

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**  
**UNIVERSITÉ DE TOURS**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »**

Année 2020/2021

N°87

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**Spécialité Biologie Médicale**

**TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par Joévin Besombes

Né le 09/04/1992 à Foix (09)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 11/10/2021

**Effets de faibles doses de manèbe et de mancozèbe**  
**sur des cellules stromales mésenchymateuses médullaires primaires**

JURY

Présidente :

Mme le Professeur Claire Pouplard, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de Tours

Membres :

M. le Professeur Emmanuel Gyan, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de Tours

M. le Professeur Olivier Hérault, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de Tours

Mme le Docteur Amélie Foucault, AHU, Faculté de Pharmacie et CHRU de Tours

**ANNÉE : 2020 - 2021**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO,  
Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **16 PROFESSEURS**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Véronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **3 PROFESSEURS ÉMÉRITES**

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### **38 MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE

GERMON  
GLEVAREC  
HERVE-AUBERT  
JUSTE  
LAJOIE  
LANOUE  
MARC  
MARCHAIS  
MAVEL  
MUNNIER  
OMBETTA-GOKA  
OUDIN  
PASQUALIN  
PRIE  
RESPAUD  
SOUCE  
TAUBER  
VELGE-ROUSSEL  
VERCOUILLIE  
VERGOTE  
VIERRON  
ZHANG

Stéphanie  
Gaëlle  
Katel  
Matthieu  
Laurie  
Arnaud  
Jillian  
Hervé  
Sylvie  
Emilie  
Jean-Edouard  
Audrey  
Côme  
Gildas  
Renaud  
Martin  
Clovis  
Florence  
Johnny  
Jackie  
Emilie  
Bei-Li

IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES  
PHARMACIE GALENIQUE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
PHARMACIE GALENIQUE  
CHIMIE ORGANIQUE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
PHARMACOLOGIE  
CHIMIE ORGANIQUE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
PHARMACOLOGIE

### **I CONTRAT D'ENSEIGNEMENT**

VANIER

Antoine

BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

### **I DIRECTEUR DE RECHERCHE**

CHALON

Sylvie

INSERM

### **2 CHARGÉS DE RECHERCHE**

MEVELEC  
MOIRE

Marie-Noëlle  
Nathalie

INRA  
INRA

### **I PRAG**

WALTERS-GALOPIN

Susan

ANGLAIS

### **I PAST**

JOYEUX

VINCENT

Filière Pharmacie

### **3 AHU**

FOUCAULT  
FOUCAULT-FRUCHARD  
MARLET

Amélie  
Laura  
Julien

HEMATOLOGIE  
PHARMACIE CLINIQUE  
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE



## **SERMENT DE GALIEN**

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

*Date : 11/10/2021*

*L'étudiant  
M. Joévin Besombes*

*Le Doyen de la Faculté  
Mme Véronique Maupoil*

# REMERCIEMENTS

---

## ***Aux membres du jury.***

*À Madame le Professeur Claire Pouplard, merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. J'ai découvert l'hématologie dans votre service et je ne l'ai plus quittée depuis ! Je vous remercie aussi pour la qualité de vos enseignements en hémostase.*

*À Monsieur le Professeur Olivier Hérault, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre service et de votre équipe de recherche durant ces deux années très enrichissantes. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master au sein de l'équipe LNOx et de m'avoir initié au domaine passionnant de la recherche biomédicale. Merci enfin pour votre disponibilité et vos conseils avisés tout au long de mon internat.*

*À Monsieur le Professeur Emmanuel Gyan, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse afin de juger ce travail.*

*À Madame le Docteur Amélie Foucault, ma directrice de thèse, qui m'a supporté pendant ces deux longues années ! Un immense merci pour ta grande disponibilité et la confiance que tu m'as accordée, aussi bien en tant qu'interne que stagiaire au sein du laboratoire de recherche. Ma thèse n'aurait pas été la même sans ton implication et tes relectures, que je t'ai parfois demandées à la dernière minute ... J'ai appris énormément à tes côtés, notamment sur la façon d'utiliser correctement le vernis à ongles !*

## ***Aux membres du laboratoire d'Hématologie Biologique du CHRU de Tours.***

*Un grand merci à Cédric, Emmanuelle, Marie-Hélène, Marie-Thérèse, Noémie et Sébastien. Merci pour votre formation de haut vol en hématologie cellulaire, dans toute sa diversité et ses spécificités. Merci pour votre disponibilité et toutes les connaissances transmises qui me suivront tout au long de mon exercice professionnel.*

*Je tiens ensuite à remercier les techniciens, les secrétaires et les aides de laboratoire, surtout ceux (qui se reconnaîtront) qui ont eu à supporter mes longues sessions d'écoute de Mylène Farmer en culture cellulaire. Merci pour votre bonne humeur, les petits-déjeuners et les cafés partagés mais aussi pour vos conseils et votre indulgence même à l'époque où je ne connaissais rien à l'hématologie !*

### ***Aux membres de l'équipe LNOx.***

*Je tiens à remercier tout particulièrement Nathalie. Tu m'as accueilli lors de mon premier jour au labo de recherche avec grande gentillesse, alors que tu venais de découvrir que les pneus de ta voiture avaient été crevés ... Merci pour ta formation en culture cellulaire, en cytométrie en flux et pour tous les « trucs et astuces » de labo.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Jérôme. Ton talent incomparable dans le dressage de ton hippocampe et tes précieux conseils m'ont permis de comprendre et d'interpréter mes résultats. Merci pour ta relecture éclairée des chapitres concernant les analyses Seahorse.*

*Merci également à Fred, tu m'as fait découvrir le monde magique de la biologie moléculaire et de la microscopie confocale. Ces moments où nous comparions la taille de nos cellules dans cette petite pièce sombre resteront à jamais gravés dans ma mémoire ! Je te salue Fred !*

*Enfin, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe LNOx, pour votre gentillesse et votre optimisme sans faille face à des résultats qui me laissaient parfois ... perplexe !*

### ***Aux personnels des différents laboratoires qui m'ont accueilli au cours de mon internat.***

*Merci à l'ensemble des biologistes, ingénieurs, techniciens, secrétaires, ... avec qui j'ai pu travailler tout au long de mon internat, pour leurs enseignements et les connaissances qu'ils m'ont transmises et qui font de la biologie médicale une discipline si passionnante.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe du laboratoire d'hématologie de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, dans lequel j'ai pu effectuer mon dernier semestre d'internat, notamment le Professeur Véronique De Mas et le Professeur Éric Delabesse qui ont accepté de m'accueillir dans leur service. Merci pour votre disponibilité et vos enseignements très pointus en cytologie et en biologie moléculaire qui ont clôturé avec panache mon dernier semestre d'internat. Merci également à mes co-internes toulousains, qui devaient parfois se demander ce que je faisais au 3<sup>ème</sup> étage quand ils ne me voyaient pas de la journée : non je ne dormais pas sur mon PC, je validais de la biomol !*

### ***A mes co-internes et amis.***

*Merci à mes co-internes, de la première heure au CHU de Poitiers, puis au CHU de Tours et enfin au CHU de Toulouse. Ce fut un réel plaisir de vous côtoyer au travail et en dehors ! Merci pour les soirées, les apéros et les week-ends partagés avec vous. Mon internat n'aurait pas été le même sans vous !*

*A mes amis de longue date, du lycée et de la fac. Nos chemins se sont parfois un peu éloignés mais nous avons gardé contact et c'est toujours un plaisir de vous retrouver. J'ai une pensée toute particulière pour les « plus anciens », Noémie et Edward, merci pour votre amitié et pour tous ces bons moments partagés ensemble. Merci Edward pour l'hébergement parisien et le confort de ton clic-clac !*

### ***A mes parents.***

*Le plus grand des mercis pour m'avoir accompagné depuis le début, dans les moments de joie comme dans ceux plus difficiles. Votre soutien et vos encouragements m'ont permis de mener à bien ces longues études et je suis fier de vous avoir à mes côtés aujourd'hui, car si j'en suis arrivé là, c'est aussi grâce à vous !*

### ***A toi, Camille.***

*Merci de partager ma vie depuis maintenant 5 ans (c'est bon, on a écrit la même durée dans nos remerciements de thèse respectifs !). Merci d'être auprès de moi à chaque instant. Nous nous sommes expatriés ensemble au bout de la France pour vivre la plus belle des aventures ! Merci de partager ma vie personnelle, et aussi un peu professionnelle, et de la rendre encore plus belle chaque jour !*

*« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte »*

Louis Pasteur (1822-1895)

*« La route ? Là où on va, on n'a pas besoin de route ! »*

Emmett Brown, dit « Doc », 1985



# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>16</b>
 <b>PARTIE 1 : INTRODUCTION .....</b>	 <b>17</b>
<b>1. Cellules stromales mésenchymateuses et microenvironnement médullaire.....</b>	<b>18</b>
1.1. Hématopoïèse et niche hématopoïétique.....	18
1.1.1. Définition et ontogénie de l'hématopoïèse .....	18
1.1.2. Concept de niche hématopoïétique.....	20
1.1.3. Principaux composants cellulaires et moléculaires de la niche .....	20
1.2. Espèces réactives de l'oxygène, hypoxie et niches hématopoïétiques .....	25
1.3. Altération des CSM dans les LAM et les SMD .....	27
<b>2. Effets des pesticides sur la santé humaine.....</b>	<b>29</b>
2.1. Pesticides : utilisation et surveillance .....	29
2.1.1. Définition et classifications des pesticides .....	29
2.1.2. Utilisation des pesticides au niveau européen et français.....	30
2.1.3. Surveillance par les agences intergouvernementales .....	32
2.2. Pesticides et cancers.....	33
2.2.1. Sources et voies d'exposition aux pesticides .....	33
2.2.2. Pesticides et hémopathies malignes .....	35

2.3.	Manèbe et mancozèbe : deux pesticides d'intérêt .....	38
2.3.1.	Usage et réglementation .....	38
2.3.2.	Profil toxicologique du manèbe et du mancozèbe .....	39
2.4.	Manganèse : constituant essentiel du manèbe et du mancozèbe .....	42
2.4.1.	Propriétés physicochimiques du manganèse et sources d'exposition .....	42
2.4.2.	Profil toxicologique du manganèse .....	43
2.4.3.	Effets cellulaires du manganèse .....	44
3.	<b>Objectifs du travail .....</b>	<b>46</b>
<b>PARTIE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>		<b>47</b>
1.	<b>Collecte des échantillons, culture cellulaire, numération et viabilité .....</b>	<b>48</b>
2.	<b>Préparation des pesticides et exposition des cellules.....</b>	<b>48</b>
3.	<b>Préparation du manganèse et exposition des cellules .....</b>	<b>49</b>
4.	<b>Étude de la sénescence .....</b>	<b>50</b>
4.1.	Détection de l'activité $\beta$ -galactosidase par méthode cytochimique .....	50
4.2.	Détection de la $\beta$ -galactosidase par immunofluorescence .....	50
5.	<b>Étude de l'expression de l'ALDH2.....</b>	<b>51</b>
5.1.	Extraction des ARN, reverse-transcription et PCR quantitative .....	51
5.2.	Extraction des protéines et quantification par <i>western-blot</i> .....	52
6.	<b>Étude du cycle cellulaire des CSM .....</b>	<b>52</b>
7.	<b>Étude de la capacité clonogénique des cellules stromales mésenchymateuses .....</b>	<b>53</b>
8.	<b>Quantification du niveau d'espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>53</b>
9.	<b>Étude du métabolisme énergétique par technique Seahorse .....</b>	<b>54</b>
10.	<b>Représentations graphiques et analyses statistiques.....</b>	<b>55</b>

<b>PARTIE 3 : RÉSULTATS .....</b>	<b>56</b>
<b>1. Exposition des CSM médullaires primaires à de faibles doses de manèbe et de mancozèbe durant 21 jours .....</b>	<b>57</b>
1.1. L'exposition au manèbe ou au mancozèbe diminue le nombre de CSM viables...	57
1.2. L'exposition au manèbe ou au mancozèbe induit une augmentation de la sénescence des CSM.....	58
1.3. L'exposition au manèbe ou au mancozèbe diminue l'expression de l'ALDH2 dans les CSM.....	59
<b>2. Exposition des CSM médullaires primaires à de faibles doses de manganèse durant 21 jours.....</b>	<b>60</b>
2.1. L'exposition au manganèse diminue le nombre de CSM viables ainsi que leur capacité clonogénique .....	60
2.2. L'exposition au manganèse ne semble pas modifier le cycle cellulaire des CSM .	63
2.3. Les faibles doses de manganèse semblent améliorer le fonctionnement mitochondrial des CSM .....	64
<b>PARTIE 4 : DISCUSSION.....</b>	<b>66</b>
<b>PARTIE 5 : CONCLUSION .....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>75</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>83</b>

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1 :</b> Évolution de la modélisation de l'hématopoïèse (d'après <sup>6</sup> ).....	19
<b>Figure 2 :</b> Organisation cellulaire de la moelle osseuse hématopoïétique (d'après <sup>3</sup> ). ....	23
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique des facteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la niche hématopoïétique <sup>9</sup> . ....	25
<b>Figure 4 :</b> Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et principaux systèmes anti-oxydants (d'après <sup>27</sup> ). ....	27
<b>Figure 5 :</b> Modifications de la niche hématopoïétique et hémopathies malignes (d'après <sup>7</sup> )....	28
<b>Figure 6 :</b> Évolution de la quantité de pesticides utilisée en France et dans le monde entre 1990 et 2019 (d'après <sup>35</sup> ).....	30
<b>Figure 7 :</b> Évolution des ventes de pesticides par catégories en France (d'après <sup>35</sup> ).....	31
<b>Figure 8 :</b> Diagramme illustrant l'augmentation du risque de LAM dans la population exposée professionnellement aux pesticides <sup>52</sup> . ....	36
<b>Figure 9 :</b> L'exposition de CSM médullaires primaires aux faibles doses du cocktail de 7 pesticides induit une diminution de l'ALDH2 <sup>56</sup> . ....	37
<b>Figure 10 :</b> Structure chimique du manèbe et du mancozèbe <sup>58</sup> .....	38
<b>Figure 11 :</b> Principaux pesticides dont les résidus retrouvés dans l'alimentation excèdent la limite autorisée au cours de l'année 2017 (d'après <sup>61</sup> ). ....	39
<b>Figure 12 :</b> Manganèse et stress oxydant (d'après <sup>83</sup> ). ....	44
<b>Figure 13 :</b> Représentation schématique des doses utilisées sur une courbe modélisant l'exposition d'une population à un pesticide. ....	49
<b>Figure 14 :</b> Détermination des principaux paramètres respiratoires et glycolytiques grâce à l'utilisation de drogues inhibant la respiration mitochondriale (Seahorse).....	55
<b>Figure 15 :</b> Le nombre de CSM viables est diminué après 21 j d'exposition à de faibles doses de pesticides. ....	57
<b>Figure 16 :</b> La sénescence des CSM est augmentée après 21 j d'exposition à de faibles doses de pesticides. ....	58
<b>Figure 17 :</b> L'ALDH2 est diminuée après 21 j d'exposition des CSM au manèbe ou au mancozèbe à faibles doses. ....	59
<b>Figure 18 :</b> Le nombre de CSM viables est diminué après 21 j d'exposition à de faibles concentrations de manganèse.....	61
<b>Figure 19 :</b> La capacité clonogénique des CSM est diminuée après 21 j d'exposition à de faibles concentrations de manganèse.....	62
<b>Figure 20 :</b> Le cycle cellulaire des CSM ne semble pas modifié après 21 j d'exposition à de faibles doses de manganèse, de manèbe ou de mancozèbe. ....	63
<b>Figure 21 :</b> Effets sur le métabolisme oxydatif et énergétique des CSM après 21 j d'exposition à de faibles doses de manganèse, de manèbe ou de mancozèbe. ....	65

## LISTE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1 :** Exemple de familles chimiques de pesticides et de leur cible principale. ....30

**Tableau 2 :** Classification du CIRC selon le risque de cancérogénicité pour l'Homme. ....33

## LISTE DES ANNEXES

---

**Annexe 1 :** Classification des pesticides selon le CIRC. ....84

**Annexe 2 :** Familles et substances actives impliquées dans les excès de risques significatifs de leucémies d'après l'expertise collective menée par l'INSERM (2021). ....86

**Annexe 3 :** Concentrations en pesticides utilisés dans les milieux de culture. ....87

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ACTB : actine  $\beta$

ADI : *acceptable daily intake*

ADN : acide désoxyribonucléique

ALDH2 : aldéhyde déshydrogénase 2

ANG-1 : angiopoïétine-1

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

CAR : *CXCL12-abundant reticular cell*

CFU-F : *colony forming unit fibroblast*

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CKI : *cyclin-dependent kinase inhibitor*

CM-H<sub>2</sub>DCFDA : *5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester*

CMN : cellules mononucléées sanguines

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSM : cellule stromale mésenchymateuse

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMT1 : *divalent metal transporter 1*

ECAR : *extracellular acidification rate*

EFSA : *European food safety authority*

ETU : éthylène thiourée

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HIF : *hypoxia inducible factor*

IC95 % : intervalle de confiance à 95 %

ISCT : *International society for cell therapy*

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LLC : leucémie lymphoïde chronique

Mn : manganèse

MnSOD : *manganese superoxide dismutase*

OCR : *oxygen consumption rate*

OMS : Organisation mondiale de la santé

OR : *odds ratio*

PBS : *phosphate buffer saline*

PCR : *polymerase chain reaction*

rhFGF : *recombinant human fibroblast growth factor*

ROS : *reactive oxygen species*

SCF : *stem cell factor*

SDF-1 : *stromal cell-derived factor 1*

SMD : syndrome myélodysplasique

SVF : sérum de veau fœtal

TGF- $\beta$  : *transforming growth factor- $\beta$*

Tpo : thrombopoïétine

TSH : *thyroid-stimulating hormone*

US EPA : *United States Environmental protection agency*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

$\alpha$ -MEM :  *$\alpha$ -minimum essential medium*

## RÉSUMÉ

---

L'exposition aux pesticides et leurs impacts sur la santé humaine et l'environnement sont aujourd'hui des problématiques majeures de santé publique. Dans cette étude, des cellules stromales mésenchymateuses médullaires primaires (CSM) ont été exposées durant 21 jours à de faibles doses de manèbe ou de mancozèbe, deux pesticides dépassant le plus souvent la limite maximale autorisée dans les aliments. Il a ainsi été observé une diminution de la prolifération des CSM, concomitante à une augmentation de leur sénescence. Il a également été mis en évidence une diminution de l'expression de l'aldéhyde déshydrogénase 2 (*ALDH2*), une enzyme essentielle au catabolisme de l'acétaldéhyde responsable de cassures de l'ADN. Enfin, les CSM ont été exposées à de faibles concentrations de manganèse, constituant essentiel du manèbe et du mancozèbe, entraînant une baisse de leur prolifération sans altérer le fonctionnement de leur chaîne respiratoire mitochondriale.

Mots-clefs : Exposition aux pesticides / Manganèse / CSM / ALDH2 / Métabolisme énergétique.

## ABSTRACT

---

Pesticide exposure and their impacts on the human health and environment are today's major public health issue. In this study, primary bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) were exposed during 21 days to low doses of maneb and mancozeb, two pesticides exceeding most often the maximum residue level allowed in food samples. This exposure resulted in a decrease in cell proliferation, promotion of senescence and decreased aldehyde dehydrogenase 2 (*ALDH2*) expression, an essential enzyme for the catabolism of acetaldehyde causing DNA breaks. Moreover, BM-MSCs were exposed to low doses of manganese, an essential component of maneb and mancozeb, resulting in a decrease in their proliferation without impairing the functioning of their mitochondrial respiratory chain.

Keywords : Pesticide exposure / Manganese / BM-MSC / ALDH2 / Energetic metabolism.



## AVANT-PROPOS

---

L'exposition aux pesticides et leurs conséquences sur la santé humaine et l'environnement sont actuellement devenues des problématiques majeures, non seulement en termes de santé publique, mais aussi sur un plan socio-économique et politique. L'impact de fortes doses de pesticides, lors d'expositions professionnelles, a été particulièrement étudié depuis plusieurs années et bénéficie d'une surveillance accrue. De nombreux effets toxiques ont été mis en évidence, notamment à l'origine de cancers solides et d'hémopathies lymphoïdes. Cependant, la population générale est elle aussi quotidiennement exposée à de très faibles doses de multiples pesticides et il n'existe à ce jour que très peu de données sur les potentielles conséquences de cette exposition. De plus, certains pesticides tels que le manèbe et le mancozèbe sont instables dans l'environnement et libèrent le manganèse qu'ils contiennent lors de leur dégradation.

Dans ce contexte, l'étude des mécanismes conduisant au développement des syndromes myélodysplasiques (SMD) et des leucémies aiguës myéloïdes (LAM), dont l'incidence augmente avec l'âge, représente un enjeu majeur. De nombreuses données de la littérature ont illustré le rôle du microenvironnement médullaire dans l'émergence de ces hémopathies, notamment celui des cellules stromales mésenchymateuses (CSM), composant cellulaire majeur de la niche hématopoïétique.

Cette étude s'est donc intéressée dans un premier temps à l'impact *in vitro* de l'exposition à long terme de CSM médullaires primaires à de faibles doses de manèbe et de mancozèbe, deux pesticides dépassant fréquemment les limites autorisées dans l'alimentation en France. Dans un second temps, la participation aux effets biologiques observés du manganèse libéré par ces pesticides a été déterminée en exposant ces CSM à de faibles doses de ce métal.

## **PARTIE 1 : INTRODUCTION**

# 1. Cellules stromales mésenchymateuses et microenvironnement médullaire

---

## 1.1. Hématopoïèse et niche hématopoïétique

---

### *1.1.1. Définition et ontogénie de l'hématopoïèse*

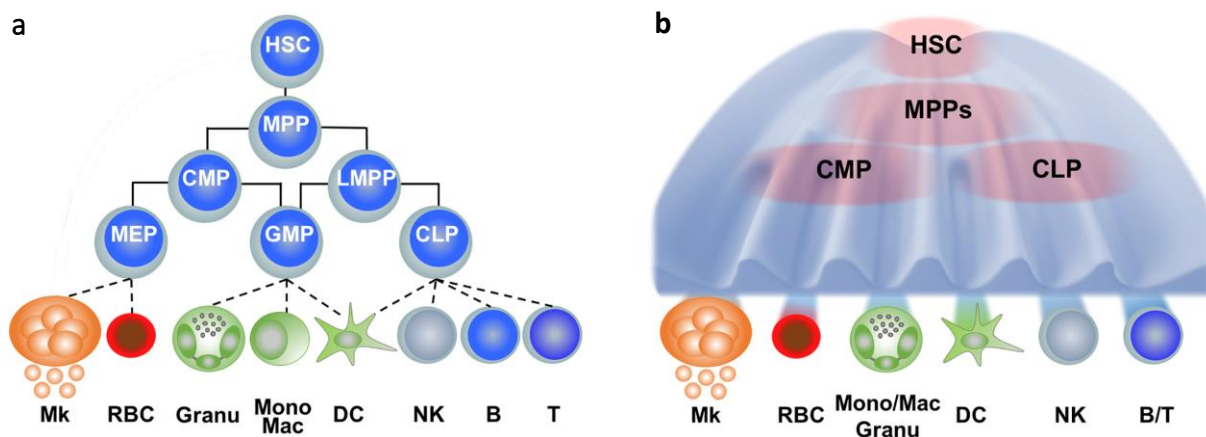
L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production et le renouvellement des éléments figurés du sang tout au long de la vie d'un individu (Figure 1). Elle débute dès le stade embryonnaire et dérive du mésoderme du sac vitellin qui va donner naissance aux premières cellules hématopoïétiques dans la région aorte-gonade-mesonephros. Par la suite, ces cellules iront coloniser le foie et la rate puis, dans un second temps, la moelle osseuse qui deviendra le site exclusif et définitif de l'hématopoïèse à partir de la naissance. À l'âge adulte, la moelle osseuse hématopoïétique se limite aux os courts et plats : sternum, côtes, bassin, crâne et vertèbres et génère environ  $4 \text{ à } 5 \cdot 10^{11}$  cellules hématopoïétiques par jour<sup>1</sup>. Cette production en continu d'une grande quantité de cellules nécessite un système régulé et qui possède de grandes capacités d'adaptation impliquant de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires.

