, François Tiaho, Catherine Lucas-Clerc, Moana Gelu-Simeon, Claire Piquet-Pellorce et Michel Samson.

Manuscrit soumis à « Toxicology Letters »

Introduction

Le chlordécone est un polluant organique persistant, qui a été utilisé en agriculture aux Antilles françaises et qui a contaminé les sols de ces îles pour des centaines d'années. Malgré son interdiction en 1993, la population antillaise demeure chroniquement exposée au chlordécone par la consommation des légumes du sol contaminé comme les racines et tubercules (patate douce, igname, dachine, carotte, navet...). L'exposition des femmes enceintes au chlordécone est corrélée positivement au risque de prématurité. Par ailleurs, une autre étude épidémiologique menée aux Antilles françaises, a associé la contamination au chlordécone à un risque plus fort de développement d'un cancer de prostate, ce qui suggère un rôle potentiel de ce pesticide dans l'évolution des maladies chroniques. L'organe le plus ciblé par le chlordécone, est le foie. Ce pesticide n'induit pas une hépatotoxicité si il est reçu à des faibles doses, en revanche il peut amplifier l'hépatotoxicité d'autres molécules. Cet effet potentialisateur a été étudié dans des modèles murins d'hépatites aiguës, mais aucune étude n'avait été menée sur son impact lors de maladies hépatiques chroniques.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'impact du chlordécone sur l'évolution de la fibrose hépatique dans un modèle murin d'hépatite aiguë. La fibrose hépatique est la conséquence d'un processus de cicatrisation excessif qui se met en place lors des agressions répétées au foie. Le tétrachlorure de carbone (CCl₄), est un toxique chimique qui est régulièrement utilisé pour induire une fibrose hépatique chez les rongeurs. Dans cette étude, nous avons développé un modèle murin de co-exposition chronique au chlordécone et au CCl₄. Notre modèle expérimental consistait à gaver les souris, pendant 12 semaines, avec une dose quotidienne de 5mg/Kg de chlordécone et une dose hebdomadaire de 0,1g/Kg de CCl₄.

Durant cette étude, des prélèvements réguliers de sang ainsi que plusieurs sacrifices de souris à des temps déterminés, ont été réalisés pour évaluer la progression de l'hépatite au fil des semaines. Les taux des transaminases hépatiques dans le sérum des souris, ainsi que les zones de nécrose observées sur les coupes de foies colorés à l'hématoxyline-éosine, ont montré que le chlordécone a amplifié l'hépatite induite par le CCl₄. Durant le processus de fibrogenèse, la matrice extracellulaire se modifie suite à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de ses composants. Nous avons étudié le niveau d'expression de certains gènes impliqués dans ce processus tels que le collagène 1 alpha, le TIMP-1, le MMP-2 et le PAI-1, par PCR quantitative en temps réel. Nos résultats montrent que le chlordécone a augmenté l'expression de ces gènes dans les foies de souris exposées au CCl₄. De même, nous avons évalué le dépôt de collagène dans les foies fibrotiques par une coloration des foies au rouge Sirius ainsi que par microscopie optique, détectant un signal de génération de second

harmonique (SHG). Dans les foies co-exposés au chlordécone et au CCl₄, la quantité de collagène déposé est significativement plus importante que celle dans les foies soumis seulement aux traitements avec le CCl₄. Enfin, nous avons étudié, par immunohistochimie, le niveau d'expression de l' α -SMA, indicateur de l'activation des cellules étoilées du foie et montré que le niveau de α -SMA était plus important dans les foies co-exposés au chlordécone et au CCl₄ que dans les foies exposés seulement au CCl₄.

En conclusion, nous montrons que le chlordécone potentialise la fibrose hépatique dans un modèle murin d'hépatite chronique induite par le CCl₄. Ce résultat invite fortement à étudier l'impact potentiel du chlordécone sur l'évolution des hépatopathies chroniques chez l'homme.

Chlordecone potentiates hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in mice

Running title: Chlordecone potentiates hepatic fibrosis

Elise Tabet^{1,2,3}, Valentine Genet^{1,2,3}, François Tiaho^{1,2,3}, Catherine Lucas-Clerc^{2,4}, Moana Gelu-Simeon^{1,5}, Claire Piquet-Pellorce^{1,2,3} and Michel Samson^{1,2,3}.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U.1085, Institut de Recherche Santé Environnement and Travail (IRSET), F-35043 Rennes, France.

² Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France.

³ Structure Fédérative BioSit UMS 3480 CNRS-US18 Inserm, F-35043 Rennes, France.

⁴ Service de Biochimie CHU Rennes, Université de Rennes 1; F-35043 Rennes, France.

⁵ Service d'Hépatogastroentérologie CHU Pointe à Pitre; F-97159 Pointe à Pitre Cedex, France.

Keywords: Liver, Fibrosis, Chlordecone, CCl₄, Collagen, Kepone

List of abbreviations: AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, CD: Chlordecone, CCl₄: Carbon tetrachloride, α -SMA: α -smooth muscle actin, ECM: Extracellular matrix

Address for correspondence: Michel Samson, INSERM-U1085, IRSET, Université de Rennes 1, 2, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex, France.

Phone (+33) 22 323 5927; Fax (+33) 22 323 4794.

Conflict of interest: The authors have no financial or commercial conflict of interest to declare.

Abstract.

Chronic liver damage due to viral or chemical agents leads to a repair process resulting in hepatic fibrosis. Fibrosis may lead to cirrhosis, which may progress to liver cancer or a loss of liver function, with an associated risk of liver failure and death. Chlordecone is a chlorinated pesticide used in the 1990s. It is not itself hepatotoxic, but its metabolism in the liver triggers hepatomegaly and potentiates hepatotoxic agents. Chlordecone is now banned, but it persists in soil and water, resulting in an ongoing public health problem in the Caribbean area. We assessed the probable impact of chlordecone on the progression of liver fibrosis in the population of contaminated areas, by developing a mouse model of chronic co-exposure to chlordecone and a hepatotoxic agent, carbon tetrachloride (CCl₄). After repeated administrations of chlordecone and CCl₄ by gavage over a 12-week period, we checked for liver damage in the exposed mice, by determining serum liver transaminase (AST, ALT) levels, histological examinations of the liver and measuring the expression of genes encoding extracellular matrix components. The co-exposure of mice to CCl₄ and chlordecone resulted in significant increases in ALT and AST levels. Chlordecone also increased expression of the Col1A2, MMP-2, TIMP-1 and PAI-1 genes in CCl₄-treated mice. Finally, we demonstrated, by quantifying areas of collagen deposition and alpha-SMA gene expression, that chlordecone potentiated the hepatic fibrosis induced by CCl₄. In conclusion, our data suggest that chlordecone potentiates hepatic fibrosis in mice with CCl₄-induced chronic liver injury.

Introduction

Fibrogenesis is a wound-healing response to repeated liver injury. It is triggered in response to chronic liver damage, regardless of the cause of the damage: viral infections, alcohol abuse, drug exposure, metabolic dysfunctions or autoimmune disorders. It manifests as a progressive replacement of the liver parenchyma with scar tissue. This process takes place over many years and can lead to other complications, such as cirrhosis, leading to liver failure or an increase in the risk of hepatocellular carcinoma. Hepatic fibrosis is characterized by the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) (Friedman, 2003). At advanced stages of the disease, there may be six times more ECM in fibrotic livers than in normal livers (Benyon and Iredale, 2000). This accumulation results from an imbalance between the synthesis and degradation of ECM components (Arthur, 2000), such as fibrillar collagen, essentially collagen type I (Tsukada et al., 2006), matrix metalloproteinases (MMPs) (Takahara et al., 1995) and their tissue inhibitors (TIMPs) (Benyon and Iredale, 2000).

Humans are exposed, on a daily basis, to various toxic agents, chemicals and drugs in the environment. The liver is the major site of detoxification for these compounds in the body. This organ may therefore be considered a target of their toxicity. In humans, hepatotoxicity due to exposure to alcohol, drugs such as acetaminophen, imidazole fungicidal agents and other chemicals has also been studied in a context of exposure to mixtures of these agents. It has been shown that exposure to alcohol + acetaminophen, or alcohol + imidazole fungicidal agent mixtures results in worse damage to the human liver than exposure to any of these agents alone (Zimmerman and Maddrey, 1995).

Many animal models for studying the molecular processes underlying the pathophysiology of the liver during exposure to hepatotoxic compounds administered alone or in combination have been developed, to improve our understanding of the molecular mechanisms of action of these hepatotoxic compounds and the host response, and to identify biological markers of liver damage. As in humans, mixtures of chemical agents were found to aggravate liver damage in

most of the animal models studied (Brautbar and Williams, 2002).

In animals, diverse causes of fibrogenesis have been studied, but the principal *in vivo* model of fibrosis is based on the repeated administration of carbon tetrachloride (CCl₄) over a period of several weeks (Brautbar and Williams, 2002; Chang et al., 2005). CCl₄ is a hepatotoxic agent that can induce liver fibrosis, and even cirrhosis, after long-term exposure. CCl₄ is known to trigger centrilobular hepatic necrosis and the first event in its hepatotoxicity is its metabolic activation in the liver (Weber et al., 2003). CCl₄ is increased by other agents, such as alcohol, in situations of co-exposure in animals (Benyon et al., 1996; Chobert et al., 2012; McLean and McLean, 1966). In particular, the hepatotoxicity of this compound has been shown to be increased in models of co-exposure to pesticides, such as mirex and chlordecone.

Chlordecone, also known as kepone, is an organochlorine pesticide that was produced essentially from 1958 through 1975 in the United States, for export to Latin America, Africa and Europe for use as an ant and cockroach poison. Kepone was also used to control banana root borer, primarily in the Caribbean area. Kepone production was banned in 1976 after it was discovered that the Life Science Products Company factory in Hopewell, Virginia, which was responsible for producing this chemical, had caused serious contamination of the environment and many of its workers were found to have medical problems. All workers at this factory presented symptoms of chlordecone poisoning, including headaches, anxiety, irritability and memory disturbance, abnormal hepatic function and defective spermatogenesis. Studies of chlordecone toxicity in humans and animal models implicated this agent in a broad array of syndromes, affecting the nervous and reproductive systems in particular. Chlordecone is known to accumulate mostly in the liver (Egle et al., 1978) triggering hepatomegaly (Guzelian, 1985). Chlordecone is not itself hepatotoxic, but several studies have shown that it can strongly potentiate the hepatotoxic effects of CCl₄ in models of acute co-exposure (Curtis et al., 1979; Klingensmith et al., 1983; Mehendale, 1989).

Chlordecone is no longer used, but it persists in the soils and water of the Caribbean area. It thus remains a public health problem, due to its potential contribution to many chronic diseases, including liver diseases.

In this study, we developed a mouse model of chronic co-exposure to chlordecone and CCl₄, to assess the impact of chlordecone on the development and progression of liver fibrosis. We evaluated the liver damage caused by the interaction between chlordecone and CCl₄, the expression of genes involved in matrix remodeling and the amount of collagen deposited in mouse livers.

Materials and Methods

Animals and experimental protocol

Eight-week-old male C57Bl/6 mice were purchased from Janvier (Le Genest-sur-Isle, France) and reared in specific pathogen-free (SPF) conditions in the local animal house, in accordance with French laws and institutional guidelines for the handling and care of experimental animals (accreditation of M. Samson #3596).

Animals were assigned to four groups at random. In the first group, the mice received olive oil daily, by gavage, as a control treatment. In the second group, mice were treated, once weekly, with CCl₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a dose of 0.1 g/kg. In the third group, the mice received chlordecone (Santa Cruz Biotechnology) daily, at a dose of 5 mg/kg. In the fourth group, the mice received chlordecone at a dose of 5 mg/kg daily for two weeks and then 0.1 g/kg CCl₄ once weekly, in addition to their daily dose of chlordecone. CCl₄ and chlordecone were diluted in olive oil and administered by oral gavage. During the 12 weeks of the study, the mice were observed and their body weight was measured once weekly. The doses of the chemicals used were well tolerated and no deaths occurred. Blood was collected from the mice 48 h and 72 h after the administration of CCl₄ in weeks 5, 7, 9 and 12 of the study. The mice were killed 72 h after the administration of the last dose of CCl₄. The liver was removed and fragments of this organ were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin or frozen in liquid nitrogen in the presence of the

cryoprotectant isopentane. Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were determined according to IFCC primary reference procedures, with an Olympus AU2700 Autoanalyser® (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan).

RNA isolation and RT-qPCR

We homogenized liver tissue samples weighing approximated 100 mg and extracted total RNA in Trizol reagent (Invitrogen). The first-strand cDNA was produced with SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). The cDNA was then amplified, with the GAPDH housekeeping gene as a control. Quantitative PCR was performed with the fluorescent dye SYBR Green and the double strand-specific SYBR® Green system (Applied Biosystems), with an ABI 7900 HT Prism sequence analyzer (Applied Biosystems). Total cDNA (30 ng) was used as a template for amplification, with the specific primer pair (Table 1) used at a final concentration of 300 nM. Each measurement was performed in triplicate. We determined 18S mRNA levels as a control, and the level of expression of each gene studied is expressed relative to that of the 18S gene. The primers used were, for collagen 1A2 (forward: 5'AGGCTGACACGAACTGAGGTA3', reverse: 5'ATGCACATCAATGTGGAGGA3'), for MMP-2 (forward: 5'TTGAGAAGGATGGCAAGTAT3', reverse: 5'ATGGTAAACAAGGCTTCATG3'), for TIMP-1 (forward: 5'TTCCAGTAAGGCCTGTAGC3', reverse: 5'TTATGACCAGGTCCGAGTT3'), for PAI-1 (forward: 5'TCCAGAAGCAGAGAGGGAAA3', reverse: 5'CAGTGCAGCTCTGACTCACC3'), for 18S (forward: 5'CGCCGCTAGAGGTGAAATTC3', reverse: 5'ATGCACATCAATGTGGAGGA3').

Immunocytochemistry and histology

For the assessment of liver injury, 4 µm-thick sections of paraffin-embedded liver were cut, placed on microscope slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Slides were

scanned with a Nanozoomer NDP and images were acquired with NDP viewer software. Collagen deposition in treated mouse livers was assessed by Sirius red staining on 4 μm -thick paraffin-embedded liver sections. The stained area was measured, over the total liver surface, with NIS element software. The percentage of the total liver area displaying fibrosis was calculated. Liver sections (10 μm thick) from frozen samples, were fixed on slides, by incubation in 4% formaldehyde for 10 minutes. They were then washed and immunostained for α -smooth muscle actin (Cy3-conjugated monoclonal anti-actin α -smooth muscle antibody, Clone 1A4, Sigma) for 1 hour. The liver sections were then washed in 1x PBS, mounted in fluorescence mounting medium (Dako) and scanned with the Nanozoomer NDP for image acquisition. Four mice per set of treatment conditions were analysed and the α -SMA stained was quantified with Image J software, using a common threshold for all samples.

Multiphoton SHG microscopy

Multiphoton SHG images were acquired on a photonic imaging platform (PIXEL facility of GIS EUROPIA, University of Rennes 1, France, <http://pixel.univ-rennes1.fr>). The imaging setup consisted of a confocal Leica TCS SP2 scanning head (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) mounted on a Leica DMIRE2 inverted microscope and equipped with a MAITAI Spectra Physics femtosecond laser (Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA). A Leica dry objective HCPLAPO 10X (NA=0.4) and Leica condenser S23 (NA=0.53) were used to apply a constant 12 mW of excitation at 820 nm to the sample, and for collection, respectively. BG39 bandpass and 410 nm IR (10 nm FWHM) filters were placed before the trans-detection photomultiplier tube (PMT) detector. Constant gains were achieved by setting 650 V and 750 V at PMTs for the trans-detection of the forward SHG signal and the epi-detection of the autofluorescence signal, respectively. Images were acquired with 20 μm -thick deparaffinized liver slices. Four random fields of view per liver section were imaged. The SHG signal was analyzed and quantified with open-source ImageJ software. Briefly, background pixels were set to NaN (not-a-

number) values and a common threshold was set for all samples. The SHG signal was quantified by determining the percentage of pixels with a signal above the threshold.

Statistical analysis

Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, and mean differences between experimental groups were assessed in nonparametric Mann–Whitney U-test, with GraphPad Prism5 software. For all statistical analyses, * denotes $p<0.05$, ** denotes $p<0.01$ and *** denotes $p<0.001$.

Results

Chlordecone administration potentiates the chronic liver injury induced by CCl₄

We investigated the impact of chlordecone on chronic liver injury, by treating mice with CCl₄ and chlordecone by gavage, according to the experimental design presented in figure 1S. Measurements of body weight over a period of 12 weeks revealed no significant difference between the four treatments (Fig. 2S), liver-to-body weight ratio was significantly higher in mice treated with chlordecone alone or in combination with CCl₄ than in mice treated with CCl₄ alone or oil (negative control) (Fig.1A). Levels of the transaminases ALT and AST were measured in the collected serum after 5, 7, 9 and 12 weeks of treatment (Fig. 1B and 3S). Chlordecone gavage had no effect on ALT and AST levels, whereas treatment with CCl₄ alone caused a significant increase of the levels of these enzymes in the serum. The exposure of mice to both CCl₄ and chlordecone resulted in significantly higher levels of ALT and AST than exposure to CCl₄ alone or oil, indicating that hepatic injury was more severe in conditions of co-exposure. The staining of liver sections with hematoxylin and eosin showed the necrotic areas to be larger after combined treatment with CCl₄ and chlordecone than after exposure to CCl₄ exposure alone, whereas liver sections from mice treated with chlordecone alone or with oil contained no zones of hepatic necrosis (Fig. 1C). Moreover, the areas of necrosis increased over time for all treatments. These measurements demonstrate that chlordecone administration potentiates the chronic liver injury caused by CCl₄.

Chlordecone enhances expression of the Col1A2, MMP-2, TIMP-1 and PAI-1 genes in the CCl₄-treated mouse model

Chronic liver injury is usually associated with changes in the extracellular matrix. Molecular changes in the livers of mice treated with oil, chlordecone, CCl₄ or with both chlordecone and CCl₄ were investigated by studying the expression of a number of genes encoding components of the extracellular matrix. Expression of the gene encoding type 1 collagen, the most abundant collagen in fibrotic tissues, increased significantly over time in mice exposed to both chlordecone and CCl₄ and the level of expression of this gene was higher in these mice than in CCl₄-treated mice (Fig. 2A). Expression of the genes encoding matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor (TIMP-1) was upregulated in the livers of mice treated with both chlordecone and CCl₄ (Fig. 2B, 2C). Expression of the gene encoding PAI-1, which is known to enhance collagen deposition in injured livers, was slightly stronger in mice exposed to both chlordecone and CCl₄ than in mice exposed to CCl₄ alone (Fig. 2D). These changes in gene expression suggest that there is an imbalance in the synthesis and degradation of extracellular matrix components in mice treated with both chlordecone and CCl₄ and that this imbalance results in greater liver injury.

Chlordecone potentiates the hepatic fibrosis induced by CCl₄

As repeated liver injury leads to liver fibrosis, we assessed the impact of chlordecone on chronic CCl₄-induced liver fibrosis development and progression, by assessing collagen deposition in mouse liver. Sirius red staining was performed on mouse liver sections, for all treatments. Control and chlordecone-treated mice had normal collagen distributions, whereas CCl₄-treated mice presented excessive collagen deposition, increasing with treatment duration. Collagen deposition levels were highest in liver sections from mice exposed to both chlordecone and CCl₄ (Fig. 3A). Quantification of the areas of collagen deposition on sections stained with Sirius red showed that a significantly larger area of the liver was covered with collagen in mice treated with both chlordecone and CCl₄ than in mice treated with CCl₄ alone (Fig. 3B).

We also assessed collagen deposition by second harmonic generation (SHG), to provide further evidence for a role of chlordecone in potentiating CCl₄-induced hepatic fibrosis. Representative liver sections were imaged by multiphoton microscopy, and we found that the SHG signal was stronger on imaged liver samples obtained from mice treated with both chlordecone and CCl₄ for 12 weeks than in mice treated with CCl₄ alone (Fig. 4A). The quantification of SHG signal images showed that significantly more collagen was deposited in mice exposed to both CCl₄ and chlordecone than in mice treated with CCl₄ alone (Fig. 4B). The imaging results obtained for Sirius red staining and SHG analysis clearly demonstrate that treatment with both chlordecone and CCl₄ increases the size of the fibrotic area in mouse liver.

Chlordecone upregulates the expression of α -SMA in CCl₄-treated mice

The excessive production of extracellular matrix during the development and the progression of liver fibrosis is mostly due to hepatic stellate cells (HSCs). These cells undergo a process of activation in chronically damaged livers, characterized by the gain of a myofibroblastic phenotype and by the production of α -smooth muscle actin (α -SMA) (Geerts, 2001). We assessed the impact of chlordecone on the production of α -SMA protein in the livers of mice treated with oil, chlordecone, CCl₄, or chlordecone+CCl₄ for 5 or 12 weeks. Immunostaining for α -SMA on liver sections yielded a positive signal when mice were treated with CCl₄ for five weeks and a stronger signal when they were treated for 12 weeks. However, the exposure of mice to both chlordecone and CCl₄ clearly enhanced the α -SMA signal on liver sections (Fig. 5A). The quantification of α -SMA staining revealed that the area displaying such staining was significantly larger in the livers of mice treated with both chlordecone and CCl₄ than in those of mice exposed to CCl₄ only (Fig. 5B).

Discussion

Chlordecone is a persistent environmental contaminant that its resistance to biodegradation and its high potential for bioaccumulation have hindered its elimination since the prohibition of

its use. Thus, even though this toxic pesticide is no longer used, studies on the impact of chlordecone on human health will remain relevant for a long time to come. Hepatomegaly is the most frequent symptom observed in people exposed to chlordecone (Cohn et al., 1978). Indeed, as chlordecone accumulates in the liver and is eliminated slowly, the liver is a major target organ for studies of the toxicity of chlordecone (Belfiore et al., 2007; Egle et al., 1978). Studies in rodent models have shown that chlordecone can induce several molecular changes in the liver, including the induction of cytochrome P450 enzymes (Mehendale et al., 1977, 1978) and changes to cholesterol homeostasis (Carpenter and Curtis, 1991; Gilroy et al., 1994).