Chez l'adulte, l'hématopoïèse débute à partir d'un petit pool de cellules souches hématopoïétiques (CSH) estimé entre 50 000 et 200 000<sup>2</sup>, localisé au sein de la moelle osseuse et caractérisé par les trois propriétés communes à toutes les cellules souches retrouvées chez l'adulte<sup>3</sup> :

- l'auto-renouvellement,
- la différenciation,
- la multipotence.

La preuve de l'existence des CSH a été apportée par la découverte d'une cellule capable de reconstituer une hématopoïèse complète et à long terme après greffe dans une souris ayant subi une irradiation sublétales<sup>4</sup>. Après plusieurs étapes de multiplication et de différenciation, les CSH ont ainsi la capacité de générer l'ensemble des cellules présentes dans le sang périphérique. Dans le modèle classique de l'hématopoïèse, la division asymétrique d'une CSH génère un progéniteur multipotent qui s'engage dans la lignée myéloïde ou lymphoïde puis

réduit son potentiel de différenciation par palier jusqu'à s'orienter vers les précurseurs d'un seul type cellulaire (Figure 1a)<sup>1</sup>. Cependant, de récentes études ont révélé une hétérogénéité importante des CSH. L'engagement au sein d'une lignée pourrait se produire plus précocement, le phénotype spécifique d'une lignée s'acquerrait de façon continue et une CSH pourrait parfois modifier son devenir, y compris après son engagement dans une lignée cellulaire<sup>5</sup>. Ainsi, le modèle actuel s'inspire du concept de « paysage épigénétique » développé par Waddington en 1957, avec une acquisition continue du phénotype régulé par un ensemble de facteurs épigénétiques modulables au cours de la différenciation. Dans ce modèle, les étapes en aval de la CSH ne sont plus définies par l'existence stable de progéniteurs multipotents, mais doivent plutôt être considérées comme des états transitoires dans l'acquisition continue du phénotype de cellule mature (Figure 1b)<sup>6</sup>.



**Figure 1 : Évolution de la modélisation de l'hématopoïèse (d'après<sup>6</sup>).**

(a) Modèle classique de l'hématopoïèse. La CSH s'engage dans une lignée grâce à une série d'étapes de différenciation binaire dont la première génère un progéniteur multipotent (MPP) puis un progéniteur commun myéloïde (CMP), se différenciant en progéniteur mégacaryocytaire et érythroïde (MEP) ou en progéniteur granulo-monocytaire (GMP), ou un progéniteur commun lympho-myéloïde (LMPP), se différenciant en progéniteur lymphoïde commun (CLP) ou en progéniteur granulo-monocytaire. (b) Modèle actuel continu de l'hématopoïèse. La CSH ne se différencie pas de façon discrète en progéniteur engagé mais acquiert un phénotype de façon continue de façon à donner l'ensemble des lignées retrouvées dans le sang périphérique (Mk : mégacaryocyte, RBC : globule rouge, Mono/Mac : monocyte/macrophage, Granu : lignée granuleuse, DC : cellule dendritique, NK : lymphocyte NK, B/T lymphocyte B/T).

### ***1.1.2. Concept de niche hématopoïétique***

Afin d'assurer l'homéostasie de l'hématopoïèse tout au long de la vie, dans des conditions physiologiques ou pathologiques (saignements, stress hématopoïétiques induits par des chimiothérapies, par l'inflammation, ...), l'équilibre entre différenciation et auto-renouvellement doit être finement régulé. La régulation de l'activité des CSH s'effectue à plusieurs niveaux, *via* des facteurs cellulaires intrinsèques (régulation transcriptionnelle, épigénétique et métabolique) ou extrinsèques incluant une régulation à distance (humorale et neuronale) et une régulation locale au niveau du microenvironnement médullaire aussi appelé « niche hématopoïétique »<sup>7</sup>.

Le concept de niche hématopoïétique a été proposé dès 1978 par Schofield<sup>8</sup> comme l'ensemble des éléments qui régulent l'activité des CSH. Les évolutions technologiques et la découverte de nouveaux marqueurs des CSH ont permis de mettre en évidence que le microenvironnement médullaire était en réalité constitué d'un réseau pluricellulaire complexe fournissant des signaux moléculaires et des interactions intercellulaires essentielles à la régulation de l'auto-renouvellement, de la différenciation et de la domiciliation médullaire des CSH.

### ***1.1.3. Principaux composants cellulaires et moléculaires de la niche***

#### ***Régulation de l'hématopoïèse par les cellules non-hématopoïétiques :***

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes présentes dans la quasi-totalité des tissus. Leur existence a été suspectée dès le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle lorsqu'un pathologiste allemand, Julius Friedriech, et un physiologiste français, Émile Goujon, ont découvert une population de cellules non hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse. Il aura fallu cependant plus de 100 ans avant d'élucider l'origine de cette fraction cellulaire<sup>9</sup>. À partir de 1968, Alexander Friedenstein apporte la preuve d'un progéniteur commun aux ostéoblastes et à des cellules de type fibroblastique présents dans la moelle osseuse qu'il appelle alors « cellule souche ostéogénique ». Ces cellules sont caractérisées par leurs capacités à adhérer au plastique des boîtes de culture et à générer, après une à deux semaines, de petites colonies de cellules d'allure fibroblastique qui seront nommées *colony forming unit fibroblast*

(CFU-F). Leur origine clonale a pu être démontrée par la relation linéaire entre le nombre de cellules ensemencées et le nombre de colonies formées ainsi que par la détection d'anomalies chromosomiques identiques<sup>10,11</sup>. Par la suite, il a été établi que ces précurseurs pouvaient se différencier *in vivo* afin de favoriser l'émergence du tissu hématopoïétique : une greffe de CFU-F sous la capsule rénale de rongeurs conduisait à la production de tissus osseux, adipeux et réticulaire pouvant héberger les cellules hématopoïétiques du receveur<sup>12,13</sup>. Ces résultats ont ainsi montré que ces précurseurs mésenchymateux avaient la capacité de reconstruire un tissu médullaire actif qui permettait d'héberger et de soutenir l'hématopoïèse et pouvaient se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes et en adipocytes.

Différentes appellations ont été utilisées pour décrire ces cellules et l'*International society for cell therapy* (ISCT) a décidé de clarifier la nomenclature en proposant le terme de « cellule stromale mésenchymateuse » pour les cellules remplissant les critères minimaux suivants :

- d'adhérence au plastique,
- d'expression des marqueurs CD105, CD73 et CD90 associés à l'absence d'expression du CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 et HLA-DR,
- de potentiel de différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes *in vitro*.

Le terme de « cellule souche mésenchymateuse » reste quant à lui réservé aux cellules qui remplissent les caractéristiques spécifiques des cellules souches<sup>14</sup>.

Il existe diverses sous-populations de CSM qui peuvent posséder des rôles spécifiques et qui contrôlent le devenir des CSH mais le contact étroit entre CSM et CSH est essentiel dans la conservation du caractère souche des cellules hématopoïétiques.

Les ostéoblastes sont issus de la différenciation des CSM. Ces cellules ostéoformatrices sont à l'interface entre l'os cortical et la moelle osseuse et elles constituent, avec les ostéoclastes, l'endoste. Elles ont été identifiées très précocement comme éléments indispensables de la niche hématopoïétique et leur déplétion dans des modèles murins entraîne une altération de l'hématopoïèse avec une diminution du nombre de progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes<sup>15,16</sup>.

Le rôle des adipocytes dans la régulation de l'hématopoïèse a été mis en évidence dans un modèle murin de lipotrophie, caractérisé par une absence totale d'adipocytes, dans lequel la reconstitution hématopoïétique était accélérée par rapport aux souris témoins. De manière intéressante au cours du vieillissement chez l'humain, le tissu hématopoïétique actif, appelé

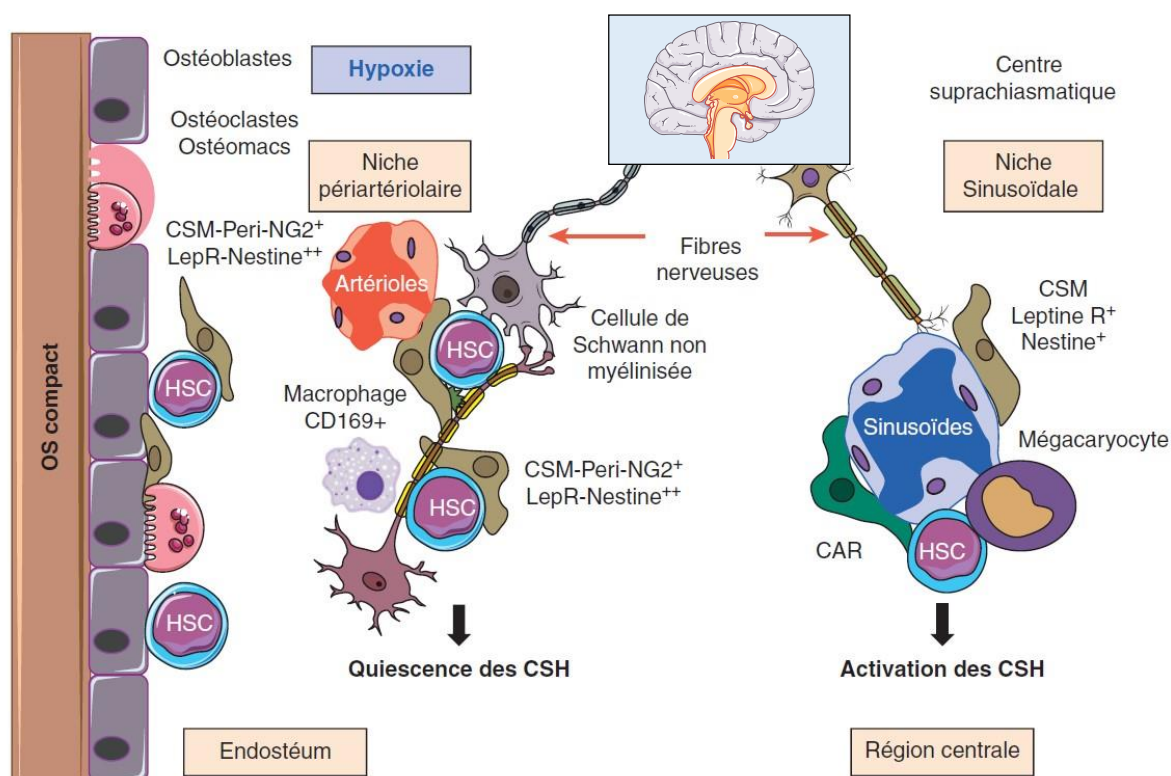
« moelle rouge », est progressivement remplacé par un tissu adipeux dit « moelle jaune » essentiellement constitué d'adipocytes. Ces résultats suggèrent ainsi que les adipocytes pourraient être des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse et corroborent le lien entre les altérations hématopoïétiques rencontrées chez les sujets âgés ou obèses et la présence d'un nombre élevé d'adipocytes<sup>17</sup>.

La moelle osseuse est un tissu richement vascularisé permettant aux différentes cellules, y compris les CSH, de gagner ou de quitter le flux sanguin. Les cellules endothéliales médullaires produisent de nombreux facteurs impliqués dans la régulation de l'activité des CSH et sont aussi impliquées dans la diversité de l'organisation de la vascularisation médullaire. Ainsi, les cellules endothéliales constituant la vascularisation de la cavité centrale médullaire expriment faiblement les protéines de jonction et s'organisent en capillaires sinusoïdaux, très perméables, permettant les échanges de CSH et de progéniteurs vers et à partir de la moelle osseuse. En revanche, les cellules endothéliales des artérioles sont beaucoup moins perméables et les forces de cisaillement plus élevées, ce qui suggère que les forces mécaniques s'exerçant dans les artérioles pourraient être impliquées dans la régulation des CSH<sup>18</sup>.

À l'instar des autres tissus, l'innervation de la moelle osseuse joue un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse, essentiellement *via* la branche du système nerveux autonome. Ces fibres nerveuses produisent de grandes quantités de catécholamines capables de réguler à la fois l'activité des CSM mais aussi d'influencer directement le comportement des CSH<sup>3</sup>.

Dans ce contexte, plusieurs types de niches ont été décrites selon le type de CSM, de cellules endothéliales et de cellules hématopoïétiques qui les composent<sup>7</sup> (Figure 2) :

- Les niches endostéales et périartériolaires sont constituées de CSM, notamment à l'origine des ostéoblastes, en contact avec des CSH majoritairement quiescentes.
- Les niches périsinusoïdales, situées dans les régions centrales de la moelle, sont constituées de CSM exprimant fortement CXCL12 (*CXCL12-abundant reticular cell*, CAR) et sont associées à des CSH activées qui s'orientent vers la différenciation.



**Figure 2 : Organisation cellulaire de la moelle osseuse hématopoïétique (d'après<sup>3</sup>).**

Les différentes populations de CSM se répartissent pour former les niches hématopoïétiques périvasculaires, constituées de CSH activées, ou périvasculaires et endostéales, contenant une majorité des CSH quiescentes.

### **Régulation de l'hématopoïèse par les cellules hématopoïétiques**

Les cellules hématopoïétiques matures représentent plus de 99 % des cellules de la moelle rouge et jouent un rôle majeur dans la régulation des CSH mais aussi des cellules de la niche. Parmi elles, certains macrophages sont capables d'influencer la domiciliation des CSH et des progéniteurs<sup>19</sup>. De plus, les polynucléaires et leurs précurseurs sont aussi impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse et contribuent plus particulièrement au contrôle de la migration médullaire des CSH. Ils sont ainsi capables de s'activer en réponse à certaines cytokines ou chimiothérapies et de libérer différentes protéases à l'origine de la dégradation de CXCR4 qui va ainsi perdre sa fonction de rétention<sup>20</sup>. Enfin, la production de *transforming growth factor-β* (TGF-β) par les mégacaryocytes entraîne une inhibition de la prolifération des CSH et participe au maintien de leur quiescence<sup>21</sup>.



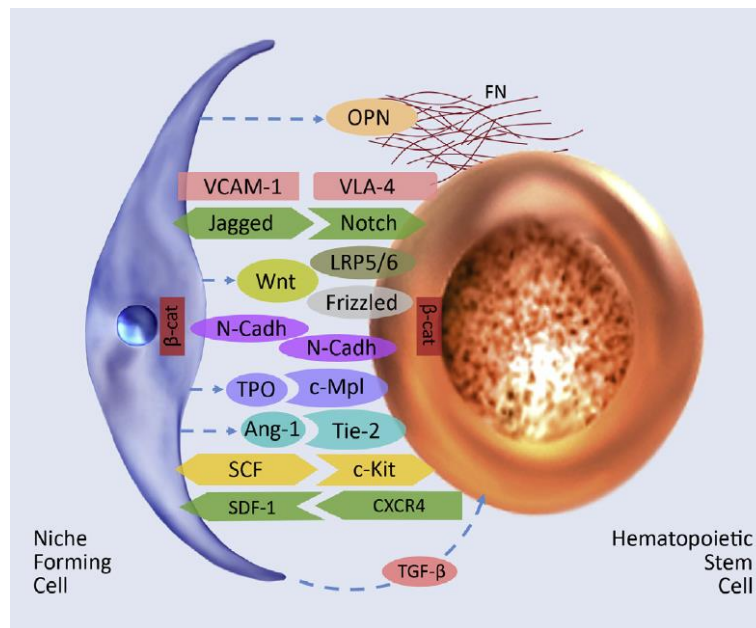
## ***Mécanismes moléculaires de régulation de l'hématopoïèse***

Les cellules du microenvironnement médullaire produisent de nombreuses protéines formant la matrice extracellulaire qui structure l'environnement médullaire et permet l'ancrage des CSH. Elle se compose de nombreuses protéines d'adhérence ubiquitaires (collagène, fibronectine...) qui interagissent avec les progéniteurs et les CSH au travers de divers récepteurs de type intégrines. La N-cadhérine et l'ostéopontine, protéines plus spécifiques de l'environnement médullaire et exprimées par les ostéoblastes, sont des acteurs majeurs de l'ancrage des CSH et des progéniteurs au niveau médullaire<sup>22</sup>.

La matrice extracellulaire contient aussi des chimioquinas impliquées dans la domiciliation et la quiescence des CSH. C'est le cas de CXCL12 (aussi appelée SDF-1), produite par les cellules du microenvironnement médullaire, qui possède une activité chimioattractante *via* son récepteur CXCR4 à l'origine d'une activation des intégrines nécessaire à la domiciliation et à la rétention médullaire des CSH et des progéniteurs<sup>3</sup>.

Les facteurs de croissance sont aussi des acteurs moléculaires majeurs de la régulation de la niche. La cytokine *stem cell factor* (SCF) sous forme membranaire se lie au récepteur c-kit (CD117) fortement exprimé sur les CSH et les progéniteurs et joue un rôle majeur dans la domiciliation et le maintien des CSH au niveau médullaire. La forme sécrétée soluble de SCF semble quant à elle jouer un rôle sur la régulation de la survie, de la prolifération et de la différenciation des cellules hématopoïétiques en potentialisant l'action d'autres cytokines telles que le Flt3-ligand, la thrombopoïétine (Tpo) et différentes interleukines<sup>23</sup>. D'autres facteurs de croissance tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), la Tpo ou l'angiopoïétine-1 (ANG-1) régulent l'hématopoïèse en modulant la capacité d'autorenouvellement des CSH<sup>3</sup>.

Enfin, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse, notamment la voie du TGF- $\beta$  qui induit l'expression d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, CKI), régulateurs négatifs du cycle cellulaire à l'origine du maintien des propriétés de quiescence des CSH. Les cellules stromales ont aussi la capacité d'activer d'autres voies de signalisation de manière paracrine telles que la signalisation Notch, dont les ligands Delta et Jagged induisent l'expansion des CSH et des progéniteurs *in vitro*, ou la signalisation Wnt qui permet l'amplification des CSH humaines et murines<sup>3,9</sup> (Figure 3).



**Figure 3 :** Représentation schématique des facteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la niche hématopoïétique<sup>9</sup>.

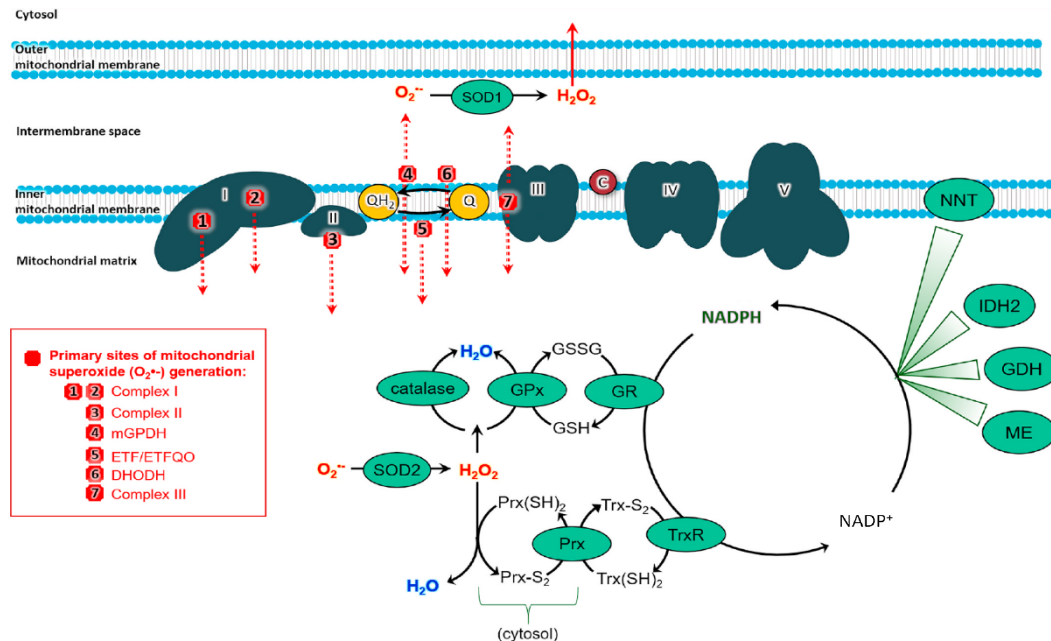
## 1.2. Espèces réactives de l'oxygène, hypoxie et niches hématopoïétiques

Bien que richement vascularisée, la pression partielle en dioxygène dans la moelle osseuse est relativement faible par rapport aux autres tissus<sup>24</sup>.

Les facteurs de transcription *hypoxia inducible factor-1α* (HIF) et HIF-2α sont les principaux régulateurs de la réponse à l'hypoxie, ils sont stabilisés en absence de dioxygène et sont exprimés à la fois dans les CSH et dans les CSM. Au sein des CSH, ils contrôlent l'expression des gènes codant les CKI, principaux inhibiteurs du cycle cellulaire, dont l'expression est augmentée en réponse à l'hypoxie. Ils sont aussi impliqués dans la migration et la domiciliation des CSH au sein des niches hématopoïétiques en régulant positivement le récepteur CXCR4, responsable de la rétention médullaire des CSH. L'hypoxie joue aussi un rôle au sein du microenvironnement et la stabilisation de HIF dans les CSM entraîne la répression de facteurs impliqués dans l'ostéogenèse. Ainsi, l'hypoxie au sein de la moelle osseuse joue un rôle majeur dans la régulation de la migration, le maintien de la quiescence des CSH et le maintien des fonctionnalités des CSM<sup>3</sup>.

La faible teneur en oxygène moléculaire au sein de la moelle osseuse pourrait aussi participer à la réduction de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et ainsi limiter le stress oxydant au sein des niches hématopoïétiques. En effet, de faibles concentrations de ROS sont nécessaires à la régulation et au maintien de l'homéostasie médullaire *via* la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la mobilisation des cellules, l'inflammation, ... Cependant, un déséquilibre entre la production de ROS et l'activité des systèmes anti-oxydants a été montré dans diverses pathologies telles que les cancers<sup>25</sup> et notamment les SMD<sup>26</sup>.

La majorité des ROS sont générés au cours de la respiration mitochondriale (Figure 4). En effet, une grande partie du dioxygène cellulaire est dédiée à la production d'énergie sous forme d'ATP *via* une série de réactions de transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire. Celle-ci, localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale, est composée d'un ensemble de couples redox constituant la chaîne de transport d'électrons et de l'ATP synthase responsable de la phosphorylation de l'ADP. Le transfert d'électrons permet le passage d'ions  $H^+$  de la matrice vers l'espace intermembranaire grâce aux complexes I, III et IV qui sont à l'origine d'un gradient de protons permettant de faire fonctionner l'ATP synthase. L'accepteur final des électrons transporté est l'oxygène qui est alors réduit pour former de l' $H_2O$ . Une des conséquences de ces réactions de transfert d'électrons est la génération de ROS. Cette production est liée à la fuite prématurée d'électrons des complexes I, II et III qui entraîne la réduction du dioxygène en anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) qui est ensuite dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) grâce aux systèmes anti-oxydants présents dans la matrice mitochondriale<sup>27</sup>. Ces systèmes anti-oxydants permettent de prendre en charge et de détoxifier les ROS, il a d'ailleurs été établi que certains d'entre eux étaient impliqués dans l'acquisition d'un phénotype malin (notamment la diminution de la SOD2)<sup>25</sup>.