In this study, we investigated the impact of chlordecone on the development and progression of chronic liver diseases, such as hepatic fibrosis. We developed a mouse model of chronic exposure to chlordecone and to the hepatotoxic chemical CCl₄. The interactions between chlordecone and several other chemicals have been studied in mouse and rat models, in acute exposure protocols involving the administration of only one or a few doses of chlordecone. For instance, chlordecone has been shown to potentiate the hepatotoxic and lethal effects of acetaminophen and bromotrichloromethane (Agarwal and Mehendale, 1982; Fouse and Hodgson, 1987). The impact of chlordecone on CCl₄ hepatotoxicity has also been studied in models of acute co-exposure. Rodents subjected to chlordecone treatment and then challenged with CCl₄ display enhanced bioactivation of CCl₄ and a lack of hepatocyte regeneration (Klingensmith et al., 1983; Lockard et al., 1983).

In our model of chronic co-exposure, mice were treated by gavage for 10 days with a dose of 5 mg/kg chlordecone, to ensure that the animals received the whole dose and was saturated with chlordecone (Lagarrigue et al., 2014). After this pretreatment, the mice were challenged by gavage with a moderate dose of CCl₄ (0.1 g/kg) once per week for 5, 7, 9 and 12 weeks in addition to their daily dose of chlordecone (5 mg/kg). As previously reported, treatment with chlordecone induced hepatomegaly. Co-exposure to chlordecone and CCl₄ significantly increased this

hepatomegaly, in a time-dependent manner. Determinations of serum hepatic enzymes (AST and ALT), which are considered to be the principal indicators of liver injury (Pratt and Kaplan, 2000), showed the levels of these enzymes to be significantly higher in mice exposed to both chlordecone and CCl₄, with the levels of these enzymes increasing with the duration of treatment. Further evidence for the impact of co-exposure to chlordecone and CCl₄ on liver injuries was provided by the histological examination of livers, which showed larger areas of necrosis for mice exposed to both chemicals and for longer durations of treatment. We used the CCl₄-induced chronic liver injury model to assess hepatic fibrosis. With the experimental strategy used, we were able to detect molecular changes due to the process of fibrogenesis and to observe typical liver fibrosis after CCl₄ application between weeks 5 and 12 of the experiment. During fibrosis progression, changes in the composition of the ECM were observed, with an increase in fibrillar collagen production (Tsukada et al., 2006). We found that expression of the collagen type I gene was stronger in mice exposed to both chlordecone and CCl₄ than in those exposed to CCl₄ alone. Similarly, co-exposure to chlordecone and CCl₄ led to an upregulation of MMP-2 and its inhibitor, TIMP-1 (Herbst et al., 1997), contributing to ECM remodeling. Our study thus reveals that pretreatment with chlordecone aggravates the molecular changes underlying fibrogenesis in the mouse model of CCl₄-induced liver fibrosis.

From the fifth week of chronic treatment with CCl₄ alone, we observed an increase in collagen deposition in mouse livers. Furthermore, treatment with both chlordecone and CCl₄ resulted in significantly higher levels of collagen deposition, as shown by both Sirius red staining and multiphoton SHG analysis. Immunostaining for α -SMA and its quantification in mouse liver showed that chlordecone clearly upregulated the production of this protein during fibrogenesis.

In conclusion, this study demonstrates that hepatic fibrosis can be influenced by chronic co-exposure to chlordecone, which aggravates liver disease. In our mouse model, chlordecone potentiated hepatic fibrosis in animals with chronic liver injury induced by carbon

tetrachloride. As chlordecone has been shown to potentiate the effects of hepatotoxic drugs, such as acetaminophen (Fouse and Hodgson, 1987), studies should be carried out on human populations living in chlordecone-contaminated areas, to check the effects of exposure to this chemical on chronic liver diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Inserm, Université de Rennes 1 and the ANR (*Agence nationale de la recherche*). For immunohistochemistry and animal house facilities, we would like to thank the dedicated platforms (i.e. H2P2 (Pascale Bellaud and Roselyne Viel), Arche (Laurence Bernard)) of SFR BIOSIT, University of Rennes 1, France.

REFERENCES

- Agarwal, A.K., Mehendale, H.M., 1982. Potentiation of bromotrichloromethane hepatotoxicity and lethality by chlordecone preexposure in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 2, 161-167.
- Arthur, M.J., 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G245-249.
- Belfiore, C.J., Yang, R.S., Chubb, L.S., Lohitnavy, M., Lohitnavy, O.S., Andersen, M.E., 2007. Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling. *Toxicology* 234, 59-72.
- Benyon, R.C., Iredale, J.P., 2000. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 46, 443-446.
- Benyon, R.C., Iredale, J.P., Goddard, S., Winwood, P.J., Arthur, M.J., 1996. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 110, 821-831.
- Brautbar, N., Williams, J., 2nd, 2002. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health* 205, 479-491.
- Carpenter, H.M., Curtis, L.R., 1991. Low dose chlordecone pretreatment altered cholesterol disposition without induction of cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos* 19, 673-678.
- Chang, M.L., Yeh, C.T., Chang, P.Y., Chen, J.C., 2005. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World J Gastroenterol* 11, 4167-4172.
- Chobert, M.N., Couchie, D., Fourcot, A., Zafrani, E.S., Laperche, Y., Mavier, P., Brouillet, A., 2012. Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats. *Lab Invest* 92, 135-150.
- Cohn, W.J., Boylan, J.J., Blanke, R.V., Fariss, M.W., Howell, J.R., Guzelian, P.S., 1978. Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. *N Engl J Med* 298, 243-248.
- Curtis, L.R., Williams, W.L., Mehendale, H.M., 1979. Potentiation of the hepatotoxicity of carbon tetrachloride following preexposure to chlordecone (kepone) in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 51, 283-293.
- Egle, J.L., Fernandez, J.B., Guzelian, P.S., Borzelleca, J.F., 1978. Distribution and excretion of chlordecone (Kepone) in the rat. *Drug Metab Dispos* 6, 91-95.
- Fouse, B.L., Hodgson, E., 1987. Effect of chlordecone and mirex on the acute hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *Gen Pharmacol* 18, 623-630.
- Friedman, S.L., 2003. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 38 Suppl 1, S38-53.
- Geerts, A., 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21, 311-335.
- Gilroy, D.J., Carpenter, H.M., Curtis, L.R., 1994. Chlordecone pretreatment alters [¹⁴C]chlordecone and [¹⁴C]cholesterol transport kinetics in the perfused rat liver. *Fundam Appl Toxicol* 22, 286-292.
- Guzelian, P.S., 1985. Clinical evaluation of liver structure and function in humans exposed to halogenated hydrocarbons. *Environ Health Perspect* 60, 159-164.
- Herbst, H., Wege, T., Milani, S., Pellegrini, G., Orzechowski, H.D., Bechstein, W.O., Neuhaus, P., Gressner, A.M., Schuppan, D., 1997. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150, 1647-1659.
- Klingensmith, J.S., Lockard, V., Mehendale, H.M., 1983. Acute hepatotoxicity and lethality of CCl₄ in chlordecone-pretreated rats. *Exp Mol Pathol* 39, 1-10.
- Lagarigue, M., Lavigne, R., Tabet, E., Genet, V., Thome, J.P., Rondel, K., Guevel, B., Multigner, L., Samson, M., Pineau, C., 2014. Localization and in situ absolute quantification of chlordecone in the mouse liver by MALDI imaging. *Anal Chem* 86, 5775-5783.
- Lockard, V.G., Mehendale, H.M., O'Neal, R.M., 1983. Chlordecone-induced potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: a morphometric and biochemical study. *Exp Mol Pathol* 39, 246-255.
- McLean, A.E., McLean, E.K., 1966. The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem J* 100, 564-571.
- Mehendale, H.M., 1989. Mechanism of the lethal interaction of chlordecone and CCl₄ at non-toxic doses. *Toxicol Lett* 49, 215-241.
- Mehendale, H.M., Takanaka, A., Desai, D., Ho, I.K., 1977. Kepone induction of hepatic mixed function oxidases in the male rat. *Life Sci* 20, 991-997.
- Mehendale, H.M., Takanaka, A., Desai, D., Ho, I.K., 1978. Effect of preexposure to kepone on hepatic mixed-

function oxidases in the female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 44, 171-180.

Pratt, D.S., Kaplan, M.M., 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 342, 1266-1271.

Takahara, T., Furui, K., Funaki, J., Nakayama, Y., Itoh, H., Miyabayashi, C., Sato, H., Seiki, M., Ooshima, A., Watanabe, A., 1995. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 21, 787-795.

Tsukada, S., Parsons, C.J., Rippe, R.A., 2006. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 364, 33-60.

Weber, L.W., Boll, M., Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33, 105-136.

Zimmerman, H.J., Maddrey, W.C., 1995. Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology* 22, 767-773.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Chronic liver injury caused by CCl₄ and chlordecone in C57BL/6 mice. Mice received oral gavage with olive oil, chlordecone (5 mg/kg body weight), CCl₄ (0.1 g/kg body weight) or chlordecone+CCl₄. They were killed at 5, 7, 9 and 12 weeks of the study. (A) Liver-to-body weight ratio, demonstrating the occurrence of hepatomegaly in the treated mice. (B) Serum levels of ALT (IU/L) in mice at the four time points studied. (C) Liver sections stained with hematoxylin and eosin, showing the necrotic area in mice at 5 and 12 weeks of study. Scale bars = 500 μ m. The different treatment groups are shown in (A) and (B) as  for oil,  for chlordecone,  for CCl₄ and  for chlordecone+CCl₄. The data shown are means \pm SD for four animals per group and the *p*-values for Mann-Whitney tests, at the right margin of the graphs, indicate the significance of differences between groups (***P*<0.01; ****P*<0.001).

Figure 2: Reverse transcription-PCR analysis of collagen 1a2 mRNA levels. (A) MMP-2 (B), TIMP-1 (C) and PAI-1 (D). Liver total RNA was extracted from mice treated with oil, chlordecone, CCl₄ or chlordecone+CCl₄ for 5, 7, 9, or 12 weeks, as described in the materials and methods section. After RT-PCR analysis, mRNA levels were expressed as ratios relative to 18S levels. The histogram bars corresponding to the different treatment groups are shown as  for oil,  for chlordecone,  for CCl₄ and  for chlordecone+CCl₄. The data shown are the means \pm SD for four animals in each group and the *p*-values for Mann-Whitney tests and one-way ANOVA test indicate the significance of differences between groups (**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001).

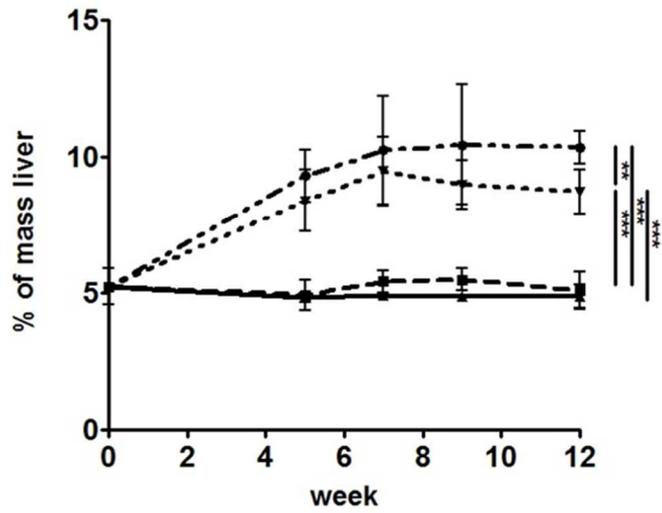
Figure 3: Effect of chlordecone on CCl₄-induced liver fibrosis. Photomicrographs of liver sections stained with Sirius red from mice treated with oil, chlordecone (5 mg/kg body weight), CCl₄ (0.1 g/kg body weight) or chlordecone+CCl₄ for 5, 7, 9 and 12 weeks (Scale bars = 500 μ m) (A). Sirius red staining for collagen was quantified with NIS element software and the percentage of the total liver area examined displaying fibrosis was calculated. The data shown are the means \pm SD for four animals in each group and *p*-values for Mann-Whitney tests, at the right margin of the graphs, indicate the significance of differences between groups (**P*<0.05).

Figure 4: Imaging of liver fibrosis by second harmonic generation microscopy. (A) SHG images illustrating collagen deposition in the livers of mice treated with CCl₄ only or chlordecone+CCl₄ for 12 weeks. Scale bars = 500 μ m. (B) The SHG signal was quantified with Image J software, as indicated in the methods section, and the percentage of the liver area displaying fibrosis was calculated for each mouse. The data shown are the means \pm SD for four animals per group and the *p*-values for Mann-Whitney tests indicate the significance of differences between groups (**P*<0.05).

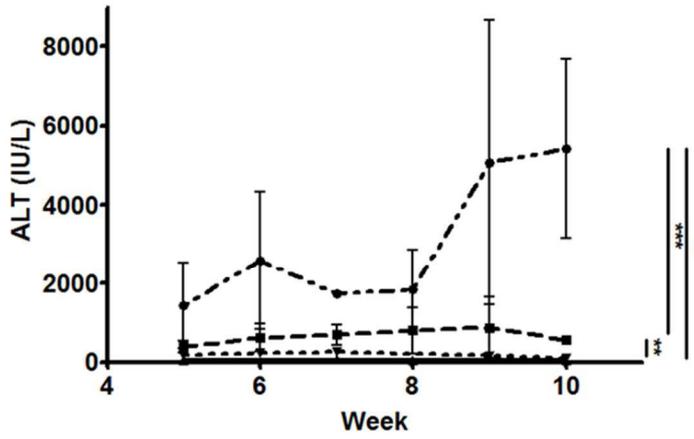
Figure 5: Immunostaining of liver sections for α -SMA. (A) Immunofluorescence images showing α -SMA staining in the livers of mice treated with oil, chlordecone, CCl₄ or chlordecone+CCl₄ for 5 and 12 weeks. Scale bars = 500 μ m. (B) Stained areas were quantified with Image J software and the data shown are means \pm SD for four animals in each group and the *p*-values for Mann-Whitney tests indicate the significance of differences between groups (**P*<0.05).

Figure 1

A



B



C

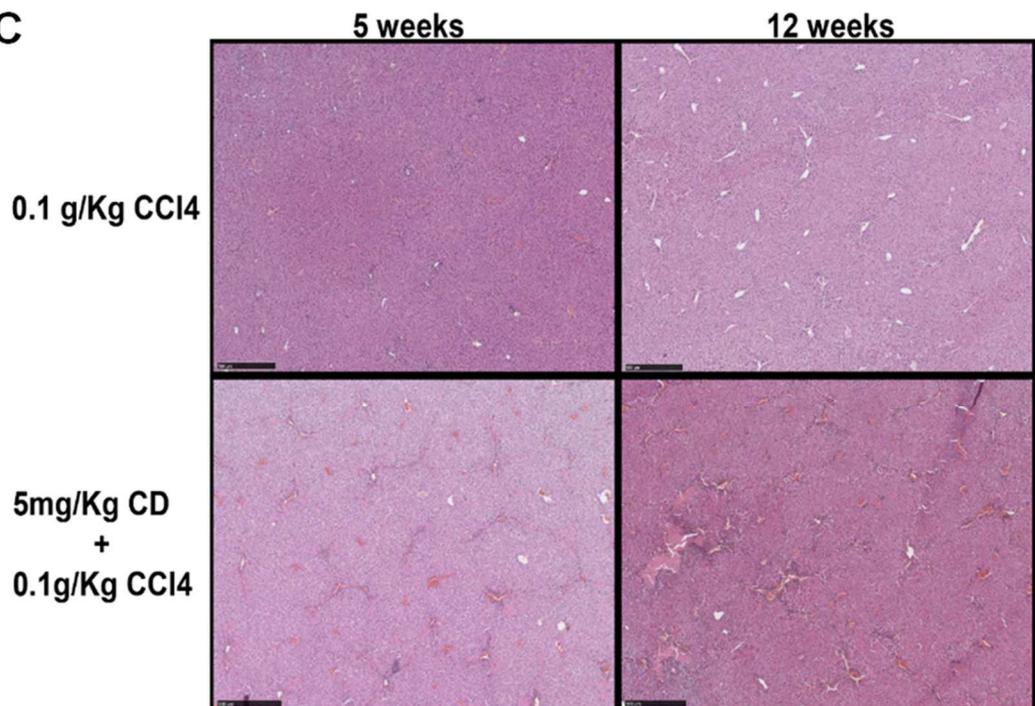


Figure 2

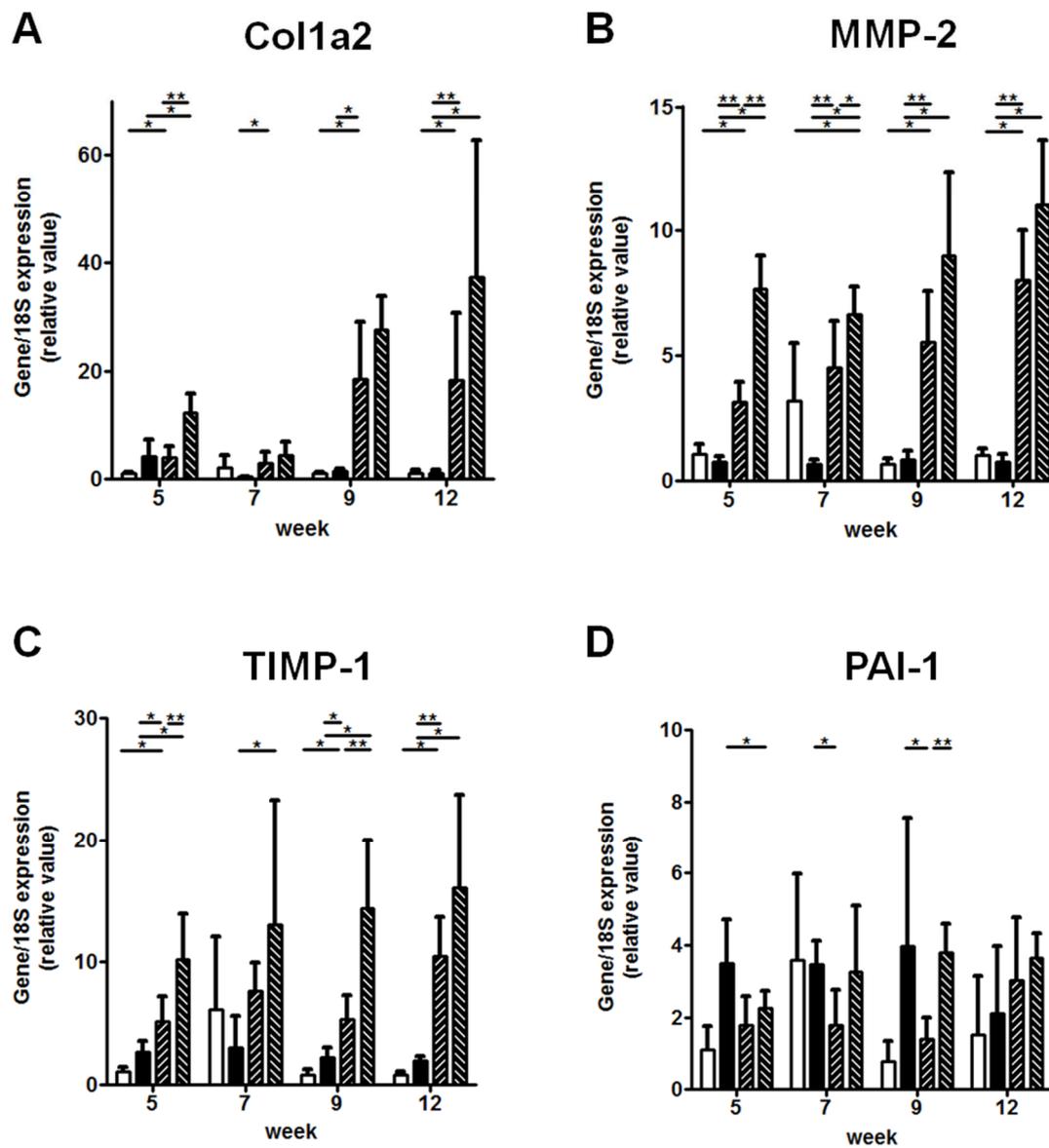
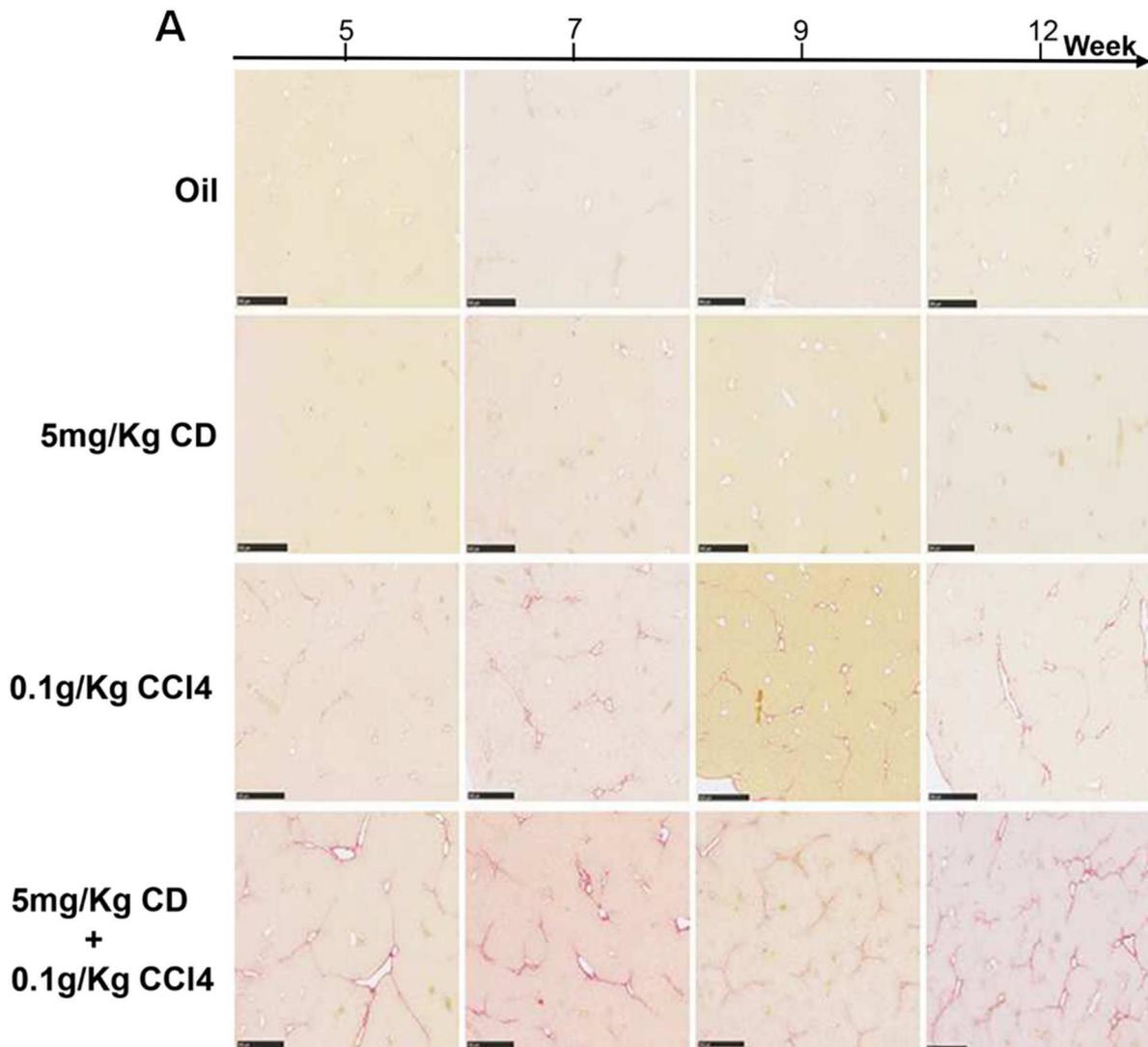