**Figure 4 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et principaux systèmes anti-oxydants (d'après<sup>27</sup>).**

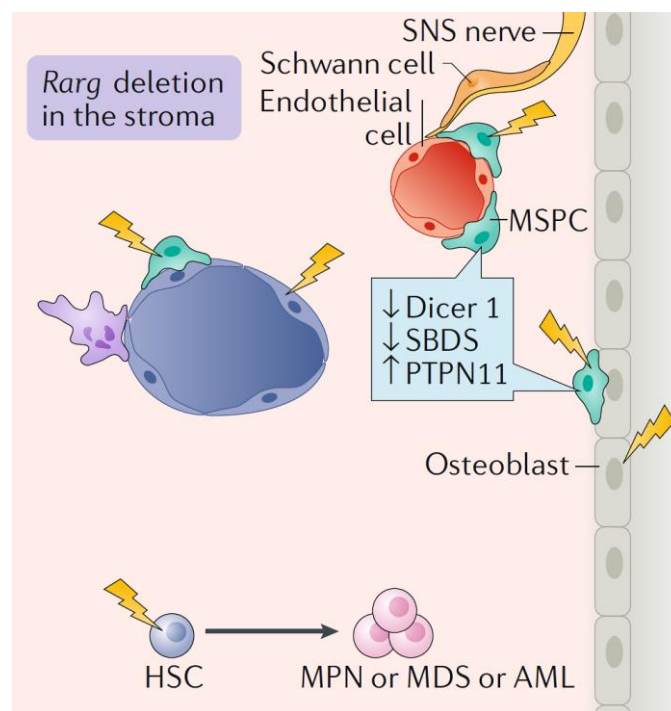
L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est la première espèce réactive de l'oxygène générée. Il est dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la *superoxide dismutase* (SOD) dont le cofacteur est le manganèse dans la matrice mitochondriale et le couple Cu/Zn dans l'espace intermembranaire. Les systèmes antioxydants glutathion peroxydase/glutathion réductase (GPx/GR) et peroxyrédoxine/thiorédoxine (Prx/TrxR) transforment le peroxyde d'hydrogène en  $H_2O$ . Le potentiel réducteur du couple NADPH/NADP<sup>+</sup> permet de régénérer ces systèmes antioxydants. Les enzymes de la matrice (*malic enzyme* [ME], glutamate déshydrogénase [GDH] et l'isocitrate déshydrogénase [IDH]) et membranaires (nicotinamide nucléotide transhydrogénase [NNT]) permettent de maintenir le pool de NADPH sous forme réduite.

### 1.3. Altération des CSM dans les LAM et les SMD

L'auto-renouvellement et la différenciation des CSH sont finement régulés par les nombreux constituants cellulaires et moléculaires du microenvironnement médullaire. Dans ce contexte, de nombreuses études ont non seulement établi que la niche hématopoïétique était remodelée par les cellules malignes mais qu'elle pourrait aussi contribuer au développement des hémopathies malignes<sup>7</sup>.

Dans le cas des hémopathies myéloïdes, une altération des CSM a été retrouvée dans plusieurs études. Ainsi, dans les SMD et les LAM, une diminution de la prolifération des CSM a été observée de façon concomitante à l'altération de l'hématopoïèse. De plus, les CSM issues de patients atteints de LAM présentaient une diminution de leur capacité de différenciation ostéogénique ainsi qu'un profil aberrant de méthylation de l'ADN<sup>28-30</sup>.

L'une des premières preuves de l'implication des CSM dans la genèse des hémopathies malignes a été rapportée par Walkley *et al.* qui a établi qu'une perte d'expression du récepteur  $\gamma$  à l'acide rétinoïque (RAR $\gamma$ ) dans des CSM murines pouvait entraîner un phénotype de syndrome myéloprolifératif<sup>31</sup>, y compris lors d'une greffe de CSH normales dans des souris délétées pour *Rarg*. Les cellules dérivées de CSM telles que les ostéoblastes pourraient aussi être impliquées dans la promotion d'un phénotype malin. La délétion du gène codant une enzyme de traitement de l'ARN, *Dicer-1*, dans la lignée ostéoblastique a provoqué l'apparition de SMD dans un modèle murin<sup>32</sup>. Cette délétion de *Dicer-1* a aussi entraîné une diminution de l'expression de *Sbds*, gène retrouvé muté dans le syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond, caractérisé par une neutropénie chronique et un risque d'aplasie médullaire ou de transformation leucémique<sup>33</sup>. De plus, l'expression conditionnelle de la protéine *tyrosine phosphatase non-receptor type 11* (*PTPN11*), un régulateur positif de la voie RAS, dans les CSM et les progéniteurs ostéoblastique murins a été identifié comme un facteur favorisant le développement et la progression d'un syndrome myéloprolifératif (Figure 5)<sup>34</sup>.



**Figure 5 : Modifications de la niche hématopoïétique et hémopathies malignes (d'après<sup>7</sup>).**

Des altérations de la niche peuvent mener à la diminution des signaux inhibiteurs qui contrôlent la croissance de populations clonales et finalement favoriser le développement d'hémopathies malignes.

## 2. Effets des pesticides sur la santé humaine

---

### 2.1. Pesticides : utilisation et surveillance

---

#### 2.1.1. Définition et classifications des pesticides

Le terme générique « pesticide » dérive des termes latins « *pestis* » (fléau) et « *caedere* » (tuer) et désigne des substances, naturelles ou synthétiques, ayant comme caractéristique principale de lutter contre des organismes jugés nuisibles. Il regroupe des produits qui dépendent de la législation :

- Sur les produits phytopharmaceutiques au sens du règlement européen (CE) n° 1107/2009.
- Sur les produits biocides au sens du règlement (CE) n° 528/2012.

Ces substances sont très largement utilisées, principalement dans l'agriculture, afin d'améliorer les rendements ainsi que la qualité et l'aspect des produits. Les définitions et les classifications des pesticides varient et dépendent du contexte d'utilisation et des réglementations. Ils peuvent ainsi être regroupés selon :

- leur cible principale : herbicides, fongicides, insecticides, rodenticides, molluscicides, ...
- leur usage : cultures végétales, voirie, traitement du bois, usage domestique (jardinage), ...
- leur structure chimique : organophosphorés, pyréthrinoïdes, carbamates, dithiocarbamates, pyridines-bipyridiliums, ...

Il est à noter qu'une même famille chimique peut avoir des usages et des mécanismes d'action différents (Tableau 1). Les produits commerciaux peuvent prendre différentes formes et sont la combinaison d'une substance active (pesticide) additionnée d'adjuvants (solvants, tensioactifs, conservateurs, ...) pouvant posséder une action toxique propre ou interférer avec la substance active. Le profil toxicologique d'une substance active n'est alors pas systématiquement superposable à celui du produit commercialisé.

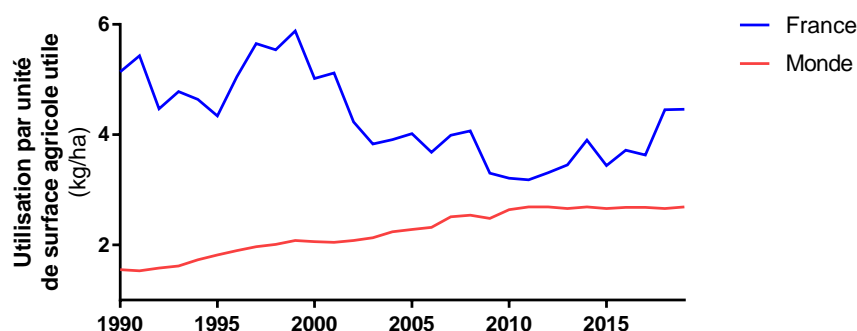
**Tableau 1 : Exemple de familles chimiques de pesticides et de leur cible principale.**

Familles chimiques	Exemple de substances actives	Classement selon cible
Organophosphorés	Chlorpyrifos, Diazinon, Malathion	Insecticides
Pyréthroïdes	Deltaméthrine, Permethrine	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbofuran, Méthomyl	Insecticides
	Asulame, Diallate, Terbutcarbe	Herbicides
Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Thiram	Fongicides
Phtalimides	Captafol, Captane, Folpel	Fongicides
Aminophosphonates glycine	Glyphosate	Herbicides

Le devenir des substances actives et de leur métabolite est également à prendre en compte car leur rémanence dans l'environnement varie fortement selon la molécule : de l'ordre de quelques heures à plusieurs années. Cette rémanence dépend des conditions environnementales, climatiques et des propriétés physicochimiques des pesticides. Ainsi, les insecticides organochlorés tels que la chlordécone, largement utilisée dans les Antilles françaises jusqu'au début des années 90, sont des polluants organiques persistants et, malgré le retrait du marché de la plupart d'entre eux, ils sont encore retrouvés dans l'environnement plusieurs décennies après leur interdiction.

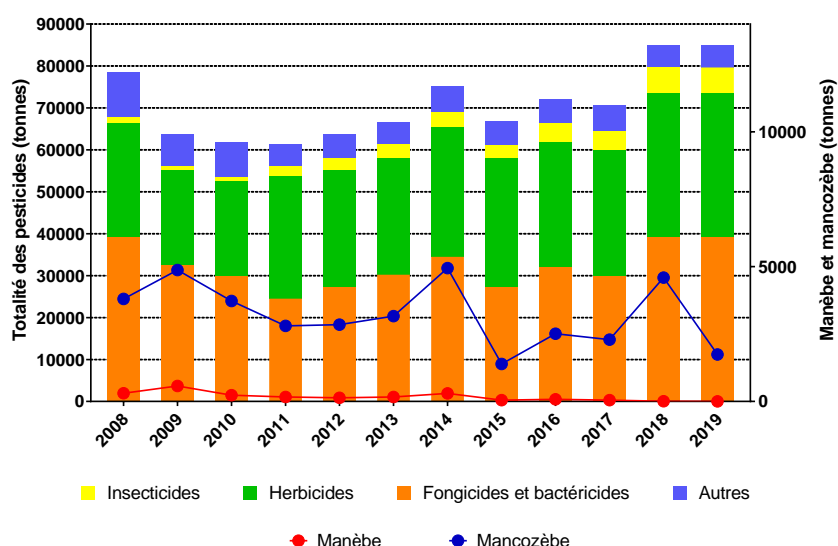
### *2.1.2. Utilisation des pesticides au niveau européen et français*

L'utilisation mondiale des pesticides n'a cessé d'augmenter depuis le début des années 1990, elle est passée de 1,5 kg/ha en 1990 à 2,7 kg/ha en 2019. Malgré plusieurs plans de réduction de la consommation de produits phytopharmaceutiques (plans Écophyto), la France est l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides avec une utilisation comprise entre 3,2 et 5,9 kg/ha depuis une trentaine d'années (Figure 6)<sup>35</sup>.



**Figure 6 :** Évolution de la quantité de pesticides utilisée en France et dans le monde entre 1990 et 2019 (d'après<sup>35</sup>).

Au sein de l'Union européenne, la France est le premier pays agricole aussi bien en termes de surface agricole utile (27,6 millions d'hectares en 2016) qu'en termes de chiffre d'affaires de production agricole (69 milliards d'euros en 2011)<sup>36</sup>. Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, les rendements agricoles ont augmenté de façon spectaculaire. Cette évolution est due à la culture de variétés végétales plus productives, mais également à l'intensification de l'agriculture française : mécanisation des exploitations, engrais, généralisation des traitements par pesticides. Ainsi, la France est à l'heure actuelle l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides, avec des ventes comprises entre 60 000 et 100 000 tonnes par an depuis une trentaine d'années même si différents plans de réduction des produits phytopharmaceutiques ont permis de diminuer cette consommation. Les fongicides représentent environ la moitié des tonnages vendus, notamment *via* l'usage important des fongicides inorganiques (soufre, cuivre et dérivés) dans les cultures viticoles (Figure 7).



**Figure 7 : Évolution des ventes de pesticides par catégories en France (d'après<sup>35</sup>).**

La grande majorité des pesticides utilisés en France le sont dans le milieu agricole et représentent plus de 1500 substances si l'on considère les utilisations passées et actuelles. À l'heure actuelle, 507 substances sont approuvées par l'Union européenne dont 349 sont effectivement autorisées en France<sup>37</sup>.



### ***2.1.3. Surveillance par les agences intergouvernementales***

L'exposition aux pesticides et leurs impacts sur la santé humaine sont actuellement des problématiques majeures sur le plan de la santé publique mais aussi sur les plans socio-économique et politique. Ainsi, de nombreuses institutions publiques se sont saisies de cet enjeu et participent au contrôle de ces produits.

L'Union européenne dispose d'un cadre législatif qui limite notamment les quantités de résidus de pesticides autorisés dans l'alimentation. Ainsi, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (*European food safety authority*, EFSA) publie un rapport annuel contenant les résultats des dosages effectués sur des échantillons issus de divers produits alimentaires. Dans le dernier rapport publié (données 2019), l'EFSA recense 43,4 % d'échantillons qui contiennent des résidus quantifiables, dont 3,9 % dépassent les limites autorisées. 27 % des échantillons sont quant à eux contaminés par de multiples résidus de pesticides<sup>38</sup>. Les données issues de ce rapport ne tiennent cependant pas compte des résidus présents dans l'eau de boisson, des manipulations directes à domicile, ni des probables effets additifs de ces composés. Il faut donc considérer que la population est quotidiennement exposée à de multiples résidus de pesticides, à des doses réelles cumulées plus importantes et ce tout au long de la vie. Au niveau français, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) supervise l'Observatoire des résidus de pesticides qui a pour mission de rassembler, d'analyser et de valoriser les informations sur la présence de pesticides dans différents milieux. Il contribue ainsi à fournir les données nationales à l'EFSA et est à l'origine des plans de réduction de l'usage des produits phytopharmaceutiques en France (plans Écophyto)<sup>39</sup>.

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), une agence de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), est aussi impliqué dans l'évaluation des risques présentés par les substances chimiques, dont les pesticides. Il publie régulièrement des monographies qui identifient les facteurs environnementaux présentant un risque cancérigène pour l'Homme. Depuis 1971, plus de 1000 agents ont été évalués mais seulement 71 pesticides ou familles de pesticides sont inclus dans les monographies (Tableau 2 et Annexe 1).

**Tableau 2 : Classification du CIRC selon le risque de cancérogénicité pour l'Homme.**

Groupe	Risque cancérogène pour l'Homme	Nombre d'agents évalués	Nombre de pesticides évalués
1	L'agent est cancérogène	121 agents	4
2A	L'agent est probablement cancérogène	89 agents	9
2B	L'agent est peut-être cancérogène	319 agents	19
3	L'agent est inclassable quant à sa cancérogénicité	500 agents	39

## **2.2. Pesticides et cancers**

### ***2.2.1. Sources et voies d'exposition aux pesticides***

L'exposition humaine aux pesticides peut se produire par contact direct, au cours de leur fabrication ou de leur utilisation, mais aussi indirectement par l'absorption de résidus de pesticides présents dans les denrées alimentaires, l'eau de boisson ou l'air. Selon les circonstances, ce sont soit des populations professionnelles exposées à de fortes doses, soit la population générale qui sera préférentiellement exposée à de faibles doses.

L'exposition professionnelle à de fortes doses de pesticides touche une population très large en France qui regroupe les agriculteurs mais aussi les personnes en charge de l'entretien des voiries, des espaces communaux, des terrains de sports, les jardiniers et les paysagistes ou les personnes intervenant dans le traitement du bois. Les agriculteurs sont particulièrement exposés aux pesticides tout au long de leur manipulation, mais les étapes de préparation, d'épandage et le nettoyage du matériel en contact avec les produits constituent les phases critiques d'exposition<sup>40</sup>.

La population générale est elle aussi exposée quotidiennement à de très faibles doses de multiples résidus de pesticides présents dans l'environnement. Les origines de cette exposition sont variées : ingestion de résidus de pesticides présents dans les aliments et les boissons, pollution environnementale (air, poussières, surfaces contaminées...) et usages domestiques (jardinage, traitement du bois, ...) <sup>40</sup>.

Quelle que soit la source de contamination, les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme selon trois voies principales : la voie cutanée, la voie digestive (ou orale) et la voie respiratoire. En milieu professionnel, la voie cutanée est considérée comme la voie majeure de pénétration des pesticides, cependant le risque est dépendant de la formulation du produit phytopharmaceutique et des caractéristiques physiologiques individuelles. Ainsi, l'exposition aux pesticides par inhalation peut se révéler majeure lors de la préparation de produits sous forme de poudres ou lors de l'épandage de formulations de type aérosols solides. En revanche, la voie orale est considérée comme la voie d'exposition la plus importante dans la population générale *via* l'ingestion d'aliments et de boissons contenant ces résidus de pesticides, voire une ingestion non alimentaire (poussières, objets contaminés) notamment chez les enfants.

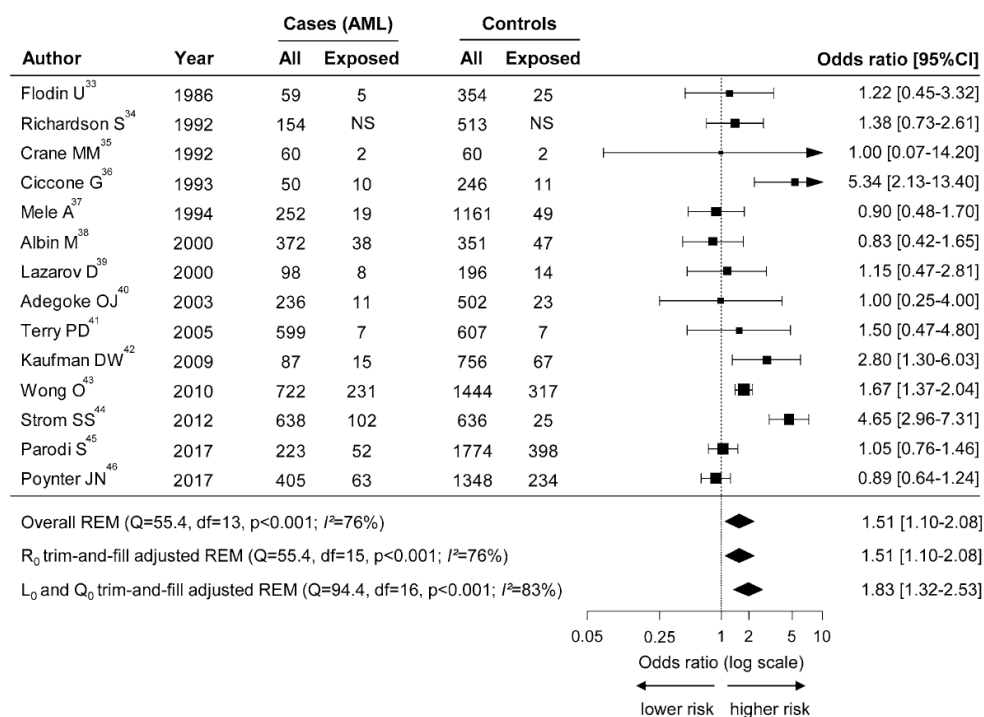
Il existe une littérature abondante concernant les liens entre exposition aux pesticides et développement de certaines pathologies, essentiellement pour les expositions professionnelles à forte dose. Cependant, les résultats apparaissent souvent contradictoires et exacerbent les conflits sociaux et politiques autour de ces produits et de leurs modalités de contrôle<sup>41</sup>. De plus, il n'existe pas de groupe dans la population humaine qui soit complètement protégé de cette exposition et l'origine multifactorielle de la plupart des pathologies rend complexe l'évaluation de l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la santé humaine<sup>42</sup>. Ainsi, plusieurs études suggèrent que les pesticides pourraient être impliqués dans le développement de nombreuses pathologies du système nerveux central (pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique mais aussi troubles neuropsychologiques), du système respiratoire (asthme), du développement (malformations congénitales) ou du métabolisme (diabète, pathologies thyroïdiennes)<sup>41</sup>. Enfin, les effets cancérogènes de certains pesticides ont été mis en évidence expérimentalement chez l'animal et des études épidémiologiques ont été menées afin de clarifier les risques d'une exposition pour les populations, essentiellement en milieu professionnel. Ainsi, la dernière expertise collective publiée par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) s'est intéressée à plusieurs cancers solides (tumeurs du système nerveux central, cancer de la prostate, cancer de la vessie et du rein, sarcome des tissus mous et des viscères) mais aussi aux hémopathies malignes (Annexe 2)<sup>40,41</sup>.

### 2.2.2. Pesticides et hémopathies malignes

Les hémopathies malignes sont caractérisées par la prolifération incontrôlée d'une population clonale de cellules hématopoïétiques, lymphoïdes ou myéloïdes. Elles sont définies par la classification OMS des hémopathies malignes dont la dernière révision publiée en 2016 les distingue selon des critères cliniques, histologiques, cytologiques, immunophénotypiques et moléculaires<sup>43,44</sup>. Au cours des dernières années, le nombre de nouveaux cas d'hémopathies malignes n'a cessé d'augmenter dans la population mondiale. Avec 45 000 nouveaux cas estimés en France en 2018, elles représentent 12 % des nouveaux cas de cancers. Le myélome multiple, le lymphome diffus à grandes cellules B, les SMD, la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et les LAM représentent à eux seuls plus de la moitié des nouveaux cas d'hémopathies<sup>45</sup>. Les étiologies de ces pathologies restent cependant mal connues et les facteurs de risques avérés (infections, déficits immunitaires, tabagisme, exposition aux radiations ionisantes, aux chimiothérapies anticancéreuses, ...) n'expliquent qu'une faible proportion des nouveaux cas. D'autres facteurs environnementaux et professionnels tels que l'exposition aux pesticides sont donc également suspectés.

L'impact des pesticides a été largement étudié dans les hémopathies lymphoïdes, qui sont plus fréquemment retrouvées dans les populations exposées aux pesticides à fortes doses<sup>46-49</sup>. Ainsi, l'Inserm considère qu'il existe une forte présomption de lien entre la survenue de lymphomes non hodgkiniens et de myélomes multiples et l'exposition aux pesticides<sup>40,41</sup>.

Les LAM sont les leucémies aiguës les plus fréquentes chez l'adulte et il n'existe à l'heure actuelle que peu de données concernant le lien entre LAM et exposition aux pesticides. Une méta-analyse publiée en 2014 a établi une relation entre le risque de développer un SMD après une exposition professionnelle aux pesticides (odds ratio [OR] = 1,95 ; intervalle de confiance à 95 % [IC95 %] : 1,23-3,09)<sup>50</sup>. Concernant les leucémies myéloïdes, une méta-analyse menée par Van Maele-Fabry *et al.* en 2007, incluant 17 cohortes et 16 études cas-témoins, s'est intéressée au LAM et aux leucémies myéloïdes chroniques. Dans le sous-groupe des LAM, une association était retrouvée avec une exposition professionnelle aux pesticides uniquement dans les études de cohortes (risque relatif [RR] : 1,55 ; IC95 % : 1,02-2,34)<sup>51</sup>. Enfin, une méta-analyse incluant 14 études cas-témoins récemment publiée par l'équipe LNOx a mis en évidence un risque de LAM augmenté chez les sujets exposés aux pesticides dans leur milieu professionnel avec un OR de 1,51 et un IC95 % compris entre 1,10 et 2,08 (Figure 8)<sup>52</sup>.