Figure 3



B

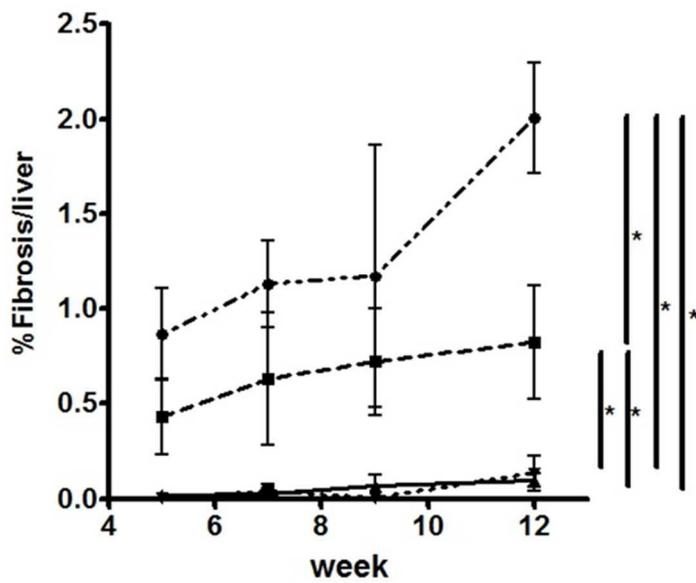


Figure 4

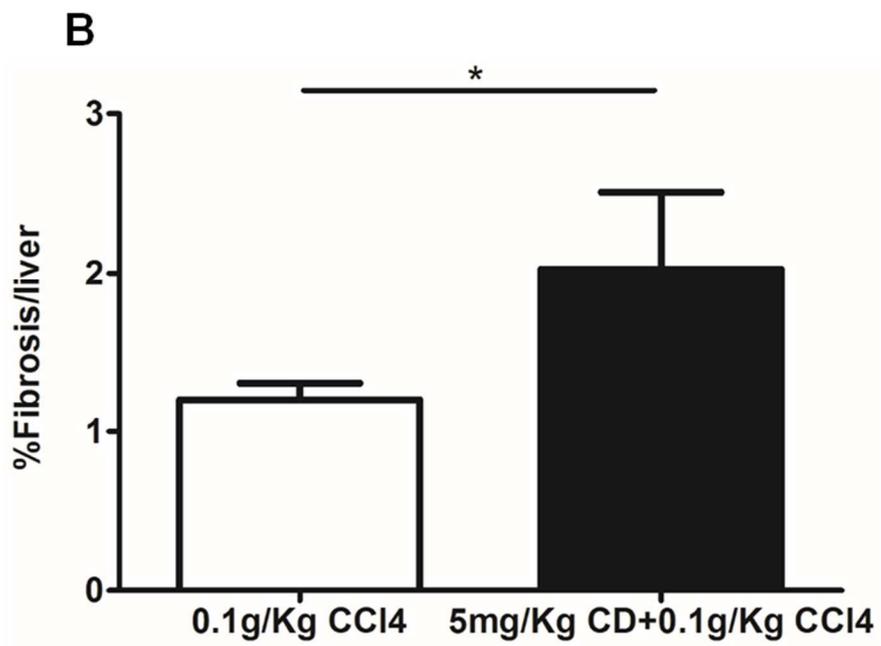
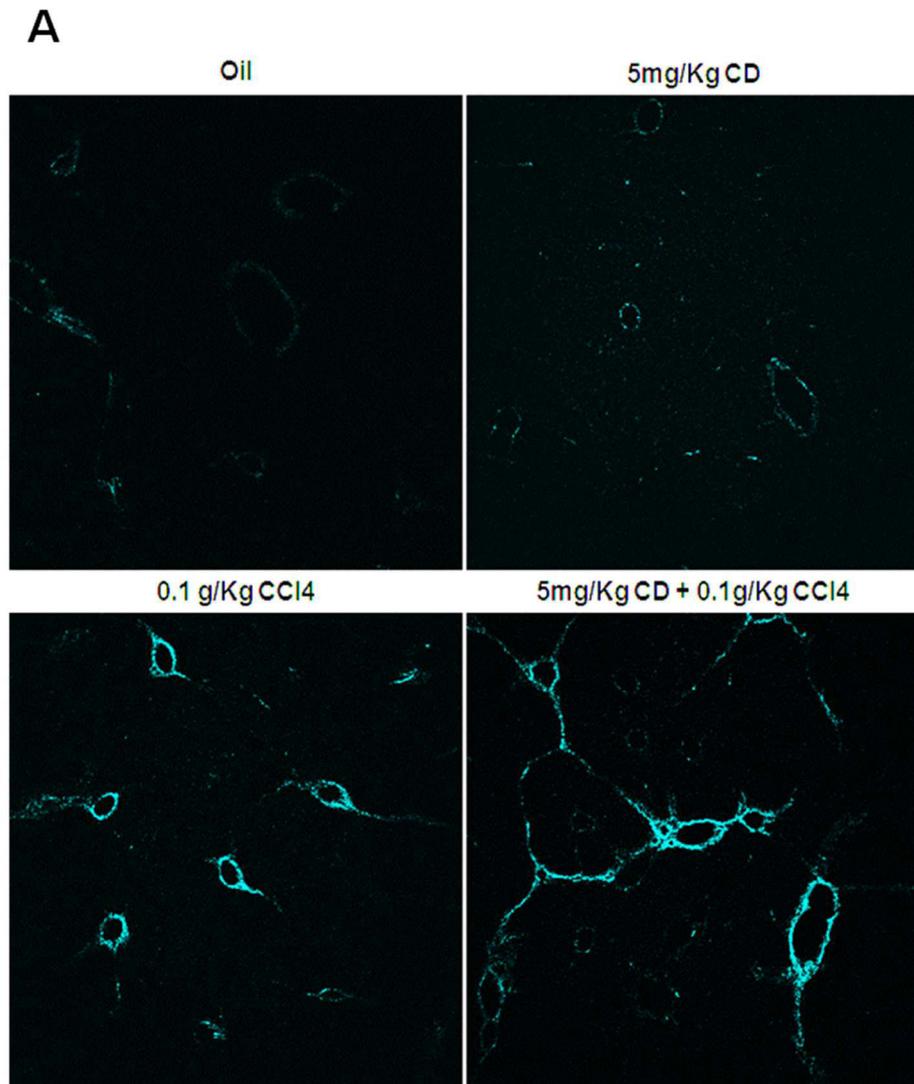


Figure 5

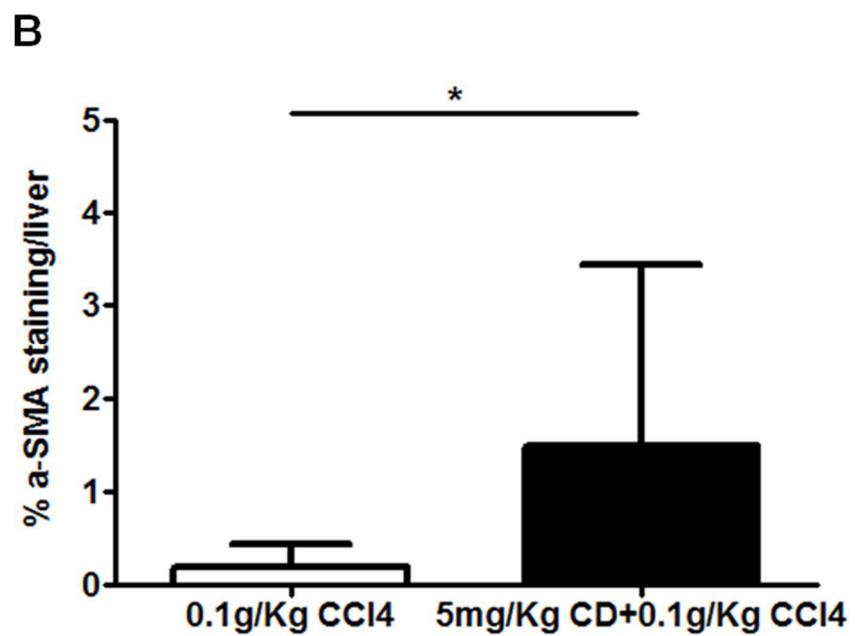
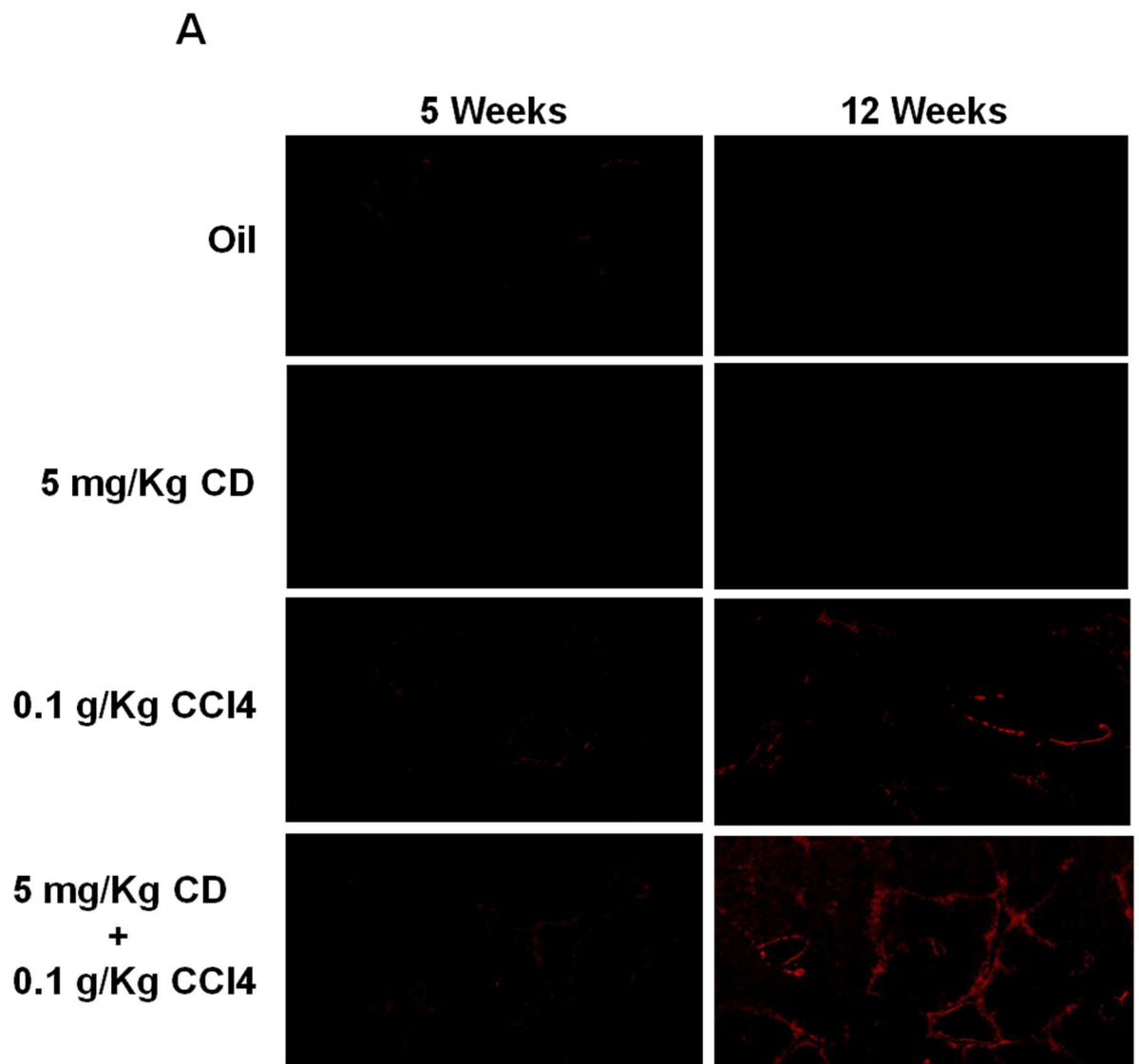


Figure 1S

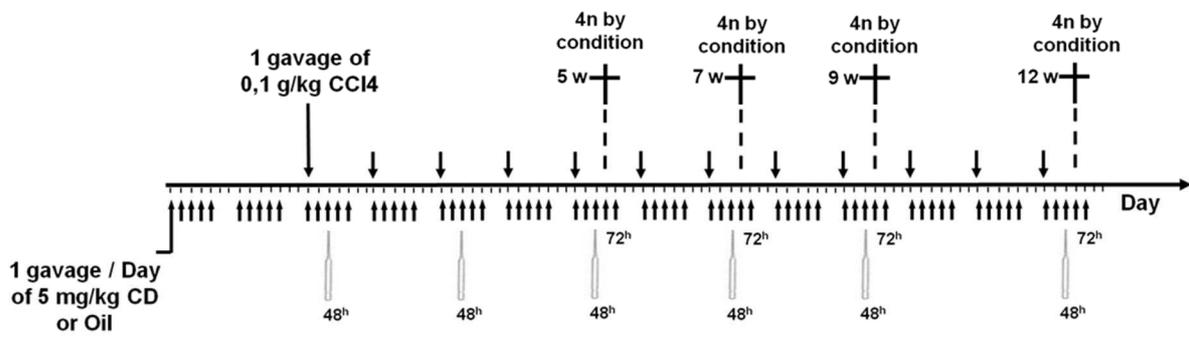


Figure 1S: Schematic diagram representing the experimental protocol. Mice were given a daily oral gavage of 5mg/Kg of CD or oil. After 10 days of pre-treatment mice received, weekly, one challenge of 0.1 g/Kg of CCl₄ or oil and continued to receive their daily dose of CD. Mice blood was collected at 48h and 72h after every CCl₄ administration and at 5, 7, 9 or 12 weeks of the study mice were killed to analyse the liver damage occurred.

Figure 2S

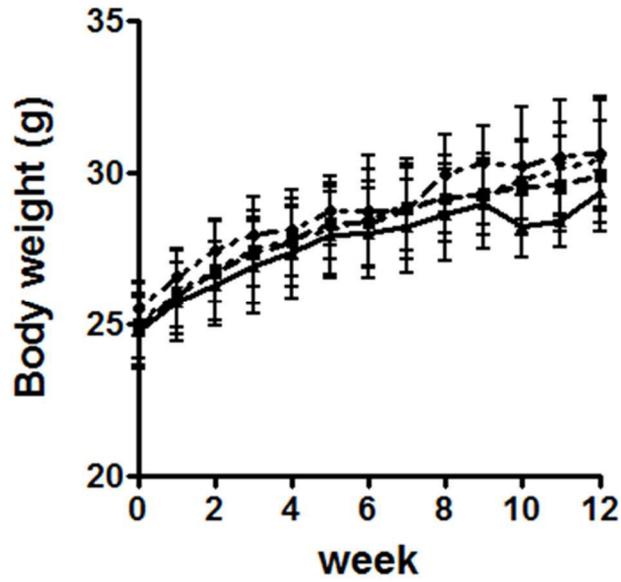


Figure 2S: Body weight curves of mice. The body weight of all mice used was measured one time per week during the 12 weeks of the study and the different groups of mice are represented as for oil, for CD, for CCl4 and for CD+CCl4. data represents means \pm SD of four animals in each group.

Figure 3S

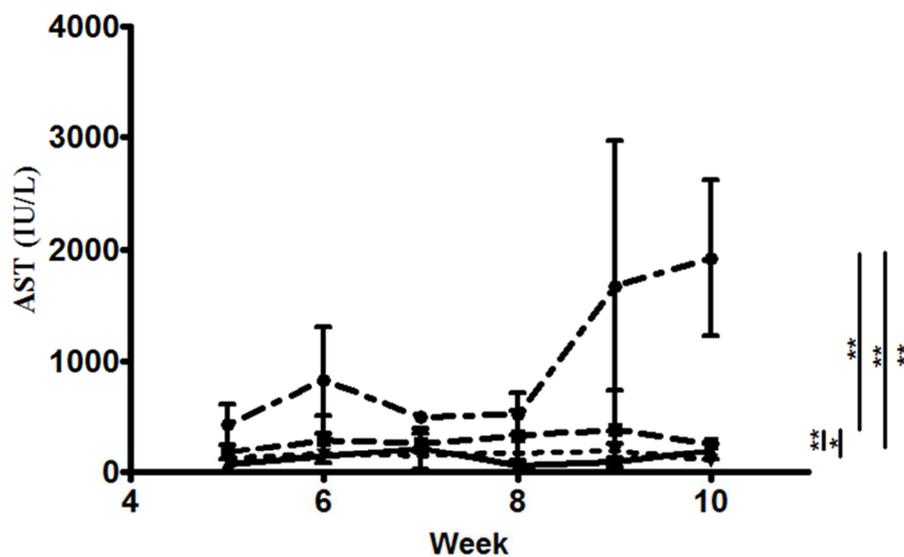


Figure 3S: Levels of AST (IU/L) measured in mice serum after 48h of the challenge with CCl4. Different groups of treatment are shown as for oil, for CD, for CCl4 and for CD+CCl4. Data represents means \pm SD of four animals in each group and p-values from statistical Mann-Whitney test shows significant differences between groups (*P<0.05; **P<0.01).

Article III

Localisation et quantification absolue *in situ*, du chlordécone, dans le foie de souris par imagerie MALDI

Mélanie Lagarrigue, Régis Lavigne, Elise Tabet, Valentine Genet, Jean-Pierre Thomé, Karine Rondel, Blandine Guével, Luc Multigner, Michel Samson et Charles Pineau.

Manuscrit publié le 16/05/2014 dans « Analytical Chemistry »

Introduction

Les développements réalisés dans le domaine de la spectrométrie de masse et plus particulièrement sur le plan instrumental ont permis il y a une dizaine d'années l'émergence de nouveau développement d'analyse directe sur tissus ou sur cellules par « matrix assisted laser desorption/ionization time of flight » (MALDI-TOF). En effet, ces analyses ont permis, tout en s'affranchissant des lourdes étapes d'extraction, purifications et séparation, d'obtenir directement les profils d'expression cellulaires sans perdre la localisation des composés au sein du tissu.

Ainsi, les images sont obtenues par ionisation de l'échantillon grâce à un faisceau laser qui parcourt toute la coupe de tissu. Après acquisition des données, un logiciel permet de sélectionner des gammes de masse correspondant à des molécules d'intérêt et de reconstruire des images de localisation. Chaque point correspondra à 1 pixel de l'image et la distance entre chaque point définira la résolution latérale de l'image.

Le chlordécone, pesticide organochloré, est connu pour son accumulation préférentielle dans le foie et présente un profil de spectrométrie de masse très caractéristique qui semble très adapté à une identification au sein d'un tissu. A ce jour, aucune technique d'imagerie n'avait été mise en œuvre pour visualiser la présence du chlordécone dans un tissu.

Dans cette étude nous avons examiné la localisation *in situ* du chlordécone dans des foies de souris exposées au chlordécone ainsi que dans des foies de souris co-exposés au chlordécone et à un agent hépatotoxique, le tétrachlorure de carbone, induisant une nécrose hépatique.

Brièvement, une coupe de foie a été fixée sur un support conducteur, recouverte par une matrice de désorption/ionisation adaptée au chlordécone, puis irradiée par un laser de la source d'ionisation MALDI. Chaque spot irradié a généré un spectre de masse à partir duquel la quantification du chlordécone a été faite. Une fois toute la coupe irradiée, l'image moléculaire du tissu a été reconstituée permettant ainsi la localisation du chlordécone au sein du foie.

Notre avons contribué à ce travail en faisant les expériences toxicologiques sur les souris. Les foies utilisés dans cette étude provenaient des souris que nous avons gavées avec du chlordécone pendant 1, 2, 5, 10 ou 25 jours.

Cette étude a permis de montrer que le foie continue à accumuler le chlordécone même après un temps long d'exposition (25 jours). Son contenu en chlordécone est proportionnel à la quantité à laquelle il est exposé. Plus les souris recevaient de gavages au chlordécone, plus la quantité séquestrée dans le foie était élevée. En outre, la localisation du chlordécone par l'imagerie MALDI a bien montré sa distribution homogène dans le tissu. En revanche, la nécrose des cellules hépatiques empêche son accumulation, puisque les zones nécrotiques des foies présentaient des quantités de chlordécone beaucoup moins élevées que le reste du parenchyme hépatique non altéré.

Cette technique de localisation des substances chimiques dans un tissu, ouvre les portes pour une meilleure compréhension de leurs toxicités ainsi que de leurs interactions avec d'autres molécules dans le même tissu. Enfin, cette technique pourrait être mise en œuvre pour localiser et quantifier le chlordécone dans d'autres tissus affectés par sa toxicité, comme les testicules, les reins, le tissu adipeux.

Localization and in Situ Absolute Quantification of Chlordecone in the Mouse Liver by MALDI Imaging

Mélanie Lagarrigue,^{†,‡,#} Régis Lavigne,^{†,‡,#} Elise Tabet,^{‡,‡,#} Valentine Genet,^{†,‡,#} Jean-Pierre Thomé,[§] Karine Rondel,^{†,‡,#} Blandine Guével,^{†,‡,#} Luc Multigner,^{||} Michel Samson,^{‡,‡,#} and Charles Pineau^{*,†,‡,#}

[†]Proteomics Core Facility Biogenouest, Inserm U1085, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, Campus de Beaulieu, Université de Rennes 1, F-35042 Rennes, France

[‡]Hepatotropic Infectious Agents And Environmental Cofactors Team, Inserm U1085, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, Campus de Villejean, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

[§]Laboratory of Animal Ecology and Ecotoxicology, Centre for Analytical Research and Technology, University of Liege, B-4000 Liège, Belgium

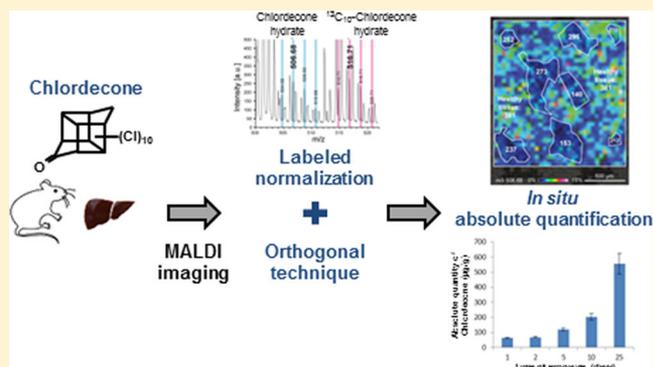
^{||}Epidemiological Research on Environment, Reproduction and Development, Inserm U1085, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, Campus de Fouillole, Université de Rennes 1, F-97154 Pointe-à-Pitre, France

[‡]Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

[#]Fédération de Recherche BioSit de Rennes, F-35043 Rennes, France

Supporting Information

ABSTRACT: Chlordecone is an organochlorine pesticide that was extensively used in the French West Indies to fight weevils in banana plantations from 1973 to 1993. This has led to a persistent pollution of the environment and to the contamination of the local population for several decades with effects demonstrated on human health. Chlordecone accumulates mainly in the liver where it is known to potentiate the action of hepatotoxic agents. However, there is currently no information on its in situ localization in the liver. We have thus evaluated a matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging quantification method based on labeled normalization for the in situ localization and quantification of chlordecone. After validating the linearity and the reproducibility of this method, quantitative MALDI imaging was used to study the accumulation of chlordecone in the mouse liver. Our results revealed that normalized intensities measured by MALDI imaging could be first converted in quantitative units. These quantities appeared to be different from absolute quantities of chlordecone determined by gas chromatography (GC), but they were perfectly correlated ($R^2 = 0.995$). The equation of the corresponding correlation curve was thus efficiently used to convert quantities measured by MALDI imaging into absolute quantities. Our method combining labeled normalization and calibration with an orthogonal technique allowed the in situ absolute quantification of chlordecone by MALDI imaging. Finally, our results obtained on the pathological mouse liver illustrate the advantages of quantitative MALDI imaging which preserves information on in situ localization without radioactive labeling and with a simple sample preparation.



Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging is increasingly recognized as a very promising technique to support distribution studies of small molecules (<1000 Da).¹ Indeed, MALDI imaging presents particularly interesting advantages over quantitative whole-body autoradiography (QWBA) that is currently the most widely used technique for studying the distribution of small molecules in situ. First, MALDI imaging does not require the use of radioactive labeled compounds that involve very expensive and time-consuming developments, adapted equipment for their manipulation, and specific treatment of radioactive wastes. Interestingly, contrary to QWBA, MALDI imaging allows the in

situ differentiation of the compound of interest from its metabolites. Finally, lateral resolution of MALDI imaging can go down to 20 μm in routine workflows² and is consequently better than the typical resolution of QWBA which is around 100 μm .

Quantification methods are a prerequisite for the development of MALDI imaging for distribution studies. However, quantification by MALDI imaging is intrinsically challenging.³

Received: January 24, 2014

Accepted: May 16, 2014

Published: May 16, 2014

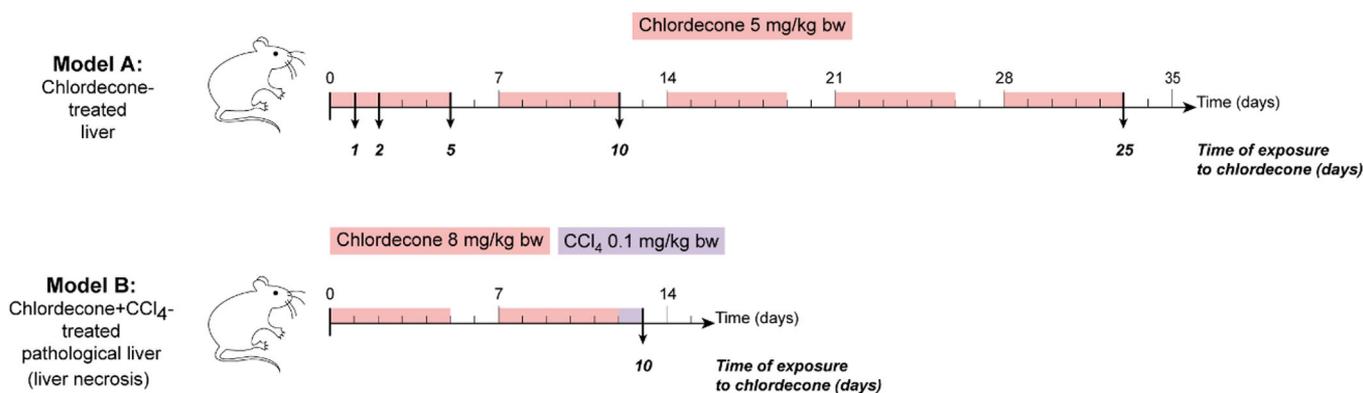


Figure 1. Two different murine models of exposure to chlordecone were developed. Model A was developed to study the accumulation of chlordecone in the mouse liver: mice were exposed to chlordecone at 5 mg/kg bw during 1, 2, 5, 10, or 25 days. Model B was developed to study the localization of chlordecone in a pathological liver: liver necrosis was induced after 10 days of exposure to chlordecone at 8 mg/kg bw by the introduction of CCl₄ at 0.1 mg/kg bw. All mice were sacrificed 72 h after the last gavage with chlordecone.

The first major difficulty is that the intensity of an analyte detected by MALDI imaging does not only depend on its absolute quantity but can also be affected by several parameters. Thus, important signal variations can be observed due to the heterogeneity of matrix crystallization. Moreover, the intensity of an analyte detected by mass spectrometry is influenced by the presence of other molecular species in the sample, leading to ion suppression effects. These ion suppression effects are particularly complex during a MALDI imaging experiment because they can vary across the tissue section depending on the local molecular composition of the different anatomical structures. The second difficulty of quantitative MALDI imaging is to understand what is really quantified. Indeed, during matrix deposition, analytes are extracted from the thickness toward the surface of the tissue section. Depending on the physicochemical properties of the analyte and the solvent composition of the matrix solution it is very difficult to assess the efficiency of such extraction. Moreover, it is very difficult to know whether extracted analytes are totally desorbed during the MALDI ionization process.

Despite these difficulties, different methods have been developed over the past years to obtain quantitative information from MALDI imaging data, among which methods with and without internal standard can be distinguished. It is noteworthy that only methods with internal standard can really correct for the heterogeneity of matrix crystallization and for the variation of ion suppression effects across the tissue section. The vast majority of approaches developed for the quantification of small molecules by MALDI imaging have been developed for the quantification of drugs.^{4–9} There are also few applications to endogenous species such as peptide,⁶ lipids,¹⁰ or acetyl-L-carnitine,^{11,12} but quantitative MALDI imaging has never been applied to the quantification of pesticides, one of which can severely impact human health.

Chlordecone (CAS no. 143-50-0) is an organochlorine molecule with a molar mass of 490.64 g/mol and a molecular formula C₁₀Cl₁₀O. Despite its prohibition by the United States in 1976, it has mainly been used as an agricultural pesticide and particularly to control the banana root borer from 1973 to 1993 in the French West Indies. Chlordecone undergoes no significant biotic or abiotic degradation in the environment.¹³ As a consequence, permanently polluted soils and waterways have been and are still these days the major sources of human contamination in French West Indies, through the con-

sumption of contaminated and locally produced foodstuffs.^{14,15} Recent studies have demonstrated that chlordecone exposure at environmentally relevant levels is associated with a significant increase in the risk of prostate cancer¹⁶ and that prenatal exposure is associated with a decreased length of gestation¹⁷ as well as negative effects on cognitive and motor development of 7 and 18 months old infants.^{18,19} After oral exposure, chlordecone is well-absorbed and distributed throughout the body, has a long half-life, and disappears more slowly from the liver than from other tissues.^{20,21} Chlordecone is not metabolized in rodents.^{20,21} However, in humans, chlordecone alcohol is formed by reduction of the hydrated carbonyl group.^{2,22} Then, chlordecone alcohol or chlordecone is excreted in bile. A distinctive feature of chlordecone distribution in both humans and rats^{20,21} is that the highest concentration is found in liver and not in body fat, as might be expected considering its relatively high octanol–water partition coefficient (K_{ow} 5.41).²³ Even if chlordecone is not considered as hepatotoxic, it is known to potentiate the deleterious action of hepatotoxic agents in rodents.^{24,25}

The aim of our study was to evaluate MALDI imaging as a tool for the in situ localization and quantification of chlordecone in the mouse liver where it is expected to be present in important quantities following exposure. To our knowledge, this is the first example of application of MALDI imaging for the quantification of a pesticide. Moreover, to date, no information was available on the in situ localization of chlordecone in the liver. Indeed, the distribution of chlordecone has been studied by radioactivity measurements²¹ or by gas chromatography (GC) analysis^{26,27} performed on tissue homogenates. These techniques are very powerful and sensitive, but information concerning the in situ localization of chlordecone within tissues is lost. Our quantification method is inspired from the approach developed by Kallback et al.⁶ and is based on the use of chlordecone labeled with nonradioactive isotopes (¹³C) as internal standard. Here, we demonstrate that this method, when combined with conventional quantification techniques performed on tissue homogenates, allows the measurement of in situ absolute quantities from MALDI imaging experiments. Here, in situ absolute quantification was successfully used to determine the accumulation profile of chlordecone in the mouse liver and for the study of chlordecone localization in the pathological mouse liver.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. All chemicals were of the highest purity obtainable. Acetonitrile (ACN), acetone, *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile (DCTB), and chlordecone were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). $^{13}\text{C}_{10}$ -Chlordecone was obtained from Euriso-top (Gif sur Yvette, France). *n*-Hexane, dichloromethane, and diethyl ether were purchased from Biosolve-Chimie (Dieuze, France). Certified analytical standards of chlordecone, PCB112 used as surrogate, and PCB209 used as internal standard for injection volume correction were purchased from Dr. Ehrenstorfer, (Augsburg, Germany).

Animals. Two different murine models of exposure to chlordecone were developed for this study (Figure 1). For model A, corresponding to chlordecone-treated mice liver, male C57Bl/6 mice (6–8 weeks old, Janvier, Le Genest-sur-isle, France) were exposed to chlordecone at 5 mg/kg of body weight (bw) by daily gavage with alimentary virgin olive oil containing chlordecone at 0.625 g/L. The following weekly scheme of gavage was used: 5 consecutive days of gavage, then 2 days without gavage. Mice were thus exposed to chlordecone at 5 mg/kg bw for 1, 2, 5, 10, or 25 days. For model B corresponding to chlordecone and CCl_4 treated mice with a pathological liver presenting liver necrosis, mice were exposed to chlordecone at 8 mg/kg bw by daily gavage with oil containing chlordecone for 10 days. Mice were then subjected to a gavage with CCl_4 at 0.1 mg/kg bw. Mice from both models were sacrificed 72 h after the last gavage with chlordecone. Control livers were obtained from mice subjected to daily gavage with oil that did not contained chlordecone. Immediately upon collection, livers were loosely wrapped in aluminum foil and snap-frozen in liquid nitrogen. Livers were then stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until required to avoid the degradation of biological components.

Tissue Preparation. Liver sections 12 μm thick were prepared on a Leica CM3050 S cryostat (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) with the microtome chamber chilled at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ and the specimen holder at $-11\text{ }^\circ\text{C}$. Liver sections were then thaw-mounted onto indium–tin oxide (ITO)-coated microscopic slides (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) adapted for MALDI mass spectrometry. On each ITO slide, a control liver section was mounted next to the liver section exposed to chlordecone. After thaw mounting, ITO slides were allowed to dry for 45 min in a desiccator. Serial cryosections were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Serial dilutions of chlordecone were prepared in ACN/ H_2O (40/60, v/v) for calibration. Before each matrix deposition, these freshly prepared calibration solutions were manually spotted (0.2 μL) onto the control liver section and corresponded to chlordecone quantities of 0, 1, 2, 4, 8, 15, and 20 pmol/spot that can also be expressed in 0, 0.5, 1, 2, 3.9, 7.4, and 9.8 ng/spot. $^{13}\text{C}_{10}$ -Chlordecone was introduced at a final concentration of 8 pmol/ μL in the matrix solution composed of DCTB at 7 mg/mL in acetone/ACN/ H_2O (60/30/10, v/v/v). The matrix solution containing the internal standard was uniformly sprayed on the ITO slide using the ImagePrep device (Bruker Daltonik GmbH) according to a specifically adapted protocol (Supporting Information).

MALDI Imaging Acquisition. MALDI mass spectra were acquired on an UltrafleXtrem MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH) in reflectron negative-ion mode and in the mass range of 400–1000 Da. Acceleration voltage was set to 20

kV, and deflection up to 400 m/z was employed to suppress matrix and other low molecular weight signals. An internal calibration was performed before each experiment using the m/z 499.285 and the m/z 516.713, corresponding to the $[\text{M}_2 - \text{H}]^-$ matrix peak and the $[\text{M} + \text{OH}]^-$ $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone, respectively. For image acquisition, a 50 or 100 μm raster width was selected and 1000 individual mass spectra were acquired at 2000 Hz repetition rate and accumulated for each pixel. Selection of regions of measurements and visualization of images were performed with the FlexImaging 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH). Raw data are available on the openMSI repository²⁸ (<https://openmsi.nersc.gov>).

The identity of chlordecone hydrate detected on exposed tissue sections was confirmed by tandem mass spectrometry (MS/MS) spectra acquired with the UltrafleXtrem mass spectrometer operating in the LIFT mode. Obtained fragment ions were first accelerated to 7 kV then to 19 kV. MS analyses were also performed on a SolariX 12 T FTICR mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH) calibrated externally and operating in the negative ionization mode with 300 laser shots per scan and a resolution of 300 000.

Calculation of the Calibration Curve and Quantification. After acquisition of MS spectra, regions of interest (ROIs) corresponding to the different calibration spots deposited on the control section and to the analyzed area of the exposed section were defined with FlexImaging. Corresponding raw mass spectra were then processed by the msIQuant software⁶ available on the <http://www.maldi-msi.org> Web site. After baseline correction, smoothing, and recalibration, the intensity of the m/z 506.68 ion corresponding to chlordecone hydrate was normalized on the intensity of the m/z 516.71 ion corresponding to $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone hydrate uniformly present on the sections. An average spectrum was then calculated for each defined ROI corresponding to the calibration spots on control section and to the analyzed area on the exposed section.

The calibration curve was calculated by reporting the normalized intensity of chlordecone hydrate (m/z 506.68) detected on the calibration spots as a function of the quantity of chlordecone ranging from 1 to 20 pmol/spot (or 0.5–9.8 ng/spot). The normalized chlordecone hydrate intensity detected on the exposed section was converted in chlordecone quantity using the equation of the calibration curve. The quantity of chlordecone can be expressed with different units. Here, we have chosen to convert all values in micrograms per gram which is the unit commonly used in toxicology. The quantity of chlordecone initially expressed in picomoles per spot or in nanograms per spot was first converted to nanograms per square meter by calculating the average area of the calibration spots. This average area was calculated by multiplying the average number of pixels in the calibration spots (equal to the average number of MS spectra acquired) with the x and y resolution. The quantity of chlordecone expressed in nanograms per square meter was then converted to nanograms per cubic meter by dividing this value by the thickness of the tissue section (12 μm). Assuming that the density of a mouse liver is 1 g/cm^3 , the quantity of chlordecone was converted into micrograms per gram.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the Detection of Chlordecone by MALDI Imaging. Due to its peculiar chemical structure, chlordecone cannot be directly ionized by MALDI mass

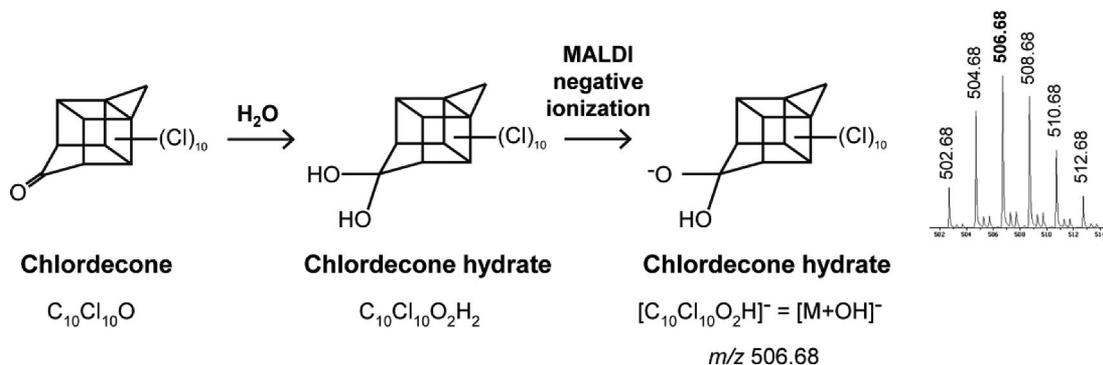


Figure 2. Chlordecone is readily converted in a chlordecone hydrate form that can be detected by MALDI mass spectrometry in the negative ionization mode at m/z 506.68 (maximum intensity of the isotope pattern).

spectrometry. However, it is known that chlordecone is readily converted into a chlordecone hydrate form²⁹ (Figure 2). Chlordecone was thus detected by MALDI mass spectrometry under its chlordecone hydrate form and only in the negative ionization mode. The maximum intensity was observed at m/z 506.68 in the very specific isotope pattern of chlordecone hydrate (Figure 2). It is interesting to note that chlordecone is also detected under this chlordecone hydrate form with other ionization techniques such as electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI).³⁰ However, there is no information available on the conversion yield of chlordecone into chlordecone hydrate.

In order to assess the detectability of chlordecone in a mouse liver section, first MALDI imaging experiments were performed on liver sections coming from mice exposed to chlordecone at 5 mg/kg bw for 10 days (model A, in Figure 1). After matrix deposition with the spraying device, MS spectra were acquired with a lateral resolution of 100 μm . The specific isotope pattern of chlordecone hydrate was detected on the liver section with a maximum intensity at m/z 506.68. In order to confirm the identity of the m/z 506.68 ion, MS/MS analyses were performed using the LIFT mode of the UltrafleXtrem mass spectrometer. The specific fragment of chlordecone hydrate was observed at m/z 426.688 on the MS/MS spectrum.³⁰ MS spectra were also acquired with a Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) mass spectrometer at a resolution of 300 000. With such resolving power, chlordecone hydrate was the only possibility that can be attributed to the isotope pattern observed at m/z 506.68 (Figure 2) with 2.9 ppm of error using the formula solver. These results confirmed the identity of chlordecone hydrate detected at m/z 506.68 on the liver sections. It should be noted that chlordecone is not metabolized in rodents.²¹ No chlordecone metabolites were thus detected on the mouse liver sections.

Choice of the Method Used for the Quantification of Chlordecone by MALDI Imaging. Methods developed for the quantification of small molecules by MALDI imaging can be divided in two types: the methods with and the methods without an internal standard. In some methods without an internal standard, authors assume that the quantity of an analyte detected on a tissue section by MALDI imaging can be calculated from calibration curves correlating the analyte intensity to known amounts of analyte deposited either on a control tissue section⁸ or on the ITO slide via the calculation of a tissue extinction coefficient (TEC).⁵ Koeniger et al.⁷ demonstrated that, without internal standard, the intensity of an analyte detected by MALDI imaging could be correlated to

its absolute quantity measured by LC–MS in a pool of serial sections. These methods without internal standard can provide good results for the quantification of small molecules in tissues with homogeneous anatomical structures. However, these do not take into consideration the signal variations due to the heterogeneity of matrix crystallization or to variable ion suppression effects that can be observed across the tissue section. The variability of the results is thus more important in highly structured tissues such as the brain, the kidney, or the lung.^{5,11} Only quantification methods with internal standard can really correct signal variations due to the heterogeneity of matrix crystallization or to the variation of ion suppression effects across the tissue section.¹¹ On the basis of conventional techniques used for the absolute quantification of small molecules by mass spectrometry, the ideal internal standard for quantitative MALDI imaging is the analyte labeled with stable isotopes (D, ¹³C, ¹⁵N, etc.). This isotope-labeled internal standard has the same physicochemical and ionization properties as the analyte and is thus subjected to the same ion suppression effects across the tissue section and to the same irregularities of matrix crystallization.