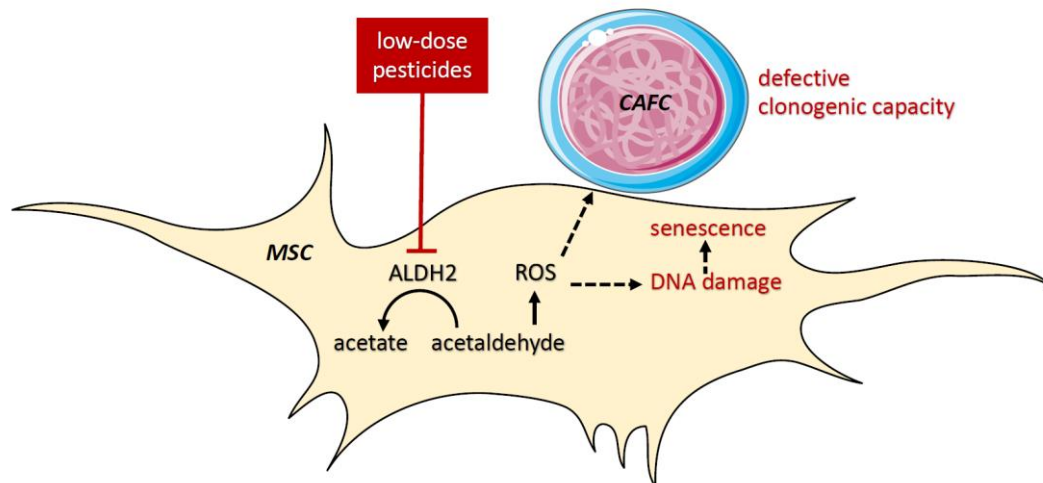


**Figure 8 : Diagramme illustrant l'augmentation du risque de LAM dans la population exposée professionnellement aux pesticides<sup>52</sup>.**

Analyse cumulative des études incluses dans la méta-analyse. L'*odds-ratio* devient statistiquement significatif après l'ajout cumulatif des patients.

Dans la population générale, le risque lié à l'exposition à de multiples résidus de pesticides à faibles doses est généralement plus complexe à établir. Il existe ainsi plusieurs études *in vitro* qui s'intéressent à l'impact des pesticides à faible doses sur l'hématopoïèse et plus particulièrement sur les CSM. L'équipe de Hochane *et al.* a établi qu'une exposition à long terme des CSM médullaire primaires à un mélange de 7 pesticides parmi les plus fréquemment rencontrés dans l'alimentation (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, chlorpyrifos éthyle, diazinon et diméthoate) pouvait induire leur sénescence en générant une augmentation des ROS<sup>53</sup>. Les auteurs ont aussi pu montrer que l'exposition à ces faibles doses du mélange de pesticides favorisait la différenciation adipocytaire des CSM qui serait indispensable à la survie et à la prolifération des blastes dans les LAM<sup>54</sup>. Cette même équipe a de plus observé des similarités entre le transcriptome de CSM exposées au cocktail de pesticides et celui de CSM issues de donneurs âgés<sup>55</sup>. Enfin, l'équipe LNOx a très récemment montré que l'exposition à de faibles doses de ce cocktail de 7 pesticides était capable d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire des cassures de l'ADN au sein de CSM médullaire primaires issues de donneurs sains. Ces CSM présentaient aussi une diminution de l'expression et de l'activité de l'aldéhyde

déshydrogénase 2 (ALDH2) ainsi qu'une augmentation du niveau d'acétaldéhyde intracellulaire. De plus, leur capacité de soutien de l'hématopoïèse était significativement altérée. De façon intéressante, ces anomalies biologiques ont aussi été retrouvées dans des CSM médullaires issues de patients atteints de SMD, suggérant que l'ALDH2 pourrait être impliquée dans la physiopathologie de ces hémopathies chez les patients âgés exposés à de multiples résidus de pesticides tout au long de leur vie<sup>56</sup> (Figure 9).



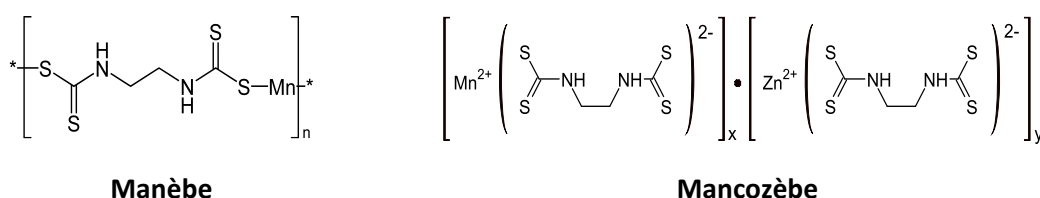
**Figure 9 :** L'exposition de CSM médullaires primaires aux faibles doses du cocktail de 7 pesticides induit une diminution de l'ALDH2<sup>56</sup>.

Cette diminution de l'ALDH2 provoque une accumulation d'acétaldéhyde intracellulaire à l'origine de lésions de l'ADN, d'une augmentation de la sénescence et d'un défaut de soutien de l'hématopoïèse.

## 2.3. Manèbe et mancozèbe : deux pesticides d'intérêt

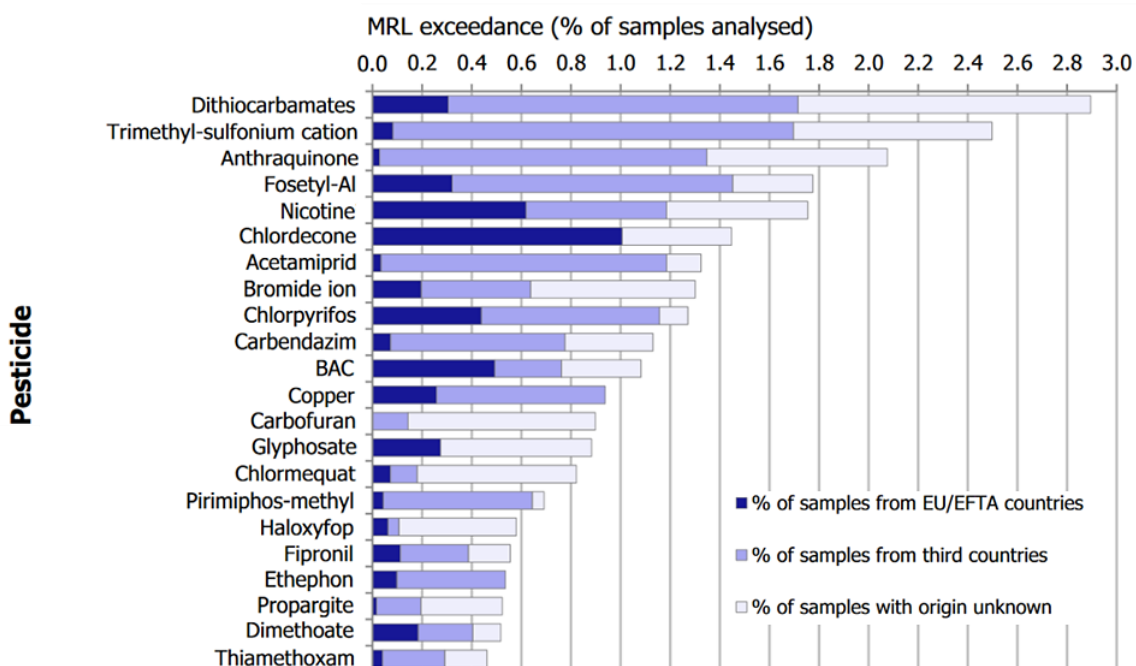
### 2.3.1. Usage et réglementation

Le manèbe et le mancozèbe appartiennent à la famille des dithiocarbamates dont l'utilisation est très répandue depuis 1940 afin de protéger les cultures contre de nombreux champignons. Quatre molécules sont actuellement référencées dans le catalogue des produits phytopharmaceutiques de l'ANSES<sup>57</sup> : le manèbe, le mancozèbe, le zinèbe et le mancopper. Elles se présentent toutes sous la forme de polymères constitués du même squelette éthylènebisdithiocarbamate et d'un atome de métal, le plus souvent du manganèse (Mn) ou du zinc (Zn) (Figure 10). Ils sont peu solubles dans l'eau et leur structure polymérique instable en solution aqueuse les rend peu persistants dans l'environnement.



**Figure 10 : Structure chimique du manèbe et du mancozèbe<sup>58</sup>.**

Les dithiocarbamates sont des fongicides de contact large spectre qui protègent les végétaux contre de nombreux champignons : mildiou, tavelure du pommier... Leur large utilisation s'explique en partie par leur faible potentiel d'induction de résistances. En effet, ils ciblent des acteurs protéiques variés et inactivent notamment des enzymes impliquées dans de nombreuses voies de biosynthèse et de transport dans le cytoplasme fongique<sup>59</sup>. Le manèbe et le mancozèbe ont été mis sur le marché en 1948 et 1961 respectivement, mais à l'heure actuelle, il n'existe plus de substances actives de la famille des dithiocarbamates autorisées par l'Union européenne pour un usage agricole : le retrait récent du mancozèbe en avril 2021 a succédé au retrait du manèbe dès 2017<sup>60</sup>. Malgré ces limitations au niveau européen, le manèbe et le mancozèbe restent autorisés au niveau national dans certains pays et sont toujours largement utilisés dans le monde. Ainsi, des résidus de manèbe et de mancozèbe sont encore retrouvés dans l'alimentation, notamment dans les produits d'importation, et les dithiocarbamates sont les substances dépassant le plus souvent la limite maximale autorisée dans les aliments selon les données publiées par l'EFSA<sup>61</sup> (Figure 11).



**Figure 11 : Principaux pesticides dont les résidus retrouvés dans l'alimentation excèdent la limite autorisée au cours de l'année 2017 (d'après<sup>61</sup>).**

### 2.3.2. Profil toxicologique du manèbe et du mancozèbe

#### **Toxicité aiguë :**

Les fongicides de la famille des dithiocarbamates ont une toxicité aiguë extrêmement faible, quelle que soit la voie d'exposition (orale, cutanée ou respiratoire)<sup>62</sup>. Chez l'Homme, l'exposition aiguë par voie cutanée en milieu professionnel est la seule rapportée dans la littérature. Elle est responsable d'irritations de la peau et des muqueuses, ainsi que de phénomènes de sensibilisation (eczéma, photosensibilisation) en cas d'expositions répétées<sup>63,64</sup>.

#### **Toxicité à long terme :**

Les dithiocarbamates partagent un profil de toxicité à long terme comparable notamment en raison de leur métabolite commun, l'éthylène thio-urée (ETU), qui peut être utilisé comme marqueur de l'exposition à cette famille de fongicides. Des études effectuées sur l'animal ont démontré les propriétés antithyroïdiennes des dithiocarbamates et de l'ETU. Chez l'Homme, des perturbations de la fonction thyroïdienne ont pu être mises en évidence avec une augmentation des taux de TSH ou la présence de nodules thyroïdiens isolés chez des ouvriers agricoles exposés aux dithiocarbamates<sup>65,66</sup>.



Plusieurs études épidémiologiques suggèrent aussi un lien entre l'exposition aux pesticides et la survenue d'une maladie de Parkinson. En 2009, l'équipe de Costello *et al.* a montré qu'une exposition conjointe au manèbe et au paraquat augmentait de 75 % le risque de développer une maladie de Parkinson<sup>67</sup>. En 2018, les données issues d'une cohorte d'agriculteurs français (cohorte AGRICAN) ont confirmé le lien entre exposition aux dithiocarbamates et développement d'une maladie de Parkinson<sup>68</sup>.

### ***Génotoxicité / cancérogénicité :***

Les critères de classification des substances cancérogènes varient selon l'autorité qui effectue cette classification. Le CIRC classe le manèbe dans le groupe 3 (« agent inclassable quant à sa cancérogénicité »)<sup>69</sup>, en revanche le manèbe et le mancozèbe sont des cancérogènes probables (groupe B2) pour l'Agence américaine de protection de l'environnement (*United States Environmental protection agency*, US EPA)<sup>70</sup>. En outre, une étude de deux ans menée sur des rats Sprague-Dawley a montré une augmentation globale des tumeurs malignes (y compris des tumeurs du tissu hématopoïétique) dans le groupe de rats dont la nourriture contenait du mancozèbe<sup>71</sup>.

Il n'existe que peu de données épidémiologiques humaines concernant spécifiquement le lien entre cancer et exposition aux dithiocarbamates. Une étude norvégienne conduite sur 236 646 agriculteurs n'a pas mis en évidence de corrélation entre exposition au mancozèbe et cancer de la thyroïde<sup>72</sup>. Cependant, un risque augmenté d'hémopathie lymphoïde a été observé dans une étude cas-témoin menée en Californie sur une cohorte de 139 000 agriculteurs exposés au manèbe ou au mancozèbe<sup>46</sup>.

### ***Effets in vitro :***

Plusieurs études ont examiné l'impact d'une exposition à de faibles doses de manèbe ou de mancozèbe sur divers types cellulaires.

Des études menées avec le mancozèbe n'ont pas montré de modification de la prolifération de cellules issues de la granulosa d'embryons de souris et d'embryons humains<sup>73</sup>, de cellules mononuclées sanguines (CMN) ou de fibroblastes murins<sup>74</sup>. Le manèbe n'impactait pas non plus la prolifération de cellules souches embryonnaires neuronales de rat. En revanche, la concentration la plus élevée (10µM) était responsable d'une mort cellulaire accrue par un phénomène d'apoptose<sup>75</sup>.

Étant donné les mécanismes d'actions variés des dithiocarbamates sur le métabolisme fongique, dont l'action au niveau de la production d'ATP et du cycle de Krebs, les auteurs se sont intéressés au niveau de ROS dans les cellules exposées à ces deux pesticides. Dans l'étude menée par Calviello *et al.*, il existait une augmentation des cassures simple brin de l'ADN aussi bien dans les fibroblastes murins que dans les CMN murines exposés au mancozèbe. Une augmentation des ROS intracellulaires ainsi qu'un taux plus élevé de désoxyguanosine hydroxylée (8-OHdG), témoin de dommages oxydatifs à l'ADN, étaient observés. Dans tous les cas, il existait une relation dose-réponse, même si elle semblait moins prononcée dans le cas des CMN<sup>74</sup>. En revanche, il n'existait pas de modification du niveau de ROS intracellulaires dans les cellules souches embryonnaires neuronales de rat exposées au manèbe<sup>75</sup>.

Il n'a pas été retrouvé de données dans la littérature sur les modifications du cycle cellulaire de cellules exposées aux dithiocarbamates. Cependant, des résultats issus des études précédentes soutiennent la présence de modifications des effecteurs protéiques impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose. Il a ainsi été observé dans les cellules de granulosa d'embryons murins et humains, après une exposition au mancozèbe, une diminution dépendante de la concentration utilisée de l'ARNm et de la protéine p53, classiquement impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire<sup>73</sup>. Cependant, il a été constaté dans une autre étude sur des cellules souches embryonnaires neuronales de rat une augmentation de l'expression des gènes codant les protéines Rb et p19 classiquement impliquées dans l'inhibition de cycle cellulaire par blocage de la phase G1<sup>75</sup>. Il faut cependant noter que la forme phosphorylée de la protéine Rb entraîne le passage des cellules en phase S, et que la phosphorylation de Rb n'a pas été étudiée.

## 2.4. Manganèse : constituant essentiel du manèbe et du mancozèbe

---

### 2.4.1. Propriétés physicochimiques du manganèse et sources d'exposition

Le Mn est un élément métallique parmi les plus abondant dans l'environnement et il représente environ 0,1 % de la croûte terrestre<sup>76</sup>. Il existe dans de nombreux états d'oxydation mais le Mn(II) et Mn(III) sont prédominants dans les systèmes biologiques<sup>77</sup>. Dans l'environnement, le Mn n'est pas naturellement présent sous forme métallique mais contenu dans des minéraux, sous forme d'oxyde, de carbonate ou de silicate. Il est ainsi retrouvé dans l'eau et dans la plupart des aliments, mais il existe aussi des sources anthropiques dont les principales sont l'industrie métallurgique et les exploitations minières. Le Mn est un métal ubiquitaire qui est retrouvé dans une grande variété de produits : engrais, cosmétiques, combustibles fossiles, piles, fongicides (manèbe et mancozèbe), additifs de l'essence, etc.<sup>76</sup>

L'ingestion d'aliments et d'eau de boisson est la principale source d'exposition au Mn dans la population générale et l'apport quotidien moyen de ce métal est estimé entre 2 et 3 mg en Europe<sup>78</sup>. Le Mn est rapidement absorbé au niveau de l'intestin grêle par un mécanisme de transport actif, impliquant notamment la protéine *divalent metal transporter 1* (DMT1), qui participe au maintien de l'homéostasie du Mn<sup>77</sup>. Sa biodisponibilité reste cependant très faible puisque seulement 5 % du Mn ingéré est absorbé. Il est ensuite stocké essentiellement dans le foie, le pancréas, le rein et possède la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique<sup>79</sup>. L'excrétion a lieu principalement par voie biliaire grâce à un transporteur actif présent au niveau de la membrane des hépatocytes et sa régulation participe elle aussi au maintien de l'homéostasie du Mn<sup>80</sup>.

Le manèbe et le mancozèbe sont des fongicides contenant du Mn. L'instabilité de leur structure polymérique en milieu aqueux les rend peu persistants dans l'environnement où ils sont rapidement hydrolysés. L'hydrolyse de ces composés est un mécanisme complexe qui implique une fragmentation de ces polymères en courtes chaînes et en ions métalliques. Les métabolites résultant de la dégradation des dithiocarbamates incluent l'éthylène bis-isothiocyanate, à l'origine du principal métabolite des dithiocarbamates, l'ETU ; qui est par la suite dégradé en éthylène urée et éthylène diamine. Tous ces métabolites sont hydrosolubles et

les données sur le devenir des dithiocarbamates dans l'environnement se limitent aux données connues sur l'ETU.

#### ***2.4.2. Profil toxicologique du manganèse***

##### ***Toxicité aiguë :***

L'inhalation de particules contenant du Mn lors d'une exposition professionnelle représente le seul cas d'intoxication aiguë. Ce risque est majeur pour la santé des mineurs, des soudeurs et des travailleurs de l'industrie métallurgique qui peuvent être exposés à des poussières d'oxyde de Mn s'ils n'utilisent pas de protections adaptées. Elle provoque une irritation intense des voies respiratoire avec une alvéolite caustique aussi appelée « fièvre des métaux »<sup>81</sup>. Il n'a pas été rapporté dans la littérature de cas d'intoxication aiguë à la suite d'une ingestion.

##### ***Toxicité à long terme :***

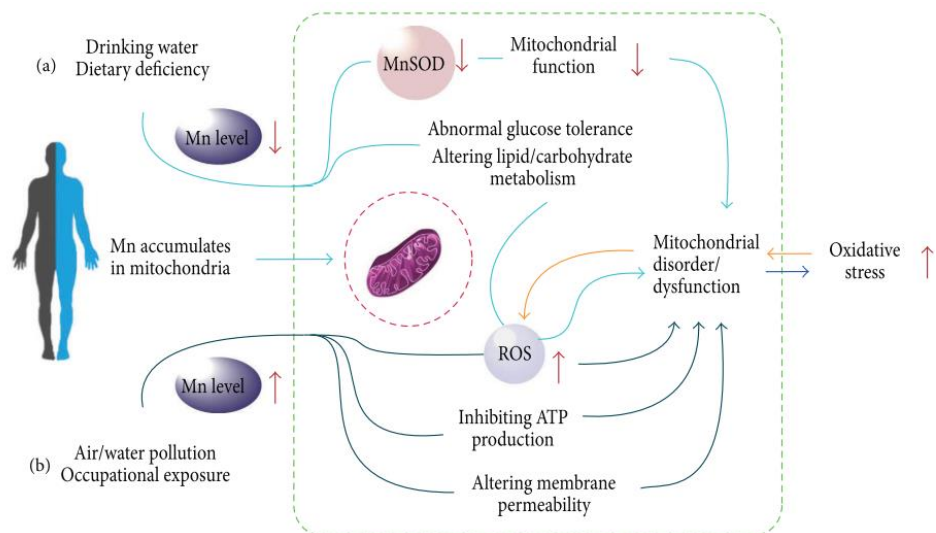
Les symptômes d'une intoxication chronique au Mn apparaissent en général après une inhalation prolongée sur plusieurs années de poussières ou de fumées contenant des oxydes de Mn. À l'inverse de la voie orale, le Mn inhalé ne subit pas l'effet de premier passage hépatique, se retrouve directement dans la circulation sanguine et peut pénétrer dans le système nerveux central en traversant la barrière hémato-encéphalique. Les principaux symptômes d'une exposition chronique sont neurologiques et respiratoires. Le tableau neurologique, appelé manganisme, présente une symptomatologie proche de celle d'un syndrome parkinsonien et, si l'exposition ne cesse pas rapidement, il peut parfois être irréversible. Sur le plan respiratoire, le tableau clinique prend la forme d'une inflammation alvéolaire avec dyspnée intense et cyanose<sup>81</sup>.

L'exposition chronique au Mn peut aussi se produire par l'ingestion d'aliments ou d'eau et, bien qu'il n'existe que peu d'études rapportant ces cas, des symptômes neurologiques d'intoxication au Mn ont déjà été décrits chez des agriculteurs exposés à des pesticides contenant du Mn tels que le manèbe<sup>82</sup>.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données sur la cancérogénicité du Mn. Ce métal n'a pas été évalué par le CIRC et il est considéré comme « non classable » par l'US EPA.

### 2.4.3. Effets cellulaires du manganèse

Le Mn est un métal essentiel étant donné son rôle dans la synthèse et l'activité de nombreuses enzymes (oxyréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases), dans le métabolisme du glucose et des lipides, dans la synthèse protéique et dans la régulation endocrine et immunitaire. De plus, de nombreuses métalloenzymes contenant du Mn, dont la Mn superoxyde dismutase (MnSOD), contribuent aux processus métaboliques listés ci-dessus et participent à la réduction du stress oxydant. En inhibant les complexes I et II de la chaîne respiratoire, un excès de Mn pourrait aussi perturber le fonctionnement mitochondrial et augmenter la production de ROS<sup>83</sup> (Figure 12).



**Figure 12 : Manganèse et stress oxydant (d'après<sup>83</sup>).**

Il n'existe que peu de données dans la littérature sur le rôle du Mn dans l'hématopoïèse. Il a été établi lors d'une étude sur des CSH murine que leur déplétion en MnSOD perturbait le métabolisme du fer et du Mn ainsi que le switch des chaînes de globine<sup>84</sup>. De plus, l'invalidation de SLC39A8, un transporteur de métal cationique hautement conservé, impacte fortement l'homéostasie du Mn et induit une anémie sévère, une dérégulation de l'hématopoïèse et une rate hypoplasique<sup>85</sup>.

Dans ce contexte, le Mn relargué lors du catabolisme du manèbe et du mancozèbe pourrait jouer un rôle dans la toxicité de ces deux pesticides. L'équipe « Signalisation TGF $\beta$ , Homéostasie du Glutathion & Thérapies Innovantes dans le Cancer » (P. Loyer, UMR 1241, Rennes) a ainsi montré dans un modèle de culture *in vitro* d'hépatocytes que :

- la toxicité du manèbe et du mancozèbe n'était pas retrouvée lorsqu'ils étaient exposés à l'ETU seul, métabolite principal des dithiocarbamates.
- le zinèbe, un dithiocarbamate contenant uniquement du zinc, n'a pas induit de cytotoxicité
- la toxicité du manèbe et du mancozèbe était inhibée par l'ajout de ZnCl<sub>2</sub> en excès dans le milieu de culture, indiquant que le flux intracellulaire Zn/Mn pourrait être impliqué dans les effets délétères de ces deux produits. (Petitjean *et al.*, article en préparation).

### 3. Objectifs du travail

---

L'exposition aux pesticides et leurs conséquences sur l'environnement et la santé humaine sont aujourd'hui une problématique majeure de santé publique. L'exposition à de fortes doses de pesticides en milieu professionnel a été largement étudiée et de nombreux effets délétères ont déjà été décrits. Cependant, la population générale est elle aussi quotidiennement exposée à de très faibles doses de multiples résidus de pesticides et il n'existe à ce jour que très peu de données sur les conséquences de cette exposition chronique.

L'étude des mécanismes conduisant au développement des hémopathies myéloïdes (LAM et SMD), dont l'incidence augmente avec l'âge, représente aujourd'hui un enjeu majeur dans ce contexte. En effet, les sujets âgés de plus de 50 ans présentent fréquemment une hématopoïèse clonale (10 à 40 % selon les études) qui est associée à un risque accru de SMD et de LAM<sup>2,86</sup>. Cependant, seuls certains patients développeront effectivement une hémopathie maligne et les facteurs favorisant cette évolution vers une de ces pathologies restent à ce jour largement méconnus. Dans ce contexte, l'imprégnation chronique du microenvironnement médullaire par de faibles doses de pesticides pourrait favoriser le développement des hémopathies malignes myéloïdes. De précédents résultats de l'équipe LNOx ont établi un lien entre le phénotype des CSM exposées à un cocktail des 7 pesticides les plus fréquemment rencontrés dans l'alimentation et celui de CSM issues de prélèvements médullaires de patients atteints de SMD *via* un mécanisme impliquant une diminution de l'ALDH2.