Different quantification methods by MALDI imaging based on the use of an isotope-labeled internal standard have been described. With these approaches, the results strongly depend on the method used for the deposition of the internal standard. In the quantification method developed by Pirman et al., the isotope-labeled internal standard is deposited directly onto the ITO slide using a microspotter, prior to tissue fixation.^{9,11,12} In the method developed by Kallback et al.,⁶ the isotope-labeled internal standard is introduced in the matrix solution and further deposited on the tissue section using a spraying device. Pirman et al.¹¹ and Kallback et al.⁶ have both demonstrated that the analyte intensity could be efficiently normalized on the intensity of the internal standard, leading to excellent linearity and reproducibility of the quantification method. Kallback et al.⁶ have also demonstrated that the labeled normalization led to a lower deviation between neighboring pixels than other common normalization techniques (TIC, RMS, etc.) and compensated for false ion signals in empty areas of the tissue section. Even if Pirman et al.^{9,12} obtained very interesting results, the approach of Kallback et al.⁶ is particularly attractive because the deposition of the internal standard is very simple and compatible with high-resolution MALDI imaging. Moreover, a software (msIQuant) was developed by Kallback et al.⁶ to assist the labeled normalization and can be downloaded freely. We have thus selected this approach for the development

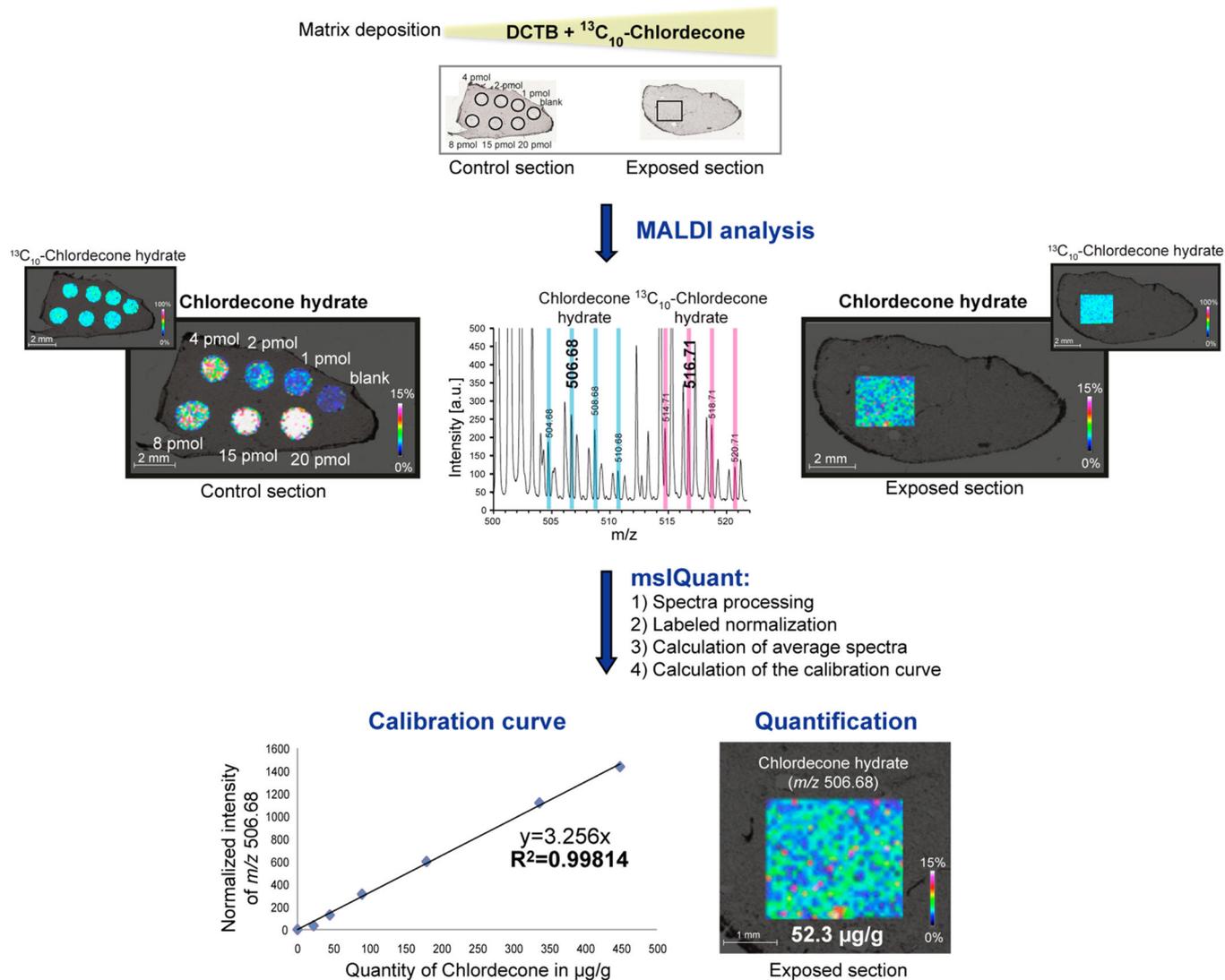


Figure 3. Quantification of chlordecone in the mouse liver (model A) after an exposure of 10 days at 5 mg/kg bw. Different amounts of chlordecone (from 1 to 20 pmol/spot corresponding to 0.5–9.8 ng/spot) were manually spotted on a control section mounted next to an exposed section. The internal standard (¹³C₁₀-chlordecone) was added in the matrix solution (DCTB) and uniformly deposited on the sections using a spraying device. After MALDI imaging acquisition, ROIs corresponding to the calibration spots on the control section and to the analyzed area of the exposed section were defined in FlexImaging. All MS spectra corresponding to each ROI were then processed by the msIQuant software. Labeled normalization consisting in the normalization of the intensity of chlordecone hydrate detected at *m/z* 506.68 to the intensity of ¹³C₁₀-chlordecone hydrate detected at *m/z* 516.71 was then performed. An average normalized MS spectrum was then calculated by msIQuant for each ROI. The normalized intensity of the *m/z* 506.68 ion detected on each calibration spot was reported as a function of the amount of chlordecone deposited on the control section expressed in micrograms per gram in order to calculate a calibration curve. Using the equation of the calibration curve, the normalized intensity of the *m/z* 506.68 ion detected on the exposed section was converted in a quantity of chlordecone expressed in micrograms per gram.

of our method for the quantification of chlordecone by MALDI imaging in the mouse liver.

Evaluation of the Linearity, Reproducibility, and Sensitivity of Chlordecone Quantification by MALDI Imaging in the Mouse Liver. First experiments of chlordecone quantification by MALDI imaging were performed on a liver section coming from a mouse exposed to chlordecone at 5 mg/kg bw for 10 days (model A, in Figure 1). Serial dilutions of chlordecone were manually spotted onto a control section mounting next to the exposed section (Figure 3). Then, the ¹³C₁₀-chlordecone internal standard was introduced in the matrix and uniformly deposited on the liver sections with the spraying device. MALDI imaging acquisition was then performed with a lateral resolution of 100 µm on the different calibration spots and on the exposed section. The internal

standard was uniformly detected under its ¹³C₁₀-chlordecone hydrate form at *m/z* 516.71 on both sections (Figure 3). As expected, chlordecone hydrate detected at *m/z* 506.68 presented increasing intensities with increasing amounts of chlordecone on the control section and seemed to be relatively homogeneously located on the section exposed for 10 days to chlordecone at 5 mg/kg bw. The msIQuant software was then used for the processing of MS spectra, for normalization on the internal standard, and for the calculation of an average spectrum for each ROI. Normalized intensities corresponding to each calibration spot were then used to calculate the calibration curve. The linearity of the calibration curve was excellent on the calibration range with an *R*² of 0.9981 (Figure 3). Using the equation of this calibration curve, the normalized intensity of the chlordecone hydrate detected on the analyzed

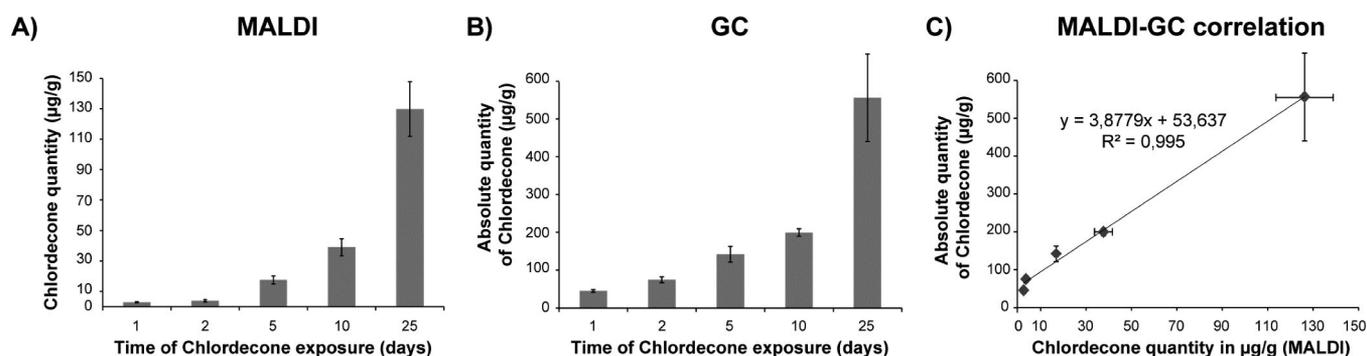


Figure 4. Accumulation profiles of chlordecone (5 mg/kg bw) in the mouse liver after 1, 2, 5, 10, or 25 days obtained (A) by quantitative MALDI imaging and (B) by GC analysis. (C) The quantity of chlordecone measured by MALDI imaging can be correlated to the absolute quantity of chlordecone measured by GC using the equation of the correlation curve. Error bars represent the standard deviation of the mean values.

area of the exposed section was correlated to a chlordecone quantity of 52.3 µg/g (Figure 3).

In order to assess the reproducibility of chlordecone quantification by MALDI imaging, this quantification experiment was repeated six times. For each technical replicate, serial sections coming from the control liver and from the liver section exposed for 10 days to chlordecone at 5 mg/kg bw were mounted on six different ITO slides. The deposition of serial dilutions of chlordecone on the control section was repeated for each ITO slide. For all experiments, the linearity of the calibration curves was excellent on the calibration range with an R^2 ranging from 0.9807 to 0.9981. The average quantity of chlordecone detected on the section exposed for 10 days to chlordecone at 5 mg/kg bw was of 52.1 µg/g ($n = 6$) with a very satisfactory relative standard deviation (RSD) of 10.2%. The average slope of the six calibration curves was 3.1801 with a relative standard deviation of 19.6%.

The linearity and the reproducibility achieved with this method for the quantification of chlordecone in the mouse liver are in good accordance with those reported by Kallback et al.⁶ for the quantification of olanzapine in the mouse brain or by Pirman and Yost¹² for the quantification of acetyl-L-carnitine in the piglet brain. These results obtained on very different molecules and organs tend to confirm the efficiency of this kind of quantification approaches based on labeled normalization. The low RSD of our quantification results also reflects a good reproducibility of both the chlordecone extraction from the thickness toward the surface of the tissue section during matrix deposition with the spraying device and the chlordecone desorption during MALDI ionization process. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were estimated at 1.2 µg/g ($S/N = 3$) and 3.9 µg/g ($S/N = 10$). The sensitivity of MALDI imaging is thus largely lower than the sensitivity of GC analyses that are typically used for the quantification of chlordecone (LOD and LOQ were 0.02 and 0.06 ng/g, respectively). However, MALDI imaging preserves information concerning the in situ localization of chlordecone with a very simple sample preparation.

Study of Chlordecone Accumulation in the Mouse Liver by MALDI Imaging. On the basis of the quality of the results obtained in terms of linearity and reproducibility, we decided to evaluate quantitative MALDI imaging for the study of chlordecone accumulation in the mouse liver. Livers coming from three mice exposed for 1, 2, 5, 10, or 25 days to chlordecone at 5 mg/kg bw (model A, Figure 1) were prepared for quantitative MALDI imaging experiments. For each time of exposure, three liver sections coming from three different mice

were mounted on the same ITO slide next to a control section used for calibration. MALDI imaging acquisitions were performed with a lateral resolution of 100 µm, and MS spectra were treated as described previously. The following quantities of chlordecone were measured by quantitative MALDI imaging: 2.9 ± 0.3 µg/g after 1 day (this value is lower than the LOQ of MALDI imaging and thus is just indicative), 3.9 ± 0.8 µg/g after 2 days, 17.6 ± 2.6 µg/g after 5 days, 39.0 ± 5.6 µg/g after 10 days, and 129.8 ± 18 µg/g after 25 days. The corresponding accumulation profile is reported in Figure 4A and reveals that chlordecone still accumulates in the mouse liver after 25 days of exposure to chlordecone at 5 mg/kg bw.

As evocated previously, complex extraction and desorption processes occur during MALDI imaging experiments and raise difficult questions about what is really quantified. Pirman et al.⁹ and Kallback et al.⁶ found that quantities of cocaine and olanzapine⁶ determined by quantitative MALDI imaging are relatively close to absolute quantities measured with other techniques. However, depending on the physicochemical properties of the studied molecule, it is difficult to know whether its extraction and desorption from the tissue are complete or not. The comparison of the quantities determined by MALDI imaging with absolute quantities measured by conventional techniques is therefore mandatory. Such comparison is crucial in our case because chlordecone is not detected directly but under a chlordecone hydrate form generated in unknown proportions in the liver and in the calibration solutions. Therefore, absolute quantities of chlordecone were determined by GC analyses performed on tissue homogenates coming from the same mouse livers and were compared to quantities measured by quantitative MALDI imaging. The method used for GC analysis is described in the Supporting Information and measures the global quantity of chlordecone (i.e., chlordecone and chlordecone hydrate). The following absolute quantities of chlordecone were measured by GC: 45.3 ± 3.4 µg/g after 1 day, 74.5 ± 8.0 µg/g after 2 days, 141.9 ± 20.5 µg/g after 5 days, 199.4 ± 10.0 µg/g after 10 days, and 556.2 ± 115.8 µg/g after 25 days. The corresponding accumulation profile is presented in Figure 4B. It appears that chlordecone quantity measured by quantitative MALDI imaging is about 4 times lower than absolute quantity determined by GC. This suggests that chlordecone quantities measured by quantitative MALDI imaging are not directly absolute quantities. Different hypotheses can be proposed to explain this result. The conversion of chlordecone into chlordecone hydrate could be more important in the calibration solutions than in vivo leading to an underestimation of the

chlordecone quantity in the exposed liver section. Extraction of chlordecone during matrix crystallization could be less effective for chlordecone contained in the exposed liver section than for chlordecone solubilized in the calibration solutions and spotted onto the control section. The *in vivo* sequestration of chlordecone by other molecular species such as albumin and high-density lipoproteins (HDL) for which chlordecone is known to have a strong affinity³¹ could also disfavor the chlordecone extraction from the exposed liver section during matrix crystallization.

Although chlordecone quantities determined by MALDI imaging are not directly absolute quantities, the accumulation profiles obtained by MALDI imaging (Figure 4A) and by GC (Figure 4B) appear to be similar. A graph correlating quantities measured by MALDI imaging with absolute quantities of chlordecone determined by GC is presented in Figure 4C. With an R^2 of 0.995, the corresponding curve confirms the excellent correlation between the accumulation profiles obtained by MALDI imaging and by GC. This correlation curve was obtained from five different times of exposure with three mice per time of exposure. We can thus consider that this result cannot be due to chance.

We have thus used the equation of this curve to convert chlordecone quantities measured by MALDI imaging into absolute quantities of chlordecone (Table 1). The LOD and LOQ of MALDI imaging converted in absolute quantities are of 58.2 and 68.9 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Table 1. Absolute Quantities of Chlordecone Determined by GC and by MALDI Imaging after Conversion of Initial Values Using the Correlation Curve Presented in Figure 4C

time of chlordecone exposure	GC			MALDI imaging		
	av quantity ($\mu\text{g/g}$)	SD	RSD%	av quantity ($\mu\text{g/g}$)	SD	RSD%
1	45.3	3.4	7.6	64.9	1.3	2.0
2	74.5	8.0	10.7	68.8	3.0	4.3
5	141.9	20.5	14.4	121.8	10.2	8.4
10	199.4	10.0	5.0	204.8	21.8	10.6
25	556.2	115.8	20.8	557.0	69.7	12.5

Our results demonstrate that, even if quantitative MALDI imaging can give very good results in terms of reproducibility and determination of accumulation profiles, the comparison with conventional techniques is still required to convert quantities measured by MALDI imaging to absolute quantities. A similar approach was already described by Koeniger et al.⁷ who demonstrated that a response factor could be calculated to correlate MALDI imaging intensities to absolute quantities determined by LC–MS analyses. However, as for all quantification methods without internal standard, the approach of Koeniger et al.⁷ cannot correct signal variations due to ion suppression effects across the tissue section or to heterogeneities of the matrix crystallization. Even in a very complex case such as chlordecone, our method combining labeled normalization and correlation with conventional techniques can be efficiently used to deduce absolute quantities from MALDI imaging data and preserves information on the *in situ* localization of the compound of interest. Once the equation of the correlation curve between quantities measured by MALDI imaging and absolute quantities determined by GC is

calculated, absolute quantities of chlordecone can be deduced from MALDI imaging data alone.

In Situ Absolute Quantification of Chlordecone in the Pathological Mouse Liver. Finally, we were interested in studying the localization of chlordecone in the pathological liver of a chlordecone and CCl_4 treated mouse. A liver section coming from a mouse exposed to chlordecone at 8 mg/kg bw for 10 days then to CCl_4 at 0.1 mg/kg bw (model B, Figure 1) was prepared for *in situ* absolute quantification of chlordecone. The liver section presents necrotic areas that can be observed on the optical image of a serial liver section stained with H&E (Figure 5A). It is noteworthy that these zones of liver injury are not observed in control mice (Supporting Information Figure S-1A), in mice exposed to chlordecone only (Supporting Information Figure S-1B), or in mice exposed to CCl_4 only (Supporting Information Figure S-1C). Necrotic areas are only observed in mice coexposed to chlordecone and CCl_4 (Supporting Information Figure S-1D). The corresponding measurements of serum alanine transaminase reflecting the level of liver necrosis are presented in Supporting Information Figure S-2. Taken together, these results illustrate that chlordecone potentiates the action of hepatotoxic agent, as previously shown.¹⁷

Due to the size of necrotic areas observed on conventional histological sections, *in situ* absolute quantification of chlordecone was performed with a lateral resolution of 50 μm . We found an average quantity of chlordecone at 355 $\mu\text{g/g}$ in the analyzed area (Figure 5B). It should be noted that mice from model B were exposed to chlordecone at 8 mg/kg bw against 5 mg/kg bw in model A (Figure 1). This explains why, for the same time of exposure (10 days), the quantity of chlordecone measured here in model B is higher than that measured in model A (204.8 $\mu\text{g/g}$). Contrary to the relatively uniform distribution of chlordecone that was observed in model A (Figure 3), the distribution of chlordecone appears to be heterogeneous in the pathological liver (Figure 5B). H&E staining of liver sections after administration of CCl_4 revealed a liver damage around the centrilobular vein (CV), as expected. The lower abundance of chlordecone seems to match perfectly with these same necrotic centrilobular areas while chlordecone is always observed in parenchyma liver. In order to get information with biological relevance, ROIs corresponding to necrotic or healthy areas were thus defined from the H&E image using FlexImaging (Figure 5C). Corresponding MS spectra were extracted and processed according to our quantification method to calculate the absolute quantity of chlordecone in each ROI. The absolute quantities of chlordecone measured in each ROI are reported in Figure 5C. Thus, we found absolute quantities of chlordecone ranging from 140 to 310 $\mu\text{g/g}$ in necrotic areas. This corresponded to an average absolute quantity of chlordecone of 263 $\mu\text{g/g}$ in necrotic areas against 381 $\mu\text{g/g}$ in the healthy tissue. This allowed us to confirm and precisely quantify the differential distribution of chlordecone deduced from MALDI images. Indeed, thanks to the labeled normalization, this differential intensity of chlordecone cannot be attributed to differential ion suppression effects between the necrotic and healthy areas but to an unambiguous differential distribution. This distribution can be easily explained by the fact that necrotic cells are not able to retain chlordecone anymore. This result illustrates the great interest of quantitative MALDI imaging that allows the preservation of *in situ* quantitative information that are lost when quantification is performed on tissue homogenates.

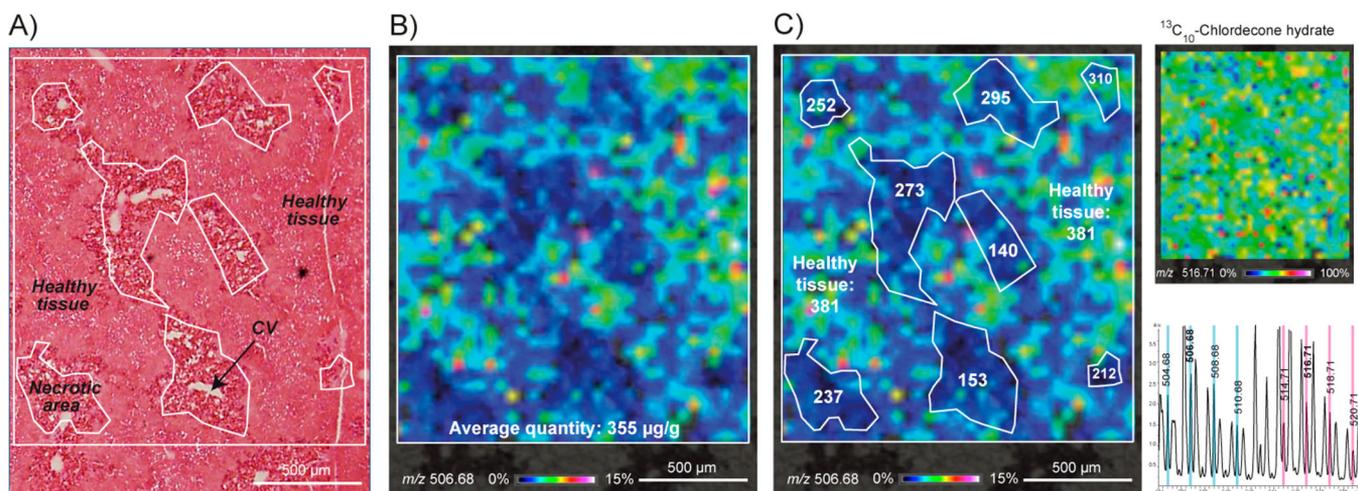


Figure 5. In situ absolute quantification of chlordecone in the pathological liver of a chlordecone and CCl_4 treated mouse. (A) Microscopic image of a serial section stained with H&E. (B) MALDI image corresponding to chlordecone hydrate: an average absolute quantity of chlordecone of $355 \mu\text{g/g}$ was measured in the analyzed area. (C) Local absolute quantities measured in each necrotic areas are lower than that measured in the healthy tissue ($381 \mu\text{g/g}$). The uniform distribution of the internal standard (m/z 516.71) on the tissue section confirms that the differential distribution of chlordecone is not due to ion suppression effects.

CONCLUSIONS

We have developed a method for the quantification of small molecules by MALDI imaging which is based on the combination of labeled normalization with the calculation of a correlation curve between MALDI imaging and a conventional quantification technique. Our method was successfully applied to the quantification of chlordecone in the mouse liver and constitutes the first example of application of MALDI imaging to the quantification of a pesticide in tissues. Moreover, to date, no information was available on the in situ localization of chlordecone in the liver. This work allowed us to demonstrate that, despite the good performances of quantification methods based on labeled normalization in terms of linearity and reproducibility, the comparison with conventional quantification techniques is still required to reach absolute quantification. Indeed, in the particularly complex case of chlordecone, the quantity determined from MALDI imaging data was not directly absolute quantity. However, with our method, when the correlation curve has been established between MALDI imaging and GC, in situ absolute quantities can be deduced from MALDI imaging data with the advantage of preserving information concerning the in situ localization. In our hands, the sensitivity of MALDI imaging was sufficient to detect chlordecone at a dose that is conventionally used to study its toxicity in rodents. However, it stays largely lower than that of GC or QWBA and could be enhanced by using targeted analysis mode such as continuous accumulation of selected ions (CASI) available on FTICR mass spectrometers. Moreover, even if the linearity of the calibration curves calculated from manually deposited calibration spots was very satisfactory, the variability of intensities within these calibration spots could be reduced thanks to a microspotter for the deposition of calibration solutions. Work is ongoing in our laboratory to apply this method to the localization and quantification of chlordecone in other organs, particularly that of the male reproductive apparatus. Indeed, the male reproductive toxicity of chlordecone is still very poorly understood. It has been evaluated in laboratory animals, and the few available data suggest that chlordecone is actually toxic for male reproduction

by causing alteration of sperm parameters at low doses and testicular atrophy at higher doses.³²

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Method used for matrix deposition with the spraying device, method used for the quantification of chlordecone in the mouse liver by gas chromatography, histological images of liver sections from control mice and mice exposed to chlordecone, to CCl_4 , and to chlordecone and CCl_4 , and measurements of alanine transaminases reflecting the level of liver necrosis in the different mice. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 0 2 2323 5279. Fax: +33 0 2 2323 5282. E-mail: charles.pineau@inserm.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The method for matrix deposition was optimized with the precious help of Manuel Chapelle, Jens Fuscher, Michael Becker, and Martin Schuerenberg from Bruker Daltonik GmbH. For immunohistochemistry analysis and animal house facilities, we thank the dedicated platforms (i.e., H2P2 and animal house platforms) of SFR BIOSIT (University of Rennes 1, France). The authors thank Catherine Adam (LEAE-CART, University of Liège) who gives valuable help for analyzing chlordecone by HRGC ECD and who performed confirmation by HRGC MS/MS. This work was supported by Inserm, the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie, the University of Rennes 1, the Région Bretagne, the Agence Nationale de la Recherche (ANR, Contaminants et Environnements, CESA), the SFR BIOSIT, and in part by grants from Biogenouest, Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA), Fonds Européen de Développement Régional, Conseil Régional de Bretagne and European Union

Seventh Framework Programme FP7 under grant agreement 305259. Elise Tabet was supported by a Ph.D. fellowship from “Assemblée Saint-Antonios Rmeyleh” of Liban.

■ REFERENCES

- (1) Tronci, G.; Ajiro, H.; Russell, S. J.; Wood, D. J.; Akashi, M. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 821–830.
- (2) Lagarrigue, M.; Becker, M.; Lavigne, R.; Deininger, S. O.; Walch, A.; Aubry, F.; Suckau, D.; Pineau, C. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110.005991.
- (3) Ellis, S. R.; Bruinen, A. L.; Heeren, R. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 1275–1289.
- (4) Groseclose, M. R.; Castellino, S. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10099–10106.
- (5) Hamm, G.; Bonnel, D.; Legouffe, R.; Pamelard, F.; Delbos, J. M.; Bouzom, F.; Stauber, J. J. *Proteomics* **2012**, *75*, 4952–4961.
- (6) Kallback, P.; Shariatgorji, M.; Nilsson, A.; Andren, P. E. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 4941–4951.
- (7) Koeniger, S. L.; Talaty, N.; Luo, Y.; Ready, D.; Voorbach, M.; Seifert, T.; Cepa, S.; Fagerland, J. A.; Bouska, J.; Buck, W.; Johnson, R. W.; Spanton, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 503–510.
- (8) Nilsson, A.; Fehniger, T. E.; Gustavsson, L.; Andersson, M.; Kenne, K.; Marko-Varga, G.; Andren, P. E. *PLoS One* **2010**, *5*, e11411.
- (9) Pirman, D. A.; Reich, R. F.; Kiss, A.; Heeren, R. M. A.; Yost, R. A. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1081–1089.
- (10) Landgraf, R. R.; Garrett, T. J.; Prieto Conaway, M. C.; Calcutt, N. A.; Stacpoole, P. W.; Yost, R. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 3178–3184.
- (11) Pirman, D. A.; Kiss, A.; Heeren, R. M.; Yost, R. A. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1090–1096.
- (12) Pirman, D. A.; Yost, R. A. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8575–8581.
- (13) Cabidoche, Y. M.; Achard, R.; Cattan, P.; Clermont-Dauphin, C.; Massat, F.; Sansoulet, J. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1697–1705.
- (14) Dubuisson, C.; Heraud, F.; Leblanc, J. C.; Gallotti, S.; Flamand, C.; Blateau, A.; Quenel, P.; Volatier, J. L. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *49*, 5–16.
- (15) Guldner, L.; Multigner, L.; Heraud, F.; Monfort, C.; Thome, J. P.; Giusti, A.; Kadhel, P.; Cordier, S. *Environ. Res.* **2010**, *110*, 146–151.
- (16) Multigner, L.; Ndong, J. R.; Giusti, A.; Romana, M.; Delacroix-Maillard, H.; Cordier, S.; Jegou, B.; Thome, J. P.; Blanchet, P. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3457–3462.
- (17) Curtis, L. R.; Mehendale, H. M. *Drug Metab. Dispos.* **1980**, *8*, 23–27.
- (18) Boucher, O.; Simard, M. N.; Muckle, G.; Rouget, F.; Kadhel, P.; Bataille, H.; Chajes, V.; Dallaire, R.; Monfort, C.; Thome, J. P.; Multigner, L.; Cordier, S. *Neurotoxicology* **2013**, *35*, 162–168.
- (19) Dallaire, R.; Muckle, G.; Rouget, F.; Kadhel, P.; Bataille, H.; Guldner, L.; Seurin, S.; Chajes, V.; Monfort, C.; Boucher, O.; Thome, J. P.; Jacobson, S. W.; Multigner, L.; Cordier, S. *Environ. Res.* **2012**, *118*, 79–85.
- (20) Cohn, W. J.; Boylan, J. J.; Blanke, R. V.; Fariss, M. W.; Howell, J. R.; Guzelian, P. S. *N. Engl. J. Med.* **1978**, *298*, 243–248.
- (21) Egle, J. L.; Fernandez, J. B.; Guzelian, P. S.; Borzelleca, J. F. *Drug Metab. Dispos.* **1978**, *6*, 91–95.
- (22) Blanke, R. V.; Fariss, M. W.; Guzelian, P. S.; Paterson, A. R.; Smith, D. E. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1978**, *20*, 782–785.
- (23) Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D. I. *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*; ACS Professional Reference Book; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; p 1965.
- (24) Agarwal, A. K.; Mehendale, H. M. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1982**, *2*, 161–167.
- (25) Curtis, L. R.; Williams, W. L.; Mehendale, H. M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1979**, *51*, 283–293.
- (26) Belfiore, C. J.; Yang, R. S.; Chubb, L. S.; Lohitnavy, M.; Lohitnavy, O. S.; Andersen, M. E. *Toxicology* **2007**, *234*, 59–72.
- (27) Hewitt, L. A.; Caille, G.; Plaa, G. L. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1986**, *64*, 477–482.
- (28) Rubel, O.; Greiner, A.; Cholia, S.; Louie, K.; Bethel, E. W.; Northen, T. R.; Bowen, B. P. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10354–10361.
- (29) Guzelian, P. S. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1982**, *22*, 89–113.
- (30) Moriwaki, H.; Hasegawa, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1243–1244.
- (31) Soine, P. J.; Blanke, R. V.; Guzelian, P. S.; Schwartz, C. C. *J. Toxicol. Environ. Health* **1982**, *9*, 107–118.
- (32) Newhouse, K.; Berner, T.; Mukerjee, D.; Rooney, A. EPA/635/R-07/004F; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2009.

Figure S-1

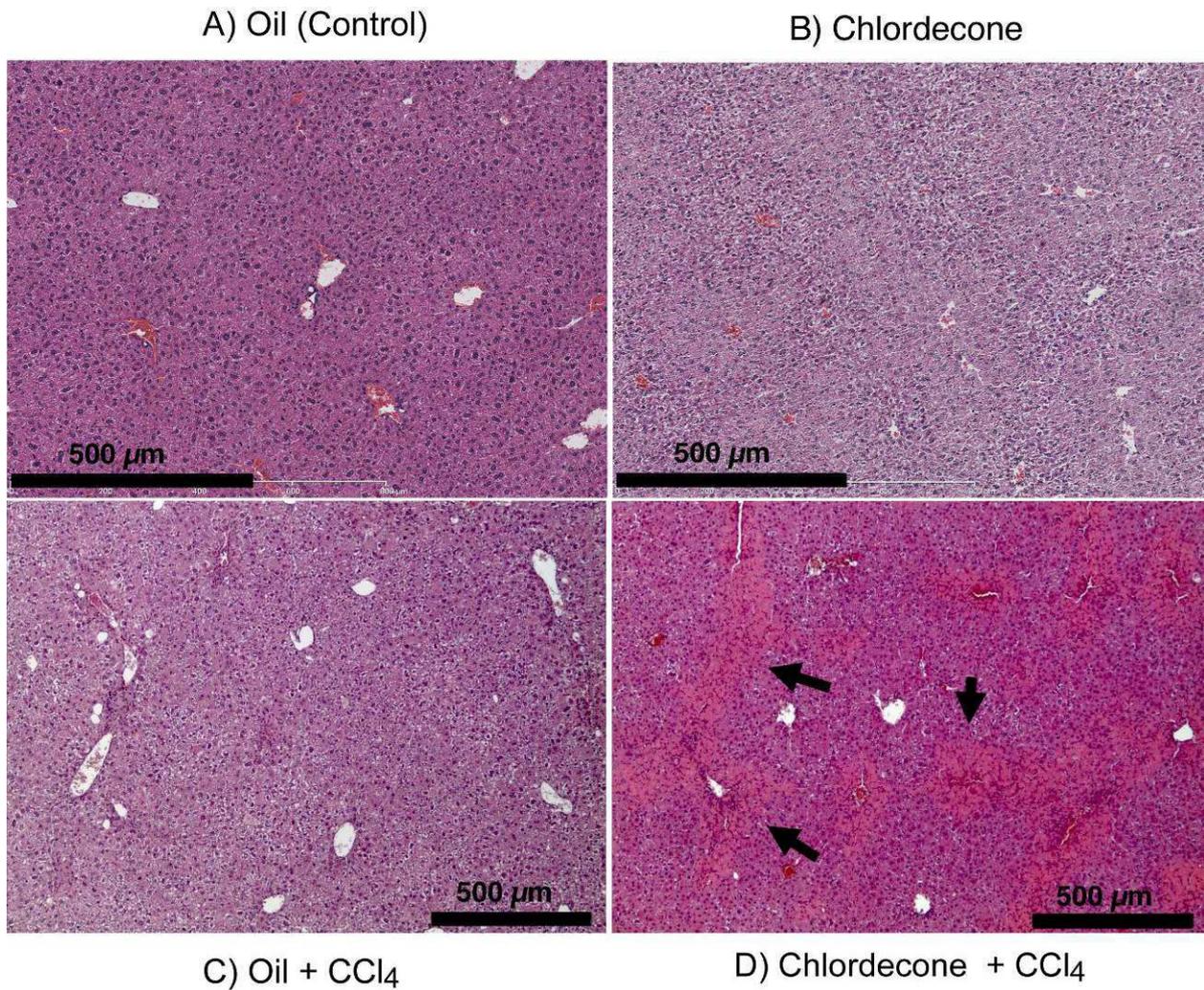


Figure S-1: Section of livers (paraffin embedded) from mice treated by gavage with **A)** oil (control), **B)** chlordecone alone, **C)** CCl₄ alone in oil or **D)** chlordecone + CCl₄ were stained with H&E for histopathology. Zone of liver injury are marked by arrows. Scale bar was 500 μm. The histopathological analysis of livers was performed as recently reported.

Figure S-2

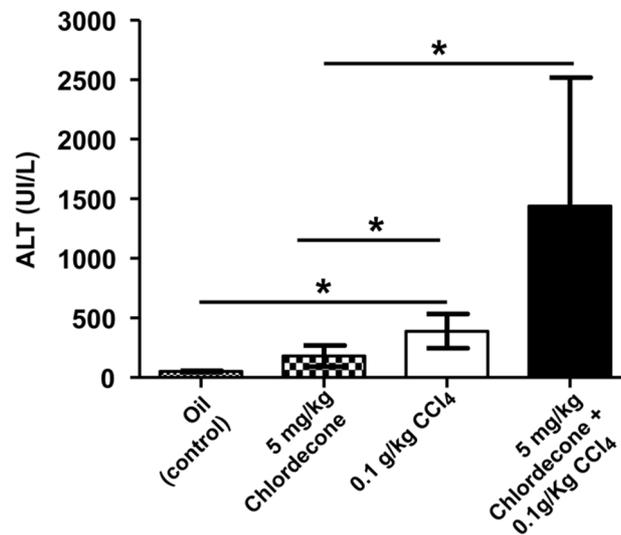


Figure S-2: Serum alanine transaminase (ALT) from mice were assayed according to the IFCC primary reference procedures and using the Olympus AU2700 Autoanalyser[®] (Olympus Optical). The results in each model are represented as means \pm standard error of the mean (SEM) of each group. Mann-Whitney *U* test was used for comparison of control group parameters with treatment group and multiple group analysis was carried out by one-way ANOVA with post Mann-Whitney *U* test as reported earlier³. The correlation between continuous variables was analysed by using GraphPad Prism5 software. For all statistical analyses, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The serum biochemical analysis of livers was performed as recently reported.

IV. Discussion générale

Les principales études toxicologiques concernant le chlordécone, ont été menées dans les années 80. Elles faisaient suite aux cas d'intoxications humaines sévères à ce pesticide aux Etats-Unis. Ces études dans le domaine de la recherche toxicologique du chlordécone avaient pour but de mieux comprendre ses mécanismes de toxicité chez l'Homme. Les études menées se basaient principalement sur les symptômes observés chez les ouvriers fortement contaminés au chlordécone dans l'usine de Hopewell (Taylor, 1978).

Le chlordécone était considéré en 1974 comme le seul pesticide réellement efficace dans la lutte contre le charançon, insecte ravageur des bananiers (Vilardebo, 1974). C'est pour cela qu'il a été utilisé d'une façon excessive dans les plantations de bananiers dans le monde, et notamment aux Antilles françaises. Plusieurs rapports publiés à l'époque ont mentionné l'effet contaminant du chlordécone dans l'environnement antillais (Snegaroff 1977a) ainsi que son pouvoir bioaccumulable (Kermarrec 1980). Malgré ces rapports, son utilisation s'est poursuivie aux Antilles françaises jusqu'en 1993 négligeant ce qui était mentionné sur sa toxicité. C'est à partir des années 2000 que les études ont commencé sérieusement à évaluer l'effet d'une contamination chronique au chlordécone sur la santé humaine. Cette solution « miracle » dans le domaine de l'agriculture s'est transformée en un problème sérieux faisant de la contamination au chlordécone, un « scandale sanitaire » en santé publique. Des études épidémiologiques sur le niveau d'imprégnation de la population antillaise ont montré depuis 2001 une contamination générale de la population (Guldner et al., 2010; Multigner, 2006).

En effet, le chlordécone est un insecticide organochloré persistant, son affinité à la matière organique facilite son accumulation dans les sols et les sédiments. La contamination des sols se propage dans l'environnement touchant l'eau et les végétaux ainsi que la chaîne trophique. La principale voie de contamination humaine, à nos jours, est l'apport alimentaire (Dubuisson et al. 2007). En effet, les études ont montré qu'il y a une corrélation entre le niveau du chlordécone présent dans les aliments consommés et le taux dosé dans le sang. Cet apport continu en chlordécone, suggère qu'il pourra être impliqué dans la survenue ou l'évolution des maladies chroniques. Des études ont montré que l'exposition quotidienne au chlordécone, durant la grossesse, est associée à une prématurité (Kadhel et al. 2014) ainsi qu'à des troubles développementaux des nourrissons (Costet et al. 2015; Dallaire et al. 2012). Le chlordécone perturbe de même la sécrétion des hormones thyroïdiennes dans le sang (augmentation de TSH chez les garçons et diminution de la thyroxine T4 chez les filles) des nourrissons après une exposition pré- ou post-natale (Cordier et al. 2015).

Les études sur l'Homme et sur les rongeurs ont montré que le chlordécone est distribué dans plusieurs tissus en s'accumulant principalement dans le foie et les graisses (Cohn, 1978; Egle, 1978). Depuis 1979, des études d'intoxication des rats et des souris en laboratoire par le chlordécone ont montré que le chlordécone peut induire le développement d'un cancer du foie (IARC 1979). Chez l'homme, l'étude épidémiologique « Karuprostate », a montré qu'il est associé à un risque plus important de développement d'un cancer de prostate (Multigner, 2010). Puisque la population antillaise est continuellement exposée au chlordécone, il était nécessaire de vérifier l'implication du chlordécone dans l'apparition et l'évolution des maladies chroniques aux Antilles.

Les études toxicologiques sont importantes pour comprendre les effets directs ou indirects du chlordécone sur la santé humaine même 20 ans après son interdiction.

Notre étude soutenue par un financement ANR-CESA consistait en deux études complémentaires : une étude épidémiologique, et une étude toxicologique chez la souris. L'étude épidémiologique consistait à évaluer l'effet des organochlorés, notamment le chlordécone, sur la fibrogenèse hépatique, en Guadeloupe. C'est une étude de type cas-témoin sur des patients atteints des hépatites chroniques d'origines virales ou alcooliques. A ce jour, 274 patients ont été inclus dans l'étude. La mesure des taux de chlordécone sérique et l'analyse des enquêtes sont en cours et donc ne nous permettent pas à ce jour de conclure sur une implication ou non du chlordécone dans l'évolution des hépatites chroniques.

L'étude toxicologique consistait quant à elle, à étudier dans des modèles murins l'impact du chlordécone sur les hépatites aiguës d'une part et sur l'évolution de la fibrose hépatique dans les maladies chroniques du foie d'autre part. Les modèles d'hépatites développés chez la souris représentaient les étiologies couramment observées chez l'Homme et à l'origine des pathologies hépatiques. Ainsi, l'agression du foie peut être due à des agents toxiques, pathogènes, à des problèmes métaboliques ou même à des maladies auto-immunes. Et c'est la répétition de ces attaques qui peut entraîner un processus de mort des hépatocytes ou nécrose cellulaire, d'inflammation, de cicatrisation du tissu ou fibrose hépatique. Cette fibrose peut conduire dans ses stades plus avancés, à la survenue de cancer primaire du foie.

Concernant les études toxicologiques sur les hépatites aiguës chez la souris, de nombreuses études rapportent la co-exposition au chlordécone et au tétrachlorure de carbone (ou CCl₄). En effet, même si l'intoxication au CCl₄ chez l'Homme est exceptionnelle, le CCl₄ est couramment utilisé en laboratoire pour induire une hépatite aiguë (administration d'une dose

importante par gavage) chez les rongeurs. Ainsi, des travaux font état d'une très forte potentialisation, jusqu'à 6700 %, de la toxicité hépatique du CCl₄ par le chlordécone. Pour expliquer cette potentialisation, des mécanismes d'interaction ont été proposés comme l'induction par le chlordécone du métabolisme du CCl₄ conduisant à la formation d'intermédiaires très toxiques, soit à l'inhibition de la réparation tissulaire (prolifération réparatrice des cellules hépatiques après une agression toxique) (Soni & Mehendale 1998; Dalu et al. 1998). Il est probable que les deux mécanismes coexistent.

Dans notre compréhension des impacts du chlordécone avec d'autres hépatotoxiques pouvant avoir des conséquences sur les pathologies chez l'homme, nous avons développé un modèle de co-exposition dans le cas de la consommation abusive l'alcool. A notre connaissance, il n'y avait pas d'étude sur l'interaction alcool-chlordécone. Notre modèle consistait en une prise d'alcool à 5% par le biais d'une alimentation liquide Lieber-DeCarli, pendant 10 jours. Suivie d'un "binge drinking" c'est-à-dire une consommation excessive d'alcool en un temps court. Chez la souris, celui-ci a été réalisé par un gavage de 3g/Kg d'éthanol. La co-exposition au chlordécone a été réalisée par un gavage quotidien des souris avec une dose de 5 mg/kg de chlordécone.

Dans notre étude, nous montrons que dans le cas d'une hépatite alcoolique aiguë, le chlordécone pourrait sensibiliser les foies lors de la consommation d'alcool avec une augmentation élevée des transaminases hépatiques dans le sang de 4 souris sur 7. Toutefois, d'autres études complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette tendance, de même pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendus dans cette interaction alcool/chlordécone.

Les études de l'impact du chlordécone sur le système immunitaire restent peu nombreuses (Chetty, 1993; Dai, 2001). Il a été montré que le chlordécone accélère la survenue de maladies auto-immunes tel que le lupus systémique (Sobel, 2005; Wang, 2007). Cette accélération pourrait être due, d'une part, aux propriétés oestrogéniques du chlordécone et d'autre part à la diminution de l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ au niveau de la rate accompagnée d'une augmentation du taux d'IFN- γ (Wang, 2008). L'accélération de l'auto-immunité était détectée seulement dans une souche de souris susceptible au lupus, ce qui suggère que la toxicité du chlordécone peut être variable selon la susceptibilité de chaque individu (Sobel, 2006).

Notre étude s'intéressait pour la première fois à l'impact du chlordécone dans un modèle murin d'hépatite auto-immune induite par l'administration de Concanavaline A. La Concanavaline A est une molécule classiquement utilisée pour induire des hépatites auto-immunes aiguës chez les rongeurs. Son mécanisme d'action porte sur la stimulation des cellules de Kupffer, des cellules NKT ainsi que des lymphocytes T CD4⁺ (Takeda, 2000; Wang, 2012). Cette stimulation est accompagnée d'une production importante d'IFN- γ , de perforine et de Granzyme conduisant à la nécrose des hépatocytes et aux lésions hépatiques (Tagawa, 1997). Nous avons montré que le chlordécone était capable de potentialiser cette hépatite. Selon notre étude, le nombre de cellules NKT résidentes dans le foie est augmenté d'un facteur 2 après une exposition des souris au chlordécone pendant 10 jours. Ce nombre plus élevé de cellules NKT, qui sont les cellules effectrices dans la mort des hépatocytes, pourrait être la raison de la potentialisation de l'hépatite induite par Con A. Toutefois, l'étude doit être approfondie pour définir les mécanismes d'action mis en place notamment par l'étude des cytokines telles que l'IFN γ , le TNF α ou l'IL-1 β .