L'objectif de ce travail était d'une part d'identifier la participation respective aux effets biologiques observés du manèbe et du mancozèbe, deux pesticides dépassant fréquemment les limites autorisées dans l'alimentation<sup>61</sup>. Pour cela, des CSM médullaires primaires ont été exposées à de faibles doses de manèbe ou de mancozèbe seul durant 21 jours. L'analyse a porté sur (1) l'étude de la prolifération des CSM, (2) l'étude de la senescence cellulaire par méthode cytochimique et par immunofluorescence et (3) l'expression de l'ALDH2 par RT-qPCR et *western-blot*. D'autre part, la dégradation du manèbe et du mancozèbe étant à l'origine d'un relargage de Mn, les effets d'une exposition de CSM médullaires primaires à de faibles doses de ce métal ont été étudiés. L'analyse a ainsi porté sur (1) la prolifération des CSM et l'étude du cycle cellulaire, (2) la quantification par cytométrie en flux du niveau de ROS et (3) l'analyse du métabolisme énergétique par technique Seahorse.

## **PARTIE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**



## 1. Collecte des échantillons, culture cellulaire, numération et viabilité

---

Les CSM médullaires primaires ont été obtenues après mise en culture de cellules médullaires totales prélevées chez des volontaires sains dans le cadre du protocole HEALTHOX (Clinicaltrials.gov n° NCT02789839). Elles ont été cultivées en milieu  $\alpha$ -MEM (Life Technologies) supplémenté de 10 % de SVF (Hyclone), 2 mM de L-glutamine (Sigma), 100 U/mL de pénicilline (Life technologies), 0,1 mg/mL de streptomycine (Life Technologies), 0,025 mg/mL d'amphotéricine B (Bristol-Myers Squibb) et de rhFGF2 (1 ng/mL, R&D Systems) qui sera appelé « milieu CSM ». Les CSM ont été cultivées dans des flasques (Falcon™) de 75 et 150 cm<sup>2</sup>, à une densité d'ensemencement de 2000 cellules/cm<sup>2</sup> et le milieu a été renouvelé deux fois par semaine durant 2 à 4 passages. Lorsque la couche de culture a atteint 80 à 90 % de confluence, une solution de trypsine 0,25 %/EDTA 1 mM (Lonza) a été ajoutée après un rinçage par du *phosphate buffer saline* (PBS, Biosolve) afin de décoller la couche cellulaire, puis les cellules ont été réensemencées dans du milieu CSM frais<sup>87</sup>. À chaque passage, les cellules vivantes ont été dénombrées en cellule de Malassez après coloration au bleu de trypan.

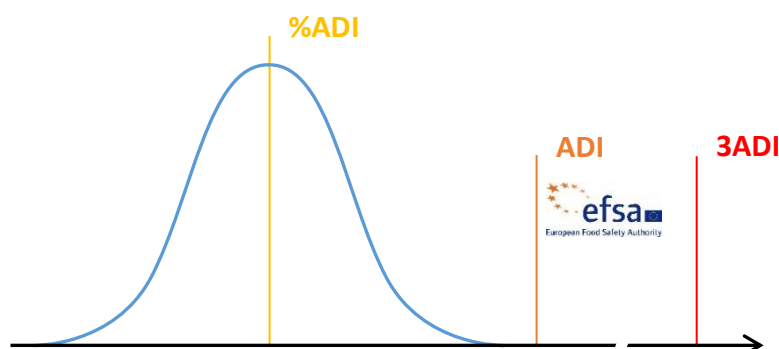
## 2. Préparation des pesticides et exposition des cellules

---

Les 7 pesticides (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, chlorpyrifos éthyle, diazinon et diméthoate) ont été fournis par Sigma-Aldrich. Les données issues du rapport annuel sur les résidus de pesticides dans l'alimentation publié par l'EFSA<sup>88</sup> ont permis de calculer 3 doses croissantes adaptées aux cultures cellulaires selon un protocole précédemment décrit<sup>53</sup> (Figure 13). Pour chaque pesticide, l'ADI (*acceptable daily intake*) est la dose définie par l'EFSA qui correspond à la quantité maximale de substance à laquelle chaque individu peut être exposé quotidiennement durant toute sa vie, sans effet significatif sur sa santé. Les 3 doses utilisées ont été :

- %ADI, reflétant l'exposition réelle de la population française à un pesticide donné
- ADI
- 3ADI, représentant 3 fois la valeur de l'ADI et utilisée comme contrôle positif.

Ces doses correspondent à des concentrations respectives en manèbe de 0,73  $\mu\text{M}$  (%ADI) ; 2,26  $\mu\text{M}$  (ADI) ; 6,78  $\mu\text{M}$  (3ADI) et en mancozèbe de 0,72  $\mu\text{M}$  (%ADI) ; 2,25  $\mu\text{M}$  (ADI) et 6,75  $\mu\text{M}$  (3ADI) dans le milieu de culture.



**Figure 13 :** Représentation schématique des doses utilisées sur une courbe modélisant l'exposition d'une population à un pesticide.

Les pesticides ont été reconstitués deux fois par semaine dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, MP Biomedicals) afin d'obtenir une concentration finale dans le milieu de culture ne dépassant pas 0,1 % de DMSO. En parallèle, une condition contrôle a été réalisée en utilisant le DMSO seul dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été exposées au cocktail des 7 pesticides, aux solutions de manèbe ou de mancozèbe seul, au mélange des 5 pesticides excluant le manèbe et le mancozèbe (chlorpyrifos-éthyle, diméthoate, diazinon, iprodione, imazalil) appelé « X5 » ou au DMSO (contrôle négatif) durant 21 j. Les pesticides et le DMSO ont été renouvelés à chaque changement de milieu (deux fois par semaine).

### 3. Préparation du manganèse et exposition des cellules

---

Le Mn a été utilisé sous forme de sel ( $\text{MnCl}_2$ ) fourni par Sigma-Aldrich et dissous dans de l'eau stérile (Eurobio). Les cellules ont été exposées à 3 concentrations (0,72  $\mu\text{M}$ , 2,25  $\mu\text{M}$ , 6,75  $\mu\text{M}$ ) correspondant aux quantités de Mn libérées par le manèbe ou le mancozèbe, en considérant que les complexes soient totalement dissociés. Une dose à 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnCl}_2$  a été utilisée comme contrôle positif. En parallèle, une condition contrôle négatif a été réalisée en utilisant de l'eau stérile seule. De la même façon que les pesticides, le Mn a été renouvelé à chaque changement de milieu (deux fois par semaine) durant les 21 j d'exposition.

## 4. Étude de la sénescence

---

### 4.1. Détection de l'activité $\beta$ -galactosidase par méthode cytochimique

---

La sénescence des cellules a été étudiée par un marquage de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase grâce à la trousse commerciale *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fabricant. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside (X-gal) qui forme un précipité bleu dans les cellules sénescents. Après 21 jours d'exposition aux pesticides,  $7.10^4$  cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits et incubées 24 h à 37 °C avec le substrat chromogène X-gal, puis le pourcentage de cellules sénescents a été numéré par observation au microscope à fond clair.

### 4.2. Détection de la $\beta$ -galactosidase par immunofluorescence

---

Après 21 j d'exposition, les CSM ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4 %, perméabilisées (PBS, Triton X-100 à 0,1 %) durant 10 min à température ambiante, puis les sites antigéniques de fixation non spécifique ont été saturés par un tampon de blocage (PBS, gélatine de poisson à 5 %, Triton X-100 à 0,1 %) durant 4 h. Les cellules fixées ont ensuite été incubées à 4 °C durant une nuit avec un anticorps de lapin anti-GLB1/ $\beta$ -galactosidase (Abcam) dilué au 1/500<sup>ème</sup>, suivi par une étape de lavages puis une incubation de 2 h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-anticorps de lapin couplé à la *fluorescein isothiocyanate* (FITC, Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/2000<sup>ème</sup>. L'ADN nucléaire a été marqué au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Invitrogen). Les images ont été acquises avec un microscope confocal couplé à une caméra haute résolution Leica TCS SP8 et analysées grâce au logiciel ImageJ.

## 5. Étude de l'expression de l'ALDH2

---

### 5.1. Extraction des ARN, reverse-transcription et PCR quantitative

---

Les ARN totaux ont été extraits grâce à la trousse commerciale Maxwell<sup>®</sup> RSC SimplyRNA Tissue Kit et à l'automate associé Maxwell<sup>®</sup> 16 (Promega). Un minimum de 10<sup>6</sup> cellules a été lysé par ajout de 200 µL de tampon de lyse (solution d'homogénéisation commerciale, thioglycérol 20 µL/mL) au culot cellulaire sec, puis les extraits ont été incubés avec de la DNase I et les ARN séparés par sélection magnétique sur colonne. Après extraction, les ARN ont été dosés par spectrophotométrie sur Nanodrop<sup>™</sup> N-1000 (Labtech) et leur intégrité a été contrôlée au bioanalyseur Agilent 2100 avec la puce Eukaryote total RNA Nano (Agilent). Le ratio des absorbances 260/280 nm était supérieur à 1,8 et l'intégrité de l'ARN conservée avec des valeurs de RIN (*RNA integrity number*) > 6,4 dans tous les cas.

La transcription inverse a été réalisée selon le protocole établi au laboratoire (SuperScript<sup>™</sup> VILO<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit, Invitrogen) dans un volume de 20 µL (10 µL d'une solution d'ARN, 4 µL de tampon 5X, 4 µL d'eau *RNase free* et 2 µL de transcriptase inverse) à partir de 500 ng d'ARN. Afin de diluer les nucléotides et les sels présents dans la solution, le volume final a été porté à 500 µL pour une concentration de 1 ng d'équivalent ARN/µL.

L'analyse par PCR quantitative a été réalisée sur thermocycleur LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche), en plaque 384 puits, grâce à la trousse commerciale LightCycler<sup>®</sup> SYBR Green I Master (Roche) selon les recommandations du fournisseur. L'expression du gène codant l'ALDH2 a été quantifiée comparativement à l'expression de gènes de référence (*ACTB* et *GAPDH*) en utilisation la méthode du cycle seuil (*cycle threshold*, Ct) et en considérant la différence des Ct ( $\Delta Ct = Ct \text{ gène étudié} - \text{moyenne géométrique Ct gènes de référence}$ ). Les différentes conditions ont été comparées en exprimant le  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*fold change*) des conditions traitées par rapport à la condition contrôle non traitée<sup>89</sup>. Les amorces utilisées ont été fournies par Roche et les séquences étaient les suivantes :

*ALDH2* : (F) cctctatgtggccaacctg, (R) ccaaattccaggcacaatgtt

*ACTB* : (F) attggcaatgagcggttc, (R) cgtggatgccacaggact

*GAPDH* : (F) agccacatcgctcagacac, (R) gcccaatacgaccaaattcc

## 5.2. Extraction des protéines et quantification par *western-blot*

---

Les CSM ont été lysées dans 100 µL de tampon de lyse cellulaire NP40 (H<sub>2</sub>O, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, glycérol 10 %, Igepal CA-630 1 %, NaN<sub>3</sub> 0,01 %) fourni par Invitrogen, contenant des inhibiteurs de protéase et de phosphatase permettant d'extraire les protéines cellulaires. Les échantillons additionnés de Laemmli ont été déposés sur un gel pré-coulé *stain free* puis les protéines ont été transférée sur une membrane (Bio-Rad Laboratories). Après saturation de la membrane (TBS, Tween 0,2 %, protéines de lait 5 % durant 1 h à température ambiante), celle-ci a été incubée durant 12 h à 4 °C dans la solution de saturation contenant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'ALDH2 humaine (Proteintech) dilués au 1/1000<sup>ème</sup>. Après une étape de lavages, la membrane a été incubée 1 h à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire de chèvre anti-anticorps de lapin couplé au fluorochrome StarBright™ Blue 700 (Bio-Rad Laboratories). Les images du gel puis de la membrane ont été acquises grâce au système d'imagerie ChemiDoc™ (Bio-Rad Laboratories) en utilisant la technologie *stain free* qui permet de normaliser la quantité de protéine d'intérêt par la quantité totale de protéine déposée sur le gel et de s'affranchir ainsi d'une protéine de ménage pour la normalisation. La quantification protéique a été réalisée avec le logiciel Image Lab™ version 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories).

## 6. Étude du cycle cellulaire des CSM

---

Le cycle cellulaire a été étudié par cytométrie en flux, sur des noyaux isolés, grâce à la trousse commerciale BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences) selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, 10<sup>6</sup> cellules ont été fixées et le contenu en ADN a été marqué grâce à de l'iodure de propidium fourni dans le kit. Les données ont été acquises sur un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences). L'exploitation des résultats a été réalisée sur le logiciel FlowJo version 10.1 (Leland Stanford Jr. University) grâce au module d'analyse du cycle cellulaire en utilisant le modèle de Watson<sup>90</sup>.

## 7. Étude de la capacité clonogénique des cellules stromales mésenchymateuses

---

La capacité clonogénique des CSM peut être établie par l'étude des CFU-F qui sont des progéniteurs adhérents des CSM. 250 cellules ont étéensemencées en flasques (Falcon™) de 25 cm<sup>2</sup> en milieu CSM. Les colonies ont été cultivées durant 10 j à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> avec un changement de milieu de culture 3 j après l'ensemencement. Au 10<sup>ème</sup> jour, les CFU-F ont été fixées avec du méthanol (Sigma-Aldrich) puis colorées au Giemsa (Sigma-Aldrich). La taille et la morphologie des colonies ont ensuite été observées grâce à un microscope à contraste de phase Leica DMI8.

## 8. Quantification du niveau d'espèces réactives de l'oxygène

---

La quantification des ROS a été réalisée par marquage des cellules avec du 5-(*and*-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Invitrogen), une sonde moléculaire permettant de détecter un large spectre de ROS intracellulaires et principalement le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les cellules (1,5.10<sup>5</sup> par condition) ont été lavées en tampon X-Vivo™ (Lonza) puis marquées par 5 µM de CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Un contrôle non marqué (DMSO) a été effectué en parallèle pour chaque condition. Après une incubation de 10 min à 37 °C, le culot a été lavé puis repris dans du PBS avant passage immédiat sur un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 Plus. La moyenne géométrique de fluorescence du CM-H<sub>2</sub>DCFDA a été mesurée et normalisée par la fluorescence de l'échantillon non marqué (DMSO) pour chaque condition. L'exploitation des résultats a été réalisée sur le logiciel FlowJo version 10.1. Des essais préalables ont permis de vérifier qu'il n'existait aucune interférence entre les pesticides aux concentrations utilisées et l'émission de fluorescence du CM-H<sub>2</sub>DCFDA.

## 9. Étude du métabolisme énergétique par technique Seahorse

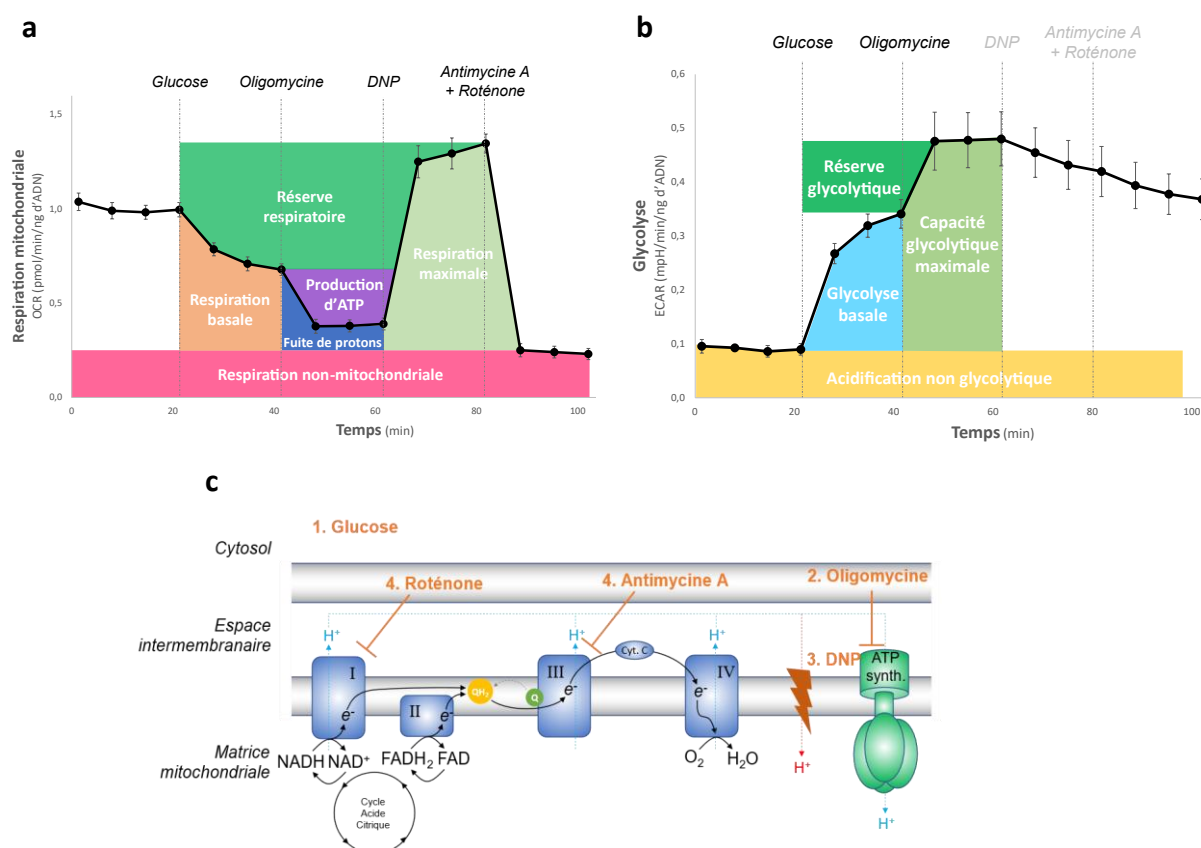
---

Après 21 j d'exposition au Mn ou aux pesticides,  $4.10^4$  CSM viables ont été déposées en triplicats dans une plaque 96 puits adaptée (Seahorse Cell Culture Plates) et incubées 12 h de façon à les laisser adhérer au fond des puits. L'étude de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse a été réalisée grâce à l'analyseur métabolique Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent) qui mesure à intervalle régulier le taux de consommation d'oxygène (*oxygen consumption rate*, OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (*extracellular acidification rate*, ECAR) dans le milieu de culture d'une monocouche de cellules vivantes<sup>91</sup>.

L'OCR, un indicateur de la respiration mitochondriale, est mesuré tout au long de l'expérimentation au cours de laquelle sont injectées de façon séquentielle dans le milieu de culture 4 drogues (fournies par Merck) permettant de déterminer parallèlement les principaux paramètres respiratoires et glycolytiques des cellules étudiées. La première injection de glucose permet de mesurer la somme de la respiration basale associée à la consommation d'oxygène indépendante de la mitochondrie. L'oligomycine, injectée par la suite, inhibe l'ATP synthase et entraîne une diminution de la consommation d'O<sub>2</sub> permettant de calculer par soustraction la part de consommation d'O<sub>2</sub> liée à la production d'ATP. Le 2,4-dinitrophénol (DNP), un agent découplant, perfore le feuillet interne de la membrane mitochondriale et entraîne une fuite massive de protons compensée par l'activation maximale de la chaîne respiratoire (complexes I à IV) permettant de déterminer la consommation d'O<sub>2</sub> maximale (respiration maximale). Enfin, la dernière injection d'antimycine A et de roténone bloque totalement la chaîne de transport d'électrons en inhibant les complexes I et II et permet de déterminer la respiration non-mitochondriale ainsi que la fuite de protons.

En parallèle, la mesure de l'ECAR permet de déterminer les paramètres glycolytiques grâce aux 4 mêmes drogues qui activent et potentialisent la glycolyse. Avant la première injection de glucose, l'ECAR est liée à l'acidification non glycolytique, soit toutes les autres réactions enzymatiques responsables d'une diminution du pH extracellulaire. L'injection en excès de glucose, substrat de la glycolyse, permet de calculer par soustraction l'acidification correspondant à la glycolyse basale. L'inhibition de l'ATP synthase par l'oligomycine lors de la deuxième injection provoque une augmentation de la glycolyse au maximum des capacités cellulaires et permet de mesurer la capacité glycolytique maximale. La réserve glycolytique

peut ensuite être déterminée par soustraction entre la capacité glycolytique maximale et la glycolyse basale (Figure 14).



**Figure 14 : Détermination des principaux paramètres respiratoires et glycolytiques grâce à l'utilisation de drogues inhibant la respiration mitochondriale (Seahorse).**

Détermination des (a) principaux paramètres de la respiration mitochondriale par la mesure de l'OCR et (b) des principaux paramètres de la glycolyse par la mesure de l'ECAR. (c) Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et des sites d'action des différentes drogues utilisées au cours de l'expérimentation.

## 10. Représentations graphiques et analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous la forme de moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Les représentations graphiques et les tests non-paramétriques de Friedman suivi de tests de comparaison multiple de Dunn, utilisés pour les analyses statistiques, ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism version 7.03 (GraphPad Software).

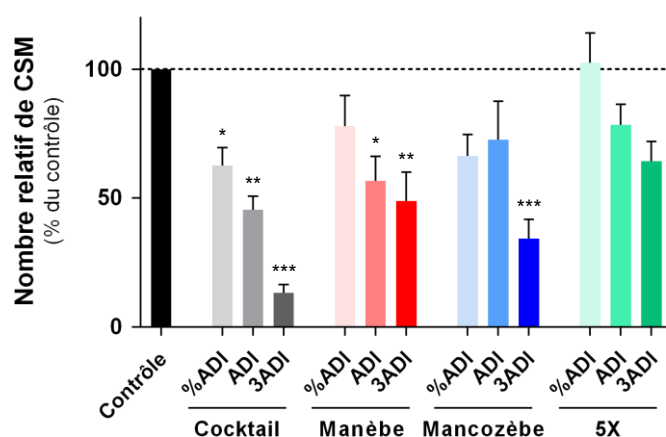


## **PARTIE 3 : RÉSULTATS**

# 1. Exposition des CSM médullaires primaires à de faibles doses de manèbe et de mancozèbe durant 21 jours

## 1.1. L'exposition au manèbe ou au mancozèbe diminue le nombre de CSM viables

Le nombre total de cellules vivantes obtenues après 21 j de traitement par le cocktail de 7 pesticides, par le manèbe seul, le mancozèbe seul ou un cocktail des 5 autres pesticides a été calculé pour chaque condition. Par comparaison à la condition contrôle (100 %), le taux d'amplification des CSM était significativement diminué après l'exposition au cocktail complet (%ADI :  $63 \% \pm 7,0 \%$ ,  $p = 0,028$  ; ADI :  $46 \% \pm 5,2 \%$ ,  $p = 0,0027$  ; 3ADI :  $13 \% \pm 3,3 \%$ ,  $p < 0,001$ ), aux concentrations ADI et 3ADI de manèbe seul (ADI :  $57 \% \pm 9,5 \%$ ,  $p = 0,015$  ; 3ADI :  $49 \% \pm 11 \%$ ,  $p = 0,0020$ ) ou à la concentration 3ADI de mancozèbe seul ( $34 \% \pm 7,5 \%$ ,  $p < 0,001$ ). L'exposition au cocktail des 5 autres pesticides semblait être responsable d'une tendance à la diminution de l'amplification des CSM en culture. La diminution de l'amplification des CSM à la dose la plus faible (%ADI) n'était significative que lorsque celles-ci étaient exposées au cocktail complet (Figure 15). Les résultats concernant le cocktail complet concordaient avec ceux précédemment publiés<sup>53,56</sup>. La viabilité cellulaire (exclusion du bleu trypan) était supérieure à 90 % dans toutes les expérimentations.