L'infection par les virus des hépatites B et C est un problème majeur de santé publique dans les pays du Sud. Les hépatites aiguës B et C sont fréquemment asymptomatiques chez l'adulte et passent donc le plus souvent inaperçues. Cependant, l'hépatite B aiguë peut se présenter sous une forme fulminante, qui est généralement mortelle en l'absence de greffe de foie. Dans 5 à 10% des cas pour l'infection par le VHB, chez l'adulte, et dans 50 à 90% des cas pour l'infection par le VHC, la présence du virus entraîne des hépatites chroniques susceptibles d'évoluer, à terme, vers une cirrhose et/ou un cancer du foie, voire vers des manifestations extra-hépatiques. Par ailleurs, dans les Antilles françaises, le pourcentage de personnes infectées par le virus de l'hépatite B est au moins trois fois plus élevé qu'en France métropolitaine et est la première cause de carcinome hépatocellulaire dans cette population. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact que pouvait avoir le chlordécone dans le cas d'une hépatite aigue d'origine virale. Nous avons développé un modèle d'hépatite virale chez la souris infectée par le virus de l'hépatite murine (ou MHV3 pour « Murine Hepatitis Virus type 3) après avoir administré du chlordécone pendant 10 jours. Le MVH3 induit une hépatite fulminante qui se traduit par la mort des souris en 5-6 jours après infection. Nous n'avons pas pu observer un effet sur la nécrose hépatique comme le relève les taux de transaminases hépatiques relarguées dans le sérum qui sont les mêmes dans les deux groupes de souris (avec ou sans traitement au chlordécone) mais nous avons pu observer que ce pesticide accélérerait la mort des souris induite par le virus. Il est connu que outre le foie, le

MHV3 présente un tropisme pour les cellules endothéliales, les macrophages et atteint aussi rapidement le cerveau des animaux infectés. Le virus MHV3 altère ainsi la structure de la barrière hématoencéphalique conduisant à son entrée dans le cerveau (Bleau, 2015). La mort précoce des souris infectées par le MHV3 et traitées au chlordécone pourrait être due à une atteinte plus importante du système nerveux central de ces souris. Le chlordécone qui s'accumule dans le cerveau (Huang, 1981), favorisait ainsi l'entrée du virus MHV3 dans notre modèle d'étude. Pour tester ces hypothèses, nous avons mesuré la quantité de virus MHV3 présente dans les cerveaux des souris infectées et traitées au chlordécone. Nous avons pu mesurer une quantité significativement plus importante de virus dans les souris infectées par le MHV3 et traitées au chlordécone que dans les cerveaux de souris infectées mais non traitées au chlordécone. Le chlordécone est connu pour induire des troubles neurologiques physiques comme les tremblements, l'ataxie, les troubles de la motricité oculaire, les troubles du langage, les céphalées (Taylor 1982). Notre étude montre que le chlordécone pourrait favoriser l'atteinte cérébrale de virus neurotropes. Ainsi nos études sont à poursuivre afin de vérifier si le chlordécone joue un rôle important au niveau de la barrière hématoencéphalique et de sa perméabilité aux virus. Ce modèle met en exergue l'importance des études sur l'impact du chlordécone dans le cas d'infection par les virus chez l'Homme, notamment les coronavirus dont fait partie le MHV3 comme le SARS (acute respiratory syndrome coronavirus) qui peuvent aussi traverser la barrière hématoencéphalique et atteindre le cerveau (Arbour, 2000). Plus généralement, cette étude pose le problème de la co-exposition au chlordécone et à certains virus sur le développement neurologique et cognitif des enfants exposés, les effets à long terme chez l'Homme et les impacts potentiels sur les maladies neurodégénératives à un âge plus avancé (tels que les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer).

Plusieurs études montrent en effet une relation entre l'exposition aux pesticides et le développement des troubles neurologiques. Une étude menée sur des agriculteurs de vigne à Bordeaux a montré que l'exposition continue aux pesticides peut réduire leurs capacités cognitives (Baldi, 2011). Chez les enfants, l'exposition à ces substances chimiques peut avoir des effets neurocognitifs tels que des troubles de mémoire et de concentration (Bouchard, 2010; Viel, 2015; Wagner-Schuman, 2015). De même l'exposition continue aux pesticides tels que le DDT, la dieldrine ou le paraquat est associée à un risque plus important de développement d'un Parkinson (Costello, 2009; Rugbjerg, 2011) ainsi qu'à une maladie d'Alzheimer (Hayden, 2010; Richardson, 2014). Le chlordécone aussi induit des troubles

neurologiques chez l'homme et chez les animaux. Pour cela, il sera intéressant d'étudier son implication dans le développement et l'évolution des maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Un autre pan important de nos recherches était l'étude de l'impact du chlordécone sur les hépatopathies chroniques et en particulier sur la fibrose hépatique. En effet, aux Antilles françaises, l'exposition persistante au chlordécone depuis près de vingt ans pose la question de son rôle dans l'évolution des maladies chroniques telles que les cancers ou bien les hépatites chroniques. Dans ce domaine, nous avons réalisé une étude expérimentale toxicologique sur l'impact du chlordécone sur l'évolution de la fibrose hépatique dans un modèle d'hépatite chronique chez la souris. Ce modèle consistait en la répétition hebdomadaire de CCl₄ (un hépatotoxique couramment utilisé dans les modèles rongeurs), et une administration quotidienne de chlordécone par gavage. Dans cette étude, nous montrons que le chlordécone potentialise la fibrose hépatique induite lors des traitements répétés par le CCl₄. Le développement de la fibrose est normalement accompagné d'un changement dans la composition de la matrice extracellulaire avec un déséquilibre entre synthèse et dégradation de ses composants (Friedman 2003). Dans notre étude, nous avons mesuré une augmentation significative du dépôt de collagène dans le foie associée à une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le processus de fibrogenèse tels que le collagène 1alpha, la MMP2 ou le TIMP-1. De plus, l'événement clé dans la fibrose hépatique est l'activation des cellules étoilées du foie qui deviennent des myofibroblastes produisant de l' α -SMA. Dans notre étude, nous montrons que les souris co-exposées chroniquement au chlordécone et au CCl₄ expriment un taux plus élevé de α -SMA que les autres souris. L'ensemble de nos travaux est cohérent avec un impact significatif du chlordécone sur la fibrose hépatique chez la souris induite par le CCl₄. Les facteurs connus liés à l'environnement qui peuvent entraîner une aggravation de la fibrose hépatique restent peu nombreux. La consommation excessive d'alcool est un facteur majeur de progression de la fibrose identifié dans la plupart des études cliniques (Degos 1999; Peters & Terrault 2002; Poynard et al. 2001; Roudot-Thoraval et al. 1997; Vento & Cainelli 2002). Un rôle aggravant de la consommation de tabac sur la progression de la fibrose a été suggéré par plusieurs études (Hézode et al. 2003; Pessione et al. 2001; Wang et al. 2002). De même, la double infection par le VHB et le VHC, par comparaison aux patients mono-infectés par le VHC ou le VHB seul (Zarski et al. 1998) est un facteur de risque d'une évolution plus rapide vers la cirrhose. La coinfection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) des patients atteints de fibrose quel que soit son

étiologie est également un facteur aggravant de l'évolution défavorable de la fibrose (Gervais 2002; Thomas 2002). Parmi les facteurs de l'environnement tels que les pesticides ou autres polluants, peu de données sont disponibles. Il a été rapporté que l'intoxication chronique par ingestion d'arsenic induit une fibrose portale (Guha Mazumder, 1988; Santra, 1999). L'exposition chronique au chlorure de vinyle monomère (CMV) peut provoquer une fibrose hépatique qui peut être associée à une hypertension portale (HTP), des varices œsophagiennes, une splénomégalie et une thrombopénie (Blendis et al. 1978; Maroni et al. 2003). Chez l'Homme, l'exposition chronique au tétrachlorure de carbone aboutit à une dégénérescence hépatique graisseuse (stéatose) évoluant vers la cirrhose (potentialisation par l'administration d'acétone ou d'éthanol) (Teta & Ott 1988) . Enfin, concernant les expositions aux PolyChloroBiphenyls (PCB), une stéatose hépatique, accompagnée ou non d'anomalies biologiques (élévation des transaminases, des triglycérides et/ou du cholestérol) ainsi qu'une discrète hépatomégalie, a été rapportée chez des travailleurs de l'industrie des transformateurs et condensateurs électriques (Maroni et al. 1981). A notre connaissance, il n'existe pas de données épidémiologiques impliquant les pesticides utilisés dans le domaine agricole, un grand champ de recherche s'ouvre dans ce domaine, qu'il conviendra d'investir.

La recherche de méthodes nouvelles permettant de détecter les molécules chimiques dont les xénobiotiques au sein même des tissus qu'ils contaminent est devenue un nouveau champ de recherche croissant et innovant. Ces approches basées sur le développement d'analyse directe sur tissus par « matrix assisted laser desorption/ionization time of flight » (MALDI-TOF) permet à la fois la recherche, l'identification et maintenant la localisation de molécules telles que les molécules chimiques au sein des tissus. Cette approche MALDI-TOF appliquée à la recherche du chlordécone dans les foies de nos souris traitées, a permis pour la première fois de quantifier et localiser le chlordécone, dans l'endroit précis où la molécule est stockée ou associée avec des protéines partenaires du foie (Lagarrigue, 2014). Cette approche d'imagerie MALDI qui a été entreprise avec succès dans le foie pourrait être étendue à d'autres tissus connus pour être la cible de chlordécone, comme la prostate, les testicules, le cerveau, le tissu adipeux, etc.... Elle permettra d'améliorer nos connaissances sur une régionalisation de la distribution du chlordécone au sein d'un tissu, voire même de définir les cellules cibles dans le tissu.

Pour conclure, la grande variabilité des mécanismes d'action du chlordécone, comme perturbateurs endocriniens, dans le système immunitaire, son stockage dans le foie et les tissus adipeux, dans le système nerveux central, etc... et sa très grande persistance dans le temps font que cette molécule peut être impliquée aussi bien dans le développement du fœtus, de l'enfant et de l'Homme adulte (atteintes des fonctions physiologiques) que dans un grand nombre de pathologies endocriniennes ou chroniques. Les études épidémiologiques en cours et celles à venir apporteront de nouvelles données et connaissances quant à l'impact du chlordécone sur la santé humaine.

V. Références bibliographiques

- Agarwal, A.K. & Mehendale, H.M., 1982. Potentiation of bromotrichloromethane hepatotoxicity and lethality by chlordecone preexposure in the rat. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 2(4), pp.161–7.
- Agarwal, A.K. & Mehendale, H.M., 1983. Potentiation of CCl₄ hepatotoxicity and lethality by chlordecone in female rats. *Toxicology*, 26(3-4), pp.231–242.
- Agarwal, A.K. & Mehendale, H.M., 1984. CCl₄-induced alterations in Ca⁺⁺ homeostasis in chlordecone and phenobarbital pretreated animals. *Life sciences*, 34(2), pp.141–8.
- Ali, S.F. et al., 1982. Subchronic dietary exposure of rats to chlordecone (Kepone) modifies levels of hypothalamic beta-endorphin. *Neurotoxicology*, 3(2), pp.119–24.
- Arbour, N. et al., 2000. Neuroinvasion by Human Respiratory Coronaviruses. *Journal of Virology*, 74(19), pp.8913–8921.
- Arenson, D.M., Friedman, S.L. & Bissell, D.M., 1988. Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology*, 95(2), pp.441–7.
- Arthur, M.J., 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(2), pp.G245–9.
- ATSDR, 1995. Toxicological profile for mirex and chlordecone. *Toxicological Profiles for Mirex And Chlordecone U.S. Department Of Health And Human Services*.
- Baldi, I. et al., 2011. Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the Phytoneer study. *Occupational and environmental medicine*, 68(2), pp.108–15.
- Barreyro, F.J. et al., 2015. The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35(3), pp.953–66.
- Bataller, R. & Brenner, D.A., 2005. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 115(2), pp.209–18.
- Bedossa, P. & Poynard, T., 1996. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(2), pp.289–93.
- Beldi, G. et al., 2008. Natural killer T cell dysfunction in CD39-null mice protects against concanavalin A-induced hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(3), pp.841–52.
- Belfiore, C.J. et al., 2007. Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling. *Toxicology*, 234(1-2), pp.59–72.

- Bell, A.N. & Mehendale, H.M., 1987. Comparative changes in hepatic DNA, RNA, protein, lipid, and glycogen induced by a subtoxic dose of CCl₄ in chlordecone, mirex, and phenobarbital pretreated rats. *Toxicology letters*, 35(2-3), pp.191–200.
- Bell, A.N. & Mehendale, H.M., 1985. The effect of dietary exposure to a mirex plus chlordecone combination on CCl₄ hepatotoxicity. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 5(4), pp.679–87.
- Bell, M.A., Ewing, R.A. & Lutz, G., 1978. Reviews of the environmental effects of pollutants. XII. Hexachlorocyclopentadiene. *Washington, DC, US Environmental Protection Agency (Report EPA-600/1-78-047)*.
- Benyon, R.C. et al., 1996. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology*, 110(3), pp.821–31.
- Bertola, A. et al., 2013. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nature protocols*, 8(3), pp.627–37.
- Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A.L., 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 26(10), pp.1175–86.
- Biron, C.A. et al., 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*, 17, pp.189–220.
- Blachier, M. et al., 2013. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of hepatology*, 58(3), pp.593–608.
- Black, D. et al., 2004. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *The Journal of surgical research*, 117(2), pp.306–15.
- Blanke, R. V et al., 1978. Identification of a reduced form of chlordecone (Kepone) in human stool. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 20(6), pp.782–5.
- Bleau, C. et al., 2015. Brain Invasion by Mouse Hepatitis Virus Depends on Impairment of Tight Junctions and Beta Interferon Production in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of virology*, 89(19), pp.9896–908.
- Blendis, L.M. et al., 1978. Portal hypertension in vinyl chloride monomer workers. A hemodynamic study. *Gastroenterology*, 75(2), pp.206–11.
- Bonacchi, A. et al., 2001. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *The Journal of biological chemistry*, 276(13), pp.9945–54.
- Bonan, H. & Prime, J.-L., 2001. Rapport sur la présence de pesticides dans les eaux de consommation humaine en Guadeloupe. *IGAS -IGE*.

- Bondy, S.C., 1992. Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicology letters*, 63(3), pp.231–41.
- Borzelleca, J.F. & Skalsky, H.L., 1980. The excretion of pesticides in saliva and its value in assessing exposure. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 15(6), pp.843–66.
- Bouchard, M.F. et al., 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics*, 125(6), pp.e1270–7.
- Boylan, J.J., Egle, J.L. & Guzelian, P.S., 1978. Cholestyramine: use as a new therapeutic approach for chlordecone (kepone) poisoning. *Science (New York, N.Y.)*, 199(4331), pp.893–5.
- Bravo, A.A., Sheth, S.G. & Chopra, S., 2001. Liver biopsy. *The New England journal of medicine*, 344(7), pp.495–500.
- Bucher, S. et al., 2014. Regulation of hepatic drug transporter activity and expression by organochlorine pesticides. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28(3), pp.119–28.
- Burt, A.D. et al., 1990. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immuno-gold labelling. *Histopathology*, 16(1), pp.53–8.
- Cabidoche, Y.M. & Lesueur Jannoyer, M., 2011. Pollution durable des sols par la chlordécone aux Antilles : comment la gérer ? *Innovations Agronomiques*, pp.117–133.
- Cannon, S.B. et al., 1978. Epidemic kepone poisoning in chemical workers. *American journal of epidemiology*, 107(6), pp.529–37.
- Casing, D. & Veilhan, L., 2008. Anatomie du foie et des voies biliaires. *EMC. Hépatologie*, 7-001-A-10.
- Castera, L., 2011. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 25(2), pp.291–303.
- Chakraborty, J.B. & Mann, D.A., 2010. NF-kappaB signalling: embracing complexity to achieve translation. *Journal of hepatology*, 52(2), pp.285–91.
- Chaudhury, S. & Mehendale, H.M., 1991. Amplification of CCl₄ toxicity by chlordecone: destruction of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 subpopulation. *Journal of toxicology and environmental health*, 32(3), pp.277–94.
- Chetty, K.N. et al., 1993. Effects of chlordecone and malnutrition on immune response in rats. *Life sciences*, 52(18), pp.PL175–80.
- Choi, S.S. & Diehl, A.M., 2009. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(6), pp.2007–13.

- Cianflone, D.J. et al., 1980. Role of biotransformation in the alterations of chloroform hepatotoxicity produced by Kepone and mirex. *Toxicology and applied pharmacology*, 53(1), pp.140–9.
- Cohn, W.J. et al., 1978. Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. *The New England journal of medicine*, 298(5), pp.243–8.
- Cordier, S. et al., 2015. Perinatal exposure to chlordecone, thyroid hormone status and neurodevelopment in infants: the Timoun cohort study in Guadeloupe (French West Indies). *Environmental research*, 138, pp.271–8.
- Costello, S. et al., 2009. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *American journal of epidemiology*, 169(8), pp.919–26.
- Costet, N. et al., 2015. Perinatal exposure to chlordecone and infant growth. *Environmental Research*, 142, pp.123–134.
- Czaja, A.J. & Carpenter, H.A., 2004. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*, 40(4), pp.646–52.
- Dai, D. et al., 2001. Modulation of mouse P450 isoforms CYP1A2, CYP2B10, CYP2E1, and CYP3A by the environmental chemicals mirex, 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene, vinclozolin, and flutamide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70(3), pp.127–141.
- Dallaire, R. et al., 2012. Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. *Environmental Research*, 118, pp.79–85.
- Dalu, A., Rao, P.S. & Mehendale, H.M., 1998. Colchicine antimetabolism abolishes resiliency of postnatally developing rats to chlordecone-amplified carbon tetrachloride hepatotoxicity and lethality. *Environmental health perspectives*, 106(9), pp.597–606.
- Dawson, G.W., Weimer, W.C. & Shupe, S., 1979. Kepone-A case study of a persistent material. *The American Institute of Chemical Engineers (AIChE) Symposium Series*, 75(190), pp.366–374.
- Le Deaut, J.-Y. & Procaccia, C., 2009. Rapport sur les impacts de l' utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles : bilan et perspectives d' évolution.
- Degos, F., 1999. Hepatitis C and alcohol. *Journal of hepatology*, 31 Suppl 1, pp.113–8.
- Desai, D., 1982. Biochemical mechanisms of chlordecone neurotoxicity: a review. *Neurotoxicology*, 3(2), pp.103–10.
- Desai, D., 1985. Chlordecone interaction with catecholamine binding and uptake in rat brain synaptosomes. *Neurotoxicology*, 6(1), pp.159–65.

- Desaiah, D., 1981. Interaction of chlordecone with biological membranes. *Journal of toxicology and environmental health*, 8(5-6), pp.719–30.
- Dubuisson, C. et al., 2007. Impact of subsistence production on the management options to reduce the food exposure of the Martinican population to Chlordecone. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 49(1), pp.5–16.
- EASL-ALEH, 2015. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of hepatology*, 63(1), pp.237–64.
- Egle, J.L. et al., 1978. Distribution and excretion of chlordecone (Kepone) in the rat. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 6(1), pp.91–5.
- Elpek, G.Ö., 2014. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World journal of gastroenterology*, 20(23), pp.7260–76.
- End, D.W., Carchman, R.A. & Dewey, W.L., 1981. Neurochemical correlates of chlordecone neurotoxicity. *Journal of toxicology and environmental health*, 8(5-6), pp.707–18.
- Epstein, S.S., 1978. Kepone--hazard evaluation. *The Science of the total environment*, 9(1), pp.1–62.
- Eroschenko, V.P., 1981. Estrogenic activity of the insecticide chlordecone in the reproductive tract of birds and mammals. *Journal of toxicology and environmental health*, 8(5-6), pp.731–42.
- Esteller, A., 2008. Physiology of bile secretion. *World journal of gastroenterology*, 14(37), pp.5641–9.
- Fainboim, L. et al., 2007. Cytokines and chronic liver disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 18(1-2), pp.143–57.
- Fariss, M.W. et al., 1980. Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (kepone) in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 8(6), pp.434–8.
- Faroon, O.M. et al., 1991. Potentiation of BrCCl₃ hepatotoxicity by chlordecone: biochemical and ultrastructural study. *Toxicology and applied pharmacology*, 110(2), pp.185–97.
- Fattovich, G. et al., 2004. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), pp.S35–50.
- Fausto, N., 2004. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(6), pp.1477–87.
- Fouse, B.L. & Hodgson, E., 1987. Effect of chlordecone and mirex on the acute hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *General pharmacology*, 18(6), pp.623–30.

- French, S.W., Benson, N.C. & Sun, P.S., 1984. Centrilobular liver necrosis induced by hypoxia in chronic ethanol-fed rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 4(5), pp.912–7.
- Friedman, S.L. et al., 1985. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), pp.8681–5.
- Friedman, S.L., 2003. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38 Suppl 1, pp.S38–53.
- Friedman, S.L., 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, 88(1), pp.125–72.
- Friedman, S.L., 2010. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 7(8), pp.425–36.
- Fujimori, K. et al., 1982. Comparison of brain discrete area distributions of chlordecone and mirex in the mouse. *Neurotoxicology*, 3(2), pp.125–29.
- Fujimori, K. et al., 1986. In vivo and in vitro synthesis, release, and uptake of [3-H]-dopamine in mouse striatal slices after in vivo exposure to chlordecone. *Journal of biochemical toxicology*, 1(4), pp.1–12.
- Gandolfi, O. et al., 1984. On the neurotoxicity of chlordecone: a role for gamma-aminobutyric acid and serotonin. *Brain research*, 303(1), pp.117–23.
- Gao, B., Radaeva, S. & Park, O., 2009. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of leukocyte biology*, 86(3), pp.513–28.
- Gebhardt, R., 1992. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacology & therapeutics*, 53(3), pp.275–354.
- Gerhart, J.M., Hong, J.S. & Tilson, H.A., 1983. Studies on the possible sites of chlordecone-induced tremor in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 70(3), pp.382–9.
- Gerhart, J.M., Hong, J.S. & Tilson, H.A., 1985. Studies on the mechanism of chlordecone-induced tremor in rats. *Neurotoxicology*, 6(1), pp.211–29.
- Gervais, A., 2002. [Chronic hepatitis C in HIV-HCV coinfecting patients]. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 26 Spec No, pp.B121–32.
- Ghosh, A.K. & Vaughan, D.E., 2012. PAI-1 in tissue fibrosis. *Journal of cellular physiology*, 227(2), pp.493–507.
- Glaser, S.S. et al., 2009. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, p.e7.
- Gossard, A.A. & Lindor, K.D., 2012. Autoimmune hepatitis: a review. *Journal of gastroenterology*, 47(5), pp.498–503.