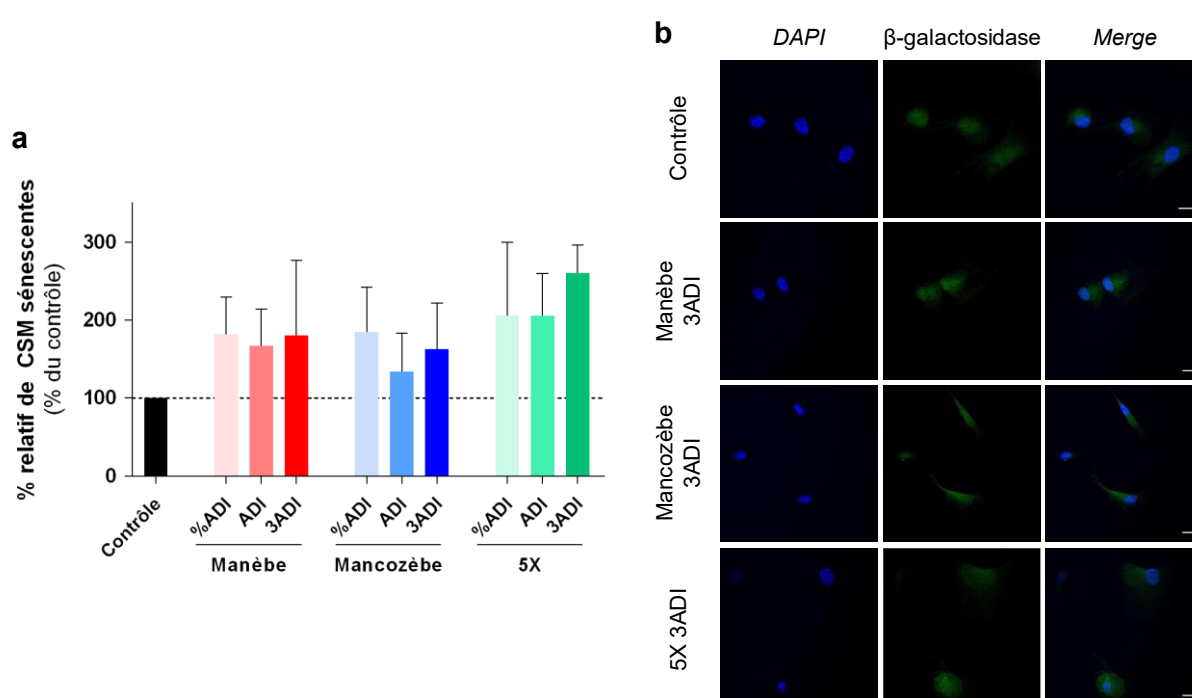


**Figure 15 :** Le nombre de CSM viables est diminué après 21 j d'exposition à de faibles doses de pesticides.

Le nombre de CSM viables a été quantifié après 21 j d'exposition. Le cocktail complet de 7 pesticides (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, chlorpyrifos éthyle, diazinon et diméthoate), le manèbe seul, le mancozèbe seul et un cocktail des 5 autres pesticides (5X : iprodione, imazalile, chlorpyrifos éthyle, diazinon et diméthoate) ont été utilisés. Le nombre de CSM viables est modérément diminué après exposition au manèbe ou au mancozèbe seul sans atteindre l'effet du cocktail complet ( $n = 5$ ). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,005$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  ; test de Friedman suivi d'un test *post-hoc* de Dunn.

## 1.2. L'exposition au manèbe ou au mancozèbe induit une augmentation de la sénescence des CSM

De précédentes études réalisées par Hochane *et al.* et par l'équipe LNOx ont révélé une augmentation de la sénescence des CSM exposées au cocktail de 7 pesticides<sup>53,56</sup>. Dans le but de clarifier l'implication des différents pesticides dans cet effet, la sénescence cellulaire a été quantifiée par la numération du nombre de cellules positives pour l'activité  $\beta$ -galactosidase en méthode cytochimique (métabolisation du substrat chromogène X-gal). Par rapport à la condition contrôle (100 %), le nombre de cellules sénescents était plus élevé quel que soit la condition d'exposition aux pesticides, avec une variabilité relativement importante entre les expérimentations (Figure 16a). Une évaluation de la sénescence, par immunofluorescence et acquisition des images par microscopie confocale, a confirmé l'augmentation de la sénescence dans les cellules exposées à la dose la plus élevée (3ADI) de manèbe seul, mancozèbe seul ou mélange des 5 autres pesticides (Figure 16b).

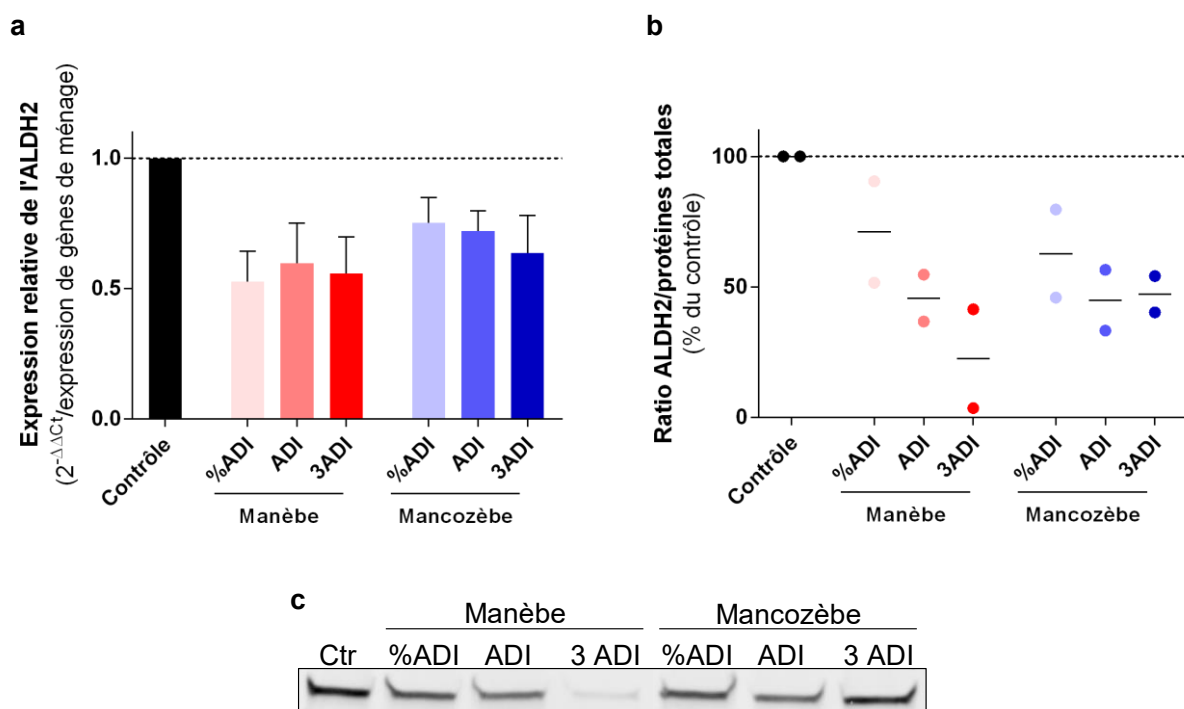


**Figure 16 :** La sénescence des CSM est augmentée après 21 j d'exposition à de faibles doses de pesticides.

Le manèbe seul, le mancozèbe seul et le cocktail des 5 autres pesticides (5X) ont été utilisés aux doses %ADI, ADI et 3ADI. (a) L'activité  $\beta$ -galactosidase dans les CSM montre un nombre plus important de cellules positives après l'exposition aux pesticides ( $n = 3$ ) et (b) l'immunofluorescence anti- $\beta$ -galactosidase confirme ces résultats (barre d'échelle : 20  $\mu$ M). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne.

### 1.3. L'exposition au manèbe ou au mancozèbe diminue l'expression de l'ALDH2 dans les CSM

De précédents travaux de l'équipe LNOx réalisés sur des CSM exposées au cocktail de 7 pesticides ont mis en évidence une diminution de l'expression de l'ALDH2, une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acétaldéhyde. L'implication du manèbe seul et du mancozèbe seul dans la modulation de l'expression de cette enzyme a été quantifiée par PCR quantitative après rétrotranscription. Par rapport à la condition contrôle (100 %), l'exposition au manèbe seul et au mancozèbe seul entraîne une diminution de l'expression du gène *ALDH2* (Figure 17a), sans qu'une relation dose-effet puisse clairement être identifiée. Cette diminution de l'ALDH2 a été confirmée au niveau protéique grâce à une quantification par *western-blot* (Figure 17b et 17c).



**Figure 17 :** L'ALDH2 est diminuée après 21 j d'exposition des CSM au manèbe ou au mancozèbe à faibles doses.

Les CSM ont été exposées durant 21 j au manèbe seul ou au mancozèbe seul. (a) L'analyse de l'expression relative de l'ALDH2 indique une diminution de l'ARNm *ADLH2* dans les CSM exposées aux dithiocarbamates (n=4). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. (b) La quantification protéique par *western-blot* révèle aussi une diminution importante de l'ALDH2 (n=2). Le trait noir horizontal représente la moyenne pour chaque condition. (c) Photographie de la membrane de *western blot*, technique *stain free* (Bio-Rad Laboratories) (Ctr : contrôle).

## **2. Exposition des CSM médullaires primaires à de faibles doses de manganèse durant 21 jours**

---

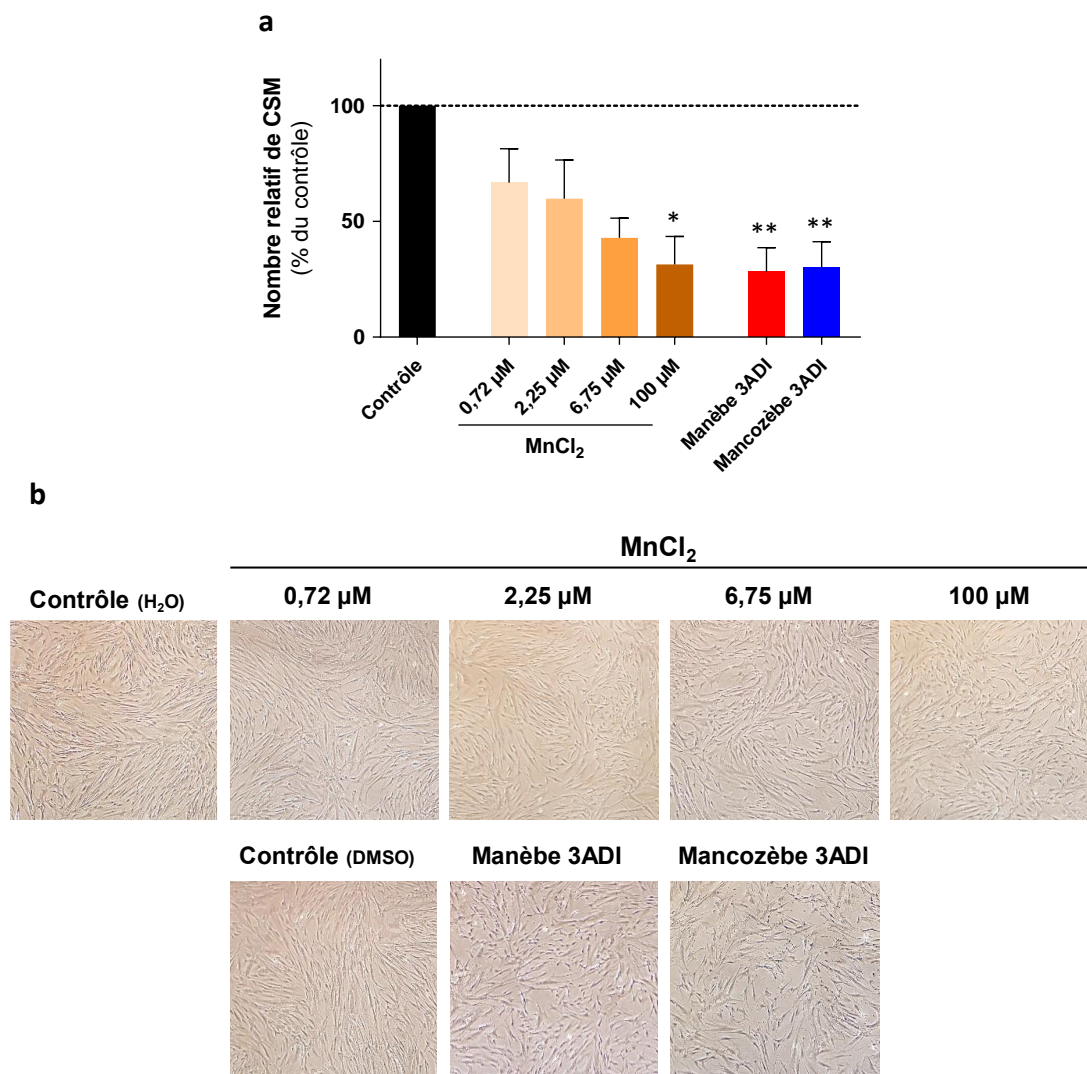
Le manèbe et le mancozèbe sont deux pesticides instables dans l'environnement et qui libèrent du Mn. L'effet de faibles concentrations de Mn a donc été étudié afin de déterminer la part de toxicité liée à ce métal.

### **2.1. L'exposition au manganèse diminue le nombre de CSM viables ainsi que leur capacité clonogénique**

---

Le nombre total de cellules vivantes obtenues après 21 j d'exposition par le Mn, le manèbe seul à la dose 3ADI ou le mancozèbe seul à la dose 3ADI a été calculé pour chaque condition et normalisé par rapport à la condition contrôle (H<sub>2</sub>O pour les conditions exposées au Mn et DMSO pour les conditions exposées au manèbe ou au mancozèbe). Par rapport à la condition contrôle (100 %), le taux d'amplification des CSM était diminué de façon dose-dépendante lors de l'exposition aux faibles concentrations de Mn (0,72 µM ; 2,25 µM ; 6,75 µM) et une diminution significative et plus importante à la concentration de 100 µM (31 % ± 12 %,  $p = 0,033$ ). La diminution du taux d'amplification lors de l'exposition au manèbe seul et au mancozèbe seul à la dose 3ADI (28 % ± 10 %,  $p = 0,0027$  ; 30 % ± 11 %,  $p = 0,0046$ ) confirmait les résultats précédemment présentés au chapitre 1.1 de ce manuscrit (Figure 18a). La viabilité cellulaire (exclusion du bleu trypan) était supérieure à 90 % dans toutes les expérimentations.

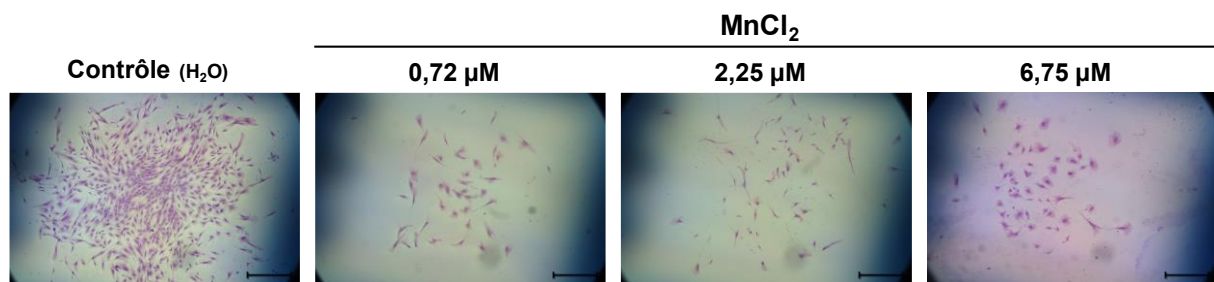
L'observation au microscope à contraste de phase des cellules adhérentes a révélé une modification de la morphologie des CSM exposées à la dose la plus élevée de Mn (100 µM), de manèbe ou de mancozèbe (3ADI) avec une augmentation de leur taille et une amplification modérée de leur cytoplasme (Figure 18b).



**Figure 18 : Le nombre de CSM viables est diminué après 21 j d'exposition à de faibles concentrations de manganèse.**

(a) La numération cellulaire (exclusion du bleu trypan) indique une diminution du nombre de CSM viables avec une relation effet-dose lors d'une exposition au manganèse (n=5). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,005$  ; test de Friedman suivi d'un test *post-hoc* de Dunn. (b) Les images des CSM adhérentes montrent une diminution de la confluence et une augmentation de leur taille après 21 j d'exposition aux doses les plus élevées de manganèse, de manèbe et de mancozèbe (microscopie à contraste de phase, x40).

La capacité clonogénique des CSM a été étudiée par culture des CFU-F. Il a ainsi été mis en évidence une diminution de leur capacité clonogénique, avec une à deux colonies observées quelque soient les conditions, de taille très réduite pour celles exposées aux faibles concentrations de Mn. De plus, les cellules constituant les colonies exposées au Mn possédaient une taille supérieure à celles de la condition contrôle, nettement visible à la concentration de 6,75  $\mu\text{M}$  (Figure 19).

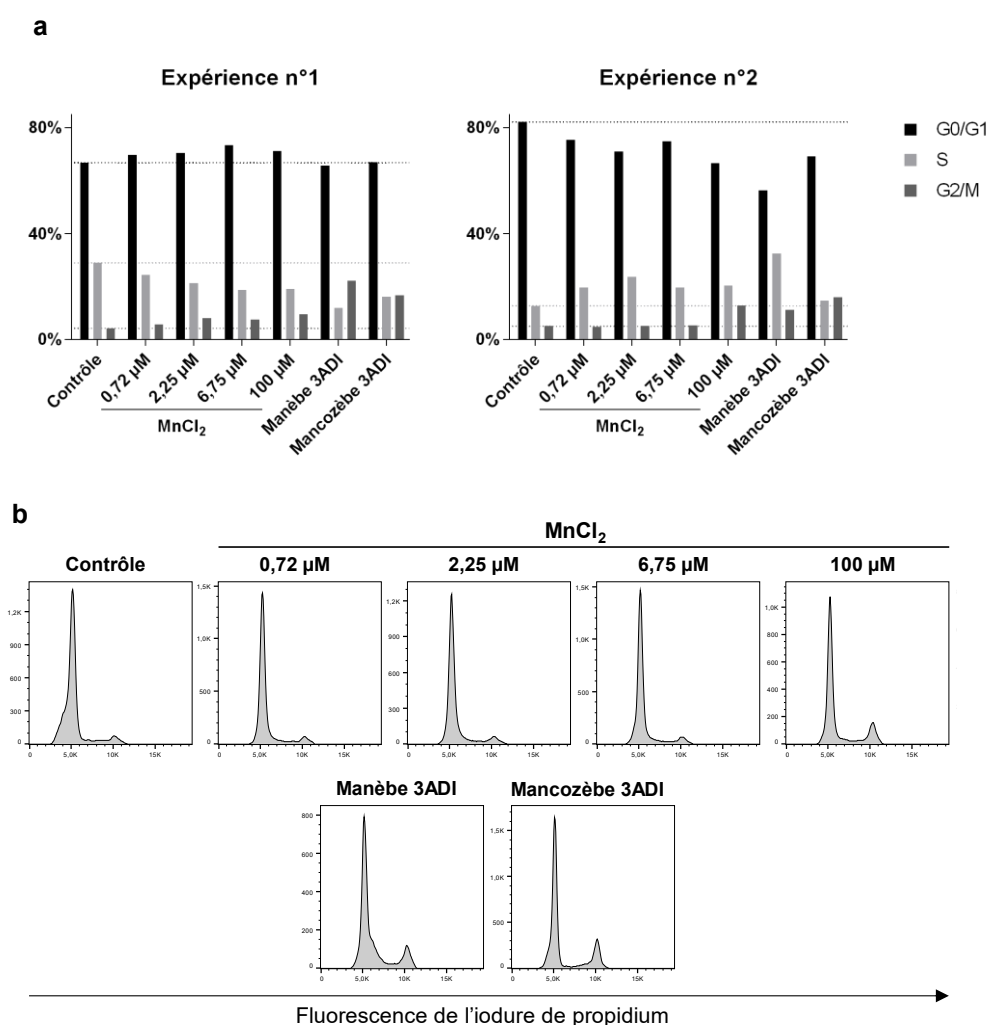


**Figure 19 : La capacité clonogénique des CSM est diminuée après 21 j d'exposition à de faibles concentrations de manganèse.**

Les faibles concentrations de manganèse entraînent une diminution de la capacité clonogénique du nombre de cellules constituant les *colony forming unit fibroblast* (CFU-F). De plus, la morphologie cellulaire (augmentation de taille) est aussi modifiée, notamment pour la concentration de 6,75  $\mu\text{M}$  (barre d'échelle : 50  $\mu\text{M}$ ).

## 2.2. L'exposition au manganèse ne semble pas modifier le cycle cellulaire des CSM

Les résultats précédents ont établi qu'une exposition à de faibles doses de Mn était responsable d'une diminution de l'amplification des CSM et d'une diminution de leur capacité clonogénique. Dans ce contexte, le cycle cellulaire a été analysé de façon monoparamétrique en quantifiant le contenu en ADN par cytométrie en flux. Il n'a pas été retrouvé de modification significative des différentes phases du cycle cellulaire sur deux expériences indépendantes (Figure 20a et 20b). Le nombre de cellules en apoptose tardive (hypoploïdie pré-G1) n'était pas modifié quelle que soit la condition d'exposition.



**Figure 20 :** Le cycle cellulaire des CSM ne semble pas modifié après 21 j d'exposition à de faibles doses de manganèse, de manèbe ou de mancozèbe.

(a) Les expériences n°1 et n°2 montrent des résultats peu différents du contrôle. (b) Les histogrammes de fluorescence de l'iodure de propidium ne sont pas modifiés par le manganèse, quelle que soit la dose, ni par les pesticides à la dose 3ADI.