- Gressner, A.M. & Weiskirchen, R., 2006. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(1), pp.76–99.
- Guéguen, Y. et al., 2006. [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Annales de biologie clinique*, 64(6), pp.535–48.
- Guha Mazumder, D.N. et al., 1988. Chronic arsenic toxicity from drinking tubewell water in rural West Bengal. *Bulletin of the World Health Organization*, 66(4), pp.499–506.
- Guicciardi, M.E. & Gores, G.J., 2010. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Seminars in liver disease*, 30(4), pp.402–10.
- Guldner, L. et al., 2011. Exposition de la population antillaise au chlordécone. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, p.25.
- Guldner, L. et al., 2010. Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: Ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone. *Environmental Research*, 110(2), pp.146–151.
- Guzelian, P.S., 1982. Chlordecone poisoning: a case study in approaches for detoxification of humans exposed to environmental chemicals. *Drug metabolism reviews*, 13(4), pp.663–79.
- Guzelian, P.S. et al., 1980. Liver structure and function in patients poisoned with chlordecone (Kepone). *Gastroenterology*, 78(2), pp.206–13.
- Guzelian, P.S., 1992. The clinical toxicology of chlordecone as an example of toxicological risk assessment for man. *Toxicology letters*, 64-65 Spec, pp.589–96.
- Hajovsky, H. et al., 2012. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*, 25(9), pp.1955–63.
- Hammond, B. et al., 1979. Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) and interaction with uterine estrogen receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(12), pp.6641–5.
- Hasler, J.A., 1999. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Molecular aspects of medicine*, 20(1-2), pp.12–24, 25–137.
- Hayden, K.M. et al., 2010. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology*, 74(19), pp.1524–30.
- Heatherington, A.C. et al., 1998. Percutaneous absorption and disposition of [¹⁴C]chlordecone in young and adult female rats. *Environmental research*, 79(2), pp.138–55.
- Hegarty, J.M., Glende, E.A. & Recknagel, R.O., 1986. Potentiation by chlordecone of the defect in hepatic microsomal calcium sequestration induced by carbon tetrachloride. *Journal of biochemical toxicology*, 1(2), pp.73–8.

- Hendriks, H.F., Brouwer, A. & Knook, D.L., 1987. The role of hepatic fat-storing (stellate) cells in retinoid metabolism. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 7(6), pp.1368–71.
- Herr, D.W., Gallus, J.A. & Tilson, H.A., 1987. Pharmacological modification of tremor and enhanced acoustic startle by chlordecone and p,p'-DDT. *Psychopharmacology*, 91(3), pp.320–5.
- Hewitt, L.A., Caillé, G. & Plaa, G.L., 1986. Temporal relationships between biotransformation, detoxication, and chlordecone potentiation of chloroform-induced hepatotoxicity. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 64(4), pp.477–82.
- Hézode, C. et al., 2003. Impact of smoking on histological liver lesions in chronic hepatitis C. *Gut*, 52(1), pp.126–9.
- Ho, I.K. et al., 1981. Neurochemical evaluation of chlordecone toxicity in the mouse. *Journal of toxicology and environmental health*, 8(5-6), pp.701–6.
- Houston, T.E. et al., 1981. Chlordecone alcohol formation in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a model for human metabolism of chlordecone (kepone). *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 1(3), pp.293–8.
- Huang, T.P., Ho, I.K. & Mehendale, H.M., 1981. Assessment of neurotoxicity induced by oral administration of chlordecone (Kepone) in the mouse. *Neurotoxicology*, 2(1), pp.113–24.
- IARC, 1979. Some halogenated hydrocarbons. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, 20, pp.1–609.
- Iijima, M., Côté, M.G. & Plaa, G.L., 1983. A semiquantitative morphologic assessment of chlordecone-potentiated chloroform hepatotoxicity. *Toxicology letters*, 17(3-4), pp.307–14.
- InVS-Inserm, 2009. Impact sanitaire de l'utilisation du chlordécone aux Antilles françaises - Recommandations pour les recherches et les actions de santé publique. *Institut de veille sanitaire*.
- Ishak, K. et al., 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*, 22(6), pp.696–9.
- Iwaisako, K. et al., 2014. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(32), pp.E3297–305.
- Jancova, P., Anzenbacher, P. & Anzenbacherova, E., 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 154(2), pp.103–16.
- Joly, P.-B., 2010. La saga du chlordécone aux Antilles françaises, Reconstruction chronologique 1968-2008. *action 39 du plan chlordécone Convention de collaboration AFSSET – INRA*.

- Kadhel, P. et al., 2014. Chlordecone exposure, length of gestation, and risk of preterm birth. *American journal of epidemiology*, 179(5), pp.536–44.
- Kalluri, R., 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), pp.1417–9.
- Kamimura, S. & Tsukamoto, H., 1995. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 22(4 Pt 1), pp.1304–9.
- Kavlock, RJ; Chemoff, N; Rogers, E. et al, 1980. Comparative tissue distribution of mirex and chlordecone in fetal and neonatal rats. *Pestic Biochem Physiol*, pp.14(3):227–235.
- Kermarrec, A., 1980. Niveau actuel de la contamination des chaînes biologiques en Guadeloupe : pesticides et métaux lourds. *INRA*.
- Kinnman, N. et al., 2000. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(5), pp.697–707.
- Kisseleva, T. & Brenner, D.A., 2006. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21 Suppl 3, pp.S84–7.
- Klingensmith, J.S., Lockard, V. & Mehendale, H.M., 1983. Acute hepatotoxicity and lethality of CCl₄ in chlordecone-pretreated rats. *Experimental and molecular pathology*, 39(1), pp.1–10.
- Klingensmith, J.S. & Mehendale, H.M., 1983. Destruction of hepatic mixed-function oxygenase parameters by CCl₄ in rats following acute treatment with chlordecone, Mirex, and phenobarbital. *Life sciences*, 33(23), pp.2339–48.
- Klingensmith, J.S. & Mehendale, H.M., 1981. Potentiation of brominated halomethane hepatotoxicity by chlordecone in the male rat. *Toxicology and applied pharmacology*, 61(3), pp.378–84.
- Klingensmith, J.S. & Mehendale, H.M., 1982. Potentiation of CCl₄ lethality by chlordecone. *Toxicology letters*, 11(1-2), pp.149–54.
- Knodell, R.G. et al., 1981. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1(5), pp.431–5.
- Kocarek, T.A., Schuetz, E.G. & Guzelian, P.S., 1994. Regulation of cytochrome P450 2B1/2 mRNAs by Kepone (chlordecone) and potent estrogens in primary cultures of adult rat hepatocytes on Matrigel. *Toxicology letters*, 71(2), pp.183–96.
- Krishna, D.R. & Klotz, U., 1994. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical pharmacokinetics*, 26(2), pp.144–60.

- Lagarrigue, M. et al., 2014. Localization and in situ absolute quantification of chlordecone in the mouse liver by MALDI imaging. *Analytical chemistry*, 86(12), pp.5775–83.
- Lamontagne, L.M. & Dupuy, J.M., 1984. Persistent infection with mouse hepatitis virus 3 in mouse lymphoid cell lines. *Infection and immunity*, 44(3), pp.716–23.
- Lapierre, P. & Alvarez, F., 2007. The liver: an organ of the immune system?. *Médecine sciences : M/S*, 23(11), pp.985–90.
- Larson, P.S. et al., 1979. Acute, subchronic, and chronic toxicity of chlordecone. *Toxicology and applied pharmacology*, 48(1 Pt 1), pp.29–41.
- Leduc, M. et al., 2013. Renal fibrosis and progression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(suppl 1), pp.i27–i27.
- Lee, J., Scheri, R.C., Zhang, Y., et al., 2008. Chlordecone, a mixed pregnane X receptor (PXR) and estrogen receptor alpha (ERalpha) agonist, alters cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism in C57BL/6 mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 233(2), pp.193–202.
- Lee, J., Scheri, R.C. & Curtis, L.R., 2008. Chlordecone altered hepatic disposition of [14C]cholesterol and plasma cholesterol distribution but not SR-BI or ABCG8 proteins in livers of C57BL/6 mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 229(3), pp.265–72.
- Lee, Y.A., Wallace, M.C. & Friedman, S.L., 2015. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*, 64(5), pp.830–41.
- Lemaire, G. et al., 2006. Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life sciences*, 79(12), pp.1160–9.
- Lemaire, G., de Sousa, G. & Rahmani, R., 2004. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical pharmacology*, 68(12), pp.2347–58.
- Lévy-Leblond, E., Oth, D. & Dupuy, J.M., 1979. Genetic study of mouse sensitivity to MHV3 infection: influence of the H-2 complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 122(4), pp.1359–62.
- Lewis, D.F. V, 2004. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*, 5(3), pp.305–18.
- Li, X., Benjamin, I.S. & Alexander, B., 2002. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *Journal of hepatology*, 36(4), pp.488–93.
- Lieber, C.S., Jones, D.P. & Decarli, L.M., 1965. Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver despite adequate diets. *The Journal of clinical investigation*, 44, pp.1009–21.

- Linder, R.E. et al., 1983. Spermotoxicity and tissue accumulation of chlordecone (Kepone) in male rats. *Journal of toxicology and environmental health*, 12(2-3), pp.183–92.
- Lohse, A.W. et al., 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology*, 110(4), pp.1175–81.
- Lok, A.S. et al., 2009. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*, 136(1), pp.138–48.
- Loreal, O. et al., 1991. Differential expression of laminin chains in hepatic lipocytes. *FEBS letters*, 290(1-2), pp.9–12.
- Mactutus, C.F. & Tilson, H.A., 1984. Neonatal chlordecone exposure impairs early learning and retention of active avoidance in the rat. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 6(1), pp.75–83.
- Mactutus, C.F., Unger, K.L. & Tilson, H.A., 1984. Evaluation of neonatal chlordecone neurotoxicity during early development: initial characterization. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 6(1), pp.67–73.
- Maroni, M. et al., 1981. Occupational exposure to polychlorinated biphenyls in electrical workers. II. Health effects. *British journal of industrial medicine*, 38(1), pp.55–60.
- Maroni, M. et al., 2003. Periportal fibrosis and other liver ultrasonography findings in vinyl chloride workers. *Occupational and environmental medicine*, 60(1), pp.60–5.
- Marra, F. et al., 1999. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(1), pp.140–8.
- Martin, J.P. et al., 1994. The virulence of mouse hepatitis virus 3, as evidenced by permissivity of cultured hepatic cells toward escape mutants. *Research in virology*, 145(5), pp.297–302.
- Martinez, A.J. et al., 1978. Chlordecone intoxication in man. II. Ultrastructure of peripheral nerves and skeletal muscle. *Neurology*, 28(7), pp.631–5.
- McGuire, R.F. et al., 1992. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 15(6), pp.989–97.
- Mehendale, H.M. et al., 1977. Kepone induction of hepatic mixed function oxidases in the male rat. *Life sciences*, 20(6), pp.991–7.
- Mehendale, H.M. et al., 1978. Effect of preexposure to kepone on hepatic mixed-function oxidases in the female rat. *Toxicology and applied pharmacology*, 44(1), pp.171–80.
- Milani, S. et al., 1990. Cellular localization of type I III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *The American journal of pathology*, 137(1), pp.59–70.

- Molowa, D.T. et al., 1986. Characterization of a unique aldo-keto reductase responsible for the reduction of chlordecone in the liver of the gerbil and man. *Journal of toxicology and environmental health*, 17(4), pp.375–84.
- Multigner, L. et al., 2006. Exposure to chlordecone and male fertility in Guadeloupe (French West Indies). *Epidemiology*, 17(6), p.S372.
- Multigner, L. et al., 2010. Chlordecone Exposure and Risk of Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(21), pp.3457–3462.
- Muriel, P. & Escobar, Y., 2003. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of applied toxicology : JAT*, 23(2), pp.103–8.
- Nakatani, K. et al., 2004. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*, 37(1), pp.29–36.
- NCI, 1976. Report on Carcinogenesis Bioassay of Technical Grade Chlordecone (Kepone) (CAS No. 143-50-0). *National Cancer Institute carcinogenesis technical report series*, 1976, pp.1–23.
- Nelson, D.R., 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of biochemistry and biophysics*, 369(1), pp.1–10.
- Nguyen, P. et al., 2008. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), pp.272–283.
- NIOSH, 2004. Pocket Guide to Chemical Hazards. *Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Cincinnati, Ohio*.
- O’Neil, M., 2001. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th edition. *Whitehouse Station, NJ: Merck and Co.*, p.359.
- O’Shea, R.S., Dasarathy, S. & McCullough, A.J., 2010. Alcoholic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(1), pp.307–28.
- Oie, C.I. et al., 2008. Liver sinusoidal endothelial cells are the principal site for elimination of unfractionated heparin from the circulation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 294(2), pp.G520–8.
- OMS, 2015a. Hépatite B. *Organisation mondiale de la santé, Aide-mémoire*.
- OMS, 2015b. Hépatite C. *Organisation mondiale de la santé, Aide-mémoire*, (164).
- Omura, T. & Sato, R., 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *The Journal of biological chemistry*, 237, pp.1375–6.

- Parsons, C.J. et al., 2004. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(5), pp.1106–15.
- Pessione, F. et al., 2001. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(1), pp.121–5.
- Peters, M.G. & Terrault, N.A., 2002. Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(5 Suppl 1), pp.S220–5.
- Pinzani, M. et al., 1996. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 110(2), pp.534–48.
- Plaa, G.L. et al., 1987. Chloroform interaction with chlordecone and mirex: correlation between biochemical and histological indices of toxicity and quantitative tissue levels. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 9(2), pp.198–207.
- Pockros, P.J. et al., 2007. Oral IDN-6556, an antiapoptotic caspase inhibitor, may lower aminotransferase activity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(2), pp.324–9.
- Poynard, T. et al., 2001. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *Journal of hepatology*, 34(5), pp.730–9.
- Puche, J.E., Saiman, Y. & Friedman, S.L., 2013. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 3(4), pp.1473–92.
- Racanelli, V. & Rehermann, B., 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(2 Suppl 1), pp.S54–62.
- Ramadori, G. et al., 1992. Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines. *Gastroenterology*, 103(4), pp.1313–21.
- Ramadori, G. & Saile, B., 2004. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 84(2), pp.153–9.
- Ramaiah, S.K., Apte, U. & Mehendale, H.M., 2001. Cytochrome P450E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 29(8), pp.1088–95.
- Rappaport, A.M., 1976. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beiträge zur Pathologie*, 157(3), pp.215–43.
- Regev, A. et al., 2002. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *The American journal of gastroenterology*, 97(10), pp.2614–8.

- Reich, M.R. & Spong, J.K., 1983. Kepone: a chemical disaster in Hopewell, Virginia. *International journal of health services : planning, administration, evaluation*, 13(2), pp.227–46.
- Reuber, M.D., 1979. The carcinogenicity kepone. *Journal of environmental pathology and toxicology*, 2(3), pp.671–86.
- Richardson, J.R. et al., 2014. Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 71(3), pp.284–90.
- Rockey, D.C. & Chung, J.J., 1995. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *The Journal of clinical investigation*, 95(3), pp.1199–206.
- Rockey, D.C., Housset, C.N. & Friedman, S.L., 1993. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 92(4), pp.1795–804.
- Rosecrans, J.A. et al., 1982. Effects of perinatal exposure to chlordecone (Kepone) on neuroendocrine and neurochemical responsiveness of rats to environmental challenges. *Neurotoxicology*, 3(2), pp.131–42.
- Roskams, T. et al., 1996. Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(3), pp.524–32.
- Roudot-Thoraval, F. et al., 1997. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. The Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 26(2), pp.485–90.
- Rubinstein, D., Roska, A.K. & Lipsky, P.E., 1986. Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 137(6), pp.1803–10.
- Rugbjerg, K. et al., 2011. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease--a population-based case-control study evaluating the potential for recall bias. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 37(5), pp.427–36.
- Russo, F.P. et al., 2006. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*, 130(6), pp.1807–21.
- Saito, S. et al., 1993. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *International immunology*, 5(5), pp.559–63.
- Santra, A. et al., 1999. Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 18(4), pp.152–5.
- Sanyal, A.J. et al., 2010. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *The New England journal of medicine*, 362(18), pp.1675–85.

- Schuppan, D. et al., 2001. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease*, 21(3), pp.351–72.
- Schuppan, D., 1990. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Seminars in liver disease*, 10(1), pp.1–10.
- Scippo, M.-L. et al., 2004. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(3), pp.664–9.
- Shah, P. V et al., 1987. Comparison of the penetration of 14 pesticides through the skin of young and adult rats. *Journal of toxicology and environmental health*, 21(3), pp.353–66.
- Simon, G.S. et al., 1986. Dominant lethal assay of chlordecone and its distribution in the male reproductive tissues of the rat. *Toxicology letters*, 30(3), pp.237–45.
- Sirica, A.E. 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), pp.1047–54.
- Skalsky, H.L. et al., 1979. The role of plasma proteins in the transport and distribution of chlordecone (Kepone) and other polyhalogenated hydrocarbons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 320, pp.231–7.
- Skalsky, H.L., Wrenn, J.M. & Borzelleca, J.F., 1980. In vitro and in vivo evaluation of the movement of Kepone in the rat submaxillary gland. *Journal of environmental pathology and toxicology*, 3(5-6), pp.529–36.
- Smedsrød, B., 2004. Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comparative hepatology*, 3 Suppl 1, p.S22.
- Smialowicz, R.J. et al., 1985. Evaluation of the immunotoxic potential of chlordecone with comparison to cyclophosphamide. *Journal of toxicology and environmental health*, 15(5), pp.561–74.
- Snegaroff, J., 1977a. Les résidus d'insecticides organochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de Guadeloupe. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, 26, pp.251–268.
- Snegaroff, J., 1977b. Les résidus d'insecticides organochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de Guadeloupe. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, 26, pp.251–268.
- Sobel, E.S. et al., 2005. Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides in (NZB x NZW)F1 mice. *Environmental health perspectives*, 113(3), pp.323–8.
- Sobel, E.S. et al., 2006. Comparison of chlordecone effects on autoimmunity in (NZBxNZW) F(1) and BALB/c mice. *Toxicology*, 218(2-3), pp.81–9.
- Soine, P.J. et al., 1982. Preferential binding of chlordecone to the protein and high density lipoprotein fractions of plasma from humans and other species. *Journal of toxicology and environmental health*, 9(1), pp.107–18.

- Soni, M.G. & Mehendale, H.M., 1998. Role of tissue repair in toxicologic interactions among hepatotoxic organics. *Environmental health perspectives*, 106 Suppl , pp.1307–17.
- Swain, M.G., 2008. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clinical science (London, England : 1979)*, 114(7), pp.457–66.
- Swain, M.G., 2010. Natural killer T cells within the liver: conductors of the hepatic immune orchestra. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 28(1), pp.7–13.
- Tagawa, Y., Sekikawa, K. & Iwakura, Y., 1997. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(3), pp.1418–28.
- Taguchi, F., Massa, P.T. & ter Meulen, V., 1986. Characterization of a variant virus isolated from neural cell culture after infection of mouse coronavirus JHMV. *Virology*, 155(1), pp.267–70.
- Takeda, K. et al., 2000. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp.5498–503.
- Tao, H. et al., 2014. The significance of YKL-40 protein in liver fibrosis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 63(4), pp.249–54.
- Tardieu, M., Boespflug, O. & Barbé, T., 1986. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *Journal of virology*, 60(2), pp.574–82.
- Taylor, J.R. et al., 1978. Chlordecone intoxication in man. I. Clinical observations. *Neurology*, 28(7), pp.626–30.
- Taylor, J.R., 1982. Neurological manifestations in humans exposed to chlordecone and follow-up results. *Neurotoxicology*, 3(2), pp.9–16.
- Terpstra, V. & van Berkel, T.J., 2000. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood*, 95(6), pp.2157–63.
- Teta, M.J. & Ott, M.G., 1988. A mortality study of a research, engineering, and metal fabrication facility in western New York State. *American journal of epidemiology*, 127(3), pp.540–51.
- Thomas, D.L., 2002. Hepatitis C and human immunodeficiency virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(5 Suppl 1), pp.S201–9.
- Thomson, A.B.R. & Shaffer, E.A., 2005. Principes fondamentaux de gastro-entérologie: États pathologiques et démarches thérapeutiques, 5e édition.

- Tiegs, G., Hentschel, J. & Wendel, A., 1992. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *The Journal of clinical investigation*, 90(1), pp.196–203.
- Tilg, H. & Day, C.P., 2007. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 4(1), pp.24–34.
- Tilson, H.A., Emerich, D. & Bondy, S.C., 1986. Inhibition of ornithine decarboxylase alters neurological responsiveness to a tremorigen. *Brain research*, 379(1), pp.147–50.
- Tilson, H.A. & Mactutus, C.F., 1982. Chlordecone neurotoxicity: a brief overview. *Neurotoxicology*, 3(2), pp.1–8.
- Tsochatzis, E.A., Bosch, J. & Burroughs, A.K., 2014. Future treatments of cirrhosis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 8(5), pp.571–81.
- Vento, S. & Cainelli, F., 2002. Does hepatitis C virus cause severe liver disease only in people who drink alcohol? *The Lancet. Infectious diseases*, 2(5), pp.303–9.
- Viel, J.-F. et al., 2015. Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. *Environment international*, 82, pp.69–75.
- Vilardebo, A. et al., 1974. Chlordecone et autres insecticides dans la lutte contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* GERM. *Fruits*, 29(24).
- Wagner-Schuman, M. et al., 2015. Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U.S. children. *Environmental health : a global access science source*, 14, p.44.
- Wallace, K., Burt, A.D. & Wright, M.C., 2008. Liver fibrosis. *The Biochemical journal*, 411(1), pp.1–18.
- Wang, B. et al., 2015. Self-renewing diploid Axin2+ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*, 524(7564), pp.180–5.
- Wang, C.-S. et al., 2002. Smoking and alanine aminotransferase levels in hepatitis C virus infection: implications for prevention of hepatitis C virus progression. *Archives of internal medicine*, 162(7), pp.811–5.
- Wang, F. et al., 2007. Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides: a comparison of splenic B-cell effects of chlordecone and estradiol in (NZBxNZW)F1 mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 99(1), pp.141–52.
- Wang, F. et al., 2008. Comparison of chlordecone and estradiol effects on splenic T-cells in (NZBxNZW)F(1) mice. *Toxicology letters*, 183(1-3), pp.1–9.
- Wang, H.-X. et al., 2012. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World journal of gastroenterology*, 18(2), pp.119–25.

- Wang, T.P., Ho, I.K. & Mehendale, H.M., 1981. Correlation between neurotoxicity and chlordecone (Kepone) levels in brain and plasma in the mouse. *Neurotoxicology*, 2(2), pp.373–81.
- Weber, L.W.D., Boll, M. & Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*, 33(2), pp.105–36.
- WHO, 2015. Alcohol. *World Health Organisation, Fact sheet*.
- Wisse, E. et al., 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 5(4), pp.683–92.
- Wu, J. & Lanier, L.L., 2003. Natural killer cells and cancer. *Advances in cancer research*, 90, pp.127–56.
- Yamazaki, M., Suzuki, H. & Sugiyama, Y., 1996. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharmaceutical research*, 13(4), pp.497–513.
- Yu, C. et al., 2003. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *The American journal of pathology*, 163(4), pp.1653–62.
- Yuen, M.-F. et al., 2009. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *Journal of hepatology*, 50(1), pp.80–8.
- Zarski, J.P. et al., 1998. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *Journal of hepatology*, 28(1), pp.27–33.