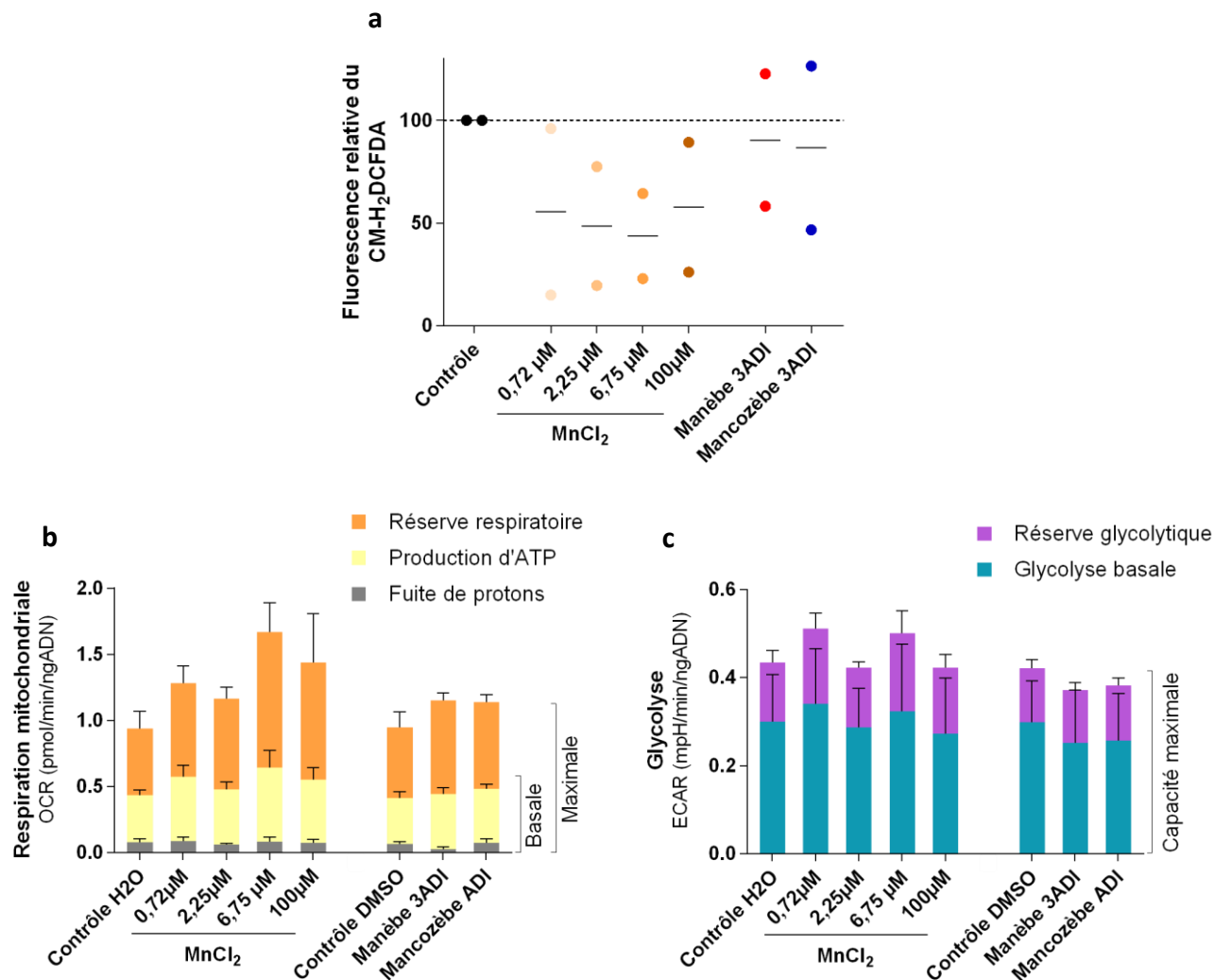


### **2.3. Les faibles doses de manganèse semblent améliorer le fonctionnement mitochondrial des CSM**

---

Le Mn est un élément métallique principalement stocké dans les mitochondries et il possède de nombreux rôles au sein de diverses protéines, dont l'enzyme antioxydante MnSOD. Son impact sur le métabolisme oxydatif et énergétique de CSM exposées durant 21 j à des concentrations croissantes de Mn, ou à la dose 3ADI de manèbe seul ou de mancozèbe seul, a donc été étudié.

Une tendance à la diminution des ROS a été mise en évidence par mesure de la fluorescence relative du CM-H<sub>2</sub>DCFDA (normalisée par rapport au contrôle H<sub>2</sub>O pour les conditions exposées au Mn et au contrôle DMSO pour les conditions exposées aux pesticides) dans les CSM exposées à de faibles doses de Mn, tandis que le niveau de ROS semblait proche de la condition contrôle pour les CSM exposées à la dose 3ADI de manèbe ou de mancozèbe. Parallèlement à cette diminution du stress oxydant et par rapport à la condition contrôle ( $0,50 \pm 0,13$  pmol/min/ngADN), une augmentation de la capacité de réserve respiratoire a été observée pour les CSM exposées aux faibles doses de Mn ( $0,72 \mu\text{M}$  :  $0,71 \pm 0,13$  pmol/min/ngADN ;  $2,25 \mu\text{M}$  :  $0,69 \pm 0,09$  pmol/min/ngADN ;  $6,75 \mu\text{M}$  :  $1,03 \pm 0,22$  pmol/min/ngADN ;  $100 \mu\text{M}$  :  $0,89 \pm 0,37$  pmol/min/ngADN). Les autres paramètres respiratoires ainsi que les paramètres glycolytiques n'ont pas été modifiés par l'exposition des CSM aux différentes doses de Mn, au manèbe seul ou au mancozèbe seul.



**Figure 21 : Effets sur le métabolisme oxydatif et énergétique des CSM après 21 j d'exposition à de faibles doses de manganèse, de manèbe ou de mancozèbe.**

(a) Le niveau de ROS (*reactive oxygen species*), quantifié par mesure de la fluorescence relative du CM-H<sub>2</sub>DCFDA, est légèrement diminué après exposition de 21 j au manganèse à faible dose ( $n = 2$ ). Le trait noir horizontal représente la moyenne pour chaque condition. (b) L'augmentation de l'OCR (*oxygen consumption rate*) des CSM exposées au manganèse est liée à l'augmentation de la capacité de réserve respiratoire et témoigne d'une amélioration du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. La glycolyse, quantifiée par la mesure de l'ECAR (*extracellular acidification rate*) ne semble pas modifiée par l'exposition au manganèse, au manèbe ou au mancozèbe. Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne.

## **PARTIE 4 : DISCUSSION**

Le lien entre exposition professionnelle à de fortes doses de pesticides et le développement de différentes hémopathies commence à être bien établi, notamment en ce qui concerne les hémopathies lymphoïdes<sup>46-49</sup> et plus récemment les LAM<sup>52</sup>. L'utilisation accrue des pesticides depuis de nombreuses années dans le milieu agricole entraîne une exposition indirecte de la population générale à une multitude de résidus de ces produits *via* l'ingestion d'aliments ou d'eau de boisson contaminés. De plus, de précédents travaux réalisés dans un modèle *in vitro* de CSM médullaires primaires, ont montré qu'une exposition à un cocktail combinant de très faibles doses des 7 pesticides les plus fréquemment rencontrés dans l'alimentation en France entraînait une altération morphologique et fonctionnelle des CSM<sup>53,55,56</sup>. Notre étude s'est donc intéressée à l'impact de l'imprégnation médullaire par les résidus de manèbe et de mancozèbe, deux pesticides présents dans ce cocktail et dépassant le plus souvent la limite maximale autorisée dans les aliments selon l'EFSA. Ainsi, des CSM médullaires primaires ont été exposées durant 21 j à de faibles doses de ces deux produits puis, dans un second temps, à de faibles concentrations de Mn, l'un des constituants essentiels du manèbe et du mancozèbe.

Dans un premier temps, les conséquences d'une exposition durant 21 j à de faibles doses de manèbe seul ou de mancozèbe seul ont été étudiées sur les CSM médullaires primaires. Une diminution de la prolifération ainsi qu'une augmentation de la sénescence ont été observées, comme cela a été rapporté dans les précédents travaux sur le cocktail de 7 pesticides<sup>53,56</sup>. Afin de décomposer les effets du cocktail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux effets du manèbe et du mancozèbe seuls. L'exposition au manèbe, au mancozèbe ou au cocktail des 5 autres pesticides n'était pas capable d'entraîner une diminution de la prolifération aussi importante que l'exposition au cocktail complet. Une tendance à l'augmentation globale de la sénescence a aussi été observée lorsque les CSM étaient exposées au manèbe, au mancozèbe ou au cocktail des 5 autres pesticides, sans qu'il ne puisse être mis en évidence d'augmentation dose-dépendante, dans la limite du faible effectif utilisé. Or, le phénomène de sénescence entraîne un arrêt du cycle cellulaire qui pourrait être à l'origine de la diminution de la prolifération observée dans les conditions exposées aux pesticides. À ce stade, nos résultats ne permettent pas d'affirmer que les dithiocarbamates représentent les principaux produits toxiques contenus dans le cocktail et la combinaison des 7 pesticides semble indispensable pour obtenir les effets biologiques maximaux. Or, les hautes autorités ne prennent pas en compte ces effets additifs et déterminent une ADI individuelle pour chaque pesticide<sup>38,61,88</sup>.

Les précédents travaux de Foucault *et al.* ont aussi mis en évidence une diminution de l'expression et de l'activité de l'ALDH2, une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acétaldéhyde, connue pour sa capacité à induire des cassures double brins de l'ADN<sup>56</sup>. Dans notre étude, une diminution de l'expression de l'ALDH2, confirmée au niveau protéique, a été observée dans les CSM lorsqu'elles étaient exposées au manèbe seul ou au mancozèbe seul sans qu'il ne puisse être établi de lien statistiquement significatif devant le faible effectif utilisé. De façon intéressante, les dithiocarbamates sont connus pour leur effet inhibiteur de l'activité des ALDH dans des neurones de rat et un lien potentiel a été établi dans la physiopathologie des maladies de Parkinson et d'Alzheimer<sup>92</sup>. De plus, le disulfirame, un inhibiteur des ALDH utilisé en thérapeutique, possède une structure de type dithiocarbamate<sup>93</sup>. Ainsi, il serait intéressant de quantifier l'activité des ALDH et de mesurer les taux d'acétaldéhyde présents au sein des CSM exposées au manèbe ou au mancozèbe.

En dehors de la diminution de la prolifération, les travaux publiés par Hochane *et al.* mettaient en évidence une orientation plus importante vers la différenciation adipocytaire lors d'une pré-exposition des CSM au cocktail de 7 pesticide. Or, d'après les données publiées par Shafat *et al.* les adipocytes soutiendraient l'hématopoïèse leucémique en lui fournissant des substrats énergétiques et un microenvironnement favorable<sup>54</sup>. Dans ce contexte, il serait pertinent d'évaluer l'implication du manèbe et du mancozèbe dans la différenciation adipocytaire des CSM.

De nombreuses données de la littérature corroborent l'implication des CSM dans le développement des hémopathies malignes. Après avoir observé l'impact de faibles doses de manèbe et de mancozèbe sur les CSM, il sera donc nécessaire d'étudier les potentiels effets de ces modifications sur l'hématopoïèse normale et leucémique. Ainsi, de premières données obtenues au sein de l'équipe, dans un modèle de co-culture de lignées leucémiques au contact de CSM préalablement exposées au cocktail de 7 pesticides, n'ont pas mis en évidence de modification de la prolifération ou du cycle cellulaire des cellules leucémiques. De plus amples études pourraient néanmoins être menées afin d'évaluer une potentielle modification de la sensibilité aux chimiothérapies des cellules leucémiques co-cultivées au contact de ces CSM. Les lignées cellulaires ne semblent cependant pas être un modèle de choix pour l'étude de ces très faibles doses de pesticides car des travaux préalables menés par l'équipe LNOx n'ont pas réussi à mettre en évidence de modifications de la prolifération ou du niveau de ROS au sein

de ces lignées, qui étaient pourtant retrouvées dans les CSM primaires exposées aux pesticides dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus dans notre étude pourraient servir, dans un second temps, à établir l'impact des pesticides sur l'hématopoïèse *in vivo*. À notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude, menée par Demur *et al.*, sur un modèle murin exposé à de faibles doses d'un mélange de 3 pesticides (atrazine, chlorpyrifos et endosulfan) ayant mis en évidence une anémie hémolytique d'origine probablement toxique chez les souris exposées<sup>94</sup>. Ainsi, un modèle de souris humanisée (xénogreffe de CSH humaines normales ou leucémiques chez une souris immunodéficiente) pourrait être exposé au cocktail de 7 pesticides *via* l'alimentation et les potentielles modifications des paramètres sanguins et médullaires pourraient être évalués à long terme. Cependant, ce modèle ne permettrait pas l'étude du développement d'hémopathies au sein d'un microenvironnement médullaire humain et certaines LAM, parmi les moins agressives, ne pourraient pas être étudiées en raison de la difficulté de greffe des cellules leucémiques au sein d'un microenvironnement murin. Ainsi, la récente technique de greffe « d'osselets humanisés », mise au point par Reinisch *et al.*, permettrait non seulement d'étudier le développement d'hémopathies au sein d'un microenvironnement humanisé mais aussi d'étudier l'implication de CSM pré-exposées aux pesticides puis greffées au sein de cet osselet afin de reconstituer un microenvironnement imprégné de ces substances phytopharmaceutiques<sup>95</sup>.

Dans un second temps, l'effet de faibles concentrations de Mn sur les CSM médullaires primaires a été étudié. Le Mn est un oligoélément essentiel au métabolisme cellulaire mais il possède aussi des effets toxiques bien décrits dans la littérature lors d'expositions chroniques à des doses plus élevées<sup>83</sup>. Il représente approximativement 21% du poids du manèbe et du mancozèbe et il pourrait jouer un rôle dans la toxicité de ces fongicides. En effet, d'après l'étude menée par Gunier *et al.*, une quantité accrue de Mn a été détectée dans des échantillons de poussière prélevés au sein d'habitations situées à proximité d'installations agricoles qui utilisaient des fongicides contenant du Mn<sup>96</sup>. De plus, Ferraz *et al.* ont rapporté les cas de deux agriculteurs exposés au manèbe ayant présenté un syndrome parkinsonien identique à celui retrouvé lors d'une exposition professionnelle chronique au Mn<sup>82</sup>. Enfin, de récents travaux effectués par l'équipe de P. Loyer (UMR1241, Rennes) semblaient attribuer une partie de l'effet toxique au Mn contenu dans ces pesticides. Ainsi, les effets d'une exposition durant 21 j à de faibles doses de Mn ont été étudiés sur les CSM médullaires primaires. Nos résultats mettent

en évidence une diminution dose-dépendante de la prolifération ainsi que des modifications morphologiques avec une augmentation de la taille des CSM, sans modification de leur viabilité. L'étude de la sénescence, quantifiée par méthode cytochimique dans les cellules exposées au Mn, n'a pas pu être exploitée car la  $\beta$ -galactosidase est une enzyme activée par des cations divalents métalliques dont le  $Mn^{2+}$ . Cette activation a notamment été décrite chez les bactéries dont la  $\beta$ -galactosidase est utilisée dans des procédés de l'industrie agroalimentaire (production de lait sans lactose)<sup>97,98</sup>. Ainsi, lors d'expériences préliminaires réalisées sur des CSM exposées à de faibles doses de Mn, il a été observé une augmentation très importante de la sénescence pour toutes les conditions, probablement liée à l'activation accrue de la  $\beta$ -galactosidase par le  $Mn^{2+}$ . Par ailleurs, si nos résultats n'ont pas permis d'objectiver une potentielle augmentation de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, une étude pourrait être réalisée par immunofluorescence afin de s'affranchir de l'augmentation artéfactuelle de son activité enzymatique. De plus, l'observation d'un arrêt du cycle cellulaire, une caractéristique de la sénescence<sup>99</sup>, pourrait expliquer la diminution de la prolifération observée pour les cellules exposées au Mn. Ainsi, une étude du cycle cellulaire sur des noyaux isolés de CSM a été réalisée mais les résultats de deux expériences indépendantes n'ont pas permis de conclure à une augmentation du nombre de cellules en phase G0/G1. Il sera donc nécessaire d'augmenter l'effectif de cette étude et d'analyser d'autres marqueurs (i) à l'origine du phénomène de sénescence (cassures de l'ADN) ou (ii) liés aux conséquences des cassures de l'ADN (augmentation de l'expression de la CKI p21, dosage des cytokines sécrétées par les cellules sénescents telles que l'IL-6)<sup>99</sup>.

Le Mn est connu pour son rôle pro-oxydant car il perturbe le fonctionnement de certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans le but d'évaluer l'effet de faibles concentrations de Mn sur le métabolisme oxydatif et énergétique, le niveau de ROS a été quantifié par mesure de la fluorescence du CM-H<sub>2</sub>DCFDA par cytométrie en flux. Une diminution dose dépendante des ROS a été observée lorsque les CSM étaient exposées aux concentrations les plus faibles de Mn (0,72  $\mu$ M ; 2,25  $\mu$ M et 6,75  $\mu$ M) alors que le manèbe et le mancozèbe ne semblaient pas modifier le niveau de ROS. Afin d'explorer l'origine de cette modification, le métabolisme énergétique des CSM a été analysé grâce à la technique Seahorse qui permet de déterminer les principaux paramètres respiratoires et glycolytiques cellulaires. Ainsi, les faibles concentrations de Mn étaient responsables d'une augmentation de la capacité de réserve respiratoire, traduisant une amélioration du fonctionnement global de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une étude réalisée en 2018 s'est intéressée aux modifications du

métabolisme énergétique d'une lignée cellulaire de glioblastome humain exposée au Mn de façon aigue. Les auteurs n'ont pas retrouvé de modification des paramètres respiratoires ou glycolytiques après une exposition instantanée à 50  $\mu$ M de Mn, une concentration bien supérieure à celles utilisées dans notre étude. De façon intéressante, ils ont aussi étudié l'impact d'une exposition aigue à 50  $\mu$ M de manèbe ou à 50  $\mu$ M de nabam, un dithiocarbamate ne contenant pas du Mn mais du sodium. L'exposition au manèbe était responsable d'une augmentation de la fuite de protons et d'une augmentation de la respiration non-mitochondriale entraînant une diminution de la capacité de réserve respiratoire. En revanche, il n'était pas observé d'effet significatif du nabam sur les paramètres respiratoires<sup>100</sup>. Ainsi, il semble que l'interaction entre la structure dithiocarbamate et le Mn soit indispensable pour générer un effet toxique à l'origine d'un découplage de la respiration mitochondriale dans les cellules exposées à une dose élevée de manèbe.

Dans le modèle étudié dans ce manuscrit, les concentrations en Mn utilisées étaient beaucoup plus faibles et la diminution du niveau de ROS ainsi que l'amélioration du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale pourraient s'expliquer par une activité accrue de la MnSOD. En effet, dans une étude menée sur le diabète, une augmentation de l'activité de la MnSOD a été décrite dans des cellules endothéliales de veine ombilicale humaines lorsque celles-ci étaient exposées à des concentrations de 5  $\mu$ M et de 10  $\mu$ M de Mn. Cette activité accrue de la MnSOD était alors responsable d'une diminution du niveau de ROS<sup>101</sup>. Ainsi, le Mn seul aux concentrations utilisées dans notre étude semble plutôt jouer un rôle anti-oxydant. Il serait intéressant de mesurer l'activité de la MnSOD dans les CSM exposées au Mn afin d'objectiver sa potentielle augmentation à l'origine de l'effet anti-oxydant. De plus, la réponse à un stress oxydant induit dans les CSM préalablement exposées aux faibles concentrations de Mn pourrait être étudiée en quantifiant le niveau de ROS à l'aide de sondes moléculaires telles que le CM-H<sub>2</sub>DCFDA (plus spécifique du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le MitoSOX™ (Invitrogen, plus spécifique de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>). L'expression des gènes cibles de Nrf2 ainsi que l'expression de gènes antioxydants (« antioxydogramme ») pourraient également être étudiées afin de mettre en évidence une potentielle réponse moléculaire des CSM à ce stress<sup>102</sup>.

À l'heure actuelle, les effets de ces très faibles doses de pesticides sur la santé humaine ne sont toujours pas connus même si certaines données commencent à émerger. Le choix des concentrations utilisées dans les modèles *in vitro* s'avère de plus un facteur confondant majeur. En effet, les auteurs se basent sur des enquêtes alimentaires permettant de déterminer les apports



journaliers quotidiens d'une population en pesticides à partir de la quantification de leurs résidus au sein d'un échantillon de produits alimentaires, sans tenir compte de l'eau de boisson. Cet apport journalier (exprimé en mg/kg de poids corporel/jour) est ensuite converti par les auteurs de ces études en concentration utilisée dans les milieux de culture. De plus, les modèles *in vitro* ne tiennent pas compte de la toxicocinétique de ces produits, en particulier des étapes d'absorption et de métabolisation potentielle. Ainsi, les concentrations auxquelles nous avons exposées nos CSM pourraient ne pas refléter l'imprégnation réelle du microenvironnement médullaire. Dans ce contexte, les concentrations en pesticides pourraient être quantifiées à partir des échantillons de moelle osseuse de sujets sains utilisés dans notre étude et prélevés dans le cadre du protocole HEALTHOX.

Les travaux réalisés dans notre étude ont permis d'obtenir les premières données concernant l'effet spécifique des dithiocarbamates (en particulier le manèbe et le mancozèbe) à faibles doses sur les CSM, l'un des composants cellulaires majeurs du microenvironnement médullaire. Ces premiers résultats semblent confirmer les effets néfastes d'un cocktail de résidus de pesticide présents dans l'alimentation et ouvrent de nombreuses perspectives sur la caractérisation des anomalies phénotypiques et moléculaires induites par l'exposition de la population générale à de très faibles doses de produits phytopharmaceutiques. À terme, ils devraient contribuer à l'acquisition de nouvelles connaissances concernant l'impact des pesticides sur l'hématopoïèse et leur éventuelle implication dans le développement d'hémopathies malignes.

## **PARTIE 5 : CONCLUSION**

Les résultats obtenus dans cette étude ont reproduit, dans une moindre mesure, les effets cellulaires (diminution de la prolifération et augmentation de la sénescence) précédemment observés dans les travaux de Hochane *et al.* et Foucault *et al.* De plus, la diminution de l'expression de l'*ALDH2* a aussi été retrouvée dans les CSM exposées à de faibles doses de manèbe seul ou de mancozèbe seul. Des analyses complémentaires devront être menées afin de confirmer les conséquences d'une telle exposition en termes de cassures doubles brins de l'ADN et de recrutement de la machinerie de réparation. Ces premiers résultats semblent néanmoins confirmer les effets additifs et délétères des nombreux résidus de pesticides omniprésents dans l'alimentation, auxquels la population générale est quotidiennement exposée.

Le Mn, connu pour être un toxique mitochondrial entraînant la génération de ROS, semble plutôt jouer un rôle anti-oxydant aux doses utilisées dans cette étude. Cet effet anti-oxydant pourrait expliquer l'amélioration du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'augmentation de la capacité de réserve respiratoire dans les CSM exposées aux faibles doses de Mn. Le mécanisme suspecté pourrait ainsi être lié à une augmentation de l'activité de la MnSOD, première étape de la détoxification des ROS, dont le fonctionnement pourrait être quantifié lors de futures expérimentations.

Enfin, même si les données de la littérature ne permettent pas à l'heure actuelle de confirmer l'impact des faibles doses de pesticides sur la santé humaine, de nombreux arguments mettent en évidence des mécanismes potentiellement impliqués dans cette toxicité. Ainsi, l'absence de preuve formelle de la toxicité des pesticides au sein de la population générale exacerbe les controverses qui entourent la réglementation et l'utilisation de ces produits. Néanmoins, de nombreuses recommandations, reposant sur un principe de précaution, ont été émises et le lavage, l'épluchage ou la cuisson des légumes font partie des moyens les plus efficaces pour limiter notre exposition à ces produits<sup>38</sup>.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2034–2045 (2006).
2. Jaiswal, S. & Ebert, B. L. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science* **366**, eaan4673 (2019).
3. Foudi, A., Zhang, Y., Liang, H., Wittner, M. & Louache, F. Environnement de la moelle osseuse et domiciliation des cellules souches hématopoïétiques. *EMC-Hématologie* **14**, 1–11 (2019).
4. Becker, A. J., McCulloch, E. A. & Till, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452–454 (1963).
5. Velten, L., Haas, S. F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., *et al.* Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat. Cell Biol.* **19**, 271–281 (2017).
6. Haas, S., Trumpp, A. & Milsom, M. D. Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Cell Stem Cell* **22**, 627–638 (2018).
7. Pinho, S. & Frenette, P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 303–319 (2019).
8. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25 (1978).
9. Domenech, J. What are mesenchymal stromal cells? Origin and discovery of mesenchymal stromal cells. in *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators* (eds. Bolontrade, M. F. & García, M. G.) 1–37 (Academic Press, 2017).
10. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V, Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230–247 (1968).
11. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K. & Lalykina, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* **3**, 393–403 (1970).
12. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. & Keiliss-Borok, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation* **17**, 331–340 (1974).
13. Friedenstein, A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. in *Immunobiology of Bone Marrow Transplantation. Haematology and Blood Transfusion* (eds. Thierfelder, S., Rodt, H. & Kolb, H. J.) vol. 25 19–29 (Springer, 1980).
14. Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
15. Visnjic, D., Kalajic, Z., Rowe, D. W., Katavic, V., Lorenzo, J., *et al.* Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**, 3258–3264 (2004).
16. Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–846 (2003).

17. Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Hauschka, P. V., Fahey, F., *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259–263 (2009).
18. North, T. E., Goessling, W., Peeters, M., Li, P., Ceol, C., *et al.* Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell* **137**, 736–748 (2009).
19. Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., *et al.* Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **116**, 4815–4825 (2010).
20. Tay, J., Lévesque, J.-P. & Winkler, I. G. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int. J. Hematol.* **105**, 129–140 (2017).
21. Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., *et al.* Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1321–1326 (2014).
22. Lévesque, J.-P., Helwani, F. M. & Winkler, I. G. The endosteal ‘osteoblastic’ niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* **24**, 1979–1992 (2010).
23. Lennartsson, J. & Rönstrand, L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* **92**, 1619–1649 (2012).
24. Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., *et al.* Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* **508**, 269–273 (2014).
25. McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652–659 (2000).
26. Picou, F., Vignon, C., Debeissat, C., Lachot, S., Kosmider, O., *et al.* Bone marrow oxidative stress and specific antioxidant signatures in myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* **3**, 4271–4279 (2019).
27. Nolfi-Donagan, D., Braganza, A. & Shiva, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* **37**, 101674 (2020).
28. Blau, O., Hofmann, W.-K., Baldus, C. D., Thiel, G., Serbent, V., *et al.* Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **35**, 221–229 (2007).
29. Geyh, S., Rodríguez-Paredes, M., Jäger, P., Khandanpour, C., Cadeddu, R.-P., *et al.* Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 683–691 (2016).
30. Von der Heide, E. K., Neumann, M., Vosberg, S., James, A. R., Schroeder, M. P., *et al.* Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* **31**, 1069–1078 (2017).
31. Walkley, C. R., Olsen, G. H., Dworkin, S., Fabb, S. A., Swann, J., *et al.* A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor  $\gamma$  deficiency. *Cell* **129**, 1097–1110 (2007).

32. Raaijmakers, M. H. G. P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852–857 (2010).
33. Zambetti, N. A., Ping, Z., Chen, S., Kenswil, K. J. G., Mylona, M. A., *et al.* Mesenchymal inflammation drives genotoxic stress in hematopoietic stem cells and predicts disease evolution in human pre-leukemia. *Cell Stem Cell* **19**, 613–627 (2016).
34. Dong, L., Yu, W.-M., Zheng, H., Loh, M. L., Bunting, S. T., *et al.* Leukaemogenic effects of *Ptpn11* activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature* **539**, 304–308 (2016).
35. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Pesticides indicators. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize> (consulté le : 05/08/2021).
36. Cook, E., Rybkowska, A. & Selenius, J. *Farm structure survey 2016*. (Eurostat Press Office, 2018).
37. Commission européenne. EU Pesticides database. [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en) (consulté le : 05/08/2021).
38. European Food Safety Authority (EFSA). The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **19**, 6491 (2021).
39. Ministère de la Transition écologique et solidaire. *Plan Écophyto II+*. (2021).
40. Inserm. *Pesticides : effets sur la santé. Collection Expertise collective*. Inserm (Lavoisier, 2013).
41. Inserm. *Pesticides et effets sur la santé : nouvelles données. Collection Expertise collective*. (EDP Sciences, 2021).
42. Kim, K.-H., Kabir, E. & Jahan, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **575**, 525–535 (2017).
43. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
44. Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
45. Le Guyader-Peyrou, S., Defossez, G., Dantony, E., Mounier, M., Cornet, É., *et al.* *Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 - Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim*. (Santé Publique France, 2019).
46. Mills, P. K., Yang, R. & Riordan, D. Lymphohematopoietic cancers in the United Farm Workers of America (UFW), 1988-2001. *Cancer Causes Control* **16**, 823–830 (2005).
47. De Roos, A. J., Zahm, S., Cantor, K., Weisenburger, D., Holmes, F., *et al.* Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup. Environ. Med.* **60**, e11 (2003).

48. Leon, M. E., Schinasi, L. H., Lebailly, P., Beane Freeman, L. E., Nordby, K.-C., *et al.* Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *Int. J. Epidemiol.* **48**, 1519–1535 (2019).
49. Lamure, S., Carles, C., Aquereburu, Q., Quittet, P., Tchernonog, E., *et al.* Association of occupational pesticide exposure with immunochemotherapy response and survival among patients with diffuse large B-cell lymphoma. *JAMA Netw. Open* **2**, e192093 (2019).
50. Jin, J., Yu, M., Hu, C., Ye, L., Xie, L., *et al.* Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: a meta-analysis based on 1,942 cases and 5,359 controls. *PLoS One* **9**, e110850 (2014).
51. Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S. & Lison, D. A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure. *Cancer Causes Control* **18**, 457–478 (2007).
52. Foucault, A., Vallet, N., Ravalet, N., Picou, F., Bene, M. C., *et al.* Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case–control studies including 3,955 cases and 9,948 controls. *Sci. Rep.* **11**, 2007 (2021).
53. Hochane, M., Trichet, V., Pecqueur, C., Avril, P., Oliver, L., *et al.* Low-dose pesticide mixture induces senescence in normal mesenchymal stem cells (MSC) and promotes tumorigenic phenotype in premalignant MSC. *Stem Cells* **35**, 800–811 (2017).
54. Shafat, M. S., Oellerich, T., Mohr, S., Robinson, S. D., Edwards, D. R., *et al.* Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood* **129**, 1320–1332 (2017).
55. Leveque, X., Hochane, M., Geraldo, F., Dumont, S., Gratas, C., *et al.* Low-dose pesticide mixture induces accelerated mesenchymal stem cell aging in vitro. *Stem Cells* **37**, 1083–1094 (2019).
56. Foucault, A., Ravalet, N., Besombes, J., Picou, F., Gallay, N., *et al.* Low-dose pesticide cocktail alters primary human bone marrow mesenchymal stem cells through ALDH2 inhibition. *Submitted*.
57. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation de l’Environnement et du Travail (ANSES). E-Phy - Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture autorisés en France. <https://ephy.anses.fr/> (consulté le : 27/04/2021).
58. University of Hertfordshire. Pesticide properties database. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb> (consulté le : 17/05/2020).
59. Hurt, S., Ollinger, J., Arce, G., Bui, Q., Tobia, A. J., *et al.* Dialkyldithiocarbamates (EBDCs). in *Hayes’ Handbook of Pesticide Toxicology* (ed. Krieger, R.) vol. 1 1689–1710 (Academic Press, 2010).
60. Règlement d’exécution (UE) n° 2020/2087 de la Commission du 14 décembre 2020 portant sur le non-renouvellement de l’approbation de la substance active « mancozèbe », conformément au règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. *JO L 423 du 15.12.2020* 50–52.
61. European Food Safety Authority (EFSA). The 2017 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **17**, 5743 (2019).



62. Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Mancozèbe - Fiche toxicologique n°277. (2010).
63. Higo, A., Ohtake, N., Saruwatari, K. & Kanzaki, T. Photoallergic contact dermatitis from mancozeb, an agricultural fungicide. *Contact Dermatitis* **35**, 183 (1996).
64. Koch, P. Occupational allergic contact dermatitis and airborne contact dermatitis from 5 fungicides in a vineyard worker. Cross-reactions between fungicides of the dithiocarbamate group? *Contact Dermatitis* **34**, 324–329 (1996).
65. Steenland, K., Cedillo, L., Tucker, J., Hines, C., Sorensen, K., *et al.* Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico. *Environ. Health Perspect.* **105**, 1126–1130 (1997).
66. Panganiban, L. R., Cortes-Maramba, N., Dioquino, C., Suplido, M. L., Ho, H., *et al.* Correlation between blood enthylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environ. Health Perspect.* **112**, 42–45 (2004).
67. Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X. & Ritz, B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am. J. Epidemiol.* **169**, 919–926 (2009).
68. Pouchieu, C., Piel, C., Carles, C., Gruber, A., Helmer, C., *et al.* Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int. J. Epidemiol.* **47**, 299–310 (2018).
69. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. <https://monographs.iarc.fr> (consulté le : 28/04/2020).
70. United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Chemicals evaluated for carcinogenic potential - Annual cancer report 2018*. (2018).
71. Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D., *et al.* Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (mancozeb) in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **982**, 123–136 (2002).
72. Nordby, K. C., Andersen, A., Irgens, L. M. & Kristensen, P. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scand. J. Work. Environ. Heal.* **31**, 89–96 (2005).
73. Paro, R., Tiboni, G. M., Buccione, R., Rossi, G., Cellini, V., *et al.* The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **260**, 155–161 (2012).
74. Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., *et al.* DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **211**, 87–96 (2006).
75. Colle, D., Farina, M., Ceccatelli, S. & Raciti, M. Paraquat and maneb exposure alters rat neural stem cell proliferation by inducing oxidative stress: new insights on pesticide-induced neurodevelopmental toxicity. *Neurotox. Res.* **34**, 820–833 (2018).
76. Šarić, M. & Lucchini, R. Manganese. in *Handbook on the toxicology of metals* (eds. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M. & Friberg, L. T.) 645–674 (Academic Press, 2007).
77. Roth, J. A. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biol. Res.* **39**, 45–57 (2006).

78. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on dietary reference values for manganese. *EFSA J.* **11**, 3149 (2013).
79. Williams, M., Todd, G. D., Roney, N., Crawford, J., Coles, C., *et al.* *Toxicological profile for manganese*. (United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012).
80. Katz, N. & Rader, D. J. Manganese homeostasis: from rare single-gene disorders to complex phenotypes and diseases. *J. Clin. Invest.* **129**, 5082–5085 (2019).
81. Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Dioxyde de manganèse - Fiche toxicologique n°52. (2015).
82. Ferraz, H. B., F. Bertolucci, P. H., Pereira, J. S., Lima, J. G. C. & F. Andrade, L. A. Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology* **38**, 550–553 (1988).
83. Li, L. & Yang, X. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: Links and interactions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–11 (2018).
84. Case, A. J., Madsen, J. M., Motto, D. G., Meyerholz, D. K. & Domann, F. E. Manganese superoxide dismutase depletion in murine hematopoietic stem cells perturbs iron homeostasis, globin switching, and epigenetic control in erythrocyte precursor cells. *Free Radic. Biol. Med.* **56**, 17–27 (2013).
85. Sunuwar, L., Frkatović, A., Sharapov, S., Wang, Q., Neu, H. M., *et al.* Pleiotropic ZIP8 A391T implicates abnormal manganese homeostasis in complex human disease. *JCI Insight* **5**, e140978 (2020).
86. Guermouche, H., Ravalet, N., Gallay, N., Deswarte, C., Foucault, A., *et al.* High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Adv.* **4**, 3550–3557 (2020).
87. Delorme, B. & Charbord, P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Med.* **140**, 67–81 (2007).
88. European Food Safety Authority (EFSA). 2008 annual report on pesticide residues according to article 32 of regulation (EC) No 396/2005. *EFSA J.* **8**, 1646 (2010).
89. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
90. Watson, J. V., Chambers, S. H. & Smith, P. J. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* **8**, 1–8 (1987).
91. Bourgeais, J. & Héroult, O. In vitro analysis of energy metabolism in bone-marrow mesenchymal stromal cells. in *Bone marrow environment. Methods in molecular biology* (eds. Espéli, M. & Balabanian, K.) 59–70 (Humana, 2021).
92. Fitzmaurice, A. G., Rhodes, S. L., Cockburn, M., Ritz, B. & Bronstein, J. M. Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology* **82**, 419–426 (2014).
93. Kaul, L., Süß, R., Zannettino, A. & Richter, K. The revival of dithiocarbamates: from pesticides to innovative medical treatments. *iScience* **24**, 102092 (2021).
94. Demur, C., Métais, B., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., *et al.* Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology* **308**, 74–87 (2013).

95. Reinisch, A., Hernandez, D. C., Schallmoser, K. & Majeti, R. Generation and use of a humanized bone-marrow-ossicle niche for hematopoietic xenotransplantation into mice. *Nat. Protoc.* **12**, 2169–2188 (2017).
96. Gunier, R. B., Jerrett, M., Smith, D. R., Jursa, T., Yousefi, P., *et al.* Determinants of manganese levels in house dust samples from the CHAMACOS cohort. *Sci. Total Environ.* **497–498**, 360–368 (2014).
97. Banerjee, G., Ray, A. & Hasan, K. N. Is divalent magnesium cation the best cofactor for bacterial  $\beta$ -galactosidase? *J. Biosci.* **43**, 941–945 (2018).
98. Ibrahim, S. A., Alazzeah, A. Y., Awaisheh, S. S., Song, D., Shahbazi, A., *et al.* Enhancement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activity in *Lactobacillus reuteri* by different metal ions. *Biol. Trace Elem. Res.* **136**, 106–116 (2010).
99. Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **128**, 1238–1246 (2018).
100. Anderson, C. C., Aivazidis, S., Kuzyk, C. L., Jain, A. & Roede, J. R. Acute maneb exposure significantly alters both glycolysis and mitochondrial function in neuroblastoma cells. *Toxicol. Sci.* **165**, 61–73 (2018).
101. Burlet, E. & Jain, S. K. Manganese supplementation reduces high glucose-induced monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *J. Biol. Chem.* **288**, 6409–6416 (2013).
102. Hérault, O. Vignon, C. Method for diagnosing hematological disorders – Brevet WO2012085188 A1 du 22/06/2011 (2012).

## **ANNEXES**

## Annexe 1

### Classement des pesticides par le CIRC

Les molécules cancérogènes chez l'Homme ont été classées par le CIRC en différentes catégories selon les études réglementaires, mécanistiques et épidémiologiques :

- Groupe 1 : l'agent est cancérogène pour l'Homme.
- Groupe 2A : l'agent est probablement cancérogène pour l'Homme.
- Groupe 2B : l'agent est peut-être cancérogène pour l'Homme.
- Groupe 3 : l'agent est inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme.
- Groupe 4 : l'agent n'est probablement pas cancérogène pour l'Homme.

Classement		Substance active	Famille chimique
<b>Groupe 1</b>	Arsenic et dérivés inorganiques	Protection du bois, fongicide, insecticide	
	Lindane	Insecticide	Organochloré
	Oxyde d'éthylène (oxacyclopropane, ...)	Fumigant	Époxyde
	Pentachlorophénol	Insecticide, protection du bois	Organochloré
<b>Groupe 2A</b>	Aldrine	Insecticide	Organochloré
	Captafol	Fongicide	Sulfanilamide
	Diazinon	Insecticide	Organophosphoré
	Dibromure d'éthylène	Fumigant	Dérivé halogéné
	Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	Insecticide	Organochloré
	Dichlorométhane	Insecticide	Chlorure de méthylène
	Dieldrine	Insecticide	Organochloré
	Glyphosate	Herbicide	Aminophosphonates glycine
	Insecticides non arsenicaux		
	Malathion	Insecticide	Organophosphoré
<b>Groupe 2B</b>	1,2-Dibromo-3-chloropropane	Fumigant, nématocide	Dérivé halogéné
	1,3-Dichloropropène	Fumigant, nématocide	Dérivé halogéné
	2,4,6-Trichlorophénol	Insecticide, protection du bois	Organochloré
	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	Herbicide	
	Aramite	Acaricide	2-(4-tert-Butylphénoxy) isopropyl-2-chloroéthyl sulfate
	Chlordane	Insecticide	Organochloré
	Chlordécone	Insecticide	Organochloré
	Chlorophénols	Préservation du bois, antifongiques, herbicides	Organochlorés
	Chlorophénoxy herbicides	Herbicides	
	Chlorothalonil	Fongicide	Organochloré
	Dichlorvos	Insecticide	Organophosphoré
	Heptachlore	Insecticide	Organochloré
	Hexachlorobenzène	Fongicide	Organochloré
	Hexachlorocyclohexanes	Insecticides	Organochlorés
	Mirex	Insecticide	Organochloré

	Nitrofène	Herbicide	Oxyde de 2,4-dichlorophényle et de 4-nitrophényle
	Parathion	Insecticide	Organophosphoré
	Sulfallate	Herbicide	Dithiocarbamate
	Tétrachlorvinphos	Insecticide	Organophosphoré
	Toxaphène	Insecticide	Organochloré
<b>Groupe 3</b>	Aldicarbe	Insecticide	Carbamate
	Amitrole	Insecticide	Organochloré
	Atrazine	Herbicide	Triazine
	Bis(2-chloro-1-méthyléthyl) éther	Fumigant	Dérivé chloré
	Captan	Fongicide	Dicarboximide
	Carbaryl	Insecticide	Carbamate
	Chlordiméforme	Acaricide	Formamidine
	Chlorobenzilate	Acaricide	Organochloré
	Chloroprophame	Herbicide	Carbamate
	Oxyquinoléate de cuivre	Fongicide, biocide	Quinoléine
	Deltaméthrine	Insecticide	Pyréthrinoïdes
	Diallate	Herbicide	Thiocarbamate
	Dicofol	Acaricide	Organochloré
	Diméthoxane	Fongicide	2,4-Diméthyl-6-m- dioxanyl acétate
	Endrine	Insecticide	Organochloré
	Ethyl selenac	Fongicide	Thiocarbamate
	Fenvalérate	Insecticide	Pyréthrinoïde
	Ferbame	Fongicide	Dithiocarbamate
	Fluometuron	Herbicide	Diméthyl-3-[3- (trifluorométhyl)phényl] urée
	Manèbe	Fongicide	Dithiocarbamate
	Méthoxychlore	Insecticide	Organochloré
	Méthyle (bromure de)	Fumigant	Hydrocarbure aliphatique bromé
	Méthyl carbamate	Insecticide	Carbamate
	Méthyle (iodure de)	Traitement du sol	Dérivé iodé
	Monuron	Herbicide	Diméthylurée
	Pentachloroéthane	Traitement du sol	Hydrocarbure aliphatique chloré
	Perméthrine	Insecticide	Pyréthrinoïde
	Piclorame	Herbicide	Dérivé de l'acide chloropicolinique
	Pipéronyl butoxide	Synergiste	Benzodioxole
	Prophame	Herbicide	Carbamate
	Quintozone	Fongicide	Pentachloronitrobenzène
	Simazine	Herbicide	Dérivé chloré de la triazine
	Terpène polychlorinés (Strobane)	Insecticides	Organochlorés
	Thirame	Fongicide	Dithiocarbamate
	Trichlorfon	Insecticide	Organophosphoré
	Trifluraline	Herbicide	Toluidine
	Zectran (Mexacarbate)	Insecticide	Carbamate
	Zinèbe	Fongicide	Dithiocarbamate
	Zirame	Fongicide	Dithiocarbamate

## Annexe 2

### **Familles et substances actives impliquées dans les excès de risques significatifs de leucémies d'après l'expertise collective menée par l'Inserm (2021).**

Il est à noter que de nombreuses études parmi les plus anciennes ne différencient pas les types de leucémies et regroupent sous cette appellation des pathologies aussi diverses que les leucémies lymphoïdes chroniques, les leucémies aiguës myéloïdes et les leucémies aiguës lymphoblastiques. Les présomptions de liens présentées dans le tableau ci-dessous concernent donc une combinaison de ces pathologies.

<b>Famille</b> Substance actives	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
<b>Organochlorés</b>		
Organochlorés (sans distinction)	Applicateurs	+
Lindane	Applicateurs	+
DDT	Applicateurs	+
Heptachlore	Applicateurs	+
Chlordane + heptachlore	Applicateurs	+
Toxaphène	Agriculteurs	+
<b>Organophosphorés</b>		
Chlorpyrifos	Applicateurs	+
Diazinon	Applicateurs	+
Fonofos	Applicateurs	+
Malathion	Agricultrices	+
Terbufos	Applicateurs	+
<b>Carbamates/Thiocarbamates/Dithiocarbamates</b>		
S-éthyl-dipropylthiocarbamate (EPTC)	Applicateurs	+
Mancozèbe	Agriculteurs	+
<b>Pyréthrinoïdes</b>		
Deltaméthrine	Agriculteurs	+ <sup>a</sup>
<b>Chloroacétanilides</b>		
Alachlore	Ouvriers en industrie de production	+
<b>Aminophosphonate glycine</b>		
Glyphosate	Agriculteurs	±

+ présomption moyenne, d'après les résultats d'une cohorte ou d'une étude cas-témoins nichée.

+<sup>a</sup> présomption moyenne, d'après les résultats de la méta-analyse de trois cohortes d'agriculteurs (Agricoh).

± présomption faible, d'après les résultats suggérés pour les LAM dans une cohorte.

### **Annexe 3**

**Concentrations en pesticides utilisées dans les milieux de culture.**

	<b>Concentrations finales dans les milieux de culture (µM)</b>		
	<b>%ADI</b>	<b>ADI</b>	<b>3ADI</b>
<b>Manèbe</b>	0,730	2,262	6,785
<b>Mancozèbe</b>	0,720	2,251	6,754
<b>Iprodione</b>	0,010	2,181	6,542
<b>Imazalile</b>	0,070	1,009	3,028
<b>Chlorpyrifos éthyle</b>	0,010	0,342	1,027
<b>Diazinon</b>	0,003	0,008	0,024
<b>Diméthoate</b>	0,010	0,052	0,157



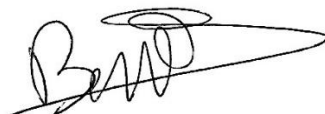
## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné **Joévin BESOMBES**

Déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publié constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée (*Décret n° 92-657 du 13 juillet 1992*).

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21809236

N° Thèse : 87

Nom et Prénom : **BESOMBES Joévin**

Sujet : **Effets de faibles doses de manèbe et de mancozèbe sur les cellules stromales  
mésenchymateuses médullaires primaires**

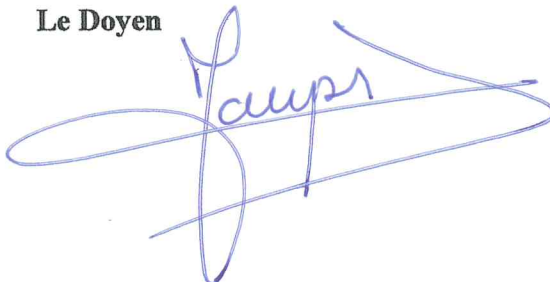
Tours, le 11/10/2021

La Directrice de Thèse :

Mme le Docteur Amélie Foucault



**Vu et Transmis :  
Le Doyen**



**Joévin Besombes**

**N°87**

**TITRE :**

**Effets de faibles doses de manèbe et de mancozèbe sur des cellules stromales mésenchymateuses médullaires primaires**

**RÉSUMÉ :**

L'exposition aux pesticides et leurs impacts sur la santé humaine et l'environnement sont aujourd'hui des problématiques majeures de santé publique. Dans cette étude, des cellules stromales mésenchymateuses médullaires primaires (CSM) ont été exposées durant 21 jours à de faibles doses de manèbe ou de mancozèbe, deux pesticides dépassant le plus souvent la limite maximale autorisée dans les aliments. Il a ainsi été observé une diminution de la prolifération des CSM, concomitante à une augmentation de leur sénescence. Il a également été mis en évidence une diminution de l'expression de l'aldéhyde déshydrogénase 2 (ALDH2), une enzyme essentielle au catabolisme de l'acétaldéhyde responsable de cassures de l'ADN. Enfin, les CSM ont été exposées à de faibles concentrations de manganèse, constituant essentiel du manèbe et du mancozèbe, entraînant une baisse de leur prolifération sans altérer le fonctionnement de leur chaîne respiratoire mitochondriale.

**MOTS-CLEFS :** Exposition aux pesticides / Manganèse / CSM / ALDH2 / Métabolisme énergétique.

**JURY :**

**Présidente :**

Mme le Professeur Claire Pouplard, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de Tours

**Membres :**

M. le Professeur Emmanuel Gyan, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de Tours

M. le Professeur Olivier Hérault, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de Tours

Mme le Docteur Amélie Foucalt, AHU, Faculté de Pharmacie et CHRU de Tours

**DATE ET LIEU DE SOUTENANCE :** 11/10/2021 à la Faculté de Pharmacie de Tours